

**DESCUBRIMIENTO DE UNA FRACCIÓN QUÍMICA A PARTIR DE HOJAS Y
RAÍCES DE *Cecropia angustifolia* CON POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE 11 β -
HSD1.**

Vanitty López Aristizábal

Universidad Icesi
Facultad de Ciencias Naturales
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Programa de Química Farmacéutica
Cali
2018

**DESCUBRIMIENTO DE UNA FRACCIÓN QUÍMICA A PARTIR DE HOJAS Y
RAÍCES DE *Cecropia angustifolia* CON POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE 11 β -
HSD1.**

Vanitty López Aristizábal

Trabajo de grado para optar al título de pregrado en
Química Farmacéutica

Tutor

Guillermo León Montoya, PhD.

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales

Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Programa de Química Farmacéutica

Cali

2018

AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II



APROBADO POR:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "W. León Montoya", written over a horizontal line.

Director del Proyecto: Guillermo León Montoya

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Gustavo Adolfo Gutiérrez", written over a horizontal line.

Evaluador: Gustavo Adolfo Gutiérrez

TABLA DE CONTENIDO

DESCUBRIMIENTO DE UNA FRACCIÓN QUÍMICA A PARTIR DE HOJAS Y RAÍCES DE <i>Cecropia angustifolia</i> CON POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE 11 β -HSD1	6
1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1. Diabetes: Situación Actual.....	8
2.2. Conceptualización Sobre la Diabetes.....	9
2.3. Enzima 11 β Hidroxiesteroide Deshidrogenasa y Efectos sobre la Diabetes.....	10
2.4. Plantas del Género <i>Cecropia</i>	11
2.5. Evaluación Enzimática: Producción de Cortisol Determinada por Fluorescencia Homogénea Resuelta en el Tiempo.....	13
3. METODOLOGÍA	15
3.1. Material Vegetal.....	15
3.2. Hojas	16
3.2.1. Tratamiento de Hojas	16
3.2.2. Extracción de Hojas	16
3.2.3. Evaluación de Extractos de Hojas.....	17
3.3. Raíces	18
3.3.1. Tratamiento de Raíces.....	18
3.3.2. Extracción de raíces en planta piloto de extracción	18
3.3.3. Fraccionamiento de extracto de raíz	19
3.3.4. Selección de fracciones.....	20
3.4. Ensayo Enzimático.....	21
3.5. Tratamiento de Datos	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. Hojas	25
4.2. Raíces	27
4.2.1. Resultados del <i>Fraccionamiento 1</i>	30
4.2.2. Resultados del <i>Fraccionamiento 2</i>	33

4.3. Ensayo Enzimático.....	36
5. CONCLUSIONES	43
ANEXOS	45
AGRADECIMIENTOS	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

DESCUBRIMIENTO DE UNA FRACCIÓN QUÍMICA A PARTIR DE HOJAS Y RAÍCES DE *Cecropia angustifolia* CON POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE 11 β -HSD1.

1. RESUMEN

La diabetes es un problema de salud que afecta la población mundial. Entre los tipos de diabetes se encuentra la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), que se caracteriza por la falta de respuesta a insulina por parte de las células. El cortisol, genera un impacto negativo en la enfermedad pues favorece los procesos catabólicos en el cuerpo, aumenta la hiperglicemia, favorece la resistencia a la insulina y estimula diferenciación de adipocitos. La enzima 11- β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1) cataliza la reducción de cortisona a cortisol, lo que asiste la enfermedad. En este contexto, este trabajo experimental pretende continuar con la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento para la DM2 a través del descubrimiento de inhibidores de 11 β -HSD1. Esta investigación centra su atención en *Cecropia angustifolia*, teniendo en cuenta la evidencia en plantas de este mismo género *Cecropia* como fuente de metabolitos secundarios de tipo triterpeno pentacíclico (PT), un núcleo químico de interés en el desarrollo de inhibidores de la 11 β -HSD1. Con la información que se obtenga de *Cecropia angustifolia*, se busca ampliar información sobre las especies del género que pueden utilizarse como potenciales inhibidores de la enzima. En el proyecto se realizó una extracción de hojas con diferentes solventes que cubrían un amplio rango de polaridades incluyendo tantos metabolitos de la planta como fuese posible. Teniendo en cuenta reportes previos de *Cecropia telenitida*, el principal reto de este trabajo experimental fue descubrir perfiles metabólicos similares pero en la especie *Cecropia angustifolia*. Sobre los perfiles, se obtuvieron unos muy similares con las fracciones de raíces, más no de hojas. Los extractos de hojas y fracciones seleccionadas se evaluaron en un ensayo enzimático, basado en la cuantificación de cortisol empleando Fluorescencia Homogénea Resuelta en el Tiempo (HRTF). Los resultados del ensayo enzimático aunque fueron inválidos debido a

errores procedimentales, su perfeccionamiento y evaluación será realizada por estudiantes de posgrado y futuros trabajos de proyecto de grado.

Palabras clave: *Cecropia angustifolia*, *Cecropia telenitida*, diabetes Mellitus Tipo 2, 11B-HSD1, inhibición, triterpenos pentacíclicos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Diabetes: Situación Actual.

La diabetes es una grave enfermedad que implica un enorme problema de salud pública. Según la OMS, en los últimos años se ha aumentado el número de personas que padecen esta enfermedad y según las estadísticas, a nivel global en el 2014 hubo 422 millones de adultos con diabetes. La diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es el tipo que predomina entre los casos de diabetes representando una cifra del casi 90% de los casos, siendo esta exclusiva de los adultos hasta hace algunos años, pero que ahora también ha involucrado a menores (OMS, 2016). De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF), en el mundo un 8.3% de la población padece diabetes y se espera que se alcance un número de casos mayor a 592 millones en los próximos 25 años. En Sur y Centro América, los dos países con el número más alto de personas diagnosticadas con diabetes son Brasil (con 11.9 millones) y Colombia (con 2.13 millones) (Vargas-Uricoechea & Casas-Figueroa, 2015). La enfermedad lleva al paciente a una serie de complicaciones que deterioraran su estado de salud, al punto que puede conllevar a la muerte. Además de generar pérdidas humanas, tiene repercusiones económicas importantes para el sistema de salud, reflejado por los altos costos de la insulina y sus análogos como tratamientos de la enfermedad en una frecuencia de uso crónico (OMS, 2016). Se han realizado estudios para conocer el costo de diabetes, uno de ellos siendo del doctor Martín Romero, economista en salud. Los principales hallazgos del estudio fue que una hipoglicemia severa puede costar al sistema 2.2 veces el promedio de unidad de pago por capacitación UPC, hipoglicemia moderada 0.5 veces UPC y por hospitalización 1UPC, lo que lleva a un costo de 562.5 dolares de paciente por año (Colombia, 2018). Factores como estos motivan al descubrimiento de tratamientos alternativos, en los que la accesibilidad a los medicamentos supere las barreras económicas, así como la gestión de programas de prevención ante la enfermedad.

2.2. Conceptualización Sobre la Diabetes.

Para entender la enfermedad, es clave tener claro cómo se da el control glicémico en el cuerpo. La glucosa es fuente de energía para el cuerpo humano, especialmente la del cerebro, pues es uno de los nutrientes más importantes que requiere para cumplir sus funciones. El cuerpo humano ha desarrollado estrategias para su control y así, se mantenga en niveles constantes dentro del rango de concentración óptimo. Es de esta manera que el cuerpo genera reservas de glucosa en los momentos en que no se necesitan cantidades adicionales, que le permiten mantener la homeostasis. Esta regulación se logra con la hormona insulina, que se libera con la detección de aumento de glucosa en sangre y viceversa. La insulina controla el metabolismo intermediario y tiene efectos, principalmente, en hígado, músculo y tejido adiposo. La hormona conserva la glicemia constante por la captación y almacenamiento de glucosa por parte de las células cuando sus niveles se aumentan. El efecto global es la disminución de glicemia en el cuerpo (Rang, Ritter, Flower, & Henderson, 2016).

En este sentido, la diabetes es una enfermedad que se caracteriza por alteraciones metabólicas, produciendo así una hiperglicemia marcada, debido a una deficiencia de insulina o una resistencia a la misma. Esta patología tiene muchas variantes, sin embargo, se suele clasificar en mayor proporción en diabetes tipo 1, tipo 2 y diabetes gestacional. La diabetes tipo 1 (DM1) (insulinodependiente) involucra la destrucción de células β del páncreas por procesos autoinmunes, que tiene como consecuencia una disminución notable en la producción de insulina, lo que se traduce en una incapacidad de generar la respuesta regulatoria necesaria. Por otro lado, DM2 (no insulinodependiente) es el tipo que más se presenta en la población y se relaciona con la resistencia a la insulina. Sobre DM2, se sabe que es un trastorno heterogéneo, lo que quiere decir que implica daños genéticos que contribuyen a la resistencia de insulina, así como una relativa deficiencia a insulina comparada con la absoluta deficiencia de la DM1. La resistencia a insulina se puede definir como una falta de respuesta de los tejidos en presencia de insulina y la falta de captación de glucosa en sangre en presencia de la misma. Los pacientes con DM2, en su mayoría, se caracterizan por la obesidad que presentan; a medida que el tejido adiposo aumenta, la

resistencia a insulina se hace más marcada. Se tiene defectos en los receptores insulínicos en cuanto a su concentración y afinidad, pero estudios han generado una de muchas hipótesis que sugieren que en la mayoría de casos la resistencia no se da por falta de afinidad con la insulina, sino más bien un problema en la señalización intracelular (Gardner & Shoback, 2012).

2.3. Enzima 11 β Hidroxiesteroide Deshidrogenasa y Efectos sobre la Diabetes.

La enzima 11 β hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β -HSD) desempeña un papel característico sobre la enfermedad y para efectos de comprensión se ampliará un poco el concepto del cortisol que es a quien la enzima regula. El cortisol es el principal glucocorticoide del ser humano y está involucrado en la regulación metabólica, inmune y cardíaca ante los estímulos de estrés. Permite una homeostasis, sin embargo, su sobreactivación lleva a una carga “alostática”. Las concentraciones elevadas se pueden traducir en obesidad, dislipidemia, hipertensión, mala regulación de la glucosa, lo que apoya la idea de que la alta acción del cortisol favorece al síndrome metabólico (Anderson & Walker, 2013). El cortisol tiene un papel protagónico en la diabetes: en el hígado contribuye a la gluconeogénesis por la inducción de fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK); en el tejido adiposo se promueve la diferenciación de adipocitos; en el páncreas una sobreexpresión de receptores de glucocorticoides en los islotes pancreáticos, disminuye la secreción de insulina y una señalización de insulina deteriorada en consecuencia (Tomlinson & Stewart, 2005). Es por lo anterior que el cortisol se ha convertido en una hormona de especial interés para los científicos, los cuales se han centrado en investigar su mecanismo para encontrar tratamientos alternativos a la DM2.

