

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE ÁCIDO QUILLAICO
A PARTIR DE *QUILLAJA SAPONARIA*. EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA TÓPICA Y ORAL”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctora en Química por:**

MAITÉ RODRÍGUEZ DÍAZ

Directores de Tesis

**Dra. Carla Delporte Vergara
Dr. Bruce K. Cassels Niven**

**SANTIAGO- CHILE
2011**

A mis abuelos Juana y Vía *in memoriam*

A mis padres y mi hija, ellos forman parte de mi todo, son mi inspiración y su amor me impulsa día a día.

A mi hermano Douglas, porque me ha mostrado cómo seguir siempre adelante.

Pero la grandeza del hombre está precisamente en querer mejorar lo que es. En imponerse Tareas.

Alejo Carpentier, "El reino de este mundo"

Me lo contaron y lo olvidé; lo vi y lo entendí; lo hice y lo aprendí.

Confucio.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera mostrar mi agradecimiento y admiración a mi tutora, la Dra. Carla Delporte (la profe Carla), por la confianza depositada en mí. Además de sus sabios consejos como directora de este trabajo, recibí su cariño y su apoyo en todo momento. También quiero agradecer a mi tutor Dr. Bruce Cassels (el profe Bruce), por toda la paciencia que ha tenido conmigo y por su gran sabiduría. Ambos me han transmitido con mucha dedicación, no solamente conocimientos de química o farmacología, sino también su experiencia sobre la vida. Es imposible encontrar estas enseñanzas en los libros.

A los profesores de la comisión Dr. Hernán Pessoa, Dr. Orlando Muñoz, Dr. Manuel Cortés y Dr. Hugo Miranda, por las oportunas observaciones hechas a este trabajo en cada etapa de su realización.

A todos los profesores del claustro del Doctorado en Química de la Universidad de Chile. Especialmente agradezco a la Dra. Cecilia Labbé por guíarme desde los inicios, incluso cuando aún no me conocía y por la grata acogida que siempre recibí en su laboratorio.

A los profesores Dr. Aurelio San Martín, Dra. Juana Roviroso, Dra. Francesca Faini y Dra. Nadine Backhouse por todo el cariño y la ayuda que me han brindado.

Al profesor Dr. Nicolás Yutronic por su sabia frase “estudiar, estudiar, estudiar, que el mundo se va a acabar...”

Al Dr. Marcelo Asencio por su contribución en la elucidación estructural del ácido quillaico.

A mis compañeros de doctorado: Pamela Caicedo, Vivianne Dougnac, Cristián González, Silvia Arrau, Mirtha Parada, León Goity, Edwin Pérez, Oney Ramírez, Iriux Almodóvar, Vicente Castro, María Cristina Aguirre, Jorge Soto y Carlos Areche. Todos, de diversa manera, han puesto su granito de arena para la culminación de este trabajo.

A los chicos del laboratorio de productos naturales: Gabriela Valenzuela, Consuelo Castro, Carlos Cartagena, María José Queupil, Marcelo Peña, Pamela Zapata, Patricio Torres y Valentina Toro, por los gratos momentos vividos.

A María Isabel Pino, por su amistad sincera y apoyo en los momentos de incertidumbre.

A la secretaría de postgrado de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, por la atención brindada en cada momento.

A los técnicos y personal de laboratorio, sin los cuales no se puede llevar a cabo un trabajo como este, especialmente a María Inés Polanco, David Aravena, Marco Rebolledo y Manuel Morales.

A la empresa Natural Response por donarnos el material vegetal. Especialmente a Hernán Cortés y Ángela Carrasco, por su buena disposición en la búsqueda de información valiosa para este trabajo.

A Ximena Silva y Patricia González, por la ayuda prestada con los animales de experimentación en el Instituto de Salud Pública.

Quiero agradecer especialmente al DAAD, por brindarme la oportunidad de estudiar con los beneficios de su beca. Especialmente a Elfie Firzlaff, por la excelente labor que desempeña.

A mi tutor en Alemania, Dr. Ludger Wessjohann por su cordialidad y por darme la oportunidad de haber formado parte de su equipo de trabajo en el Instituto de Bioquímica de las Plantas (IBP).

A mis compañeros del laboratorio en el IBP: Fredy León, Martin Brauer y especialmente a Rayser Boch, por hacerme reír cada día de mi estancia en Alemania.

Al grupo de amigos cubanos: Idielín y Abdel, Abel, Naifi, Eduardo René y muchos otros que me han acompañado durante esta travesía.

A mis amigos: Amy, Arelys, Sulay, Albis, Saddys, Jaqui, Isa, Maité 1, Karel y Rafa. Incluso estando lejos, nunca dejaron de estar presente en los buenos y malos momentos. Gracias por su lealtad.

A toda mi familia por su apoyo incondicional desde la distancia.

A *mein* Sebastian, por todo lo que significa para mí su pasión, su ternura y su comprensión infinitas.

A todos los que han contribuido de alguna u otra forma a la realización de este trabajo y a la redacción de mi tesis de doctorado. Gracias a todos por los momentos compartidos, tanto en el ámbito profesional como personal.

ÍNDICE DE MATERIAS

	Página	
Título	i	
Dedicatoria	ii	
Agradecimientos	iii	
Indice	v	
Lista de figuras	viii	
Lista de tablas	x	
Lista de esquemas	xi	
Abreviaturas	xii	
Resumen	xvi	
Abstract	xviii	
1	Introducción	1
1.1	Inflamación. Aspectos generales	1
1.2	Triterpenos pentacíclicos. Aspectos generales	6
1.2.1	Triterpenos pentacíclicos y sus derivados. Propiedades antiinflamatorias y relacionadas	9
2	Descripción de <i>Quillaja saponaria</i> Mol.	14
2.1	Generalidades	14
2.1.1	Clasificación taxonómica	14
2.1.2	Descripción botánica	14
2.1.3	Hábitat y distribución geográfica	15
2.1.4	Composición química	15
2.1.5	Usos, propiedades e importancia económica	16
2.2.2	Explotación y conservación	18
3	Hipótesis y objetivos del trabajo	19
3.1	Hipótesis de trabajo	19

3.2	Objetivos	21
4	Materiales y métodos	22
4.1	Parte química	22
4.1.1	Solventes y reactivos	22
4.1.2	Métodos espectroscópicos y espectrométricos	22
4.1.3	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	22
4.1.4	Espectroscopía de infrarrojo (IR)	23
4.1.5	Espectrometría de masas (EM)	23
4.1.6	Punto de fusión	23
4.1.7	Aislamiento y caracterización de triterpenos pentacíclicos: ácido quillaico y ácido fitolacagénico	23
4.1.8	Determinación de la pureza de ácido quillaico y ácido fitolacagénico mediante CLAE	25
4.1.9	Obtención de derivados hemisintéticos a partir de ácido quillaico	25
	Éster metílico del ácido quillaico (2)	25
	Éster metílico de la 16 α -hidroxihederagenina (3)	26
	3 β ,16 α -Dihidroxi-23-oxoolean-12-en-28-oato de metilo (4a)	27
	3,16-dioxoolean-23-nor-12-en-28-oato de metilo (4b)	27
	3 β ,16 α -Dihidroxi-23-(<i>t</i> -butildimetilsilil)-olean-12-en-28-oato de metilo (5)	28
	3 β ,16 α -Dihidroxi-23-(<i>t</i> -butildimetilsilil)-12,13-epoxiolean-28-oato de metilo (6)	29
	16 α -Hidroxihederagenina ó ácido 3 β ,16 α ,23-trihidroxiolean-12-en-28-oico (7)	30
	Ácido 23-(4-metilpiperazinilazoquillaico (8)	30
	Bis-acetato de ácido quillaico (9)	31
	Bis-succinato de ácido quillaico (10)	32
	23-Nor-12-en-28-nor-3,16-dioxooleanona (11)	32

4.2	Parte farmacológica	33
4.2.1	Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	33
4.2.2	Animales de experimentación	33
4.2.3	Ensayo del edema inducido en oreja de ratón por vía tópica	34
4.2.4	Ensayo de la actividad antiinflamatoria oral	35
4.2.5	Tratamiento estadístico	35
4.3	Formulaciones farmacéuticas desarrolladas	36
4.3.1	Formulación de gel al 8% de ácido quillaico	36
4.3.2	Formulación de crema al 8% de ácido quillaico	37
5	Resultados y discusión	38
5.1	Parte química	38
5.1.1	Triterpenos aislados: ácidos quillaico y fitolacagénico	38
5.1.2	Derivados de ácido quillaico	46
5.2	Parte farmacológica	56
5.2.1	Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	56
5.2.2	Ensayo del edema inducido en oreja de ratón por vía tópica	56
5.2.3	Ensayo de la actividad antiinflamatoria oral	73
5.2.4	Consideraciones sobre la farmacocinética de los compuestos evaluados farmacológicamente	75
6	Conclusiones	77
7	Referencias Bibliográficas	79
8	Anexos	92
8.1	Publicaciones derivadas de la Tesis	92
8.2	Trabajos presentados a congresos	93
8.3	Cromatograma CLAE para ácidos quillaico y fitolcagénico	95
8.4	Espectros para los compuestos obtenidos	96

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Metabolismo del ácido araquidónico	2
Fig. 2 Reacciones de ciclación y peroxidación de la COX	3
Fig. 3 Vía de la ciclooxigenasa	4
Fig. 4 Vía de la óxido nítrico sintasa	5
Fig. 5 Estructura química del isopreno	7
Fig. 6 Estructura química de algunos representantes de la familia de los triterpenos pentacíclicos	8
Fig. 7 Ejemplo de derivados de ácido oleanólico como inhibidores de la iNOs	10
Fig. 8 Estructura química del CDDO	11
Fig. 9 Estructura química del derivado ciano-enona de boswelato de metilo	11
Fig. 10 Estructura de saponinas encontradas en la quinoa	12
Fig. 11 Estructura química de derivado de ácido betulínico	13
Fig. 12 <i>Quillaja saponaria</i> Mol.	15
Fig. 13 Estructura básica de las saponinas de <i>Quillaja saponaria</i> Mol	16
Fig. 14 Estructura química del ácido quillaico	20
Fig. 15 Estructura química del ácido fitolacagénico	40
Fig. 16 Estructuras químicas de las sapogeninas descritas como componentes de las saponinas de corteza de quillay	41
Fig. 17 Estructuras químicas del ácido quillaico y los derivados preparados	46
Fig. 18 Estructuras químicas de ácido fitolagénico y fitolacagenina	61
Fig. 19 Resultados del % de efecto antiinflamatorio tópico (EAI) para los extractos 100Q y H-100Q	63
Fig. 20 Curva dosis-respuesta (escala logarítmica) para el ácido quillaico	64

Fig. 21 Compuestos que presentaron actividad analgésica además de la actividad antiinflamatoria tópica

73

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Aplicaciones y usos de las saponinas del quillay	17
Tabla 2 Resultados de la metodología de extracción empleada	42
Tabla 3 Datos espectroscópicos de ¹ H RMN del ácido quillaico.	43
Tabla 4 Datos espectroscópicos de ¹³ C RMN del ácido quillaico	44
Tabla 5 Datos espectroscópicos de ¹ H RMN y de ¹³ C RMN del ácido fitolcagénico	45
Tabla 6 Triterpenoides naturales aislados con efecto antiinflamatorio	59
Tabla 7 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica inducida por AA y TPA de 100Q y H-100Q	60
Tabla 8 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica de ácido fitolcagénico obtenido de <i>Q. saponaria.</i> , fitolcagenina extraída de <i>P. dioica</i> , y el éster metílico de esta última, frente a inflamación inducida por AA y TPA	62
Tabla 9 Valores de dosis efectiva 50 (DE ₅₀), log DE ₅₀	65
Tabla 10 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica de ácido quillaico, gel y crema al 8 %	65
Tabla 11 Efecto antiinflamatorio topico (%EAI) del ácido quillaico (1) y sus derivados	67
Tabla 12 Porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico <i>in vivo</i> de los derivados obtenidos comparado con sus estructuras químicas	68
Tabla 13 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los fármacos de referencia administrados por vía oral	74
Tabla 14 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria oral del ácido quillaico	74

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema I	47
Esquema II	47
Esquema III	49
Esquema IV	51
Esquema V	51
Esquema VI	52
Esquema VII	53
Esquema VIII	54
Esquema IX	54

ABREVIATURAS

%EAI	Porcentaje de efecto antiinflamatorio
δ	Desplazamiento químico
μM	Micro Molar
100Q	Extracto acuoso purificado Ultra Dry 100 Q ®
^{13}C RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
^1H RMN	Resonancia magnética nuclear de protones
AA	Ácido araquidónico
AcOEt	Acetato de etilo
Ac₂O	Anhídrido acético
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
br s	Singulete ancho
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50%
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
COSY	Espectroscopía de correlación
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
cPLA₂	Fosfolipasa A ₂ citosólica
Cs₂CO₃	Carbonato de cesio
d	Doblete
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
DE₅₀	Dosis efectiva media

DEPT	
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EETs	Ácidos epoxieicosatrienoicos
EI-MS	Espectrometría de masas con ionización electrónica
Et₂O	Éter etílico
EtOH	Etanol
Fr.	Fracción
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
GHMBC	Correlación heteronuclear a múltiple enlace en gradiente
GHSQC	Correlación heteronuclear a múltiple enlace en gradiente
h	Horas
H-100Q	Extracto hidrolizado
HETEs	Hidroxieicosatetraenoicos
HEX	Hexano
HPETEs	Hidroperoxieicosatetraenoicos
Hz	Hertz
IFN-γ	Interferón ganma
IL-6	Citoquinas proinflamatorias
iNOS	Óxido Nítrico Sintetasa inducible
IR	Infrarrojo
ISP	Instituto de salud pública de Chile
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
LPS	Lipopolisacáridos bacterianos
5-LO	Lipooxigenasa
LTs	Leucotrienos
m	Multiplete
<i>m</i>CPBA	ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico

Me₂CO	Acetona
MeI	Yoduro de metilo
MeOH	Metanol
MHz	mega Hertz
min	Minutos
MS	Espectrometría de masas
N₂	Nitrógeno
Na₂SO₄	Sulfato de sodio
NaBH₄	Borohidruro de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetasa
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGES-1c	Isoforma inducible de la PGE sintasa
PGES-1m	Isoforma inducible de la PGE sintasa
PGES-2m	Isoforma inducible de la PGE sintasa
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGIs	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
Pyr	Piridina
q	Cuarteto
R_F	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singulete
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia humana
t	Triplete
TBDMS	<i>t</i> -butildimetilsililo
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol-13 acetato

TXs	Tromboxano
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo I

RESUMEN

Quillaja saponaria Mol. es una especie nativa de Chile, empleada desde tiempos ancestrales para el tratamiento de artritis y dolores dentales. Desde el punto de vista químico las saponinas del quillay han sido ampliamente estudiadas y actualmente se comercializan extractos de la biomasa de quillay, para elaborar saponinas de diversas calidades empleadas en la industria farmacéutica y alimentaria. Sin embargo, se conoce poco acerca de la química de la sapogenina principal (ácido quillaico), así como de la farmacología de esta sapogenina aislada. Estos argumentos brindaron la oportunidad de llevar a cabo una investigación orientada hacia la modificación hemisintética de este producto natural y el estudio de su actividad antiinflamatoria tópica y oral *in vivo*. El objetivo general de este trabajo fue obtener el ácido quillaico a partir de un extracto acuoso de *Quillaja saponaria* Mol. y derivados a partir de la modificación estructural del ácido quillaico; así como evaluar la actividad antiinflamatoria tópica de los compuestos obtenidos. Para ello se emplearon reacciones que implicaron reducciones, oxidaciones y sustituciones de grupos, fundamentalmente en los anillos A, C y D de la molécula de ácido quillaico. Cada uno de los compuestos aislados fue caracterizado estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas y espectrofotométricas. Para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* se empleó el ensayo del edema inducido en la oreja de ratón, tras la administración de AA y/o TPA. En ambos ensayos el grupo de animales tratados con las muestras a evaluar estuvo constituido por 8 animales, los que recibieron una dosis única de cada una de las muestras. Se emplearon dosis de los compuestos aislados equimolares a las dosis de los fármacos de referencia, indometacina y nimesulida. Además se desarrollaron dos formulaciones en base a ácido quillaico al 8%, las cuales fueron evaluadas mediante el ensayo antiinflamatorio descrito anteriormente. Conjuntamente con el ácido quillaico se aisló y caracterizó otra genina de este extracto: el ácido fitolacagénico. Se obtuvieron derivados de ácido quillaico modificando principalmente el grupo hidroxilo adicional en el C-16 y en el grupo aldehído presente en el C-4 en lugar de un metilo. Se demostró la actividad antiinflamatoria tópica del ácido quillaico frente a inflamación inducida por TPA y/o AA. La actividad antiinflamatoria fue dosis dependiente frente a AA con un efecto máximo de 92,1 %, comparado con el fármaco de referencia nimesulida. El ácido quillaico también presentó actividad dosis dependiente frente a TPA (62,2%). Ambos efectos son estadísticamente

significativos. El extracto de saponinas totales (100 Q) no presentó actividad tópica en la inflamación inducida por TPA. Por el contrario, se puede concluir que hubo un efecto proinflamatorio. Frente a AA, el 100Q mostró un efecto de sólo 19,8%. El extracto hidrolizado (H-100 Q) presentó leve actividad antiinflamatoria frente a AA, así como frente a TPA. El efecto antiinflamatorio fue de 25,0% y 35,7 % para AA y TPA, respectivamente. Sin embargo estos resultados no son estadísticamente significativos. Si bien la crema y el gel al 8% de ácido quillaico presentaron efecto antiinflamatorio éstos son menores que las del compuesto puro en ambos ensayos. En la evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía oral, el ácido quillaico no presentó efecto antiinflamatorio. Las modificaciones estructurales realizadas al ácido quillaico disminuyeron el efecto antiinflamatorio. Partiendo de la esterificación del ácido quillaico, los resultados del efecto antiinflamatorio para el éster metil quillaico fueron de 27,3% y 38,4% para AA y TPA, respectivamente. Lo que demuestra que para ejercer el efecto es necesario el ácido carboxílico libre. Para la mayoría de los derivados, la actividad antiinflamatoria frente a TPA fue mayor que frente a AA. Nuestros estudios sugieren que la presencia del grupo aldehído podría ser importante para modular la actividad antiinflamatoria frente a AA, mientras que el grupo carboxilo puede modular la actividad antiinflamatoria frente a TPA. El extracto 100Q obtenido desde la corteza de *Quillaja saponaria* Mol. es una buena fuente de ácido quillaico, triterpenoide con excelente actividad antiinflamatoria tópica.

ABSTRACT

Quillaic acid is the major aglycone of the widely studied saponins of Chilean indigenous tree *Quillaja saponaria* Mol. The industrial availability of quillaja saponins and the extensive functionalization of this triterpenoid provide unique opportunities for structural modification and pose a challenge from the standpoint of selectivity in regard to one or the other secondary alcohol group, the aldehyde, and the carboxylic acid functions. In spite of the traditional use of saponin-rich aqueous extracts of this species to treat inflammation, no scientific studies are available, and the potential use of its major sapogenin as anti-inflammatory agents had not been explored thus far.

The main aim of this study is to determine the topical anti-inflammatory activity of commercial partially purified *Q. saponaria* saponin extract (Ultra Dry Q 100, 100Q) and its hydrolyzed product (H-100 Q). In addition, the anti-inflammatory effect was evaluated of quillaic acid and of its two topical formulations, gel and cream. Some quillaic acid derivatives were prepared and subjected to topical assays for the inflammatory inhibition elicited by arachidonic acid (AA) or phorbol ester (TPA).

Evaluations of the topical antiinflammatory activity were made for both a commercial partially purified saponin extract (UltraDry 100Q, 100Q) and sapogenins crude (H-100Q). The two most abundant sapogenins—quillaic acid and phytolaccagenic acid—were isolated from H-100Q, and pharmacologically evaluated. All these samples, 100Q, H-100Q, quillaic acid and phytolaccagenic acid, were subjected to topical assays for the inhibition of inflammation elicited by arachidonic acid (AA) or phorbol ester (TPA).

The topical antiinflammatory activity was evaluated by AA-induced and 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA)-induced inflammation assays in mice ears. TPA acts primarily as an activator of protein kinase C and NF- κ B, promoting the enhanced expression of proinflammatory enzymes such as the inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and 5-lipoxygenase. On the other hand, AA presumably acts downstream as a precursor of inflammatory mediators such as elastase, myeloperoxidase, NADPH oxidase and cyclooxygenase 1.

While 100Q did not exhibit topical antiinflammatory activity, H-100 Q was slightly active (35.7%). Quillaic acid showed dose-dependent anti-inflammatory activity against both AA

(92.1 %) and TPA (62.2) assays. On the other hand, phytolaccagenic acid showed anti-inflammatory activity against AA (%efecto) and TPA (%efecto). Two topical formulations using quillaic acid as active principle—a cream and a gel (8% w/v)—exhibited lower anti-inflammatory effect than pure quillaic acid in the TPA (50.8%) and AA (39.5%) assays. On the other hand, our derivatives exhibited a lower antiinflammatory activity than quillaic acid. The modifications of our derivatives led us to conclude that the occurrence of the aldehyde and carboxyl groups could modulate the antiinflammatory activity.

The topical antiinflammatory effect of aqueous extracts from *Quillaja saponaria* is for the first time under study. Although 100Q did not show topical antiinflammatory effect against TPA, its main sapogenin, quillaic acid, did exhibit dose-dependent topical antiinflammatory effect against both AA and TPA models.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INFLAMACIÓN. ASPECTOS GENERALES

El proceso inflamatorio es una respuesta fisiológica de defensa local cuya finalidad es localizar, aislar y destruir un agente nocivo (microorganismo o toxina) y propiciar los mecanismos de reparación tisular, siendo un proceso muy complejo caracterizado por enrojecimiento, edema, fiebre, dolor y pérdida de función del tejido involucrado (Simmons *et al.*, 2004; Goodman *et al.*, 2006). No obstante, cuando se alteran los mecanismos reguladores encargados de mantener bajo control dicha respuesta, el proceso se vuelve patológico (Ray *et al.*, 2009).

Las células componentes del medio ambiente inflamatorio incluyen monocitos, macrófagos, linfocitos B y T, neutrófilos y mastocitos, y cada una de estas cumple funciones determinadas para restablecer la homeostasis (Serhan y Savill, 2005). La activación de estas células da lugar a la generación de gran variedad de mediadores, que forman parte de la compleja respuesta inflamatoria, dando la característica de cascada a esta respuesta. Esta cascada comienza con la formación de ácido araquidónico (AA) mediante la acción de la fosfolipasa citosólica A2 (cPLA₂) a partir de los fosfolípidos de la membrana citoplasmática. El AA formado activa diversas enzimas responsables de la liberación de los mediadores anteriormente citados; los de mayor trascendencia son los llamados eicosanoides. Entre los eicosanoides están: a) los tromboxanos (TXs) y las prostaglandinas (PGs) responsables de la vasodilatación y, por lo tanto del edema, calor y dolor en la zona de inflamación, en especial la PGE₂, generada en gran cantidad por este tipo celular y una de las responsables de la hiperalgia (Mitchell y Warner, 1999); b) PGI₂ y LTs; todos ellos de acciones diversas, sintetizados a partir del AA (Simmons *et al.*, 2004). Otros tipos de mediadores producto del metabolismo del AA son: c) los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) y los ácidos hidroxieicosatrienoicos (HETEs); en último lugar d) los isoprostanos formados por la formación de radicales libres en el área afectada (Figura 1).

En principio, la activación de macrófagos da lugar a la generación de una gran variedad de mediadores que actúan formando parte del complejo proceso de la respuesta inflamatoria. Como ejemplos están los mediadores lipídicos, factores del complemento, y citoquinas proinflamatorias interleucinas IL-1 α y β , IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF- α), entre otros. Los macrófagos contienen también las isoenzimas inducibles ciclooxigenasas (COX-2) y la óxido nítrico sintasa (iNOS), las cuales son expresadas tras la activación de las células por contacto con diversos estímulos proinflamatorios como citoquinas, endotoxinas y ésteres de forbol, entre otros (Simmons *et al.*, 2004).

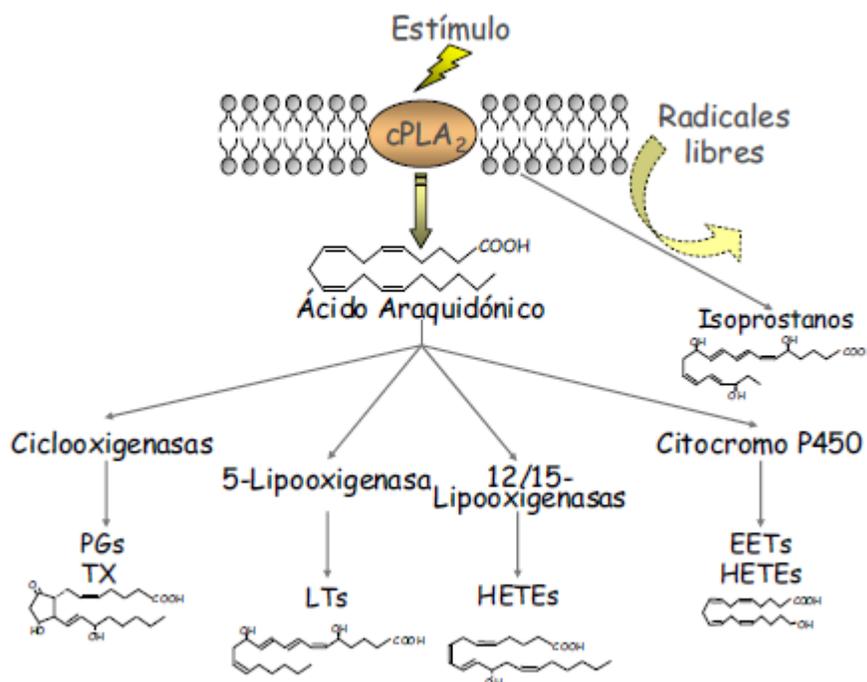


Figura 1. Metabolismo general del ácido araquidónico. cPLA₂, fosfolipasa A₂ citosólica; EETs, ácidos epoxieicosatrienoicos; HETEs, ácidos hidroxieicosatetraenoicos; LTs, leucotrienos; PGs, prostaglandinas; TX, tromboxano. **Fuente:** López-Parra et al., 2005

La ciclooxigenasa (COX) es una enzima que cataliza la conversión de AA a PGH₂, el precursor de una variedad de mediadores activos fisiológicamente, como PGE₂, PGI y TX. Hay dos isoformas principales de esta enzima, COX-1, una ciclooxigenasa constitutiva, y COX-2, una isoforma inducida en respuesta a varios estímulos y activada en el sitio de la inflamación. COX-2 es rápidamente inducida en macrófagos y células

endoteliales por citoquinas proinflamatorias y puede ser responsable del edema, vasodilatación y dolor asociados a la inflamación (López-Parra et al., 2005, Simmons *et al.*, 2004). A su vez, la activación de macrófagos puede inducir hipersecreción de varias moléculas que median inflamación y toxicidad, como TNF- α , IFN- γ , IL-6, entre otras. Las diferentes vías de acción de las ciclooxigenasas (ambas isoformas de la COX (COX-1 y COX-2) oxigenan el AA para formar la prostaglandina (PGG₂, que rápidamente se reduce a PGH₂, endoperóxido muy inestable que origina los diferentes tipos de PGs por acción de diversas sintasas (Figura 2).

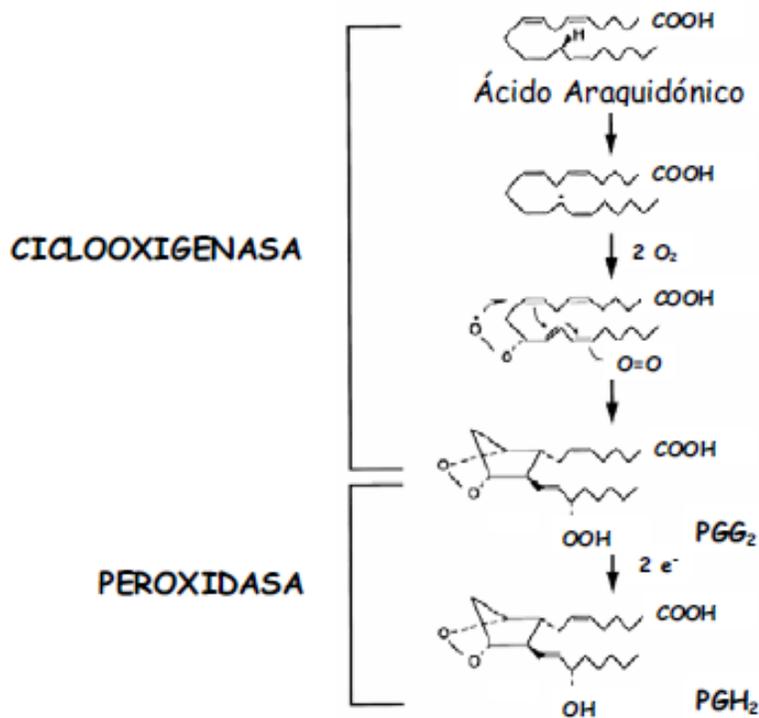


Figura 2. Reacciones de ciclación y peroxidación de la COX. Reacciones consecutivas catalizadas por las ciclooxigenasas o endoperóxido H sintasas. **Fuente:** López-Parra, 2005

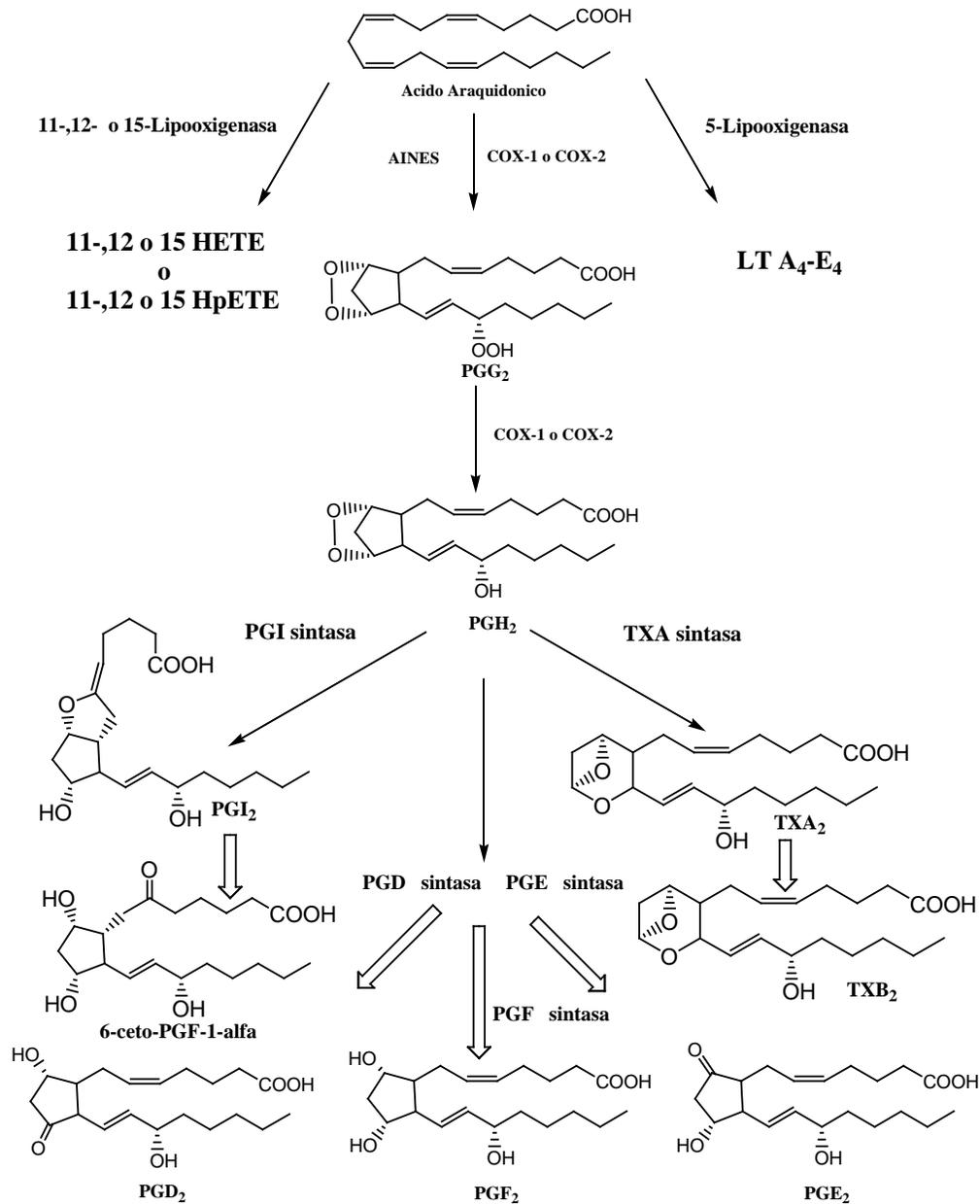


Figura 3. Vía de las ciclooxygenasas (COX). Ambas isoformas de la COX (COX-1 y COX-2) oxigenan al AA para formar la prostaglandina (PGG₂, que rápidamente se reduce a PGH₂, endoperóxido muy inestable que origina los diferentes tipos de PGs por acción de diversas sintasas.

La PGH₂ actúa como sustrato intermediario para la síntesis de PGs de las series E₂, F₂, D₂ e I₂ (también llamada prostaciclina) y la TXA₂ (Figura 3). El hecho de que la PGH₂ se transforme en un metabolito o en otro está regulado de forma específica dependiendo

del tipo celular y de la sintasa que se exprese, de tal manera que cualquier célula formadora de prostanoides, sintetiza uno de ellos mayoritariamente. Por ejemplo, PGH_2 se transforma en PGD_2 en el cerebro por la acción de la enzima citosólica PGD sintasa. Alternativamente PGH_2 puede convertirse en $\text{PGF}_{2\alpha}$ por la PGF sintasa que se expresa principalmente en el útero. Las células endoteliales vasculares producen PGI_2 o prostaciclina a partir de la PGH_2 por la acción de la PGI sintasa; y las plaquetas liberan TXA_2 a partir de la PGH_2 mediante la TX sintasa. Tanto la PGI_2 como la TXA_2 tienen una vida media muy corta (30 segundos y 3 minutos, respectivamente) por lo que son rápidamente hidrolizadas a los compuestos inactivos 6- keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ y TXB_2 . Finalmente la PGE_2 se produce en muchos tipos celulares mediante la PGE sintasa, que existe en mamíferos bajo tres isoformas diferentes: PGES-1m, PGES-1c y PGES-2m. De estas tres isoformas, la PGES-1m es la que ha recibido mayor atención porque esta enzima es inducible y se encuentra funcionalmente ligada a la isoforma COX-2 (Murakami y Kudo, 2004).

Otra de las enzimas altamente expresada en macrófagos activados es la iNOS, la que a partir de L-arginina genera otro de los mediadores implicados en la respuesta inflamatoria e hiperalgésica, el óxido nítrico (NO) como se muestra en la Figura 4.

