



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

LICENCIATURA EN QUÍMICA

TESIS

**BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS ACTIVOS INHIBIDORES DE LA
ENZIMA α -GLUCOSIDASA A PARTIR DE LA ESPECIE *ZALUZANIA
AUGUSTA***

Para obtener el título de

Licenciado en química

PRESENTA

Durán Villeda Osmin

Director

Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

Codirectora

Dra. Reyna Zeferino Díaz

Pachuca de Soto, Hgo., México. Agosto 2024

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 5 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud y manifiesto mi agradecimiento

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por darme la oportunidad de realizar mi estudio en la Licenciatura de Química.

Al Dr. J. Martín Torres Valencia, por recibirme en su grupo de investigación y por permitir el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Reyna Zeferino, por su total apoyo y disposición en la realización de este trabajo.

A la Dra. Raquel Cariño Cortés, por permitirme realizar parte de este proyecto en su laboratorio, por su apoyo y conocimiento compartido.

A mis compañeros de laboratorio M. Q. Patricia y Q. Aylin, por su agradable compañía en el laboratorio y por brindarme su apoyo.

A mis amigos de la licenciatura, por toda su compañía en el trayecto recorrido y por su apoyo.

A mis padres, Carlos Durán y Edith Villeda, por todo su valioso apoyo y preciado esfuerzo que hicieron para poder llegar a culminar este trabajo.

Tabla de contenido

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Diabetes	2
2.2. Clasificación etiológica de la diabetes	2
2.2.1. Diabetes mellitus tipo 1	3
2.2.2. Diabetes mellitus tipo 2	4
2.2.3. Diabetes gestacional	4
2.3. Diagnóstico de la diabetes	5
2.3.1. Prueba A1c (hemoglobina A glicada)	5
2.3.2. Glucosa plasmática en ayunas (GPA)	6
2.3.3. Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTG)	7
2.3.4. Prueba de glucosa plasmática aleatoria	7
2.4. Tratamiento de la diabetes	8
2.4.1. Tratamiento no farmacológico	8
2.4.2. Tratamiento farmacológico	8
2.4.2.1. Sulfonilureas	9
2.4.2.2. Inhibidores de la enzima α -glucosidasa	10
2.4.2.3. Insulinas	12
2.4.2.4. Biguanidas	13
2.4.2.5. Tiazolidinediona	14
2.4.2.6. Meglitinidas	15
2.5. Hidratos de carbono	17

2.5.1. Clasificación de hidratos de carbono	17
2.5.1.1. Monosacáridos	18
2.5.1.1.1. Glucosa	18
2.5.1.1.2. Fructosa	19
2.5.1.1.3. Galactosa	19
2.5.1.2. Disacáridos	20
2.5.1.2.1. Lactosa	20
2.5.1.2.2. Maltosa	20
2.5.1.2.3. Sacarosa	21
2.5.1.3. Oligómeros	22
2.5.1.4. Polisacáridos	22
2.6. Digestión de hidratos de carbono	23
2.6.1. Enzimas glucosidasas	24
2.6.1.1. Amilasas	24
2.6.1.1.1. α -amilasa salival	24
2.6.1.1.2. α -amilasa pancreática	25
2.6.1.2. α -glucosidasas	26
2.6.1.2.1. Maltasa	26
2.6.1.2.2. Sacarasa	27
2.6.1.3. β -galactosidasa	27
2.6.1.3.1. Lactasa	27
2.7. Familia Asteraceae	28
2.7.1. Familia Asteraceae en México	30
2.8. Género <i>Zaluzania</i>	32

2.8.1. Composición química del género <i>Zaluzania</i>	33
2.9. <i>Zaluzania augusta</i>	36
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. OBJETIVOS	40
4.1. Objetivo general	40
4.2. Objetivos específicos	40
5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1. Procedimientos generales	41
5.2. Colecta e identificación botánica de especie	42
5.3. Obtención de extractos	42
5.3.1. Secado y molienda	42
5.3.2. Extracto metanólico	43
5.3.3. Extracto con hexano, con cloroformo y con acetato de etilo	43
5.4. Extracción y aislamiento de los principales metabolitos secundarios	44
5.5. Determinación de la capacidad antioxidante método DPPH	47
5.6. Determinación de la capacidad antioxidante método ABTS	49
5.7. Determinación de la capacidad antioxidante método FRAP	50
5.8 Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa	52
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
6.1. Compuestos aislados de <i>Z. augusta</i>	55
6.1.1. Elucidación estructural del ácido ceanótico (1)	55
6.1.2. Elucidación estructural de la (-)-4'-O-metilcatequina (2)	62
6.1.3. Elucidación estructural del β -sitosterol (3)	66

6.1.4. Elucidación estructural parcial de la (-)-4'-O-metilgalocatequina (4) y de la (-)-galocatequina (5)	67
6.2. Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa	70
6.3. Determinación de la capacidad antioxidante método DPPH	72
6.4. Determinación de la capacidad antioxidante método ABTS	74
6.5. Determinación de la capacidad antioxidante método FRAP	75
7. CONCLUSIONES	77
8. ANEXOS	79
8.1. Compuesto 1, ácido ceanótico	79
8.1.1. Espectro 1. Espectro APT del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en acetona-d ₆	79
8.1.2. Espectro 2. Espectro HSQC del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en acetona-d ₆	80
8.1.3. Espectro 3. Espectro HSQC ampliación del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en acetona-d ₆	81
8.1.4. Espectro 4. Espectro HMBC del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en acetona-d ₆	82
8.1.5. Espectro 5. Espectro HMBC ampliación del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en acetona-d ₆	83
8.1.6. Espectro 6. Espectro de RMN de ¹³ C del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en piridina-d ₅	84
8.1.7. Espectro 7. Espectro de RMN de ¹ H del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en piridina-d ₅	85
8.1.8. Tabla 1, datos cristalográficos del compuesto 1	86
8.2. Compuesto 2, (-)-4'-O-metilcatequina	87
8.2.1. Espectro 8. Espectro HSQC del compuesto 2 adquirido a 400 MHz en acetona-d ₆	87

8.2.2. Espectro 9. Espectro COSY del compuesto 2 adquirido a 400 MHz en acetona-d ₆	88
8.3. Compuesto 3, (-)-gallocatequina	89
8.3.1. Espectro 10, Espectro de RMN de ¹³ C del compuesto 5 adquirido a 400 MHz en piridina-d ₅	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

[α]	Rotación óptica específica
°C	Grado Celsius
ρ	Densidad
$\rho(r)$	Densidad electrónica
μL	Microlitro
μM	Micromolar
$\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$	Micromol de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por gramo de extracto
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
AcOEt	Acetato de etilo
APT	Prueba de protones adjuntos
B	Blanco
C	Carbono
cm	Centímetro
cm^{-1}	Centímetro a la menos uno
CN	Control negativo
CNnE	Control negativo no enzimático
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear
CP	Control positivo
d	Doble
dd	Doble de dobles
DG	Diabetes gestacional
DM1	Diabetes mellitus tipo 1

DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidracilo
EtOH	Etanol
FRAP	Poder antioxidante reductor férrico
g	Gramo
GPA	Glucosa plasmática en ayunas
H	Hidrógeno
HbA1c	Hemoglobina A glicada
HMBC	Correlación heteronuclear a enlaces múltiple
HSQC	Correlación heteronuclear de un único cuanto
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media máxima
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
L	Litro
m	Metro
M	Molar
m	Múltiple
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mg/dL	Miligramo por decilitro
mg/mL	Miligramo por mililitro
MHz	Mega Hertz

min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mmol EqT/g	Milimol de Trolox por gramo de extracto
mmol/L	Milimol por litro
nm	Nanómetro
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
<i>p</i> -NPG	<i>p</i> -nitrofenol- α -D-glucopiranosido
ppm	Partes por millón
PTG	Prueba de tolerancia oral a la glucosa
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Simple
td	Triple de dobles
TLC	Cromatografía en capa fina
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
U/mL	Unidad por mililitro
Z.	<i>Zaluzania</i>

1. INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios o productos naturales han sido utilizados desde la antigüedad en la medicina tradicional para tratar diversas afecciones. Gracias al avance de la ciencia y la tecnología, al día de hoy, la investigación en productos naturales constituye un inmenso campo de investigación para la búsqueda y desarrollo de nuevas moléculas con actividad farmacológica.

En México existen al menos 306 especies de plantas que son utilizadas para el tratamiento de la diabetes, las cuales están distribuidas en 93 familias y 235 géneros. Las familias más comunes son: Asteraceae, Fabaceae, Cactaceae, Solanaceae y Euphorbiaceae.¹ Entre ellas, alrededor de 50 especies se encuentran en el Estado de Hidalgo. Algunas especies como *Haplopappus venetus*, *Zaluzania augusta* (raíces), *Costus mexicanus*, *Sedum moranense*, entre otras, no cuentan a día de hoy con estudios químicos ni biológicos.

Con el propósito de contribuir al conocimiento químico y biológico del género *Zaluzania* en México y en el estado de Hidalgo, en este proyecto se pretende aislar principios activos inhibidores de la enzima α -glucosidasa, a partir de la especie *Z. augusta*. Además, se pretende comprobar el efecto hipoglucemiante de la especie al evaluar la actividad de inhibición de la enzima α -glucosidasa, así como la evaluación de la actividad antioxidante por distintas técnicas. Esta especie fue seleccionada, ya que a través de una búsqueda bibliográfica se encontró que de entre más de 150 especies utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes mellitus la composición química de las raíces de *Z. augusta*, no ha sido explorada.

1. Andrade, A. & Heinrich, M. (2005): "Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes", *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), pp. 326-348. Disponible en: <https://n9.cl/ybky9>

2. ANTECEDENTES

2.1. Diabetes

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico crónico caracterizado por presentar hiperglucemia, la cual, resulta de la deficiencia de insulina o por insulinoresistencia.²

Cuando la hiperglucemia se presenta de forma duradera puede dar inicio a padecimientos visuales, renales, cardíacos y circulatorios.

2.2. Clasificación etiológica de la diabetes

Según la OMS³, la diabetes se puede clasificar en tres tipos:

- Diabetes mellitus tipo 1 (DM1): resultado de la deficiencia en la secreción de insulina.
- Diabetes mellitus tipo 2 (DM2): resultado de la resistencia a la insulina combinado con una alteración en la secreción de insulina.
- Diabetes gestacional (DG): resultado de la hiperglucemia presentada por primera vez durante el embarazo.