La 11 β -HSD regula las cantidades de cortisol en el cuerpo, para que este se pueda unir a los receptores de glucocorticoides y así generar su efecto en diferentes órganos. Existen dos isoenzimas, la 11 β -HSD2 se encuentra principalmente en los riñones y colon, la cual se encarga de convertir el cortisol como glucocorticoide activo al glucocorticoide inactivo cortisona, con actividad oxidasa. Esta isoenzima previene la ocupación del cortisol en los

receptores de glucocorticoides, evitando que se generen los efectos que favorecen la enfermedad. Por otro lado, la isoenzima tipo 1 se expresa en el hígado y el tejido adiposo, es bidireccional y dependiente del cofactor NADPH. Sin embargo, la 11 β -HSD1 tiene una marcada actividad reductasa demostrada en estudios *in vivo*, lo que implica una gran contribución a la regeneración del glucocorticoide inactivo al activo, cortisol (Tomlinson & Stewart, 2005). La unidireccionalidad característica de los estudios *in vivo* está explicada por la orientación que tiene el sitio activo de la enzima hacia el interior del retículo endoplásmico. Allí la enzima tiene una fuente de hexosa-6-fosfato deshidrogenada, que produce NADPH en su papel catalítico y mantiene la actividad reductasa de la enzima (Banhegyi, Benedetti, Fulceri & Senesi, 2004)

En los últimos años, la comunidad científica ha investigado esta enzima y sus maneras de inhibirla, para que de esta manera se disminuya la concentración de cortisol y prevenir efectos en la enfermedad de diabetes. En estos avances se ha logrado encontrar inhibidores no selectivos, es decir, sustancias que inhiben las dos isoenzimas, como lo es la molécula carbenoxolona. Sin embargo, los efectos adversos que se presentan a partir de esta no-selectividad conlleva a descartar estas sustancias como nuevos tratamientos. Es así como se resalta la importancia del descubrimiento de inhibidores selectivos para la 11 β -HSD1. Desde el 2002 se han registrado alrededor de 30 patentes con moléculas selectivas para la isoenzima 1 (Tomlinson & Stewart, 2005). Recientes estudios han de mostrado que existen moléculas de tipo triterpeno pentacíclico con actividad inhibitoria sobre la enzima 11 β -HSD1, lo que ha aumentado el interés en la investigación sobre estas sustancias (Mosquera Salcedo, 2017).

2.4. Plantas del Género *Cecropia*.

El género *Cecropia* pertenece a los géneros neotropicales y se compone de alrededor 61 especies, ubicándose principalmente en áreas húmedas a una elevación de 2600m. Se encuentra ubicado en el continente americano, desde el sur de México hasta el norte de Argentina (Berg & Franco-Roselli, 2005). En el género de plantas *Cecropia* se ha evidenciado la presencia de triterpenos pentacíclicos (PT) y a su vez, las especies vegetales

de este género han sido utilizadas por la medicina tradicional Latino Americana para tratar enfermedades metabólicas incluyendo la diabetes (Mosquera, Panay, & Montoya, 2018). A continuación, se describen algunas de las especies del género y algunos resultados de estudios que reflejan sus potenciales efectos ante enfermedades, como la diabetes.

Cecropia telenitida es una especie recientemente investigada, y sus resultados son prometedores. En esta planta se han descubierto sustancias con potencial utilidad en tratamientos a ciertas enfermedades. El ácido Serjánico, un PT, ha demostrado ser una molécula con actividad hipoglucemiante y un reductor de la expresión de mRNA de factores pro-inflamatorios en tejido adiposo, en estudios con ratones resistentes a la insulina (Balcazar, Tabares-Guevara, Gonzalez, Ramirez-Pineda, & Montoya Peláez, 2014). Otra molécula encontrada ha sido el ácido Espergulagénico A, que muestra un poder inhibitorio en la producción de óxido nítrico en la respuesta inflamatoria de células dendríticas estimuladas con lipopolisacáridos (Montoya Peláez, Sierra, Alzate, Holzgrabe, & Ramirez-Pineda, 2013). Se ha hecho un estudio sobre la composición de las raíces de *Cecropia telenitida* y se ha evidenciado la presencia de triterpenos pentacíclicos con capacidad de inhibir la enzima 11 β -HSD1. En su estudio “*Triterpenos pentacíclicos de Cecropia telenitida pueden funcionar como inhibidores de la 11 β -HSD1*” Mosquera, Montoya y Panay realizaron un screening de la biblioteca química obtenida a partir de las raíces de esta planta que incluye 125 fracciones químicas purificadas, y donde una de ellas exhibió un 82% de inhibición de formación de cortisol sobre 11 β -HSD1 en un ensayo *in vitro*. Esta fracción tiene el nombre de CD16 y esta nomenclatura se seguirá utilizando de ahora en más en el presente trabajo. De esta misma fracción se aisló y purificó una de las moléculas a la que se nombró ácido Isoyarúmico, y que efectivamente presentaba una estructura de tipo PT, lo que reforzó la hipótesis de que las moléculas con núcleo químico PT de *Cecropia telenitida* son las responsables de la inhibición de 11 β -HSD1 (Mosquera et al., 2018).

Por otro lado, se han hecho estudios en México sobre las hojas de la *Cecropia obtusifolia*, la cual se reporta como una planta de uso común en la medicina tradicional por su efecto hipoglucémico. En el estudio se evaluó en efecto en una muestra de 12 pacientes con diabetes

tipo 2, que por 32 semanas se les suministró un extracto acuoso de las hojas de la planta que generó un consecuente efecto de disminución de glucosa en sangre. Es así, como se logró evidenciar un efecto hipoglucémico en el extracto acuoso de la hoja de *Cecropia obtusifolia*, sin efectos adversos y sin intervenir en la estimulación en la secreción de insulina (Revilla-Monsalve, Andrade-Cetto, Palomino-Garibay, Wiedenfeld, & Islas-Andrade, 2007).

Cecropia angustifolia es una especie del género *Cecropia* de la que se tiene poca información sobre su composición química. La planta está distribuida en el área que comprende desde Guatemala (probablemente desde México) a las montañas costeras de Venezuela y a través de la cadena montañosa de los Andes. Su hábitat consiste principalmente en los bosques submontanos húmedos a una elevación de 800 a 2400m. En Colombia se ha reportado su presencia en diferentes departamentos incluyendo a Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Chocó, Huila, Meta, Norte de Santander, Putumayo, Quindío, Valle del Cauca, entre otros (Berg & Franco-Roselli, 2005). Los datos sobre *Cecropia angustifolia* no va más allá de colectas, descripciones botánicas y taxonómicas, y no se cuenta con información suficiente que incluya esta planta en el grupo de especies de *Cecropia* con efectos benéficos sobre la enfermedad de DM2. Con base a esto, resulta pertinente una investigación que profundice sobre aspectos metabólicos y posibles aplicaciones farmacológicas. Es así como el proyecto de investigación buscará identificar una fracción química a partir de hojas y raíces de *Cecropia angustifolia* como *Hit* inhibitorio sobre la enzima 11 β -HSD1, obteniendo extractos de material vegetal de sus hojas y raíces, fraccionando los extractos de raíz y analizando su capacidad inhibitoria sobre la enzima.

2.5. Evaluación Enzimática: Producción de Cortisol Determinada por Fluorescencia Homogénea Resuelta en el Tiempo.

La evaluación se llevará a cabo a través de reacciones de la enzima 11 β -HSD1 y las fracciones de raíz y extractos de hoja de *Cecropia angustifolia* cuyo perfil metabólico muestre alta similitud con los reportes previos del laboratorio de investigación. La Fluorescencia Homogénea Resuelta en el Tiempo (HTRF) será la técnica analítica utilizada

para la determinación cuantitativa de producción de cortisol en el ensayo enzimático que evidencie si las fracciones presentan potencial farmacológico.

Esta técnica hace uso de la tecnología de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) con mediciones en tiempo resuelto (TR), donde se medirán señales generadas a partir de la interacción entre dos moléculas, que emiten energía de resonancia fluorescente al estar próximas entre sí. La tecnología FRET mide la transferencia de energía entre un fluoróforo donante, cuya emisión estimula la emisión de fluorescencia de un sustrato modificado. Cada uno de estos fluoróforos se acoplan a las biomoléculas a estudiar, y en el momento en que se presente una interacción entre estas, habrá una transferencia de energía entre los fluoróforos debido a su proximidad (Mosquera Salcedo, 2017).

La empresa Cisbio ha desarrollado un método de cuantificación de cortisol donde se utiliza esta técnica de HTRF. El método es un inmunoensayo competitivo donde el cortisol producido por las células y el cortisol deuterado (Cortisol D2, que es uno de los reactivos incluidos en el kit del ensayo) compiten para unirse a un anticuerpo monoclonal de cortisol (Anticortisol) que ha sido marcado con Europium-Criptato. El cortisol D2 y el Anticortisol permanecen unidos emitiendo una señal de fluorescencia, esto debido a que en proximidad emiten las señales respectivas. Cuando el cortisol es producido por la enzima 11β -HSD1, compete con cortisol D2 para poderse unir al Anticortisol. Es así como, al desplazar el cortisol D2, la señal de fluorescencia se reduce y la señal específica resulta ser inversamente proporcional a la concentración de cortisol en la muestra (Cisbio, 2016). A continuación, en la **Figura 1** se ilustra los explicado anteriormente.

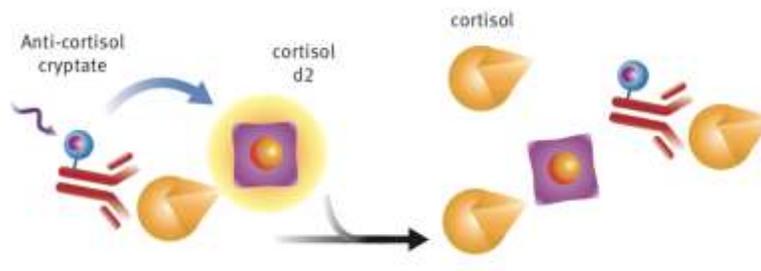


Figura 1. Funcionamiento de HTRF (Cisbio, 2016)

3. METODOLOGÍA

Para lograr los objetivos propuestos se establecen diferentes etapas, y la metodología en general se basa en la realizada por Mosquera en su tesis de maestría “*Biblioteca química de moléculas derivadas de raíces de Cecropia telenitida y su evaluación como fuente de moléculas inhibidoras de la enzima 11B-HSD1*” (Mosquera Salcedo, 2017).

3.1. Material Vegetal

La recolección de hojas y raíces de *Cecropia angustifolia* fue realizada en el departamento del Valle del Cauca (Colombia) el 23 de Junio del 2018. Se contó con el permiso otorgado a la Universidad Icesi por parte del Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, que se encuentra vigente en la Resolución 0525 del 20 de Mayo del 2016, “*por el cual se otorga el permiso marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial y se toman otras determinaciones*” (Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2016) y en la Resolución 0763 del 9 de Mayo del 2018, “*por la cual se otorga el acceso a recursos genéticos y productos derivados para el proyecto denominado ‘Programa para el Estudio, Uso y Aprovechamiento Sostenible de la Biodiversidad Colombiana’*” (Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2018).

La colecta se realizó específicamente en los alrededores de pueblo Pance, ubicado al sur de la ciudad de Cali (3°19'55.21"N, 76°38'15.12"W). Para esta actividad, se contó con el acompañamiento del profesor Guillermo León Montoya, director del proyecto de investigación y de Juan Camilo Sánchez, curador del herbario de la Universidad Icesi. Además, en el proceso de identificación de la planta realizado por Juan Camilo Sánchez y Laura Toro González (esta última especialista de *Cecropia* para Colombia), se generó voucher de colección No. 1636 que se puede encontrar en el herbario de la Universidad (ver **Anexo 1**).

3.2. Hojas

3.2.1. Tratamiento de Hojas

El material vegetal se separó y se seleccionaron las hojas del espécimen. Se recolectó alrededor de 140 g de este órgano vegetal. Las hojas se secaron en el horno por 10 días a una temperatura de 45°C. Con esto se buscaba la eliminación de agua presente en las hojas. Para facilitar este proceso, pasado el tiempo de secado, se realizó una reducción de tamaño de partícula, de esta manera se logró aumentar el área superficial de contacto para que hubiese un mejor desempeño en la extracción.

3.2.2. Extracción de Hojas

Se realizó una extracción por maceración que consiste en el contacto del material vegetal con el solvente por varios días. Cabe notar que con este método, la extracción puede llegar a un nivel de equilibrio de concentraciones entre el solvente y el material, por lo que en este punto la velocidad de extracción baja. Es preciso que alcanzado este equilibrio, haya una renovación del solvente de extracción, para que así se renueve el gradiente de concentración y aumente la velocidad de paso de sustancias desde el material vegetal al solvente.

