



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento De Química Farmacológica y Toxicológica
Laboratorio de Productos Naturales

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES INHIBITORIAS SOBRE ENZIMAS QUE REGULAN LA GLICEMIA DE EXTRACTOS DE HOJAS DE DIFERENTES GENOTIPOS DE *UGNI MOLINAE*.

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

ÍTALO ALEJANDRO BUGUEÑO DÍAZ

Profesora Patrocinante

Dra. Carla Delporte V.
Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

Directores de Tesis

Dra. Carla Delporte V.
Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica
Dra. Ivette Seguel B.
Directora del Instituto de
Investigación Agropecuaria,
Carillanca.

Santiago, Chile
2015

A mis pilares

Agradecimientos

Agradezco a mi familia que siempre ha creído y confiado en mí, y principalmente agradezco a mis padres, Carmen Díaz Carrasco y Fredy Bugueño Araya, quienes se han dedicado durante toda mi vida a apoyarme con su amor y cariño, quienes han sudado y luchado para lograr una vida estable y feliz para mis hermanos y para mí. De su fuerza de voluntad me he nutrido y aprendido que ante cualquier adversidad, siempre hay que luchar por los sueños, los obstáculos existen para aprender.

Agradezco a mis hermanos, quienes siempre creyeron en mis capacidades, y ante cualquier problema que yo haya o he de tener, ellos estarán para apoyarme. De mis hermanos destaco mucho a Patricia, quien cambió la mentalidad en la familia y demostró que ser profesional es para quien lo desee de verdad, que las metas son alcanzables si uno se esfuerza por ello. Ella siempre estimuló mi creatividad y mis capacidades, vio el potencial en mi interior y me hizo sentir orgulloso de ello.

Agradezco a mis amigos y compañeros, quienes estuvieron para compartir grandes experiencias y momentos felices. La amistad para mí ha sido un anhelo lejano, pero en estos últimos años he podido volver a confiar en el sentimiento de amistad, las grandes personas que me han aceptado tal cual como soy, y han querido compartir sus experiencias conmigo, de verdad las estimo y agradezco mucho. Yo siempre estaré para apoyarlos cuando lo necesiten.

Agradezco a todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Productos Naturales, todos me han ayudado mucho en este proceso de investigación y aprendizaje. Gracias a Jorge, quien fue mi guía en esta memoria y siempre tuvo una mano para ayudarme. También agradezco mucho a la Profesora Carla Delporte, quien confió y me dio esta

oportunidad para desarrollar mi sueño como investigador, gracias por todo el aprendizaje que he tenido durante este proceso.

Finalmente agradezco a la persona más importante para mí durante estos últimos nueve años, con ella hemos crecido y aprendido, hemos compartido muchas experiencias, me ha ayudado a desarrollarme como persona, ha creído siempre en mí y siempre me ha dado su mano para poder nuevamente levantarme y seguir luchando. Eres mi luna, mi complemento, mi luz, eres mi preciosa y mi más importante pilar durante todo este tiempo. De verdad, te agradezco con todo mi corazón mi pequeñita Evelyn.

Financiamiento

Esta memoria fue financiada por el proyecto FONDECYT N°1130155 dirigido por la Dra. Carla Delporte Vergara

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | II |
| ÍNDICE DE TABLAS | III |
| ÍNDICE DE ANEXOS | IV |
| ABREVIATURAS | V |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 ANTECEDENTES | 1 |
| 1.2. ESTUDIOS QUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS PREVIOS | 2 |
| 1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA | 7 |
| 2. HIPÓTESIS | 8 |
| 3. OBJETIVOS | 8 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL | 8 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 8 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 9 |
| 4.1 REACTIVOS | 9 |
| 4.2 MATERIAL VEGETAL | 10 |
| 4.3 ESTUDIOS QUÍMICOS | 12 |
| 4.3.1 <i>Obtención de extractos seriados de Ugni molinae</i> | 12 |
| 4.4 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> | 13 |
| 4.4.1 <i>Ensayo inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa)</i> | 13 |
| 4.4.2 <i>Ensayo inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)</i> | 17 |
| 4.4.3 <i>Tratamiento de datos</i> | 21 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 22 |
| 5.1 ESTUDIOS QUÍMICOS | 22 |
| 5.1.1 <i>Obtención de los EAEs y EETs</i> | 22 |
| 5.2 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS | 23 |
| 5.2.1 <i>Ensayo de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa)</i> | 23 |
| 5.2.2 <i>Ensayo de inhibición de la enzima proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)</i> | 36 |
| 6. CONCLUSIONES | 43 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 44 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Esqueleto ursano | 2 |
| Figura 2. Esqueleto lupano..... | 3 |
| Figura 3. Esqueleto oleanano..... | 3 |
| Figura 4. Esqueleto flavonoles | 4 |
| Figura 5. Epicatequina | 4 |
| Figura 6. Ácido gálico | 4 |
| Figura 7. <i>Ugni molinae</i> | 7 |
| Figura 8. Proceso de extracción seriada de las hojas de <i>Ugni molinae</i> | 13 |
| Figura 9. Acción de la enzima glicógeno fosforilasa sobre el glicógeno | 15 |
| Figura 10. Curva de inhibición enzimática del compuesto de referencia frente a la GPa..... | 26 |
| Figura 11. Curva de inhibición de GPa del EAE 14-4 | 28 |
| Figura 12. Curva de inhibición de GPa del EAE 8-2 | 28 |
| Figura 13. Curva de inhibición de GPa del EAE 19-1ha | 28 |
| Figura 14. Curva de inhibición de GPa del EAE ZF-18 | 28 |
| Figura 15. Curva de inhibición de GPa del EAE 23-2 | 29 |
| Figura 16. Curva de inhibición de GPa del EAE 19-1 | 29 |
| Figura 17. Curva de inhibición de GPa del EAE 31-1 | 29 |
| Figura 18. Curva de inhibición de GPa del EAE 19-2 | 29 |
| Figura 19. Curva de inhibición de GPa del EAE 22-1 | 29 |
| Figura 20. Curva de inhibición de GPa del EAE 27-1 | 29 |
| Figura 21. Curva de inhibición de GPa del EET 19-2 | 31 |
| Figura 22. Curva de inhibición de GPa del EET 27-1 | 31 |
| Figura 23. Curva de inhibición de GPa del EET 23-2 | 31 |
| Figura 24. Curva de inhibición de GPa del EET 31-1 | 31 |
| Figura 25. Curva de inhibición de GPa del EET 22-1 | 31 |
| Figura 26. Curva de inhibición de GPa del EET ZF-18 | 31 |
| Figura 27. Curva de inhibición de GPa del EET 19-1ha | 32 |
| Figura 28. Curva de inhibición de GPa del EET 8-2 | 32 |
| Figura 29. Curva de inhibición de GPa del EET 14-4 | 32 |
| Figura 30. Curva de inhibición de GPa del EET 19-1 | 32 |
| Figura 31. Curva de inhibición enzimática del compuesto de referencia frente a la PTP1B | 38 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Ácidos triterpénicos derivados del esqueleto ursano | 2 |
| Tabla 2. Ácidos triterpénicos derivados del esqueleto lupano..... | 3 |
| Tabla 3. Ácidos triterpénicos derivados del esqueleto oleanano | 3 |
| Tabla 4. Flavonoles..... | 4 |
| Tabla 5. Genotipos, procedencia, número de registro de testigo herbario y criterios de selección de los genotipos de <i>Ugni molinae</i> utilizados en este estudio | 11 |
| Tabla 6. Resumen del ensayo de inhibición de GPa | 14 |
| Tabla 7. Resumen del ensayo de inhibición de PTP1B..... | 18 |
| Tabla 8. Rendimientos del procedimiento de extracción seriada de las hojas de <i>Ugni molinae</i> expresados en % p/p..... | 22 |
| Tabla 9. Resultados de la inhibición sobre la GPa de la cafeína | 23 |
| Tabla 10. Porcentaje de inhibición sobre la GPa de los EAEs de murtila | 24 |
| Tabla 11. CI_{50} frente a la GPa de los EAEs de cada genotipo evaluado | 24 |
| Tabla 12. Porcentaje de inhibición sobre la GPa de los EETs de murtila..... | 27 |
| Tabla 13. CI_{50} frente a la GPa de los EETs de cada genotipo evaluado..... | 27 |
| Tabla 14. Significancia estadística del efecto inhibitorio de los EAEs de los distintos genotipos de murtila frente a GPa | 30 |
| Tabla 15. Significancia estadística del efecto inhibitorio de los EETs de los distintos genotipos de murtila frente a GPa | 31 |
| Tabla 16. CI_{50} de los EAEs y EETs de las hojas de distintos genotipos evaluados de <i>Ugni molinae</i> y cafeína sobre GPa..... | 32 |
| Tabla 17. Valores de CI_{50} frente a la GPa de los triterpenoides pentacíclicos presentes en las hojas de murtila | 35 |
| Tabla 18. Valores de CI_{50} frente a la GPa de diferentes polifenoles presentes en las hojas de murtila | 35 |
| Tabla 19. Resultados de la inhibición sobre la PTP1B del compuesto de referencia..... | 36 |
| Tabla 20. Inhibición sobre la PTP1B de los EAEs de murtila | 37 |
| Tabla 21. Inhibición sobre la PTP1B de los EETs de murtila..... | 37 |
| Tabla 22. Inhibición sobre la PTP1B de los EAEs de murtila..... | 37 |
| Tabla 23. Inhibición sobre la PTP1B de los EETs de murtila..... | 38 |
| Tabla 24. Valores de las CI_{50} de los polifenoles presentes en las hojas de murtila frente a la PTP1B..... | 40 |
| Tabla 25. Valores de las CI_{50} de los triterpenoides pentacíclicos presentes en las hojas de murtila frente a la PTP1B..... | 40 |
| Tabla 26. Significancia estadística del efecto inhibitorio de los EAEs de los distintos genotipos de murtila frente a PTP1B..... | 41 |
| Tabla 27. Significancia estadística del efecto inhibitorio de los EETs de los distintos genotipos de murtila frente a PTP1B..... | 42 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| Anexo 1: Testigos Herbarios de los 10 genotipos de murtila..... | 49 |
| Anexo 2: Resumen de congreso asistido..... | 54 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| INIA: | Instituto de Investigación Agropecuaria |
| RAPD: | ADN polimórfico amplificado al azar |
| DMT2: | Diabetes mellitus tipo 2 |
| GP _a : | Glicógeno fosforilasa a |
| PTP1B: | Proteína tirosina fosfatasa 1B |
| EAEs: | Extractos de acetato de etilo |
| EETs: | Extractos etanólicos |
| HCl: | Ácido clorhídrico |
| HEPES: | Ácido 4-(2- hidroxil etil)-1-piperazin etano sulfónico |
| DMSO: | Dimetilsulfóxido |
| KCl: | Cloruro de potasio |
| EGTA: | Ácido etilenglicoltetraacético |
| Mg ₂ Cl: | Cloruro de magnesio |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ : | Molibdato de amonio |
| DTT: | Ditiotreitol |
| NaCl: | Cloruro de sodio |
| pNPP: | p-nitro fenil fosfato |
| NaOH: | Hidróxido de sodio |
| HEX: | Hexano |
| DCM: | Diclorometano |
| AE: | Acetato de etilo |

| | |
|--------------------|---------------------------------------|
| ET: | Etanol |
| EHE: | Extracto hexánico |
| EDCM: | Extracto de diclorometano |
| CI ₅₀ : | Concentración inhibitoria cincuenta |
| ANOVA: | Análisis de varianza |
| TS: | Tampón salino |
| T: | Tampón |
| G1P: | Glucosa-1-fosfato |
| B: | Blanco |
| CN: | Control negativo |
| CNE: | Control no enzimático |
| M: | Muestra |
| Acn: | Absorbancia del control negativo |
| Ab: | Absorbancia del blanco |
| Am: | Absorbancia de la muestra |
| Acne: | Absorbancia del control no enzimático |

RESUMEN

Ugni molinae Turcz., conocida tradicionalmente como murtilla, es una especie autóctona que crece en forma silvestre y abundante en las regiones del sur de Chile. A sus hojas la medicina folclórica le ha atribuido varias propiedades medicinales; sus infusiones son utilizadas por sus propiedades astringentes, aromáticas, estimulantes, analgésicas y antiinflamatorias, así como también para aliviar las dolencias de las vías urinarias, entre otros usos. Estudios químicos y farmacológicos realizados en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile; confirmaron la presencia de compuestos triterpénicos en las hojas de murtilla, tales como los ácidos betulínico, ursólico, oleanólico, alfitólico, corosólico, madecásico, maslínico y asiático, además de compuestos polifenólicos como ácido gálico, quercetina, miricetina, canferol, epicatequina y algunos de sus derivados glicosilados. Se le atribuyen a ambos grupos de compuestos los efectos inhibidores de la glicógeno fosforilasa a (GPa), e inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B).

El objetivo de este estudio fue realizar un estudio comparativo de las propiedades inhibitorias de la GPa y la PTP1B de extractos de acetato de etilo (EAEs) y etanólico (EETs) de las hojas de diez diferentes genotipos de *U. molinae*, cultivados y recolectados en las mismas condiciones. Para esto se realizaron los ensayos de inhibición de GPa y PTP1B, los resultados se analizaron por espectrofotometría y se compararon por análisis de varianza de una vía ANOVA y test de Tuckey, considerando que los resultados tuvieron diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

Los resultados indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) entre los diferentes genotipos de los extractos evaluados en el ensayo de inhibición de GPa y que existe diferencias estadísticamente significativas en la capacidad inhibitoria a las concentraciones evaluadas entre los diferentes genotipos de los extractos evaluados en el ensayo de inhibición de PTP1B. Esto confirma que la diferencia genética si influencia las propiedades farmacológicas de la especie.

SUMMARY

Evaluation of inhibitory properties of *ugni molinae* leaf extract over glycemia regulating enzymes.

Ugni molinae Turcz., traditionally known as 'murtilla', is a native Chilean species which grows wild and plentiful in the south of the country. The folk medicine has attributed medicinal properties to the infusion of the murtilla leaves, using it for its astringent, aromatic, stimulating, analgesic and anti-inflammatory properties; as well as relieving ailments of the urinary tract, among other uses.

Chemical and pharmacological studies in the Natural Products Laboratory of the Faculty of Chemical and Pharmaceutical Sciences, Universidad de Chile; confirmed the presence of triterpene compounds in murtilla leaves, such as betulinic, ursolic, oleanolic, aliphatic, corosolic, madecassic, maslinic and asiatic acids, as well as polyphenolic compounds like gallic acid, quercetin, myricetin, kaempferol, epicatechin and some of their glycosylated derivatives. Both groups of compounds have inhibitory effects on glycogen phosphorylase a (GPa), and also they are inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B).