². Deshpande, A., Hayer, M. & Schootman, M. (2008): “Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications”, *Physical Therapy*, 88, pp. 1254–1264. Disponible en: <https://n9.cl/8pika>

³. (2023): “Diabetes”, *World Health Organization*. Disponible en: <https://n9.cl/xdeey>

2.2.1. Diabetes mellitus tipo 1

Este tipo de diabetes suele manifestarse comúnmente durante la adolescencia, aunque no está limitada a esta etapa, porque puede aparecer a cualquier edad. Además, se ha observado una mayor prevalencia en personas de raza blanca.⁴ Se presenta como resultado de la autodestrucción inmunitaria de las células β pancreáticas, se alcanza cuando el paciente ha destruido más del 90% de sus células pancreáticas. Por lo tanto, el paciente con DM1 tiene una alta deficiencia en la secreción endógena de insulina.⁵

Estimaciones demuestran que la prevalencia de la DM1 es de aproximadamente de 2 a 3 personas por cada 1000 habitantes y que equivale al 10% del total de casos de diabetes.⁴

La DM1 no muestra una distinción significativa en términos de género o edad; sin embargo, se observa una incidencia más alta en hombres a partir de los 14 años. Además, entre el 90 y el 95% de los casos totales ocurre entre las edades de 14 y 34.⁴

4. (2017): *Tratado de Diabetes Mellitus*, 2a edición, Madrid, Médica Panamericana.

5. Rang, H., Ritter, J., Flower, R. & Henderson, G. (2014): *Farmacología*, 8a edición, Barcelona, ELSEVIER.

2.2.2. Diabetes mellitus tipo 2

La DM2 se presenta como resultado de la insulinoresistencia, generalmente en pacientes obesos. Además, su incidencia tiende a aumentar con la edad, ya que la función de las células β pancreáticas tiende a disminuir con el tiempo.⁵

En la etiología de la DM2, la obesidad, la glucemia basal perturbada y la capacidad trastornada de la tolerancia a la glucosa, son los factores más importantes que anteceden a la aparición de la DM2.⁵ La DM2 representa alrededor del 90% de todos los casos de diabetes. Esta alta incidencia subraya la necesidad de una detección temprana y la necesidad de la búsqueda de nuevos compuestos que puedan contribuir al tratamiento efectivo de esta enfermedad.⁴

2.2.3. Diabetes gestacional

Es una condición que se presenta durante el periodo de gestación y se caracteriza por valores elevados de glucosa en sangre.^{4, 6} Aunque estos niveles suelen ser altos, generalmente no son lo suficientemente elevados para establecer diabetes. Si es detectada en el segundo o tercer trimestre de gestación, se clasifica como DG, mientras que, si es detectada en el primer trimestre, correspondería a DM2, que previamente no había sido detectada.⁴

^{6.} Katzung, B., Masters, S. & Trevor, A. (2012): *Basic and Clinical Pharmacology*, 12a edición, Estados Unidos, McGraw-Hill.

2.3. Diagnóstico de la diabetes

El diagnóstico de la diabetes mellitus se puede realizar utilizando cuatro métodos diferentes, tal como lo establece la *American Diabetes Association*.⁷

2.3.1. Prueba A1c (hemoglobina A glicada)

La hemoglobina A glicada (HbA1c), es una proteína conjugada, la cual se encuentra únicamente en los glóbulos rojos de la sangre. Los glóbulos rojos mueren constantemente y el cuerpo produce nuevos a diario. Dado que los glóbulos rojos tienen una vida media de aproximadamente 90 días o 3 meses, la cuantificación de la HbA1c se utiliza como un indicador para medir los niveles de azúcar en la sangre durante ese período. Por lo tanto, la medición de la HbA1c permite diagnosticar la diabetes y evaluar el comportamiento del azúcar en la sangre en los últimos tres meses.⁸

La prueba de HbA1c presenta diversas ventajas en comparación con otros métodos para el diagnóstico de la diabetes. Algunas de estas ventajas incluyen menor tiempo de prueba, no es necesario ayunar antes de la prueba y no requiere el consumo de bebidas especiales para realizar la prueba, además de que la prueba no suele verse afectada significativamente por situaciones de enfermedades agudas o estrés.⁴

⁷. American Diabetes Association: *Diagnóstico*. Disponible en: <https://n9.cl/3bfhp>

⁸. Eyth, E. & Naik, R. (2023): "Hemoglobin A1C", *StatPearls*. Disponible en: <https://n9.cl/2qiqv>

Según la *American Diabetes Association*, se definirá como diabético al paciente que presente un diagnóstico mayor o igual al 6.5% de HbA1c. Por otro lado, se dictará como prediabético a aquellos pacientes que obtengan un valor de HbA1c en el rango de 5.7 a 6.4% y se considerará como paciente sano a aquel que obtenga un valor por debajo de 5.7% de HbA1c (Tabla 1).⁷

Tabla 1. Diagnóstico de diabetes en prueba de %HbA1c.

Diagnóstico	Paciente sano	Paciente prediabético	Paciente diabético
%HbA1c	< 5.7	5.7 - 6.4	≥ 6.5

2.3.2. Glucosa plasmática en ayunas (GPA)

El análisis consiste en medir los niveles de GPA, con un ayuno de por lo menos 8 horas previo a realizar la prueba. Este análisis es una herramienta importante para cuantificar la glucosa en el cuerpo y es una de las pruebas diagnósticas clave para determinar la diabetes y la prediabetes.⁷ El ayuno permite obtener una medida precisa de la glucosa en sangre en condiciones de reposo, lo que proporciona información valiosa sobre la salud metabólica del paciente.

Para poder definir a un paciente como diabético, este debe presentar valores de GPA mayores o iguales a 7 mmol/L (126 mg/dL), mientras que será diagnosticado con prediabetes al obtener valores entre 100 y 125 mg/dL y por debajo de ellos (< 100 mg/dL) se tratará de un paciente sano (Tabla 2).⁷

Tabla 2. Diagnóstico de diabetes en prueba de GPA.

Diagnóstico	[GPA] (mg/dL)
Paciente sano	< 100
Paciente prediabético	100 - 125
Paciente diabético	> 126

2.3.3. Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTG)

La prueba de tolerancia oral a la glucosa mide la capacidad del cuerpo al procesar el azúcar en base a la concentración de glucosa que hay en la sangre dos horas después de ser administrada una bebida azucarada. Esta prueba es valiosa para diagnosticar y monitorear trastornos relacionados con el metabolismo de la glucosa, como la diabetes y la prediabetes. La medición de los niveles de glucosa en sangre después de la ingestión de glucosa, proporciona información importante sobre cómo el cuerpo maneja y regula el azúcar.⁷

Para considerar a un paciente como diabético, este debe obtener una concentración de glucosa en sangre después de aplicar la prueba, igual o mayor a 200 mg/dL, para valores comprendidos entre 140 y 199 mg/dL se tratará de una persona prediabética, mientras que, por debajo de ellos, será una persona sana (Tabla 3).⁷

Tabla 3. Diagnóstico de diabetes en prueba de PTG.

Diagnóstico	[Glucosa] (mg/dL)
Paciente sano	< 140
Paciente prediabético	140 - 199
Paciente diabético	≥ 200

2.3.4. Prueba de glucosa plasmática aleatoria

Se refiere a la prueba más rápida y accesible, sin embargo, también la más inexacta. Consiste en medir la glucosa plasmática en cualquier día y a cualquier hora, refiriéndose a una persona diabética a aquella que obtenga una concentración de glucosa plasmática mayor o igual a 200 mg/dL.⁷

2.4. Tratamiento de la diabetes

2.4.1. Tratamiento no farmacológico

Si bien las causas de la DM1 y DM2, son totalmente diferentes para ambas, los hábitos alimenticios saludables y el ejercicio físico regular son la base en la cual se apoya el tratamiento farmacológico respectivo. Dichas recomendaciones son particulares de cada individuo, ya que deben ajustarse a cada persona que lo requiera, dependiendo del requerimiento nutricional, hábitos de alimentación y metas del tratamiento.⁴

2.4.2. Tratamiento farmacológico

La mayoría de los pacientes diagnosticados con algún tipo de diabetes mellitus, requieren tratamiento farmacológico, dado que no logran mantener un control adecuado en sus niveles de glucosa en la sangre. Para que la población diagnosticada con cualquier tipo de diabetes pueda tener control de sus niveles de glucemia, existen actualmente más de cinco tipos de fármacos hipoglucemiantes con mecanismo de acción diferente, de los cuales existen una gran cantidad de medicamentos disponibles.⁹ Gracias a la amplia variación disponible, estos medicamentos permiten a los profesionales de la salud adaptar el enfoque terapéutico a las necesidades individuales de cada paciente.

⁹. Ayala, P., Calvo, C., Herrada, M., López, M. & Tezanos, R. (2002): "Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus", *Offarm*, 21(10), pp. 120-124. Disponible en: <https://n9.cl/54wgz>

2.4.2.1. Sulfonilureas

Son una clase de compuestos orgánicos usados como fármacos orales antidiabéticos. Contienen un núcleo general formado por un grupo sulfonilo unido a la urea (Figura 1), del cual deriva su nombre: sulfonilureas.

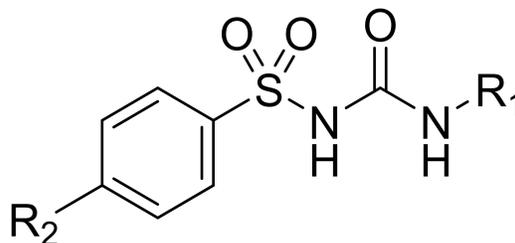


Figura 1. Estructura general de las sulfonilureas.