Las sustancias extraídas son de polaridad similar a la del solvente utilizado, y con el fin de obtener la mayor cantidad de compuestos, se buscó cubrir un amplio rango de polaridades. Es así como la extracción empezó con Hexano, posteriormente con diclorometano (DCM)/acetato de etilo (AcoEt) (1:1), luego con AcoEt, AcoEt/metanol (Met) y finalmente Metanol. Siguiendo este orden, se depositaron 140g de hojas trituradas en un frasco Erlenmeyer de vidrio de 5L y se adicionó 3L de cada uno de los solventes. El material vegetal con el solvente se dejó en reposo por un día, pasado el tiempo se filtró el extracto y posteriormente, el filtrado se concentró en un rotavaporador marca Heidolph. Para asegurar el agotamiento del material, se realizaron 3 extracciones con cada uno de los solventes mencionados. En la **Figura 2**, se presenta un esquema de la etapa de extracción.

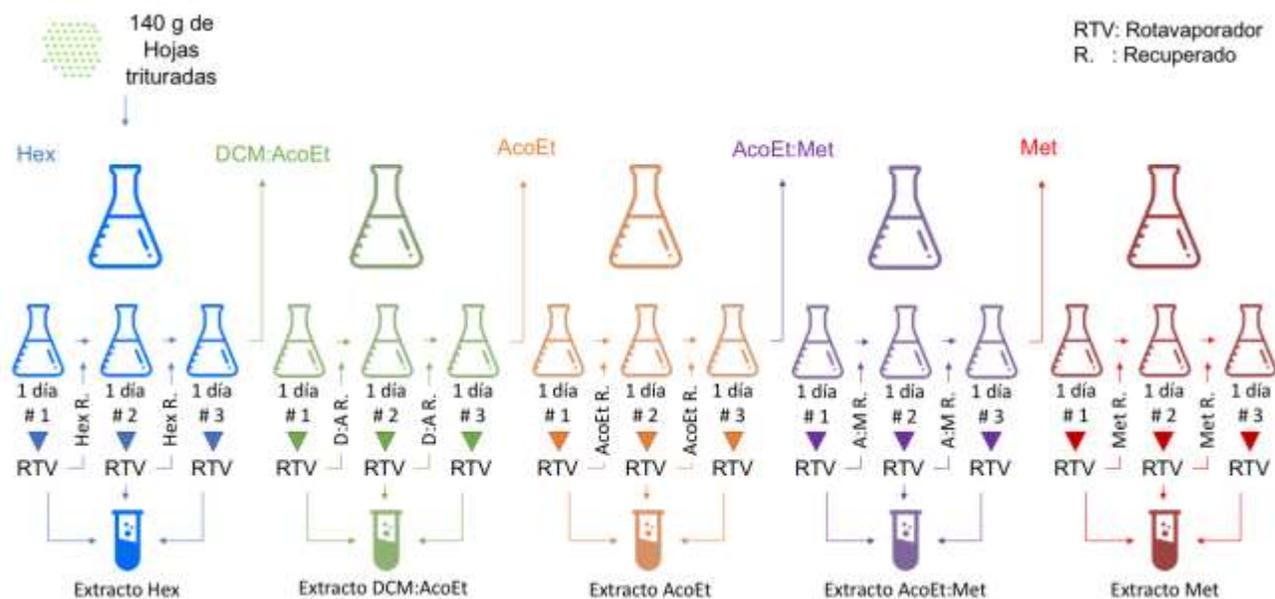


Figura 2. Esquema de la etapa de extracción de hojas.

A los extractos de hojas no se les realizó un posterior fraccionamiento, ya que al no tener evidencia previa alguna de componentes prometedores en las hojas de *Cecropia angustifolia*, no se justificaba el uso de grandes cantidades de solventes para este fin. Es por esta razón, que los extractos se llevaron al ensayo enzimático directamente, para evaluar la actividad enzimática que podrían tener sobre 11 β -HSD1.

3.2.3. Evaluación de Extractos de Hojas

Con el fin de realizar un análisis metabólico preliminar comparando los perfiles cromatográficos de triterpenos pentacíclicos encontrados en *Cecropia telenitida*, los extractos obtenidos de la hoja de *Cecropia angustifolia* se evaluaron por medio de TLC. A cada extracto se le asignó un carril en una placa cromatográfica, asignando además alguno de ellos para el estándar de la fracción CD16 de *Cecropia telenitida*, y los estándares de ácido Serjánico y Espergulagénico. CD16 es una fracción de moléculas de tipo triterpénico contenida en las raíces de *Cecropia telenitida*, que exhibió una actividad inhibitoria en estudios previos sobre 11 β -HSD1. El desarrollo cromatográfico consistió en una mezcla de DCM/AcoEt (1:1) y derivatización con el reactivo de vainillina-ácido sulfúrico. Los registros

fotográficos de la placas de TLC reveladas se realizaron en el equipo Amersham Imager 600 de la marca General Electrics. Las imagen respectiva corresponden a la **Figura 7**.

3.3. Raíces

3.3.1. Tratamiento de Raíces

El material vegetal se separó y se seleccionaron las raíces del espécimen. Las raíces se secaron en un horno por 10 días a una temperatura de 45°C aproximadamente. Así como en las hojas, lo que se buscaba era eliminar el agua que pudiese causar interferencia en los procedimientos de extracción posteriores. Terminado el secado, se realizó una disminución del tamaño de partícula pulverizando el material en una lijadora de disco convencional. El material vegetal recuperado de la pulverización fue de 1.44 Kg. La pulverización buscaba optimizar el proceso de extracción, aumentando el área de superficie de contacto con el solvente.

3.3.2. Extracción de raíces en planta piloto de extracción

El material vegetal pulverizado restante se llevo a la planta piloto de extracción. El solvente utilizado fue DCM/AcoEt en una proporción de 1:1. En una primera etapa, la extracción se hizo por 14 días, sin embargo, para agotar el material al nivel más alto posible, se renueva el solvente y se hace una nueva extracción por otros 14 días en una segunda etapa. Ambos extractos se juntaron, se filtraron y concentraron. En la **Figura 3**, se muestra un esquema sobre la extracción de raíces.

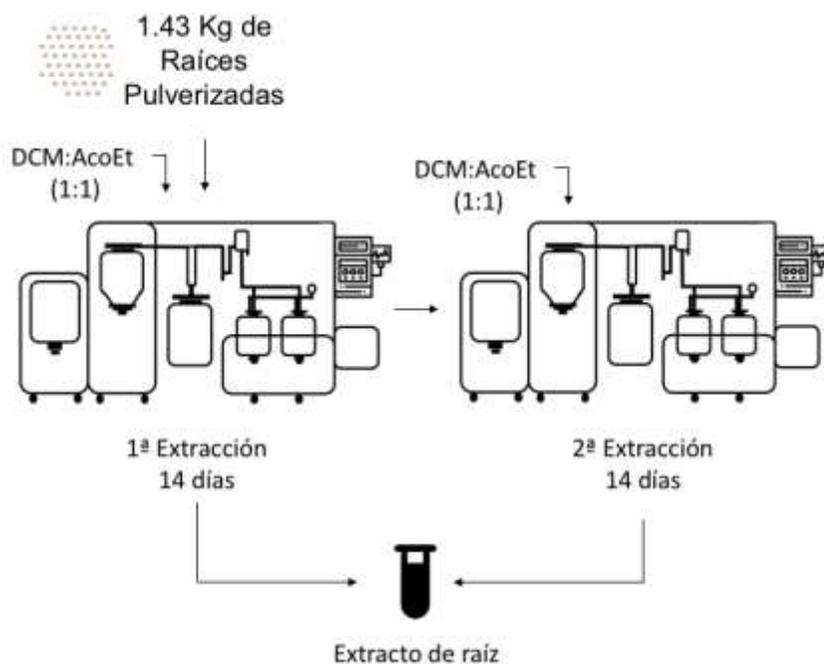


Figura 3. Esquema de la etapa de extracción de raíces.

3.3.3. Fraccionamiento de extracto de raíz

El extracto obtenido se fraccionó con ayuda del equipo de cromatografía preparativa de marca Biotage. En este caso, se utilizó una columna acoplada al equipo de 340 g, empacada con silica-gel KP de fase normal, con un tamaño de partícula de 60-200 μ m. Para depositar la muestra en el samplet (portamuestras de columna de fraccionamiento con silica-gel), el extracto se tuvo que dividir en dos partes iguales, pues se quería seguir el mismo protocolo planteado por Mosquera en su trabajo (Mosquera Salcedo, 2017). Es así como se realizaron 2 corridas distintas, a las que se les llamará *Fraccionamiento 1* y *Fraccionamiento 2*, respectivamente. La columna se hizo correr con una fase móvil aplicada en gradiente, donde se fue aumentando la polaridad de la misma. En este sentido, se empezó con DCM 100% hasta llegar a AcoEt 100%, y finalmente Met al 100%. Cabe aclarar que para el *Fraccionamiento 1* se utilizó una columna nueva, y que para el *Fraccionamiento 2* se utilizó la columna usada en *1*. En general, las condiciones de fraccionamiento del *Fraccionamiento 1* y *2* fueron iguales, y algunas de estas se presentan en la **Tabla 1**. El protocolo que se siguió

fue el mismo utilizado por Mosquera en su proyecto de investigación (Mosquera Salcedo, 2017).

Tabla 1. Condiciones de fraccionamiento

Cartucho	SNAP KP-Sil 340g
Flujo	200mL/min
Gradiente	100%DCM → 100% AcoEt. 100% Met
Volumen de Fracciones	100 mL
Detectores UV	200-300nm
Volúmenes de Columna	Equilibrio DCM-AcoEt → 2 100%DCM → 100% AcoEt. →13.8 100% Met → 5.8

Del *Fraccionamiento 1*, salen las *Fracciones 1* y del *Fraccionamiento 2*, salen las *Fracciones 2*. En la **Figura 4**, se muestra un esquema sobre el fraccionamiento de extracto de raíz.



Figura 4. Esquema sobre el fraccionamiento del extracto de raíz

3.3.4. Selección de fracciones

Las fracciones generadas en cada uno de los fraccionamientos se unieron en fracciones de 300 mL y se concentraron en el rotavaporador marca Heidolph. La fracción concentrada se colectaba en tubos de ensayo debidamente marcado con el nombre de las fracciones que contenía (ej. 1-3, 4-6, etc.). Al material de cada uno de estos tubos se les realizó un análisis cromatográfico con carriles comparativos de estándar de la fracción CD16 de *Cecropia telenitida*, estándar de ácido Serjánico y Espergulagénico. La fase móvil que se utilizó para

correr las placas fue DCM/AcoEt (1:1), y terminado el desarrollo cromatográfico, las placas se revelaron con el reactivo vainillina- ácido sulfúrico. Las fracciones que exhibieran un perfil similar a los de las sustancias de comparación se seleccionarían para el posterior ensayo enzimático. En la **Figura 5**, se muestra un esquema sobre la selección de fracciones de raíz.