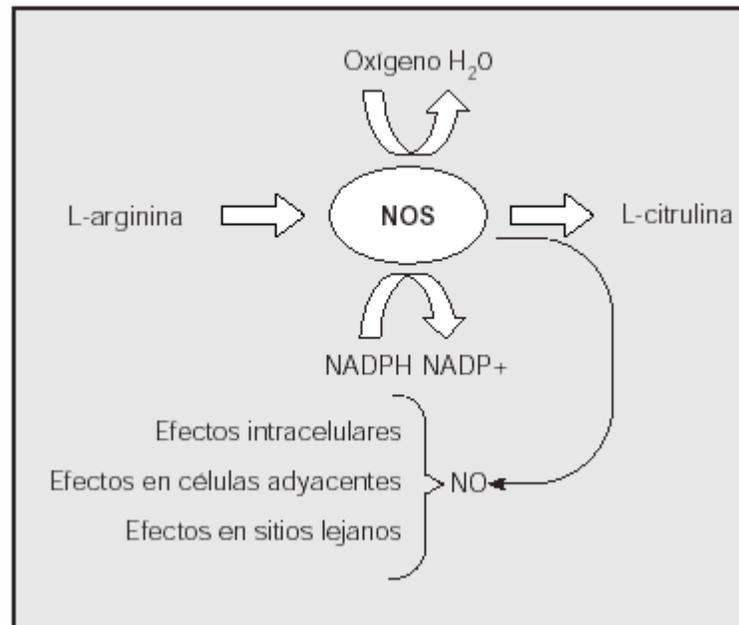


Figura 4. Vía de la óxido nítrico sintasa (NOS).

Esta molécula tiene una acción antimicrobiana en los macrófagos al formar, en presencia del anión superóxido generado también por células fagocíticas, una especie radicalaria como el peroxinitrito. Esta molécula es muy reactiva y citotóxica y es responsable del daño tisular asociado a los procesos inflamatorios (Boscá *et al.*, 2005).

La expresión elevada de COX-2 en macrófagos y células endoteliales debida a la acción de lipopolisacáridos (LPS) y citoquinas proinflamatorias da lugar a una producción excesiva de PGs, mayoritariamente PGE₂, responsable de la vasodilatación y dolor (Mitchell y Warner, 1999). Por otra parte, la sobreproducción de NO por activación de la iNOS está fuertemente asociada con la inflamación (Boscá *et al.*, 2005).

Por lo tanto el mecanismo más importante involucrado en la respuesta antiinflamatoria es la inhibición de enzimas, tales como la cPLA₂ (generadora de eicosanoides), la COX-2 (productora de cantidades significativas de prostaglandina PGE₂) y la iNOS (productora de óxido nítrico) (Serhan *et al.*, 2005). Los fármacos o sustancias antiinflamatorias pueden seguir diversas vías para conseguir dicho efecto. Los más conocidos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) inhiben la enzima COX actuando como antagonistas competitivos reversibles en la mayoría de los casos (López-Parra *et al.*, 2005). Un caso particular es la aspirina que actúa por acetilación irreversible de la isoenzima COX-1. Otros antiinflamatorios conocidos como los corticoides son capaces de inhibir varias etapas en el proceso de la inflamación, como la inhibición de la cPLA₂ e incluso el factor de transcripción nuclear (NF-κβ).

1.2 TRITERPENOS PENTACÍCLICOS. ASPECTOS GENERALES.

La gran potencialidad de la biosíntesis de las plantas está muy bien ilustrada en el grupo de metabolitos secundarios conocido como “terpenoides”. En general los terpenos están formados por unidades de 5 unidades de isopreno y constituyen uno de los grupos de compuestos más ampliamente distribuidos en la naturaleza junto con los alcaloides y los compuestos fenólicos (Figura 5).

En un comienzo se aislaron, desde las fracciones más volátiles de muchos aceites esenciales, hidrocarburos de fórmula $C_{10}H_{16}$ a los que se le denominó “terpenos”. Luego se aislaron compuestos oxigenados que también se incluyeron dentro de esta clasificación general, por lo que la terminación “eno” (correspondiente a hidrocarburo) resultó inadecuada y se les llamó “terpenoides”. Estos compuestos se encuentran principalmente en el reino vegetal. Aunque generalmente se encuentran en las plantas dicotiledóneas y pteridofitas, también es posible encontrarlos en algunos animales marinos (Bruneton, 2001).

Están formados por la unión virtual de unidades de isopreno. Esta relación del isopreno con los terpenoides es absolutamente formal, ya que según la ruta biogénica de estos compuestos, los vegetales no los sintetizan a partir del isopreno, el cual no ha sido aislado como producto natural (Müller, 1974). Sin embargo, el conocimiento de la unión de dos o más unidades isoprénicas como componentes de los terpenoides ha sido de gran ayuda en la elucidación de sus estructuras. Esto llevó a la formulación de la “regla del isopreno”, enunciada por Ruzicka que plantea que un terpenoide debe ser divisible en unidades de isopreno (Ruzicka, 1953).

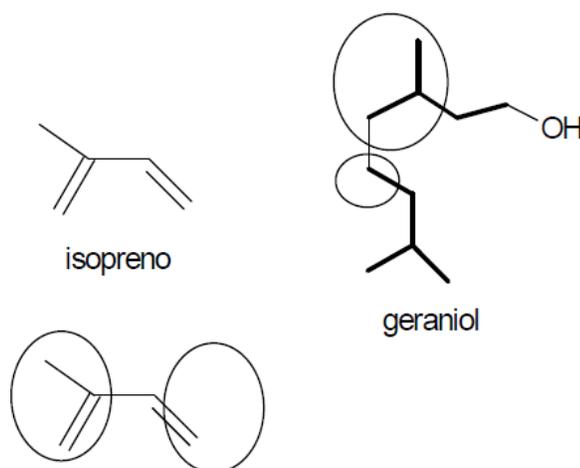


Figura 5. Estructura química del isopreno (2-metil butadieno). Cuando se unen dos unidades isoprénicas se obtienen los monoterpenos como por ejemplo el geraniol.

De acuerdo a la regla del isopreno, los terpenos se clasifican de acuerdo a la multiplicidad de este grupo en monoterpenos (dos unidades isoprénicas), sesquiterpenos (tres), diterpenos (cuatro) sesterpenos (cinco), triterpenos (seis), etc. Dentro del grupo de los terpenoides están los triterpenoides, ampliamente distribuidos en el reino vegetal como glicósidos, estéres o libres. Por definición se consideran *productos naturales que tienen un esqueleto de 30 átomos de carbono ($C_{30}H_{48}$ o menos átomos de hidrógeno dependiendo de su grado de oxidación) y que se derivan del escualeno (6 unidades de isopreno) por ciclaciones y/o modificaciones de éste*. El estudio de los triterpenoides tuvo sus inicios en 1949 con la determinación estructural del ácido oleanólico (Tschesche, 1971).

Según cuál sea su esqueleto estructural base se dividen en diferentes familias entre las cuales se destacan por su abundancia los lupanos (ej.: ácido betulínico) que presentan cuatro anillos de seis miembros y uno de cinco; y los oleananos (ej.: ácido oleanólico y ácido quillaico) y ursanos (ej.: ácido ursólico) que presentan cinco anillos de seis miembros (Figura 6).

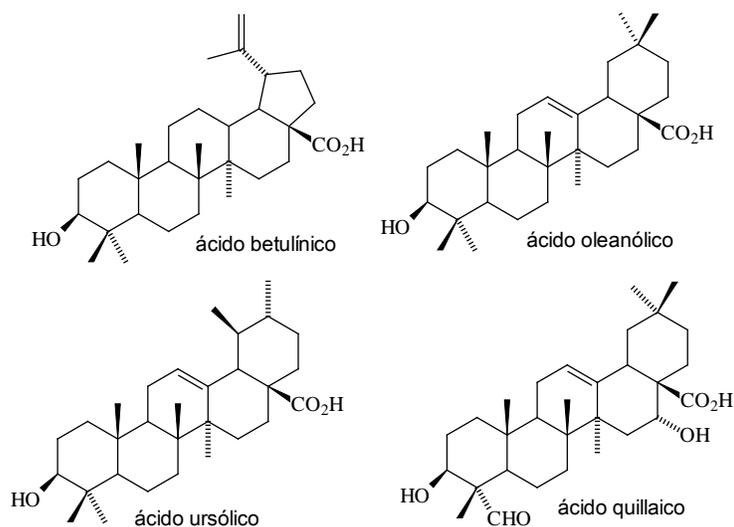


Figura 6. Estructuras químicas de algunos representantes de las familias de los triterpenoides pentacíclicos: ácido betulínico, ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido quillaico.

De forma general los triterpenoides han sido ampliamente estudiados no solo desde el punto de vista químico estructural, sino también por sus diversas aplicaciones en la industria de la alimentación y la agricultura, así como en la medicina tradicional y moderna (Connolly y Hill, 2000).

Principalmente los triterpenos pentacíclicos han llamado la atención por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales (Sezter, 2003; Banno *et al.*, 2004; Chiang *et al.*, 2005; Ovesna *et al.*, 2004; Reyes, 2006; Brinker *et al.*, 2007), hepatoprotectoras (Yim *et al.*, 2001), antimicrobianas (Cowan *et al.*, 1999; Hichri *et al.*, 2003), antivirales (Mayaux *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 2001) hipoglucemiantes ó antidiabéticas (Chen *et al.*, 2006), entre otras.

1.2.1. Triterpenos pentacíclicos y sus derivados: Propiedades antiinflamatorias y relacionadas.

Durante la última década se han publicado aproximadamente 700 artículos científicos sobre triterpenos pentacíclicos, especialmente sobre aquellos derivados del ácido oleanólico (Connolly, 2000; Calixto *et al.*, 2003; Liu, 2005; Dzuback, 2006; Brinker *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Estas investigaciones no incluyen solamente el aislamiento y la purificación de estos triterpenoides a partir de diversas fuentes vegetales, sino también modificaciones químicas de los mismos para obtener derivados más efectivos en diversas actividades farmacológicas. Una de las más estudiadas la actividad antiinflamatoria, debido a que está estrechamente relacionada con patologías con alta incidencia en la población mundial actual, tales como la artritis reumatoide y el cáncer, entre otras (Singh *et al.*, 1992; Banno *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). En la actualidad se busca obtener derivados de hemisíntesis a partir de triterpenoides pentacíclicos más potentes como antiinflamatorios, con menos reacciones adversas y una óptima biodisponibilidad (Farina *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2005).

En diversos estudios se ha demostrado que, por ejemplo, el ácido oleanólico tiene actividad antiinflamatoria importante evaluada en ensayos *in vivo* en los que se indujo

inflamación dérmica con AA o TPA en orejas de ratón (Singh *et al.*, 1992; Recio *et al.*, 1995; Banno *et al.*, 2004; Liu, 1995; Aguirre *et al.*, 2006); incluso, en uno de estos trabajos, el ácido triterpénico resultó ser más activo que la indometacina usada como fármaco de referencia (Banno *et al.*, 2004). Además se demostró que el ácido oleanólico inhibe las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) que intervienen en el proceso inflamatorio (Brinker *et al.*, 2007). Más recientemente se ha observado que a bajas concentraciones (menores de 3 μM) inhibe la producción de NO y de la PGE_2 (Wu *et al.*, 2004).

Basándose en estos resultados se han preparado derivados de hemisíntesis del ácido oleanólico empleando diferentes vías y probando conjuntamente su actividad antiinflamatoria *in vitro*. En uno de estos estudios se investigó una serie de derivados como inhibidores de la producción de NO (Honda *et al.*, 2000a). Como resultado se obtuvieron e identificaron nuevos derivados del ácido oleanólico con funcionalidad 1-en-3-ona, entre los que se destacaron el ácido 3-oxoolean-1,12-dien-28-oico (Figura 7 a) y los sustituidos además en el C-2 del anillo A con grupos carboxilo, como se muestra en la Figura 7. Estos mostraron una gran actividad inhibitoria ($\text{CI}_{50} = 0,01\text{-}0,1 \mu\text{M}$) de la producción de NO inducida por $\text{INF-}\gamma$ en macrófagos de ratas. De éstos fue el más potente el derivado del ácido 2-carboxi-3-oxoolean-1,12-dien-28-oico (Figura 7b), el cual tuvo una potencia similar a la hidrocortisona empleada como fármaco de referencia ($\text{CI}_{50} = 0,1 \mu\text{M}$). Cabe señalar que la actividad inhibitoria de estos nuevos triterpenos no fue bloqueada por un fármaco antagonista de glucocorticoides, lo que sugiere que su acción sobre la iNOS no está mediada por la interacción con el receptor de estas hormonas.

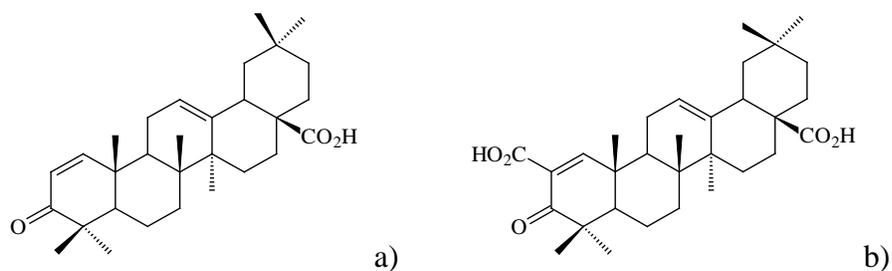


Figura 7 a y b. Ejemplos de derivados del ácido oleanólico con interesante actividad como inhibidores de la iNOS.

Otro ejemplo interesante, que ha sido ampliamente estudiado, es el ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) el cual presenta una potente actividad antiinflamatoria por el mecanismo de inhibición de la iNOS y de la COX-2 (Suh *et al.*, 1998; Liu, 2005) e inhibe la proliferación de varias líneas celulares de tumores en humanos (Favaloro *et al.*, 2002). En este derivado la modificación conjunta de los anillos A y C aumenta la potencia antiinflamatoria aproximadamente 10.000 veces con respecto al ácido oleanólico (Honda *et al.*, 2000b) (Figura 8).

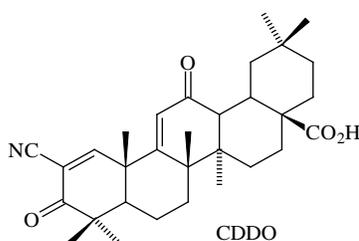


Figura 8. Estructura química del 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO). Actualmente este compuesto se encuentra en fase II de ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer pancreático.

De forma general, han despertado mayor interés los derivados de hemisíntesis del ácido oleanólico que contienen un grupo electroceptor en el C-2 del anillo A como por ejemplo el grupo ciano y los oxo-derivados (Zaprutko, 2004; Chen *et al.*, 2006, Ogawa *et al.*, 2007). También se ha prestado atención a derivados de los ácidos boswélico, en los cuales fue encontrado un potente efecto antiinflamatorio y citotóxico (Subba Rao *et al.*, 2008). (Figura 9)

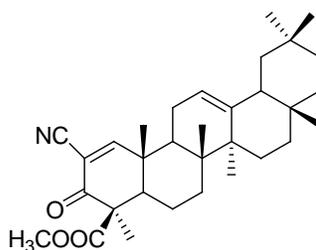


Figura 9. Derivado ciano-enona de boswelato de metilo con potente actividad citotóxica

Además en el 2008 fue reportado el efecto citotóxico tanto de saponinas como de geninas de la quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), importante planta alimenticia endémica de la región andina (Kuljanabagavad *et al.*, 2008). Estas saponinas constituyen una mezcla compleja de triterpenos pentacíclicos provenientes estructuralmente de los ácidos oleanólico, fitolacagénico y hederagenina, formando glicósidos con diversos azúcares. Se denominan geninas a la agliconas triterpénicas, de las cuales aquéllas con grupos aldehídos presentaron mayor actividad citotóxica (Figura10).

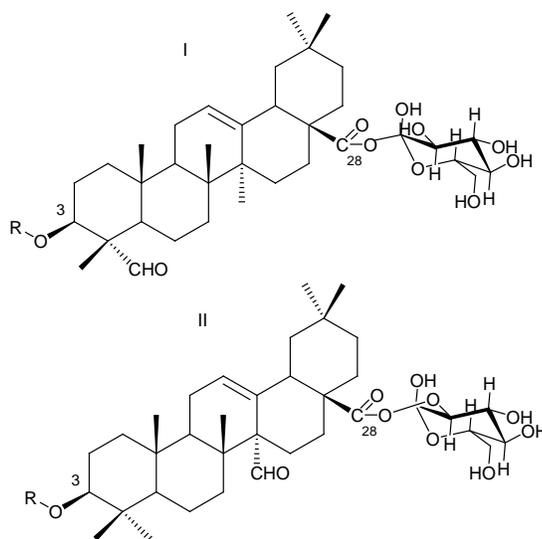


Figura10. Estructuras químicas de las saponinas encontradas en la quínoa con actividad citotóxica y que presentan grupos aldehídos en su estructura: ácido 3B-hidroxi-23-oxo-olean-12-en-28-oico (I) y ácido 3B-hidroxi-27-oxo-olean-12-en-28-oico,

Entre los diferentes tipos de triterpenos pentacíclicos se destaca el ácido betulínico, extraído de diversas especies vegetales, al que se le han realizado diversas modificaciones estructurales y su posterior evaluación biológica. Fujioka *et al* (1994) sintetizaron y evaluaron biológicamente nueve derivados de este triterpenoide, encontrando que el grupo hidroxilo en posición 3 y el ácido carboxílico en posición 17 contribuían positivamente a la actividad antiVIH-1. Más recientemente se han obtenido derivados del ácido betulínico con potente actividad antiviral (Csuk *et al.*, 2010). Con el mismo efecto, como posibles agentes para tratar el SIDA, se encontraron productos

naturales obtenidos desde propóleo brasileño, entre los cuales se encontraba el ácido betulínico (Ito *et al.*, 2001).

Recientemente se han preparado derivados del triterpeno dammarano con fuerte habilidad para inhibir la proteasa del VIH-1 (Wei *et al.*, 2009). Aunque obtienen varios compuestos, los mejores resultados se relacionan con los ésteres succínicos como potentes inhibidores de la proteasa del VIH-1 ($IC_{50} < 10 \mu M$) (Figura 11).

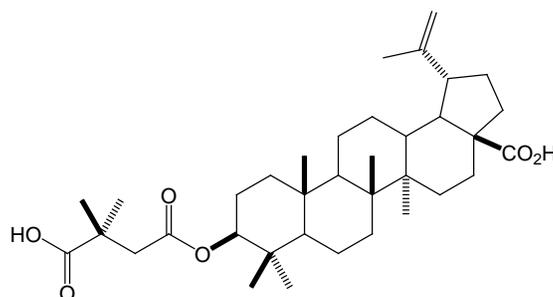


Figura11. Éster 2,2-dimetilsuccínico del ácido betulínico con potente actividad antiviral

1. DESCRIPCIÓN DE *QUILLAJA SAPONARIA* MOL.

2.1 Generalidades

2.1.1 Clasificación taxonómica

El nombre genérico *Quillaja* proviene de la denominación popular que se le diera a este árbol en Chile (“quillay”), que deriva del mapudungun “këllai” o “küllai”, que significa “jabón de palo”. El nombre específico o epíteto proviene del latín “sapo” (jabón) y hace referencia al uso tradicional de la corteza del árbol para lavar y a su característica espumante, lo cual se debe a su abundante contenido de saponinas, metabolitos secundarios que se caracterizan por sus propiedades detergentes y espumantes (Ribera et al., 2008, Bruneton, 2001). El género *Quillaja* pertenece a la Clase Magnoliopsida, Subclase Rosidae, Orden Rosales, Familia Quillajaceae, Subfamilia Spiroidea (Montenegro, 2002). La *Quillaja saponaria* Mol., Quillajaceae D. Don (1831), según Kubitzki (2007), está constituida por un solo género y dos especies: *Q. saponaria* y *Q. brasiliensis* (Kubitzki, 2007).

2.1.2 Descripción botánica

El quillay, es un árbol siempre verde de hojas duras que puede alcanzar hasta 15 m de altura con un tronco de diámetro de hasta 1 m. Su corteza es de color gris ceniciento y presenta algunas fisuras longitudinales. Sus hojas son simples, alternas, cortamente pecioladas, de color verde, glabras, de forma oblonga y borde liso o sólo con algunos dientes. Sus flores son hermafroditas, solitarias o dispuestas en corimbos terminales cortos, de color verde blanquecino, aplanadas y en forma estrellada. Posee un cáliz compuesto por 5 sépalos y una corola de 5 pétalos alternos a los sépalos. Androceo formado por 10 estambres en dos series de filamentos libres y gineceo compuesto por 5 ovarios, cada uno con un estilo filiforme y un estigma Su fruto es una cápsula leñosa, dehiscente, con forma

de estrella de 5 puntas, que contiene numerosas semillas aladas (Hoffmann *et al.*, 1992; Montenegro, 2002) (ver Figura 12).



Figura 12. *Quillaja saponaria* Mol. A) Árbol B) Hojas y Flores y C) Frutos.

Fotografías de Juan Pablo Gabella y Diego Alarcón; <http://www.chilebosque.cl/tree/qsapo.html>.

2. 1.3 Hábitat y distribución geográfica

Es una especie nativa de Chile, especialmente de la zona central del país, desde la Provincia de Limarí en la IV Región (30°30' LS) hasta la Provincia del Bío-Bío en la VIII Región (38° LS). Forma parte del matorral esclerófilo desde la Cordillera de Costa hasta la Cordillera de los Andes. En el Valle Central de Chile, crece en lugares soleados y en los cerros secos de escasa vegetación (Hoffmann *et al.*, 1992).

2. 1.4 Composición química

Este árbol presenta una mezcla compleja de saponinas triterpénicas, siendo éstos los metabolitos mayoritarios en la especie (Nord *et al.*, 2001). En los extractos de corteza y madera de quillay se han identificado 62 saponinas diferentes (Higuchi *et al.*, 1987, Higuchi *et al.*, 1988; Kensil *et al.*, 1991; Jacobsen *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1998; Nord y Kenne, 2000; Guo *et al.*, 2000; Nyberg *et al.*, 2000; Van Setten *et al.*, 2000). Como se muestra en la Figura 13, el esqueleto estructural de la mayoría de las saponinas de quillay es el ácido quillaico sustituido en la posición C-3 con un trisacárido y en la posición C-28

con un oligosacárido unido a un residuo de fucosa, el cual a su vez, se encuentra unido a dos grupos acilo. (Higuchi *et al.* 1988; Kensil *et al.*, 1991; Jacobsen *et al.*, 1996; Van Setten *et al.*, 1995; Nord y Kenne, 2000).

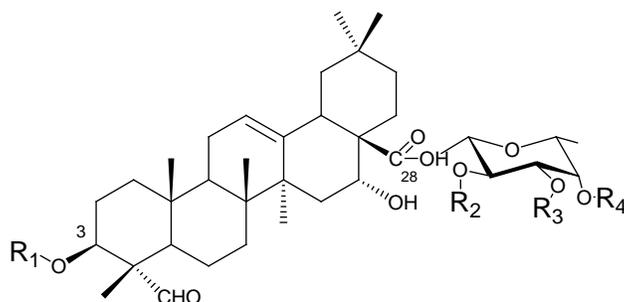


Figura 13. Estructura básica de las saponinas de *Q. saponaria* Mol. derivadas del ácido quillaico. La aglicona está unida en la posición 3 a un trisacárido o disacárido (R1). El residuo fucosilo (Fuc) unido a través de un grupo éster en la posición-28, está sustituido por un oligosacárido en la posición 2 (R2), por un residuo monosacárido o un grupo acilo en la posición 3 (R3), y/o por un grupo acilo en la posición-4 (R4). **Adaptado de:** Ribera *et al.*, 2008, Nord *et al.*, 2001.

2.1.5 Usos, propiedades e importancia económica

La importancia económica del quillay radica fundamentalmente en su alta concentración de saponinas, compuestos que presentan una gran cantidad de propiedades y usos.

Existen más de 200 referencias científicas con respecto a las posibles aplicaciones industriales de las saponinas de quillay. Las principales se muestran en la Tabla 1.

Industria	Usos
Alimentación humana	Espumante en bebidas y cervezas, emulsificante en comidas y bebidas.
Alimentación animal	Aditivo para alimentos, protección contra patógenos (inmunoestimulante), reducción de emisiones de amoníaco en criaderos, reducción de colesterol de huevos y productos lácteos.
Agricultura	Promotor de crecimiento vegetal.
Cosmética	Surfactante, emulsificante y principio activo, fundamentalmente en la fabricación de champúes.
Fotografía	Surfactante en películas fotográficas
Minería	Tratamiento de aguas residuales, mejoramiento de la calidad de los efluentes orgánicos (biodegradación de grasas en procesos aeróbicos y anaeróbicos), control de la neblina ácida en procesos de electro obtención.
Farmacéutica	Adyuvante en vacunas animales y humanas.

Tabla 1. Aplicaciones y usos industriales de las saponinas del quillay. **Adaptado de:** San Martín y Briones, 2000. Ribera et al., 2008

En la medicina folclórica esta especie se recomienda para tratar enfermedades respiratorias y afecciones dermatológicas, así como para tratar artritis reumatoide crónica. Además la corteza macerada se usa como expectorante; mientras que los infusos en enfermedades crónicas de la piel, y en lavados para tratar las indigestiones. Además el quillay se utiliza para tratar las alopecias, como estimulante de la mucosa gástrica, sudorífico y diurético (Hoffmann *et al.*, 1992).

Actualmente, las saponinas del quillay han despertado el interés científico por sus actividades citotóxica (Gaidi *et al.*, 2002), inmunoestimulante como coadyuvante de vacunas (Palatnik de Sousa *et al.*, 2004) y más recientemente, antiviral (Roner *et al.*, 2007).

Las fracciones menos tóxicas de las saponinas de esta especie se han utilizado experimentalmente en el control y prevención de enfermedades infecciosas, cáncer, desórdenes autoinmunes, tratamiento del SIDA e infección neumococal, control de la malaria y tratamiento de la tuberculosis (Kensil *et al.* 1991; Newman, 1992; Wu, 1992; Chavali)

Además, estudios han demostrado que extractos de quillay ricos en saponinas actuarían como larvicidas (Pelah *et al.*, 2002), nematocidas (San Martín y Briones, 2000) y fungicidas naturales (Apablaza *et al.*, 2002). En la actualidad se evalúa la posibilidad de utilizar dichos extractos en la formulación de plaguicidas naturales de interés comercial (Apablaza *et al.*, 2002).

2. 1.6 Explotación y conservación

Con el propósito de proteger la población de la especie, en 1985 el quillay fue clasificado en estado "*Vulnerable*" por la Corporación Nacional Forestal (CONAF) en la IV Región. Ribera *et al.*, 2008. Esto se debió a un manejo inadecuado que hizo que el quillay estuviera seriamente amenazado.

La empresa Natural Response S.A. ha desarrollado un proceso que utiliza toda la madera del quillay (no sólo la corteza) para la obtención de extractos de quillay ricos en saponinas, lo que ha permitido satisfacer parte de la demanda mundial de saponinas empleando madera proveniente de raleos de los bosques existentes y así aprovechar mejor la biomasa silvestre (comunicación personal con Natural Response, 2007). Actualmente la empresa dedica grandes recursos al manejo sustentable de la corteza de quillay y a la preservación de la especie.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

- El ácido quillaico puede ser obtenido eficientemente a partir de un extracto acuoso de *Quillaja saponaria* Mol. mediante la hidrólisis en medio ácido.
- El ácido quillaico presentará actividad antiinflamatoria tópica y oral *in vivo* frente a inflamación inducida por TPA y/o AA.
- El ácido quillaico puede ser estructuralmente modificado teniendo en cuenta su elevada funcionalización (diferenciándose del ácido oleanólico en el grupo hidroxilo adicional en el C-16 y en el grupo aldehído presente en el C-4 en lugar de un metilo)
- Algunos derivados de hemisíntesis del ácido quillaico presentarán igual o mayor actividad farmacológica que el ácido quillaico.

Esta hipótesis se basa en que dentro de la familia de los oleananos se encuentra el ácido quillaico ó quillájico (ácido $3\beta,16\alpha$ -dihidroxi-23-oxoolean-12-en-28-oico), principal sapogenina triterpénica de la corteza del quillay (*Quillaja saponaria* Mol., Quillajaceae), el cual no aparece entre las decenas de triterpenos naturales reportados por su actividad antiinflamatoria (Figura 14). Sin embargo en 1977 se aislaron dos saponinas con actividad antiinflamatoria y analgésica, a partir de un extracto obtenido de partes aéreas de la clavelina *Dianthus barbatus* L. cv. "China Doll" (familia Caryophyllaceae). Curiosamente la aglicona de cada una fue identificada como ácido quillaico (Cordell *et al.*, 1977. Además de este estudio, existen escasos antecedentes sobre la obtención de derivados a partir de ácido quillaico y su posterior evaluación farmacológica (Kim *et al.*, 2006).

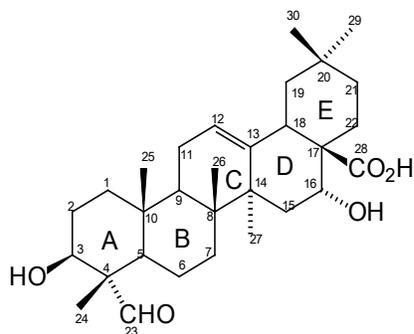


Figura 14. Estructura química del ácido quillaico ó quillájico (ácido $3\beta,16\alpha$ -dihidroxi-23-oxoolean-12-en-28-oico), principal sapogenina triterpénica de la corteza del quillay (*Quillaja saponaria* Mol., Quillajaceae)

Por otra parte, Chile es el único país que produce grandes cantidades de corteza de quillay, la que se exporta masivamente a Europa y los Estados Unidos para obtener diversas calidades de saponinas de uso industrial, cosmético y farmacéutico (Vogel y Berti, 2003).

También desde el punto de vista químico las saponinas del quillay han sido ampliamente estudiadas (Higuchi *et al.*, 1987; Higuchi *et al.*, 1988; Kensil *et al.*, 1991; Jacobsen *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1998; Nord y Kenne, 2000; Guo y Kenne, 2000; Nyberg *et al.*, 2000). Sin embargo, se conoce poco acerca de la química de la sapogenina principal (ácido quillaico) desde su elucidación estructural en 1939 y posteriormente, en 1968, la identificación de los constituyentes de la prosapogenina (sapogenina y un azúcar) predominante en una mezcla de productos de hidrólisis parcial, que resultó ser el 3β -glucurónido del ácido quillaico (Labriola y Deulofeu, 1969). Estos argumentos nos brindan una gran oportunidad para emprender una investigación orientada hacia la modificación hemisintética de este producto natural y el estudio de su actividad antiinflamatoria tópica y oral *in vivo*.

Los estudios farmacológicos *in vivo*, utilizando una vía de administración usada por la población, como son las vías tópica y oral, nos permitirán obtener una mejor estimación de los potenciales efectos farmacológicos de la principal sapogenina del quillay y de sus productos de hemisíntesis. Es necesario tener en cuenta que los estudios farmacológicos

de un potencial nuevo fármaco, realizados en animales, son un requisito indispensable para su posterior uso clínico. Además desde el punto de vista práctico, es interesante estudiar la potencialidad terapéutica de un producto natural para cuya producción Chile cuenta con ventajas comparativas únicas.

3.2 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es obtener el ácido quillaico a partir de un extracto acuoso de *Quillaja saponaria* Mol. y derivados a partir de la modificación estructural del ácido quillaico; así como evaluar la actividad antiinflamatoria tópica de los compuestos obtenidos.

Para lograr este objetivo general nos proponemos los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener y purificar eficientemente el ácido quillaico a partir de un extracto acuoso seco de corteza de quillay.
2. Evaluar la actividad antiinflamatoria tópica de ácido fitolacagénico y fitolcagenina.
3. Evaluar la actividad antiinflamatoria tópica y oral *in vivo* del ácido quillaico..
4. Sintetizar una serie de derivados a partir del ácido quillaico, mediante reducciones, oxidaciones y sustituciones de grupos, fundamentalmente en los anillos A, C y D.
5. Evaluar la actividad antiinflamatoria tópica *in vivo* de los derivados obtenidos
6. Realizar estudios de relación estructura-actividad para determinar los requerimientos estructurales necesarios para las actividades evaluadas tanto *in vivo*.
7. Desarrollar formulaciones dermatológicas en base a ácido quillaico y evaluar su eficacia *in vivo*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 PARTE QUÍMICA

4.1.1 Solventes y reactivos

Para el aislamiento de las sapogeninas mediante CC se utilizó gel de sílice Merck (Kieselgel 60), con tamaños de partícula comprendidos entre 0,063-0,200 mm y 0,040-0,063 mm. Para la purificación de los productos obtenidos por hemisíntesis se utilizó la sílice más fina y sucesivas CC en Sephadex LH-20.

Para el análisis por CCF se emplearon cromatofolios de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Aldrich), revelando los cromatogramas con *p*-anisaldehído-ácido sulfúrico (PAS) (etanol/ácido acético/ácido sulfúrico/*p*-anisaldehído, 17/2/1/0,2), calentando las placas a 100 °C hasta aparición de un color para visualizar las manchas. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla de AcOEt: DCM (1:1). En la sección de síntesis se detalla el sistema de solventes utilizado en cada caso.

4.1.2 Métodos espectroscópicos y espectrométricos

Para la determinación estructural de todos los compuestos en estudio se usaron técnicas de RMN uni- y bidimensionales, de IR, de masas y datos de literatura.

4.1.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los datos espectrales fueron obtenidos en un espectrómetro Avance Bruker con sonda de determinación inversa de 5 mm y con gradientes en Z 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C. En algunos casos se registraron los espectros en un instrumento Varian INOVA 500 (500 MHz para ¹H / 125 MHz para ¹³C). La asignación de las señales, según las necesidades, fue hecha con la asistencia de experimentos de COSY, DEPT, GHMBC y GHSQC. Como solventes para las mediciones se emplearon CDCl₃ y CD₃OD según la solubilidad de los distintos compuestos. Los valores de desplazamientos químicos fueron

expresados en δ con respecto a las señales del TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

4.1.4 Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Todas las muestras se prepararon en pastillas de KBr y los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro Nicolet Nexus 470 FT-IR.

4.1.5 Espectrometría de masas (EM)

Los espectros de masas de alta resolución fueron obtenidos en un espectrómetro de masas FT-ICR (Bruker Apex III 70e Fourier Transform - Ion Cyclotron Resonance - MS con IRMPD, fuentes de iones: ESI, APCI y Nanospray) equipado con una celda InfinityTM con un imán superconductor a un campo de 7,0 Tesla.

4.1.6 Puntos de fusión

Los puntos de fusión fueron determinados en una platina microscópica de Kofler Reichert-Jung Galen III acoplada a un termómetro de termocupla DUAL JTEK Digi - Sense.