Desde 1946 han sido empleados en la terapia contra la DM2, debido a su efecto insulinosecretor, por ello, son especialmente útiles en la etapa temprana de la DM2, dado que, el fármaco ejerce su principal acción sobre las células β , requiriendo que las células β sean funcionales, condición que no cumple la DM1 ni la DM2 en etapa avanzada. Este tipo de fármaco induce la secreción de insulina, que resulta en la disminución de la glucosa plasmática.⁵

Se conocen dos tipos de sulfonilureas, las cuales se han clasificado en base a su descubrimiento y aspectos farmacocinéticos: de primera y segunda generación. Actúan de manera similar; sin embargo, debido a las diferencias estructurales, las características farmacocinéticas cambian. Las sulfonilureas más usadas de la primera generación destacan: la tolbutamida (Figura 2) y la clorpropamida. Por otro lado, entre las sulfonilureas de segunda generación más empleadas se distinguen la glibenclamida (Figura 3) y la glipizida.⁵

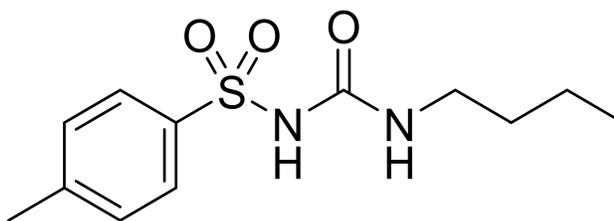


Figura 2. Estructura de la tolbutamida.

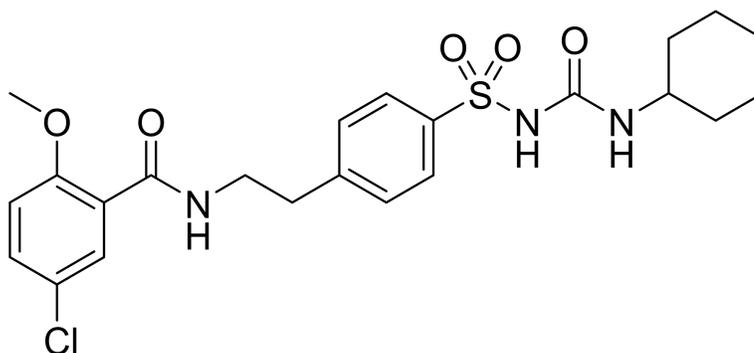


Figura 3. Estructura de la glibenclamida.

2.4.2.2. Inhibidores de la enzima α -glucosidasa

Son un grupo de fármacos usados en el tratamiento de la DM2, aprobados en la década de los 90, cuyo mecanismo de acción es inhibir la enzima α -glucosidasa. Esto retrasa la absorción de los carbohidratos por parte del organismo y, por lo tanto, también reduce el incremento o variaciones en la glucemia posprandial en alrededor de 3 mM.¹⁰

¹⁰. Akmal, M. & Wadhwa, P. (2022): "Alpha Glucosidase Inhibitors", *StatPearls*. Disponible en: <https://n9.cl/2kxtxl>

Considerados como inhibidores competitivos dependientes de la dosis, inhiben de forma reversible principalmente a la sacarasa y a la maltasa presentes en las vellosidades intestinales que se encargan del desdoblamiento de la sacarosa y maltosa en monosacáridos absorbibles (fructosa y glucosa).¹⁰

Han sido desarrollados tres fármacos de esta clase: acarbosa (Figura 4), miglitol (Figura 5) y voglibosa; sin embargo, este último solo se comercializa en Japón.⁴ La acarbosa (C₂₅H₄₃NO₁₈) es el fármaco más empleado y más estudiado de esta categoría. La acarbosa posee una estructura de pseudo-tetrasacárido, que se aísla como metabolito secundario de cepas de cultivo de *Actinoplanes*.¹¹ La estructura de pseudo-tetrasacárido se asemeja a la de los oligómeros y disacáridos que se obtienen a través de la digestión de los carbohidratos, por esta razón tiene la capacidad de actuar como un inhibidor competitivo de la enzima α -glucosidasa, por un periodo de 4 a 6 horas.

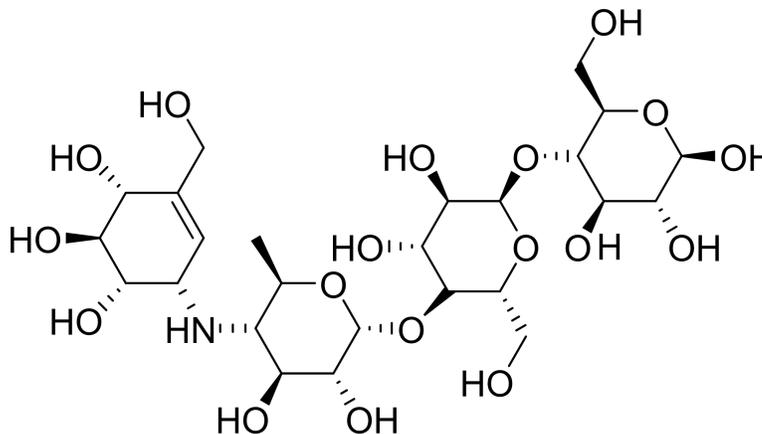


Figura 4. Estructura de la acarbosa.

¹¹. Green, G., Evans, J. & Vong, A. (1996): "Pyrans and their Benzo Derivatives: Applications", *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, 5, pp. 469-500. Disponible en: <https://n9.cl/vohrb>

El miglitol es un fármaco derivado de la 1-desoxinojirimicina, con fórmula química $C_8H_{17}NO_5$, posee una estructura química que es conocida como iminoazúcar.¹² Al poseer una estructura muy similar a los monosacáridos puede actuar como un inhibidor competitivo de la enzima α -glucosidasa. Aunque la acarbosa y el miglitol se asemejan estructuralmente a los hidratos de carbono, estos poseen diferencias que hacen que el miglitol sea hasta seis veces más potente al inhibir a la sacarasa respecto a la acarbosa.⁶

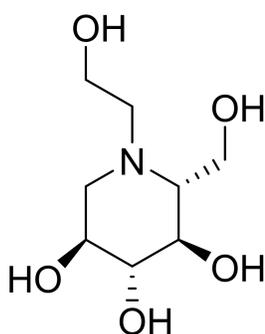


Figura 5. Estructura del Miglitol.

2.4.2.3. Insulinas

La insulina es una hormona, la cual es utilizada como fármaco para el tratamiento de la diabetes mellitus. Las insulinas disponibles en el mercado difieren entre sí desde la técnica de producción por recombinación de ADN, la secuencia de aminoácidos, la concentración, la solubilidad y el tiempo de acción biológica.⁶

¹². Alonzi, D., Scott, K., Dwek, R. & Zitzmann, N. (2017): "Iminosugar antivirals: the therapeutic sweet spot", *Biochemical Society Transactions*, 45(2), pp. 571-582. Disponible en: <https://n9.cl/jxiqu>

Desde principios del siglo XX ha sido utilizada para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 y 2.⁴

La insulina es indispensable en el tratamiento de la DM1, debido a la deficiencia absoluta en la secreción de insulina endógena, por lo cual, la supervivencia del paciente con DM1 depende de la administración de insulina exógena.

La mayoría de los pacientes con DM2 no requieren de insulina exógena para su supervivencia al inicio de la enfermedad; sin embargo, con el paso del tiempo se requiere de insulina exógena para su tratamiento.⁵

Las insulinas se clasifican de acuerdo a su tiempo de acción. Existen insulinas de acción rápida, que tienen un inicio de acción muy rápido y una corta duración de acción; de acción corta, con un inicio rápido y duración de acción breve; de acción intermedia, con un inicio y tiempo de acción intermedios; de acción prolongada, con un tiempo de inicio y duración de acción prolongados.⁶

2.4.2.4. Biguanidas

Son una clase de compuestos orgánicos utilizados ampliamente como fármacos orales antidiabéticos. Contienen una estructura general conformada por una molécula de biguanida (Figura 6), de la cual deriva su nombre: biguanidas.⁵

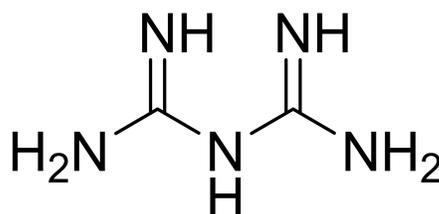


Figura 6. Estructura de la biguanida.

Aunque han sido desarrolladas varias de estas, actualmente se utiliza únicamente la metformina (Figura 7).⁶

Con más de 50 años de experiencia en el mercado, la metformina es el fármaco de primera elección y el más utilizado para el tratamiento de la DM2. La metformina actúa inhibiendo la producción hepática de glucosa, por ello es de gran ayuda al tratamiento farmacológico de la DM2, además de ejercer efectos de gran importancia en la utilización de la glucosa y la captación de la misma. La metformina presenta ventajas en comparación con la insulina y las sulfonilureas. Estas ventajas incluyen la capacidad de estabilizar el peso corporal y la ausencia de hipoglucemia.^{5, 6}

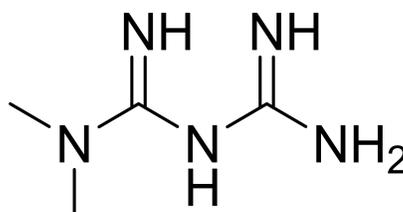


Figura 7. Estructura de la metformina.

2.4.2.5. Tiazolidinediona

Las tiazolidinedionas, también llamadas glitazonas pertenecen a una clase de compuestos orgánicos heterocíclicos utilizados frecuentemente como agentes antidiabéticos orales. Contienen una estructura general conformada por una molécula de 2,4-tiazolidinediona (Figura 8), de la cual deriva su nombre: tiazolidinedionas.

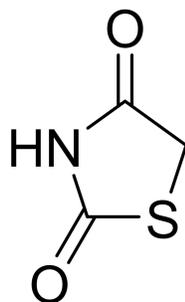


Figura 8. Estructura de la 2,4-tiazolidinediona.