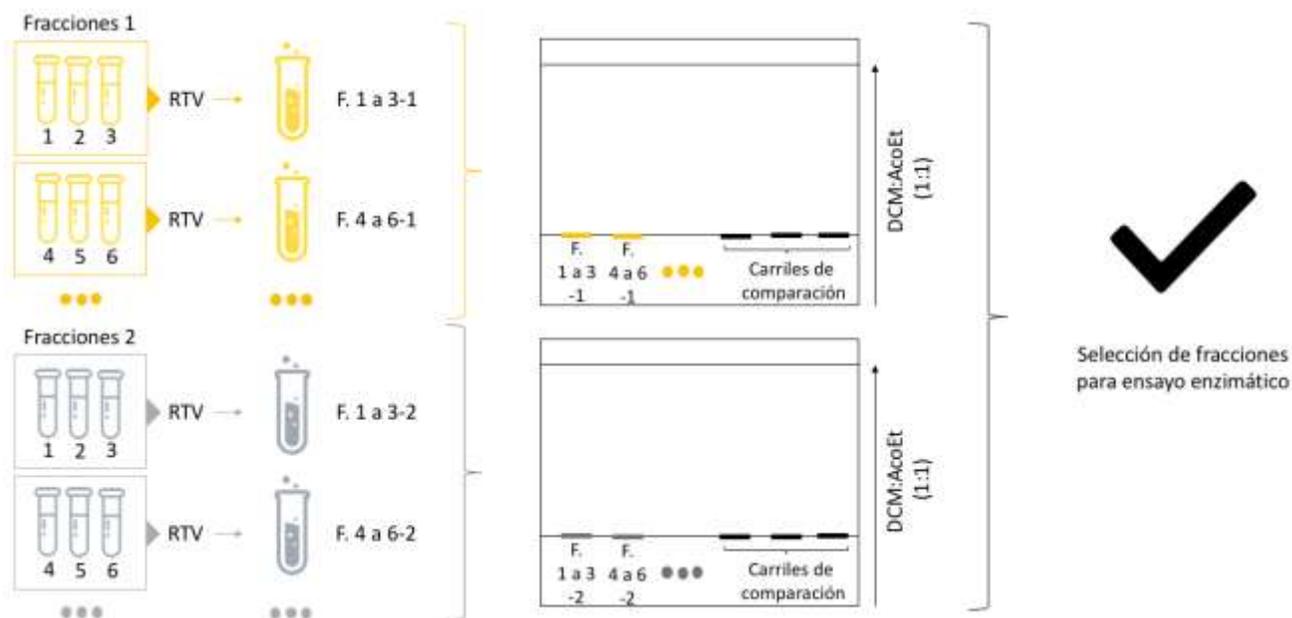


Figura 5. Esquema sobre la selección de fracciones de raíz.

3.4. Ensayo Enzimático

Con el fin de evaluar la actividad sobre la enzima 11β -HSD1 se preparan diferentes muestras para el ensayo enzimático. De las fracciones y extractos seleccionados en la etapa anterior se pesó 1mg, actividad que se realizó haciendo uso de los servicios que presta el Laboratorio de Instrumentación Química de la Facultad de Ciencias Naturales (LIQ).

Como se había mencionado anteriormente, se hizo uso del método de cuantificación de cortisol del *Cortisol kit* de la marca Cisbio. En este kit se usaron la fracciones seleccionadas y la enzima 11β -HSD1 para hacer la determinación de las fracciones que exhibían un efecto inhibitor teniendo en cuenta la cantidad de cortisol producida en el ensayo. Como fuente de enzima 11β -HSD1 se usó microsomas hepáticos humanos de la marca Sekisui- Xenotech.

Para poder proceder con el ensayo de inhibición, se debían corroborar en primer lugar cuales eran las condiciones óptimas de producción de cortisol para los microsomas. De esta manera, se aseguraría la buena función de los mismos y el correcto desempeño que tendrían en el ensayo. En este sentido, se hizo una primera evaluación donde se varió la cantidad de microsomas utilizados, el tiempo óptimo para incubar la reacción y el acoplamiento o no de una reacción de regeneración del cofactor NADPH. Se debe recordar que la enzima 11 β -HSD1 es dependiente del cofactor NADPH, que se puede añadir en un exceso o acoplar un sistema de regeneración del mismo. Esto se logra incorporando en la reacción la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), su sustrato glucosa 6 fosfato (G6P) y NADP⁺, que al activarse genera NADPH a partir del NADP⁺ (Mosquera Salcedo, 2017). Los factores y niveles variados se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 2. Factores y niveles de variación.

		Factores	
		Sistema de regeneración de NADPH	Volumen de microsomas utilizado (μ L)
Niveles	Acoplado	1	3
			6
		2	3
			6
		4	3
			6
	No Acoplado	1	3
			6
		2	3
			6
		4	3
			6

Con los resultados que se obtuvieron en esta evaluación, que se presentarán en la sección 4, se definió que el ensayo enzimático se debería realizar con el acoplamiento del sistema de

regeneración de NADPH , utilizando un volumen de 3 μL de microsomas a un tiempo de 3 horas.

Al tener las condiciones del ensayo claras, se procedió a realizar el ensayo enzimático. Las reacciones de los microsomas hepáticos humanos que contenían $11\beta\text{-HSD1}$ se prepararon mezclando 3 μL de microsomas, comercialmente disponibles a una concentración de 20 μg de proteína/ μL , con un buffer Tris- HCl (pH 7.0) a 20mM, 250 μM de NADPH, 200nM de cortisona, 2mM de G6P, 670 μM de NADP⁺, 10mM de MgCl_2 , 4 μL de G6PDH y 2 μL de inhibidores a 1ppm en un medio de DMSO, todo esto para llevarlo a un volumen final de 200 μL . Además de las reacciones de inhibición, se debió preparar una serie de controles que se enlista a continuación:

- Control negativo con todos los componentes de reacción excepto el inhibidor, NADP⁺ y NADPH
- Controles con DMSO sin inhibidor disuelto
- Control positivo de cortisol, donde la cortisona en la reacción es reemplazada por cortisol.
- Control de reacción enzimática, donde se aplicaron las mismas condiciones que en la reacción, pero no se añadió inhibidor alguno.
- Control de inhibición, donde se preparó la reacción con el inhibidor carbenoxolona disuelto en agua, en vez de DMSO. La concentración de carbenoxolona en reacción fue de 600nM.

Estas reacciones se incubaron por 3 horas a una temperatura de 37°C. Pasado este tiempo, se hizo una lectura utilizando el método de cuantificación de cortisol del *Kit Cortisol* de la marca Cisbio, que hace uso de la técnica analítica de HTRF. Para esta lectura, se preparó un plato de HTRF donde los pozos contendrían 10 μL de cada una de las reacciones con los inhibidores o controles correspondientes, 5 μL de Cortisol- D2 (aceptor) y 5 μL de Anticortisol- criptato (donador). Estos últimos son los reactivos de detección del HTRF. Además, se contaría con pozos para la construcción de la curva de calibración del cortisol, curva que se preparó siguiendo las indicaciones del protocolo del Kit de Cisbio, además del control negativo y

positivo sugerido en el mismo. A la curva y los controles adicionales se les debió hacer el mismo tratamiento con el cortisol-D2 y el Anticortisol.

La detección de cortisol con la técnica de HTRF en la metodología mencionada se realizó en el lector de microplacas Synergy H1 de marca Biotek. De acuerdo a las recomendaciones del proveedor, la lectura se extendió por 2 horas y los resultados de inhibición se analizaron como se muestra a continuación.

3.5. Tratamiento de Datos

Para analizar la inhibición del ensayo, se debió calcular el porcentaje de inhibición de cada una de las fracciones y extractos seleccionados. Para esto se hizo uso de la siguiente ecuación:

$$\%inhibición = 100 \left(1 - \frac{C_i - S_b}{C_0 - S_b} \right) \quad (1)$$

Donde C_i y C_0 representa la concentración de cortisol en la reacción con y sin inhibidor, respectivamente y S_b hace referencia a la concentración de cortisol en la reacción de control sin NADPH/NADP+. Se considera un *Hit* inhibitorio si este porcentaje es mayor al 73% tal y como lo reporta Mosquera, Montoya y Panay en su trabajo de investigación (Mosquera et al., 2018).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Hojas

Para la colecta del material vegetal se realizó un desplazamiento a Pueblo Pance en el departamento del Valle del Cauca. Las hojas se recolectaron y trituraron para obtener finalmente 140 g de hoja triturada de *Cecropia angustifolia*. Después de realizada la extracción, tal y como se indica en la **Figura 1**, se obtuvieron 5 extractos de la hoja. Los pesos se registran en la **Figura 6**, donde además se ilustra un poco el proceso que se siguió para llegar a los mismos.

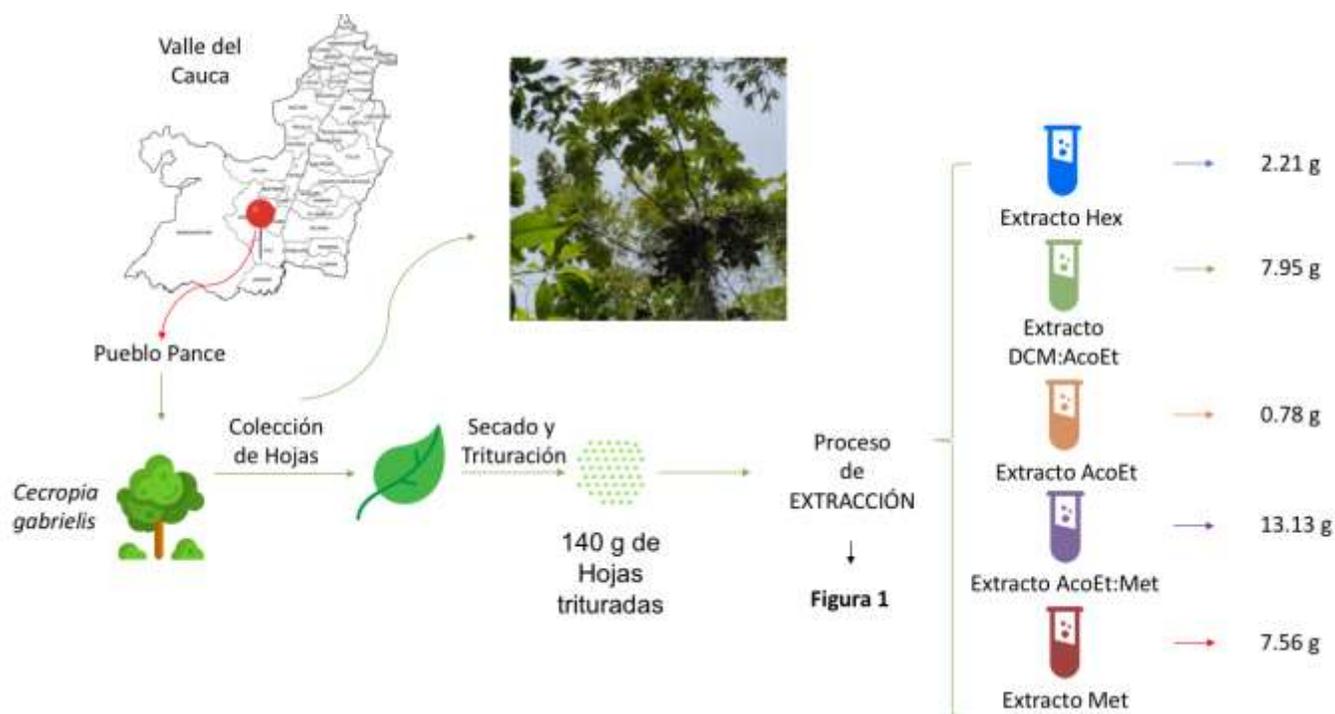


Figura 6. Rendimiento de extracción de hoja por maceración.

Se procedió a realizar un testeo utilizando cromatografía planar (TLC). Como se había mencionado anteriormente, la información sobre la *Cecropia angustifolia* es algo limitada en el ámbito de investigación como posible droga, y no va más allá de colectas, descripciones

botánicas y taxonómicas. No se tiene evidencia alguna de que en sus órganos vegetales se contengan triterpenos pentacíclicos, o algún otro tipo de molécula que tenga actividad enzimática sobre 11 β - HSD1. Es por esto que se propone un análisis de los extractos, en donde se comparen con un estándar de CD16 de *Cecropia telenitida*, estándares de ácido Serjánico y de ácido Espergulagénico. CD16 es una fracción de moléculas de tipo triterpénico contenida en las raíces de *Cecropia telenitida*, que exhibió una actividad inhibitoria en estudios previos sobre 11 β - HSD1. El ácido Serjánico y ácido Espergulagénico son triterpenos pentacíclicos no comerciales aislados de esta última planta. A continuación, en la **Figura 7**, se presentan los resultados de la evaluación de los extractos, después de desarrollada la metodología propuesta.