4.1.7 Aislamiento y caracterización de los triterpenoides pentacíclicos: ácido quillaico y ácido fitolacagénico

El material de partida (Ultra Dry 100Q®, Lote: 300507, P.I. 25732002) fue donado por Natural Response S.A. Éste es un extracto acuoso seco, purificado por spray, proveniente de la biomasa de *Quillaja saponaria*, Mol., que contiene un 93% de sólidos y menos del 7% de humedad (Roner *et al.*, 2007). Es un polvo amorfo, de color entre blanco y beige, con un pH de 4,3 para una solución del 10%. El contenido de saponinas triterpénicas es del 65% determinadas por CLAE (San Martín and Briones, 2000). El extracto ha sido aprobado por la FDA (Food and drug administration) para uso de la industria alimentaria (21 CFR

172.510, FEMA GRAS número 2973). Además ha sido aprobado para su uso en la Unión Europea (UE) en bebidas no alcohólicas (código E 999. Current CAS número 68990-67-0). La información sobre el lugar y la época de recolección de la biomasa es un dato no otorgado por la empresa Natural Response S.A).

A este material de partida hemos denominado en nuestro trabajo 100Q.

Para realizar la hidrólisis, se pesaron 20 g de 100Q y se mezclaron con 500 mL de una solución acuosa de HCl al 9% con calentamiento a reflujo a 100 °C durante 3 horas. El sólido resultante se filtró al vacío, se lavó con abundante agua y se llevó hasta sequedad en estufa para calcular rendimiento. Al sólido final que se obtuvo en este proceso se le denominó H-100Q.

Al hidrolizado obtenido (H-100Q) se le realizó un fraccionamiento en CC de sílica gel. La muestra a fraccionar se mezcló con una cantidad menor o igual a su peso en sílica gel y se homogenizó con ayuda de acetona en un mortero. Dicho proceso también ayudó a volatilizar el solvente.

Una vez que el disolvente se volatilizó, el sólido se secó en estufa hasta completa sequedad. A continuación la muestra se hizo pasar por un tamiz, originando la “cabeza” de la columna cromatográfica.

Por otra parte, se pesó una cantidad de sílica gel al menos 5 veces mayor a la “cabeza” en altura, constituyendo el “cuerpo” de la columna. El siguiente paso fue seleccionar la columna, agregar un papel filtro sobre la frica y conectar la columna a un matraz Kitasato. A continuación se mezcló el cuerpo con diclorometano (DCM) y se agregó en forma de papilla a la columna. Una vez que este proceso se realizó cuantitativamente, se esperó que la sílica gel decante y que su superficie fuese plana. Recién en ese momento se añadió vacío para eliminar completamente el DCM, compactar la sílica y dejar la columna seca.

Luego se agregó un segundo papel filtro, seguido de la cabeza, y se homogenizó con ayuda de presión mecánica y vacío (sin solvente). Una vez que la superficie de la cabeza no presentó irregularidades, se agregó un tercer papel filtro y algodón.

Para eluir la primera fracción se activó el sistema de vacío, se agregó un volumen adecuado de fase móvil y se cortó el vacío hasta cuando la columna ya no goteó más.

Las distintas fracciones se monitorearon por medio de cromatografía en capa fina (CCF, ver más abajo). Aquellas que presentaron un perfil cromatográfico similar se reunieron en una y se les eliminó el disolvente mediante un rotavapor para realizar otra columna de sephadex.

Las fracciones reunidas en una se disolvieron en 20 ml de una mezcla de HEX, DCM y MeOH (6:2:1) la cual se llevó a una CC rellena de Sephadex LH-20 utilizando esa misma mezcla para eluir. Para la columna utilizada, que tiene una altura de 33,5 cm y un diámetro interno aproximado de 4,6 cm (volumen aproximado 560 mL), se agregó 20 mL de fase móvil saturada con muestra (3,5 % del volumen de la columna). Se recolectaron aproximadamente 60 fracciones de eluyente, cada una de un volumen de aproximadamente 40 mL. Cada fracción recolectada se monitoreó mediante CCF. Las fracciones que presentaron similar perfil cromatográfico se juntaron y se concentraron a presión reducida, siendo sometidas a otra CC en Sephadex bajo las mismas condiciones aquéllas que aún no presentaban la pureza requerida. En el caso de comprobar su pureza fueron sometidas a los métodos espectroscópicos anteriormente mencionados para su elucidación estructural. Una vez que la CCF no evidenció la presencia de sapogeninas, la columna se lavó con metanol para su reutilización.

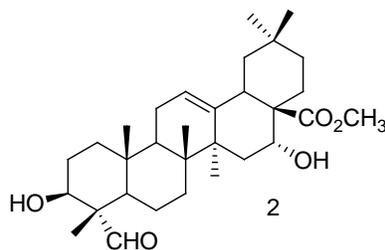
4.1.8 Determinación de la pureza de ácido quillaico y ácido fitolacagénico mediante CLAE

Se analizó la pureza, tanto del ácido quillaico necesario para las semisíntesis como del ácido fitolacagénico aislado. Se utilizó una técnica analítica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAE), en un equipo Merck Kapillar-GC-FID HRGC MEGA 5160). La fase móvil empleada consistió en una mezcla de acetonitrilo: H_3PO_4 al 0,1% en agua = 60:40 v/v. Flujo fue de 0,8 mL/min y el volumen de inyección de 20 μ l.

4.1.9 Obtención de derivados hemisintéticos a partir de ácido quillaico

Éster metílico del ácido quillaico (2). En un balón se colocó ácido quillaico (compuesto **1**, 200 mg, 0,41 mmol) y DMF (10,3 mL). A esta solución a 0 °C se le añadió MeI (25 μ L,

0,41 mmol) y Cs_2CO_3 (401 mg, 1,23 mmol). La mezcla de reacción se dejó bajo agitación durante 45 min a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y luego fue concentrada a presión reducida. El producto obtenido fue purificado por CC empleando como fase móvil DCM:AcOEt 1:1 para dar un sólido blanco (**2**), de $R_F = 0,83$ (190 mg, 95%).



Punto de fusión: 174-177 $^\circ\text{C}$

IR (KBr): 3506 (-OH), 2945, 1721 (CO), 1589 y 1452 cm^{-1}

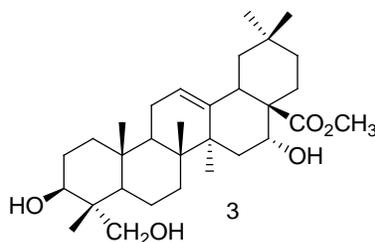
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0,73, 0,88, 0,96, 0,99, 1,00, 1,40 (3H s, Me-24, 26, 29, 30, 25, 27) 3,01 (1H, dd, $J = 4,2; 14,1$ Hz, 18-H), 3,57 (3H, s, $-\text{CH}_3$), 3,77 (1H, m, 3-H), 4,44 (1H, m, 16-H), 5,30 (1H, t, $J = 3,3$ Hz, 12-H), 9,29 (1H, s, 23-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz)

δ 9,4, 16,2, 17,6, 24,8, 27,3, 33,4, 49,9, 52,3, 56,7, 72,8, 75,1, 123,3, 145,0, 179,3, 208,5.

HREIMS Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_5$: 523,3387280, encontrado: 523,3393957.

Éster metílico de la 16 α -hidroxihederagenina (3). En un balón se colocó el compuesto **2** (129 mg, 0,26 mmol) disuelto en MeOH anhidro (7,0 mL) a $0\text{ }^\circ\text{C}$. A esta solución se le añadió NaBH_4 (15 mg, 0,39 mmol) y se dejó agitando a $0\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas. La reacción se detuvo con la adición de agua helada (70 mL). Luego se filtró el sólido formado y éste fue disuelto en AcOEt (200 mL) y se lavó con una solución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y luego se concentró a presión reducida. El producto se purificó por CC (DCM:AcOEt 2:1) para dar un sólido blanco (**3**), $R_F = 0,36$ (120 mg, 93%).



Punto de fusión: 150-155°C

IR (KBr): 3422, 2947, 2363, 1717, 1654 cm^{-1} .

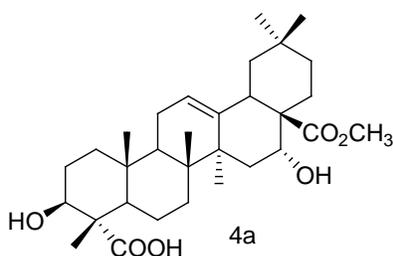
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0,70, 0,76, 0,88, 0,96, 0,98, 1,38 (3H cada uno, s, Me-24, 26, 29, 30, 25, 27) 3,00 (1H, dd, $J = 4.4; 14.3$ Hz, 18-H), 3,29 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, 24-H), 3,52 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, 24-H), 3,57 (3H, s, CH_3); 3,63 (1H, dd, $J = 5,1; 11,0$ Hz, 3-H), 5,30 (1H, t, $J = 3,3$ Hz, 12-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz)

δ 12,75, 16,36, 17,7, 24,8, 27,3, 33,4, 67,3, 73,8, 75,2, 123,5, 144,9, 179,4.

HREIMS Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{O}_5$: 501.3578930, encontrada: 501.3585483.

3 β ,16 α -Dihidroxi-23-oxoolean-12-en-28-oato de metilo (4a) y (3,16-dioxoolean-23-nor-12-en-28-oato de metilo (4b). El compuesto **2** (100 mg, 0,199 mmol) fue colocado en un balón con 9,7 mL de acetona en un baño a 0 °C. Durante 20 minutos, con agitación constante, fue añadido gota a gota el reactivo de Jones (0,54 mL/mmol sustrato, 1,75 mL) hasta que el color de la solución cambió de verde a pardo. La mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 10 min. Para eliminar el exceso del reactivo de Jones fue añadido 2-propanol (10 mL) y los compuestos volátiles fueron evaporados a presión reducida. Luego se añadió agua destilada (20 mL) y la mezcla acuosa fue extraída tres veces con AcOEt (10 mL cada vez). El extracto fue lavado tres veces con agua (10 mL) y tres veces con solución acuosa saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 y filtrada. El filtrado fue concentrado a presión reducida para dar un residuo que fue purificado por CC en gel de sílice (DCM:AcOEt 2:1) para dar dos compuestos mayoritarios, **4b** de color amarillo-pardo, $R_F = 0,81$ (25 mg, 25%) y **4a**, (AcOEt:MeO 1:1) de color amarillo, $R_F = 0,17$ (10 mg, 10%).

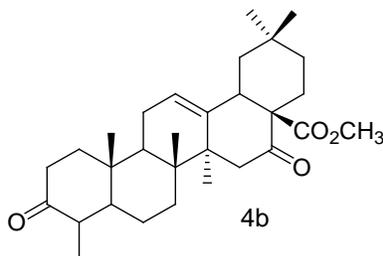


4a Punto de fusión: 180-190 °C

IR (KBr): 3447, 2925, 2854, 2361, 1712 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0,72, 0,90, 0,97, 1,25, 1,34 (3H cada uno s, Me-26, 30, 29, 27, 25), 2,04 (1H, s, 24-H), 2,71 (1H, d, $J = 15,2$ Hz, 19-H), 3,35 (1H, dd, $J = 3,8, 14,4$ Hz, 18-H), 3,61 (3H, s, CH_3), 4,30 (1H, t, 16-H), 4,51 (1H, s, 3-H), 5,38 (1H, t, $J = 3,3$ Hz, 12-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ 51,92, 72, 24, 74,96, 175,5, 177,4, 122,7, 142,7.



4b Punto de fusión: 240-246 °C

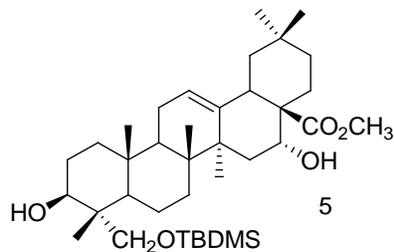
IR (KBr): 3411, 2956, 2924, 2855, 1719, 1715 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0,87, 0,92, 0,93, 1,17, 1,19 (3H cada uno s, Me-30, 25, 29, 26, 27), 1,00 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, 24-H), 2,71 (1H, d, $J = 15,2$ Hz, 19-H), 3,33 (1H, dd, $J = 3,8; 14,4$ Hz, 18-H), 3,67 (3H, s, CH_3), 5,56 (1H, t, $J = 3,3$ Hz, 12-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ 52,44, 124,1, 140,5, 173,3, 208,6, 213,6.

3 β ,16 α -Dihidroxi-23-(*t*-butildimetilsilil)-olean-12-en-28-oato de metilo (5). Una mezcla de **3** (100 mg) con cloruro de TBDMS (96 mg, 1,3 mmol) e imidazol (170 mg, 2,5 mmol) en DMF (0,5 mL) fue agitada en atmósfera de N_2 a temperatura ambiente durante 18 h. Luego se añadió HEX (30 mL) y la solución fue lavada varias veces con NaCl (2×10 mL) y luego con agua (20 mL), y secada con Na_2SO_4 . Después de la evaporación del solvente el

residuo se purificó repetidas a través de CC en gel de sílice (HEX:AcOEt, 90:10), para dar el compuesto **6**, sólido de color blanco (60 mg, 62,5%), $R_F = 0,80$.



Punto de fusión: 290-294 °C

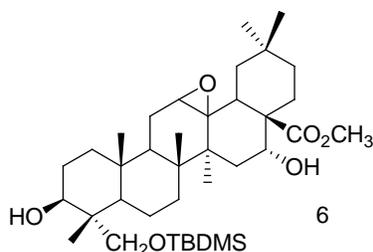
IR (KBr): 3542, 3467, 2951, 2927, 2856, 1710 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0,05 (9H, s, Si-(CH_3)₃), 0,72, 0,88, 0,90, 0,96, 1,33 (3H cada una s, Me-30, 25, 29, 26, 27), 3,03 (1H, dd, $J = 3,8, 14,4$ Hz 18-H), 3,33 (1H, dd, 2H, - CH_2O), 3,5 (1H, t, 3-H), 3,70 (3H, s, CH_3), 4,50 (1H, s, 16-H), 5,40 (1H, t, $J = 3,3$, 12-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) δ 11,20, 16,04, 16,98, 23,40, 24,80, 27,05, 52,91, 56,45, 68,85, 72,79, 75,15, 123,7, 145,2, 178,0.

EM $[\text{M-Na}]^+ = 639,31305$ calculada para ($\text{C}_{37}\text{H}_{64}\text{O}_5\text{Si} = 616,45230430$).

3 β ,16 α -Dihidroxi-23-(*t*-butildimetilsilil)-12,13-epoxiolean-28-oato de metilo (6). Una mezcla de **5** (43 mg, 0,06 mmol) y *m*CPBA (15,5 mg, 0,09 mmol) en DCM (3 mL) se dejó agitando a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla fue diluida en 20 mL de DCM:Et₂O (1:2), lavada varias veces con NaCl (2 \times 10 mL) y luego con agua (20 mL), y secada con Na₂SO₄. Después de la evaporación del solvente el residuo (65 mg) se purificó por cromatografía en una placa preparativa de gel de sílice usando como eluyente HEX:AcOEt 1:5 para dar **6** como un sólido cristalino de color blanco (25 mg, 58%). Una muestra de 10 mg fue obtenida por recrystalización en MeOH, $R_F = 0,20$.



Punto de fusión: 295-297 °C

IR (KBr): 3411, 2948, 2862, 1701, 1627 cm^{-1} .

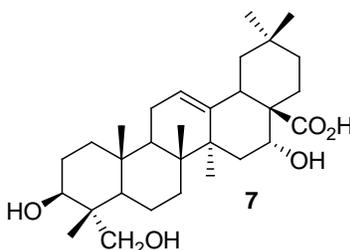
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 0,55, 0,88, 0,92, 0,96, 1,22 (3H cada una s, Me-30, 25, 29, 26, 27), 3,42 (2H, dd, $-\text{CH}_2\text{O}$), 4,03 (1H, dd, $J = 3,8; 14,4$ Hz, 18-H), 4,34 (1H, s, 16-H), 5,21 (1H, brt, 12-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz)

δ 11,45, 16,09, 16,18, 23,25, 26,57, 52,90, 55,47, 56,36, 67,98, 72,24, 75,12, 178,6.

EM $[\text{M-Na}]^+ = 655,72304$ calculada para $(\text{C}_{37}\text{H}_{64}\text{O}_6\text{Si} = 632,45623432)$.

16 α -Hidroxihederagenina ó ácido 3 β ,16 α ,23-trihidroxiolean-12-en-28-oico (7). Ácido quillaico (10 mg, 0,02 mmol) fue disuelto en MeOH anhidro (1,0 mL) a 0 °C. A esta solución se le añadió NaBH_4 (1,15 mg, 0,03 mmol) y se dejó agitando a 0 °C durante 2,5 h. La reacción se detuvo con la adición de agua helada (10 mL). Luego se filtró y el sólido fue disuelto en AcOEt (20 mL). Se lavó con una solución saturada de NaCl, la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y luego se concentró a presión reducida para dar 8 mg (80%) de un sólido blanco (7) $R_F = 0,50$.



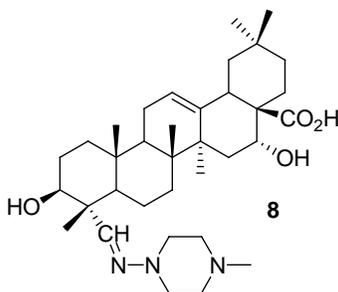
Punto de fusión: 200-204 °C.

IF (KBr): 3420, 2947, 2370, 1715, 1654 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) 5,50 (1H, t, H-12), 4,45 (H-16), 4,03 (1H, dd, H-3), 3,50 (d, CH_2), 3,30 (d, CH_2 $J = 11,0$ Hz), 3,00 (1H, dd, H-18), 0,70-1,3 (6 señales, 3H cada una, s).

Ácido 23-(4-metilpiperazinilazoquillaico (8). Una solución de **1** (100 mg, 0,205 mmol) más 1-amino-4-metilpiperazina (61,2 mg, 0,6 mmol) en EtOH absoluto (43 mL) y ácido acético glacial (1,7 mL) fue calentada bajo reflujo durante 24 h. La mezcla de reacción fue

concentrada a sequedad y el residuo fue purificado por CC en gel de sílice, eluyendo con DCM:AcOEt (1:1). El producto final **8** (35 mg, 35%) fue un sólido de color amarillo claro.



Punto de fusión: 200-210 °C

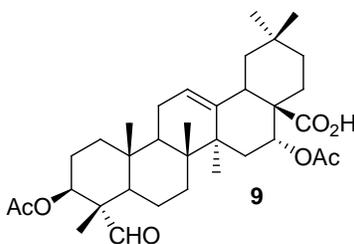
IR (KBr): 3424, 2944, 2862, 2361, 1610 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 0,77, 0,83, 0,94, 0,95, 0,97, 1,31 (3H cada uno, s, Me-30, 25, 29, 24, 26, 27), 2,41 (3H, s, N- CH_3), 2,63 (4H, m, $-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_3$), 3,04 (4H, m, $-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2-$), 3,27 (3H, s, CH_3), 3,52 (1H, t, $J = 5,1$ Hz, H-3), 3,67 (1H, dd, $J = 3,8; 14,2$ Hz, H-18), 4,40 (1H, s, H-16), 5,27 (1H, t, $J = 3,5$ Hz, H-12), 6,70 (1H, s, H-23).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ 11,09, 14,18, 17,03, 19,49, 22,35, 50,70, 51,76, 53,47, 74,25, 75,32, 121,4, 144,2, 152,6, 179,4.

HREIMS Calculada para $\text{C}_{35}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_4$: 583,4303220. encontrada: 583,4300958.

Bis-acetato de ácido quillaico (9). Ácido quillaico (100 mg, 0,21 mmol) fue tratado con Ac_2O (0,5 ml, 0,41 mmol) en pyr (1,5 mL) en presencia de DMAP (25 mg) a temperatura ambiente por 12 h. La mezcla de reacción fue concentrada a sequedad en un evaporador rotatorio hasta obtener un sólido de color pardo (96 mg, 96%). Luego el residuo fue purificado en una CC de gel de sílice usando como eluyente DCM:AcOEt (2:1) hasta dar **9** de color pardo claro (96 mg, 80%), $R_F = 0,85$.



Punto de fusión: 180-186 °C

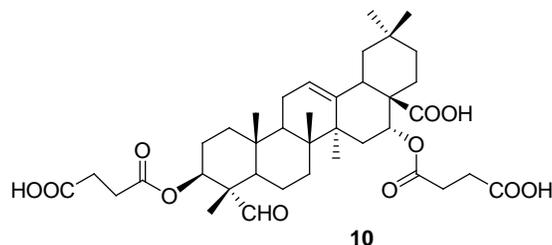
IF (KBr): 3431, 2950, 2861, 1736, 1656 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , Pyr- d_5 , 400 MHz) δ 0,70, 0,85, 0,94, 1,00, 1,07, 1,27 (3H cada uno s, Me-30, 25, 29, 24, 26, 27), 2,07 (6H, s, acetoxi), 3,05 (1H, dd, $J = 3,6$; 14,2 Hz, 18-H), 4,51 (1H, s, 3-H), 5,39 (1H, s, 16-H), 5,64 (1H, t, $J = 3,4$ Hz, 12-H); 9,23 (1H, s, 23-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , Pyr- d_5 , 100 MHz) δ 9,48, 15,65, 16,93, 20,38, 21,96, 23,24, 73,27, 76,25, 123,1, 142,1, 170,0, 170,4, 180,1, 204,5.

EM $[\text{M-Na}]^+ = 593,3448750$ calculada para ($\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_7 = 570,367643025$).

Bis-succinato de ácido quillaico (10). Ácido quillaico (100 mg, 0,21 mmol) se trató con anhídrido succínico (200 mg, 2,03 mmol), en 2 ml de pyr en presencia de 25 mg de DMAP. La mezcla se dejó reaccionando a reflujo durante 5 días, al cabo de los cuales se le añadió más cantidad de anhídrido succínico (200 mg, 2,03 mmol) y se dejó reaccionando la mezcla durante 7 días más. La mezcla de reacción fue diluida con agua y luego extraída con DCM. La fase orgánica se lavó con solución saturada de NaCl y luego se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se fraccionó por CC en gel de sílice eluyendo con DCM: Me_2CO 1:1, logrando aislar **10** como un sólido amorfo (40 mg, 20%).



Punto de fusión: 200-203 °C

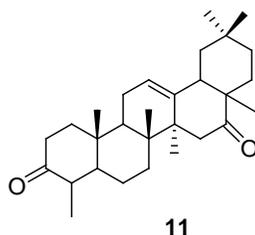
IR (KBr): 3433, 2929, 2863, 2359, 1708, 1637 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0,80, 0,85, 0,90, 0,92, 1,00, 1,10 (3H cada uno s, Me-30, 25, 29, 24, 26, 27), 2,5 (4H, s, $\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 3,03 (1H, dd, $J = 3,6$; 14,2 Hz, 18-H), 4,31 (s, 3-H), 4,50 (s, 16-H), 5,25 (1H, t, $J = 3,3$ Hz, 12-H), 9,20 (1H, s, 23-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 8,41, 15,43, 16,85, 17,98, 20,06, 21,60, 22,49, 41,53, 43,72, 53,15, 54,10, 68,88, 73,80, 124,3, 148,5, 171,9, 174,7, 179,2, 205,0.

23-Nor-12-en-28-nor-3,16-dioxoleanona (11). Ácido quillaico (50 mg, 0,10 mmol) fue colocado en un balón con 5 mL de Me_2CO en un baño a 0 °C. Durante 20 min con

agitación constante fue añadido el reactivo de Jones (0,54 mL/mmol sustrato, 0,15 mL) hasta que el color de la solución cambió de verde a pardo. La mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Para eliminar el exceso del reactivo de Jones fue añadido 2-propanol (5 mL) y los compuestos volátiles fueron evaporados a presión reducida. Luego se añadió agua destilada (10 mL) y esta mezcla acuosa fue extraída tres veces con AcOEt (5 mL). El extracto fue lavado tres veces con agua (5 mL) y tres veces con solución acuosa saturada de NaCl (5 mL). La fase orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro y filtrada. El filtrado fue concentrado a presión reducida para dar un residuo que fue purificado por CC en gel de sílice (DCM:AcOEt 2:1) para dar un compuesto de color amarillo-pardo **11**, $R_F = 0,85$ (40 mg, 80%). En el cromatofolio se observó además otras manchas también de color amarillo que no se pudieron separar.



Punto de fusión: 235-240 °C.

IR (KBr): 2950, 2928, 2855, 1720, 1715 cm⁻¹.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 0,85, 0,90, 0,93, 1,17, 1,20 (3H cada uno s, Me-30, 25, 29, 26, 27) 5,5 (t, 1H, $J = 3.3$, H-12) 3,33 (dd, 1H, $J = 3.8; 14.4$ Hz, H-18).

4.2 PARTE FARMACOLÓGICA

4.2.1 Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*

4.2.2 Animales de experimentación

Los animales empleados fueron ratones machos de la cepa CF-1 no consanguíneos, de 20 a 25 g de peso, obtenidos en la Unidad de Pruebas Biológicas del ISP. Fueron mantenidos a temperatura de 18 a 20 °C, en ayunas con agua *ad libitum* durante 12 h previas a los ensayos. Todos los procedimientos fueron realizados en dicha unidad del ISP bajo los

principios éticos internacionales que guían la investigación con animales de experimentación proclamados por la OMS (1990) (Miranda *et al.*, 2006).

4.2.3 Ensayo del edema inducido en oreja de ratón por vía tópica

El ensayo utilizado fue la inducción de edema en oreja de ratón, tras la aplicación de AA o TPA (Delporte *et al.*, 2005). En ambos ensayos el grupo de animales tratados con las muestras a evaluar estuvo constituido por 8 animales, los que recibieron una dosis única de cada una de las muestras o del fármaco de referencia (nimesulida o indometacina). El grupo de animales controles (16 ratones) fueron aquellos que no recibieron las muestras en estudio.

Los compuestos puros fueron evaluados a dosis equimolares de los fármacos de referencia (dosis a las que estos últimos presentaron el efecto máximo) disueltos en EtOH o Me₂CO. Las dosis a las cuales los fármacos de referencia indometacina y nimesulida presentaron el efecto máximo fueron de 0,5 mg (1,40 μmol) y 1,0 mg (3,24 μmol) por oreja, respectivamente. Las formulaciones farmacéuticas del tipo gel y crema al 8% de ácido quillaico fueron evaluadas a dosis equivalentes a aquéllas empleadas con ácido quillaico puro. Cada una de las muestras fue administrada tópicamente en la superficie interna (10 μl) y externa (10 μl) de la oreja derecha de los animales y en la oreja izquierda fue aplicado sólo el vehículo. Transcurridos 5 min fue aplicado sobre la oreja derecha el agente inflamatorio AA (2 mg/oreja) o TPA (5 μg/oreja) disuelto en Me₂CO y sobre la oreja izquierda sólo el vehículo. Luego de 1 h de aplicado el AA y 4,5 h de aplicado el TPA (tiempo de inflamación máxima), los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les cortaron porciones de orejas de 6 mm de diámetro con un sacabocados, tanto de la oreja izquierda como la derecha. Es importante destacar que las muestras son aplicadas minutos antes de ambos agentes inflamatorios, con el fin no alterar la absorción de los potenciales principios activos a través de la piel.

4.2.4 Ensayo de la actividad antiinflamatoria oral

Los fármacos de referencia fueron indometacina y naproxeno sódico para AA y TPA, respectivamente. Estos fueron evaluados a diferentes dosis (10, 20 y 40 mg/kg de peso de ratón), utilizando 8 animales para cada dosis. El grupo de animales controles (que sólo recibió el vehículo y el agente inflamatorio) estuvo constituido por 16 animales.

Se utilizó otro grupo de 8 animales para evaluar el efecto del ácido quillaico. Las muestras fueron disueltas en goma arábiga al 5% en solución salina fisiológica (NaCl 0,9%), en un volumen de 0,4 ml/ratón, usando una sonda nasogástrica. Los agentes inflamatorios fueron aplicados sobre la oreja derecha del ratón en las siguientes dosis: AA (2 mg/oreja) o TPA (5 µg/oreja) disueltos en acetona.

En relación al ensayo frente a AA, la muestra a evaluar fue administrada por vía oral e inmediatamente después se aplicó el agente inflamatorio. Después de una hora, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les cortaron porciones de orejas de 6 mm de diámetro con un sacabocados, tanto de la oreja izquierda como la derecha. Respecto del ensayo frente a TPA, este agente inflamatorio fue aplicado al inicio del ensayo y a las 3,5 h se administró la muestra por vía oral. Después de una hora se procedió al sacrificio de los animales y pesada de los discos de orejas.

4.2.5 Tratamiento estadístico

Por diferencia de peso de ambos discos de tejido se cuantificó el edema producido. Los porcentajes de efecto antiinflamatorio tópico (EAI) y de efecto antiinflamatorio oral (EAO) fueron calculados en cada caso comparando la mediana de los pesos de los edemas de los animales tratados (P_{edemaM}), con la mediana de los pesos de los edemas de los animales controles (P_{edemaC}), como se ve en la siguiente fórmula:

$$\% \text{Efecto antiinflamatorio (EAI ó EAO)} = \frac{P_{\text{edemaC}} - P_{\text{edemaM}}}{P_{\text{edemaC}}} \times 100$$

Los datos fueron expresados como valores de las medianas \pm SEM. La significancia de los efectos fue calculada por el método estadístico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973). Además se compararon las diferencias significativas entre dos o más grupos (compuestos) mediante un método de análisis no paramétrico (test de Kruskal-Wallis), seguido por el test múltiple de Dunnett para comparaciones individuales (PRISMA software). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas en ambos análisis para un $p \leq 0,05$.

4.3 Formulaciones farmacéuticas desarrolladas

4.3.1 Formulación de gel al 8% de ácido quillaico

Para preparar el gel se utilizaron las siguientes materias primas:

Materias primas	Cantidad (% p/p)
• Carbomer 940	1,0
• glicerina	5,0
• metilparabeno	0,1
• NaOH (10%) c.s.p	para pH = 7,5
• agua c.s.p para	100
• 0,4 g de ácido quillaico disuelto en 5 ml de NaOH (10%)	

El gel se preparó calentando el agua junto con el metilparabeno y la glicerina hasta alcanzar una temperatura de 90 °C aproximadamente. Luego se adicionó poco a poco el carbomer 940 agitando hasta hicharlo. Una vez hinchado, se dejó enfriar la preparación a temperatura ambiente y se agregó el NaOH (10%) hasta obtener un pH =7,5. Este gel se llevó a un peso de 100 g, añadiendo agua. Luego se añadieron 0,4 g de ácido quillaico para obtener 5 ml de gel.

4.3.2 Formulación de crema al 8% de ácido quillaico (emulsión o/w)

Para preparar esta emulsión se emplearon las siguientes materias primas:

Materias primas	Cantidad (% p/p)
• aceite mineral	5,0 (fase oleosa)
• alcohol cetílico	10 (fase oleosa)
• metilparabeno	0,2 (fase acuosa)
• propilparabeno	0,1 (fase acuosa)
• NaOH(10%)	0,5 (fase acuosa)
• ácido esteárico	9,5 (fase oleosa)
• agua c.s.p	100 (fase acuosa)
• 0,4 g de ácido quillaico disuelto en 5 ml de NaOH (10%)	

Se prepararon por separado las dos fases. En un vaso de precipitado se mezclaron los componentes de la fase oleosa (aceite mineral, alcohol etílico y ácido esteárico). En otro vaso de precipitado se mezclaron los componentes de la fase acuosa (metilparabeno, propilparabeno, NaOH (10%) y agua). Ambos recipientes se calentaron por separado hasta una temperatura de 70 °C. Luego se mezclaron ambas fases adicionando la fase acuosa sobre la fase oleosa con agitación constante durante 5 min a temperatura ambiente. La emulsión resultante fue pesada y se completó con agua hasta un peso de 100 g. Posteriormente se añadieron los 0,4 de ácido quillaico disueltos en NaOH (10%) para preparar 5 ml de crema.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PARTE QUÍMICA

5.1.1 Triterpenos pentacíclicos aislados desde H-100Q: ácido quillaico y ácido fitolacagénico

El H-100Q se presentó como un residuo seco de color café oscuro que correspondió al 30% del extracto total de saponinas.

Respecto del fraccionamiento del H-100Q mediante CC de Sephadex LH-20, se pudo evidenciar que en las fracciones 15-30 ricas en sapogeninas se formó un sólido, de color morado y $R_F = 0,52$ al revelar con PAS, idénticos a los de un patrón de ácido quillaico. Al cristalizar, se observó un compuesto en forma de agujas blancas muy delgadas que fue soluble en AcOEt.

En las fracciones 40-55 precipitó otro sólido, de color verde y $R_F = 0,40$ al revelar con PAS, idénticos a los de un patrón de ácido fitolacagénico. Este cristalizó como un sólido amorfo blanco, soluble en MeOH.

Partiendo de 20 g de 100Q se obtuvieron 3,5g de ácido quillaico correspondientes a 17,5% del 100Q. Por su parte del ácido fitolacagénico (Q-3) se obtuvieron 50 mg correspondientes a 0,25% del 100Q. Según el análisis por CLAE pudimos obtener ácido quillaico (**1**) con un nivel de pureza del 95%, el cual aparece a un tiempo de retención de 16,0 minutos. El ácido fitolacagénico sale a un tiempo de retención de 12,8 min. Los cromatogramas se muestran en el Anexo I.

El espectro de masas corroboró la identificación del ácido quillaico (ácido $3\beta,16\alpha$ -dihidroxi-23-oxoolean-12-en-28-oico) cuyo $[M-H]^-$ presentó una relación $m/z = 485,3273$, siendo la calculada para $C_{30}H_{45}O_5 = 486,33064$.

En el espectro de ^1H -RMN a δ 9,77 se observa un singulete correspondiente al protón del grupo aldehído en la posición 3. Además se aprecia una señal a δ 5,35 correspondiente al protón vinílico (H-12) y las señales características de los grupos metilos entre δ 0,91 y δ 1,65. La señal a δ 3,80 se asignó al protón geminal del grupo hidroxilo (H-3) y la señal a δ 4,46 al H-16 geminal del grupo hidroxilo en dicha posición (Tabla 3).

En el espectro de ^{13}C -RMN se observan señales a δ 208,5 para el carbono del grupo aldehído (C-23) y una señal a δ 181,1 para el carbono del carboxilo (C-28). Así mismo aparecen las señales para los carbonos 12 y 13, a δ 123,1 y δ 145,2 respectivamente. También son apreciables las señales para los carbonos unidos a hidroxilos a δ 75,21 e (C-16) y a δ 72,78 (C-3). A δ 56,76 aparece una señal característica para el C-4 que es el carbono unido al grupo aldehído. Aparecen 6 señales correspondientes a los metilos (C-24, 25, 26, 27, 29 y 30) en δ 9,40; 16,20; 17,70; 26,70; 33,45 y 24,88 respectivamente (Tabla 4). En el espectro de IR, las señales que se observan a 3372 y 3506 cm^{-1} corresponden a los hidroxilos, la de 2945 cm^{-1} corresponde a carbonos alifáticos, la de 2654 cm^{-1} al grupo carbonilo del aldehído, la de 1720 cm^{-1} al grupo carbonilo del grupo ácido, la de 1589 cm^{-1} al doble enlace vinílico y la de 1452 cm^{-1} a los enlaces entre carbonos saturados respectivamente. Los espectros obtenidos se muestran en el Anexo II.