Las glitazonas son comúnmente utilizadas como complemento farmacológico junto con otros hipoglucemiantes orales para el tratamiento de la DM2, haciendo su efecto sobre la glucemia. Actúan incrementando la captación de la glucosa y utilización de la glucosa por parte de los tejidos, dicho efecto se asocia a una mejora en los niveles de glucosa circulante y una reducción de la insulinemia sin tener efecto en la hipoglucemia.^{4, 5} Han sido desarrolladas una gran cantidad de este tipo de moléculas, por ejemplo, la troglitazona, fue el primer fármaco de esta clase en comercializarse. Por otro lado, la pioglitazona (Figura 9), es actualmente el único fármaco de esta clase que se mantiene en uso clínico.⁴

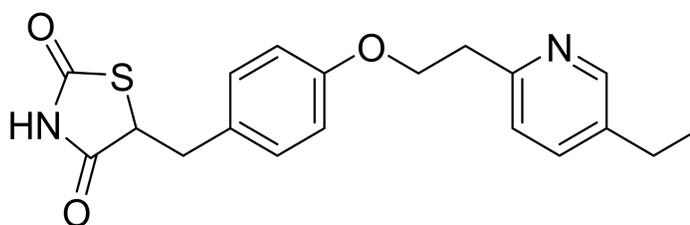


Figura 9. Estructura de la pioglitazona.

2.4.2.6. Meglitinidas

Este tipo de fármacos orales para el tratamiento de la DM2, son derivados de la meglitinida (Figura 10).

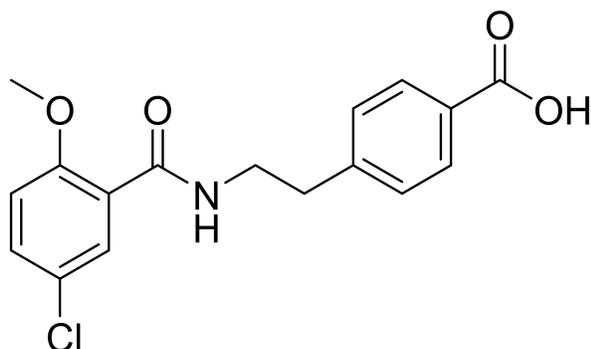


Figura 10. Estructura de la meglitinida.

Este tipo de fármacos son utilizados cuando el ejercicio físico y la dieta por sí solos no son suficientes para controlar la DM2 en los pacientes.⁵ Las meglitinidas actúan como estimulantes de la secreción de insulina, aunque su eficacia suele ser menor en comparación con otros fármacos.^{5, 6} Sin embargo, estos tienen la ventaja de tener un tiempo de acción rápido, lo que reduce el riesgo de hipoglucemias. Cuando el paciente está en etapa avanzada de la enfermedad, estos suelen ir acompañados con otros hipoglucemiantes. Actualmente en uso clínico se utilizan la repaglinida y la nateglinida (Figura 11).⁵

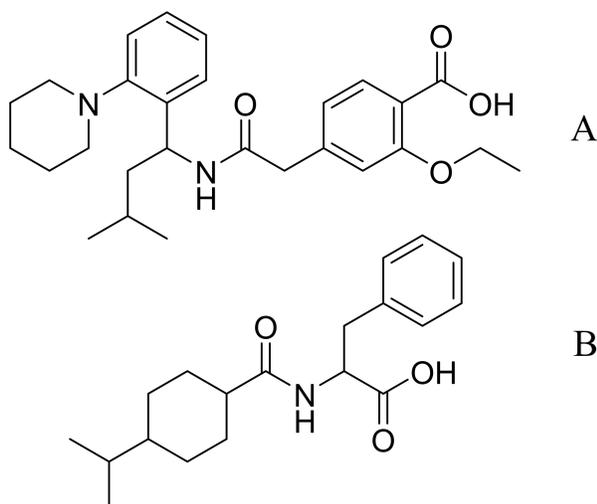


Figura 11. Estructura de la repaglinida (A) y nateglinida (B).

2.5. Hidratos de carbono

Diversos términos han sido empleados cotidianamente por la comunidad científica y la sociedad para referirse a ellos: carbohidratos, azúcares, sacáridos y glúcidos. Constituyen las biomoléculas con mayor abundancia en la naturaleza con aproximadamente el 75% de materia orgánica, son compuestos orgánicos formados por carbono, hidrógeno y oxígeno.^{13, 14}

Los hidratos de carbono cubren una amplia variedad de funciones, desde la vertiente energética, constituyen el principal recurso de energía para el ser humano (glucosa), como elemento estructural, componen la estructura fibrosa y leñosa de las especies vegetales y animales (celulosa), además de actuar como precursores de ciertos lípidos y aminoácidos.^{13, 14}

2.5.1. Clasificación de hidratos de carbono

Estructuralmente, los carbohidratos son derivados aldehídicos o cetónicos de polialcoholes y pueden ser clasificados con respecto al número de unidades de azúcares simples contenidos en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.¹⁴

^{13.} Lozano, J., Galindo, J., García, J., Martínez, J., Peñafiel, R. & Solano, F. (2005): *Bioquímica y Biología Molecular para ciencias de la salud*, 3a edición, Madrid, McGraw-Hill.

^{14.} Laguna, J. & Piña, E. (1990): *Bioquímica*, 4a edición, México, SALVAT.

2.5.1.1. Monosacáridos

También llamados azúcares simples, son aquellas moléculas en las cuales, ya no es posible llevar a cabo una fragmentación por hidrólisis. Nombrados además como cetosas, a aquellos con un grupo cetona en su estructura y aldosas, a aquellos con un grupo aldehído en su estructura. Con respecto al número de átomos de carbono que componen la molécula, se conocen las triosas con tres átomos de carbono, son los azúcares más pequeños, las tetrasas, las pentosas, las hexosas y las heptosas, con cuatro, cinco, seis y siete átomos de carbono respectivamente.¹⁴

Los azúcares simples con mayor abundancia e importancia en los organismos vivos, son la fructosa, la glucosa y galactosa (hexosas).¹⁵

2.5.1.1.1. Glucosa

Recurso omnipresente en todos los organismos vivos, es el combustible principal para las células vivas. Tanto para los organismos con respiración aerobia y anaerobia, la glucosa es la principal fuente de energía. Entre los mayores aportadores de glucosa (Figura 12) al organismo incluyen la sacarosa, la lactosa, el jarabe de maíz de alta fructosa y el almidón (amilopectina y amilosa).¹⁵

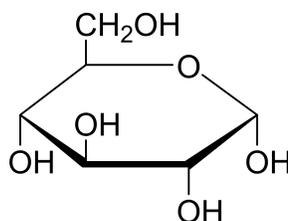


Figura 12. Glucosa.

^{15.} Mckee, T. & Mckee, J. (2020): *Bioquímica Las bases moleculares de la vida*, 7a edición, México, McGraw-Hill.

2.5.1.1.2. Fructosa

Presente en la fruta, vegetales y miel, es la cetosa más común. Cada gramo de fructosa (Figura 13), da el doble de sabor dulce respecto a la glucosa. Por ello, es el monosacárido más empleado en la industria alimenticia como agente edulcorante.¹⁵

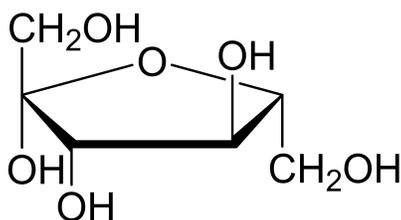


Figura 13. Fructosa.

2.5.1.1.3. Galactosa

Posee la misma fórmula molecular que la glucosa y dispone de casi la misma estructura. Diferenciadas únicamente por la posición de uno de los grupos hidroxilo (OH); sin embargo, dicha diferencia, cambia completamente las propiedades químicas de ambos monosacáridos. El mayor recurso de aporte de galactosa (Figura 14) es la lactosa, la cual se encuentra únicamente en productos lácteos. Es indispensable para sintetizar una variedad de biomoléculas.¹⁶

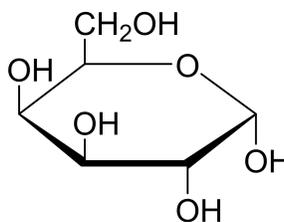


Figura 14. Galactosa.

¹⁶. Williams, C. (2003): "Galactose", *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, pp. 2843-2846. Disponible en: <https://n9.cl/rqh7zl>

2.5.1.2. Disacáridos

Formados por la unión de dos unidades de monosacáridos a través del enlace O-glucosídico, se forman por la condensación entre un grupo hidroxilo del carbono anomérico de uno de los monosacáridos y un grupo hidroxilo del otro monosacárido. Los disacáridos más importantes a nivel fisiológico destacan principalmente la sacarosa, la lactosa y la maltosa.^{13, 15}

2.5.1.2.1. Lactosa

La lactosa (Figura 15) es un disacárido presente en la leche, denominado por ello como azúcar de leche, se forma en las glándulas mamarias de los mamíferos,¹⁴ por una molécula de galactosa y glucosa, enlazados por medio de un enlace β -glucosídico, entre el grupo hidroxilo del carbono anomérico de la galactosa al grupo hidroxilo del carbono 4 de la glucosa.¹⁵ Al llevar a cabo una reacción de hidrólisis, esta origina D-glucosa y D-galactosa, tal como sucede en el intestino delgado por acción de la enzima lactasa (Figura 26).¹⁴

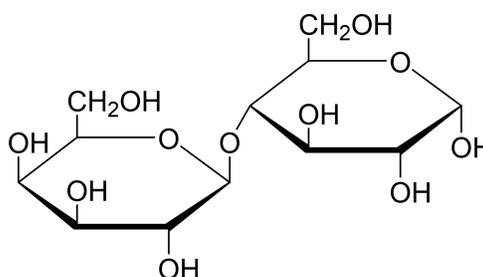


Figura 15. Lactosa.

2.5.1.2.2. Maltosa

La maltosa (Figura 16), popularmente conocida como azúcar de malta, no existe en forma libre naturalmente, es un producto intermediario de la hidrólisis del almidón.¹⁵

Estructuralmente formado por la unión de dos moléculas de glucosa a través del enlace glucosídico del carbono anomérico de una molécula y el carbono 4 de otra. Al ser hidrolizada en el intestino por acción de la maltasa, da lugar a dos moléculas de D-glucosa que serán absorbidas por el organismo (Figura 23).¹⁴

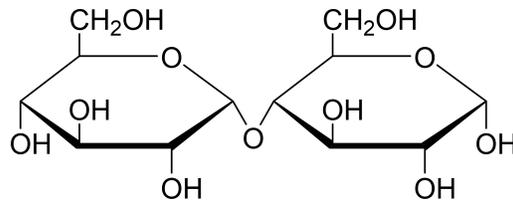


Figura 16. Maltosa.