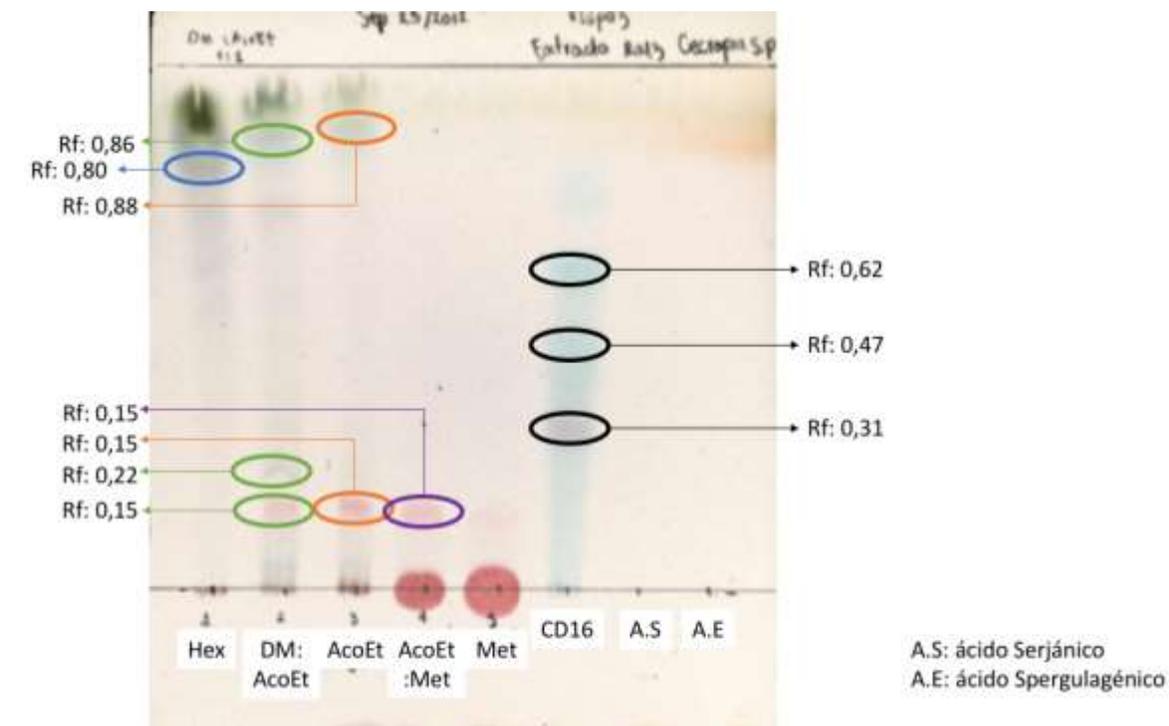


Figura 7. Placa cromatográfica -TLC con Rf incluidos. Extractos de hojas, CD16, ácido Serjánico y Espergulagénico

Según muestra la **Figuras 7**, los Rf obtenidos en las fracciones no coinciden con los que presenta el estándar de CD16. Este resultado indica que dentro de las hojas de *Cecropia*

angustifolia no se encuentran las mismas sustancias de interés que presenta CD16. Este hallazgo no resulta inquietante, ya que partiendo del hecho de que CD16 proviene de raíces, se está hablando de dos órganos vegetales distintos. Lo que sugiere el resultado, es que a pesar de que no se encuentran sustancias de las que ya se tienen registro, se podría estar detrás de otro tipo de sustancias con posible inhibición sobre la enzima. Esta hipótesis resulta válida teniendo en cuenta que una especie del mismo género, *Cecropia obtusifolia*, presenta propiedades hipoglucémicas cuando se ingieren infusiones de sus hojas. Para poder comprobar o rechazar la hipótesis planteada sobre la *Cecropia angustifolia*, se procedió a realizar el ensayo enzimático con los extractos obtenidos.

Los extractos de la planta no pasaron por un fraccionamiento, ya que, como se ha mencionado, la información que se tiene sobre *Cecropia angustifolia* es insuficiente para justificar el uso de grandes cantidades de solvente en este proceso. No se podía arriesgar al gasto de reactivo, con la latente posibilidad de no encontrar resultados prometedores en las muestras fraccionadas. En este sentido, los extractos fueron directamente evaluados en el ensayo y que de esta manera, si se lograba obtener actividad enzimática sobre alguno de ellos, se pudiesen sentar pruebas que despertaran el interés a futuras investigaciones sobre la *Cecropia angustifolia* en sus hojas.

4.2. Raíces

Recolectado y pulverizado el material, se obtuvo un peso de 1.44Kg. Al tratarse de una especie con la que no se tenía información de respaldo, se debían hacer pruebas previas a la extracción para la justificación del uso de la planta piloto y el consecuente uso de solvente.

En este sentido, se tomaron 10,12g de material de raíz pulverizado y se realizó una extracción a pequeña escala con DCM/AcoEt (1:1) por 4 días. El extracto obtenido se fraccionó y las fracciones generadas se llevaron a un análisis por TLC. En las pruebas de TLC se realizaron comparaciones con fracciones de *Cecropia telenitida*, la fracción CD16 de *Cecropia telenitida*, ácido Serjánico y ácido Isoyarúmico. Este último, fue una nueva molécula aislada

en *Cecropia telenitida* por parte de Mosquera, Montoya y Panay en su trabajo de investigación (Mosquera et al., 2018). En las fracciones 10 a 14 obtenidas, se obtuvo un perfil algo parecido a CD16, pero el resultado más prometedor fue el que se obtuvo al comparar estas fracciones con el ácido Isoyarúmico. En la **Figura 8** se muestra la placa correspondiente.

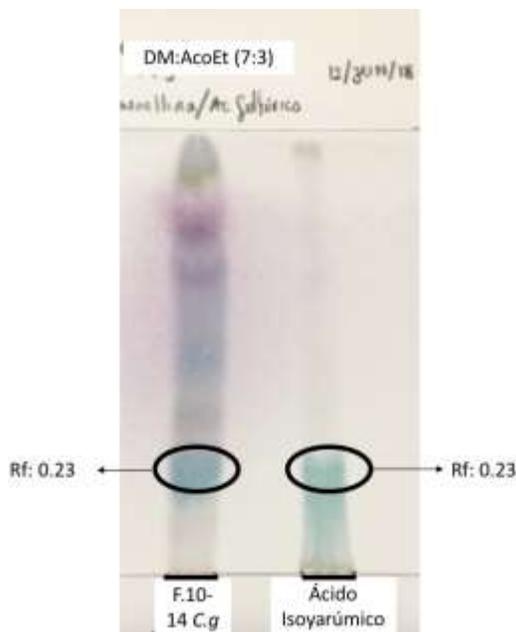


Figura 8. Placa cromatográfica -TLC con Rf incluido. Ácido Isoyarúmico vs F. 10 a 14.

El resultado que se presenta en la **Figura 8** es muy diciente. Las fracciones unidas se siembran junto a estándar de ácido Isoyarúmico para ser comparadas. Los compuestos sembrados fueron eluidos por una fase móvil con la polaridad un poco más reducida (DCM/AcoEt – 7:3), comparada con la que se había utilizado convencionalmente de (1:1), haciendo que el arrastre haya sido un poco menor. Se presentaron dos bandas con un mismo Rf, una de estas bandas correspondiente a la banda del ácido Isoyarúmico aislado. Según esto, se podría relacionar que estas fracciones en *Cecropia angustifolia* cuentan con la presencia de ácido Isoyarúmico. Sin embargo, hacer este tipo de afirmación en etapas iniciales de la investigación es un poco arriesgado. A pesar de esto, se obtuvo pruebas de un panorama alentador en cuanto a la continuación del proyecto, ya que la evidencia mostró que

efectivamente habían resultados preliminares interesantes por investigar. En este sentido, se aprueba el uso de la planta de extracción por parte del director de la investigación.

Aprobado el uso de la planta, se depositó 1.43Kg restantes del material vegetal pulverizado. En la **Figura 9** se presenta un esquema y resultados del proceso de extracción, además del peso del extracto generado.



Figura 9. Peso de extracto de raíz.

Obtenido el extracto de raíces de 25.29g, se procedió a realizar su fraccionamiento. Como se mencionó en la metodología, el extracto debió dividirse en dos partes para realizar el fraccionamiento, esto por cuestiones de capacidad del samplet utilizado en la columna de fraccionamiento. Es así como se procede a realizar el *Fraccionamiento 1* y *2*. En la **Figura 10** se presenta algunos de los resultados generados en los fraccionamientos mencionados.

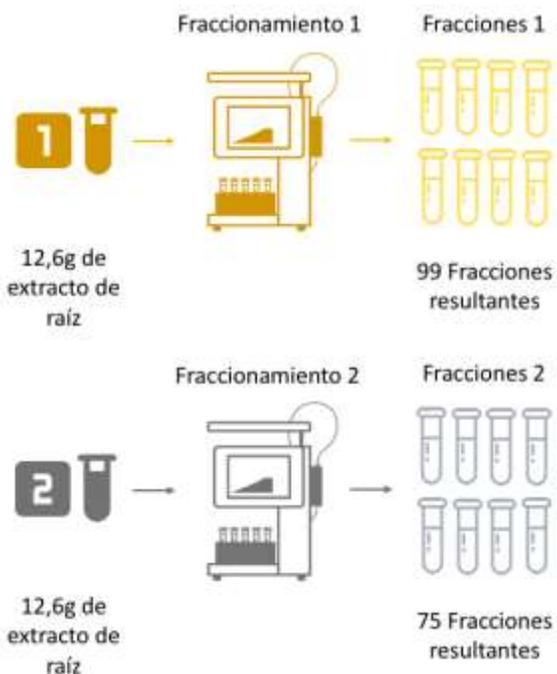


Figura 10. Resultados *Fraccionamiento 1* y *2*.

Las fracciones obtenidas fueron agrupadas por volúmenes de 300 mL, que comprendía la unión de 3 fracciones seguidas. Las placas se siembran con carriles de comparación de CD16, ácido Serjánico y Espergulagénico, se desarrollan con fase móvil DCM/AcoEt (1:1) y reveladas con vainillina- ácido sulfúrico, tal como se describe en la metodología planteada. Los resultados principales se presentan en las figuras a continuación.