El otro compuesto aislado desde H-100Q fue igualmente caracterizado, asignándole la estructura del ácido fitolacagénico (Figura 15). En el espectro de masas se observó un pico a $m/z = 539,33340$ [$\text{M}+\text{Na}$] (valor calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_6 = 516,70965$). En este caso, en el espectro de ^1H -RMN no se observó ninguna señal atribuible a un grupo aldehído.

En el espectro de ^{13}C -RMN se observaron dos señales correspondientes a carbonos carboxílicos a δ 181,30 y δ 178,78, el segundo supuestamente esterificado. Además aparecen las señales para los carbonos con hibridización sp^2 12 y 13, a δ 124,26 y δ 144,82 respectivamente. Otras dos señales características se muestran en δ 73,81 y δ 67,23 para los carbonos C-3 y C-23, respectivamente, unidos a hidroxilos. En cuanto al espectro de IR,

una señal a 3428 cm^{-1} corresponde a los hidroxilos, otra a 2941 cm^{-1} a los metilos, la de 1729 cm^{-1} a grupos carboxilos (C=O), 1538 cm^{-1} del carbono vinílico (C=C) y 1460 cm^{-1} correspondiente a la señal de los enlaces entre carbonos saturados respectivamente. Los espectros obtenidos se muestran en el Anexo III.

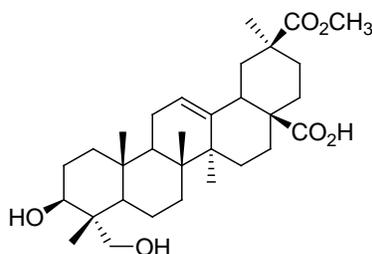


Figura 15. Estructura química del ácido fitolacagénico

Las estructuras químicas aisladas y caracterizadas estructuralmente a partir del H-100Q corresponden a geninas que forman parte de las saponinas de la corteza de quillay descritas anteriormente en la literatura (Nyberg *et al.*, 2000; Guo y Kenne, 2000). Como muestra la Figura 16, seis sapogeninas han sido descritas por diversos autores como estructuras fundamentales de las saponinas de quillay: existe acuerdo general en la existencia de 4 de ellas (ácidos quillaico, equinocístico, 22β -hidroxi-quillaico y fitolacagénico), mientras que la gipsogenina y el ácido fitolacagénico acetilado en *O*-23 han sido reportados solamente en los trabajos de Nyberg *et al.* (2000) y Kite *et al.* (2004), respectivamente.

Esto concuerda con el hecho de que el ácido quillaico forma parte de la mayoría de las saponinas constituyentes de la corteza de quillay (Guo y Kenne, 2000; Kite *et al.*, 2004). Aunque en la literatura es poco frecuente encontrar una valoración de las sapogeninas de la corteza de quillay, Kite *et al.* (2004) afirman que de las 67 saponinas de *Quillaja saponaria* cuyas estructuras se conocían a la fecha, 6 correspondieron a moléculas que contienen ácido 22β -hidroxi-quillaico como genina, 2 contendrían ácido fitolacagénico o su acetato, mientras que sólo una saponina presentaría ácido equinocístico en su composición. El resto de las saponinas (la mayor parte), incluyendo las mayoritarias designadas en dicho trabajo

como QS-17; QS-18 y QS-21, presentaron exclusivamente ácido quillaico como sapogenina (Kite *et al.*, 2004).

Tanto el ácido quillaico como el ácido fitolacagénico fueron caracterizados en este trabajo mediante técnicas espectroscópicas y espectrofotométricas, teniendo en cuenta las publicaciones precedentemente citadas.

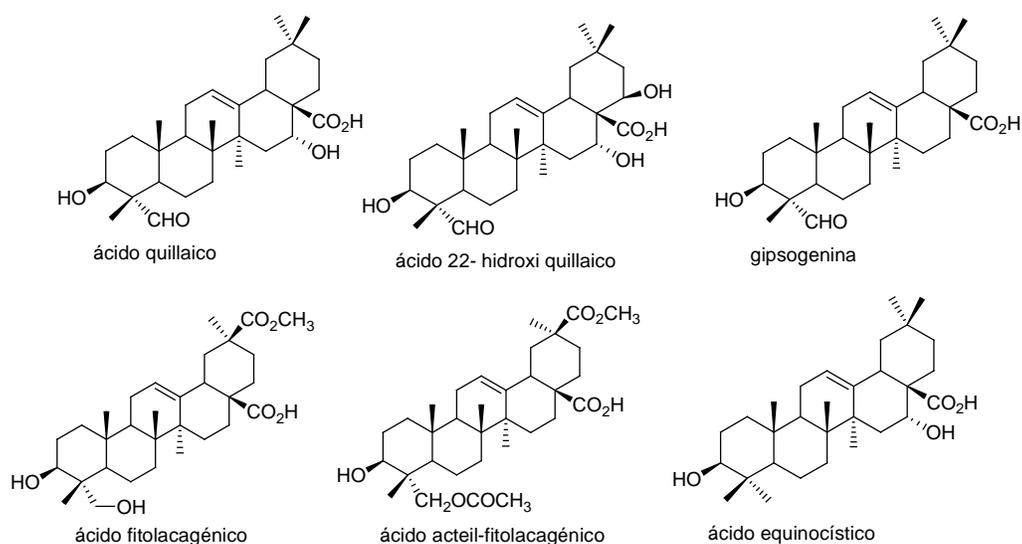


Figura 16. Estructuras químicas de las sapogeninas descritas por diferentes autores como componentes de las saponinas de corteza de quillay.

Para ambos metabolitos secundarios resultó conveniente seguir una metodología de extracción según la descrita en este trabajo, consistente en la hidrólisis con HCl al 9% durante 3 horas. Estas condiciones son más suaves que las descritas por otros autores en las cuales se empleaba el ácido sulfúrico para la hidrólisis (Palatnik de Sousa *et al.*, 2004) y tuvieron por objetivo obtener las geninas con un mínimo de alteraciones estructurales. Los rendimientos obtenidos se observan en la Tabla 2.

Compuesto	Fracción de la CC Sephadex LH-20	Cantidad obtenida (g)	Rendimiento (%)
Ácido quillaico	15-30	3,5	17,5
Ácido fitolacagénico	40-55	0,05	0,25

Tabla 2. Resultados de la metodología de extracción empleada. Cantidad y rendimiento obtenidos para el ácido quillaico y el ácido fitolacagénico.

Mediante la CCF se pudo evidenciar la presencia de al menos cuatro geninas adicionales presentes en el H-100Q. En este sentido, el trabajo para el aislamiento y la identificación de las restantes geninas fue continuado por Carlos Cartagena (memoria de tesis para optar por el título de químico farmacéutico).

Si bien el principal objetivo de nuestro trabajo fue la obtención de cantidades suficientes de ácido quillaico para la posterior hemisíntesis de derivados, fue útil obtener además el ácido fitolacagénico como otra de las agliconas de las saponinas del quillay. Esto permitió evaluarlo en un ensayo farmacológico *in vivo* y comparar su actividad con la del ácido quillaico y sus derivados, brindando un valor agregado al conocimiento científico que se tiene hasta la fecha sobre estos productos de la corteza de quillay.

Tabla 3. Datos de ^1H -RMN del ácido quillaico, comparados con datos encontrados en la literatura.

N ^o H	Ácido quillaico (95% pureza) (CD ₃ OD-CDCl ₃) 500 MHz	Ácido quillaico ^a (resto de aglicona) CD ₃ OD 400 MHz	Éster metílico del ácido quillaico ^b CDCl ₃ 400 MHz
1	11,1; 1,72 (d $J = 5,9$)*	1,11; 1,72	----
2	1,79; 1,94*	1,79; 1,98	----
3	3,80 (dd $J = 5,4; 9,5$)	3,86	3,76 (m)
5	1,36 (dd $J = 3,5; 14,8$)	1,33	2,15 (dd $J = 3,0; 14,3$)
6	*	0,95; 1,47	----
7	*	1,29; 1,54	----
9	1,75	1,75	----
11	1,93 (d $J = 3,5$) 1,95 (d $J = 3,5$)*	1,93; 1,93	----
12	5,35 (t $J = 3,4$)	5,33	5,37 (t $J = 3,5$)
15	1,79 (d $J = 4,4$)*	1,41; 1,74	----
16	4,46 (t $J = 4,4; 2,9$)	4,45	4,50 (t $J = 3,3$)
18	3,01 (dd $J = 4,1; 14,2$)	2,93	3,03 (dd $J = 4,4; 14,5$)
19	1,07 (d $J = 5,6$) 2,23 (d $J = 14,2$) *	1,05; 2,30	----
21	*	1,19; 1,96	----
22	1,83 (m)	1,84; 1,83	----
23	9,33 (s)	9,44	9,38 (s)
Me			1,36 (s, 3H) 3,59 (s, 3H) 1,94-0,84 (m, 21H) 1,04 (s, 3H) 0,95 (s, 3H) 0,95 (s, 3H) 0,89 (s, 3H) 0,71 (s, 3H)
Me (24)	1,10 (s)	1,17	
Me (25)	1,04 (s)	1,02	
Me (26)	0,84 (s)	0,81	
Me (27)	1,40 (s)	1,40	
Me (29)	0,88 (s)	0,89	
Me (30)	0,95 (s)	0,97	

---- valores no informados

* Señales superpuestas

^a Nyberg y Kenne, 2000.^b Kim et al., 2006

Tabla 4. Datos de ^{13}C -RMN del ácido quillaico, comparados con datos encontrados en la literatura.

Nº C	Ácido quillaico CD ₃ OD, 125,6 MHz	Ácido quillaico ^a (resto de aglicona) CD ₃ OD, 500 MHz	Ácido quillaico metilado ^b CDCl ₃ , 126 MHz
1	39,43	38,9	38,26
2	27,89*	25,4	26,26
3	72,78	85,7	72,00
4	56,76	56,0	55,44
5	49,51	48,9	48,88
6	21,75	21,0	----
7	33,55*	33,3	----
8	40,93	40,8	40,72
9	48,02*	47,6	----
10	36,96	37,0	----
11	24,42	24,3	----
12	123,1	122,8	122,55
13	145,2	144,6	143,12
14	42,70	42,4	----
15	36,15	36,1	36,15
16	75,21	74,6	75,03
17	59,75	----	----
18	42,04	41,9	45,56
19	47,69*	47,8	46,83
20	31,41	31,0	30,59
21	36,55	36,1	35,60
22	32,78	31,6	30,92
23	208,5	210,8	207,34
24	9,40	10,6	9,10
25	16,20	16,3	15,89
26	17,70	17,6	17,11
27	26,95	26,9	27,19
28	181,1	177,1	177,55
29	33,45*	33,0	32,98
30	24,88	24,7	23,44

---- valores no asignados

* Señales superpuestas

^a Nyberg y Kenne, 2000.

^b Kim et al., 2006

Tabla 5. Datos de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN del ácido fitolacagénico, comparados con datos encontrados en la literatura.

N ^o C	^1H -RMN CD ₃ OD, 500 MHz (δ)	^{13}C -RMN CD ₃ OD, 126 MHz (δ)	^1H -RMN (δ) ^a	^{13}C -RMN (δ) ^a
1	*	39,48	0,99; 1,64	39,4
2	*	27,42	1,93; 1,77	26
3	3,60 (dd $J = 4,4$; 11,5)	73,81	3,64	83,60
4	-	43,33		44,20
5	0,65-1,25	48,72	1,23	48,20
6	*	19,06	1,36; 1,51	18,70
7	*	33,47	1,61; 1,36	33,30
8	-	40,45		40,70
9	1,77 (dd $J = 4,1$; 13,7)	48,49	1,64	48,90
10	-	37,91		37,60
11	1,99 (dd $J = 3,7$; 13,7)	24,49	1,93; 1,92	24,50
12	5,30 (t $J = 3,7$)	124,2	5,34	124,00
13	-	144,8		144,50
14	-	45,02		43,20
15	*	28,86	1,65; 1,21	28,90
16	*	24,22	2,08; 1,71	24,20
17	-	47,01		47,40
18	2,69 (dd $J = 4,1$; 13,4)	43,97	2,74	43,40
19	*	43,29	1,95; 1,72	43,20
20	-	42,82		44,90
21	*	31,30	2,03; 1,40	31,20
22	*	35,02	1,67; 1,67	34,10
23	3,52 (d $J = 10,7$) 3,29 (d $J = 10,7$)	67,22	3,27; 3,75	64,90
24	0,80 (s)	14,45	0,73	13,20
25	1,18 (s)	16,28	0,98	24,80
26	0,69 (s)	17,05	0,81	17,80
27	0,97 (s)	26,38	1,19	26,00
28	-	178,8		177,60
29	1,13 (s)	28,70	1,14	28,40
30	-	181,3		178,90
31 (COOMe)	3,59 (s)	52,32	3,73	52,3

* Señales superpuestas

^a Guo y Kenne (2000) en CD₃OD a 600 MHz

5.1.2 Derivados de ácido quillaico

A partir de ácido quillaico (**1**) se prepararon algunos derivados tal como se detalló en el capítulo de Materiales y Métodos. Las estructuras de los compuestos se representan en la figura 17.

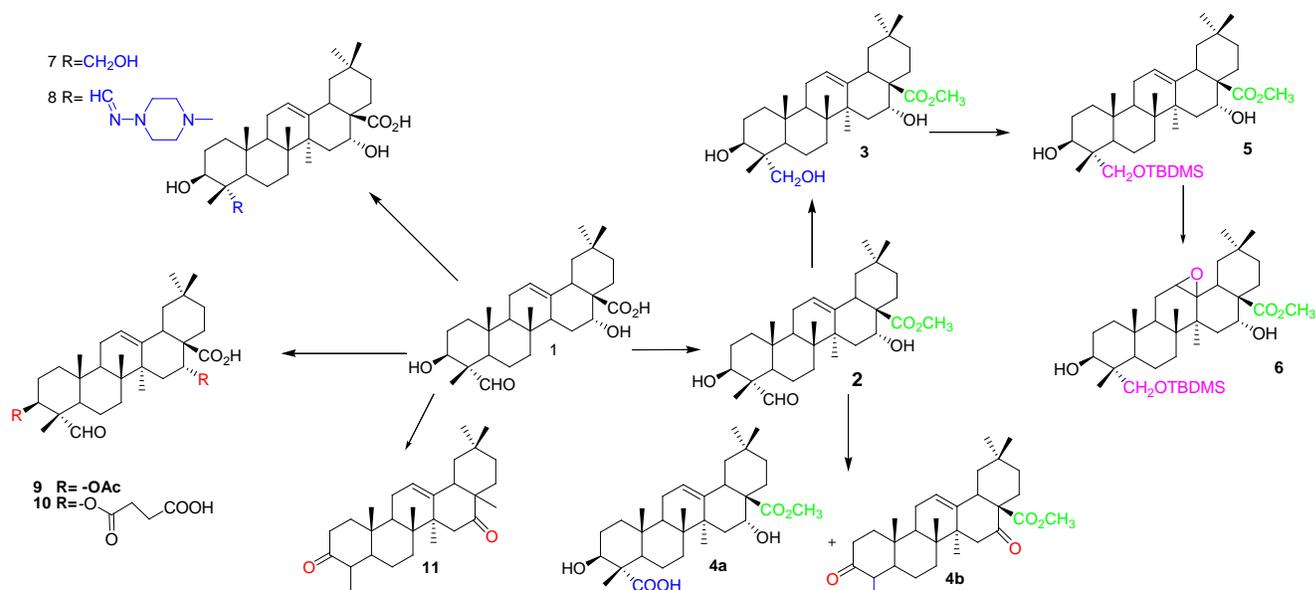
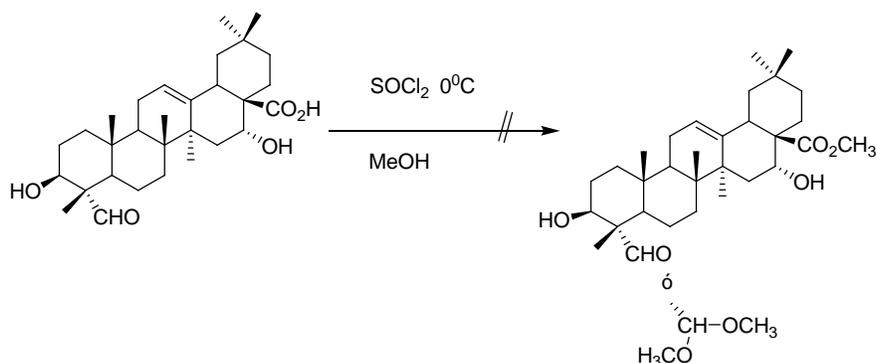


Figura 17. Estructuras químicas del ácido quillaico y los derivados preparados

En todos los derivados obtenidos se mantuvo el esqueleto de oleanano del ácido quillaico (**1**). Las reacciones llevadas a cabo consistieron específicamente en modificaciones de los anillos A, C y D sin apertura de los mismos.

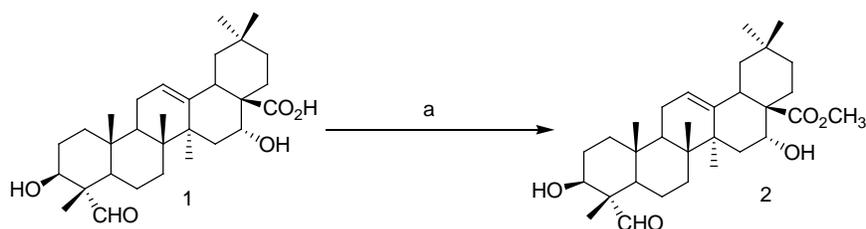
La elucidación estructural de los derivados de **1** se realizó comparando los datos espectroscópicos con los del compuesto de partida.

Inicialmente se trató de hacer la esterificación del ácido quillaico, agregando gota a gota SOCl_2 a baja temperatura sobre el compuesto **1** disuelto en MeOH anhidro, como se muestra en el esquema I. Sin embargo esta reacción no tuvo lugar en una proporción detectable pues al monitorear la formación de productos por CCF sólo se observó una mancha de igual R_F al producto de origen.



Esquema I. Reacción fallida de esterificación del ácido quillaico

Para obtener el compuesto **2** se reprodujo la metodología empleada por Kim *et al.*, 2006 (Esquema II), obteniendo un rendimiento superior (95%) al informado por dichos autores (68%). Fue útil comparar los datos de caracterización estructural de **2** con los obtenidos por estos autores. Aunque en nuestro trabajo fue usado Cs_2CO_3 como base para activar el grupo carboxilo, puede ser factible el uso de carbonatos comerciales de menor costo como K_2CO_3 ó CaCO_3 .



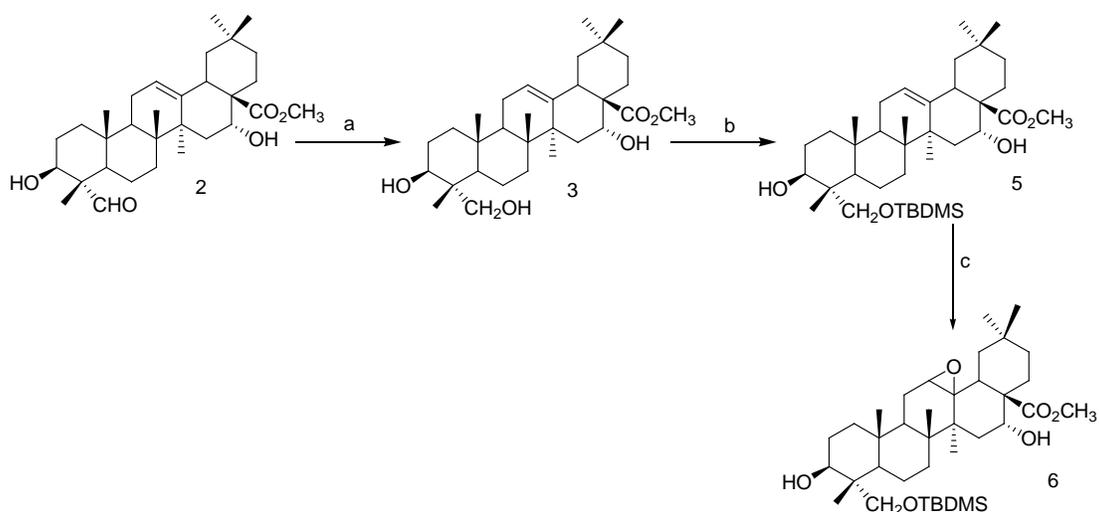
Esquema II. Reactivos y condiciones a) DMF, 0 °C, MeI, Cs_2CO_3

El uso de DMF como disolvente para **1** se justifica por ser un solvente aprótico y polar que eleva la energía de estado fundamental (nivel más bajo de energía) del nucleófilo. Esto garantiza que la posibilidad de que se generen solvatos (con o sin carga) por formación de enlaces de hidrógeno entre los átomos de oxígeno de **1** y este solvente sea prácticamente nula.

Los datos obtenidos para **2**, tanto de los espectros de ^1H -RMN como de ^{13}C -RMN, están de acuerdo con los encontrados en la literatura (Kim *et al.*, 2006). En el espectro de ^1H -RMN podemos observar una señal a δ 3.57, desplazamiento típico para las señales de protones cercanos a átomos de oxígeno ($\text{CH}_3\text{-O-}$), correspondiente a un singulete, su integral corresponde a tres protones y su desplazamiento químico es típico de ésteres metílicos. En el caso del espectro de ^{13}C RMN, la señal adicional que presenta este compuesto con respecto a **1** es a la del grupo metilo del éster, la cual se encuentra a 52,33 ppm (C-31). Aparecen las señales típicas para el carbono aldehídico C-23 a δ 208,5 y a δ 179,3 para el carbono del carboxilo en posición 28. Así mismo aparecen las señales para los carbonos vinílicos 12 y 13 a δ 123,3 y 145,0 respectivamente. El experimento DEPT-135 nos confirma esta asignación. En el espectro de masas de alta resolución se corroboró la fórmula molecular: $[\text{M-Na}]^+ = 523,33873$ ($\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_5 = 523,3387280$). En el espectro de IR, las señales que se observan entre 3500 y 3453 cm^{-1} corresponden a los hidroxilos, la de 2946 cm^{-1} corresponde a los metilos, la de 2683 cm^{-1} al grupo carbonilo del aldehído, la de 1719 cm^{-1} al grupo carbonilo del carboxilo, la de 1637 cm^{-1} al enlace vinílico y la de 1449 cm^{-1} a los enlaces entre carbonos saturados. Los espectros obtenidos se muestran en Anexos IV.

Desde el punto de vista químico la idea de obtener el éster metílico del ácido quillaico persigue un objetivo de factibilidad en la purificación, pues con derivados metilados se hace menos complicada la purificación por CC empleando gel de sílice en comparación con los derivados que mantienen el carboxilo libre.

Algunos derivados (**3**, **5** y **6**) fueron preparados a partir de **2** con vistas a explorar la posible actividad antiinflamatoria y la influencia del grupo aldehído de la posición 4 del anillo A en dicha actividad farmacológica (Esquema III). La protección selectiva del alcohol primario de **3**, se hizo como paso previo a la epoxidación.



Esquema III. Reactivos y condiciones a) NaBH_4 , MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C}$; b) TBDMS, imidazol, DMF, atm. N_2 , t.a; c) *m*CPBA, DCM, t.a.

Las reacciones de reducción selectiva con NaBH_4 han sido ampliamente descritas para los triterpenos pentacíclicos (Wen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2008) con leves resultados frente a la inhibición de la glicógeno fosforilasa ($\text{IC}_{50} > 80\text{ }\mu\text{M}$). Los rendimientos obtenidos tanto para **3** como **7**, productos de la reducción del éster metílico del ácido quillaico y del ácido sin esterificar, fueron satisfactorios con valores de 93% y 80%, respectivamente.

En el espectro de ^1H -RMN del compuesto **3** no aparece la señal del protón del aldehído. En el espectro de ^{13}C -RMN se observa la desaparición de la señal del C-23 a 208 ppm y la aparición de una señal adicional a δ 67,30. Con la ayuda del experimento G-HMBC se confirmó la conectividad entre el C-4 que resuena a δ 40,57 con la señal de los hidrógenos presentes en el grupo $\text{CH}_2\text{-OH}$ en el C-23. Además se mostró la conectividad entre el C-11 (δ 24,44) y el protón del C-12 típico de los triterpenoides insaturados en esta posición, así como la relación entre los hidrógenos de los metilos 29 y 30 y los carbonos C-20 y C-21. Se corroboró la fórmula molecular en el espectro de masas de alta resolución: $[\text{M-Na}]^+ = 525,35483$ y $[\text{M-H}]^- = 501,35789$ ($\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_5 = 501,3578930$). En el espectro de IR se observan señales a 3428 cm^{-1} correspondiente a los hidroxilos y 2947 cm^{-1} correspondiente a metilos. Además se observó la desaparición de la banda característica para aldehído, conservándose las señales a 1717 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo del carboxilo,

1654 cm^{-1} del doble enlace vinílico y 1449 cm^{-1} correspondiente a los enlaces entre carbonos saturados. Los espectros obtenidos se muestran en Anexos V.

La protección del hidroxilo primario de **3** con un grupo TBDMS produjo **5**. Seguidamente fue preparado el epóxido (**6**) tratando **5** con *m*CPBA, cuyo objetivo fue explorar una secuencia mediante la cual se pudiese modificar el anillo C. Los bajos rendimientos de **5** y **6** impidieron continuar con el objetivo de obtener una función cetona en el anillo C.

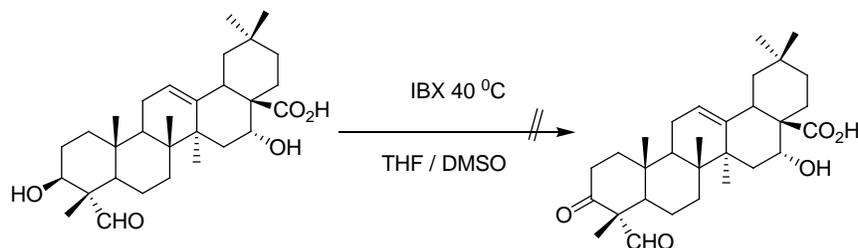
Como antecedente de la reacción para formar el compuesto **6** tenemos la descrita ampliamente por Honda *et al.* (2000) para los ácidos oleanólico y ursólico, con rendimientos de entre 40-50%.

Para el compuesto **5** el espectro de ^1H -RMN muestra las señales correspondientes a metilos entre δ 0,72-1,33 (s, 5 señales para CH_3). Además en δ 0,05 apareció un singulete correspondiente a los 9 hidrógenos del grupo $\text{Si}-(\text{CH}_3)_3$. También se observan las siguientes señales características 5,40 (t, 1H, H-12) 4,50 (s, 1H, H-16), 3,70 (s, 3H, CH_3), 3,5 (H-3). En el espectro de IR se observan señales para hidroxilos en 3542 y 3467 cm^{-1} . La señal que se observa a 2951 cm^{-1} es características de grupos metilos, la de 1717 cm^{-1} corresponde al grupo carbonilo, la de 1560 cm^{-1} al doble enlace vinílico y la de 1468 cm^{-1} a los enlaces entre carbonos saturados. Los espectros obtenidos se muestran en Anexos VIII.

En el caso del compuesto **6** en el espectro de ^1H -RMN vemos las señales correspondientes a metilos en δ 0,5-1,22 (s, CH_3). Además se encuentra la señal típica del proton de C-12 a δ 5.21, y aquéllas a 4,34 y 4,03 para los protones de C-16 y C-18, respectivamente. En el espectro de IR se observan señales para hidroxilos en 3411 cm^{-1} . Las señales que se observan a 2948 cm^{-1} son características de grupos metilos, la de 1701 cm^{-1} corresponde al grupo carbonilo, la de 1596 cm^{-1} al enlace vinílico y la de 1457 cm^{-1} a los enlaces entre carbonos saturados. Los espectros obtenidos se muestran en Anexos IX.

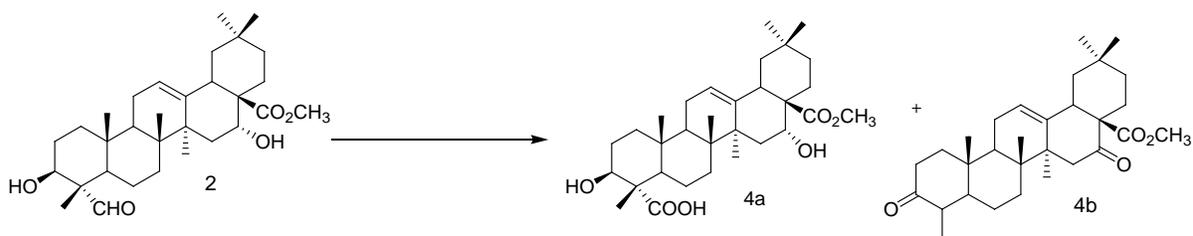
Con el fin de obtener oxocompuestos a partir del ácido quillaico y de su éster metílico se probó una metodología que consistía en la oxidación con ácido 2-yodoxibenzoico (IBX) (Yadav *et al.*, 2006). Nuestro objetivo era obtener selectivamente un grupo cetónico en la

posición 3 del anillo A, debido al menor impedimento estérico para la entrada del IBX, en comparación con la posición 16 del anillo D. El inconveniente en nuestro caso fue la formación de varios productos difíciles de separar (Esquema IV).



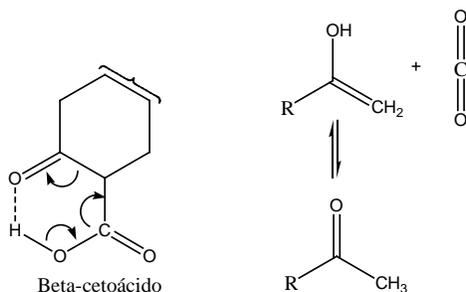
Esquema IV. Reacción de oxidación del ácido quillaico empleando IBX.

Como alternativa en la literatura se describen varios métodos de oxidación de triterpenos pentacíclicos empleando clorocromato de piridinio (PCC), dimetildioxirano (DMDO), o reactivo de Jones (CrO_3 en ácido sulfúrico acuoso), entre otros agentes oxidantes (Honda *et al.*, 2000; Ogawa *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2009). Los compuestos **4a** y **4b** se formaron mediante la oxidación no selectiva de **2** empleando el reactivo de Jones (Esquema V). Los aldehídos son rápidamente oxidados para producir ácidos carboxílicos, ya que estos tienen un protón ($-\text{CHO}$) que puede ser extraído con facilidad durante la oxidación, lo que los diferencia de las cetonas. Las oxidaciones de Jones ocurren con rapidez a temperatura ambiente y se obtienen buenos rendimientos.



Esquema V. Reactivos y condiciones: reactivo de Jones, acetona, 0 °C.

La pérdida del carboxilo unido al C-4 al formarse el compuesto **4b** se explicaría por la formación previa de la dicetona, generando un β -cetoácido relativamente inestable (Esquema VI).



Esquema VI. Mecanismo de descarboxilación de **1**

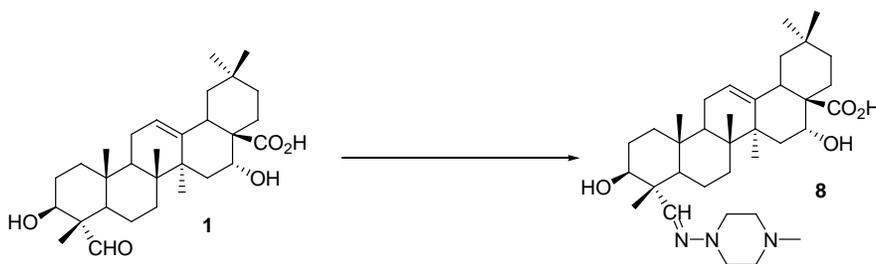
En el caso del compuesto **4a** como vimos como desaparecen la señal del protón del aldehído y también la señal del mismo grupo en el espectro de ^{13}C -RMN. Se observan dos señales características para COOH y COOCH_3 en este último espectro, y permanecen las señales correspondientes a los C-3 y C-16, hidroxilados, a 74,96 y 72,24 ppm, por lo que podemos decir que en este caso solamente ocurrió la oxidación del aldehído. En el espectro de IR se observa una señal pequeña correspondiente a hidroxilos en 3447 cm^{-1} . Las señales que se observan a 2925 cm^{-1} son características de grupos metilos, la de 1712 cm^{-1} corresponde a grupos carbonilo, la de 1560 cm^{-1} al enlace vinílico y la de 1458 cm^{-1} a los enlaces entre carbonos saturados. Los espectros obtenidos se muestran en Anexos VI.

En el espectro de ^1H -RMN del compuesto **4b** no aparece el singulete correspondiente al protón del aldehído. Aparece a δ 5,56 la señal del H-12, además del resto de las señales típicas para triterpenos pentacíclicos. Por su parte en el espectro de ^{13}C -RMN aparecen dos señales atribuibles a grupos cetónicos: a δ 213,2 para el C-3 y δ 208,6 para el C-16. A δ 173,3 aparece una señal correspondiente al grupo carboxílico. Además se observan señales características de los triterpenos oleanánicos en δ 140,5 y δ 124,1 de los C-13 y C-12, respectivamente. La señal del metilo en el C-4 aparece a δ 44,63. Con la ayuda del experimento G-HMBC se confirmó la conectividad entre el C-4 y los hidrógenos presentes en el grupo metilo en C-24 a δ 1,00. La fórmula molecular fue determinada con el espectro

de masas de alta resolución: $[M-Na]^+ = 491,31304$ ($C_{30}H_{44}O_4 = 491,3130430$), indicando la pérdida de un átomo de carbono. En el espectro de IR, la señal que se observa a 2956 cm^{-1} es característica de grupos metilos ($-CH_3$), las de 1767 y 1715 cm^{-1} corresponden a carbonilos, la de 1598 cm^{-1} al enlace vinílico y la de 1448 cm^{-1} corresponde a los enlaces entre carbonos saturados. Los espectros obtenidos se muestran en Anexos VII.

Como otras alternativas de modificación del grupo aldehído en C-23 se obtuvieron los compuestos **7** y **8**. En el caso de la hemisíntesis de **7** se siguió la misma metodología empleada para obtener **3**, partiendo del ácido quillaico sin esterificar. En el espectro de ^1H -RMN de **7** se aprecian las señales del protón unido al C-12 a δ 5,5 y para los de C-16 y C-3 a δ 4,45 y 4,03 respectivamente. La señal típica del protón del aldehído desaparece y vemos entonces una señal a δ 3,35 típica para CH_2O . Además se ven seis señales para metilos entre δ 0,70-1,3. Los espectros obtenidos se muestran en Anexos X.

La hidrazona (**8**) se forma por reacción entre **1** y 1-amino-4-metilpiperazina (Esquema VII). El objetivo fue obtener este compuesto nuevo dentro de la variada gama de triterpenoides y sus derivados descritos anteriormente.