2.5.1.2.3. Sacarosa

La sacarosa (Figura 17), la cual es conocida y consumida mundialmente como azúcar de mesa, se sintetiza en las hojas y tallos de plantas, más no en animales.¹⁵ Se forma por la unión de una molécula de glucosa y una molécula de fructosa a través del enlace glucosídico, el cual está conectado a diferencia de la maltosa y lactosa, en ambos carbonos anoméricos.¹⁴ Cuando la enzima sacarasa hidroliza una unidad de sacarosa en el organismo, da origen correspondientemente a los monosacáridos que la conforman: una unidad de D-glucosa y una de D-fructosa (Figura 25).

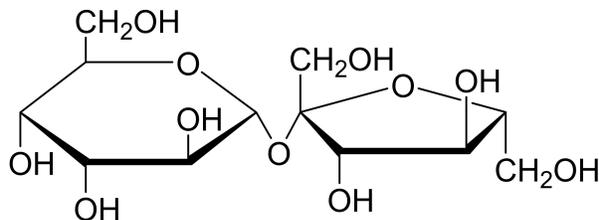


Figura 17. Sacarosa.

2.5.1.3. Oligómeros

Consisten en la unión de pocas unidades de monosacáridos, generalmente de tres a diez unidades. A nivel fisiológico, tiene importancia el trisacárido maltotriosa (Figura 18), el cual se forma por la hidrólisis aleatoria del almidón. Al hidrolizar una molécula de maltotriosa en el organismo por acción de la enzima α -glucosidasa (maltasa), se liberan las tres moléculas de D-glucosa (Figura 24).¹³

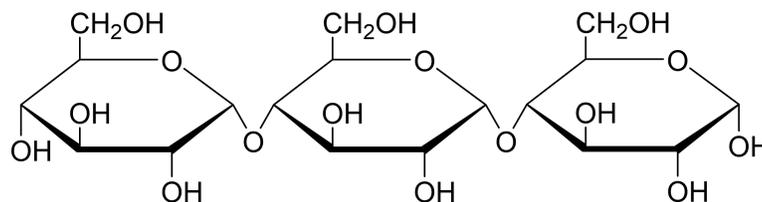


Figura 18. Maltotriosa.

2.5.1.4. Polisacáridos

Denominados además como glucanos, son una serie de macromoléculas formadas por un gran número de monómeros de un azúcar simple (Figura 19). Estos pueden ir desde las diez unidades de monosacáridos hasta miles de unidades monoméricas, con pesos moleculares de medianos a altos.^{14, 15} Estos difieren entre sí debido al monómero repetitivo, dependiendo de la longitud de la cadena, por la posición de los enlaces glucosídicos y por el grado de ramificación.¹⁷

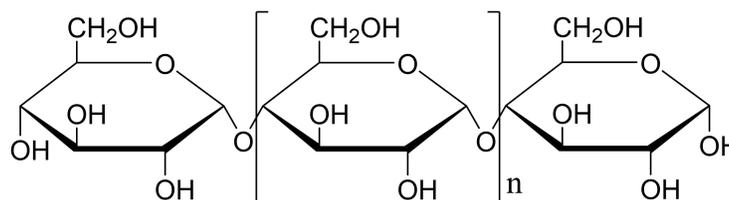


Figura 19. Amilosa (almidón).

¹⁷. Nelson, D. & Cox, M. (2019): *Principios de Bioquímica, 7a*, Omega.

2.6. Digestión de hidratos de carbono

Los hidratos de carbono de la dieta se integran en su mayoría por polisacáridos. Los almidones, la celulosa y las dextrinas representan las principales cadenas poliméricas consumidas, además del disacárido sacarosa. A través de la digestión de los hidratos de carbono, las cadenas poliméricas son hidrolizadas hasta convertirlas en monosacáridos simples, para ser absorbidos por el cuerpo.¹⁴

El primer proceso digestivo de los carbohidratos se realiza en la boca, dicho proceso comienza cuando el bolo alimenticio tiene contacto con la saliva. Además de la lubricación y humedad que aporta la saliva, en ella está presente la enzima α -amilasa salival, cuya acción consiste en iniciar la hidrólisis de los almidones consumidos (amilosa y amilopectina). El proceso es realizado únicamente mientras el bolo alimenticio es mantenido en la boca, puesto que la enzima α -amilasa salival no es activa en el pH ácido del estómago.¹³

El proceso de digestión de los carbohidratos continúa en el duodeno, efectuado por la enzima α -amilasa pancreática, sintetizada por el páncreas y liberada en el jugo pancreático. La enzima α -amilasa pancreática, con la misma actividad que la α -amilasa salival continúa con la hidrólisis de los polisacáridos hasta convertirlos en su forma de disacáridos y oligosacáridos, esencialmente en maltosa y maltotriosa. El proceso es realizado completamente dado al mayor tiempo de contacto entre los polisacáridos y la α -amilasa pancreática, variable de 3 a 5 horas.¹³

Los oligosacáridos remanentes y los disacáridos son hidrolizados finalmente a monosacáridos por la acción de las carbohidrasas, principalmente por la maltasa, la sacarasa y la lactasa, específicas para la maltosa y maltotriosa, la sacarosa y la lactosa, respectivamente, liberando glucosa, fructosa y galactosa.¹³

2.6.1. Enzimas glucosidasas

Representan un conjunto de enzimas, cuya función consiste en catalizar la hidrólisis de hidratos de carbono en monosacáridos. Estas son indispensables en el proceso digestivo, ya que ayudan a que el cuerpo pueda absorber la glucosa. Reciben su nombre específico en base al sustrato sobre el cual actúan, por el tipo de enlace hidrolizado y por el mecanismo de acción que llevan a cabo.¹⁸

2.6.1.1. Amilasas

2.6.1.1.1. α -amilasa salival

Rompe los enlaces α -(1,4) glucosídicos de las moléculas de amilosa y amilopectina, con el fin de generar oligómeros cortos (Figura 20, 21).¹³

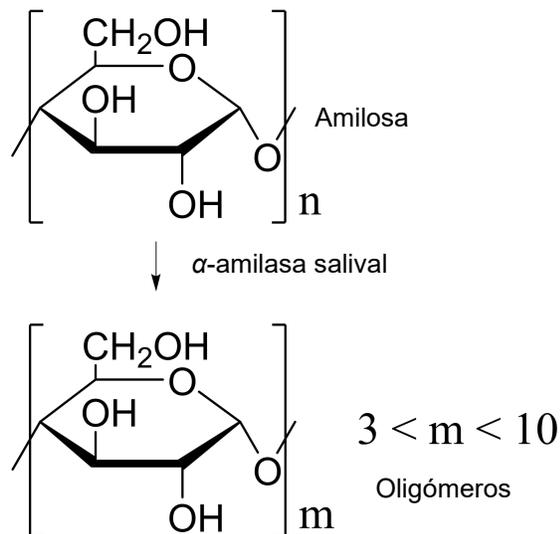


Figura 20. Representación de la hidrólisis de la amilosa efectuada por la α -amilasa.

¹⁸. Inamdar, A., Sangawe, V. & Adhapure, N. (2022): "Enzymes in rhizosphere engineering", *Rhizosphere Engineering*, pp. 259-272. Disponible en: <https://n9.cl/3x5am>

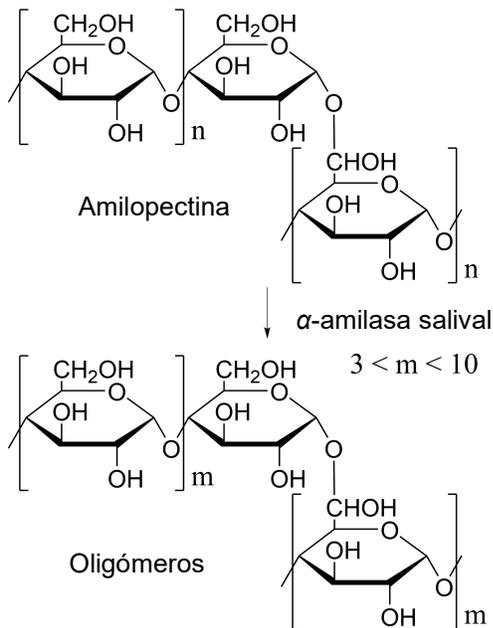


Figura 21. Representación de la hidrólisis de la amilopectina efectuada por la α -amilasa.

2.6.1.1.2. α -amilasa pancreática

Rompe los enlaces α -(1,4) de los oligómeros de cadena más corta generados por la α -amilasa salival con el fin de generar principalmente, maltosa y maltotriosa (Figura 22).¹³

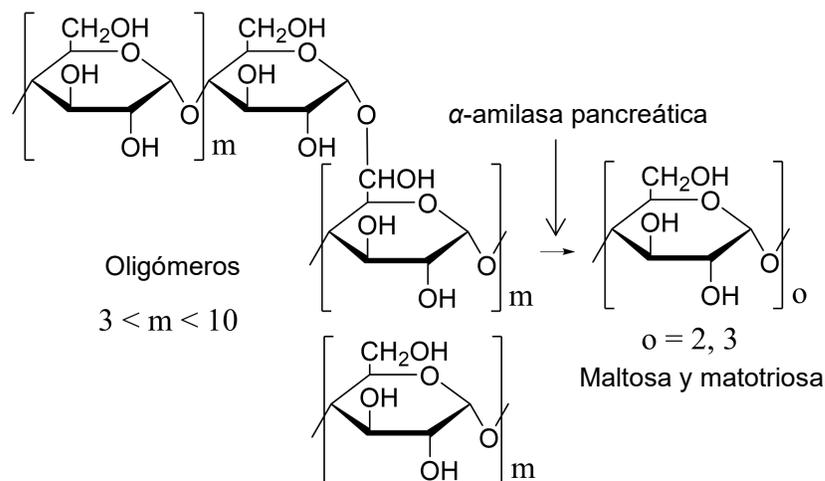


Figura 22. Representación de la hidrólisis efectuada por la α -amilasa pancreática sobre los polisacáridos.