4.2.1. Resultados del *Fraccionamiento 1*

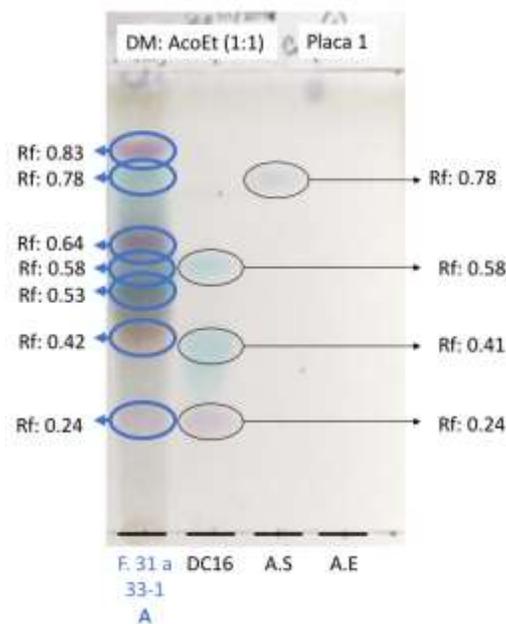


Figura 11. Placa 1- TLC con Rf incluidos – *Fraccionamiento 1*

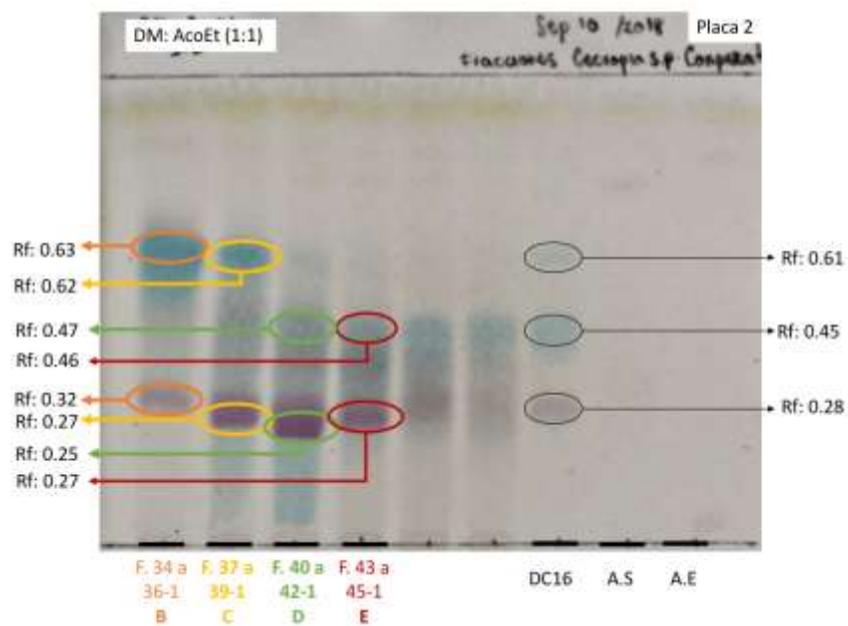


Figura 12. Placa 2- TLC con Rf incluidos – *Fraccionamiento 1*

Las **Figuras 11** y **12**, presentan los resultados más representativos de las fracciones del *Fraccionamiento 1*. Las fracciones *F.31 a 33-1* a *F. 43 a 45-1*, exhibieron Rfs y perfiles cromatográficos idóneos para un análisis cualitativo y fueron estas fracciones a las que se les

prestó especial atención. Las fracciones se denotaron con las letras **A**, **B**, **C**, **D** y **E**, respectivamente, tal y como se muestra en las **Figuras 11 y 12**.

En cuanto a la fracción **A**, presentada en la **Figura 11**, esta comparte ciertas bandas con la fracción CD16, específicamente las bandas con Rf 0.24 y 0.58. No solo tienen un Rf igual, sino que también generaron una derivatización con el mismo color. La banda con Rf 0.42 en la fracción **A** no presenta similitud con la banda de Rf 0.41 en la fracción CD16, a pesar de que sus Rf son algo parecidos, su color es completamente distinto. En cuanto al ácido Serjánico y ácido Espergulagénico no se obtuvo resultado similar con estos estándares. Además de las bandas mencionadas, la fracción **A** presenta en su composición otras sustancias de las cuales no se tienen certeza alguna de su identificación.

En la **Figura 12**, las fracciones **B** y **C** exhiben un comportamiento parecido entre ellas, y a su vez lo hacen las fracciones **D** y **E**. Al comparar estas fracciones con CD16 se logran encontrar varias coincidencias, estas se especifican a continuación:

- a. La banda con Rf 0.61 de CD16 parece estar presente en las fracciones **B** y **C** con Rf 0.63 y 0.62 respectivamente. Adicionalmente, el color de derivatización es bastante similar.
- b. La banda con Rf 0.45 de CD16 muestra similitud con las bandas de Rf 0.47 y 0.46 de las fracciones **D** y **E** respectivamente. Su derivatización presenta un tono azulado, así como lo hace la banda de CD16.
- c. La banda con Rf 0.28 de CD16 por su parte, se encuentra presente en todas las fracciones seleccionadas de la **Figura 11**. En las fracciones **B** a **E** se encuentra esta banda con Rf entre 0.25 a 0.32.

Es así como estas 5 fracciones se seleccionaron como potenciales candidatas en el ensayo enzimático. Se esperaba que así como presentaban similitud con el perfil cromatográfico de CD16, presentara algún parecido en la actividad que exhibía frente a la enzima 11 β -HSD1. Los resultados del ensayo enzimático de las fracciones mencionadas se presentan en la sección 4.3.

4.2.2. Resultados del *Fraccionamiento 2*

Por otro lado, en el *Fraccionamiento 2* se presentan otras 5 fracciones con una similitud significativa a CD16. Las **Figuras 13** y **14** presentan las placas con el perfil cromatográfico de estas 5 fracciones seleccionas.

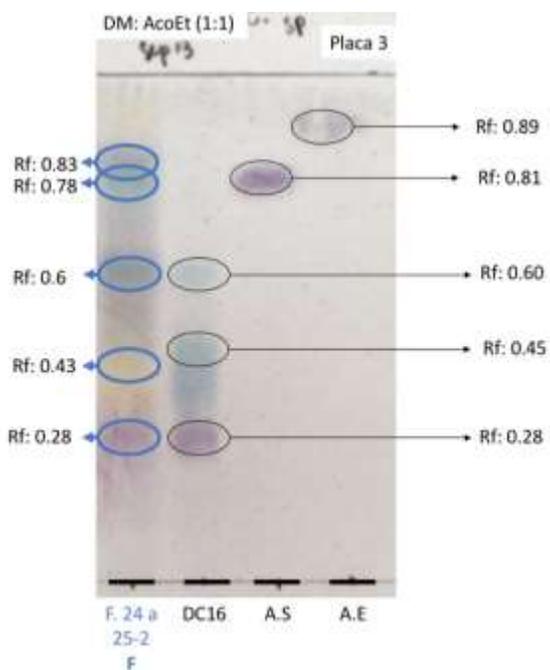


Figura 13. Placa 3- TLC con Rf incluidos – *Fraccionamiento 2*

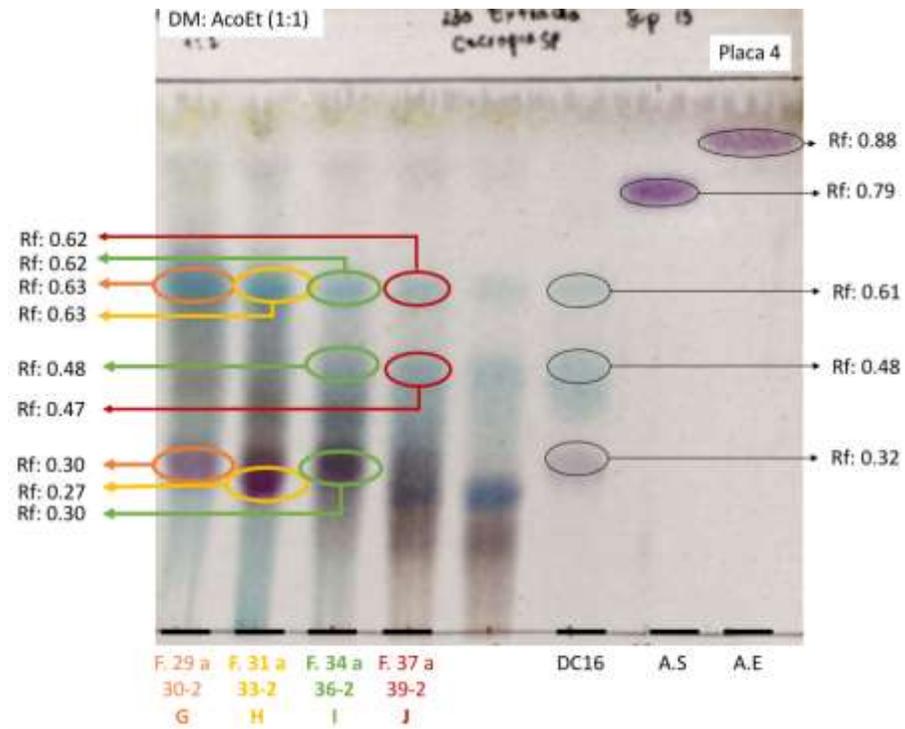


Figura 14. Placa 4- TLC con Rf incluidos – *Fraccionamiento 2*

Las fracciones seleccionadas, como se puede observar en las **Figuras 13** y **14**, fueron *F. 24 a 25-2*, *F. 29 a 30-2*, *F. 31 a 33-2*, *F. 34 a 36-2* y *F. 37 a 39-2*. Estas fracciones fueron denotadas respectivamente con las letras **F, G, H, I, J**. Esto se debió a una confusión en el momento en que se concentraron las fracciones, por lo que **F** y **G** resultaron de la unión de las fracciones 25-25 y 29-30 respectivamente.

En la **Figura 13**, donde se presenta la fracción **F**, se pueden encontrar 2 coincidencias significativas con DC16. Una de ellas en la banda con Rf 0.28 que se encuentra con el mismo Rf en la fracción DC16, además de que la derivatización para ambas bandas generó un color bastante parecido. Por otro lado, **F** presentó otra banda con Rf de 0.6 que coincide con la banda de ese mismo Rf en DC16. Para este caso, la derivatización no es muy concluyente, pero el tono azulado predomina en ambas bandas. Se podría pensar que hay otra coincidencia con la banda de Rf 0.43 en **F** con la de Rf 0.45 en DC16, sin embargo la derivatización para ambas es distinta y no refieren Rf idénticos.

En cuanto a la **Figura 14**, se presentan las fracciones **G** a **J**. Las fracciones **G** y **H** presentan perfiles cromatográficos similares, y tienen dos coincidencias con DC16. La primera, es con la banda de Rf 0.61 de DC16 que en **G** y **H** se presentan con Rf de 0.63 para ambas; y la segunda coincidencia está en la banda con Rf de 0.32 que en **G** y **H** se presentan con Rf de 0.30 y 0.27 respectivamente. La derivatización además coincide, como se muestran los colores en la **Figura 14**. La fracción **I**, por su parte, presenta coincidencia con las 3 bandas representativas de DC16, siendo esta banda la única en presentar las 3 bandas representativas. En su caso, **I** tiene sus bandas ubicadas en los Rf 0.30, 0.48 y 0.62, siendo estos muy similares a los Rf de 0.32, 0.48 y 0.61 de DC16. Por último, **J** comparte 2 bandas con DC16, una de ellas con Rf de 0.48, que resulta idéntico respecto a la banda de DC16; y la otra con Rf de 0.62 difiriendo un poco del Rf 0.61 de la banda en DC16.

Algo que cabe discutir acerca de los fraccionamientos, es que las fracciones escogidas en el *Fraccionamiento 1* como en el 2 fueron parecidas en cuanto a la posición, más no iguales; es decir que en el *Fraccionamiento 1* se escogieron las fracciones 31 a 45 y en el *Fraccionamiento 2* las fracciones 29 a 39 exceptuando algunas. Es intrigante pensar cómo un segundo sistema que corrió con las mismas condiciones del primero pudo haber diferido en la manera en que se obtuvieron las fracciones, sin embargo la respuesta radica en la columna utilizada. En el *Fraccionamiento 1* se utilizó una columna totalmente nueva, y en el *Fraccionamiento 2* se reutilizó esta misma columna, lo que explica por qué las fracciones escogidas se obtuvieran a diferentes volúmenes de columna.

Estas otras 5 fracciones del *Fraccionamiento 2* también fueron seleccionadas para el ensayo enzimático, tal y como se hizo con las otras 5 fracciones del *Fraccionamiento 1*. Por la similitud en el perfil cromatográfico en estas fracciones, también se esperaba de ellas una respuesta de inhibición de la enzima 11 β -HSD1. Los resultados del ensayo se presentan a continuación.