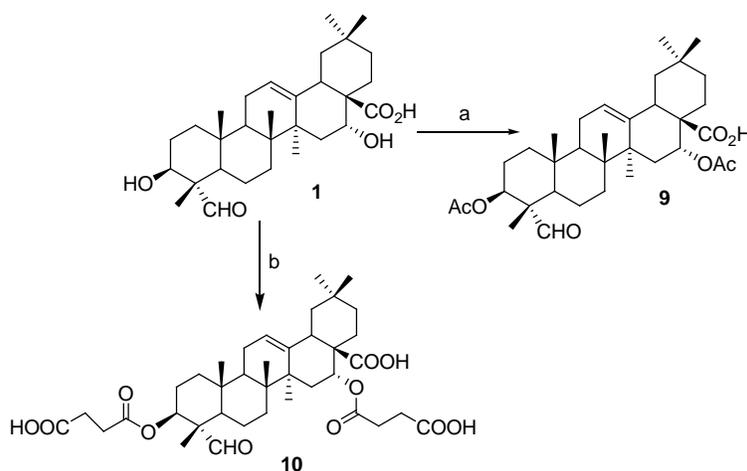


Esquema VII. *Reactivos y condiciones:* 1-amino-4-metilpiperazina, EtOH absoluto, ácido acético glacial, reflujo.

El espectro de ^1H -RMN del compuesto **8** presenta una señal característica de iminas ($CH=N$) en δ 6,77 y la señal correspondiente al grupo metilo de la metilpiperazina aparece en δ 2,41. Las señales de los grupos metileno del heterociclo aparecen entre δ 2,63 y 3,04. Además podemos ver las señales características del ácido quillaico, excepto la correspondiente al protón del aldehído. La fórmula molecular fue corroborada con el espectro de masas de alta resolución: $[M-H]^- = 582,47721$. ($C_{35}H_{57}N_3O_4 = 583,4300958$). En el espectro de IR, se observan señales debidas a hidroxilos en 3424 cm^{-1} . La señal que

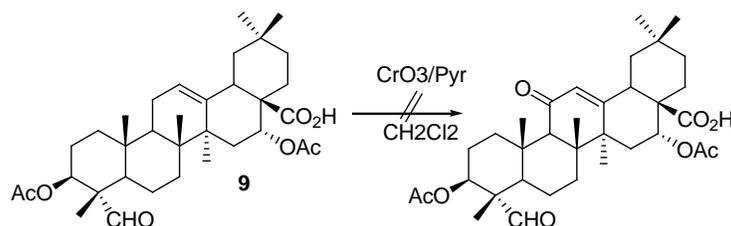
se observa a 2944 cm^{-1} es característica de grupos metilos, a 2361 cm^{-1} para iminas, a 1610 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo de la función ácida, a 1561 cm^{-1} al doble enlace C=C y a 1450 cm^{-1} a los enlaces entre carbonos saturados. Los espectros obtenidos se muestran en Anexos XI.

Los grupos hidroxilos presentes en C-3 y C-16 fueron esterificados manteniendo los grupos aldehído y carboxilo, preparando los ésteres bis-acetato (**9**) y bis- hemisuccinato (**10**) de ácido quillaico, respectivamente. Esterificaciones análogas han sido descritas por diversos autores en relación a los triterpenos pentacíclicos (Zhang *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2009; Csuk *et al* 2010) (Esquema VIII).



Esquema VIII. Reactivos y condiciones a) anhídrido acético, pyr, t.a; b) anhídrido succínico, pyr, DMAP t.a

Por otra parte, un intento de llevar a cabo la oxidación alílica en el anillo C, resultó fallida por la formación de productos con bajo rendimiento que no pudieron ser aislados (Esquema IX).



Esquema IX. Intento de oxidación alílica de **9**.

Para el compuesto diacetilado (**9**) se aprecia una señal de ^1H -RMN típica del grupo acetoxilo en δ 2,07, cuya integral corresponde a 6 protones. Además vemos la señal del aldehído en δ 9,23. En el caso del espectro de ^{13}C -RMN se aprecian las señales del aldehído en δ 204,5 y del carboxilo en δ 180,1 mientras que la señales de los carbonos carbonílicos de los acetoxilos se pueden observar en δ 170,4 y 170,0. La fórmula molecular fue corroborada con el espectro de masas de alta resolución: $[\text{M}-\text{Na}]^+ = 593,3448750$ ($\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_7 = 570,367643025$). En el espectro de IR se observan señales correspondientes a hidroxilos en 3431 cm^{-1} . La señal que se observa a 2950 cm^{-1} es característica de grupos metilos, la de 1736 cm^{-1} corresponde a grupos carbonilo, la de 1656 cm^{-1} al doble enlace $\text{C}=\text{C}$ y la de 1450 cm^{-1} corresponde a los enlaces entre carbonos saturados. Los espectros obtenidos se muestran en Anexos XII.

En el caso del bis-hemisuccinato (**10**) se aprecian en el espectro de ^1H -RMN seis señales para metilos a δ 0.80, 0.85, 0.90, 0.92, 1.00 y 1.10. Se observa una señal a δ 2.5 para los 8H de los grupos $\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ y un triplete a δ 5,12 para el protón del C-12. En el espectro de ^{13}C -RMN se aprecian las señales del aldehído en δ 204,9 y la del carboxilo libre en δ 179,1 mientras que las señales de los ésteres se pueden observar en δ 179,1 y δ 174,7. En el espectro de IR se observan señales correspondientes a hidroxilos en 3433 cm^{-1} . La señal que se observa a 2929 cm^{-1} es característica de grupos metilos, la de 2359 cm^{-1} corresponde al enlace $\text{C}-\text{H}$ del aldehído, 1515 cm^{-1} al doble enlace $\text{C}=\text{C}$ y la de 1458 cm^{-1} a los enlaces entre carbonos saturados. Los espectros obtenidos se muestran en Anexos XIII.

Por su parte en la oxidación con reactivo de Jones del ácido quillaico para dar (**11**), obtenido bajo las mismas condiciones que **4a** y **4b** no se observan las señales típicas en el espectro de ^1H -RMN, como la del protón de aldehído y las de los protones en H-16 y en H-3. Solamente se distingue claramente el singulete para H-12 a δ 5,5. El espectro de ^{13}C -RMN muestra la presencia de dos carbonilos. Los espectros obtenidos se muestran en Anexos XIV.

5.2 PARTE FARMACOLÓGICA

5.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*

5.2.1 Ensayo de inhibición por vía tópica del edema inducido en oreja de ratón

Los estudios farmacológicos *in vivo*, utilizando vías de administración usadas por la población, en este caso tópica y oral, nos permiten obtener una mejor estimación de los potenciales efectos farmacológicos de las saponinas y sapogeninas del quillay y sus productos de modificación química. Los métodos *in vivo* utilizados en esta tesis nos permiten establecer si los triterpenoides evaluados son antiinflamatorios, sin determinar específicamente su mecanismo de acción. Sin embargo al utilizar dos agentes inflamatorios (13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol, TPA y ácido araquidónico, AA) nos podemos aproximar a su probable mecanismo de acción.

La inflamación inducida por TPA se desarrolla más lentamente que aquella inducida por AA. El TPA es un potente agente promotor de tumores que se encuentra en el aceite de croton (*Croton tiglium* L.). La administración tópica de TPA provoca un edema agudo con infiltración leucocitaria, actuando a través de la activación de la proteincinasa C (PKC), dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos. La PKC desempeña un papel importante en la transducción de señales de una gran variedad de sustancias que activan funciones celulares y de proliferación. La PKC activada actúa a diferentes niveles, activando el factor nuclear kappa B (FN- κ B). Este factor de transcripción promueve la expresión de varios agentes proinflamatorios como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la óxido nitroso sintasa inducible (iNOs), citoquinas inflamatorias tales como las interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) que es otra citoquina proinflamatoria y de defensa del huésped cuya producción exagerada conlleva a enfermedades proinflamatorias crónicas, lo que trae como consecuencia la formación de prostanoídes e incremento de la producción de radicales libres (Ban *et al.*, 2009). Tras la aplicación de TPA en oreja de ratón, se produce un eritema y vasodilatación después de 1-2 h, y a las 3-4 h aumenta el grosor del tejido como consecuencia de la extravasación de líquido, siendo el edema máximo entre las 4 a 6

h. Transcurridas 12-14 h el edema desaparece, aunque la vasodilatación y el eritema persisten hasta las 24-48 h. A nivel histológico se observa agregación plaquetaria a las 2 h, agregación y adherencia de leucocitos polimorfonucleares a las células endoteliales entre 4-6 h, y migración hacia el tejido y desgranulación de mastocitos a partir de las 6 h. Al cabo de 6-24 h comienza el acúmulo de leucocitos en la dermis. Por último, tras 48-96 h se observa hiperplasia en la membrana basal epidérmica, debida al incremento del número de células en división.

Por el contrario, la respuesta inflamatoria frente a AA es más rápida y se produce por un aumento de la actividad de mieloperoxidasa y la elastasa debida a que los neutrófilos llegan rápidamente después de la aplicación de este agente inflamatorio. La administración tópica del AA provoca un edema de corta duración, con un comienzo rápido asociado al incremento de los niveles de prostaglandinas (PGs), tromboxano TXB₂ y leucotrieno LTB₄, con un ligero aumento de los niveles de LTC₄. Varios minutos después de su aplicación comienza la vasodilatación. A los 10 min se incrementa la permeabilidad vascular, desarrollándose el edema que alcanza su máximo al cabo de 1 h y desaparece prácticamente a las 6 h, aunque queda un eritema residual. Según la dosis de AA administrada en la oreja del ratón, el metabolismo de éste puede dirigirse hacia la vía de la COX o hacia la vía de la 5-lipoxigenasa (5-LO). A concentraciones bajas predominan los metabolitos de la vía de la COX, mientras que a dosis altas los metabolitos que predominan son los de la vía de la 5-LO. El AA apenas estimula la actividad mitótica epidérmica y la síntesis de ADN, por lo que no hay hiperplasia epidérmica. El estudio bioquímico demuestra que el AA es rápidamente metabolizado (aproximadamente 15 min), dando lugar a la formación de eicosanoides, principalmente PGE₂, LTC₄ y LTD₄ (Inoue *et al.*, 1988; Griswold *et al.*, 1991).

El efecto antiinflamatorio frente a AA o TPA ha sido demostrado en las últimas décadas para un gran número de triterpenos pentacíclicos con esqueletos de los tipos del ursano, oleanano y lupano. Algunos de estos compuestos mostraron una potente actividad antiinflamatoria cuando se comparan con antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

clásicos como por ejemplo indometacina, nimesulida entre otros (Wu *et al.*, 2004, Banno *et al.*, 2004, Otuki *et al.*, 2005).

Recientemente se ha estudiado con algún grado de detalle el triterpeno pentacíclico α -amirina, el cual actúa por la inhibición de la expresión de COX-2 mediante la inhibición de las proteína-cinasas ERK, p38 MAPK y PKC, bloqueando además la activación del NF- κ B (Medeiros *et al.*, 2007).

Otros estudios realizados con triterpenos pentacíclicos, han demostrado que compuestos de este grupo pueden ser potentes antiinflamatorios por diversos mecanismos. En la Tabla 6 se muestran diferentes especies vegetales con sus triterpenoides bioactivos con efectos antiinflamatorios y sus mecanismos de acción (Dzubak *et al.*, 2006).

En un trabajo de 1995, Recio *et al.* se refirieron a los requerimientos estructurales necesarios para la actividad antiinflamatoria *in vivo* de triterpenoides, observando que los grupos carboxilos en las posiciones C-28 o C-30 de la molécula o una función alcohólica primaria en C-28 están asociados con una mayor actividad. Además estos autores señalaron que las actividades antiinflamatorias encontradas para los diferentes triterpenoides evaluados dependían en gran medida del método utilizado para generar la inflamación, observando mayor efecto frente a TPA (destacar que el AQ fue más activo frente a AA).

Nombre científico de la especie	Metabolito activo	Mecanismo de acción antiinflamatorio
<i>Boswellia serrata</i>	Ácido boswélico	Inhibición de 5-LO
<i>Ganoderma lucidum</i> <i>Plantago major</i> <i>Olea europaea</i> <i>Panax ginseng</i>	Ácido oleanólico	Inhibición de COX-2
<i>Malus domestica</i> <i>Calluna vulgaris</i> <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> <i>Sambucus chinensis</i> <i>Solanum incanum</i> <i>Crataeva nurvala</i>	Ácido ursólico	Inhibición de COX-2 Inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno
<i>Anemone raddeana</i> <i>Lycopodium cernuum</i> <i>Syzygium claviflorum</i> <i>Betula alba</i>	Ácido betulínico	Inhibición de la fosfolipasa A2
<i>Pistacia terebinthus</i> <i>Schinus terebinthifolius</i>	Ácido morólico	Inhibición de la fosfolipasa A2
<i>Schinus terebinthifolius</i> <i>Pistacia terebinthus</i>	Ácido masticadienólico	Inhibición de la fosfolipasa A2
<i>Platycodon grandiflorum</i>	Platicodina D	Inhibición de COX-2
<i>Anemone raddeana</i> <i>Crataeva nurvala</i>	Lupeol	Inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)
<i>Diospyros kaki</i>	Uvaol	Inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)
<i>Diospyros kaki</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i>	Alfa-amirina	Inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno

Tabla 6. Triterpenoides naturales aislados desde especies vegetales con efecto antiinflamatorio (Adaptado de Dzubak *et al.*, 2006)

Los resultados farmacológicos correspondientes a 100Q y a H-100Q se muestran en la Tabla 7. Como se observa, el 100Q no presentó actividad antiinflamatoria tópica frente a TPA (-30,7 %). Por el contrario se puede concluir que el edema en los animales tratados fue significativamente mayor que en los animales controles, indicando en este caso un efecto pro-inflamatorio. Frente a la inflamación inducida por AA, el efecto fue de 19,8 %, sin significancia estadística.

Con respecto al H-100Q podemos decir que a la dosis de 0,75 mg/oreja exhibe mayor efecto frente a AA que frente a TPA, pero ambos efectos son menores que los efectos máximos de los fármacos de referencia. No se evaluaron dosis más altas de H-100Q debido a problemas de solubilidad en los vehículos utilizados en el ensayo.

Estos resultados demuestran que el H-100Q, es una mezcla rica en saponinas donde particularmente el ácido quillaico, presenta mayor actividad antiinflamatoria que el extracto total de saponinas (100Q), siendo más significativa esta diferencia frente a TPA.

Muestra	Vehículo	Dosis mg/ 20µL oreja	% EAI _{AA} ± SEM	%EAI _{TPA} ± SEM
100Q	Etanol	1,5 mg/oreja	19,8 ± 13,3	-30,7 ± 22,8
H-100Q	Acetona	0,75 mg/oreja	25,0 ± 8,0	35,7 ± 5,5
indometacina	Acetona	0,5 mg/oreja		↑ 92,9* ± 3,2
nimesulida	Acetona	1,0 mg/oreja	↑ 48,8* ± 4,0	

Tabla 7. Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica inducida por AA y TPA de 100Q y H-100Q comparada con las sustancias de referencia nimesulida e indometacina.*p ≤ 0,05; n = 8; ↑ efecto máximo.

Por otra parte se realizó un estudio comparativo entre el ácido fitolacagénico aislado en nuestro trabajo y dos compuestos (fitolacagenina y su éster metílico, obtenidos en otro

estudio paralelo a partir de un extracto metanólico de frutos de *Phytolacca dioica* L., Phytolaccaceae (ombú). El objetivo fue comparar la actividad antiinflamatoria de los mismos teniendo en cuenta la similitud estructural entre estos triterpenos pentacíclicos (Figura 18).

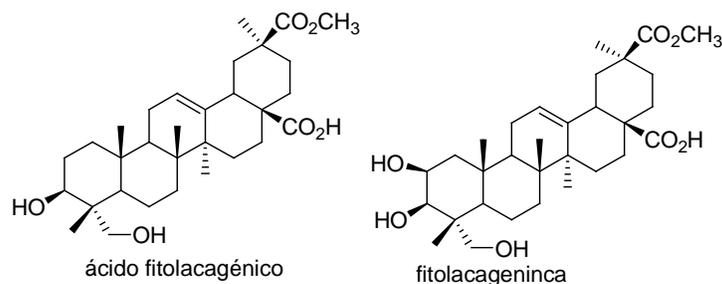


Figura 18. Estructuras químicas de ácido fitolacagénico (*Quillaja saponaria* Mol.) y fitolacagenina (*Phytolacca dioica* L.)

Como se puede apreciar en la Tabla 8, la fitolacagenina no presentó actividad antiinflamatoria tópica en la inflamación inducida por AA (-2,8 %) a la dosis de 1,7 mg/oreja, equimolar con respecto a la dosis de nimesulida. Frente a TPA (56,2 %), exhibió un efecto antiinflamatorio significativo a la dosis de 0,73 mg/oreja, equimolecular con respecto a la dosis de indometacina, aunque menor que el efecto máximo del fármaco de referencia (92,9 %).

El éster metílico de fitolacagenina por su parte no presentó un efecto significativo frente a AA ni frente a TPA a las dosis de 1,7 y 0,7 mg/oreja, respectivamente. Por su parte, el ácido fitolacagénico aislado desde el H-100Q, presentó actividad antiinflamatoria moderada tanto frente a AA (27,3 %) como a TPA (46,5 %).

De forma general, tanto el ácido fitolacagénico como la fitolacagenina mostraron un mayor efecto antiinflamatorio frente a TPA.

Muestra	Vehículo	Dosis mg/20 μl/oreja	%EAI _{TPA} ± SEM	%EAI _{AA} ± SEM
Ácido fitolacagénico	Acetona	0,73 – 1,7	46,5* ± 10,0	27,3 ± 7,1
Fitolacagenina	Acetona	0,73 – 1,7	56,2* ± 8,1	-2,8 ± 5,6
Éster metílico de fitolacagenina	Acetona	0,73 – 1,7	10,3 ± 10,1	10,8 ± 10,7
indometacina	Acetona	0,5	↑ 92,9* ± 3,2	-
nimesulida	Acetona	1,0	-	↑ 48,8* ± 14,0

Tabla 8. Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica de ácido fitolacagénico obtenido de *Q. saponaria.*, fitolacagenina extraída de *P. dioica*, y el éster metílico de esta última, frente a inflamación inducida por AA y TPA.

Por otra parte, se evaluó la actividad antiinflamatoria tópica del ácido quillaico a diferentes dosis. En la Figura 19 se muestran los resultados del efecto antiinflamatorio tópico obtenidos para el ácido quillaico. Los efectos antiinflamatorios fueron dosis – dependientes, alcanzando un efecto máximo frente AA de 92,1 % (a la dosis de 1 mg/oreja) y frente a TPA de 62,2 % (a la dosis de 0,5 mg/oreja). Cabe mencionar que por problemas de solubilidad no se pudieron evaluar dosis superiores a 1 mg/oreja de ácido quillaico.

Resulta interesante destacar el efecto presentado por el ácido quillaico frente a AA (92,1 %) ya que éste superó ampliamente el efecto máximo del fármaco de referencia nimesulida (48,8 %). El efecto observado para este mismo compuesto frente a TPA fue de 62,2 %, es válido señalar que este valor también es significativo. Si comparamos estos ensayos a la dosis mayor empleada (1mg) podemos apreciar que el ácido quillaico es más eficaz en la inflamación inducida por AA que por TPA.

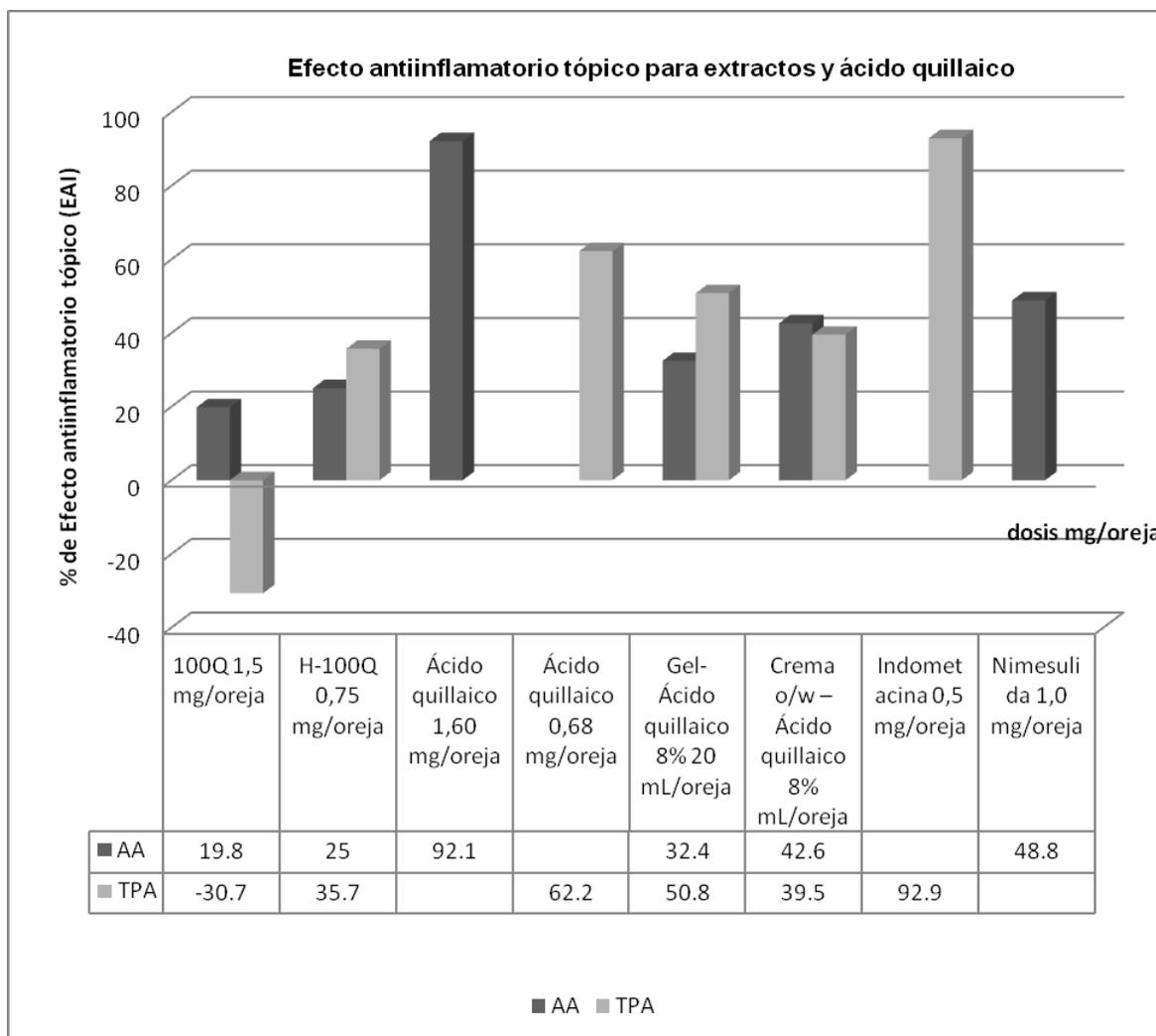
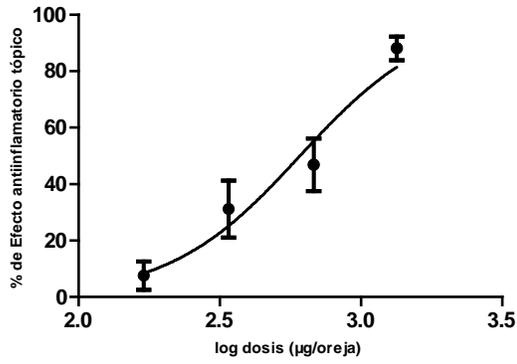


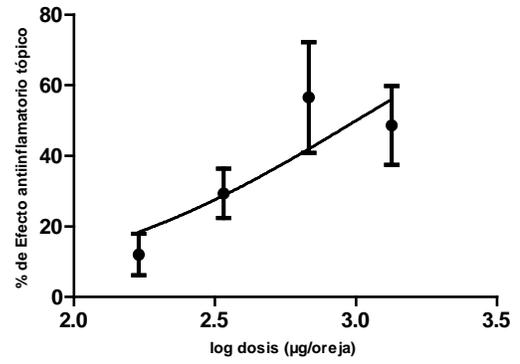
Figura 19. Resultados del % de efecto antiinflamatorio tópico (EAI) para los extractos 100Q y H-100Q, el ácido quillaico y sus formulaciones en gel y crema al 8%, comparados con los fármacos de referencia frente a la inflamación producida por AA y TPA.

Los gráficos logarítmicos de las curvas dosis-respuesta correspondientes al ácido quillaico frente a AA y a TPA, comparadas con las curvas de los fármacos de referencia, se muestran en la Figura 20. Las DE_{50} se muestran en la tabla 8 tanto para los fármacos de referencia, así como para el ácido quillaico.

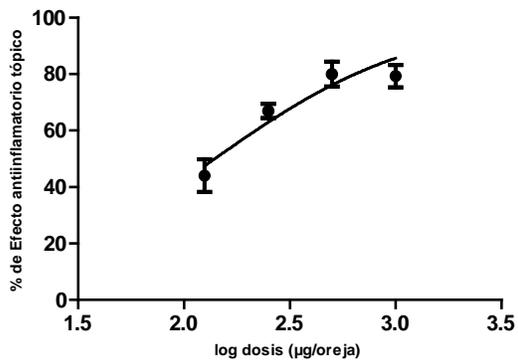
Curva logarítmica dosis-respuesta para ácido quilaico (AA)



Curva logarítmica dosis-respuesta para ácido quilaico (TPA)



Curva logarítmica dosis-respuesta para indometacina



Curva logarítmica dosis-respuesta para nimesulida

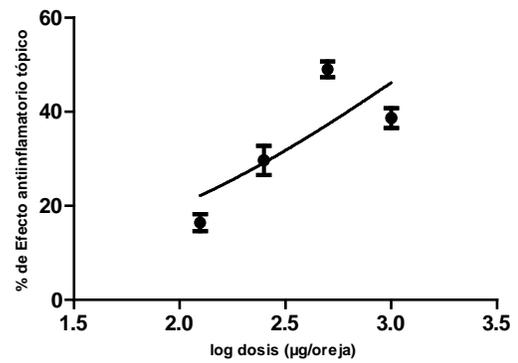


Figura 20. Curva dosis-respuesta (escala logarítmica) para el ácido quilaico frente a TPA y AA, comparadas con los fármacos de referencia

Fármaco	DE ₅₀ (µg)	Log DE ₅₀	Efecto máximo EAI (%)
Nimesulida (AA)	1335	3,126	48,8
Indometacina (TPA)	139,6	2,145	92,9
Ácido quillaico (AA)	608,0	2,784	92,1
Ácido quillaico (TPA)	1002	3,001	62,2

Tabla 8. Valores de dosis efectiva 50 (DE₅₀), log DE₅₀ y efecto máximo para la nimesulida, indometacina y ácido quillaico, calculadas según las curvas dosis-respuesta frente a AA y TPA

Además en la misma figura 19 se muestran los resultados de los efectos antiinflamatorios de las dos formulaciones desarrolladas (tipo gel y crema) de ácido quillaico al 8 %, comparándolas con el efecto máximo obtenido para este mismo compuesto sin formular, frente a la inflamación inducida por AA y a TPA (Tabla 9).

Muestra	Vehículo	Dosis	% EAI _{AA} ± SEM	%EAI _{TPA} ± SEM
Ácido quillaico	Acetona	1,60 mg/oreja	↑ 92,1* ± 4,2	-
Ácido quillaico	Acetona	0,68 mg/oreja	-	↑ 62,2* ± 16,6
gel 8 %	gel s/1	20 µL/oreja	32,4* ± 10,5	50,8* ± 11,2
crema o/w 8 %	crema s/1	20 µL/oreja	42,6* ± 10,5	39,5* ± 10,4
Indometacina TPA	Acetona	0,5 mg/oreja	-	↑ 92,9* ± 3,2
Nimesulida AA	Acetona	1,0 mg/oreja	↑ 48,8* ± 14,0	-

Tabla 9. Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica de ácido quillaico, gel y crema al 8 % mediante el ensayo del edema en oreja de ratón inducido por AA y TPA

*p ≤ 0,05; n = 8; ↑ efecto máximo; s/1 vehículo, EAI_{AA} = efecto antiinflamatorio tópico frente a AA, EAI_{TPA} = efecto antiinflamatorio tópico frente a TPA

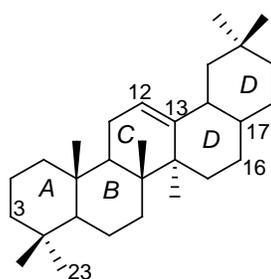
Como se puede observar en dicha tabla, las actividades antiinflamatorias de la crema y el gel al 8 % son menores que las del ácido quillaico puro en ambos ensayos, siendo la disminución más notable frente a AA. Esto puede ser explicado porque la inflamación producida por AA es rápida y la formulación pudo haber retardado la absorción completa del ácido quillaico dentro de este intervalo de tiempo.

Además se evaluó la actividad antiinflamatoria tópica *in vivo* para cada uno de los derivados obtenidos. En la Tabla 10 se muestran los valores del porcentaje del EAI obtenido cuando se induce inflamación con TPA o con AA, para cada compuesto.

Como se puede apreciar, los derivados obtenidos presentaron menor efecto antiinflamatorio que el ácido quillaico y con algunos de ellos no se obtuvo efecto o este fue significativamente menor. Resulta interesante que, en la mayoría de los casos, el efecto antiinflamatorio se observó sólo cuando se indujo inflamación con TPA. En la tabla 11 se muestran los valores del efecto antiinflamatorio comparados con las estructuras químicas de cada derivado, mostrándose en color rojo los valores significativos.

Compuesto	Dosis TPA mg/20µl/oreja	Dosis AA mg/20 µl/oreja	%EAI _{TPA} ± SEM	%EAI _{AA} ± SEM
1	0.68	1.6	↑62.2* ± 16.6	↑92.1* ± 4.2
2	0.7	1.6	38.4* ± 9.8	27.3* ± 7.4
3	0.9	1.6	47.0* ± 17.1	0 ± 9.0
4a	0.5	1.15	32.0* ± 10.0	0 ± 5.9
4b	0.15	0.65	24.1 ± 9.2	3.2 ± 18.8
5	0.62	1.47	0 ± 27.5	-6.8 ± 10.2
6	0.9	2.0	9.7 ± 13.7	0 ± 3.4
7	0.7	1.6	31.0* ± 7.0	11.4 ± 6.7
8	0.8	1.8	60.0* ± 13.7	-4.5 ± 11.8
9	0.78	1.8	47.3* ± 10.5	18.9* ± 9.0
10	0.8	1.9	40.3* ± 5.9	39.2* ± 14.4
Indometacina	0.5	0.5	↑92.9* ± 3.2	0 ± 9.0
Nimesulida	1.0	1.0	5.0 ± 5.6	↑48.8* ± 14.0

Table 10. Efecto antiinflamatorio topico (%EAI) del ácido quillaico (**1**) y sus derivados frente a AA y TPA (EAI_{AA} y EAI_{TPA}, respectivamente); *p ≤ 0,05; n = 8; ↑ efecto máximo



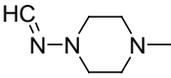
	C-3	C-23	C-12	C-13	C-16	C-17	%EAI _{TPA} ± SEM	%EAI _{AA} ± SEM
	SEM							
1	β -OH	CHO	H		α -OH	COOH	62, 2* ± 16, 6	92, 1* ± 4, 2
2	β -OH	CHO	H		α -OH	CO ₂ CH ₃	38, 4* ± 9, 8	27, 3* ± 7, 4
3	β -OH	CH ₂ OH	H		α -OH	CO ₂ CH ₃	47, 0* ± 17, 1	-11, 9 ± 9, 0
4a	β -OH	COOH	H		α -OH	CO ₂ CH ₃	32, 0* ± 10, 0	-1, 6 ± 5, 9
4b	=O		H		=O	CO ₂ CH ₃	24, 1 ± 9, 2	3, 2 ± 18, 8
5	β -OH	CH ₂ OTBDMS	H		α -OH	CO ₂ CH ₃	-45, 7 ± 27, 5	-6, 8 ± 10, 2
6	β -OH	CH ₂ OTBDMS	H	-O-	α -OH	CO ₂ CH ₃	9, 7 ± 13, 7	-17, 0 ± 3, 4
7	β -OH	CH ₂ OH	H		α -OH	COOH	31, 0* ± 7, 0	-11, 4 ± 6, 7
8	β -OH		H		α -OH	COOH	60, 0* ± 13, 7	-4, 5 ± 11, 8
9	β -OAc	CHO	H		α -OAc	COOH	47, 3* ± 10, 5	18, 9 ± 9, 0
10		HOOC-(CH ₂) ₂ -COOH	H			HOOC-(CH ₂) ₂ -COOH	40, 3* ± 5, 9	39, 2* ± 14, 2
11	β -OH	COOH	H		α -OH	COOH	5, 3 ± 7, 0	42, 6* ± 7, 4

Tabla 11. Porcentaje de efecto antiinflamatorio tóxico *in vivo* de los derivados obtenidos comparado con sus estructuras químicas

* $p \leq 0,05$; $n = 8$; \uparrow efecto máximo, **EAI_{AA}** = efecto antiinflamatorio tóxico frente a AA, **EAI_{TPA}** = efecto antiinflamatorio tóxico frente a TPA

El éster metílico del ácido quillaico (**2**) mostró actividad frente a la inflamación inducida tanto por TPA como por AA, aunque en el segundo caso con una eficacia netamente menor (27,3%).

El compuesto **3** (éster metílico de la 16 α -hidroxihederagenina, con el grupo aldehído reducido a alcohol) presentó un efecto estadísticamente significativo frente al TPA (47,0 %) pero sin efecto frente al AA.

El compuesto **4a**, producto de oxidación del grupo aldehído del éster metílico del ácido quillaico, también fue activo frente a la inflamación inducida por TPA e inactivo frente a la inducida por AA. El producto de oxidación y descarboxilación **4b**, que presenta funciones cetona en los carbonos C-3 y C-16, parecería presentar un leve efecto antiinflamatorio frente a TPA, pero éste no fue estadísticamente significativo.

Los compuestos **5** y **6**, con el hidroxilo del C-23 sililado con sustituyentes voluminosos, carecieron de actividad antiinflamatoria tanto frente a AA como a TPA con valores incluso negativos, lo pudiera corresponder a un efecto pro-inflamatorio en especial frente a TPA.

El compuesto **7** es el producto de reducción del grupo aldehído del ácido quillaico (16 α -hidroxihederagenina). Aunque en menor grado, conservaría cierta actividad frente a la inflamación inducida por TPA y (sin alcanzar significancia estadística) aquella inducida por AA.

El interesante efecto antiinflamatorio de **8** (60,0 %) frente a la inflamación inducida por TPA, difiere sustancialmente del resultado negativo para el efecto antiinflamatorio frente a AA (-4,5 %).

Los compuestos **9** y **10**, derivados del ácido quillaico con los grupos hidroxilos esterificados, mostraron actividad antiinflamatoria significativa frente a la inflamación inducida tanto por TPA como por AA.