2.6.1.2. α -glucosidasas

2.6.1.2.1. Maltasa

Hidroliza el enlace α -glucosídico de la maltosa o la maltotriosa, liberando dos o tres moléculas de glucosa respectivamente (Figura 23, 24), que pueden ser absorbidas por el organismo.¹³

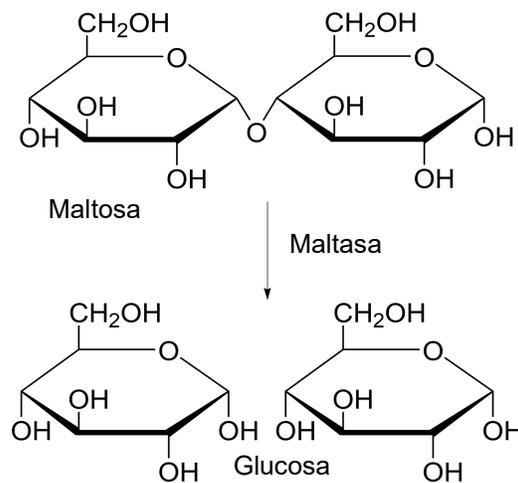


Figura 23. Representación de reacción efectuada por la maltasa sobre la maltosa.

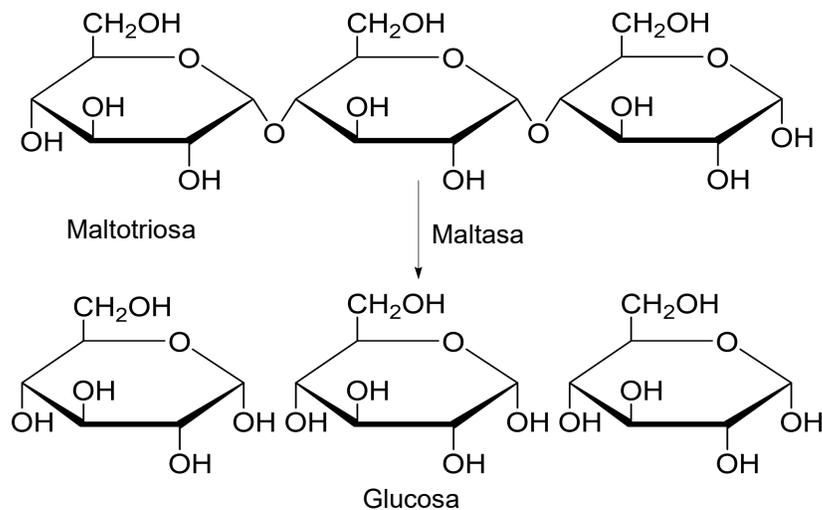


Figura 24. Representación de reacción efectuada por la maltasa sobre la maltotriosa.

2.6.1.2.2. Sacarasa

Hidroliza los enlaces α -glucosídicos de la sacarosa, liberando una molécula de fructosa y una molécula de glucosa (Figura 25), de forma que el organismo es capaz de absorberlas.¹³

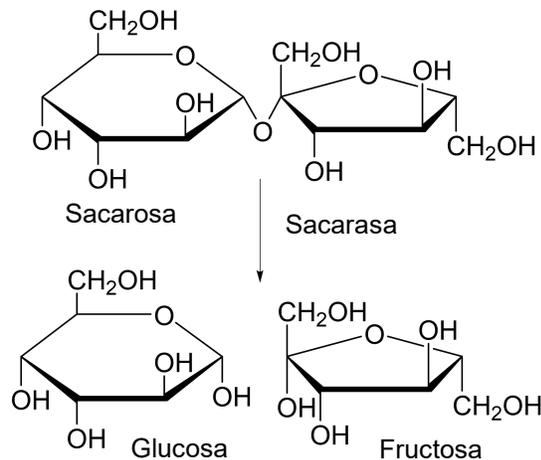


Figura 25. Representación de reacción efectuada por la sacarasa sobre la sacarosa.

2.6.1.3. β -galactosidasa

2.6.1.3.1. Lactasa

Hidroliza el enlace β -glucosídico de la lactosa, produciendo una molécula de galactosa y otra de glucosa (Figura 26), con el fin de poder ser procesadas por el organismo.¹³

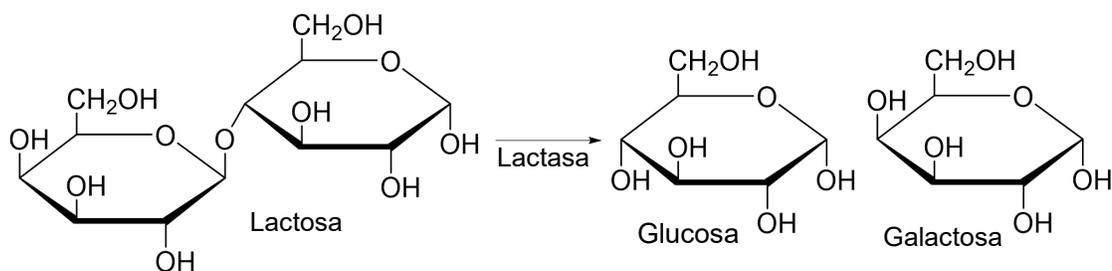


Figura 26. Representación de reacción efectuada por la lactasa sobre la lactosa.

2.7. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae nombrada también como Compositae es el grupo de plantas más amplio de todo el mundo. La familia Asteraceae consta de 32,913 especies, las cuales se agrupan en 1,911 géneros.¹⁹

Las Asteraceae tienen una distribución cosmopolita, a excepción de la Antártica, se encuentran presentes a lo largo de las regiones tropicales y subtropicales de Norte América, en los Andes, en las regiones del mar Mediterráneo, Asia central, el este de Brasil, el sur de África y el suroeste de China.

De las 32,913 especies, la mayor parte corresponde a especies herbáceas y el resto corresponden al tipo arbusto o inclusive árboles, cuya distribución se encuentra principalmente en las regiones tropicales de África, América del Norte y del sur y Madagascar.²⁰

Tabla 4. Géneros de Asteraceae más abundantes en el mundo.

Género	No. de especies aceptadas
<i>Senecio</i>	1600
<i>Hieracium</i>	1411
<i>Vernonia</i>	1000
<i>Cousinia</i>	687
<i>Artemisia</i>	474
<i>Baccharis</i>	400
<i>Mikania</i>	250

19. (2013): “Compositae”, *The Plant List*. Disponible en: <https://n9.cl/4dnec>

20. Panero, Jose L. & Crozier, Bonnie. (2012): “Asteraceae”, *Internet Archive*, 27 de enero. Disponible en: <https://n9.cl/m631u>

La familia Compositae es de gran importancia a nivel mundial, debido a la gran demanda alimenticia que cubren, como es el caso de *Lactuca sativa*, mejor conocida como lechuga, *Cynara scolymus* (alcachofa) o *Helianthus annuus* (girasol). Así mismo, son apreciadas desde el punto de vista culinario, como lo son *Cichorium intybus* o *Taraxacum*, para uso ornamental, incluyen diversas especies tales como *Tagetes erecta*, conocida principalmente como flor de cempasúchil en México, *Dimorphotheca pluvialis* o *Cosmos atrosanguineus*.

Chamaemelum nobile mayormente conocida como manzanilla, ha sido ampliamente utilizada en medicina tradicional, así como *Inula helenium* o *Santolina chamaecyparissus*.

Los constituyentes químicos de la familia Compositae han sido ampliamente estudiados, dado su gran campo de aplicación ya mencionado. Dichos estudios químicos han resultado en el aislamiento de más de 5,000 metabolitos secundarios, tales como esteroides, terpenos (diterpenos, sesquiterpenos y triterpenos), alquenos, compuestos fenólicos: flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos, taninos, entre otros.^{21, 22, 23, 24, 25} Los terpenos son los más comunes en este género, siendo así que se cuenta con un aproximado de 3,000 estructuras de sesquiterpenos conocidas.²⁵

-
21. Kasterova, E., Revushkin, A. & Zibareva, L. (2019). "Secondary metabolites of some Siberian species of plants tribe Cynareae (Asteraceae)", *South African Journal of Botany*, 125, pp. 24-29. Disponible en: <https://n9.cl/i4jbb7>
 22. Jepkoech, C., Kerubo, L., Nchiozem-Ngnitedem, V., Kenanda, E., Guefack, F., Mbaveng, A., Kuete, V. & Heydenreich, M. (2022). "Antibacterial secondary metabolites from *Vernonia auriculifera* Hiern (Asteraceae) against MDR phenotypes", *Natural Product Research*, 36, pp. 3203-3206. Disponible en: <https://n9.cl/1fzjl>
 23. Urzúa, A. (2004). "Secondary metabolites in the epicuticle of *Haplopappus foliosus* dc. (Asteraceae)", *Journal of the Chilean Chemical Society*, 49(2), pp. 137-141. Disponible en: <https://n9.cl/roh8z>
 24. Schwabe, T., Ferreira, M., Alvarenga, S. & Emerenciano, V. (2003). "Neural Networks for Secondary Metabolites Prediction in *Artemisia* Genus (Asteraceae)", *Internet Electronic Journal of Molecular Design*. Disponible en: <https://n9.cl/g6m86>
 25. Funck, V., Susanna, A., Stuessy, T. & Bayer, R. (2009). *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. Disponible en: <https://n9.cl/odlb7>

2.7.1. Familia Asteraceae en México

México forma parte del conjunto de los doce países megadiversos,²⁶ siendo Asteraceae la familia de flora más grande y diversa comprendida en el territorio nacional.^{27, 28} En México, la familia Asteraceae ostenta una riqueza cuantiosa, la cual registra 3,057 especies,²⁷ las cuales se agrupan en 417 géneros. Los géneros más notables por el número de especies identificadas, así como por el número de especies endémicas y microendémicas se muestran en la Tabla 5,²⁸ refiriéndose a especies endémicas a cuyas especies se extienden a lo largo del territorio mexicano. Las especies microendémicas son aquellas especies cuyo linaje se restringe a un solo estado del territorio nacional.

Tabla 5. Géneros de Asteraceae más abundantes en México.