The aim of this study is to conduct a comparative study of inhibitory properties of the leaves of ten different *U. molinae* genotypes, by ethyl acetate (EAEs) and ethanol (ETEs) extracts, on PTP1B and GPa. In order to do it, they were performed inhibition assays of GPa and PTP1B, the results were analyzed by spectrophotometry and compared by analysis of variance ANOVA and Tuckey test, considering that the results have statistically significant differences at $p < 0.05$.

The results indicated that there were significant differences between the inhibitory concentration 50 (IC₅₀) between different genotypes of the extracts tested in the inhibition assay of GPa, and that there is statistically significant difference in the inhibitory capacity at the concentrations evaluated between the different genotypes extracts evaluated for inhibition of PTP1B. This confirms that the genetic difference of this species influences the pharmacological properties of it.

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Ugni molinae Turcz., comúnmente conocida como murtila o murta, es un arbusto nativo del sur de Chile (Avello *et al.*, 2009). A sus hojas se le han atribuido varias propiedades medicinales por parte de la medicina folclórica, sus infusiones son utilizadas por sus propiedades astringentes, aromáticas, estimulantes, analgésicas y antiinflamatorias, así como también para aliviar las dolencias de las vías urinarias, entre otros usos (Muñoz, 1981; Montenegro, 2000; Delporte *et al.*, 2007). Desde el punto de vista de la industria cosmética, las hojas de murtila son usadas para suavizar el cutis reseco y aumentar la elasticidad de la piel (Montenegro *et al.*, 2005). En el mercado nacional se comercializan productos cosméticos a base de extractos obtenidos desde las hojas de murtila desarrollados por el Laboratorio Levinia y Manfredini, ya que sus compuestos polifenólicos poseen efectos correctivos y neutralizantes del estrés oxidativo; además, los terpenos y los taninos que poseen sus extractos tienen propiedades reguladoras de la microcirculación, cicatrización y poder astringente (Segel y Torralbo, 2004).

La planta ha sido históricamente apreciada por sus agradables frutos, los que se utilizan en repostería, en la fabricación de mermeladas, jugos y en la elaboración de licores (Ah-Hen *et al.*, 2011). Además, investigaciones han concluido que los extractos metanólicos, etanólicos y antocianinas purificadas desde el fruto poseen actividad antioxidante y actividad inhibitoria contra las bacterias *E. coli* y *S. typhi*, similar a la de los antibióticos estándar en el mercado (Junqueira-Gonçalves *et al.*, 2015).

Las hojas de murtila han sido investigadas desde el punto de vista químico y farmacológico en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile, y por otros investigadores cuyos resultados previos a la realización de esta memoria se presentan a continuación:

1.2. Estudios químicos y farmacológicos previos

Análisis químicos realizados en nuestro laboratorio confirman la presencia de compuestos polifenólicos y triterpénicos en las hojas de murtila. Se han identificado triterpenos pentacíclicos para extractos seriados de las hojas de la especie, derivados de los esqueletos ursano, lupano y oleanano (Figuras 1, 2 y 3). Específicamente se han aislado e identificados los ácidos betulínico, ursólico, oleanólico, alfitólico, corosólico, madecásico, maslínico y asiático (Tablas 1, 2 y 3), responsables de los efectos antioxidantes, antiinflamatorios e inhibidores de la glicógeno fosforilasa a (Aguirre *et al.*, 2006; Delporte *et al.*, 2007; Goity *et al.*, 2013).

Triterpenos identificados en las hojas de *Ugni molinae*.

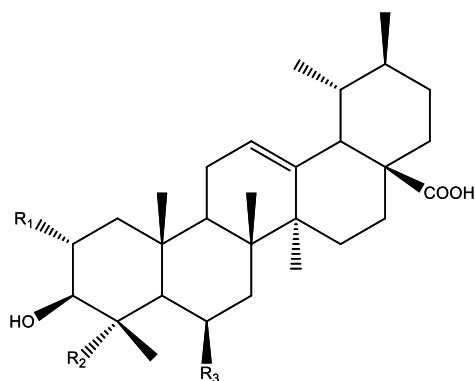


Figura 1. Esqueleto ursano

Tabla 1. Ácidos triterpénicos derivados del esqueleto ursano

| ácido | R1 | R2 | R3 |
|------------|-----|---------------------|-----|
| Ursólico | -H | -CH3 | -H |
| Corosólico | -OH | -CH3 | -H |
| Asiático | -OH | -CH ₂ OH | -H |
| Madecásico | -OH | -CH ₂ OH | -OH |

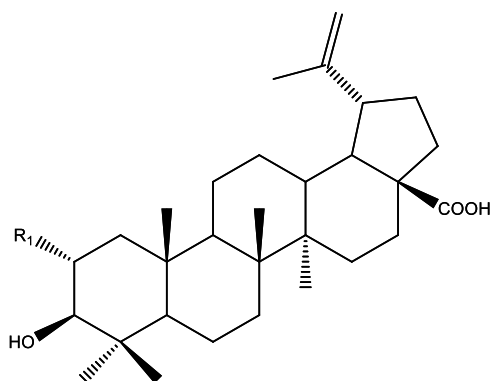


Figura 2. Esqueleto lupano

Tabla 1. Ácidos triterpénicos derivados del esqueleto lupano

| Ácido | R ₁ |
|------------|----------------|
| Betulínico | -H |
| Alfitólico | -OH |

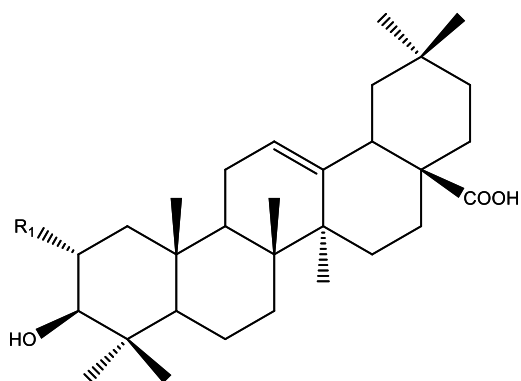


Figura 3. Esqueleto oleanano

Tabla 2. Ácidos triterpénicos derivados del esqueleto oleanano

| Ácido | R ₁ |
|------------|----------------|
| Oleanólico | -H |
| Maslínico | -OH |

Además se han identificado varios compuestos polifenólicos, principalmente flavonoides, entre los cuales se han descrito quercetina, miricetina, canferol (Tabla 4, Figura 4), epicatequina (Figura 5) y heterósidos de los flavonoides antes mencionados (Rubilar *et al.*, 2006; Avello *et al.*, 2012). Finalmente, en investigaciones recientes realizadas en nuestro laboratorio se ha identificado ácido gálico en extractos etanólicos de la especie (Figura 6) (Pérez, 2015).

Polifenoles identificados en las hojas de *Ugni molinae*.

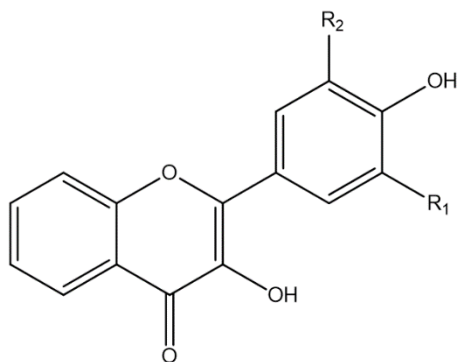


Figura 4. Esqueleto flavonoles

Tabla 3. Flavonoles

| | R1 | R2 |
|-------------------|------------|------------|
| Miricetina | -OH | -OH |
| Quercetina | -H | -OH |
| Canferol | -H | -H |

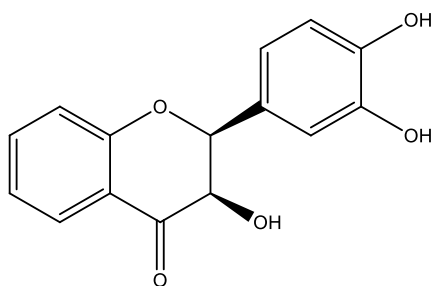


Figura 5. Epicatequina

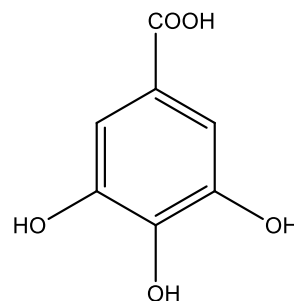


Figura 6. Ácido gálico

Las últimas investigaciones realizadas en nuestro laboratorio se han hecho con distintos genotipos de murtila, ya que estudios previos realizados en el Instituto de Investigación Agropecuaria (INIA), han demostrado que la murtila silvestre presenta una gran variabilidad genética, la cual fue confirmada a nivel molecular mediante la aplicación de la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), con el fin de seleccionar el o los genotipos de la especie con los mejores atributos comerciales (Seguel *et al.*, 2000). Es así, que en la actualidad en nuestro laboratorio se está investigando la influencia genotípica en las propiedades farmacológicas de *Ugni molinae*.

En diferentes estudios se ha demostrado que existe una gran variedad de compuestos polifenólicos y triterpénicos que poseen un potencial efecto atenuante de la hiperglicemia (Ramírez *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2009; Jakobs *et al.*, 2006; Zhang W. *et al.*, 2006; Na *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2009; Nurul *et al.*, 2013; Zhang J. *et al.*, 2015; Lan *et al.*, 2015), de los cuales, muchos se han identificado en diferentes extractos de la hoja de murtila (Aguirre *et al.*, 2006; Delporte *et al.*, 2007; Goity *et al.*, 2013; Rubilar *et al.*, 2006; Avello *et al.*, 2012; Arancibia, 2015).

La hiperglicemia crónica es una característica de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), condición que trae como consecuencia daño a nivel microangiopático (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovascular (enfermedad isquémica del corazón, ataque cerebral y enfermedad vascular periférica). La DMT2 se asocia a una reducción en la expectativa de vida, aumento del riesgo de eventos mórbidos relacionados con complicaciones crónicas y disminución en la calidad de vida (Organización Mundial de la Salud, 2006; Sarwar *et al.*, 2010)

La hiperglicemia posee diferentes causas, entre estas destaca el desequilibrio entre la ingesta y gasto de calorías, la inactividad física, la susceptibilidad genética, la excesiva producción de glucosa hepática, entre otras. La producción de glucosa por el hígado ha sido un importante blanco farmacológico en la terapia contra la hiperglicemia, la cual consta tanto de la glicogenólisis como de la gluconeogénesis; esta última, permite la síntesis de glucosa a partir de precursores no glucosídicos como lactato, aminoácidos, piruvato, glicerol e intermediarios del ciclo de Krebs (Hanson y Owen, 2013). La glicogenólisis es catalizada en el hígado, músculo y cerebro por la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa), responsable de la liberación de

glucosa a partir del glucógeno (Thomson *et al.*, 2009). Se ha comprobado que la producción de glucosa hepática aumenta en el estado post-pandrial en personas con diabetes mellitus 2, esto debido a un descontrol en los niveles de glucagón en sangre, los cuales se mantienen elevados, provocando la excesiva producción de glucosa hepática (McCormack *et al.*, 2001; Del Prato *et al.*, 2004).

Existen otra enzimas implicadas en la regulación y control de los niveles de glucosa sanguíneos, específicamente enzimas ligadas a la resistencia a la insulina, como la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), la cual es un regulador negativo de la señalización de la insulina. Concretamente, la PTP1B remueve las moléculas de fosfato de los residuos de tirosina de las proteínas del receptor de insulina activado, y los fosfatos de las proteínas involucradas en la cascada de señalización *per se*. Por lo tanto, investigaciones han demostrado y concluido que la inhibición de PTP1B resultaría en receptores de insulina activados, mejorando así la sensibilidad a la insulina y estimulando la incorporación de glucosa (Koren y George, 2007; Goldstein *et al.*, 2000).

En el presente trabajo de investigación, se evaluaron comparativamente diferentes genotipos de los extractos de acetato de etilo (EAEs) y extractos etanólicos (EETs) de las hojas de murtila, cultivados en las mismas condiciones climáticas, temperatura, humedad y calidad de suelo, respecto a su actividad inhibitoria sobre las enzimas GPa y la PTP1B, enzimas implicadas en el control glicémico en el organismo. Esta evaluación se realizará con la finalidad de demostrar diferencias debidas al factor genético, y así, determinar el genotipo de *Ugni molinae* que más destaque entre los evaluados, como un candidato que pueda ser cultivado a gran escala para su explotación comercial por la industria farmacéutica.

1.3. Descripción botánica

Ugni molinae Turcz., de la familia de las Myrtaceae, conocida tradicionalmente como murta o murtila es un arbusto perenne, que puede llegar hasta los 2 m de alto en regiones lluviosas. Se distribuye principalmente en el sur de Chile, desde la VII hasta la X Región. Se caracteriza por poseer ramas con una superficie vellosa, cubiertas de tricomas filamentosos. Las hojas son de color verde oscuro brillantes, con forma ovalada, lanceolada o elíptica y se disponen de manera opuestas, estas hojas pueden alcanzar tamaños de 2cm aproximadamente (Figura 7).

Sus flores son solitarias, de color rosado a blanco; son hermafroditas y presentan forma acampanada, tienen de 4 a 5 sépalos fusionados por la base, su corola posee de 4 a 5 pétalos libres, y poseen gran cantidad de estambres.

Los frutos maduran aproximándose el verano; es una baya globosa, de color rojo intenso y tienen un diámetro entre 5 y 15 mm. La murtila necesita suelos sin exceso de humedad y sol constante para su adecuado desarrollo. Se cultiva por sus frutos, de agradable sabor y aroma, los cuales han sido descritos como una mezcla de notas frutales, dulces y florales; por estas cualidades, el fruto de murtila ha alcanzado un gran valor comercial. El período de recolección de los frutos suele ser en el verano, pero en ciertas zonas es más tardío, dependiendo de las condiciones climáticas de la región de cultivo (Montenegro, 2000).



Figura 7. *Ugni molinae*

2. Hipótesis

Las hojas de los distintos genotipos de *Ugni molinae*, cultivados y recolectados en las mismas condiciones, presentan diferencias en la actividad inhibitoria de la glicógeno fosforilasa a (GPa) y la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Realizar un estudio comparativo de las propiedades inhibitorias de la GPa y la PTP1B de las hojas de distintos genotipos de *Ugni molinae*.

3.2 Objetivos Específicos

Evaluar el potencial efecto hipoglicemiante de los extractos de acetato de etilo (EAEs) y extractos etanólicos (EETs) de hojas provenientes de diez genotipos diferentes de *Ugni molinae*, mediante:

1. Ensayo inhibición de la actividad de la GPa
2. Ensayo inhibición de la actividad de la PTP1B

4. Materiales y métodos

4.1 Reactivos

Se utilizó hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol de grado de laboratorio para las extracciones del material vegetal.