Al comparar los efectos antiinflamatorios tópicos del ácido quillaico con los de sus derivados, se pudo observar que las modificaciones estructurales realizadas produjeron una probable disminución del efecto antiinflamatorio, especialmente frente a AA, con una pérdida total de la actividad en los casos de los derivados sililados en el C-23 (5 y 6). La esterificación del grupo carboxilo del C-28 parece ser una modificación que disminuye el efecto antiinflamatorio tópico, a lo menos tratándose de inflamación inducida por AA.

El hecho de que el ácido quillaico haya tenido un 92,1 % de efecto antiinflamatorio tópico frente a la inflamación inducida por AA (incluso superior a la nimesulida, 48,8 %), nos lleva a pensar que su mecanismo de acción va por una vía diferente al resto de sus derivados evaluados. En este sentido parece significativo la observación de que sólo los ésteres del ácido quillaico, tanto en el grupo carboxilo del C-28 como en las funciones alcohólicas de C-3 y C-16 mostraran efectos antiinflamatorios significativos frente a la inflamación inducida por AA.

Si comparamos el efecto exhibido por el éster metílico del ácido quillaico en dosis equivalentes a las utilizadas con el ácido mismo, este derivado presentó efectos menores tanto frente a TPA como a AA, pero la mayor disminución fue frente a AA (27,3%). Por tanto, si bien la esterificación mejora las condiciones químicas para la purificación de estos compuestos (ver acápite anterior), desde el punto de vista farmacológico se observó que la metilación del carboxilo (C-28) unido al C-17 produce una disminución del efecto.

Algunos de los derivados del ácido oleanólico recientemente obtenidos demuestran la importancia del grupo carboxilo en su estructura para que se manifieste un efecto antiinflamatorio. Para dichos triterpenoides así como sus derivados se ha encontrado un mecanismo relacionado con la inhibición directa de la producción de prostaglandinas. Si bien estos ensayos fueron *in vitro*, demostraron la importancia de mantener ciertos grupos estructurales con respecto a otros (Honda *et al.*, 2000 a y b).

Posteriormente, Reyes *et al.* (2006) demostraron que la diacetilación en la molécula del lupano disminuye la actividad antiinflamatoria. Este ensayo consistió en la evaluación de la

actividad antiinflamatoria *in vitro* medida por la inhibición de la producción de NO y PGE2 por triterpenos de la especie *Maytenus*, especialmente ácido betúlinico y sus derivados como el betulin 28-acetoxi, y el 3,28- diacetoxi. Esto concuerda con nuestros resultados, ya que el diacetato del ácido quillaico (**9**) presentó una notable disminución del efecto antiinflamatorio en comparación con su precursor (**1**), particularmente frente a la inflamación inducida por AA. Sin embargo mantuvo un efecto significativo frente a ambos agentes inflamatorios. Por lo tanto el mecanismo de acción del ácido quillaico podría ir por la inhibición de la expresión de enzimas como COX-2 e iNOs, que por la inhibición directa de la formación de mediadores de la inflamación (Reyes *et al.*, 2006).

Zhang *et al.* (2005) describen el efecto antiinflamatorio de derivados acetilados de algunos triterpenoides aislados de semillas de *Picrorhiza kurroa*. En este estudio se evaluó la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2 de seis triterpenoides a dosis de 100 µg/mL empleando como fármacos de referencia AINEs clásicos como aspirina, ibuprofeno, naproxeno; y dos inhibidores selectivos de la COX-2 como son celecoxib y rofecoxib. Los compuestos ensayados sólo presentaron actividad inhibitoria frente a la COX-2, incluidos derivados acetilados de los mismos metabolitos secundarios, los que tuvieron menor efecto a la dosis ensayada (Zhang *et al.*, 2005).

Por su parte los derivados obtenidos por oxidación del éster metílico del ácido quillaico (**4a** y **4b**) mostraron disminución de los efectos en el modelo de TPA y su pérdida total frente a la inflamación por AA. En el caso específico de **4b** esto no se corresponde con los resultados obtenidos por otros autores que probaron oxocompuestos sintetizados a partir de triterpenos pentacíclicos (Honda *et al.*, 2000 a y b). Cabe señalar que muchos de estos estudios son realizados *in vitro*, por lo que se pierden los procesos fisiológicos que sufren los fármacos en el organismo.

Los compuestos **5** y **6**, con un grupo dimetil-t-butilsililo unido al oxígeno del C-23, carecieron de actividad antiinflamatoria, lo que pudiera estar relacionado con el gran tamaño de los grupos incorporados a su estructura química. Compuestos similares carecen de actividad en estudios realizados por otros autores (Honda *et al.*, 1997).

Un caso interesante es el compuesto **8** pues se trata de una hidrazona que presenta en su estructura un grupo 1-amino-4-metilpiperazina. Este derivado solamente presentó actividad frente a TPA (60 %) comparable a la del ácido quillaico (62,2 %). Sin embargo se perdió el efecto frente al modelo de inflamación por AA. Esto podría ser interesante en relación con el mecanismo, que en este caso excluiría una acción directa sobre las enzimas que metabolizan el AA sin afectar mayormente efectos sobre las etapas iniciales de la inflamación inducida por TPA.

Por su parte el bis-succinato de ácido quillaico (**10**), a pesar de la introducción de un grupo relativamente voluminoso, presentó una interesante actividad antiinflamatoria tanto frente a AA como a TPA, 39,2% y 40,3 % respectivamente. Estos resultados pueden ser alentadores con respecto al papel del succinato en el efecto antiinflamatorio. Al igual que en el caso del diacetato, que podría tener actividades equivalentes, estos ésteres podrían sufrir una hidrólisis in vivo liberando ácido quillaico. Así, podría haber un efecto intrínseco sobre la inflamación inducida por TPA y otro efecto, causado por el producto de hidrólisis, que también afectaría la inflamación por AA.

El ácido quillaico fue significativamente más activo que el resto de los derivados frente a ambos ensayos AA y TPA, demostrado por el test de Kruskal Wallis que compara diferencias entre dos y más grupos. El único compuesto que no mostró diferencias significativas con ácido quillaico fue el compuesto **8**, frente a la inflamación inducida por TPA.

Podemos agregar que los derivados **2** y **4b**, así como **1** (Figura 21) presentaron además actividad analgésica comparable a la del fármaco de referencia ibuprofeno, por los dos métodos empleados en la evaluación del efecto antinociceptivo en ratones: latigazo en la cola y placa caliente (Arrau *et al.*, 2010). El que estos compuestos presenten a la vez efectos antiinflamatorios y analgésicos nos puede indicar que su mecanismo de acción podría ser por la inhibición de la COX. Nuestros estudios sugieren que la presencia de los grupos aldehído y carboxilo puede ser importante para modular la actividad especialmente frente a la inflamación inducida por AA.

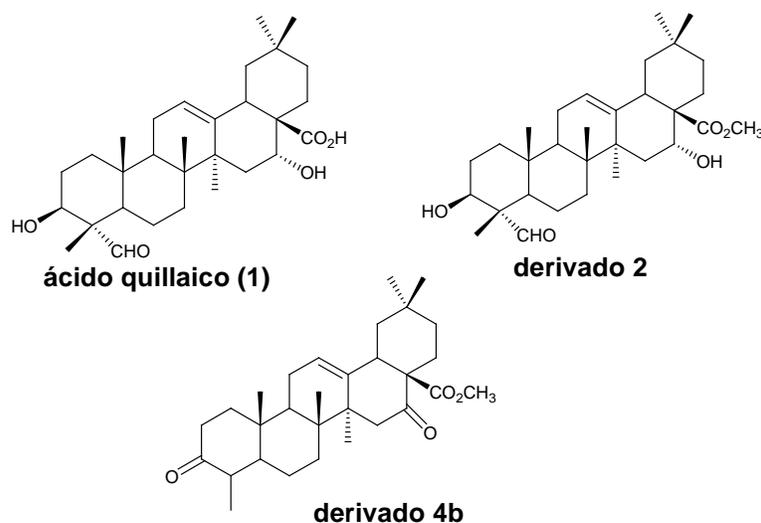


Figura 21. Compuestos que presentaron actividad analgésica además de la actividad antiinflamatoria tópica.

5.2.2 Ensayo de inhibición por vía oral del edema inducido en oreja de ratón

Los fármacos de referencia empleados mostraron un efecto antiinflamatorio oral (EAO) dosis dependiente con un efecto máximo de 63,2 % y 52,8% para indometacina y naproxeno sódico, respectivamente (Tabla 12).

Los resultados del efecto antiinflamatorio por vía oral obtenidos para el ácido quillaico demuestran prácticamente una desaparición del efecto por esta vía. En ambos casos no presentó efecto ni frente a AA, ni TPA con porcentajes de -5,7 % y 3,8%, respectivamente. Los porcentajes de efecto antiinflamatorio obtenidos no son significativos (Tabla 13). Estos resultados pueden deberse a los diferentes procesos que sufre el fármaco a su paso por el organismo, como se explicará en el próximo acápite.

Muestra	Vehículo	Dosis mg/kg	% EAO _{AA} ± SEM	%EAO _{TPA} ± SEM
indometacina	goma arábica	10		23,8* ± 13,3
indometacina	goma arábica	20		↑ 63,2* ± 7,3
indometacina	goma arábica	40		50,3* ± 2,8
naproxeno sódico	goma arábica	10	49,4* ± 8,0	
naproxeno sódico	goma arábica	20	↑52,8* ± 8,4	

Tabla 12. Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los fármacos de referencia administrados por vía oral, mediante el ensayo del edema en oreja de ratón inducido por AA y TPA.

*p ≤ 0,05; n = 8; ↑ efecto máximo; EAO_{AA} efecto antiinflamatorio oral frente a AA; EAO_{TPA} efecto antiinflamatorio oral frente a TPA

Muestra	Vehículo	Dosis mg/kg	% EAO _{AA} ± SEM	%EAO _{TPA} ± SEM
Ácido quillaico	goma arábica	10		3,8 ± 7,1
Ácido quillaico	goma arábica	10	-5,7 ± 3,0	
indometacina	goma arábica	20		↑ 63,2* ± 7,3
naproxeno sódico	goma arábica	20	↑ 52,8* ± 8,4	

Tabla 13. Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria oral del ácido quillaico, mediante el ensayo del edema en oreja de ratón inducidos por AA y TPA

*p ≤ 0,05; n = 8; ↑ efecto máximo; EAO_{AA} efecto antiinflamatorio oral frente a AA; EAO_{TPA} efecto antiinflamatorio oral frente a TPA

5.2.3 Consideraciones sobre la farmacocinética de los compuestos evaluados farmacológicamente

La mayoría de los triterpenos pentacíclicos como los ácidos ursólico, oleanólico y betulínico son ácidos débiles con un pKa aproximadamente de 5 (Du y Chen, 2009). Desde el punto de vista farmacocinético esto significa que necesitan un medio ó pH ligeramente ácido para que el equilibrio químico se desplace a su forma no ionizada y puedan atravesar las membranas biológicas.

Según datos teóricos el grupo ácido de la molécula de ácido quillaico (1) tiene un pKa de 4.61. Además se determinó su coeficiente de reparto ($\log D = 1,65$), el cual estuvo muy cercano al valor teórico ($\log D = 1,68$) (comunicación personal con la candidata a doctor Silvia Arrau). Por lo tanto este tipo de compuesto debería tener una buena absorción a través de las membranas biológicas.

Además de este proceso de absorción, los compuestos en el organismo sufren otra serie de procesos como distribución, metabolismo y excreción, los cuales dependen de varios factores entre los cuales se encuentran la vía de administración y las propias características físico-químicas de cada fármaco.

En nuestro trabajo hemos empleado dos vías de administración para probar el efecto antiinflamatorio del ácido quillaico (tópica y oral). Evidentemente estas difieren, puesto que la absorción por vía oral es gastroenteral y por lo general los fármacos que van por este camino sufren efecto de primer paso antes de alcanzar la circulación sistémica, lo que puede disminuir su biodisponibilidad, es decir la fracción de fármaco que llega a sangre y está disponible para ejercer su acción farmacológica.

En cambio la vía tópica es una vía en la cual se evita la degradación digestiva del principio activo y su metabolismo a nivel hepático. Sin embargo en la piel concurren una serie de enzimas como las hidrolasas, que también contribuyen a la biotransformación de los fármacos aplicados (Seydel y Weise, 2002).

En este sentido existen estudios farmacocinéticos realizados a derivados de triterpenos pentacíclicos, entre ellos el CDDO (Noker *et al.*, 2004). Como parte de sus estudios preclínicos se han determinado los parámetros farmacocinéticos y la toxicidad en ratas y perros. Los resultados mostraron que a las dosis administradas por vía endovenosa, el CDDO exhibe una farmacocinética lineal. Se metaboliza a nivel hepático con una semivida plasmática aproximada de 1,95 h. Se elimina por vía hepática y renal.

Otros estudios sobre los resultados del metabolismo de estos triterpenoides, demostraron el potente efecto de varios derivados del ácido oleanólico (incluyendo su 3-oxo derivado) administrados por vía oral. El ácido oleanólico no fue activo, lo cual lleva a la hipótesis de una posible transformación metabólica en el organismo (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005). Esta transformación según la estructura química de los triterpenos pentacíclicos podría ser una glucuronidación o sulfatación en el C-3.

Como una forma de graficar como influye la vía de administración en estos triterpenoides, dichos autores demostraron en distintos modelos experimentales de inflamación que el ácido oleanólico fue activo frente a la inflamación inducida por aplicación repetida de TPA en oreja de ratón, mientras que por vía oral fue inactivo.

Si extrapolamos estos resultados a nuestro estudio podemos postular una posible explicación para el insignificante efecto antiinflamatorio obtenido para el ácido quillaico administrado por vía oral si lo comparamos con el efecto antiinflamatorio obtenido por vía tópica (62,2 % frente a TPA). Este triterpenoide pudiera sufrir un primer paso hepático que afectara considerablemente la fracción biodisponible.

Por otra parte la visible disminución de la actividad biológica observada en el compuesto **2** con respecto al **1** (frente a la inflamación tópica inducida por ambas vías), demuestra la importancia de que el grupo carboxilo esté libre para que se manifieste el efecto antiinflamatorio tópico frente a AA.

6. CONCLUSIONES

Durante el transcurso de la presente tesis se confirmó la hipótesis que el ácido quillaico podía ser obtenido con un rendimiento importante a partir de un extracto estandarizado de *Quillaja saponaria* Mol. mediante la hidrólisis con HCl al 9%.

Conjuntamente con el ácido quillaico se aisló y caracterizó otra genina de este extracto: el ácido fitolacagénico.

El ácido quillaico es un compuesto altamente funcionalizado lo que permitió realizar modificaciones estructurales exploratorias con miras a modular la actividad antiinflamatoria.

Se obtuvieron derivados de ácido quillaico modificando principalmente el grupo hidroxilo adicional en el C-16 y en el grupo aldehído presente en el C-4 en lugar de un metilo.

Cada uno de estos derivados fue caracterizado estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas y espectrofotométricas.

Además se demostró que el ácido quillaico tenía actividad antiinflamatoria tópica *in vivo* frente a inflamación inducida por TPA y/o AA. La actividad antiinflamatoria fue dosis dependiente frente a AA con un efecto máximo de 92,1 %, comparado con el fármaco de referencia nimesulida. El ácido quillaico también presentó actividad dosis dependiente frente a TPA (62,2%). Ambos efectos son estadísticamente significativos.

El 100 Q no presentó actividad tópica en la inflamación inducida por TPA. Por el contrario, se puede concluir que hubo un efecto pro-inflamatorio. Frente a AA, el 100Q mostró un efecto de sólo 19,8%.

El H-100 Q presentó leve actividad antiinflamatoria frente a AA, así como frente a TPA. El efecto antiinflamatorio fue de 25,0% y 35,7 % para AA y TPA, respectivamente. Sin embargo estos resultados no son estadísticamente significativos.

Si bien la crema y el gel al 8% de ácido quillaico presentaron efecto antiinflamatorio éstos son menores que las del compuesto puro en ambos ensayos.

En la evaluación de la actividad antiinflamatoria por vía oral, el ácido quillaico no presentó efecto antiinflamatorio.

Las modificaciones estructurales realizadas al ácido quillaico disminuyeron el efecto antiinflamatorio.

Partiendo de la esterificación del ácido quillaico, los resultados del efecto antiinflamatorio para el éster metil quillaico fueron de 27,3% y 38,4% para AA y TPA, respectivamente. Lo que demuestra que para ejercer el efecto es necesario el ácido carboxílico libre.

Para la mayoría de los derivados, la actividad antiinflamatoria frente a TPA fue mayor que frente a AA.

Nuestros estudios sugieren que la presencia del grupo aldehído podría ser importante para modular la actividad antiinflamatoria frente a AA, mientras que el grupo carboxilo puede modular la actividad antiinflamatoria frente a TPA.

El extracto 100Q obtenido desde la corteza de *Quillaja saponaria* Mol. es una buena fuente de ácido quillaico, tritepenoide con excelente actividad antiinflamatoria tópica.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, M.; Delporte, C.; Backhouse, N.; Erazo, S.; Letelier, M.; Cassels, B.K.; Silva, X.; Alegría, S.; Negrete, R. Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 5673–5677.

ARRAU, S.; Delporte, C.; Cartegane, C.; Rodríguez-Díaz, M.; González, P.; Silva, X.; Cassels, B.K.; Miranda, H. F. Antinociceptive activity of *quillaja saponaria* mol. Saponin extract, quillaic acid and derivatives in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2010**

APABLAZA, G.; Diaz, M., San Martín, R.; Moya, E. Control de oidio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de quillay (*Quillaja saponaria*). *Cien. Inv. Agr.* **2002**, 29: 83-90.

BAN, J.; Oh, J. H.; Kim, T.M.; Kim, D. J.; Jeong, H-S.; Han, S. B.; Hong, J. T. Anti-inflammatory and arthritic effects of thiacremonone, a novel sulfur compound isolated from garlic via inhibition of NF- κ B. *Arthritis Research & Therapy.* **2009** 11, 5 1-13

BANNO, N.; Akihisa, T.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Higashihara, H.; Ukiya, M.; Watanabe, K.; Kimura, Y.; Hasegawa, J.I.; Nishino, H. Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, 68, 85-90.

BENJAMIN, W.A.; Oxidation mechanisms, Applications to Organic Chemistry. J. Wiley and Sons, Inc., New York, **1964**, p. 61.

BOSCÁ, L.; Zeini, M.; Través, P.G.; Hortelano, S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicol.* **2005**, 208, 249-258.

BRINKER, A.M.; Ma, J.; Lipsky, P.E.; Raskin, I.; Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae). *Phytochemistry* **2007**, 68, 732-766.

BRUNETON, J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. Segunda Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. **2001**, p.653

CALIXTO, J.B.; Otuki, M.; Santos, A. Anti-inflammatory compounds of Plant origin. Part I. Action on Arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). *Planta Med.* **2003**, 69, 973-9834.

CHAVALI, R.; Campbell, J. Immunomodulatory effects of orally-administered saponins and nonspecific resistance against rabies infection. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* **1987**, 84: 129-134.

CHEN, J.; Liu, J.; Zhang, L.; Guanzhong, W.; Hua, W.; Wu, X.; Sun, H. Pentacyclic triterpenes. Part3: Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2915-2919.

CHENG, Y.; Liu, J.; Yang, X.; Zhao, X.; Xu, H. Oleanolic acid nanosuspensions: preparation, *in vitro* characterization and enhanced hepatoprotective effect. *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, 57, 259-264.

CHIANG, Y. M.; Chang, J. Y.; Kuo, C.C. Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Phytochem.* **2005**, 66, 495-501.

CONNOLLY, J.; Hill, R. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 463-482.

COPAJA, S.V., Blackburn, C., Carmona, R. Variation of saponin contents in *Quillaja saponica* Molina. *Wood Sci. Technol.* **2003**, 37, 103-108.

CORDELL, G.A.; Lyon, R. L.; Fong, H. H.; Benoit, P. S.; Farnsworth, N. R. Biological and phytochemical investigations of *Dianthus barbatus* cv. "China Doll" (caryophyllaceae). *Lloydia*. **1977**, 40, 361-363.

COWAN, N.M; Plants products as antimicrobial agents. *Clin. Microbial*. **1999**, 12, 564-582.

CSUK, R.; Barthel, A.; Kluge, R.; Ströhl, D.; Kommera, H.; Paschke, R. Synthesis and biological evaluation of antitumour-active betulin derivatives. *Bioorg. Med. Chem*. **2010**, 18, 1344–1355

DANNHARDT, G.; Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors- current status and future prospects. *Eur. J. Med. Chem*. **2001**, 36, 109-126.

DELPORTE, C., Backhouse, N., Erazo, S., Negrete, R., Vidal, P.; Silva, X.; López-Pérez, J.L.; San Feliciano, A., Muñoz, O. Analgesic-antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. *J. Ethnopharmacol*. **2005**, 99, 119-124.

DELPORTE, C.; Backhouse, N.; Salinas, P.; San Martin, A.; Loyola, A. Pharmacotoxicological study of new diterpenoids. *Bioorg. Chem. Lett*. **2003**, 11, 1187-1190.

DINKOVA-KOSTOVA, A.; Liby, T.; Stephenson, K.K.; David Holtzclaw, W.; Gao X.; Renee Risingsong; Honda, T.; Gordon W. Sporn, M.B; Talalay, P. Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: Correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *PNAS*, **2005**, 102, 4585

DU, H.; Chen, X. CD-MEKC Method To Analyze Triterpene Acids In Traditional Chinese Medicines. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2009**, 20, 1268-1274.

DZUBAK, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustora, A.; Kuuasnica, M.; Biedermann, L.; Maskova, M.; Sarek, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep*. **2006**, 23, 394-411.

ESCALANTE, A. M.; Santecchia C. B; López, S. N.; Gattuso, M.A.; Ravelo, A. G.; Monache, F. D.; González, M.; Zacchino S. A. Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera* an Argentinean species in critic risk. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, 82, 29-34.

FARINA, C.; Panza, M.; Pifferi, G. Synthesis and antiulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *Pharmacol.* **1998**, 53, 22-32.

FAVALORO, F.; Honda, Y.; Honda, T.; Gribble, W.; Suh, N.; Risingsong, R.; Sporn, M. Design and synthesis of tricyclic compounds with enone functionalities in rings A y C: A novel class of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *J. Med. Chem. Lett.* **2002**, 45, 4802-4805.

FUJIOKA, T., Kashiwada, T. Anti AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the VIH activity of structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 243-247.

FURROW, M.; Myers, G. Practical Procedures for the Preparation of N-tert-butyl dimethylsilylhydrazones and Their Use in Modified Wolff-Kishner Reductions and in the Synthesis of Vinyl Halides and gem-Dihalides. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5436-5445.

GAIDI, G.; Miyamoto, T.; Laurens, V.; Lacaille-Dubois, M. New acylated triterpene saponins from *Silene fortunei* that modulate lymphocyte proliferation. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1568-1572.

GOODMAN, A.; Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. [The pharmacological basis of therapeutics] McGraw-Hill Interamericana, México D.F, 9nd ed., **1996** 1, p. 679-691.

GREENE, T.; Wuts, P. Protective groups in Organic Synthesis. Third Edition. J. Wiley and Sons, Inc., New York, **1999**, p. 297-319.

GRISWOLD, D.E., Marshall, P.J., Lee, J.C., Webb, E.F., Hillegass, L.M., Wartell, J.; Newton, J. Jr, Hanna, N. Pharmacology of the pyrroloimidazole, SK&F 105809-II. Antiinflammatory activity and inhibition of mediator production *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, 42, 825-831.

GUO, S.J.; Kenne, L. Characterization of some *O*-acetylated saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Phytochem.* **2000**, 54, 615-623.

GUO, S.J.; Kenne, L.; Lundgren, L.N.; Rönnerberg, B.; Sundquist, B.G. Triterpenoid saponins from *Quillaja saponaria* Mol. *Phytochem.* **1998**, 48, 175-180.

HASHIMOTO, F.; Kashiwada, Y.; Consentino, L.M.; Chen, Ch.; Garret, P.; Lee, K. Anti-AIDS agents –XXVII. Synthesis and Anti- VIH activity of betulinic acid dihydrobetulinic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 2133-2143.

HICHRI, F.; Benn, H.; Cheriaa, J.; Jegham, S.; Mighri, Z.; Antibacterial activity of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds. *C. R. Chimie.* **2003**, 6, 473-483.

HIGUCHI, R., Tokimitsu, Y. and Komori, T. An acylated triterpenoid saponin from *Quillaja Saponaria*. *Phytochem.* **1988**, 27: 1165-1168.

HIGUCHI, R.; Tokimitsu, Y.; Fujioka, T.; Komori, T.; Kawasaki, T.; Oakenful, D. G.; Structure of desacylsaponins obtained from the bark of *Quillaja saponaria* Mol, *Phytochem.* **1987**, 26, 229-235.

HOFFMANN, A., Farga, C., Lastra, J. y Veghazi, E. Plantas Medicinales de uso común en Chile. Segunda edición. Ediciones Fundación Claudio Gay. Santiago. Chile. **1992**

HOLLANDER, M.; Wolfe, D. Nonparametric Statistical Methods; J. Wiley & Sons, New York, **1973**, pp 27-32, 62-70.

HONDA, T.; Gribble, G.; Finlay, H.; Bore, L.; Favalaro, F.; Wang, Y.; Sporn, M. Novel synthetic oleanane and ursane triterpenoids with various enone functionalities in ring A as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *J. Med Chem.* **2000 a**, 43, 1866-1877.

HONDA, T.; Rounds, B.; Gribble, G.; Finlay, H.; Bore, L.; Favalaro, F.; Wang, Y.; Sporn, M.; Suh, N. Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified Rings A and C: A series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *J. Med Chem.* **2000 b**, 43, 4233-4246.

HONDA, T.; Gribble, G.; Finlay, H.; Bore, L.; Favalaro, F.; Wang, Y.; Sporn, M. Partial Synthesis of Krukovines A and B, Triterpene Ketones Isolated from the Brazilian Medicinal Plant *Maytenus krukovii*. *J. Nat. Prod.* **1997**, 607, 1164-1167.

INOUE, H., Mori, T., Koshihara Y. Sulfidopeptide-leukotrienes are major mediators of arachidonic acid-induced mouse ear oedema. *Prostaglandins* **1988**, 36, 731-740.

ITO, J.; Chang, R.; Wang, Park, Y.; Ikegaki, M.; Kilgore, N.; Lee, H. Anti-AIDS Agents. 48.1 Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 1278-1281.

JACOBSEN, N.E.; Fairbrother, W.J.; Kensil, C.R.; Lim, A.; Wheeler, D.A.; Powell, M.F. Structure of the saponin adjuvant QS-21 and its base-catalyzed isomerization product by ^1H and natural abundance ^{13}C NMR spectroscopy, *Carbohydr. Res.* **1996**, 280, 1-14.

JADAV, J.S; Swapan, K. B.; Srinivas, R. 2-Iodoxybenzoic Acid Mediated Facile Conversion of 1,3-Diols to 1,2-Diketones by Oxidative Cleavage of the C-C Bond.

Synthesis. **2006**, 24, 4237-4241.

JOHNSON, W.S.; Shelberg, W.E. A plan for distinguishing between some five and six membered ring ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, 67, 1745-1754.

KENSIL, C.R.; Patel, U.; Lennick, M.; Marciani, D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex, *J. Immunol.* **1991**, 146, 431-437.

KIM, Y.; Wang, P.; Navarro-Villalobos, M.; Rohde, B.D. Synthetic studies of complex immunostimulants from *Quillaja saponaria*: Synthesis of the potent clinical immunoadjuvant QS-21Aapi. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11907.

KITE, G.C., Howes, M. J.; Simmonds, M.S. Metabolomic analysis of saponins in crude extracts of *Quillaja saponaria* by liquid chromatography/mass spectrometry for product authentication. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2004**, 18, 2859-70.

KUBITZKI K. The Families and genera of vascular plants; Springer, Berlin & Heidelberg **2007**, 9, 407-408.

KULJANABHAGAVAD, T.; Thongphasuk, P.; Chamulitrat, W.; Wink, M. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry* , **2008**, 69, 1919–1926

LABRIOLA, R.A.; Deulofeu, V. The structure of prosapogenin from *Quillaja* saponin, *Experientia* **1969**, 25, 124-125.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**, 227, 680-685.

LIU, J. Olenolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 22, 92-94.

LÓPEZ-PARRA M. et al. The selective ciclooxigenasa -2 inhibitor celecoxib modulates the formation of vasoconstrictor eicosanoids and activates PPAR γ . Influence of albumin. *J. of Hepatology*. **2005**, 42, 75-81.

LLORET, S.; Moreno, J. Effects of an anti-inflammatory peptide (Antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 50, 347-353.

LOWRY, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-275.

MAYAUX, J.F; Bousseau, A.; Pauwels, R.; Huet, T.; Hénin, Y.; Dereu, N.; Evers, M.; Soler, F.; Poujade, C.; De Clercq, E.; Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, 91, 3564-3568.

MIRANDA, H.F.; Puig, M.M.; Prieto, J. C., Pinardig 2006. Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain.* **2006**, 121, 22-28.

MITCHELL, J.A; Warner, T.D. Cyclo-oxygenase-2: Pharmacology, Physiology, Biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, 128, 1121-1132.

MONTENEGRO, G. Chile nuestra flora útil. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile. **2000**, p. 267.

MOSNAM, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proloferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**, 65, 55-63.

MÜLLER, E. "Secondary metabolism and coevolution", ed. M. Luckner, K. Mothes. Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle Saale, **1974**, p.123.

MURAKAMI, M.; Kudo, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog. Lipid. Res.* **2004**, 43, 3-35.

NEWMAN, M. Immunogenicity and toxicity testing of an experimental HIV-1 vaccine in nonhuman primates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1992**, 8, 1413-1418.

NOKER, P.E.; Gorman, G.S.; Schweikart, K.M.; Tomaszewski, J.E.; Sporn, M.; Page, J.E. Pharmacokinetics and toxicity of CDDO, a synthetic triterpenoid, in rats and dogs. *Cancer Res.* **2004**, 45, 200-205.

NORD, L.; Kenne, L. Novel acetylated triterpenoid saponins in a chromatographic fraction from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydr. Res.* **2000**, 329, 817-829.

NYBERG, N.T.; Kenne, L.; Rönnberg, B.; Sundquist, B. Separation and structural analysis of some saponins from *Quillaja saponaria*. *Carbohydr. Res.* **2000**, 323, 87-97.

OGAWA, S.; Hosoi, K.; Makino, M.; Fujimoto, Y.; Iida, T. Oxyfunctionalization products of terpenoids with dimethyldioxirane and their biological activity. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, 55, 247-250.

OTUKI, M.F.; Vieira-Lima, F.; Malheiros, A.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and a-amyrin pentacyclic triterpene. *Europ. J. Pharmacol.* **2005**, 505, 253– 259

OVESNA, Z.; Vachalcova, A.; Horvathova, K.; Tothova, D. Pentacyclic triterpenoids acids: new chemoprotective compounds. *Neoplasma.* **2004**, 55, 327-333.

PALATNIK DE SOUSA, C.B.; Santos, W.R.; Casas, C.P.; Paraguai de Souza, E.; Tinoco, L.; Da silva, B.P.; Palatnik, M.; Parente, J. Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehyde-containing *Quillaja saponaria* sapogenins. *Vaccine.* **2004**, 22, 2470-2479.

PELAH, D., Abramovich, Z., Markus, A. and Wiesman, Z. The use of comercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes* and *Culex pipiens*. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, 81, 407-409.

PREHN, D.; Serrano, C.; Berrios, C.G. Micropropagacion de *Quillaja saponaria* Mol. a partir de semillas. *Bosque (Valdivia)* **2003**, 24, 3-12.

RAY A, Huisman MV, Tamsa JT. The role of inflammation on atherosclerosis, intermediate and clinical cardiovascular endpoints in type 2 diabetes mellitus. *Europ. J. In. Med.*, **2009**; 20: 253-260.

RECIO, M.C.; Giner, R.M.; Mañez, S.; Ríos, J.L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.* **1995**, 61, 182-185.

REYES, C.; Núñez, M.J.; Jiménez, A.; Busserolles, J.; Alcaraz, M.; Bazzocchi, L. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E₂. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 1573-1579.

RIBERA, A., Zuñiga, G. and Cotoras, M. (2008). Effect of extracts from *in vitro* shoots of *Quillaja saponaria* Mol. on *Botrytis cinerea*. *Word Journal Biotechnology and Microbiology* **2008**, 11274-008-9673.

RONER, M.R.; Srayberry, J. Antiviral activity obtained from aqueous extracts of Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria* Mol.) *J. Gen. Virol.* **2007**, 88, 275-285.

RUSICKA, L. Die Synthese des 22.23-Dihydro-isosqualens. *Experientia*, **1953**, 9, 357.

SAN MARTIN, R.; Briones, R. Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *J. Sci. Food Agri.* **2000**, 80, 2063- 2068.

SERHAN, C.N.; Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol.* **2005**, 6, 1191-1196.

SETZER, W.N.; Setzer, M.C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents, *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, 3, 540-556.

SEYDEL, J.K.; Wiese, M. Drug-membrane interactions. Analysis, drug distribution and modeling. Wiley-VCH. **2002**, 15. p.25

SHARPLESS, K.B.; Michaelson R.C, Electrophilic and nucleophilic organoselenium reagents. New routes to α,β -unsaturated carbonyl compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 6137-6139.

SHAW, J.; Stevenson, R. 4-Bromo and 4-chloro-cholest-4-en-3-one. *J. Chem. Soc.* **1955**, 3549-3551.

SIMMONS, D.L; Botting, R.M. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol.* **2004**, 56, 387-437.

SINGH, G.B.; Singh, S.; Bani, B.; Gupta, B.D.; Banerjee, S.K. Antiinflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, 44, 456-458.

SUH, N.; Honda, T.; Finlay, H.; Barchowsky, A.; Williams, C.; Benoit, N.E.; Xie, Q.; Nathan, C.; Gribble, G.; Sporn, M. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res.* **1998**, 58, 517-723.

SUBBA RAO, G.S.R.; Kondaiah, P.; Singh, S.K.; Ramanan, P.; Sporn, M.B. Chemical modifications of natural triterpenes glycyrrhetic and boswellic acids: evaluation of their biological activity, *Tetrahedron* **2008**, 64, 11541-11548

TORALAND, M.; Rosende, R. Produccion y productividad de quillay. *Renares* **1986**, 3, 19-21.

TOWBIN, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1979**, 76, 4350-4354.

TSCHESCHE, R. Advances in the chemistry of antibiotic substances from higher plants. *Pharmacognosy and Phytochemistry*.ed. Wagner, H. Springer Verlag, Berlín, **1971**, p.274.

VAN SETTEN, D.C.; Van de Werken, G. Molecular structures of saponins from Quillaja saponaria Molina. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, 404, 185-93.

VAN SETTEN, D.C., Van de Werken, G., Zomer, G. and Kersten, G.F. Glycosyl compositions and structural characteristics of the potential immuno-adjuvant active saponins in the Quillaja saponaria Molina extract quil A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, 9, 660.