Género	Especies	Endémicas	Microendémicas
<i>Ageratina</i>	167	135	41
<i>Verbesina</i>	164	138	43
<i>Stevia</i>	116	95	19
<i>Erigeron</i>	87	65	16
<i>Brickellia</i>	85	57	11
<i>Acourtia</i>	76	67	14
<i>Bidens</i>	68	43	15

^{26.} (2023): “¿Qué es un país megadiverso?”, 17 de agosto. Disponible en: <https://n9.cl/f4c5k>

^{27.} Villaseñor, J. (2016): “Check list of the native vascular plants of Mexico”, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87, pp. 559-902. Disponible en: <https://n9.cl/3dgm8>

^{28.} Villaseñor, J. (2018): “Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México”, *Botanical Sciences*, 96(2), pp. 332-358. Disponible en: <https://n9.cl/tbaea>

Las especies de la familia Asteraceae poseen un perfil químico deseable desde el punto de vista farmacológico, ya que cuentan con propiedades farmacológicas conocidas, tales como agentes antiinflamatorios, antitumorales, antiparasitarios y antibacterianos, así como efecto hepatoprotector, cicatrizante, entre otras. Por tal razón, han sido ampliamente utilizadas en el territorio nacional como medicina tradicional.²⁹

En el estado de Hidalgo, la familia Asteraceae es la más extensa en cuanto al número de especies presentes, así mismo encabeza la lista de las familias más utilizadas en la medicina tradicional.³⁰

Cientos de estudios científicos han sido llevados a cabo en México con especies de la familia Asteraceae, siendo algunos de ellos orientados al estudio de las especies como agentes antidiabéticos.^{31, 32, 33, 34}

-
29. López, V., Cariño, R. & Zurita, L. (2021): "Ethnopharmacology of the Asteraceae family in Mexico", *Botanical Sciences*, 99(3), pp. 455-486. Disponible en: <https://n9.cl/eanhe>
30. Pérez, B., Villavicencio, M. & Ramírez, A. (2003): *Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo*, Pachuca, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
31. Rivera, S., Vásquez, A., Navarrete, A., Hernández, M., Linares, E., Bye, R. & Mata, R. (2017): "Anti-Hyperglycemic Activity of Major Compounds from *Calea ternifolia*", *Molecules*, 22(2). Disponible en: <https://n9.cl/y0dts>
32. Castilho, P. & Spínola, V. (2017): "Evaluation of Asteraceae herbal extracts in the management of diabetes and obesity. Contribution of caffeoylquinic acids on the inhibition of digestive enzymes activity and formation of advanced glycation end-products (*in vitro*)", *Phytochemistry*, 143, pp. 29-35. Disponible en: <https://n9.cl/r3wnc>
33. Martínez, A., Mazón, A., Cruz, I., Bye, R. & Mata, R. (2017): "Antidiabetic and Antihyperalgesic Effects of a Decoction and Compounds from *Acourtia thurberi*", *Planta Medica*, 83(6), pp. 534-544. Disponible en: <https://n9.cl/yqt2o>
34. Ramírez, G., Zavala, M., Pérez, J. & Zamilpa, A. (2012): "In Vitro Screening of Medicinal Plants Used in Mexico as Antidiabetics with Glucosidase and Lipase Inhibitory Activities", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. Disponible en: <https://n9.cl/vwcy>

2.8. Género *Zaluzania*

Se trata de un género de angiospermas, el cual fue descrito por primera vez por Christiaan Hendrik Persoon, empleando como especie tipo a *Zaluzania triloba*, la cual fue publicada en su libro titulado *Synopsis Plantarum*, tomo II en 1807.³⁵ Compete a un género con apenas 14 especies aceptadas, de las 36 especies que han sido descritas.³⁶

El género *Zaluzania* es nativo de México, presente en estados como Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Aguascalientes, Durango, Puebla, Zacatecas, Oaxaca, Coahuila, entre otros.³⁷ A excepción de *Zaluzania grayana*, la cual ha sido reportada encontrada en Arizona y Nuevo México.³⁶

La Tabla 6 muestra las especies aceptadas del género *Zaluzania*.³⁶

Tabla 6. Especies aceptadas del género *Zaluzania*.

Nombre	Nombre
<i>Z. augusta</i> (Lag.) Sch. Bip.	<i>Z. megacephala</i> var. <i>coahuilensis</i> Olsen
<i>Z. augusta</i> var. <i>rzedowskii</i> McVaugh	<i>Z. mollissima</i> A. Gray
<i>Z. delgadoana</i> B.L. Turner	<i>Z. montagnaeifolia</i> Sch. Bip.
<i>Z. discoidea</i> A. Gray	<i>Z. parthenioides</i> (DC.) Rzed.
<i>Z. durangensis</i> B.L. Turner	<i>Z. pringlei</i> Greenm.
<i>Z. grayana</i> B.L. Rob. and Greenm.	<i>Z. subcordata</i> W.M. Sharp
<i>Z. megacephala</i> Sch. Bip.	<i>Z. triloba</i> (Ortega) Pers.

^{35.} (2023): “Zaluzania Pers”, *Tropicos*. Disponible en: <https://n9.cl/easr8n>

^{36.} Torres, J., Zeferino, R., Ortiz, L., Téllez, M. & Escamilla, R. (2023): “Chemical Composition of Plants of the Genus *Zaluzania*”, *Natural Product Communications*, 18(6), pp 1-10. Disponible en: <https://n9.cl/6yxnx>

^{37.} Suárez, M. & Villaseñor, J. (2020): “Ecological niche overlap among species of the genus *Zaluzania* (Asteraceae) from the dry regions of Mexico”, 153(3), pp. 337-347. Disponible en: <https://n9.cl/052zr>

El género *Zaluzania* ha sido empleado en la medicina tradicional en el territorio nacional. Algunos reportes indican que las especies *Z. augusta* y *Z. montagnifolia* poseen propiedades farmacológicas para el tratamiento de la diabetes.^{1, 38} Algunos otros indican que las especies *Z. montagnifolia* y *Z. triloba* poseen propiedades farmacológicas abortivas,^{38, 39} además de también poseer propiedades analgésicas (tratamiento del dolor de estómago) y para el tratamiento de heridas.³⁰

2.8.1. Composición química del género *Zaluzania*

La composición química del género *Zaluzania* ha sido estudiada en algunas de las especies que lo comprende. Es común encontrar en este género lactonas sesquiterpénicas y flavonoides principalmente, además de monoterpenos y sesquiterpenos.³⁶ Entre algunos de sus componentes comunes, se encuentra la zaluzanina C (Figura 27), la cual ha sido reportada por diversos autores en *Z. augusta*, *Z. grayana*, *Z. triloba*, *Z. parthenoides* y *Z. robinsonii*.^{36, 40, 41, 42, 43}

-
38. Ruano, N., Pacheco, Y., Lozoya, G., Rubio, E., Ruiz, N., Martínez, Y., Cruz, R., Ramirez, A. & Ramón, L. (2013): "Lipophilic constituents and some biological activities of hexanic extracts from *Zaluzania montagnifolia*, (SCH. BIP.) SCH. BIP. (Asteraceae)", *Agrociencia*, 47, pp. 335-346. Disponible en: <https://n9.cl/m7ley>
39. Andrade, A. (2008): "Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México", *Journal of Ethnopharmacology*, 122, pp. 163-171. Disponible en: <https://n9.cl/97w0v>
40. Romo, A., Cabrera, A., Ortega, A., Romo, J. (1967): "Constituents of zaluzania species-II Structures of Zaluzanin C and Zaluzanin D", *Tetrahedron*, 23, pp. 3903-3907. Disponible en: <https://n9.cl/v7085>
41. Spring, O., Buschmann, H., Vogler, B., Schilling, E. & Hoffmann, M. (1995): "Sesquiterpene lactone chemistry of *Zaluzania grayana* from on-line LC-NMR measurements", *Phytochemistry*, 39(3), pp. 609-612. Disponible en: <https://n9.cl/0en02>
42. Jolad, S., Wiedhopf, R. & Cole, J. (1974): "Tumor-Inhibitory Agent From *Zaluzania Robinsonii* (Compositae)", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, pp. 1321-1322. Disponible en: <https://n9.cl/kyl75>
43. Domínguez, X., Marroquín, J. & Cárdenas, E. (1975): "Isolation of Zaluzanin-C a cytotoxic sesquiterpenelactone from *Zaluzania parthenoides*", *Planta medica*, 28, pp. 89-91. Disponible en: <https://n9.cl/4rtpm>

Se ha reportado además la presencia de zaluzanina A, zaluzanina B y zaluzanina D en especies de este género (Figura 27).^{36, 38, 40, 41, 42, 44}

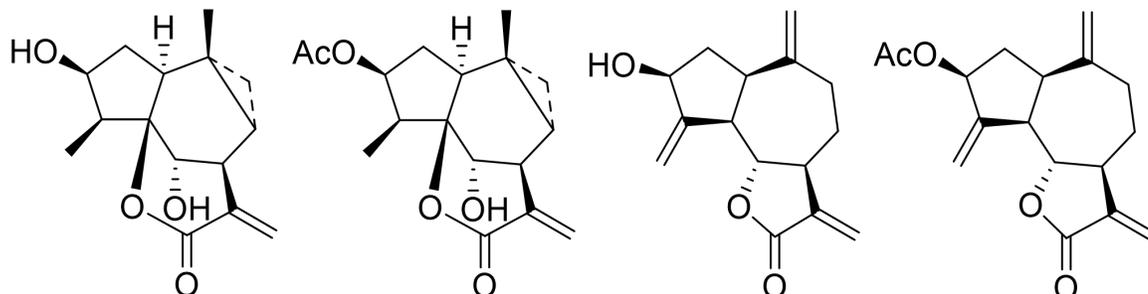


Figura 27. De izquierda a derecha, estructuras de la zaluzanina A, B, C y D.

Algunos flavonoides encontrados en algunas de las especies del género son: kaempferol-3-metiléter (A), kaempferol-3,6-dimetiléter (B), quercetina-3-metiléter (C) y quercetina-3,6-dimetiléter (D), entre algunos otros (Figura 28).⁴⁵

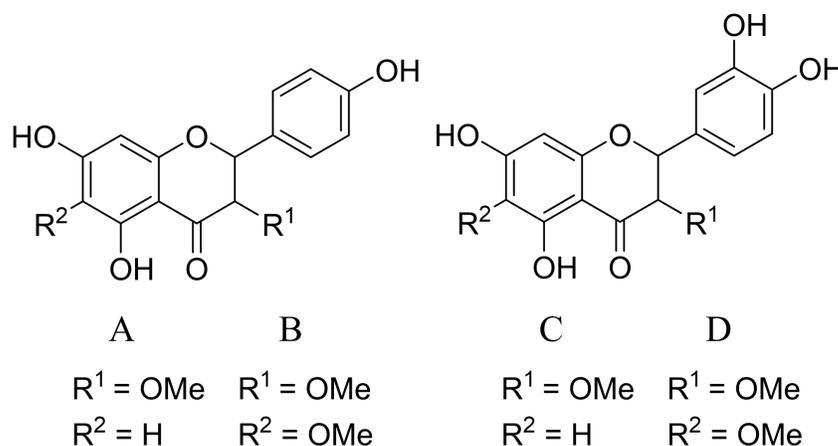


Figura 28. Flavonoides presentes en el género *Zaluzania*.