Para la realización de los ensayos enzimáticos se utilizaron: Solvente de lavado Extran MA 03, libre de fosfato, Merck; solventes p.a. como dimetilsulfóxido, Merck, ácido clorhídrico (HCl), Merck; agua milli-Q preparada por un sistema Milipore Mili-Q Plus (Milipore, Bedford, MA, USA); sal sódica de HEPES, Sigma-Aldrich; glicógeno proveniente de hígado de bovino, Sigma-Aldrich; sal hidratada disódica de α -D-glucosa 1-fosfato, Sigma-Aldrich; enzima glicógeno fosforilasa a (GPa) proveniente de músculo de conejo, Sigma-Aldrich; Proteína tirosina fosfatasa 1B recombinante humana, expresada en *E. coli*, Sigma-Aldrich; cloruro de potasio (KCl), Merck; ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), Sigma-Aldrich; cloruro de magnesio (Mg_2Cl), Merck; molibdato de amonio ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$), Merck; verde malaquita (oxalato), Merck; ditioneitol (DTT), Sigma-Aldrich; cloruro de sodio (NaCl), Merck; p-nitro fenil fosfato (pNPP), Sigma-Aldrich e Hidróxido de sodio (NaOH), Merck.

Los compuestos de referencias utilizados en los ensayos fueron: cafeína, Sigma-Aldrich, para el ensayo de inhibición de GPa, y sal sódica de o-vanadato, Sigma-Aldrich, para el ensayo de inhibición de PTP1B.

4.2 Material vegetal

Se trabajó con las hojas de diez genotipos de *Ugni molinae* que se cultivaron en las mismas condiciones climáticas, de temperatura, humedad y calidad de suelo, desde el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ubicado en Carillanca, Temuco. El INIA ha recolectado hojas de más de 100 diferentes genotipos de la especie, desde la VII Región del Maule a la X región de los Lagos. En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile se han registrado y depositado un testigo herbario de cada genotipo seleccionado para los estudios. Estos genotipos fueron seleccionados considerando dos cualidades de interés comercial; cinco fueron elegidos por la capacidad de producir un gran número de hojas y los otros cinco genotipos fueron escogidos debido a su potencial agronómico con respecto a la producción de frutos. Los diferentes genotipos y los números de registro de cada testigo herbario se identifican en la Tabla 5.

Tabla 4. Genotipos, procedencia, número de registro de testigo herbario y criterios de selección de los genotipos de *Ugni molinae* utilizados en este estudio

| Genotipos | Procedencia | N° de registro herbario | Criterio de selección |
|-----------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| 19-1 | Porma, IX región | SQF-22554 | Hojas |
| ZF-18 | Putique, X región | SQF-22550 | Hojas |
| 8-2 | Cauquenes, VII región | SQF-22571 | Hojas |
| 19-1 ha | Porma, IX región | SQF-22553 | Hojas |
| 14-4 | Purén, IX región | SQF-22549 | Hojas |
| 23-2 | Queule, XV región | SQF-22556 | Frutos |
| 31-1 | Lenca, X región | SQF-22551 | Frutos |
| 19-2 | Porma, IX región | SQF-22550 | Frutos |
| 22-1 | Mehuín, XV región | SQF-22552 | Frutos |
| 27-1 | Aucar, X región | SQF-22555 | Frutos |

4.3 Estudios químicos

4.3.1 Obtención de extractos seriados de *Ugni molinae*

Los EAE y EET se obtuvieron de las hojas secas y molidas (2,0kg) de cada uno de los genotipos. Éstas fueron extraídas sucesivamente por maceración a temperatura ambiente con hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etilo (AE) y etanol (ET); después los solventes fueron eliminados en un evaporador rotatorio a presión reducida, obteniéndose los extractos secos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanólico (EHE, EDCM, EAE y EET, respectivamente) (Figura 8). Los extractos estudiados fueron los EAEs y EETs, ya que de acuerdo a estudios previos ambos presentan el mayor contenido de triterpenoides y compuestos fenólicos, metabolitos secundarios con efectos inhibidores de las enzimas GPa y PTP1B (Aguirre *et al.*, 2006; Delporte *et al.*, 2007; Goity *et al.*, 2013).

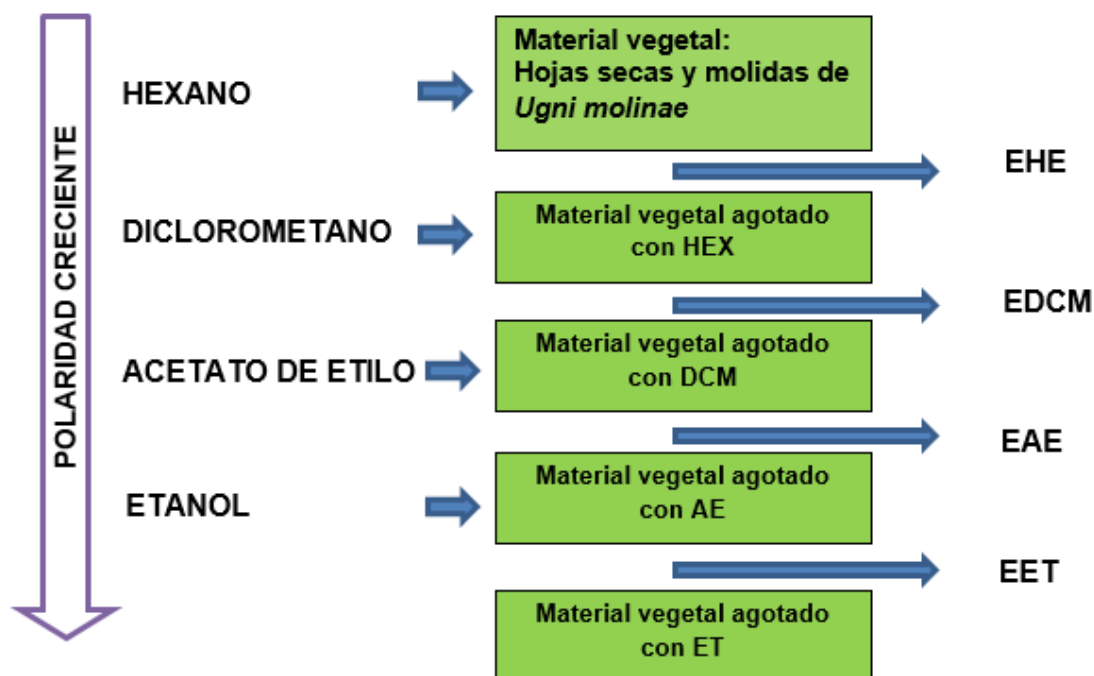


Figura 8. Procedimiento de extracción seriada de las hojas de *Ugni molinae*. EH: extracto hexánico; EDCM: extracto diclorometano; EAE: extracto acetato de etilo; EET: extracto etanólico; HEX: hexano; DCM: diclorometano; AE: acetato de etilo; ET: etanol.

4.4 Estudios farmacológicos *in vitro*

4.4.1 Ensayo inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa)

Protocolo

La metodología utilizada estuvo basada en el procedimiento descrito por Wen *et al.*, en el 2008, método que fue modificado y adaptado para las condiciones de trabajo en el laboratorio, acorde a los volúmenes de los reactivos a trabajar en el lector de microplacas. La actividad de la GPa se determinó por espectrofotometría, para esto se midió la reacción en dirección de la síntesis de glicógeno por la liberación de fosfato a partir de glucosa-1-fosfato, al inverso de la reacción que sucede naturalmente en el organismo (Figura 9). Esta reacción se llevó a cabo a 22°C durante 25 minutos en 150µL de medio tamponado que contenía 50mM HEPES (pH 7.2), 100mM KCl, 2,5mM EGTA, 2,5mM MgCl₂, 0,5mM glucosa-1-fosfato, y 1mg/ml de glucógeno. El fosfato fue medido a 621nm, 5 minutos después de la adición de 150µL de solución de detención que contenía 10mg/ml de molibdato de amonio y 0,38mg/ml de verde malaquita en medio con 1M de HCl. Las diluciones de los extractos que se analizaron fueron añadidas al ensayo en 20µL disueltas en dimetilsulfoxido al 14% (DMSO). Las condiciones del ensayo están descritas en la Tabla 6.

Se implementó el método en el espectrofotómetro del lector de microplacas realizando la curva de inhibición enzimática, en la que se utilizó como compuesto de referencia a la cafeína, obteniéndose la CI_{50} experimental del compuesto de referencia.

Luego cada muestra se analizó por triplicado en el espectrofotómetro del lector de microplacas y se evaluó a distintas concentraciones para obtener la concentración inhibitoria cincuenta (CI₅₀) (Wen *et al.*, 2008).

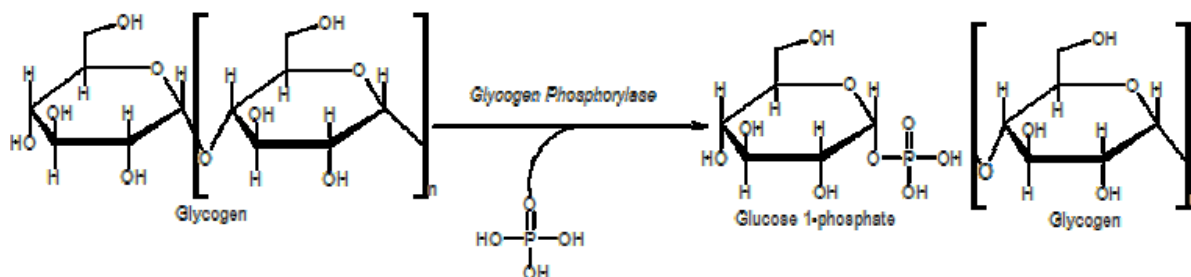


Figura 9. Acción de la enzima glicógeno fosforilasa sobre el glicógeno

Tabla 5. Resumen del ensayo de inhibición de GPa

| | Blanco(B) [μl] | Control negativo (CN) [μl] | Control no enzimático (CNE) [μl] | Muestra (M) [μl] |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------------|---------------------|
| Tampón salino (TS) | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Tampón HEPES (T) | 90 | | 90 | |
| Dimetilsulfoxido 14% (DMSO) | 20 | 20 | | |
| Diluciones de extractos | | | 20 | 20 |
| Glicógeno | | 35 | | 35 |
| Glucosa-1-fosfato (G1P) | | 35 | | 35 |
| Glicógeno Fosforilasa a (GPa) | | 20 | | 20 |
| Incubar 25 minutos a 22°C | | | | |
| Solución de detención | 150 | 150 | 150 | 150 |
| Incubar 5 minutos a 22°C | | | | |
| Medir a 621nm | | | | |

Preparación de reactivos

a. Solución de tampón HEPES

Se prepararon 25mL de solución de tampón de HEPES (50mM), para esto se pesó 325mg de HEPES en un vaso precipitado y se agregó un poco de agua Milli-Q, para posteriormente ajustar aproximadamente a pH 7,2. La solución fue guardada a 4°C.

b. Solución de tampón con sales

Se prepararon 25mL de solución de tampón HEPES (50mM) a la que se le agregaron sales. Para esto se pesó 325mg de HEPES en un vaso precipitado y se agregó un poco de agua Milli-Q, posteriormente se ajusta aproximadamente a pH 7,8. Luego se agregaron 186mg de KCl, 23,7mg de EGTA y 12,71mg de MgCl₂. Finalmente, se ajusta a pH 7,2. La solución se guardó a 4°C.

c. Solución de glicógeno

Se prepararon 10mL de solución de glicógeno (1mg/mL), para esto se pesaron 10mg de glicógeno y se llevó a un volumen final de 10mL con la solución de tampón HEPES 50mM a pH 7,2. La solución se guardó a 4°C.

d. Solución de glucosa-1-fosfato

Se prepararon 25mL de solución de glucosa-1-fosfato (0,5mM), para lo que se pesó 3,8mg de glucosa y fue aforado en un matraz de 25mL con la solución de tampón (HEPES 50mM) a pH 7,2. La solución final fue guardada en tubos eppendorf a -20°C.

e. Solución de enzima glicógeno fosforilasa a (GPa)

Se preparó una solución de GPa (60µg/mL), para esto fueron pesados 3,25mg de sólido seco que contiene 1,5mg de enzima y se aforó en un matraz de 25mL con la solución de tampón HEPES 50mM a pH 7,2. Finalmente se guardaron en tubos eppendorf a una temperatura de aproximadamente -20°C.

f. Solución de detención

Se prepararon 250mL de la solución, para esto se pesaron 2,5g de molibdato de amonio y 95mg de verde de malaquita, los cuales fueron llevados a un matraz aforado de 250mL y se disolvieron en una cantidad mínima de agua milli-Q. Al matraz se le agregó un volumen de 25mL de HCl al 37%, y luego se aforó con agua milli-Q hasta completar volumen.

Finalmente, la solución se disolvió con ayuda de un sonicador y después se filtraron los residuos no disueltos, obteniéndose la solución final.

g. Soluciones de los extractos etanolicos (EET)

Se preparó una solución concentrada (150µg/mL) de cada genotipo de los extractos de *Ugni molinae* a evaluar en dimetilsulfoxido (DMSO) al 14%, y se tomaron las alícuotas respectivas para obtener las concentraciones necesarias para evaluar la curva de inhibición enzimática de cada genotipo.

h. Soluciones de los extractos de acetato de etilo (EAE)

Se preparó una solución concentrada (3mg/mL) de cada genotipo de los extractos de *Ugni molinae* a evaluar en DMSO al 14%, y se tomaron las alícuotas respectivas

para obtener las concentraciones necesarias para evaluar la curva de inhibición enzimática de cada genotipo.

i. Soluciones de cafeína

Se preparó una solución concentrada (300 μ M) de cafeína en DMSO al 14% y se tomaron las alícuotas respectivas para obtener las concentraciones deseadas para evaluar la curva de inhibición enzimática del compuesto de referencia.

4.4.2 Ensayo inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)

Protocolo

La metodología utilizada fue basada en el procedimiento descrito por Ma *et al.*, en el 2011, método que fue modificado y adaptado para las condiciones de trabajo en el laboratorio, acorde a los volúmenes de los reactivos a trabajar en el lector de microplacas. La actividad enzimática se determinó por espectrofotometría, para la cual se utilizó p-nitro fenil fosfato (pNPP) como sustrato, el cual se hidroliza a p-nitrofenol que a pH alcalino se torna de incoloro a amarillo. Los 96 pocillos disponibles en la microplaca fueron llevados a un volumen final de 250 μ L, los que contenían 12mM de pNPP y 0,1 μ g PTP1B recombinante en tampón, el cual estaba constituido por 50mM de HEPES, 150mM de NaCl y 5mM de ditioneitol (DTT). Las diluciones de los extractos que se analizaron fueron añadidas al ensayo en 20 μ L disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO) al 12,5%. Después de la incubación por 10 min a 37 °C la reacción se terminó con 5M de NaOH. El producto formado, p-nitrofenol, fue estimado midiendo la absorbancia a 405nm. La hidrólisis no enzimática de 12mM de pNPP fue corregida midiendo el aumento en la absorbancia

a 405nm obtenido en la ausencia de la enzima PTP1B. Las condiciones del ensayo están descritas en la Tabla 7.