VAN SETTEN, D.C., Zomer, G., Van de Werken, G., Wiertz, E.J.H., Leeftang, B.R.; Kamerling, J.P. Ion trap multiple-stage tandem mass spectrometry as a pre- NMR tool in the structure elucidation of saponins. *Phytochem. Anal.* **2000**, 11, 190-198.

VOGEL, H.; Berti, M. Como producir y procesar plantas medicinales y aromáticas de calidad. FIA, Santiago de Chile. **2003**. p.169

WEI, Y.; Ma C.-M.; Hattori M. Synthesis of dammarane-type triterpene derivatives and their ability to inhibit HIV and HCV proteases. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 3003-3010.

WU, J. Saponins adjuvants enhancement of antigenspecific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. *J. Immunol.* **1992**, 148, 1519-1525.

WU, M.J.; Wang, L.; Ding, H.J.; Weng, C.Y.; Yen, J.H. *Glossogyne tenuifolia* acts to inhibit inflammatory mediator production in a macrophage cell line by down regulating LPS-induced NF-kB. *J. Biomed. Sci.* **2004**, 11,186-199.

YIM, T.K.; Wu, W.K.; Pak, W.F.; Ko, K.M.; Hepatoprotective action of an oleanolic acid-enriched effect of *Ligustrum lucideum* fruits is mediated through an enhancement on hepatic glutathione regeneration capacity in mice. *Phytoterapy.* **2001**, 15, 589-592.

YU, D.; Morris, N.; Lee, K.; New developments in natural products. *Med. R. Rev.* **2007**, 27, 108-132.

ZAPRUTKO, L.; Partyka, D.; Bednarczyk-Cwynar, B. Triterpenoids. Part 21: Oleanolic acid derivatives as percutaneous transport promoters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4723-4726.

ZHANG, Y.; De Witt, D.; Murugesan, S.; Nair, M. Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitory triterpenoids from *Picrorhiza korroa* seeds. *Life Sci.* **2005**, 77, 3222-3230.

ZIN J, Weiss C. *La salud por medio de las plantas medicinales*. Salesiana, Santiago de Chile, 6nd ed., **1980**, p. 277.

8. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- Silvia Arrau, Carla Delporte, Carlos Cartagena, **Maité Rodríguez-Díaz**, Patricia Gonzáles, Ximena Silva, Bruce Cassels, Hugo Miranda “Antinociceptive activity of *Quillaja saponaria* Mol. extract, quillaic acid and derivatives in mice” (aceptada Journal of Ethnopharmacology)
- **Maité Rodríguez-Díaz**, Carla Delporte, Silvia Arrau, Carlos Cartagena, Bruce K. Cassels, Ludger A. Wessjohann “Topical anti-inflammatory activity of quillaic acid derivatives” (aceptada Journal of Pharmacy and Pharmacology)
- **Maité Rodríguez-Díaz**, Olosmira Correa, Carla Delporte, Silvia Arrau, Carlos Cartagena, Bruce K. Cassels “In vivo anti-inflammatory activity of the aqueous extract and saponinins from *Quillaja saponaria* Mol.” (manuscrito en preparación)

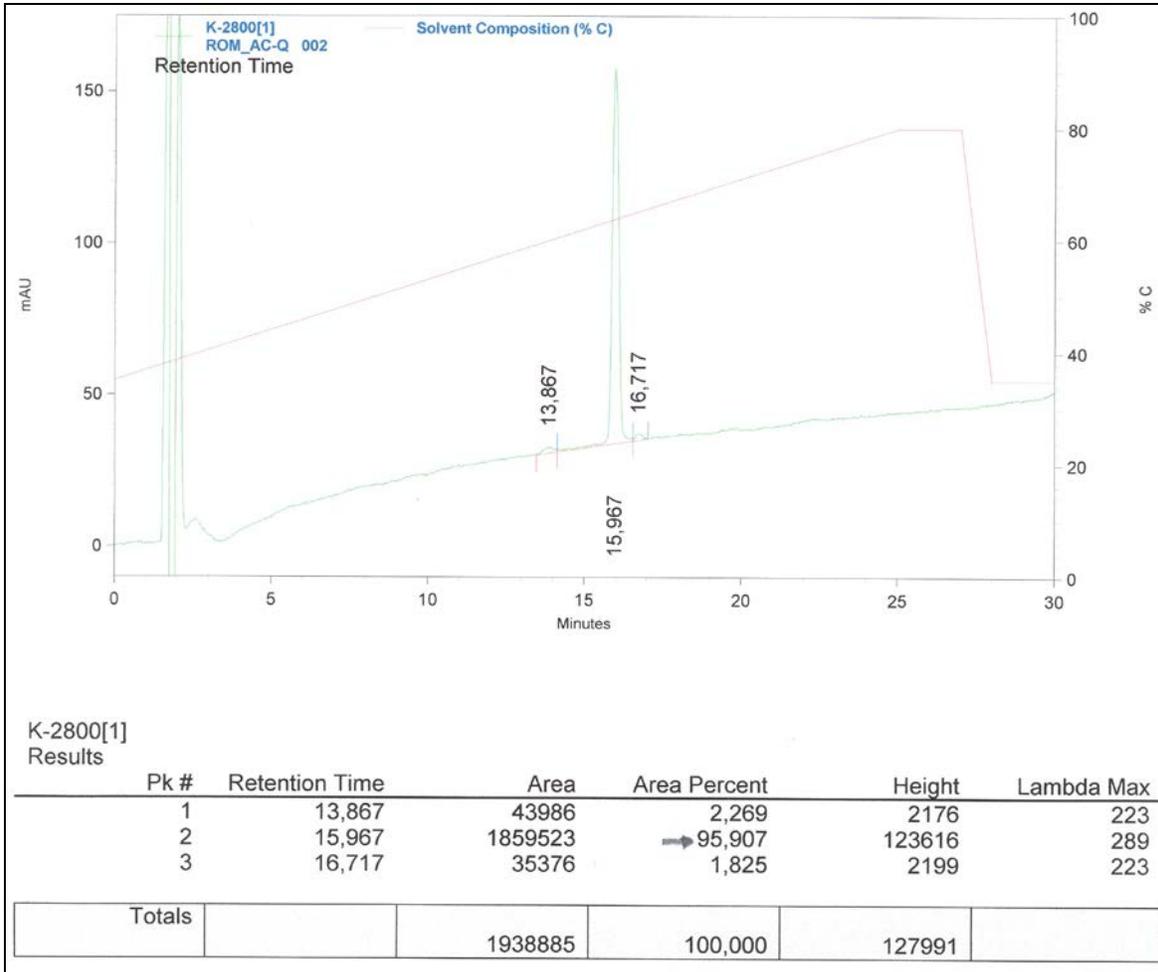
9. TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS

- II Congreso Internacional Farmacéutico, Viña del Mar, Nov. 2008. (1 trabajo presentado en póster: M. Rodríguez-Díaz, S. Arrau, C. Cartagena, B.K. Cassels, P. González, , C. Delporte “Evaluación de la actividad antiinflamatoria de un extracto estandarizado de *Quillaja saponaria* Mol., quillay”)
- II Congreso de Fitoterápicos del Mercosur. VI Reunión de la Sociedad Latinoamericana de fitoquímica. Belo Horizonte, Brasil. Dic. 2008 (1 trabajo presentado en póster: M. Rodríguez-Díaz, S. Arrau, C. Cartagena, B.K. Cassels, H. Miranda, C. Delporte “*Quillaja saponaria* Mol., una planta chilena con perspectivas en la fitoterapia”)
- Jornadas de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Chile, 2009 y 2010 (Presentación de los avances del trabajo de tesis)
- International Conference on Saponins – New trends in saponins, Nancy, Francia, Jun. 2009 (1 trabajo presentado en póster por el profesor Dr. Bruce K. Cassels: C. Delporte, M. Rodríguez-Díaz, M. Rebolledo-Fuentes, B.K. Cassels “Prosapogenins and anti-inflammatory activity”)
- IOCD International Symposium Biology, Chemistry, Pharmacology and Industrial Applications of Plants of Americas, Viña del Mar, Nov. 2009 (3 trabajos presentados en póster: M. Rodríguez-Díaz, B.K. Cassels, L. Wessjohann, C. Delporte “Topical anti-inflammatory activity of quillaic acid derivatives” ; C. Cartagena, M. Rodríguez, B.K. Cassels, C. Delporte “*Quillaja saponaria* as a triterpenoid source” y M. Raimondi, S.A. Zacchino, M. Rodríguez-Díaz, C. Delporte, M.A. Novoa, M. Asencio, B.K. Cassels, “Glycosylation decreases antifungal activity in phytolaccagenin saponins”)
- Congreso de la SOQUIFICH, Santiago, Sep. 2010 (1 trabajo presentado en póster: M. Rodríguez-Díaz, O. Correa, S. Arrau, C. Cartagena, P. González, X. Silva, B.K. Cassels, C. Delporte “Nuevas perspectivas del quillay en la industria farmacéutica”)

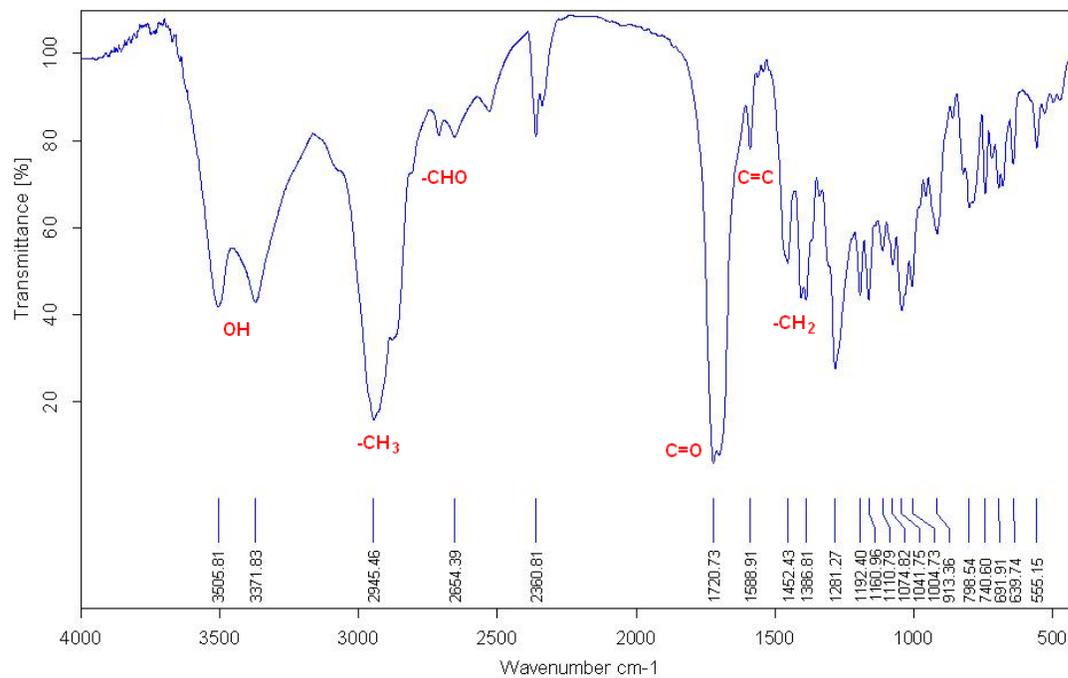
- Congreso de la sociedad chilena de Farmacología (SOFARCHI), Valdivia, Nov. 2010. (1 trabajo presentado en póster: M. Rodríguez-Díaz, C. Cartagena, B.K. Cassels, C. Delporte “Actividad antiinflamatoria tópica de ácido quillaico y sus derivados”)

ANEXOS

Cromatograma CLAE para ácido quillaico y ácido fitolcagénico

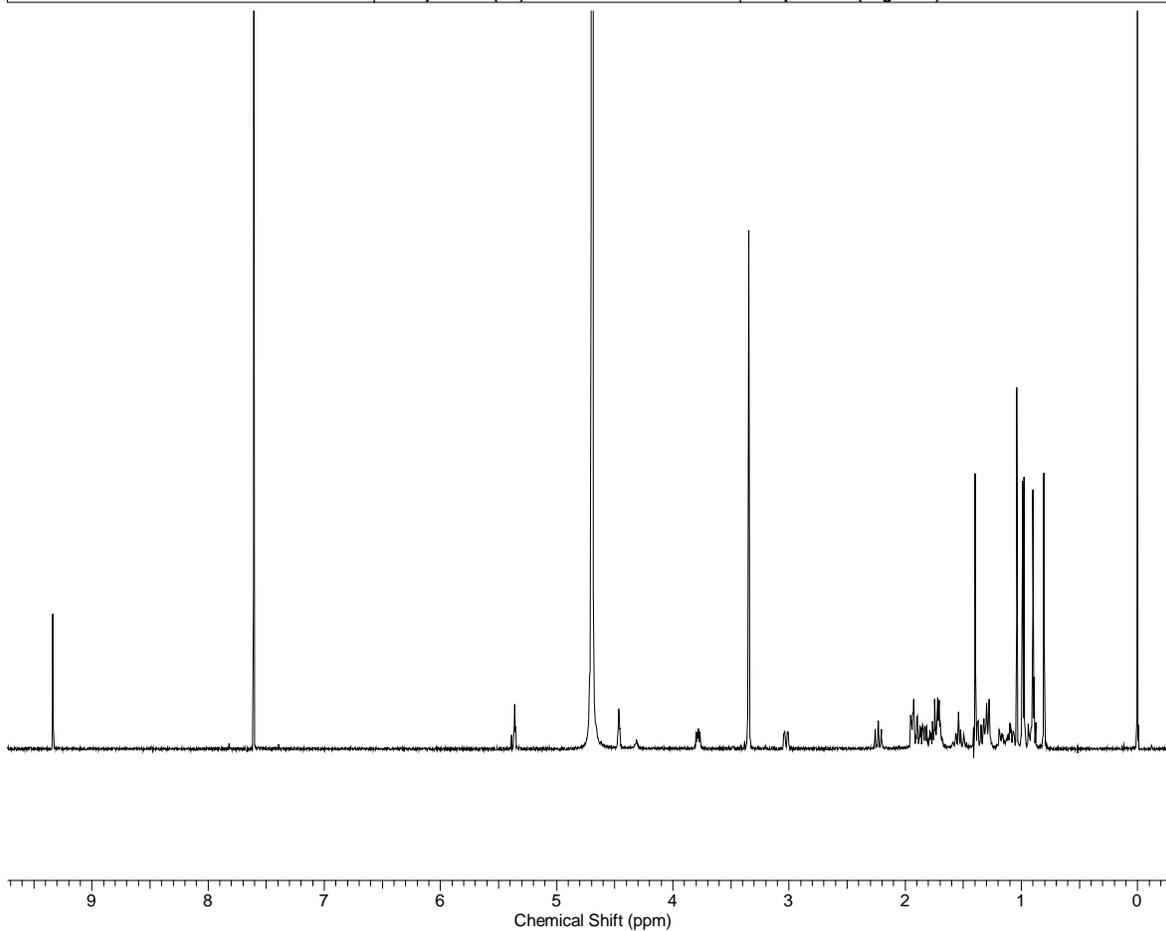


Espectros IR y RMN para ácido quillaico (1)



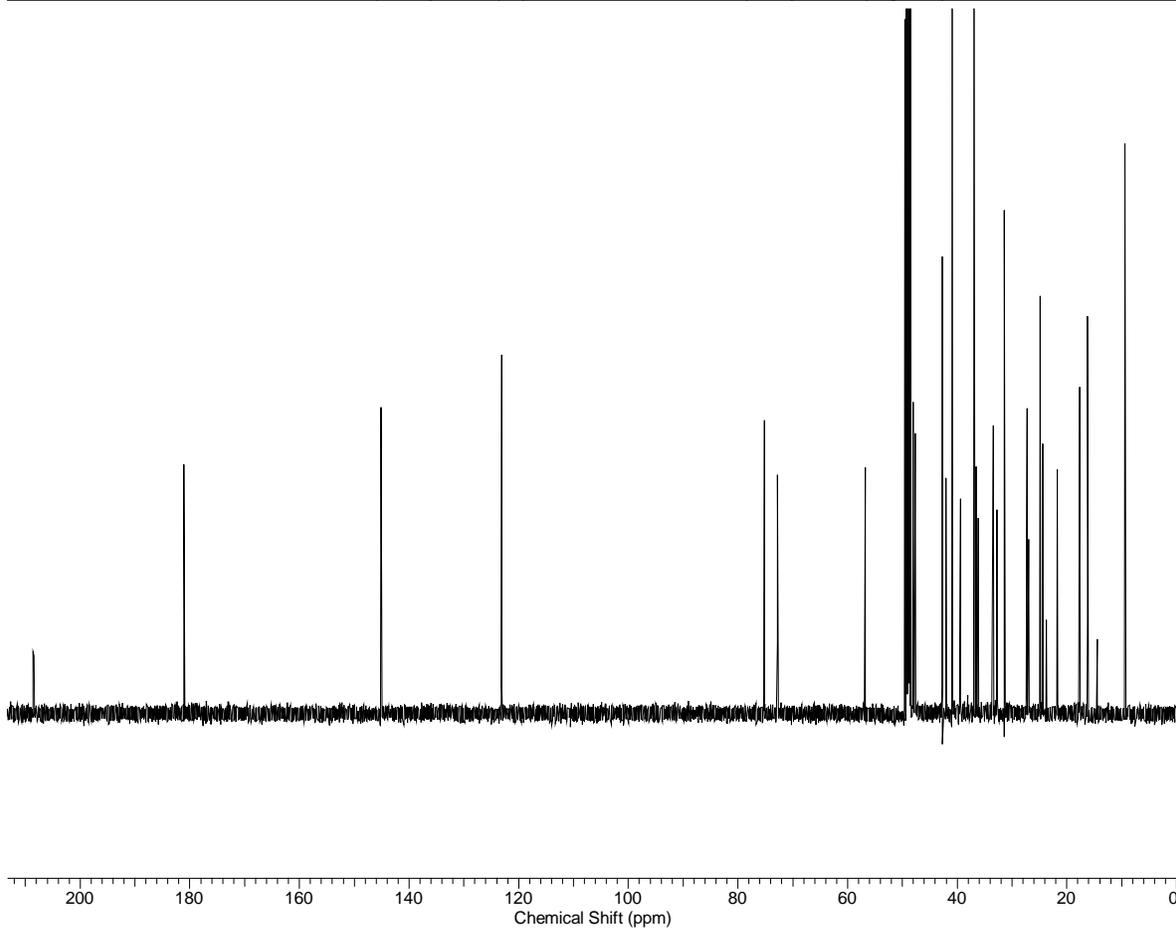
1H RMN ácido quillaico

Acquisition Time (sec)	4.0972	Comment	ROM001_1H/CD3OD+CDCl3/1H		
Date	Mar 26 2008				
File Name	D:\DIONAEA MUSCIPULA\DOCTORADO_CHILE\PB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM001_1H				
Frequency (MHz)	499.80	Nucleus	1H	Number of Transients	64
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	s2pul
Solvent	METHANOL-D4	Sweep Width (Hz)	7997.60	Temperature (degree C)	29.000



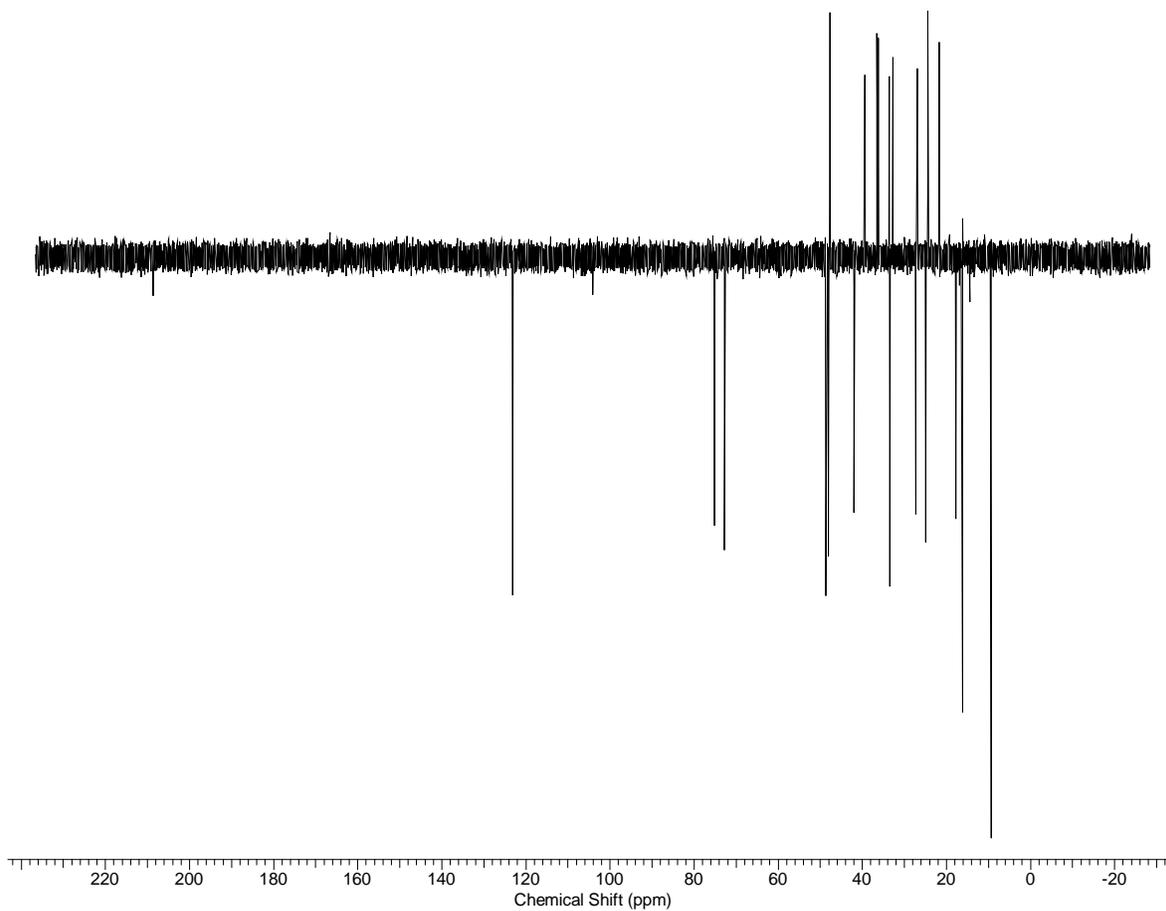
13C RMN ácido quillaico

Acquisition Time (sec)	0.9834	Comment	ROM001_13C/CD3OD/13C		
Date	Mar 26 2008				
File Name	D:\DIONAEA MUSCIPULA\DOCTORADO_CHILE\PB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM001_13C				
Frequency (MHz)	125.69	Nucleus	13C	Number of Transients	20000
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	s2pul
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	33319.45	Temperature (degree C)	22.000



Dept 135_ ácido quillaico

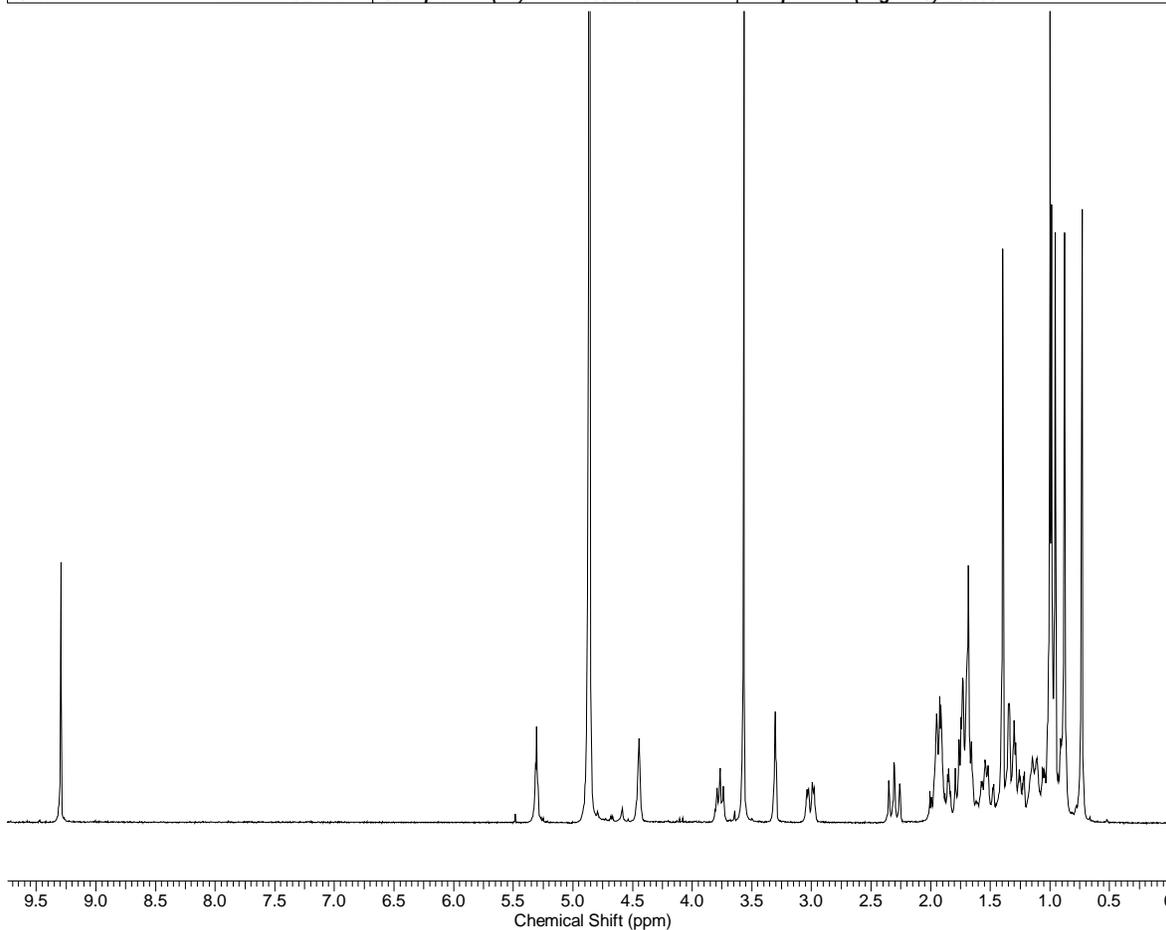
Acquisition Time (sec)	0.9834	Comment	ROM001_13C/CD3OD/13C		
Date	Mar 26 2008				
File Name	D:\DIONAEA MUSCIPULA\DOCTORADO_CHILE\PB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM001_13C				
Frequency (MHz)	125.69	Nucleus	13C	Number of Transients	1344
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	dept135
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	33319.45	Temperature (degree C)	22.000



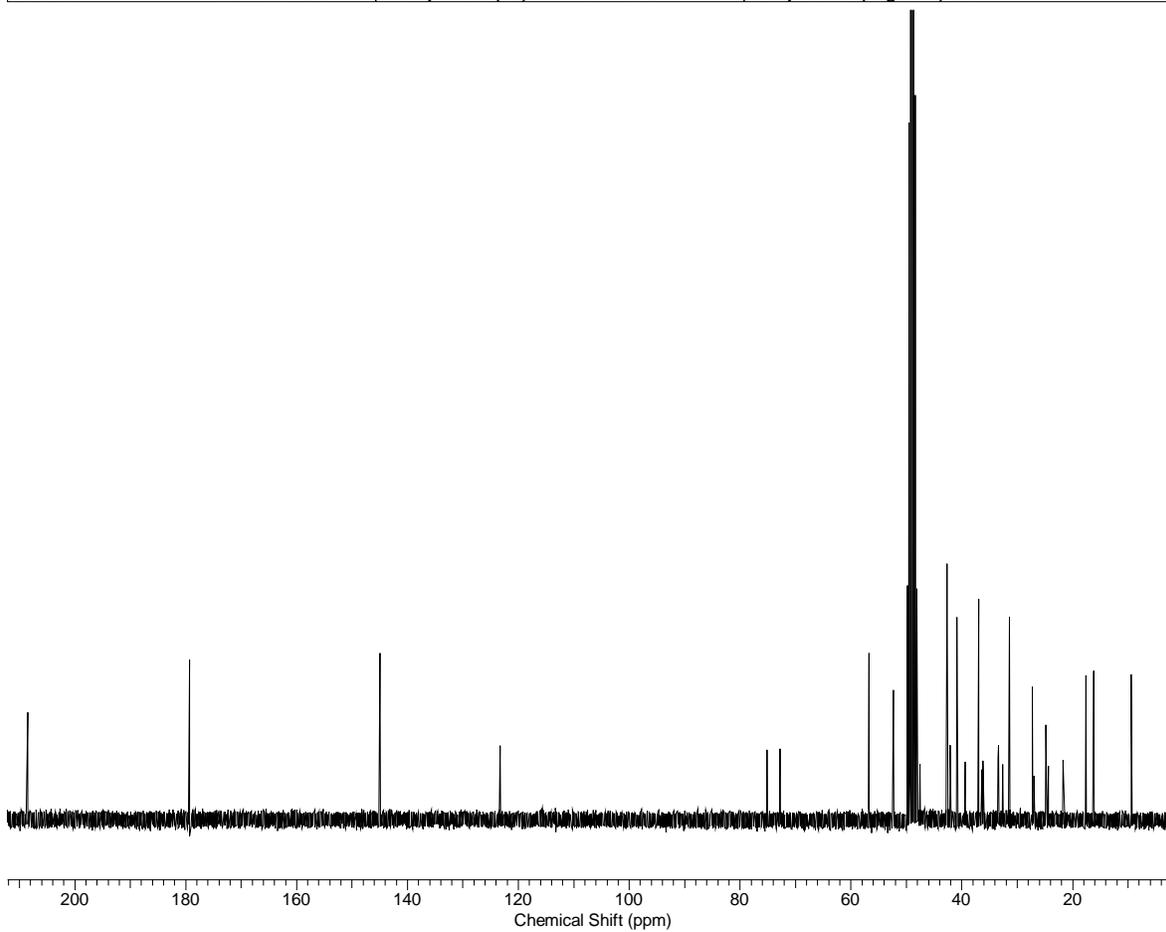
Espectros RMN para derivado 2

1H RMN derivado 2

Acquisition Time (sec)	2.7329	Comment	ROM018/CD3OD/1H		
Date	Jul 11 2008				
File Name	D:\DIONAEA MUSCIPULA\DOCTORADO_CHILE\VPB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM018_20080711_03				
Frequency (MHz)	300.23	Nucleus	1H	Number of Transients	64
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	s2pul
Solvent	METHANOL-D4	Sweep Width (Hz)	5995.20	Temperature (degree C)	28.000

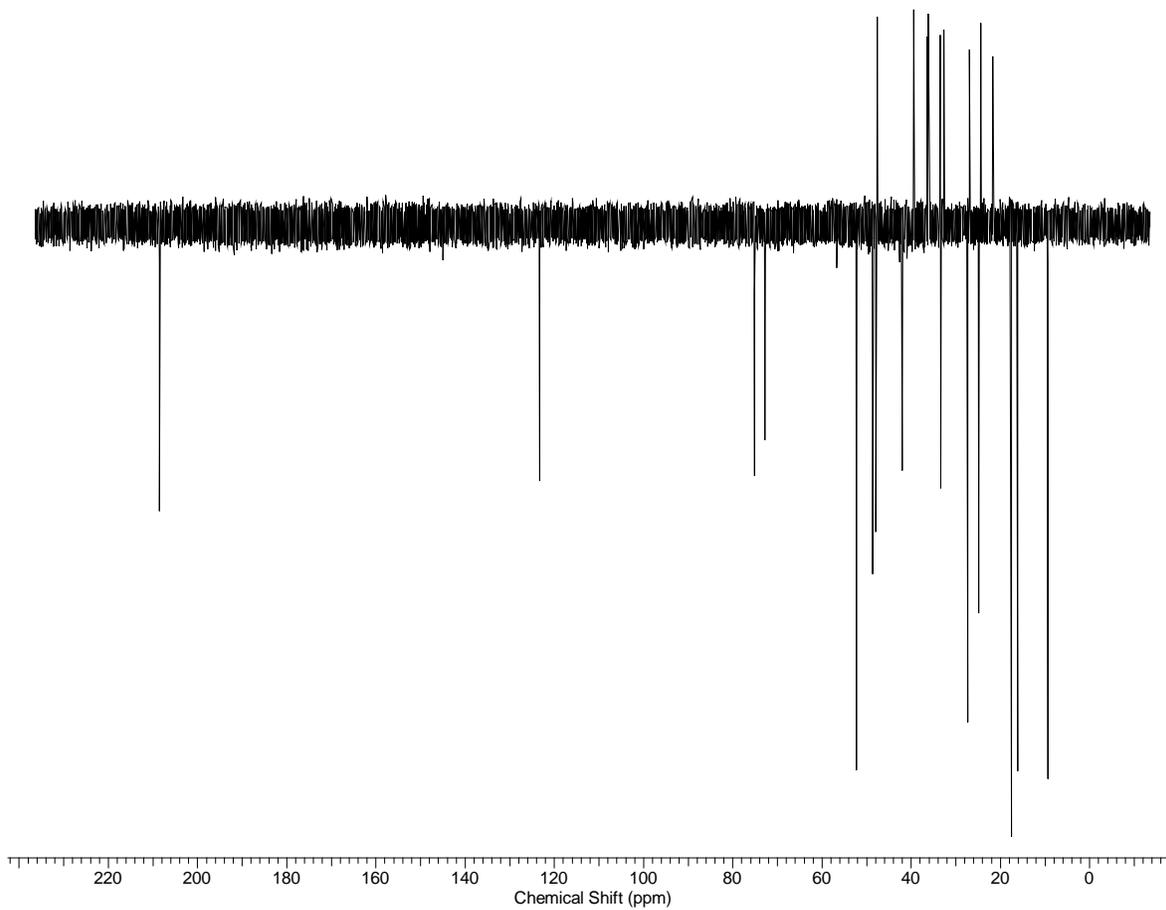


Acquisition Time (sec)	1.7465	Comment	ROM018/CD3OD/13C		
Date	Jul 14 2008				
File Name	D:\DIONAEA MUSCIPULA\DOCTORADO_CHILE\PB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM018_20080711_03				
Frequency (MHz)	75.50	Nucleus	13C	Number of Transients	2000
Original Points Count	32953	Points Count	65536	Pulse Sequence	s2pul
Solvent	METHANOL-D4	Sweep Width (Hz)	18867.92	Temperature (degree C)	29.000