4.3. Ensayo Enzimático

Como se mencionó en la metodología, se debió realizar un ensayo previo para evaluar las condiciones óptimas de producción de cortisol por parte de la enzima 11 β -HSD1 contenida en los microsomas hepáticos. Además, esta sería una prueba de que los mismos estaban funcionando correctamente, ya que eran nuevos y era la primera vez que se utilizaban en un ensayo. Según los reportes de Mosquera (Mosquera Salcedo, 2017), la cantidad óptima de microsomas a la concentración de 20 μ g de proteína/ μ L es de 1 μ L, pero la autora aclara que se deben conocer las condiciones óptimas cada vez que se trabaje con un nuevo lote de microsomas.

Es así como se procede a hacer el ensayo utilizando los mismos reactivos que se especificaron en la metodología para el ensayo de inhibición, sin embargo, en este caso las reacciones no contendrían inhibidores, pues lo que en realidad se quería evaluar era la correcta producción de cortisol en los mismos. Además de las reacciones sin inhibidor, se preparó la curva de calibración de cortisol sugerida en el protocolo, así como controles respectivos. Cada una de las reacciones, estándares de curva y controles, se les hizo el mismo tratamiento con los reactivos de detección del kit: cortisol D2 y Anticortisol, responsables de la señal de respuesta en la lectura, tal como se mencionó en la metodología para el ensayo de inhibición. Los resultados de este ensayo previo se presentan a continuación.

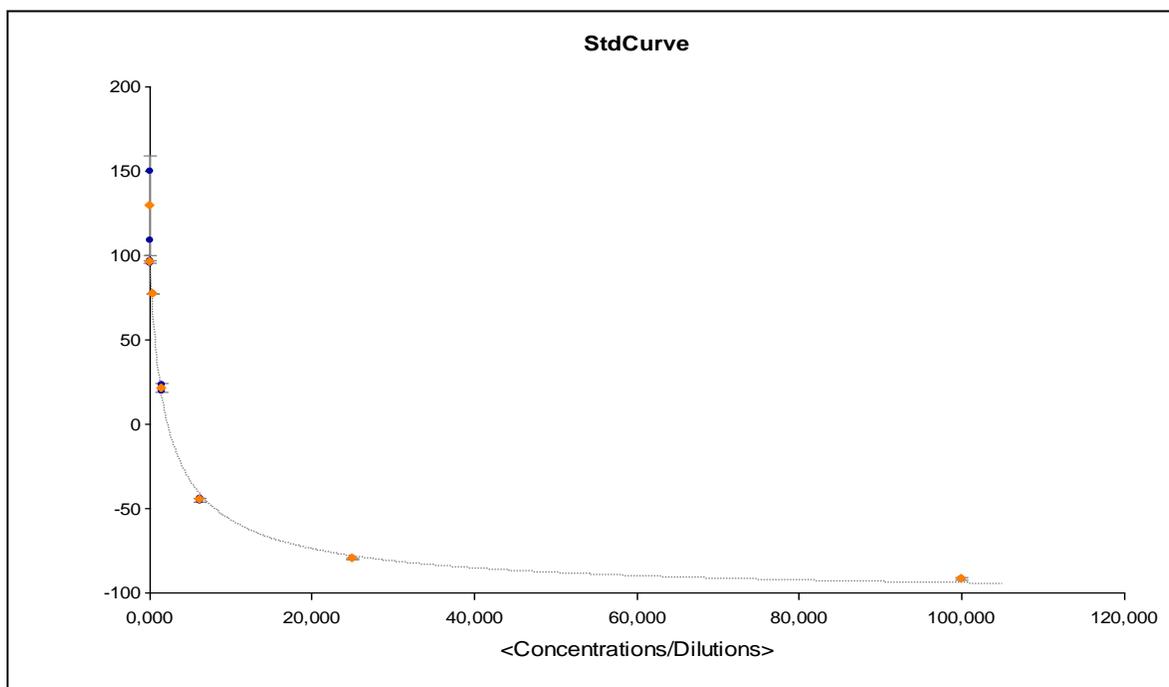


Figura 15. Curva de calibración de ensayo preliminar.

En la **Figura 15** se presenta la curva de calibración para la cuantificación de cortisol obtenida para este ensayo previo. El modelo matemático que explica los datos es $y = (125+103)/(1+(x/1.82)^{0,802})-1.82$ con un coeficiente de determinación de 0.997. Este coeficiente de determinación es alto, lo que indica que la variabilidad de la respuesta (Delta F%) está explicada por la variable independiente (Concentración de Cortisol en mg/mL) en este modelo. El dato de Delta F% es generado por el método a través de un tratamiento matemático que se explicará a continuación.

Como se había mencionado anteriormente, la lectura por HTRF se basa en la medida de fluorescencia emitida cuando un par de fluoróforos están próximos. Para este caso, el par de fluoróforos corresponde al cortisol D2 (aceptor) y el Anticortisol (donante). Cuando estos permanecen juntos en la reacción, el equipo emite una radiación a una longitud de onda de 330 nm que excita el sistema, y en respuesta se da una emisión por parte del sistema que es la señal que detecta el equipo. Las señales emitidas por parte del sistema pueden ser de dos tipos según el estado de reacción, y es por esto que el equipo detectará señales a dos

longitudes de onda diferentes: 665nm y 620nm. La señal que se detecta a 665nm corresponde a la señal emitida cuando el par de fluoróforos están unidos y por otro lado, la que se detecta a 660nm es la que produce el Anticortisol criptato por el mismo, es decir, cuando el cortisol estándar o el cortisol producido por la enzima desplaza el cortisol D2. Por lo anterior, se cuenta con dos datos de lectura en cada pozo de reacción, y en el método se hace la siguiente relación matemática.

$$Ratio(Proporción) = \frac{A_{665nm}}{A_{620nm}} \times 10^4 \quad (2)$$

En la ecuación 2 se muestra el tratamiento matemático que se le hace a la lectura de las emisiones para calcular un dato llamado *Ratio*, que se utiliza para calcular Delta F%.

$$Delta F\% = \frac{Ratio \text{ de Muestra} - Ratio \text{ Control Negativo}}{Radio \text{ de Control Negativo}} \times 100 \quad (3)$$

Es así como se puede decir que Delta F% es una medida indirecta de la señal producida, pero que a su vez implica un valor neto en el cual se ha corregido la señal de ruido empleando la respuesta del control negativo. Esto tiene sentido ya que la preparación del control negativo sugerido por el protocolo se prepara reemplazando los reactivos por buffer (Tris- HCl y de detección) y solo incluye 5 µL de Anticortisol criptato en el pozo de reacción.

Cabe notar además, que la señal de emisión resulta ser inversamente proporcional a la concentración de cortisol en la reacción. En este sentido, en cada uno de los pozos de reacción se hizo una lectura, un tratamiento de datos que al final arrojaron un Delta F %. Este dato se trató matemáticamente con el modelo generado por la curva de calibración de cortisol, y al final se obtuvo una concentración de cortisol producido en la reacción por parte de la enzima.

Habiendo entendido cómo se generan los datos de concentración de cortisol, se procede a la discusión de resultados del ensayo preliminar que evaluaba las condiciones óptimas para la

reacción enzimática. La producción de cortisol de los microsomas se evaluó variando el tiempo de incubación antes de la lectura correspondiente en el lector de platos (3h y 6h), el acople de regeneración de NADPH con la enzima G6PDH (acoplada y no acoplada) y la cantidad de microsomas utilizado (1 μ L, 2 μ L Y 4 μ L). Al hacer la lectura en el lector de platos Synergy H1 de la marca Biotek, el equipo arrojó resultados de la concentración de cortisol producida en cada una de las muestras. Los datos se presentan en la figura a continuación.

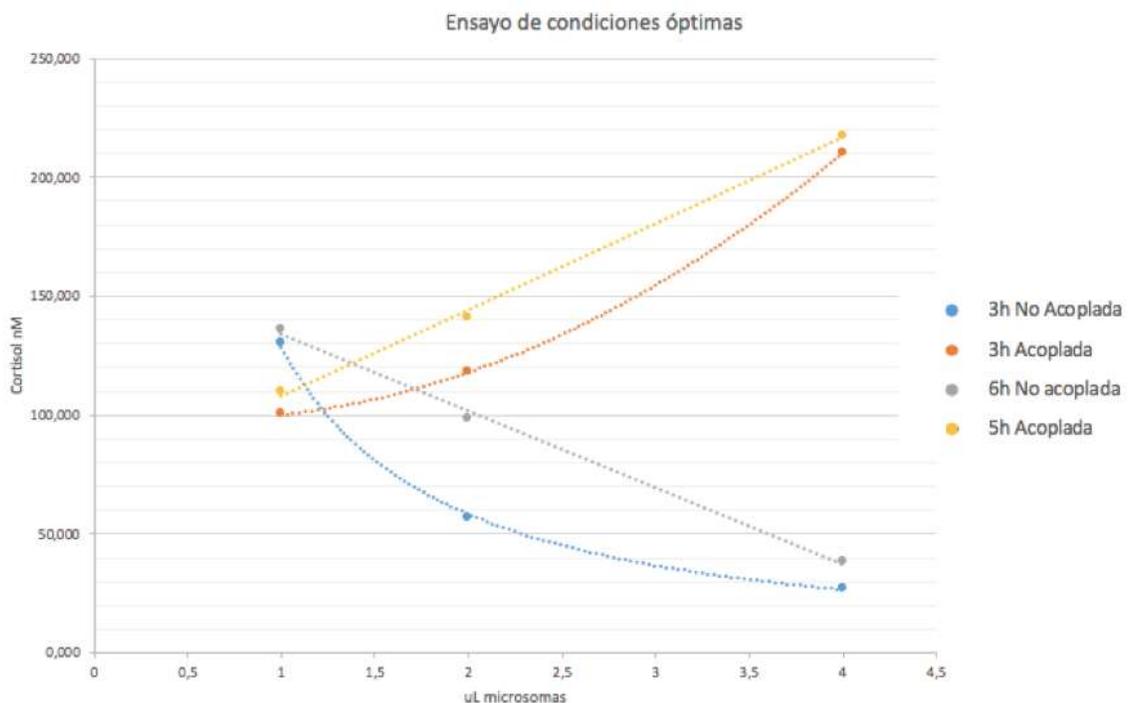


Figura 16. Evaluación del efecto del tiempo de incubación sobre la producción de cortisol en las reacciones acopladas y no acopladas.

En la **Figura 16** se muestran los resultados de variación de los μ L de microsomas, tiempo y la condición de reacción, teniendo en cuenta la tabla de convenciones presentada a la derecha del gráfico. Las líneas amarillo y naranja representan las reacciones acopladas con el sistema de regeneración de NADPH, siendo la amarilla la que representa la reacción con 5 horas de incubación y la naranja con 3 horas de incubación previa a la lectura. Cabe notar que en la reacción acoplada, la lectura se hizo a 5 horas en vez de 6 que era lo planeado, por cuestiones

logísticas. Respecto al comportamiento de las 3h vs las 5h siempre se ve un aumento de la cantidad de cortisol producido. Además, se observa que a medida que se aumenta los μL de microsomas en la reacción, aumenta la producción de cortisol en la misma, siendo mejor la producción de cortisol con $4\mu\text{L}$ de microsomas para las reacciones acopladas. Este era un resultado de esperarse, ya que a medida que se aumenta la cantidad de enzima presente en los microsomas, la utilización de sustrato será más, con un consecuente aumento de la cantidad de cortisol producida y el hecho de que se favoreciera la reacción con el hecho de que el NADPH no se agotaría gracias al sistema de regeneración acoplado.