Se implementó el método en el espectrofotómetro del lector de microplacas, realizando la curva de inhibición enzimática, en la que se utilizó como compuesto de referencia la sal sódica de o-vanadato, obteniéndose la CI_{50} experimental del compuesto de referencia.

A continuación se realizó un ensayo preliminar con dos genotipos de los EAEs y los EETs (8-2 y 22-1). Los EAEs se evaluaron a concentraciones de 40, 20, 10, 5, 2 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y los EETs fueron evaluados a 2 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con el fin de encontrar una concentración común a la que inhiban entre 0 y 100% a la enzima, y así comparar los 10 diferentes genotipos de cada extracto.

Tabla 6. Resumen del ensayo de inhibición de PTP1B.

| | Blanco(B) [μl] | Control negativo (CN) [μl] | Control no enzimático (CNE) [μl] | Muestra (M) [μl] |
|----------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------|
| Tampón (B) | 130 | 100 | 130 | 100 |
| Dimetilsulfoxido 12,5% (DMSO) | 20 | 20 | | |
| Diluciones de extractos | | | 20 | 20 |
| Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B) | | 30 | | 30 |
| p-Nitro fenil fosfato (p-NPP) | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Incubar 10 minutos a 37°C | | | | |
| Solución de detención | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Medir a 405nm | | | | |

Preparación de reactivos

a. Solución de tampón

Se prepararon 25mL de solución tampón HEPES (50mM) a la que se le agregaron sales, para esto se pesó 325mg de HEPES, 19,3mg de DTT y 219mg de NaCl y fueron llevados a un vaso precipitado, se agregó un poco de agua Milli-Q y se ajustó a pH 7,2. La solución fue guardada a 4°C.

b. Solución de p-nitro fenil fosfato (pNPP)

Se preparó un volumen de 10mL de solución de pNPP (60mM), para lo que se pesaron 222,7mg de pNPP y fue aforado en un matraz de 10mL con la solución tampón. La solución final fue guardada en tubos eppendorf a -20°C.

c. Solución de enzima Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)

Se preparó una solución de 1mL de enzima en solución tampón a una concentración de $3,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de PTP1B, para esto se utilizó una alícuota de 6,7 μL de una solución madre de enzima de concentración 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mantenida a -80°C.

d. Solución de detención NaOH

Se preparó un volumen de 10mL de solución de NaOH (5M), para lo que se pesaron 2g de NaOH y luego fue aforado en un matraz de 10mL con agua milli-Q. La solución final fue guardada a 4°C.

e. Soluciones de los extractos etanolicos (EET)

Se preparó una solución concentrada (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de cada genotipo de los extractos de *Ugni molinae* a evaluar en dimetilsulfoxido (DMSO) al 12,5%, y se tomaron alícuotas respectivas para obtener una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el volumen total

a trabajar en cada pocillo (250µL) necesario para evaluar la capacidad inhibitoria de los distintos genotipos a esa concentración.

f. Soluciones de los extractos de acetato de etilo (EAE)

Se preparó una solución concentrada (500µg/mL) de cada genotipo de los extractos de *Ugni molinae* a evaluar en DMSO al 12,5%, y se tomaron alícuotas respectivas para obtener una concentración de 2µg/mL en el volumen total a trabajar en cada pocillo (250µL) necesario para evaluar la capacidad inhibitoria de los distintos genotipos a esa concentración.

g. Soluciones de la sal sódica de o-vanadato

Se preparó una solución concentrada (500µg/mL) de la sal sódica de o-vanadato en DMSO al 12,5% y se tomaron las alícuotas respectivas para obtener las concentraciones deseadas para evaluar la curva de inhibición enzimática del compuesto de referencia.

4.4.3 Tratamiento de datos

Para los ensayos realizados se determinó el porcentaje de inhibición enzimática utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{Acn} - \text{Ab}) - (\text{Am} - \text{Acne})}{(\text{Acn} - \text{Ab})} \times 100$$

Dónde:

- Acn = Absorbancia del control negativo
- Ab = Absorbancia del blanco
- Am = Absorbancia de la muestra
- Acne = Absorbancia del control no enzimático

Los datos se graficaron como logaritmo de la concentración ($\mu\text{g/mL}$) vs % inhibición para poder determinar la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}), los datos se trabajaron por triplicado y se evaluaron en el programa Graph Pad Prism versión 6.01. Los resultados se presentaron como CI_{50} .

Para determinar la diferencia estadísticamente significativa entre los genotipos evaluados respecto a sus capacidades inhibitorias sobre las enzimas GPa y PTP1B, se utilizó el análisis estadístico por ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples Tukey.

5. Resultados y Discusión

5.1 Estudios Químicos

5.1.1 Obtención de los EAEs y EETs

En la Tabla 8, se puede observar que los EETs fueron los que presentaron mayor rendimiento. Esto último indica que la murtila tiene una mayor proporción de compuestos polares como por ejemplo polifenoles. Por el contrario los EHEs fueron los de menores rendimientos.

El EET del genotipo ZF-18 fue el de mayor rendimiento (27,7%) y en estudios paralelos realizados en nuestro laboratorio, fue el que presentó mejores efectos antioxidantes (Pérez, 2015; Valenzuela, 2015).

Tabla 7. Rendimientos del procedimiento de extracción seriada de las hojas de *Ugni molinae* expresados en % p/p.

| Genotipo | EHE | EDCM | EAE | EET |
|----------|-------|-------|-------|--------|
| 14-4 | 1,3 % | 1,9 % | 5,2 % | 11,3 % |
| 19-1 | 1,0 % | 1,5 % | 5,6 % | 16,4 % |
| 19-1 ha | 1,1 % | 2,9 % | 4,4 % | 14,8 % |
| 22-1 | 1,1 % | 1,6 % | 5,4 % | 13,0 % |
| 27-1 | 1,1 % | 1,7 % | 4,8 % | 12,5 % |
| 23-2 | 1,2 % | 1,3 % | 7,0 % | 12,1 % |
| 8-2 | 1,2 % | 1,3 % | 5,6 % | 9,5 % |
| 31-1 | 1,5 % | 1,7 % | 5,1 % | 8,5 % |
| 19-2 | 1,2 % | 1,9 % | 4,7 % | 10,2 % |
| ZF-18 | 1,1 % | 1,7 % | 3,1 % | 27,7 % |

EHE: extracto hexánico; EDCM: extracto de diclorometano; EAE: extracto de acetato de etilo; EET: extracto etanólico. En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos y en verde por la cantidad de hojas.

5.2 Estudios Farmacológicos

5.2.1 Ensayo de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa)

En la Tabla 9 se presentan las distintas concentraciones evaluadas de cafeína con su porcentaje de inhibición de la GPa, y en la Figura 10 se muestra la curva de inhibición de GPa dependiente del logaritmo de la concentración de cafeína, con su correspondiente ecuación de la curva.

Tabla 8. Resultados de la inhibición sobre la GPa de la cafeína

| $\mu\text{g/ml}$ | 0,9 | 1,9 | 3,9 | 7,8 | 15,5 | 31,1 | 62,1 |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| % | 18,4 \pm 4,6 | 28,7 \pm 2,3 | 41,3 \pm 6,0 | 57,7 \pm 2,8 | 70,4 \pm 3,7 | 76,8 \pm 1,9 | 80,1 \pm 2,8 |

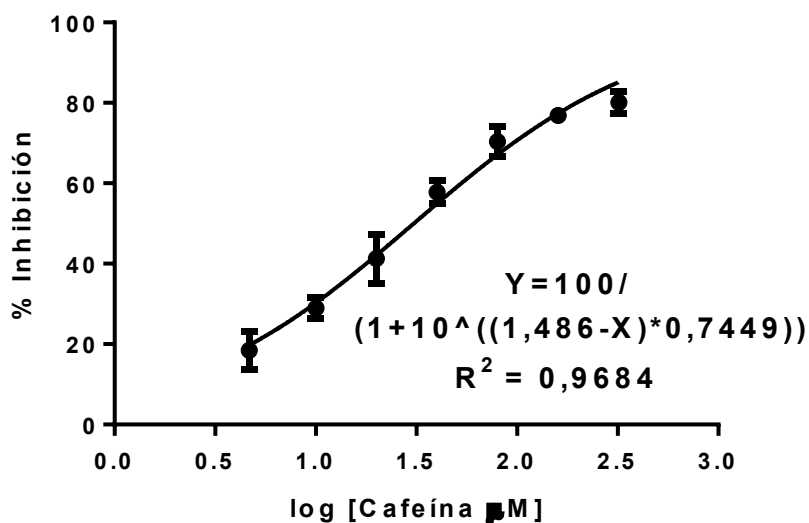


Figura 10. Curva de inhibición enzimática del compuesto de referencia frente a la GPa

El compuesto de referencia ensayado presentó una CI_{50} de 5,95 $\mu\text{g/ml}$.

A continuación se evaluaron los EAEs y EETs de los distintos genotipos de murtila a diferentes concentraciones por triplicado para obtener la concentración inhibitoria cincuenta (CI₅₀). En las Tablas 10 y 12 se pueden observar los porcentajes de inhibición \pm su desviación estándar de las diferentes concentraciones evaluadas de los extractos. Y en las Tablas 11 y 13 se presentan las CI₅₀ de cada genotipo de murtila evaluado.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición sobre la GPa de los EAEs de murtila

| $\mu\text{g/ml}$ | 5,0 | 10 | 20 | 40 | 80 | 120 | 160 |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Genotipo | | | | | | | |
| 19-1 | 12,6 \pm 1,3 | 26,5 \pm 1,5 | 43,1 \pm 1,3 | 60,6 \pm 0,9 | 61,7 \pm 1,0 | - | - |
| ZF-18 | - | - | 29,7 \pm 1,6 | 48,4 \pm 1,9 | 63,4 \pm 1,9 | 72,2 \pm 1,4 | 84,2 \pm 1,5 |
| 8-2 | - | 5,3 \pm 0,8 | 19,6 \pm 0,7 | 38,6 \pm 0,7 | 53,2 \pm 2,0 | 56,4 \pm 1,4 | - |
| 19-1 ha | - | - | 20,8 \pm 1,0 | 36,8 \pm 1,7 | 47,7 \pm 1,1 | 61,4 \pm 0,4 | 65,6 \pm 1,7 |
| 14-4 | - | - | 27,6 \pm 1,1 | 34,8 \pm 1,3 | 45,5 \pm 0,7 | 47,7 \pm 1,1 | 51,3 \pm 0,2 |
| 23-2 | 6,3 \pm 2,2 | 24,3 \pm 1,3 | 38,0 \pm 1,8 | 56,0 \pm 1,6 | 74,3 \pm 0,4 | - | - |
| 31-1 | - | - | 35,3 \pm 2,8 | 53,2 \pm 0,4 | 63,8 \pm 2,0 | 74,8 \pm 0,9 | 84,5 \pm 1,0 |
| 19-2 | - | 8,6 \pm 1,6 | 27,2 \pm 1,0 | 50,3 \pm 0,8 | 67,5 \pm 1,3 | 93,0 \pm 2,8 | - |
| 22-1 | - | 10,2 \pm 0,8 | 28,7 \pm 1,9 | 46,9 \pm 1,5 | 60,5 \pm 1,6 | 65,1 \pm 1,0 | - |
| 27-1 | - | - | 21,8 \pm 1,1 | 35,0 \pm 1,0 | 42,3 \pm 0,6 | 51,9 \pm 0,4 | 57,9 \pm 1,5 |

GPa: Glicógeno fosforilasa a; EAE: Extracto acetato de etilo; DE: Desviación estándar; En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos y en verde por la cantidad de hojas. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la enzima.

Tabla 10. CI₅₀ frente a la GPa de los EAEs de cada genotipo evaluado

| Genotipos | 19-1 | ZF-18 | 8-2 | 19-1ha | 14-4 | 23-2 | 31-1 | 19-2 | 22-1 | 27-1 |
|---------------------------------------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|
| CI ₅₀ [$\mu\text{g/ml}$] | 32,16* | 44,34* | 77,45* | 78,85* | 137,00* | 34,23* | 37,42* | 41,32* | 53,99* | 108,70* |

* $p \leq 0,05$ significativo con respecto al control; CI₅₀: concentración inhibitoria 50; En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos y en verde por la cantidad de hojas.

La comparación de las CI₅₀, nos permite concluir que el genotipo 19-1 seleccionado por la cantidad de hojas fue el más potente (CI₅₀ de 32,16 $\mu\text{g/ml}$), pero con una eficacia alrededor del 60%; y que el 23-2 (CI₅₀ de 34,23 $\mu\text{g/ml}$) fue el más potente

de los genotipos seleccionados por la calidad de sus frutos, con una eficacia sobre el 70%. Por eficacia se comprende a la respuesta terapéutica potencial máxima que un fármaco puede inducir; por lo tanto, aunque el genotipo 19-1 sea el más potente, no es el más eficaz. Además, es importante considerar que todos los EAEs muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al control positivo (cafeína) (Tabla 14), pero ninguno sobrepasa la potencia de inhibición sobre la GPa de la cafeína (CI_{50} de 5,95µg/ml).

En las Figuras 11 a la 20, se presentan las curvas de inhibición de GPa versus logaritmo de la concentración de los EAEs con su correspondiente ecuación de la curva, esta inhibición fue concentración-dependiente para cada EAE evaluado.

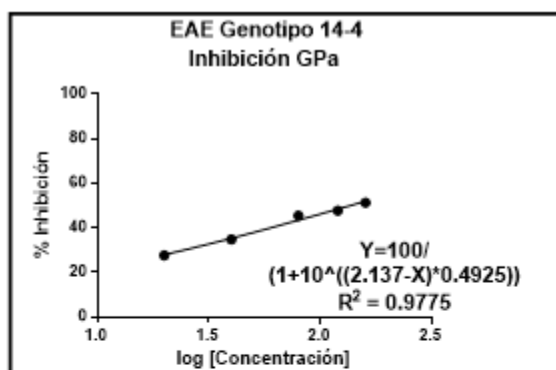


Figura 11.

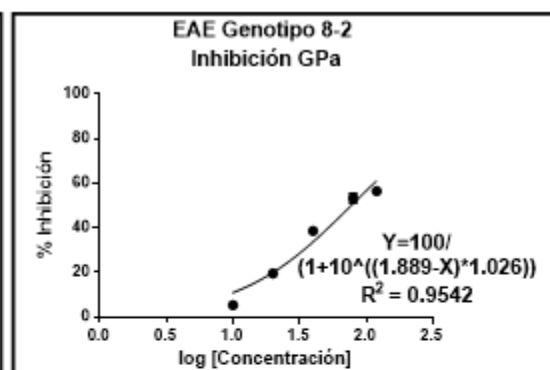


Figura 12.