Dept 135_ derivado 2

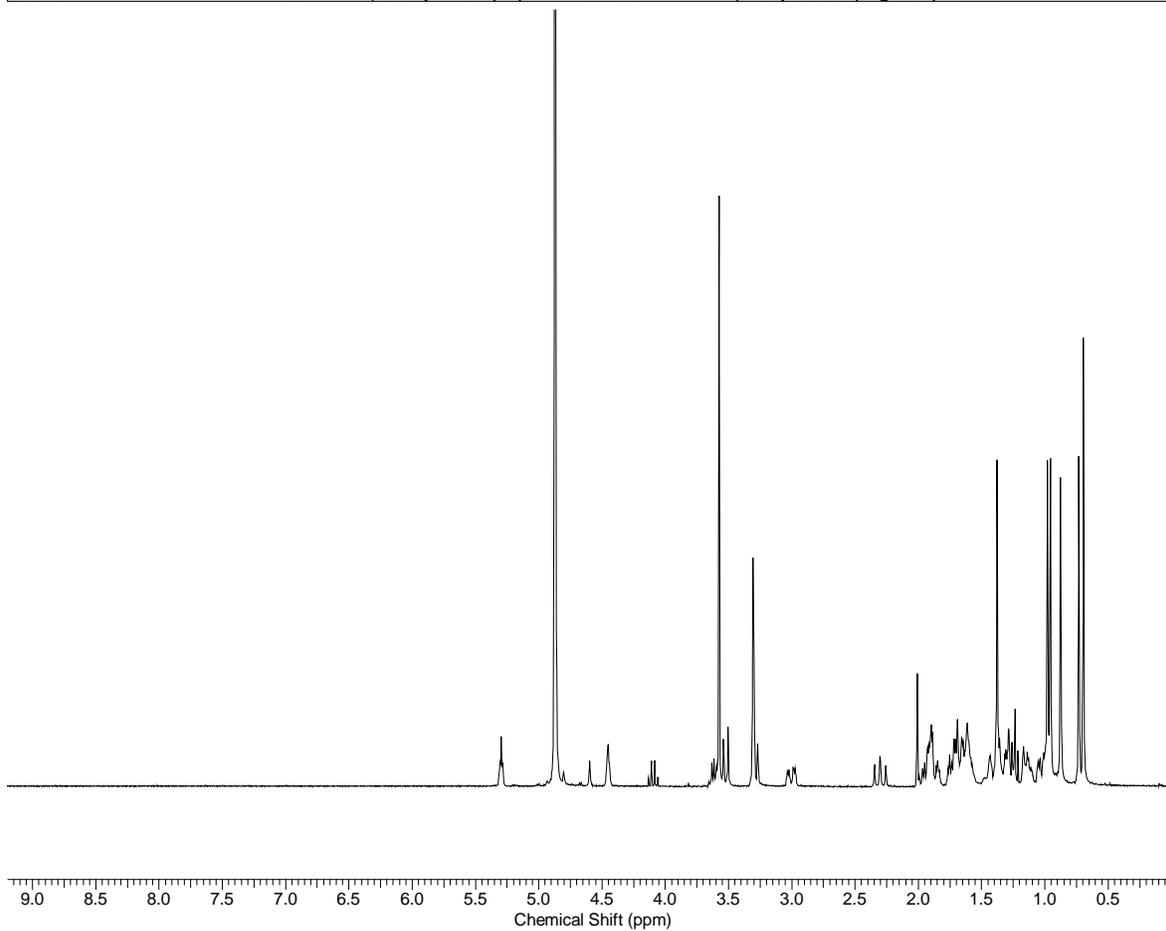
Acquisition Time (sec)	1.7465	Comment	ROM018/CD3OD/13C		
Date	Jul 14 2008				
File Name	D:\DIONAEA MUSCIPULA\DOCTORADO_CHILE\PB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM018_20080711_03				
Frequency (MHz)	75.50	Nucleus	13C	Number of Transients	1000
Original Points Count	32953	Points Count	65536	Pulse Sequence	dept135
Solvent	METHANOL-D4	Sweep Width (Hz)	18867.92	Temperature (degree C)	29.000



Espectros RMN para derivado 3

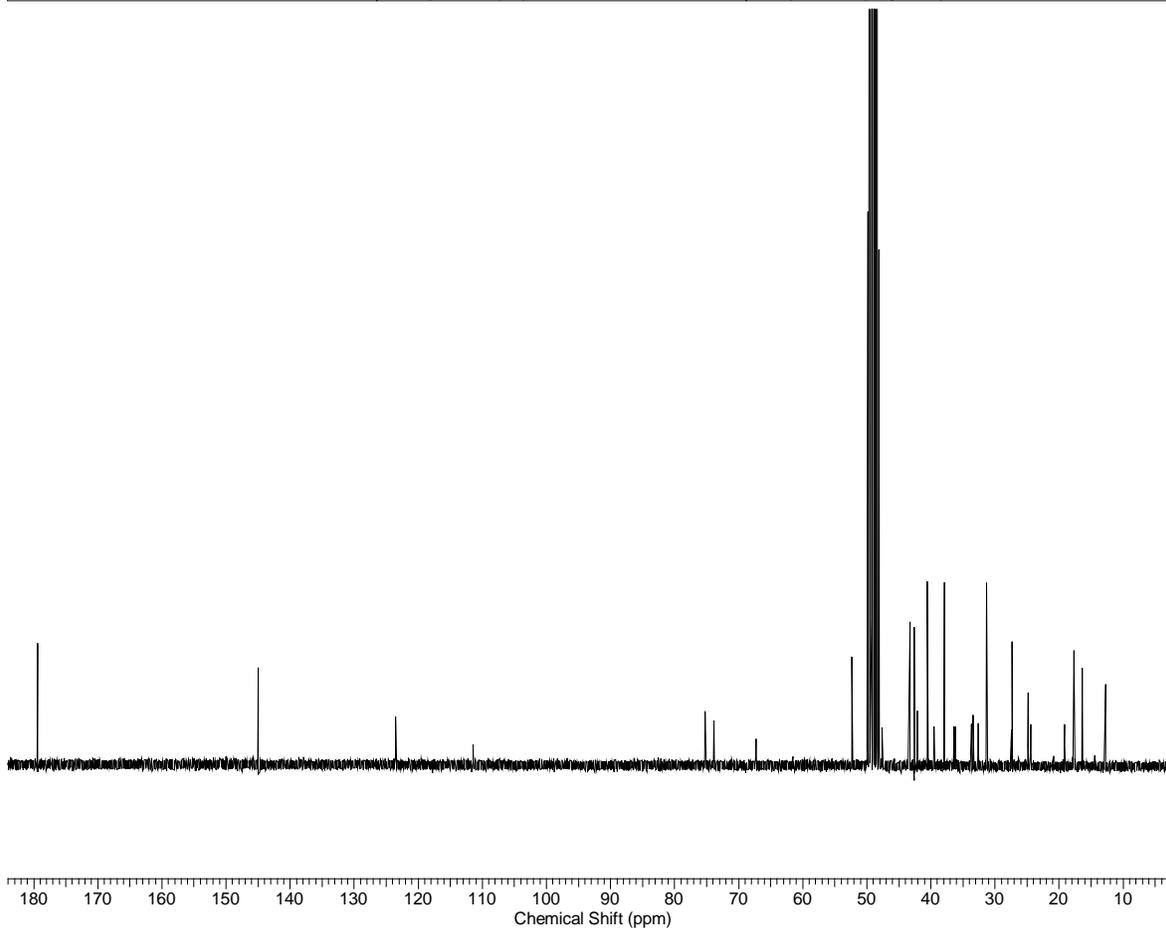
1H RMN derivado 3

Acquisition Time (sec)	2.7329	Comment	ROM016/CD3OD/1H		
Date	Jul 11 2008				
File Name	D:\DIONAEA MUSCIPULA\DOCTORADO_CHILE\PB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM016_20080711_02				
Frequency (MHz)	300.23	Nucleus	1H	Number of Transients	64
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	s2pul
Solvent	METHANOL-D4	Sweep Width (Hz)	5995.20	Temperature (degree C)	28.000



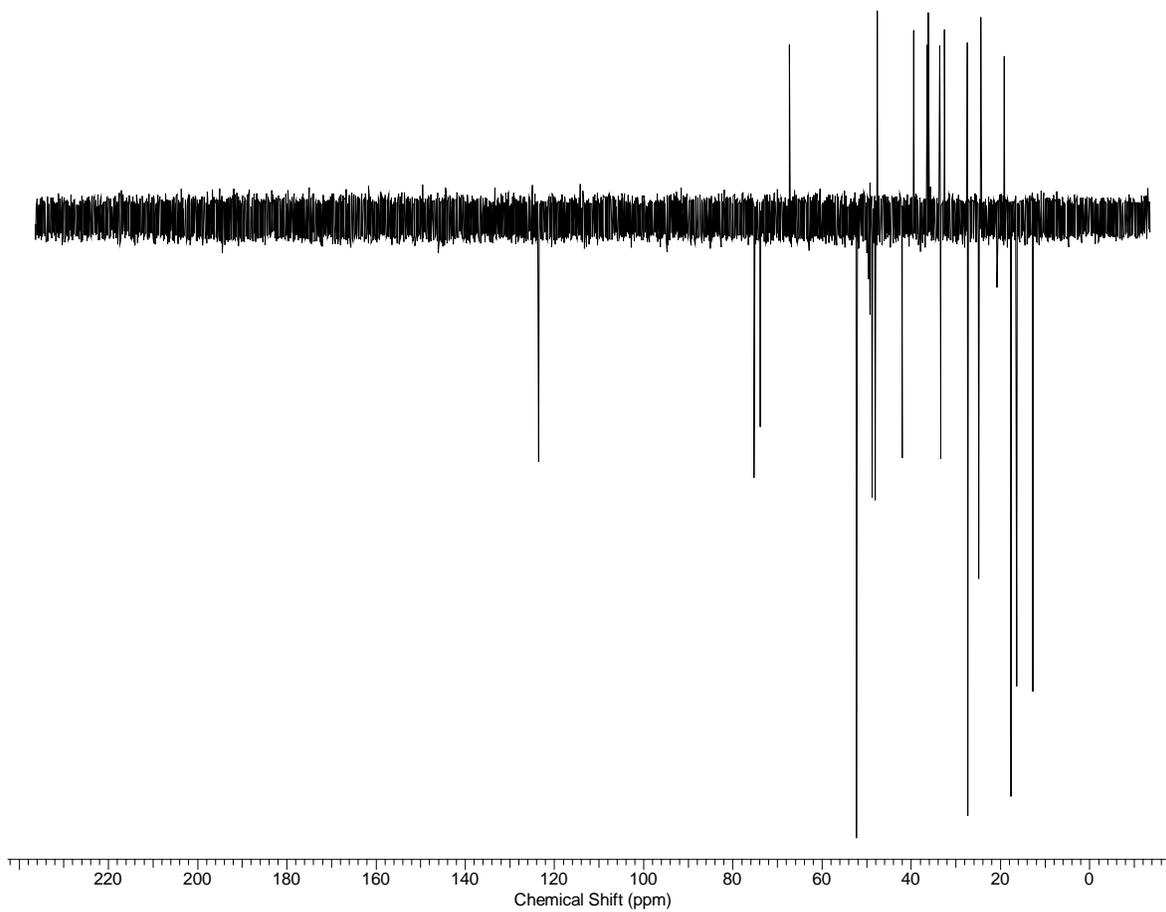
13C RMN_derivado 3

Acquisition Time (sec)	1.7465	Comment	ROM016/CD3OD/13C		
Date	Jul 14 2008				
File Name	D:\DIONAEA MUSCIPULA\DOCTORADO_CHILE\IPB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM016_20080711_02				
Frequency (MHz)	75.50	Nucleus	13C	Number of Transients	10000
Original Points Count	32953	Points Count	65536	Pulse Sequence	s2pul
Solvent	METHANOL-D4	Sweep Width (Hz)	18867.92	Temperature (degree C)	29.000



Dept 135_ derivado 3

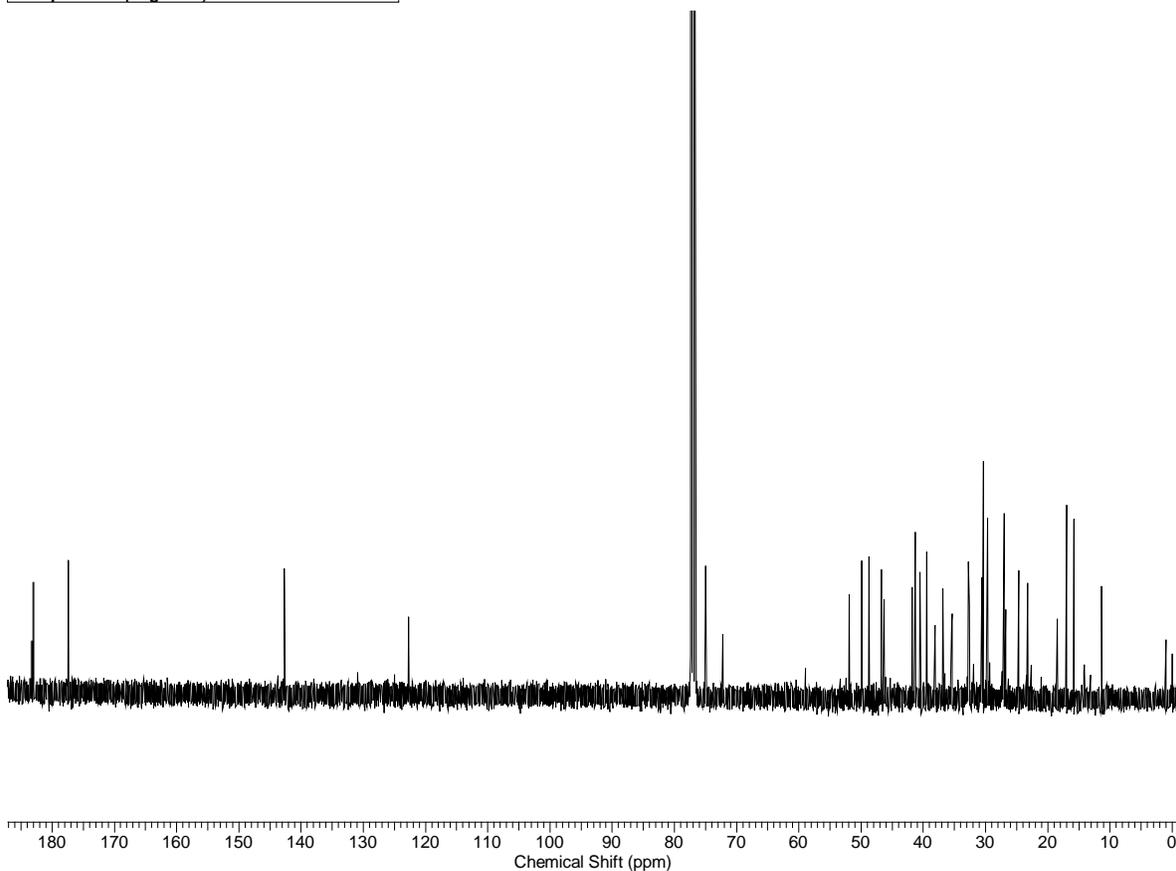
Acquisition Time (sec)	1.7465	Comment	ROM016/CD3OD/13C		
Date	Jul 14 2008				
File Name	D:\DIONAEA MUSCIPULA\DOCTORADO_CHILE\PB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM016_20080711_02				
Frequency (MHz)	75.50	Nucleus	13C	Number of Transients	5000
Original Points Count	32953	Points Count	65536	Pulse Sequence	dept135
Solvent	METHANOL-D4	Sweep Width (Hz)	18867.92	Temperature (degree C)	29.000



Espectros RMN para derivado 4a

13C RMN derivado 4a

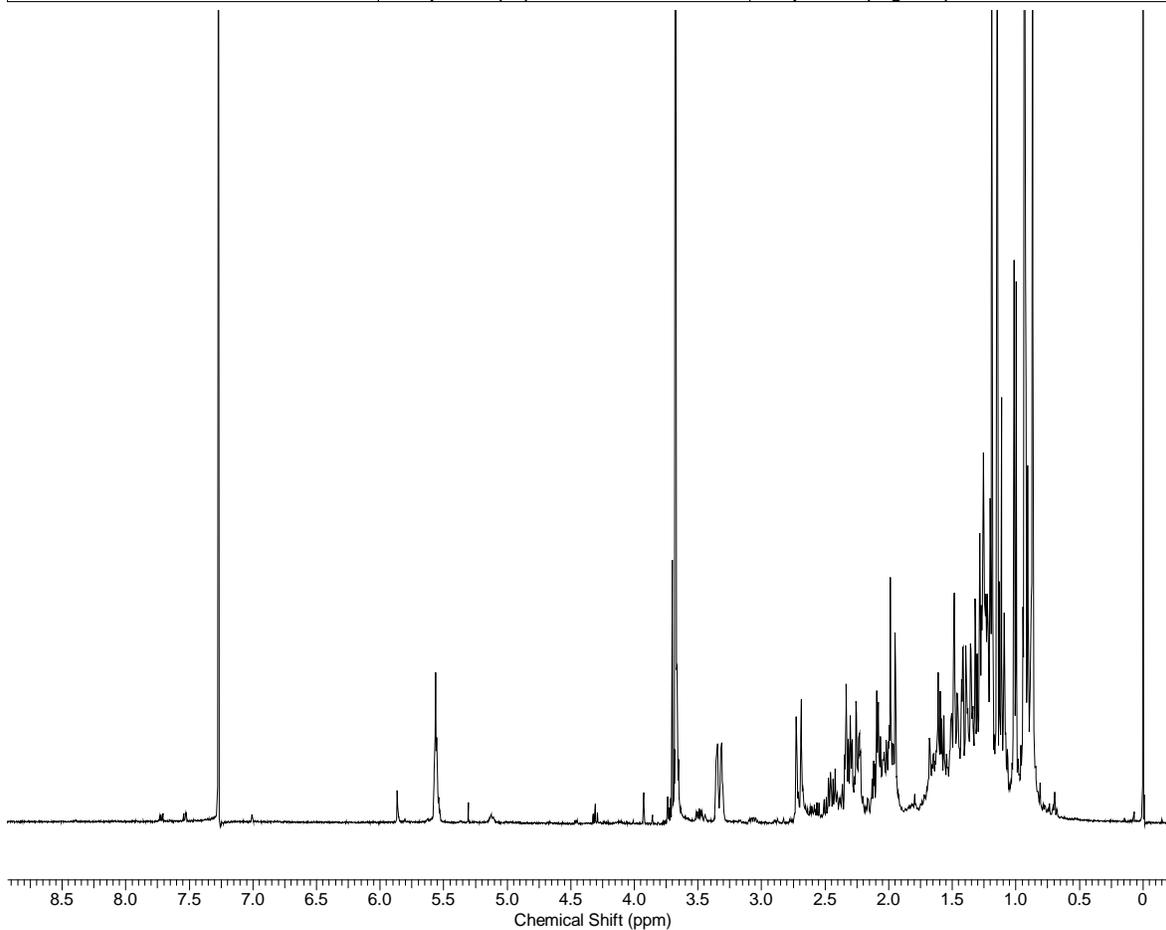
Acquisition Time (sec)	1.3566	Comment	GLF037_p/CDCl3/13C
Date	Jul 21 2008		
File Name	D:\DIONAEA MUSICIPULA\DOCTORADO_CHILE\PB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM018-037sin_bidimensionales\ROM018-037sin bidimensionales\ROM037_p		
Frequency (MHz)	100.57	Nucleus	13C
Number of Transients	10000	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	s2pul
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	24154.59
Temperature (degree C)	28.000		



Espectros RMN para derivado 4b

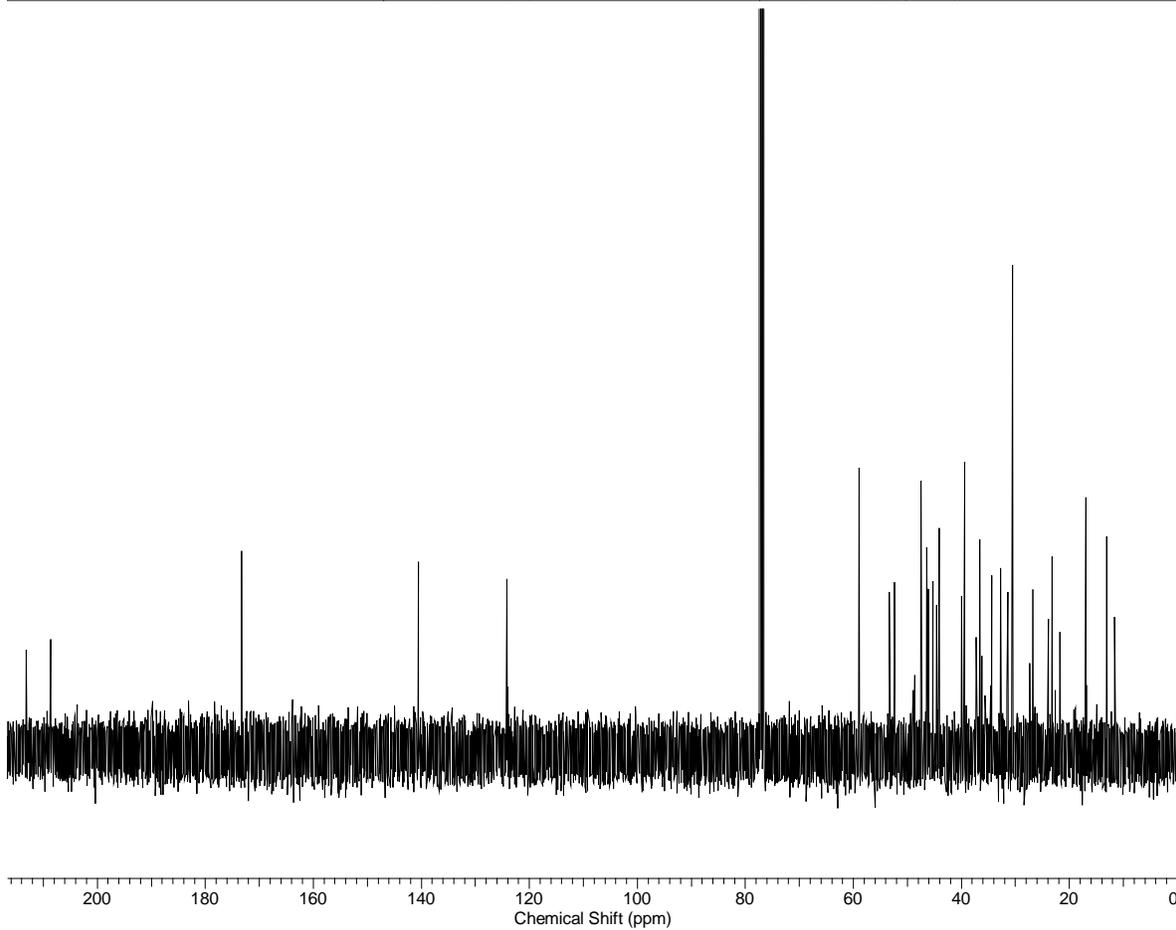
1H RMN compuesto 4b

Acquisition Time (sec)	4.0960	Comment	ROM037_ap/CDCl3/1H		
Date	Jul 21 2008				
File Name	D:\DIONAEA MUSCIPULA\DOCTORADO_CHILE\IPB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM037_todo\ROM037_ap				
Frequency (MHz)	399.93	Nucleus	1H	Number of Transients	40
Original Points Count	26206	Points Count	32768	Pulse Sequence	s2pul
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	6397.95	Temperature (degree C)	28.000



13 C RMN_derivado 4b

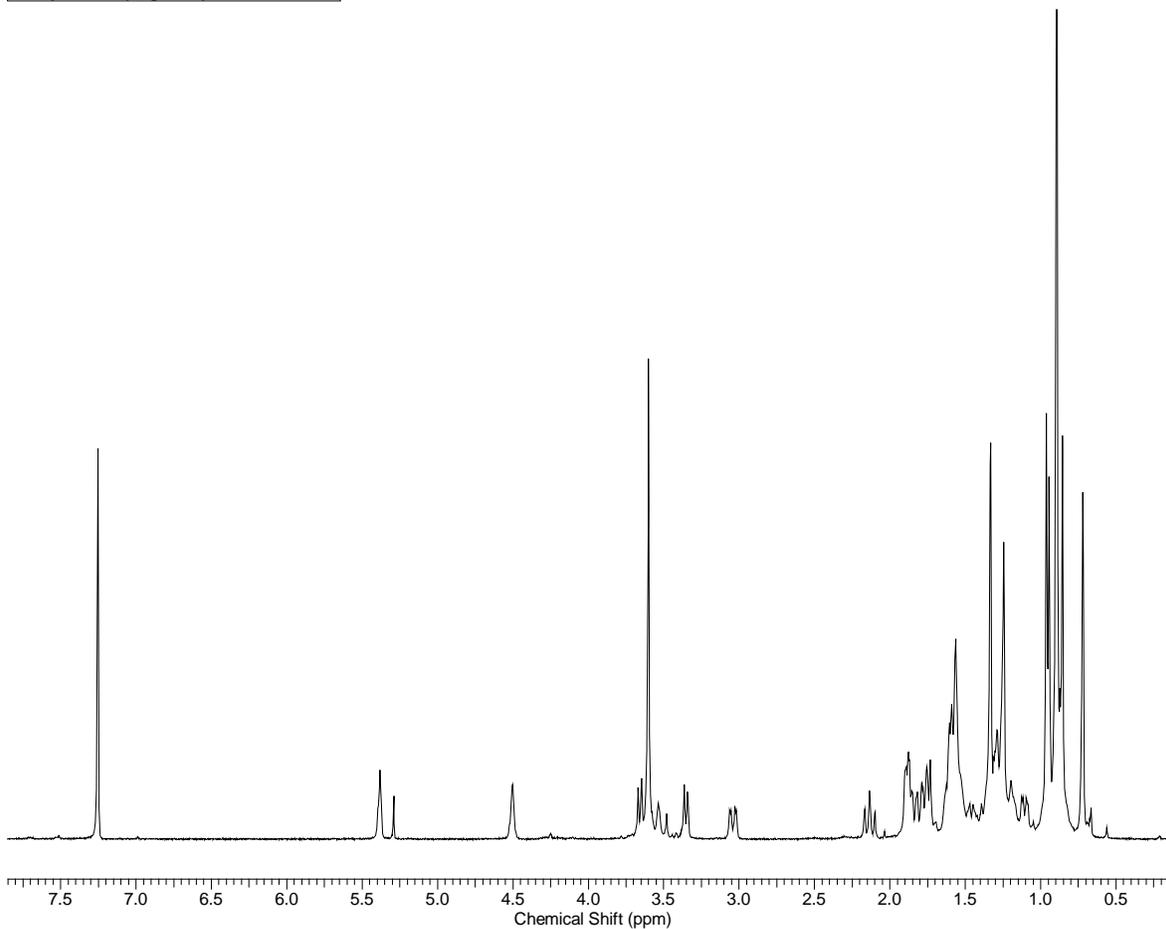
Acquisition Time (sec)	1.3566	Comment	ROM037_ap/CDCI3/13C		
Date	Jul 21 2008				
File Name	D:\DIONAEA MUSCIPULA\DOCTORADO_CHILE\PB_Halle_ALEMANIA_2008\NMR\ROM037_todo\ROM037_ap				
Frequency (MHz)	100.57	Nucleus	13C	Number of Transients	10000
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	s2pul
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	24154.59	Temperature (degree C)	28.000



Espectros RMN para derivado 5

1H RMN _derivado 5

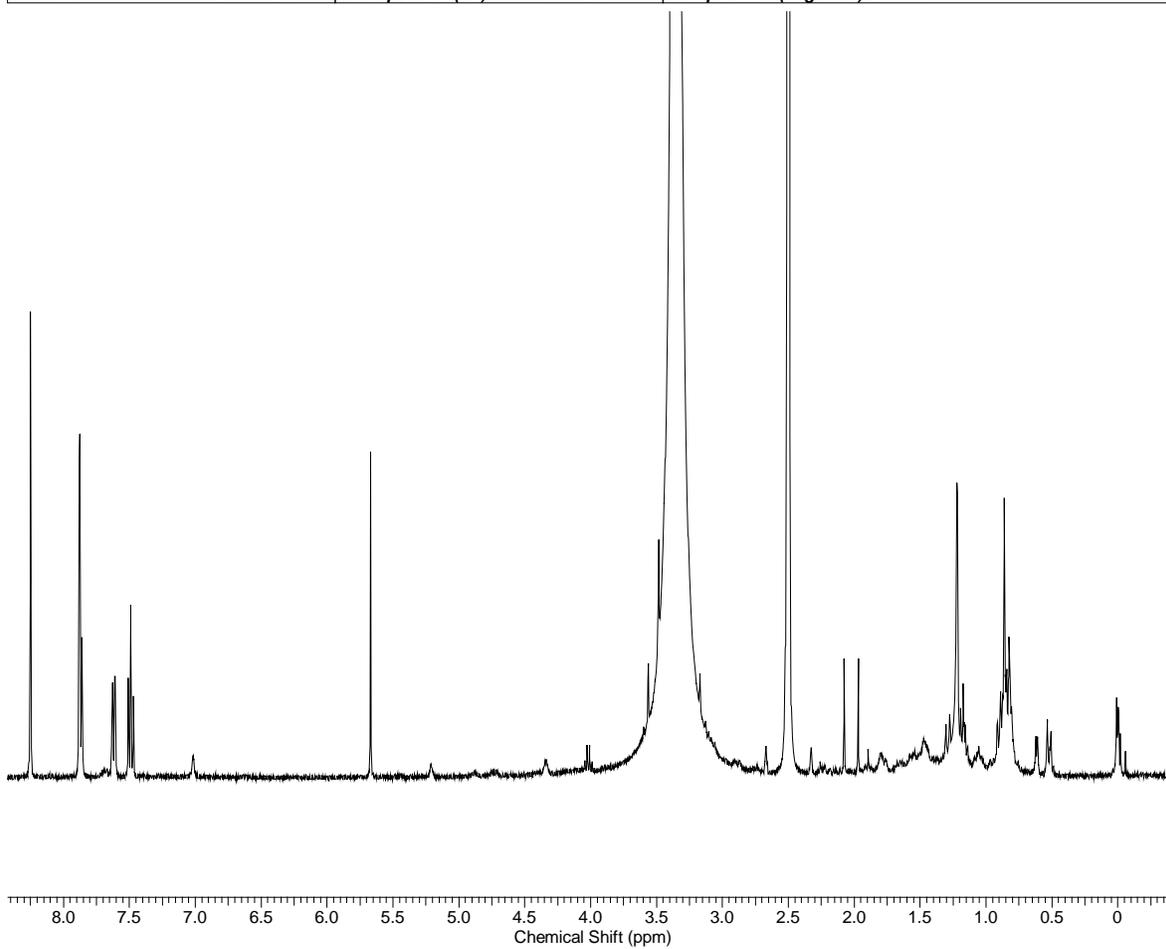
Acquisition Time (sec)	2.7329	Date	29 Jul 2009 14:08:50		
File Name	C:\Documents and Settings\Maite\Desktop\ROM-036_001001r				
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	1H	Number of Transients	32
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Solvent	CHLOROFORM-D		Sweep Width (Hz)	5995.20	
Temperature (degree C)	27.000				



Espectros RMN para derivado 6

1H RMN_derivado 6

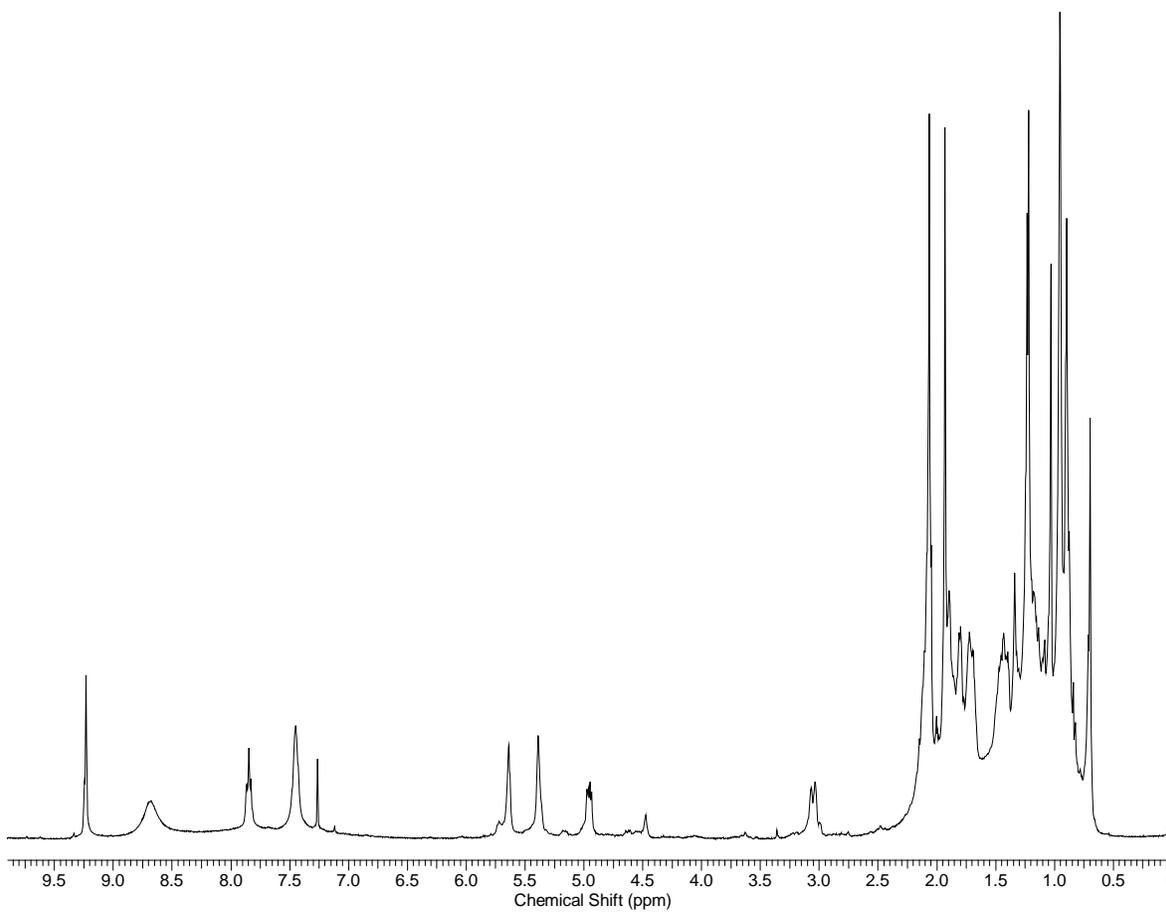
Acquisition Time (sec)	2.7329	Date	04 Aug 2009 19:22:48		
File Name	C:\Documents and Settings\Maite\Desktop\ROM-025_001001r				
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	1H	Number of Transients	48
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	5995.20	Temperature (degree C)	27.000



Espectros para derivado 9

1H RMN compuesto 9

Acquisition Time (sec)	2.7329	Comment	Imported from UXNMR.		
Date	19 Jun 2009 10:32:10				
File Name	C:\Documents and Settings\Maite\Desktop\ROM030_001001r		Frequency (MHz)	400.13	
Nucleus	1H	Number of Transients	8	Original Points Count	16384
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D
Sweep Width (Hz)	5995.20	Temperature (degree C)	27.000		



13C RMN compuesto 9

Acquisition Time (sec)	1.3664	Comment	Imported from UXMNR.
Date	19 Jun 2009 11:02:22		
File Name	C:\Documents and Settings\Maite\Desktop\ROM030_002001r	Frequency (MHz)	100.61
Nucleus	13C	Number of Transients	512
Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Sweep Width (Hz)	23980.81	Temperature (degree C)	27.000
		Original Points Count	32768
		Solvent	CHLOROFORM-D