Por otro lado, las líneas gris y azul representan la reacción no acoplada a 6 y 3 horas respectivamente. Así como en el caso anterior, la variación del tiempo solo hace que haya más producción del cortisol, ya que se le da más tiempo a la reacción para que genere su producto. Contrario a lo que pasa en la reacción acoplada al sistema de regeneración, en este caso el aumento de la cantidad de microsomas desfavorece la producción de cortisol, sugiriendo que la producción de cortisol es mejor cuando se utilizan bajas cantidades de enzima en reacción. Este comportamiento se puede deber al hecho de que si se aumenta la cantidad de enzima, la demanda de NADPH también aumentará, y en ausencia de la regeneración del cofactor, se llega a un punto en que el NADPH no es suficiente para que la reacción continúe efectivamente y la velocidad de producción de cortisol disminuirá.

Con los resultados se definió que el ensayo de inhibición se haría con $3\mu\text{L}$ de microsomas, 3 horas de incubación y el sistema de regeneración de NADPH acoplados. Así, se montaron los pozos de reacción con los 15 potenciales inhibidores que se habían seleccionado en las etapas anteriores: 5 extractos de hoja y las fracciones **A** a **J** de las raíces. A pesar de que se siguió el procedimiento sugerido en la metodología, los resultados del ensayo de inhibición resultaron ser no válidos y no se pudo calcular el porcentaje de inhibición de cada una de las fracciones y extractos. El pozo de reacción del control de inhibición no presentó los resultados esperados, y es por esto que se decide invalidar el ensayo.

El control de inhibición del ensayo se realizó con carbenoxolona, que como se mencionó anteriormente, ha evidenciado un efecto inhibitorio sobre la enzima. El resultado en la lectura para este plato fue una concentración de cortisol por encima de 105 mg de cortisol por mL. Este resultado es contradictorio, ya que se esperaba que la cantidad de cortisol presente en este plato fuese muy baja. El tratamiento con la carbenoxolona varió con respecto a las muestras, en que el tiempo de incubación para el control de inhibición fue de 2 horas en vez de 3, y esto se debió principalmente a razones logísticas del ensayo. Aún así, no se esperaba que esta variación generara una producción de cortisol alta, en vez de eso se debía observar alguna evidencia de inhibición.

Otra de las razones que pudo haber influido, es la cantidad de microsomas utilizados. En su trabajo Mosquera (Mosquera Salcedo, 2017), estandariza la reacción a 1 μ L de microsomas utilizados así como lo hace con la concentración final de carbenoxolona de 600nM. El hecho de que se haya aumentado la cantidad de microsomas pone el juicio la concentración de inhibidor que se debió haber utilizado, pues con un aumento de proteína de enzima, era de esperar que se produjera mucho más cortisol. Es probable que la cantidad de carbenoxolona utilizada, no haya sido suficiente para inhibir la cantidad de enzima en reacción y que por esto los resultados hubiesen presentado lecturas de cortisol muy altas. Basado en este se sugiere que hubo un error en el planteamiento de la experimentación desde que se querían averiguar las condiciones óptimas para el ensayo enzimático. Para este punto también se debió llevar a cabo un control de inhibición con Carbenoxolona en cada uno de los μ L de microsomas variados y que además, se planteara un estudio de la inhibición si además de la variación de microsomas, se variara la cantidad de carbenoxolona utilizada.

Resulta inquietante el hecho de que si Mosquera ya había estandarizado unas condiciones, ¿por qué estas se cambiaron?. En un planteamiento inicial se quería trabajar a condiciones que resultaran un tanto predecibles. Es decir, 3 μ L en la **Figura 16** supondrían un valor medio que tendría predicciones cuando su límite se acercara por derecha e izquierda. Al inicio plantear el uso de 1 μ L generaba cierto grado de desconfianza al presentarse en los límites inferiores del ensayo. Sin embargo, con los resultados en mano, se discutió que fue mejor

haber seguido el procedimiento de Mosquera, ya que variar la cantidad de microsomas implicaría una variabilidad altísima en los resultados y que además no se contaría con un patrón de referencia como lo podría haber sido los ensayos realizados por Mosquera.

Además, se puede pensar que la relación con el sistema de regeneración del NADPH pudo haber sido una fuente de error. Se piensa que la cantidad de enzima G6PDH fue mucho mayor que la que se necesitaba, por lo que en este sentido hubo una sobre producción de NADPH. Esto pudo haber influido de alguna manera y haber sido una posible razón a las altas concentraciones de cortisol detectadas.

Cada una de las razones mencionadas anteriormente hacen parte de posibles hipótesis sobre el error, y que se precisa de experimentación para comprobarlas.

5. CONCLUSIONES

- En la composición química de las raíces de *Cecropia angustifolia* se presenta un perfil cromatográfico similar al perfil cromatográfico de la fracción CD16 que presentan las raíces de *Cecropia telenitida*, hecho que hace que esta planta despierte un especial interés en cuanto al descubrimiento de posibles triterpenos pentacíclicos presentes en la misma.
- No se puede hacer ningún tipo de aproximación en cuanto a la composición química de las hojas de *Cecropia angustifolia*, ya que no se contó con un perfil cromatográfico de comparación de este mismo órgano vegetal. Lo que sí se puede afirmar, es que las sustancias contenidas en las mismas no hacen parte del perfil cromatográfico de la fracción de raíz de *Cecropia telenitida* con la que se comparó.
- El nuevo lote de microsomas hepáticos humanos que contenían la enzima 11 β -HSD1 tienen un mejor desempeño en la producción de cortisol cuando se utilizan cantidades mayores de microsomas y se acopla a un sistema de regeneración de NADPH. 3h de incubación de la reacción resulta suficiente para la producción de cantidades considerables de cortisol.
- No se tienen ningún resultado concluyente en el ensayo de inhibición ya que el control de inhibición con carbenoxolona no generó inhibición. Con este resultado en el control se debe invalidar el ensayo, lo que indica que en las condiciones del sistema hay un factor que desfavorece la confiabilidad de los resultados de inhibición.
- Se piensa que la modificación de la cantidad de microsomas utilizados de 1 μ L a 3 μ L, la cantidad de enzima G6PDH utilizada en el acoplamiento del sistema para la regeneración de NADPH y el tiempo insuficiente de incubación de la reacción

control de carbenoxolona son razones que pudieron haber afectado los resultados del ensayo enzimático.

- Las hipótesis que se plantean sobre la posible causa de error deben ser evaluadas experimentalmente para determinar verídicamente la causa de la falla en el ensayo.

ANEXOS

Anexo 1. Voucher de Colección *Cecropia angustifolia*.





Planta de Colombia: Valle del Cauca.
Departamento: Valle del Cauca.
Municipio: San Andrés Boga.
Finca: Finca La Esperanza, km 14, vía a la finca del
campesino, en el finca La Esperanza, 2012. H. 1000 m.
14° 32' 21" N, 76° 58' 30" W

Stemodia angustifolia (Poeberl)
Santalaceae: Santalaceae & Convolvulaceae
Herbario: BMNH - Herbario de 2012

Arbol grande de 5 m de altura, tronco grisáceo, en la parte superior del tronco,
puede ser grisáceo o rojo, fructificación, con el fruto amarillo. Cereza
rojo oscuro (200 g por fruto), con el fruto rojo oscuro. Cereza
rojo oscuro, con el fruto rojo oscuro. Cereza rojo oscuro, con el
fruto rojo oscuro. Cereza rojo oscuro, con el fruto rojo oscuro.

Epiteto: *Stemodia angustifolia* (Poeberl) S. G. Lee & S. G. Lee
Número de catálogo: 2012 - Fecha colectada: 17 de junio de 2012
"Herbario de la Universidad Nacional de Colombia"
"Herbario de la Universidad Nacional de Colombia"
"Herbario de la Universidad Nacional de Colombia"

AGRADECIMIENTOS

Se extiende un especial agradecimiento al tutor del proyecto de investigación, el profesor de la Universidad Icesi, Dr. Guillermo León Montoya, por su dedicación, apoyo y entrega a lo largo del proyecto. Así mismo, se agradece a Dr. Aram Joel Panay, también profesor de la Universidad Icesi, por su apoyo en la sección bioquímica de este proyecto. En cuanto al trabajo de identificación de *Cecropia angustifolia* se le agradece al curador del herbario de la Universidad Icesi, Juan Camilo Sánchez, y a la estudiante de doctorado en la Universidad de Minnesota Twin Cities y especialista de *Cecropia* para Colombia, Laura Toro González.

Se le da un especial agradecimiento además, a los estudiantes de maestría en biotecnología de la Universidad Icesi, Gustavo Gutierrez y Laura Valencia, por su apoyo y dedicación durante la parte experimental del proyecto. Por último, un agradecimiento a la profesora de la Universidad Icesi y recién graduada de la maestría de biotecnología, Catalina Mosquera, por su tiempo y disposición para el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a Dios, mi familia y amigos por ser y estar ahí cuando lo necesité.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, A., & Walker, B. R. (2013). 11 β -HSD1 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Drugs*, 73(13), 1385–1393.
<https://doi.org/10.1007/s40265-013-0112-5>
- Balcazar, N., Tabares-Guevara, J. H., Gonzalez, P., Ramirez-Pineda, J. R., & Montoya Peláez, G. L. (2014). HYPOGLYCEMIC ACTIVITY OF SERJANIC ACID OBTAINED FROM *Cecropia telenitida*: PRELIMINARY DATA. *Abstracts Book of 23° SILAE Congress*, 1(1827–8620), 183.
- Banhegyi, G., Benedetti, A., Fulceri R. & Senesi, S. (2004). Cooperativity between 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the lumen of endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27017-27021. <http://doi.org/10.1074/jbc.M404159200>
- Berg, C. C., & Franco-Roselli, P. (2005). FLORA NEOTROPICA MONOGRAPH 94: CECROPIA. *New York Botanical Garden Press On*, 94, 1–203. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4393938> .
- Cisbio. (2016). *Protocolo para el método de detección de cortisol HTRF de Cortisol Kit Cisbio*. Francia. Retrieved from <https://www.cisbio.com/drug-discovery/htrf-technology>
- Gardner, D. G., & Shoback, D. (2012). *Endocrinología Básica y Clínica*. (Mc Graw Hill, Ed.) (9na Edició). México D.F.: Mc Graw Hill. Retrieved from <http://nebulosa.icesi.edu.co:2070/onlinepdfjs/view.aspx>
- Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2016). Resolución 0526 del 2016. Colombia.
- Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2018). Resolución 0763 de 2018. Colombia.
- Montoya Peláez, G. L., Sierra, J. A., Alzate, F., Holzgrabe, U., & Ramirez-Pineda, J. R. (2013). Pentacyclic triterpenes from *Cecropia telenitida* with immunomodulatory activity on dendritic cells. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(5), 754–761.

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000500006>

- Mosquera, C., Panay, A. J., & Montoya, G. (2018). Pentacyclic triterpenes from *Cecropia telenitida* can function as inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Molecules*, *23*(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules23061444>
- Mosquera Salcedo, C. (2017). *Biblioteca química de moléculas derivadas de raíces de Cecropia telenitida y su evaluación como fuente de moléculas inhibidoras de la enzima 11B-HSD1*. Universidad Icesi.
- OMS. (2016). *Informe Mundial de la diabetes. Resumen de orientación*. [https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2016.03\(02\)71-076](https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2016.03(02)71-076)
- Rang, H. P., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2016). *Farmacología* (Octava edi). Barcelona: Elsevier.
- Revilla-Monsalve, M. C., Andrade-Cetto, A., Palomino-Garibay, M. A., Wiedenfeld, H., & Islas-Andrade, S. (2007). Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, *111*(3), 636–640. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.014>
- Tomlinson, J. W., & Stewart, P. M. (2005). Mechanisms of disease: Selective inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a novel treatment for the metabolic syndrome. *Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism*, *1*(2), 92–99. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0023>
- Vargas-Uricoechea, H., & Casas-Figueroa, L. Á. (2015). An Epidemiologic Analysis of Diabetes in Colombia. *Annals of Global Health*, *81*(6), 742–753. <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2015.11.001>