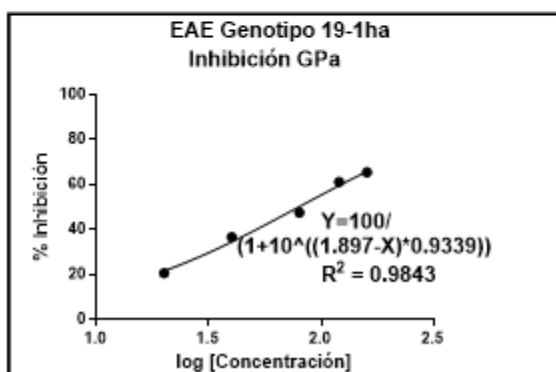


Figura 13.

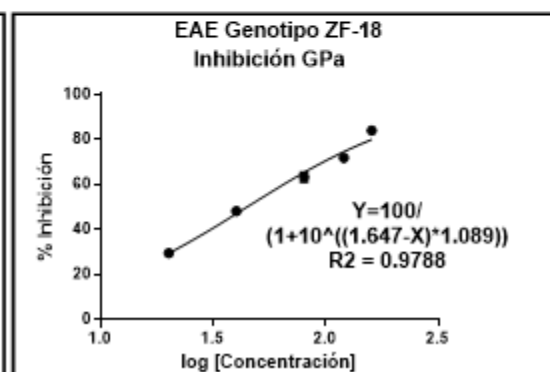


Figura 14.

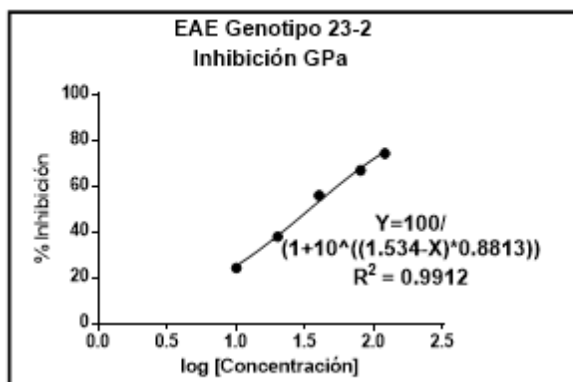


Figura 15.

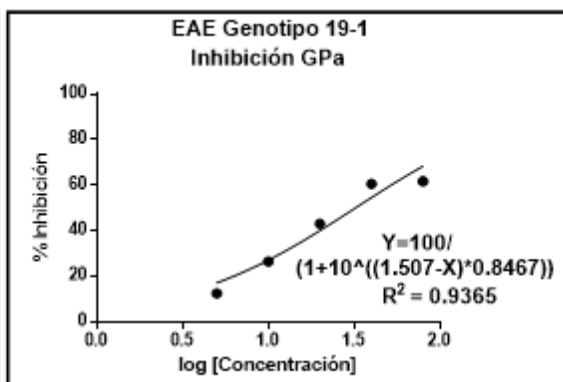


Figura 16.

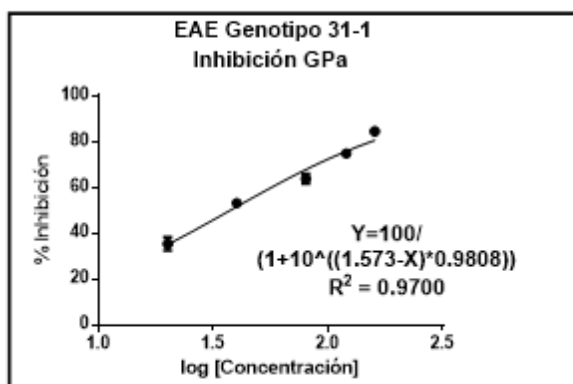


Figura 17.

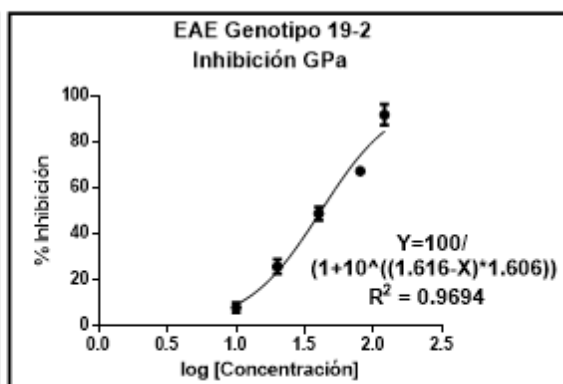


Figura 18.

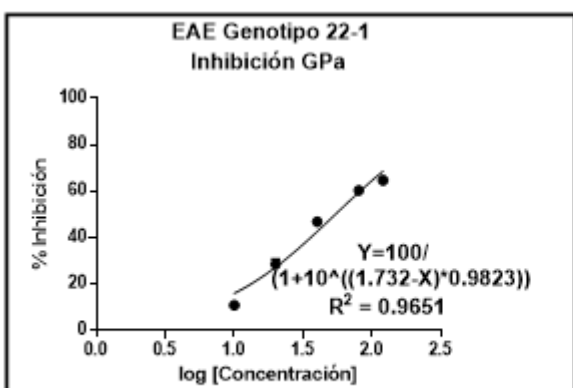


Figura 19.

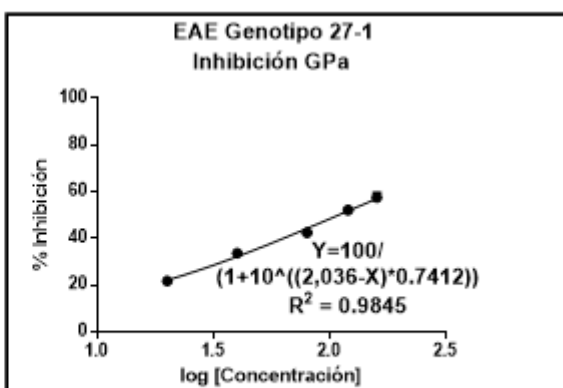


Figura 20.

Tabla 11. Porcentaje de inhibición sobre la GP_a de los EETs de murtilla

| $\mu\text{g/ml}$ | 1,0 | 1,8 | 2,5 | 3,8 | 7,5 |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Genotipo | | | | | |
| 19-1 | 48,7 \pm 1,8 | 62,4 \pm 2,7 | 73,1 \pm 1,4 | 81,2 \pm 0,2 | 84,2 \pm 0,6 |
| 14-4 | 38,0 \pm 1,9 | 65,5 \pm 1,0 | 71,7 \pm 1,3 | 82,8 \pm 1,9 | 92,3 \pm 0,4 |
| 8-2 | 37,6 \pm 2,1 | 56,6 \pm 1,8 | 68,4 \pm 1,9 | 80,3 \pm 2,8 | 86,0 \pm 0,1 |
| ZF-18 | 40,2 \pm 1,3 | 50,0 \pm 0,6 | 65,5 \pm 1,5 | 78,3 \pm 0,4 | 87,2 \pm 1,5 |
| 19-1 ha | 5,9 \pm 1,5 | 19,4 \pm 0,6 | 37,1 \pm 1,1 | 53,2 \pm 1,3 | 79,5 \pm 0,7 |
| 22-1 | 39,6 \pm 1,4 | 66,8 \pm 1,4 | 75,4 \pm 1,5 | 87,7 \pm 0,6 | 94,4 \pm 0,3 |
| 23-2 | 37,6 \pm 2,3 | 62,4 \pm 0,4 | 75,5 \pm 0,3 | 81,7 \pm 0,3 | 88,0 \pm 0,7 |
| 31-1 | 26,8 \pm 0,9 | 52,9 \pm 1,4 | 66,3 \pm 0,7 | 74,4 \pm 0,9 | 88,1 \pm 0,4 |
| 27-1 | 26,0 \pm 2,3 | 41,1 \pm 1,8 | 54,7 \pm 1,6 | 82,6 \pm 1,7 | 98,3 \pm 1,2 |
| 19-2 | 6,5 \pm 1,2 | 33,9 \pm 1,0 | 48,3 \pm 1,7 | 60,4 \pm 0,8 | 79,2 \pm 1,1 |

GP_a: Glicógeno fosforilasa a; EAE: Extracto acetato de etilo; DE: Desviación estándar; En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos y en verde por la cantidad de hojas. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la enzima.

Tabla 12. CI₅₀ frente a la GP_a de los EETs de cada genotipo evaluado

| Genotipos | 19-1 | 14-4 | 8-2 | ZF-18 | 19-1ha | 22-1 | 23-2 | 31-1 | 27-1 | 19-2 |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CI ₅₀ [$\mu\text{g/ml}$] | 1,03* | 1,31* | 1,44* | 1,53* | 3,52* | 1,26* | 1,33* | 1,75* | 2,02* | 2,89* |

* $p \leq 0,05$ significativo con respecto al control; CI₅₀: concentración inhibitoria 50; En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos y en verde por la cantidad de hojas.

Al igual que en los EAEs, al comparar las CI₅₀, se puede concluir que el genotipo 19-1 seleccionado por la cantidad de hojas fue el más potente (CI₅₀ de 1,03 $\mu\text{g/ml}$), y posee una eficacia sobre el 80%; el 22-1 fue el más potente de los genotipos seleccionados por la calidad de sus frutos (CI₅₀ de 1,26 $\mu\text{g/ml}$), destacando entre todos los EETs evaluados con una eficacia sobre el 90%. Es de importancia resaltar que todos los EETs tuvieron una potencia mayor al compuesto de referencia, cafeína, que posee un CI₅₀ de 5,98 $\mu\text{g/ml}$, y todos exhiben diferencias estadísticamente significativas respecto del control positivo, resultados que se mostrarán más adelante (Tabla 15).

En las Figuras 21 a la 30, se presentan las curvas de inhibición de GPa versus logaritmo de la concentración de cada EET evaluado, con su correspondiente ecuación de la curva.

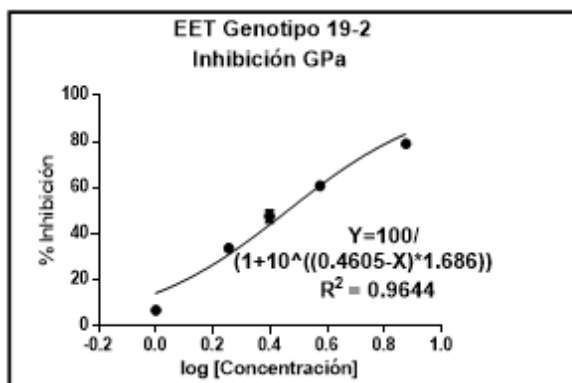


Figura 21.

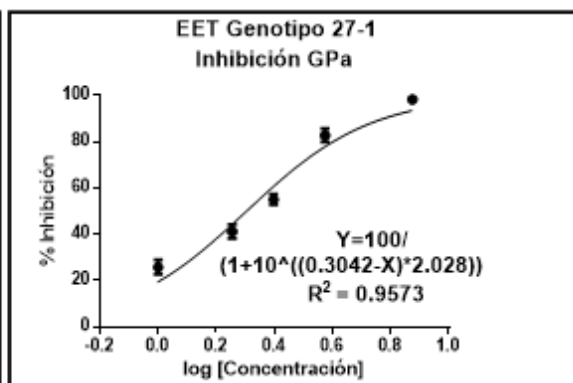


Figura 22.

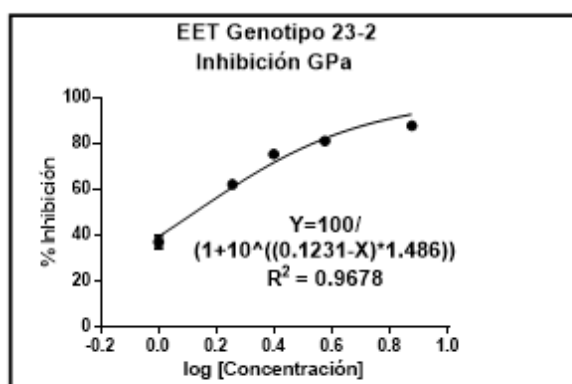


Figura 23.

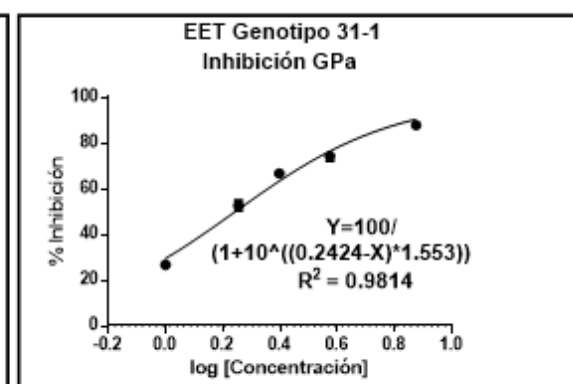


Figura 24.

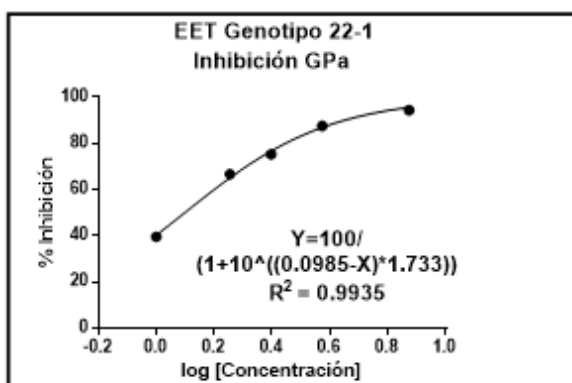


Figura 25.

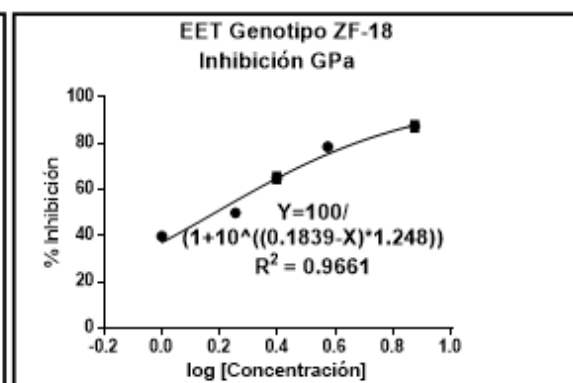


Figura 26.

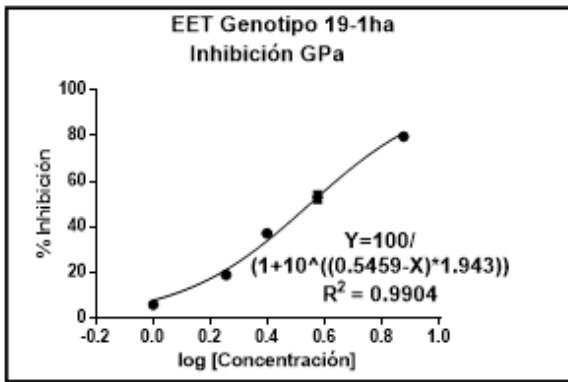


Figura 27.

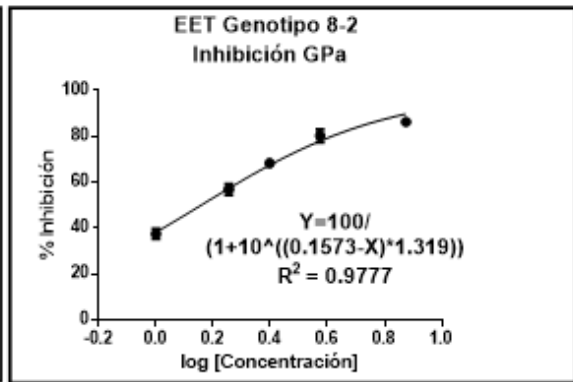


Figura 28.

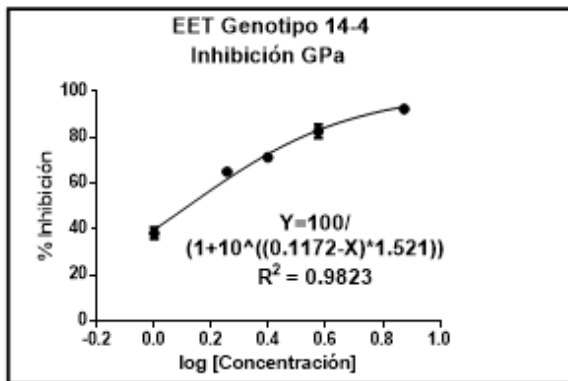


Figura 29.

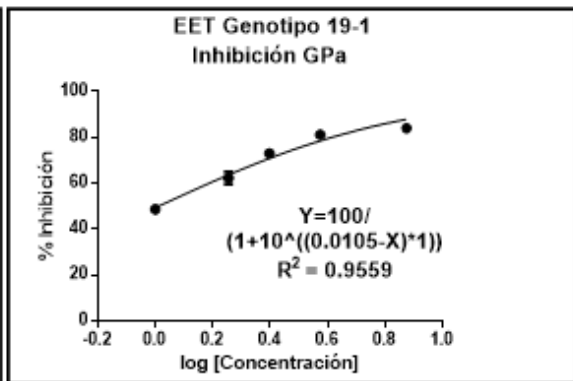


Figura 30.

El análisis estadístico de los resultados fue realizado por análisis de varianza (ANOVA) de una vía y el test de comparaciones múltiples Tukey, el cual demostró que hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al compuesto de referencia y entre los diferentes genotipos de *Ugni molinae* que fueron estudiados. Estos resultados se muestran en las Tablas 14 y 15.

Tabla 13. Significancia estadística del efecto inhibitorio de los EAEs de los distintos genotipos de murtila frente a GPa

| | Cafeína | 19-1 | ZF-18 | 8-2 | 19-1ha | 14-4 | 23-2 | 31-1 | 19-2 | 22-1 | 27-1 |
|---------|---------|------|-------|-----|--------|------|------|------|------|------|------|
| Cafeína | | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 19-1 | * | | * | * | * | * | NS | NS | NS | * | * |
| ZF-18 | * | * | | * | * | * | * | NS | NS | * | * |
| 8-2 | * | * | * | | NS | * | * | * | * | * | * |
| 19-1ha | * | * | * | NS | | * | * | * | * | * | * |
| 14-4 | * | * | * | * | * | | * | * | * | * | * |
| 23-2 | * | NS | * | * | * | * | | NS | NS | * | * |
| 31-1 | * | NS | NS | * | * | * | NS | | NS | * | * |
| 19-2 | * | NS | NS | * | * | * | NS | NS | | * | * |
| 22-1 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | | * |
| 27-1 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | |

* $p \leq 0,05$ se consideró significativo comparando los distintos genotipos y el control; NS: No significativo; En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos, en verde por la cantidad de hojas y en color naranja el compuesto de referencia.

En todos los EAEs de *Ugni molinae* estudiados existen diferencias estadísticamente significativas comparados con el compuesto de referencia, y también es destacable el amplio rango, estadísticamente significativo, en la capacidad de inhibición sobre la GPa entre la mayoría de los genotipos.

Entre los genotipos 19-1, 23-2, 31-1 y 19-2, como se puede observar en la Tabla 14, no hay diferencia significativa. Es importante mencionar que entre estos genotipos, el 19-1 es el único seleccionado por la cantidad de hojas, y estos 4 genotipos aludidos son los que mejores resultados tuvieron respecto a potencia inhibitoria sobre la GPa.

Entre los genotipos ZF-18, 31-1 y 19-2 no hubo diferencia significativa.

Entre los genotipos 8-2 y 19-1ha no hubo diferencia significativa, ambos genotipos son pertenecientes al grupo seleccionado por hojas y estos poseen una CI_{50} media comparado con el resto de los genotipos.

Tabla 14. Significancia estadística del efecto inhibitorio de los EETs de los distintos genotipos de murtila frente a GPa

| | Cafeína | 19-1 | 14-4 | 8-2 | ZF-18 | 19-1ha | 22-1 | 23-2 | 31-1 | 27-1 | 19-2 |
|---------|---------|------|------|-----|-------|--------|------|------|------|------|------|
| Cafeína | | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 19-1 | * | | NS | NS | NS | * | NS | NS | NS | * | * |
| 14-4 | * | NS | | NS | NS | * | NS | NS | NS | NS | * |
| 8-2 | * | NS | NS | | NS | * | NS | NS | NS | NS | * |
| ZF-18 | * | NS | NS | NS | | * | NS | NS | NS | NS | * |
| 19-1ha | * | * | * | * | * | | * | * | * | * | NS |
| 22-1 | * | NS | NS | NS | NS | * | | NS | NS | NS | * |
| 23-2 | * | NS | NS | NS | NS | * | NS | | NS | NS | * |
| 31-1 | * | NS | NS | NS | NS | * | NS | NS | | NS | * |
| 27-1 | * | NS | NS | NS | NS | * | NS | NS | NS | | * |
| 19-2 | * | * | * | * | * | NS | * | * | * | NS | |

* $p \leq 0,05$ se consideró significativo comparando los distintos genotipos y el control; NS: No significativo; En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos, en verde por la cantidad de hojas y en color naranja el compuesto de referencia.

En todos los EETs de los genotipos de *Ugni molinae* estudiados existen diferencias estadísticamente significativas comparados con el compuesto de referencia, pero a diferencia de los EAes, los EETs mayoritariamente no son diferentes estadísticamente entre sí respecto a la potencia de inhibición sobre la GPa.

Se puede destacar al genotipo 19-1ha, que posee diferencia estadísticamente significativa con casi todos los demás genotipos, a excepción del 19-2. Estos dos genotipos comparten que son los que menor potencia tienen sobre la GPa.

El genotipo 27-1 también tuvo una baja potencia, el tercero menos potente, y junto a los genotipos 19-1ha y 19-2 son los que se diferencian estadísticamente con el genotipo más potente, 19-1.

Tabla 15. CI_{50} de los EAEs y EETs de las hojas de distintos genotipos evaluados de *Ugni molinae* y cafeína sobre GPa

| Genotipos | EAE CI_{50} [$\mu\text{g/ml}$] | EET CI_{50} [$\mu\text{g/ml}$] |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------|
| 19-1 | 32,16* | 1,03* |
| ZF-18 | 44,34* | 1,53* |
| 8-2 | 77,45* | 1,44* |
| 19-1 ha | 78,85* | 3,52* |
| 14-4 | 137,00* | 1,31* |
| 23-2 | 34,23* | 1,33* |
| 31-1 | 37,42* | 1,75* |
| 19-2 | 41,32* | 2,89* |
| 22-1 | 53,99* | 1,26* |
| 27-1 | 108,70* | 2,02* |
| Cafeína | 5.95 | |

* $p \leq 0,05$ significativo con respecto al control; GPa: Glicógeno fosforilasa a; EAE: Extracto acetato de etilo; EET: Extracto etanolico; CI_{50} : concentración inhibitoria 50; En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos, en verde por la cantidad de hojas y en color naranja el compuesto de referencia. Se destacan en verde el genotipo elegido por "hojas" con mayor potencia en los EAE y EET. Se destacan en rojo el genotipo elegido por "frutos" con mayor potencia en los EAE y EET.

En estudios anteriores se ha demostrado que las hojas de murtila presentan una gran cantidad de compuestos polifenolicos, los cuales se encuentran principalmente en los EETs (Rubilar *et al.*, 2006). También se han descrito una gran variedad de triterpenos pentacíclicos que se encuentran mayoritariamente en los EAEs de *U. molinae*, y en menor cantidad en los EETs (Rubilar *et al.*, 2006; Goity *et al.*, 2013). Esto se está corroborando en tesis realizadas paralelamente en el Laboratorio de

Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (Arancibia, 2015; Peña, 2014).

Se puede observar que respecto de los EAEs, es el genotipo 19-1 el que presentó mayor potencia (32,16 μ g/ml), y el 14-4 es el que presentó menor potencia (137,00 μ g/ml).

En el caso de los EETs, también fue el genotipo 19-1 el que presentó mayor potencia (1,03 μ g/ml), y el 19-1ha el que presentó menor potencia (3,52 μ g/ml).

La GP_a posee varios sitios regulatorios o sitios de unión, contiene un sitio catalítico que une glucosa, glicógeno y análogos de éstos; el sitio alostérico que une adenosina monofosfato y glucosa-6-fosfato; un sitio nucleósido de purina llamado sitio inhibitor, que es activo hacia derivados de purina como la cafeína y un sitio alostérico que une índoles. Esto nos indica que podrían existir una gran variedad de compuestos capaces de unirse a los sitios regulatorios e inhibir a la enzima (Karis *et al.*, 2009; Tsitsanou *et al.*, 2013).

En estudios farmacológicos *in vitro* realizados por Wen *et al.*, en el 2008, se demostró que una gran variedad de triterpenoides pentacíclicos poseen capacidad inhibitoria sobre la GP_a, como se puede observar en la Tabla 17. Sin embargo, es importante destacar que los EETs fueron 30 a 100 veces más potentes que los EAEs, siendo estos últimos lo que poseen la mayor cantidad de triterpenos, esto es posible que se pueda deber a diferentes razones, los cuales se discutirán a continuación.

Jakobs *et al.*, en el 2006, demostraron que varios polifenoles como luteolina, tricina, baicaleina, quercetina, entre otros, obtenidos de las compañías Extrasynthese y Sigma-Aldrich, poseen capacidad inhibitoria sobre la GP_a. Dentro de los compuestos evaluados en la investigación anteriormente mencionada, se encuentran varios polifenoles identificados en extractos de murtilla (Peña, 2014), cuyas CI₅₀ frente a la GP_a se observan en la Tabla 18. Estos resultados podrían indicar que los polifenoles, como la quercetina, son los que principalmente están involucrados en la alta potencia de los EETs estudiados. Sin embargo, algunos compuestos como la epicatequina no poseen actividad, lo que podría afectar en el efecto total del extracto, incluso compitiendo con los demás compuestos por los sitios de unión en la enzima, provocando una disminución de la actividad final.

Como se ha mencionado anteriormente, en los EAEs se encuentran la mayor proporción de triterpenos, sobre los cuales se ha demostrado que poseen actividad inhibitoria sobre la GP_a, pero hay algunos como el ácido madecásico que no presentan actividad inhibitoria sobre la enzima (Wen *et al.*, 2008.), provocando, posiblemente competencia con los otros compuestos por los sitios de unión de la enzima, lo que podría generar una disminución en la potencia final.

Por tanto, considerando que en ambos extractos (EETs y EAEs) existe una mezcla de compuestos, tanto polifenoles como triterpenos, y que las proporciones de estos difieren según el genotipo que corresponda (Arancibia, 2015; Peña, 2014), se puede inferir que existen interacciones (sinergia y/o competencia) entre los distintos compuestos y los sitios de unión de la GP_a, con lo que se puede inferir que los extractos de los genotipos con mejores resultados deben tener una mezcla de triterpenos y polifenoles en las proporciones más adecuadas para inhibir la GP_a.

Tabla 16. Valores de CI_{50} frente a la GPa de los triterpenoides pentacíclicos presentes en las hojas de murtila

| Triterpenoides pentacíclicos | CI_{50} [$\mu\text{g/mL}$] |
|------------------------------|--------------------------------|
| Ácido ursólico | 4,1 ^a |
| Ácido oleanólico | 6,4 ^a |
| Ácido asiático | 8,3 ^a |
| Ácido corosólico | 9,5 ^a |
| Ácido alfitólico | 9,9 ^b |
| Ácido maslínico | 13,2 ^a |
| Ácido betulínico | 19,6 ^a |
| Ácido madecásico | s.a ^a |

CI_{50} : Concentración inhibitoria 50; ^aWen *et al.*, 2008; ^bHao *et al.*, 2009; s.a: sin actividad.

Tabla 17. Valores de CI_{50} frente a la GPa de diferentes polifenoles presentes en las hojas de murtila

| Polifenoles | CI_{50} [$\mu\text{g/mL}$] |
|--------------|--------------------------------|
| Quercetina | 1,5 ^a |
| Epicatequina | s.a ^a |
| Ácido gálico | s.a ^a |

CI_{50} : Concentración inhibitoria 50; ^aJakobs *et al.*, 2006; s.a: sin actividad.

5.2.2 Ensayo de inhibición de la enzima proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)

En la Tabla 19 se presentan las distintas concentraciones evaluadas de la sal sódica de o-vanadato con su porcentaje de inhibición sobre la PTP1B, y en la Figura 31 se muestra la curva de inhibición de la PTP1B dependiente del logaritmo de la concentración de la sal sódica de o-vanadato, con su correspondiente ecuación de la curva.

Tabla 18. Resultados de la inhibición sobre la PTP1B del compuesto de referencia

| [µg/ml] | 0,4 | 1 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 40 |
|---------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| % | 12,4 ± 1,4 | 18,1 ± 0,4 | 55,9 ± 1,5 | 65,7 ± 2,3 | 74,0 ± 1,2 | 78,2 ± 0,8 | 84,2 ± 3,2 | 92,2 ± 2,1 |

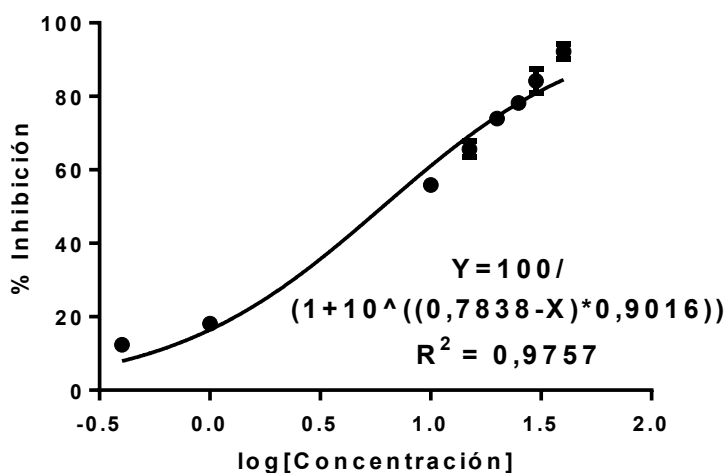


Figura 31. Curva de inhibición enzimática del compuesto de referencia frente a la PTP1B

El compuesto de referencia ensayado presentó una CI_{50} de 6,08µg/mL.

A continuación se evaluaron los EAEs y EETs de dos genotipos de murtila a diferentes concentraciones frente a la PTP1B.

Tabla 19. Inhibición sobre la PTP1B de los EAEs de murtila

| [µg/ml] Genotipo | 20 | 10 | 5 | 2 | 1 |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
| 8-2 | 101,2 ± 3,0 | 98,7 ± 1,4 | 100,6 ± 1,7 | 78,2 ± 1,3 | 17,8 ± 2,1 |
| 22-1 | 102,5 ± 2,2 | 103,1 ± 4,2 | 99,4 ± 2,5 | 84,1 ± 2,0 | 19,0 ± 1,4 |

Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición.

Tabla 21. Inhibición sobre la PTP1B de los EETs de murtila

| [µg/ml] Genotipo | 2 | 1 |
|---------------------|------------|------------|
| 8-2 | 97,2 ± 0,7 | 80,8 ± 2,6 |
| 22-1 | 99,0 ± 1,8 | 88,1 ± 1,9 |

Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición.

Con estos resultados se decidió evaluar a los EAEs a 2µg/mL y los EETs a 1µg/mL, con el objetivo de obtener un resultado preliminar comparativo de la capacidad inhibitoria entre los genotipos de un mismo extracto. En las Tablas 22 y 23 se pueden observar los resultados obtenidos.

Tabla 22. Inhibición sobre la PTP1B de los EAEs de murtila

| Genotipos | 2µg/mL EAE |
|-----------|------------|
| 19-1 | 97,2 ± 0,9 |
| 14-4 | 80,8 ± 1,5 |
| 8-2 | 80,7 ± 1,3 |
| ZF-18 | 79,5 ± 2,0 |
| 19-1ha | 48,8 ± 1,9 |
| 27-1 | 94,0 ± 0,8 |
| 19-2 | 93,1 ± 1,2 |
| 23-2 | 91,1 ± 2,0 |
| 22-1 | 83,4 ± 1,9 |
| 31-1 | 64,7 ± 1,3 |

En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos, en verde por la cantidad de hojas y en color naranja el compuesto de referencia. Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición.

Dentro de los EAEs fue el genotipo 19-1 ($97,2 \pm 0,9\%$) el que mayor porcentaje de inhibición posee a la concentración estudiada, sin embargo son varios los genotipos que poseen un porcentaje de inhibición mayor al 90%.

El EAE que obtuvo el menor porcentaje de inhibición fue el genotipo 19-1ha ($48,8 \pm 1,9\%$)

Tabla 23. Inhibición sobre la PTP1B de los EETs de murtilia

| Genotipos | 1 μ g/mL EET |
|-----------|------------------|
| ZF-18 | 88,5 \pm 0,9 |
| 8-2 | 83,5 \pm 1,7 |
| 14-4 | 82,7 \pm 1,9 |
| 19-1 | 76,4 \pm 2,5 |
| 19-1ha | 72,9 \pm 1,7 |
| 23-2 | 90,1 \pm 1,3 |
| 22-1 | 88,2 \pm 2,1 |
| 27-1 | 82,2 \pm 1,1 |
| 19-2 | 65,0 \pm 2,8 |
| 31-1 | 59,0 \pm 1,8 |

En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos, en verde por la cantidad de hojas y en color naranja el compuesto de referencia. Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición.

Dentro de los diferentes genotipos evaluados de los EETs fue el 23-2 ($90,1 \pm 1,3\%$) el que mayor porcentaje de inhibición posee a la concentración estudiada, sin embargo son varios los genotipos que poseen un porcentaje de inhibición mayor al 80%.

El EET 31-1 fue el que exhibió el menor porcentaje de inhibición ($59,0 \pm 1,8\%$).

Para poder realizar una correcta comparación entre los extractos EETs y EAEs evaluados, es necesario tener la CI_{50} de cada genotipo, sin embargo, se puede observar que los EETs a una concentración menor (1 μ g/mL) son capaces de inhibir sobre el 50% a la enzima PTP1B; a diferencia de los EAEs que a una concentración de 2 μ g/mL inhiben en su mayoría sobre el 50% a la enzima, además que según los

ensayos preliminares realizados en los genotipos 8-2 y 19-1 de los EAEs, corroboran que a una concentración de 1 µg/mL inhiben menos del 20% a la enzima. Esto último podría indicar que los compuestos fenólicos que se encuentran en forma mayoritaria en los EETs podrían ser responsables de la inhibición de la PTP1B.

Además del sitio catalítico de la PTP1B, se ha identificado un segundo sitio de unión, lo cuales se encuentran adyacentes entre sí (Zhang *et al.*, 1993). Investigaciones mediante a acoplamiento molecular con una estructura cristalográfica de PTP1B humana, utilizando ácidos triterpénicos como el ácido morónico, oleanólico, ursólico y morólico, cuales fue purificado y caracterizado desde extractos acetónicos de hojas y raíces de la planta *Phoradendron reichenbachianum*, sugieren una potencial unión de las moléculas anteriormente mencionadas, al sitio de unión adyacente al sitio catalítico de la enzima (Ramírez *et al.*, 2011).

En las Tablas 24 y 25 se pueden observar los valores de las CI_{50} frente a la PTP1B de los polifenoles y los triterpenoides pentacíclicos respectivamente, resultados recopilados de diferentes investigaciones, de los cuales se adjuntaron los que se encuentran presentes en las hojas de murtilla. De esta recopilación de resultados, se puede concluir que el compuesto con mayor potencia es la epicatequina (0.6 ± 0.0 µg/mL) (Lan *et al.*, 2015), lo cual corroboraría que los EETs posean una mayor capacidad inhibitoria sobre la PTP1B, considerando que la mayor concentración de polifenoles, como la epicatequina, se encuentran en los EETs (Rubilar *et al.*, 2006), Además existen compuestos polifenólicos conjugados que no poseen actividad sobre la enzima como la quercetina-3-O- α -D glucuronido (Zhang J. *et al.*, 2015), lo que podría afectar en la potencia final del extracto.

Por otro lado, los EAEs que poseen una gran cantidad de triterpenoides pentacíclicos (Rubilar *et al.*, 2006; Goity *et al.*, 2013), presentaron una destacada actividad inhibitoria sobre la PTP1B. En general los triterpenoides pentacíclicos encontrados en la bibliografía estudiada, como el ácido ursólico, oleanólico, maslínico y corosólico poseen una gran potencia inhibitoria sobre la enzima, como se puede observar sus CI_{50} en la Tabla 25. Esto último podría indicarnos que los triterpenos de los extractos evaluados sí están implicados en el efecto inhibitorio sobre la PTP1B.

Por consiguiente, ya que tanto los EETs y los EAEs poseen una mezcla de compuestos triterpénicos, polifenólicos y otros en proporciones y concentraciones variables entre extractos y entre genotipos (Arancibia, 2015; Peña, 2014), se puede inferir que los extractos de los genotipos con mejores resultados podrían tener una mezcla de compuestos con capacidad inhibitoria en las proporciones más adecuadas para inhibir la PTP1B.

Tabla 24. Valores de las CI_{50} de los polifenoles presentes en las hojas de murtila frente a la PTP1B

| Polifenoles | CI_{50} [$\mu\text{g}/\text{mL}$] |
|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Epicatequina | $0,6 \pm 0,0^c$ |
| Quercetina | $6,2 \pm 2,3^a$ |
| Quercetina-3-O- β -D-glucóronido | $7,4 \pm 1,2^b$ |
| Miricetina-3-O- β -D-glucóronido | $9,5 \pm 3,3^b$ |
| Quercetina-3-O- α -D-glucóronido | s.a ^b |

CI_{50} : Concentración inhibitoria 50; ^aNurul I. *et al.*, 2013; ^bZhang J. *et al.*, 2015; ^cLan J. *et al.*, 2015; s.a: sin actividad.

Tabla 25. Valores de las CI_{50} de los triterpenoides pentacíclicos presentes en las hojas de murtila frente a la PTP1B

| Triterpenoides pentacíclicos | CI_{50} [$\mu\text{g}/\text{mL}$] |
|------------------------------|---------------------------------------|
| Ácido ursólico | $1,4 \pm 0,1^a$ |
| Ácido oleanólico | $1,8 \pm 0,2^b$ |
| Ácido maslínico | $2,8 \pm 0,1^c$ |
| Ácido corosólico | $3,4 \pm 0,4^b$ |

CI_{50} : Concentración inhibitoria 50; ^aZhang W. *et al.*, 2006; ^bNa M. *et al.*, 2006; ^cQiu W. *et al.*, 2009.

En la Tabla 26 se puede evidenciar que todos los EAEs de *Ugni molinae* estudiados poseen diferencias estadísticamente significativas comparados con el compuesto de referencia a una concentración de 2µg/mL. También sobresale la gran diferencia, estadísticamente significativa, en la capacidad de inhibición sobre la PTP1B entre la mayoría de los genotipos.

Tabla 26. Significancia estadística del efecto inhibitorio de los EAEs de los distintos genotipos de murtila frente a PTP1B.

| | o-vanadato | 19-1 | ZF-18 | 8-2 | 19-1ha | 14-4 | 23-2 | 31-1 | 19-2 | 22-1 | 27-1 |
|------------|------------|------|-------|-----|--------|------|------|------|------|------|------|
| o-vanadato | | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 19-1 | * | | * | * | * | * | * | * | NS | * | NS |
| ZF-18 | * | * | | NS | * | NS | * | * | * | NS | * |
| 8-2 | * | * | NS | | * | NS | * | * | * | NS | * |
| 19-1ha | * | * | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 14-4 | * | * | NS | NS | * | | * | * | * | NS | * |
| 23-2 | * | * | * | * | * | * | | * | * | * | NS |
| 31-1 | * | * | * | * | * | * | * | | * | * | * |
| 19-2 | * | NS | * | * | * | * | NS | * | | * | NS |
| 22-1 | * | * | NS | NS | * | NS | * | * | * | | * |
| 27-1 | * | NS | * | * | * | * | NS | * | NS | * | |

* $p \leq 0,05$ se consideró significativo comparando los distintos genotipos y el control; NS: No significativo; En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos, en verde por la cantidad de hojas y en color naranja el compuesto de referencia.

Específicamente, entre los genotipos ZF-18, 8-2, 14-4 y 22-1 no existe diferencia estadísticamente significativa. Estos genotipos mencionados anteriormente a una concentración de 2µg/mL inhibieron alrededor del 80% la enzima.

Entre los genotipos que a una concentración de 2µg/mL inhibieron sobre el 90% (19-1, 27-1, 19-2 y 23-2), solo hay diferencia estadísticamente significativa entre el más y menos potente (19-1 (97,2 + 0,9%) y 23-2 (91,1 + 2,0%)).

En la Tabla 27 se puede evidenciar que todos los EETs de *Ugni molinae* estudiados poseen diferencias estadísticamente significativas comparados con el compuesto de referencia a una concentración de 1µg/mL. Además es destacable que entre la mayoría de los genotipos evaluados exista diferencia estadísticamente significativa respecto a la capacidad de inhibición de la PTP1B.

Tabla 27. Significancia estadística del efecto inhibitorio de los EETs de los distintos genotipos de murtila frente a PTP1B.

| | O-vanadato | 19-1 | ZF-18 | 8-2 | 19-1ha | 14-4 | 23-2 | 31-1 | 19-2 | 22-1 | 27-1 |
|------------|------------|------|-------|-----|--------|------|------|------|------|------|------|
| O-vanadato | | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 19-1 | * | | * | * | NS | * | * | * | * | * | * |
| ZF-18 | * | * | | NS | * | * | NS | * | * | NS | * |
| 8-2 | * | * | NS | | * | NS | * | * | * | NS | NS |
| 19-1ha | * | NS | * | * | | * | * | * | * | * | * |
| 14-4 | * | * | * | NS | * | | * | * | * | * | NS |
| 23-2 | * | * | NS | * | * | * | | * | * | NS | * |
| 31-1 | * | * | * | * | * | * | * | | * | * | * |
| 19-2 | * | * | * | * | * | * | * | * | | * | * |
| 22-1 | * | * | NS | NS | * | * | NS | * | * | | * |
| 27-1 | * | * | * | NS | * | NS | * | * | * | * | |

*p ≤ 0,05 se consideró significativo comparando los distintos genotipos y el control; NS: No significativo; En color rojo los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos, en verde por la cantidad de hojas y en color naranja el compuesto de referencia.

Entre los genotipos más potentes (23-2, ZF-18 y 22-1), no hubo diferencia significativa, y a su vez los genotipos ZF-18 y 22-1 no presentaron diferencias significativas con el genotipo 8-2. Este último tampoco se diferenció significativamente con los genotipos 14-4 y 27-1, como se puede observar en la Tabla 27.

6. Conclusiones

- Se confirma la hipótesis, ya que existe diferencia estadísticamente significativa en las propiedades farmacológicas estudiadas entre los diferentes genotipos evaluados de *Ugni molinae*, cultivados y recolectados en las mismas condiciones edafoclimáticas.
- Respecto a la inhibición sobre la GP_a, la potencia de los EETs fue mayor que la cafeína, y la potencia de los EAEs, fue menor que la de la cafeína. Lo que podría indicar que los EETs poseen a los compuestos más activos o la mejor mezcla de ellos
- El EET y el EAE del genotipo 19-1 fueron los más potentes en el ensayo de inhibición de la GP_a (CI₅₀ 1,03 y 32,16 µg/mL, respectivamente), siendo este genotipo un potencial candidato para continuar con futuros estudios farmacológicos, además de su cultivo y recolección con fines medicinales.
- Existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos genotipos evaluados frente a la GP_a, esta se debería principalmente a las variaciones genéticas en la especie, debido a que todos los genotipos fueron cultivados y recolectados en las mismas condiciones.
- Respecto a la inhibición de la PTP1B, existe mayoritariamente diferencias estadísticamente significativas entre los 10 genotipos evaluados, lo que se debe a la variación genética en la especie, ya que todos los genotipos fueron cultivados y recolectados en las mismas condiciones. Siendo el genotipo 19-1 el que presento el mayor porcentaje de inhibición entre los EAEs a una concentración de 2µg/mL (97,2 ± 0,9%) y el genotipo 23-2 el que presento el mayor porcentaje de inhibición entre los EETs a una concentración de 1µg/mL (90,1 ± 1,3%).

7. Referencias bibliográficas

Aguirre M.C., Delporte C., Backhouse N., Erazo S., Letelier M.E., Cassels B.K., Silva X., Alegría S. y Negrete R. Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 14(16): 5673–5677, 2006.

Ah-Hen, K., Zambra, C., Aguëro, J., Vega-Gálvez, A. y Lemus-Mondaca, R. Moisture Diffusivity Coefficient and Convective Drying Modelling of Murta (*Ugni molinae* Turcz): Influence of Temperature and Vacuum on Drying Kinetics. *Food and Bioprocess Technology*: 1-12, 2011.

Arancibia Radich, Jorge. Influencia del genotipo en las propiedades antiinflamatorias, hipoglicemiantes y perfil de triterpenoides de las hojas de *Ugni molinae*. Primer Informe de Avance de Tesis (Candidato a Doctor en Ciencias Farmacéuticas). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2015. 55h.

Avello M., Valdivia R., Mondaca M., Ordoñez J., Bittner M., Becerra J. Actividad de *Ugni molinae* Turcz. frente a microorganismos de importancia clínica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (2):141-144, 2009.

Avello M., Pastene E., Bustos E., Bittner M., Becerra J. Variation in phenolic compounds of *Ugni molinae* populations and their potential use as antioxidant supplement. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23(1): 44-50, 2012.

Delporte, C., Backhouse, N., Inostroza, V., Aguirre, M.C., Peredo, N., Silva, X., Negrete, R. y Miranda, H.F. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 112 (1): 162-165, 2007.

Del Prato, S., Marchetti, P. Beta- and alpha-cell dysfunction in type 2 diabetes. *Hormone and Metabolic Research*, 36 (2004), pp. 775–781

Goity L., Queupil M.J., García L., Cassels B.K., Delporte C. Extractos de hojas de *Ugni molinae* (murtilla): inhibidores de glicógeno fosforilasa. XXXII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile: 3 al 6 de noviembre de 2010, Valdivia, SOFARCHI. p.p.s.p.

Goity L., Queupil M.J., Jara D., Alegría S., Peña M., Barriga A., Aguirre M.C., Delporte C. An HPLC-UV and HPLC-ESI-MS based method for identification of anti-inflammatory triterpenoids from the extracts of *Ugni molinae*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2013.

Goldstein, B. J., Bittner-Kowalczyk, A., White, M. F. & Harbeck, M. Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the GRB2 adaptor protein. *J. Biol. Chem.* 275, 4283–4289 (2000).

Hanson, R., Owen, O. Gluconeogenesis. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2013, pp 381-386.

Hao, J., Zhang, X., Zhang, P., Liu, J., Zhang, L. y Sun, H. Efficient access to isomeric 2,3-dihydroxy lupanes: first synthesis of alphilolic acid. *Tetrahedron*, 65 (38): 7975-7984, 2009.

Jakobs, S., Fridrich, D., Hofem, S., Pahlke, G. y Eisenbrand, G. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50 (1): 52-57, 2006.

Junqueira-Gonçalves M., Yáñez L., Morales C., Navarro M, Contreras R. and Zúñiga G. Isolation and Characterization of Phenolic Compounds and Anthocyanins from Murta (*Ugni molinae* Turcz.) Fruits. Assessment of Antioxidant and Antibacterial Activity. *Molecules*, 20, 5698-5713, 2015.

Karis D., Wendy A. Loughlin, Ian D. Jenkins, Peter C. Healy. Glycogen phosphorylase inhibitory effects of 2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl amide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009.

Koren, S., George Fauntus, I., Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 21 (4), 621–640, 2007.

Lan Jiang, Sodik Numonov, Khayrulla Bobakulov, Muhammad Nasimullah Qureshi, Haiqing Zhao and Haji Akber Aisa. Phytochemical Profiling and Evaluation of Pharmacological Activities of *Hypericum scabrum* L. *Molecules*, 20, 11257-11271, 2015.

McCormack, J.C., Westergaard, N., Kristiansen, M., Brand, C.L., and Lau, J. 2001. Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy. *Curr. Pharm. Des.* 7: 1451–1474.

Montenegro, G., Kornfeld, R. y Rioseco, V. Infusión para suavizar cutis reseco. En: *Secretos de nuestras plantas y otras especies: Como usarlas en beneficio de las personas*. 2. Santiago, 2005, pp. 63.

Montenegro, G. Chile nuestra flora útil. Guía de plantas de uso apícola, en medicina folklórica, artesanal y ornamental. Santiago de Chile, Ediciones Universidad Católica de Chile, 2000, pp. 241-242.

Muñoz, M., Barrera, E., Meza, I. El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. Museo de Historia Natural. Santiago de Chile, Publicación ocasional N°33, 1981, pp. 52-53.

Na, M., Jang, J., Njamen, D., Tanyi Mbafor, J., Tanee Fomum, Z., Yeon Kim, B., Keun Oh, W., and Seog Ahn, J. Protein Tyrosine Phosphatase-1B Inhibitory Activity of Isoprenylated Flavonoids Isolated from *Erythrina mildbraedii*. *Journal of Natural Products*, 69, 1572-1576, 2006.

Nurul, M., Ah Jung, H., Sook Sohn, H., Mi Kim, H., Sue Choi., J. Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. *Archives of Pharmacal Research*. 36:542–552, 2013.

Peña Cerda, Marcelo Edgardo. Estudio comparativo de la composición química y actividad antioxidante de hojas de distintos genotipos de *Ugni molinae*. Estudio del mecanismo antiinflamatorio de uno de los extractos bioactivos. Primer Informe de Avance de Tesis (Candidato a Doctor en Ciencias Farmacéuticas). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2015. 80h

Pérez Arancibia, Rodrigo Nicolás. Cuantificación de flavonoides y ácido gálico en hojas de distintos genotipos de *Ugni molinae* Turcz., y evaluación de su actividad antioxidante. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2015. 98h.

Qiu, W., Shen, Q., Yang, F., Wang, B., Zou, H., Li, J., Li, J., Tang, L. Synthesis and biological evaluation of heterocyclic ring-substituted maslinic acid derivatives as novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19: 6618–6622, 2009.

Ramírez-Espinosa J., Rios M.Y., López-Martínez S., López-Vallejo F., Medina-Franco J.L., Paoli P., Camici G., Navarrete-Vázquez G., Ortiz-Andrade R., Estrada-Soto S. Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTP1B: In vitro, in silico, and in vivo approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46: 2243-2251, 2011.

Rubilar M., Pinelo M., Ihl M., Scheuermann E., Sineiro J., y Nuñez M. Murta Leaves (*Ugni molinae* Turcz.) as a Source of Antioxidant Polyphenols. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 54: 59-64, 2006.

Sarwar N, Gao P, Seshasai SRK, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CDA, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*; 375:2215–2222, 2010.

Seguel I., Peñaloza E., Gaete N., Montenegro A. y Torres A. Collecting and molecular characterisation murta (*Ugni molinae* Turcz.) gerplasmin Chile, *Agrosur*. 28(2): 32-41, 2000.

Seguel, I. y Torralbo, L. Murtilla: El berrie nativo del sur de Chile. *Revista Tierra Adentro* N° 57. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago. Chile. 2004. pp 20-25.

Tsitsanou K., Hayes J., Keramioti M., Mamais M., Oikonomakos N., Kato A., Leonidas D., Zographos S. Sourcing the affinity of flavonoids for the glycogen phosphorylase inhibitor site via crystallography, kinetics and QM/MM-PBSA binding studies: Comparison of chrysin and flavopiridol. *Food and Chemical Toxicology*, 2013.

Thomson S. A., Banker P., Bickett D.M., Boucheron J.A., Carter H.L, Clancy D.C., Cooper J.P., Dickerson S.H., Garrido D.M., Nolte R.T., Peat A.J., Sheckler L.R., Sparks S.M., Tavares F.X., Wang L., Wang T.Y., Weiel J.E. Anthranilimide based glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. Part 3: X-ray crystallographic characterization, core and urea optimization and in vivo efficacy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19: 1177–1182, 2009.

Valenzuela Bustamante, Paula Denisse. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de *Ugni molinae* Turcz. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2015. 65h.

Wen, X., Sun, H., Liu, J., Cheng, K., Zhang, P., Zhang, L., Hao, J., Zhang, L., Ni, P., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Alexacou, K.M., Gimisis, T., Hayes, J.M. y Oikonomakos, N.G. Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (12): 3540-3554, 2008.

World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. Report of a WHO/IDF consultation, 2006.

Yi-ming Ma, Rong-ya Tao, Qian Liu, Juan Li, Jin-ying Tian, Xiao-lin Zhang, Zhi-yan Xiao, Fei Ye. PTP1B inhibitor improves both insulin resistance and lipid abnormalities in vivo and in vitro. *Mol Cell Biochem*. 357:65–72, 2011.

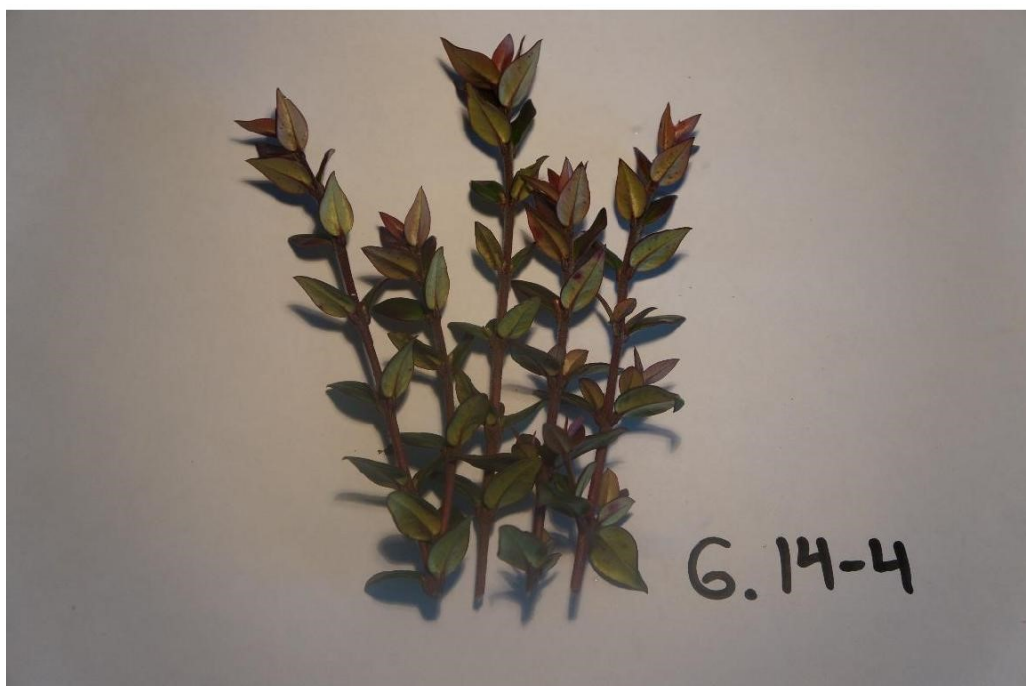
Zhang, J., Shen, Q., Lu, J., Li, J., Liu, W., Yang, J., Li, J., Xiao, K. Phenolic compounds from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Ijinskaja and their inhibitory activity against PTP1B. *Food Chemistry* 119:1491–1496, 2010.

Zhang, W., Hong, D., Zhou, Y., Zhang, Y., Shen, Q., Hu, L., Li, J. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760 1505–1512, 2006.

Zhang, Zy, MacLean, D, Thieme-Seffler, Am *et al.* Substrate specificity of the protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:4446-4450. 1993.

Anexos

Anexos 1: Testigos Herbarios de los 10 genotipos de murtila











Anexo 2: Resumen de congreso asistido

Evaluación de la actividad inhibitoria sobre la glicógeno fosforilasa a de distintos genotipos de *Ugni molinae*. (Evaluation of the inhibitory activity of different genotypes of *Ugni molinae* on glycogen phosphorylase a)

Ítalo Bugueño¹, Jorge Arancibia-Radich¹, Ivette Seguel², Carla Delporte¹

¹Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile;

²INIA, Carillanca, IX Región, Chile.

E-mail: italo.b.d@hotmail.com

Estudios previos en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la U. de Chile, han demostrado que las hojas de murtila poseen un potente efecto inhibitor de la glicógeno fosforilasa a (GPa), enzima responsable de la liberación de glucosa a partir de glicógeno. Los estudios químicos muestran que las hojas de murtila presentan taninos, ácidos fenólicos, flavonoides, y una serie de triterpenoides pentacíclicos como los ácidos asiático, corosólico, madecásico, oleanólico, ursólico y maslínico, los cuales se les vincula en parte a la actividad hipoglicemiante¹.

El objetivo de este trabajo fue determinar en forma comparativa las concentraciones inhibitorias cincuenta (CI₅₀) de los extractos etanólicos (EET) sobre la actividad de la GPa, los cuales fueron preparados a partir de las hojas de diez genotipos de *Ugni molinae*, obtenidos desde el banco de germoplasma del INIA (Carillanca). Dichos genotipos fueron cultivados y recolectados en las mismas condiciones.

La actividad de la enzima fue determinada en dirección de la síntesis de glicógeno a través de la liberación de fosfato desde glucosa-1-fosfato a 22°C. Se desarrolló un aducto de color verde entre el grupo fosfato liberado y la solución de detención que consistió en molibdato de amonio y verde de malaquita². La absorbancia del aducto fue determinada en un lector de microplaca.

Los resultados muestran que el genotipo 19-1 fue el más potente, con un CI₅₀ de 1,03µg/ml, con un porcentaje de inhibición máximo de 84,2% a una concentración de 7,50µg/ml.

Agradecimientos: FONDECYT 1130155; Beca Conicyt 21130672; Beca Conicyt 21120377.

Referencias

¹Goity L., Queupil M.J., García L., Cassels B.K., Delporte C. Extractos de hojas de *Ugni molinae* (murtila): inhibidores de glicógeno fosforilasa. XXXII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile: 3 al 6 de noviembre de 2010, Valdivia, SOFARCHI. p.p.s.p.

² Martin W., Hoover D., Armento S., Stock I., Mcpherson K., Danley D., Stevenson R., Barretti E., Treadway J. Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo. National Academy of Sciences USA 95: 1776–1781, 1998. Medical Sciences.