^{44.} Ortiz, L., Torres, J., Velázquez, R., Valdez, A., Gayosso, J., Cerda, C. & Joseph, P. (2013): "Caracterización y Cuantificación de la Zaluzanina A en el té de *Zaluzania augusta*", *Revista Latinoamericana de Química*, pp. 183. Disponible en: <https://n9.cl/7mh5v>

^{45.} Olsen, J. & Mabry, T. (1980): "Systematic implications of flavonols in *Zaluzania*", *Biochemical Systematics and Ecology*, 8, pp. 261-262. Disponible en: <https://n9.cl/81icx>

Se ha reportado el aislamiento de esteroides: β -sitosterol y estigmasterol en *Z. parthenoides* (Figura 29).⁴³

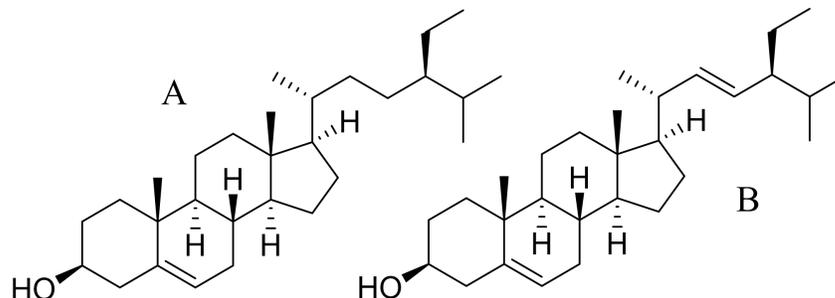


Figura 29. β -sitosterol (A) y estigmasterol (B).

Además, se ha reportado el aislamiento de diterpenos tipo *ent*-kaureno: ácido gradiflorénico y ácido *ent*-kaurenoico (Figura 30), para *Z. montagnifolia*.³⁸

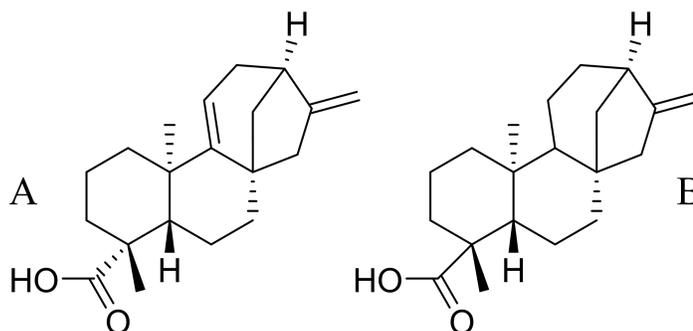


Figura 30. Ácido gradiflorénico (A) y ácido *ent*-kaurenoico (B).

Entre los 18 monoterpenos que han sido identificados en *Z. montagnifolia*, destacan por su gran abundancia el alcanfor y borneol en hojas y flores. Entre sus 39 sesquiterpenos identificados, algunos componentes representativos por su gran copiosidad son germacreno D y β -cariofileno.^{36, 46}

^{46.} Villa, N., Pacheco, Y., Rubio, E., Zárate, J., Castro, C. & Ramírez, S. (2018): "*Zaluzania montagnifolia*: essential oil composition and biological properties", *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 17(3), pp. 249-258. Disponible en: <https://n9.cl/mfe6u>

2.9. *Zaluzania augusta*

Z. augusta es una especie endémica de México que fue documentada por primera vez en 1861 por el botánico alemán Carl Heinrich Schult, la cual publicó en su libro titulado *Flora oder Botanische Zeitung*.^{47, 48, 49}

Conocida comúnmente como cenicilla o limpia tunas (Figura 31), es un arbusto que puede llegar a medir hasta 3 m de altura. Sus hojas son de color verde oscuro con un tono grisáceo en la parte superior (el haz) cuyo tamaño de hoja puede alcanzar hasta los 8 cm de largo por 4 cm de ancho. Los pecíolos de las hojas pueden alcanzar hasta 1 cm de largo. Por lo general, presenta de 5 a 10 flores liguladas en forma oblonga y de color amarillo, que tienen entre 5 y 8 mm de longitud. Además, cuenta con un gran número de flores del disco (internas), las cuales presentan un color amarillo y tienen un tamaño que varía entre 2 y 3 mm de largo, llegando a sumar de 60 a 100 flores internas.⁵¹

En lo que concierne a su distribución geográfica, *Z. augusta* se localiza en Aguascalientes, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Figura 32).^{47, 51}

En la medicina tradicional, se emplea la infusión de la raíz de *Z. augusta* como un remedio para tratar la diabetes.²²

47. (2023): "*Zaluzania augusta* (Lag.) Sch. Bip.", *Tropicos*. Disponible en: <https://n9.cl/4oaxc>

48. (1870): *Flora oder Botanische Zeitung*. Regensburg, 28. Disponible en: <https://n9.cl/f2uoh>

49. "*Zaluzania augusta* (Lag.) Sch. Bip.", *Global Biodiversity Information Facility*. Disponible en: <https://n9.cl/34xof>

50. Vibrans, H. (2011): "*Zaluzania augusta* (Lag.) Sch. Bip.", *Conabio*. Disponible en: <https://n9.cl/72bgym>

51. Olsen, J. (1975): "*Zaluzania augusta* (Lag.) Sch. Bip.", *Red de Herbarios del Noroeste de México*. Disponible en: <https://n9.cl/ojyr4>



Figura 31. Ejemplar de *Z. augusta*.

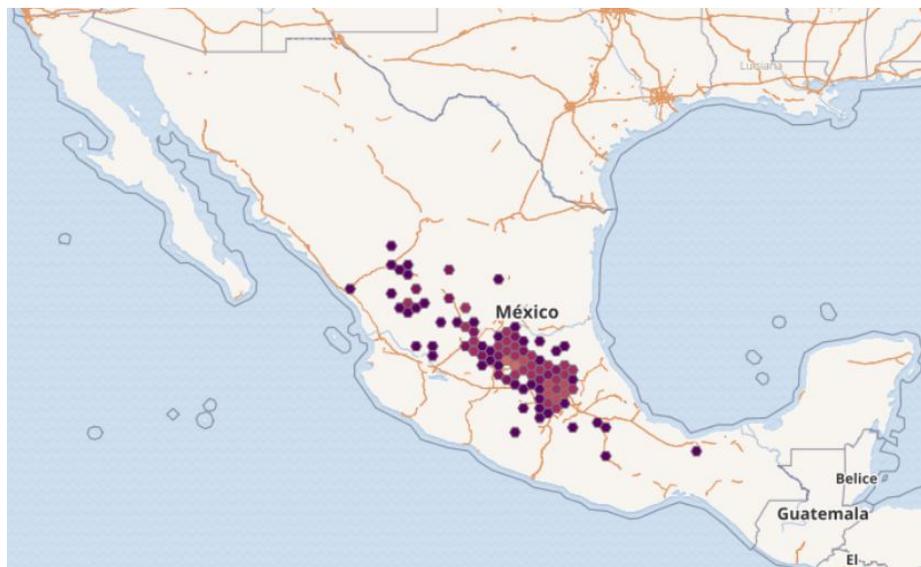


Figura 32. Distribución de *Z. augusta* en México.⁴⁹

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a los antecedentes sobre el uso de la especie *Z. augusta* en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes mellitus, se plantea llevar a cabo un estudio para investigar la actividad hipoglucemiante de esta planta. Dicha actividad se pretende evaluar mediante un ensayo *in vitro* de inhibición de la enzima α -glucosidasa, y si resulta positivo, será de interés científico conocer las sustancias más abundantes en los extractos. Y finalmente, se pretende evaluar la capacidad antioxidante por distintas técnicas, debido a la relación que presenta la diabetes tipo 2 con el estrés oxidativo,⁵² factor que da origen a enfermedades del sistema nervioso central como el Alzheimer, desordenes autoinmunes y antiinflamatorios como el cáncer y artritis reumatoide, trastornos relacionados con el deterioro de la visión, envejecimiento, entre otras enfermedades,^{53, 54} además de que el estrés oxidativo tiene relación directa con la aparición de la diabetes.⁵⁵

Aunque algunas plantas del género *Zaluzania* han sido estudiadas, es bien conocido que los metabolitos que una determinada especie es capaz de biosintetizar depende de varios factores, como lo son el agua, el pH del suelo, tipo de suelo, temperatura, altitud, entre otros, por lo tanto, cuando una misma especie se desarrolla en ecosistemas diferentes, ésta puede generar metabolitos distintos.

-
52. Maritim, A., Sanders, R. & Watkins, J. (2003): "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review", *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), pp. 24-37. Disponible en: <https://n9.cl/p0t1w>
53. Phaniendra, A., Babu, D., & Periyasamy, L. (2015): "Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases", *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), pp. 11-26. Disponible en: <https://n9.cl/kor4g>
54. Silbel, F. & Gürkan, H. (2008): "The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases", *Advances in Molecular Biology*, (1), pp. 1-9. Disponible en: <https://n9.cl/ckeuy>
55. Florence, T. (1995): "The role of free radicals in disease", *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology*, 23(1), pp. 3-7. Disponible en: <https://n9.cl/vrgjvq>

Por otro lado, en algunos casos los estudios realizados en años anteriores, no contaban con los métodos espectroscópicos avanzados del presente, por ello dichos estudios presentaban limitaciones respecto a la elucidación estructural de los metabolitos aislados, dejando algunos de ellos inconclusos. Además, estudiar una especie por primera vez, química y biológicamente, pudiera conducir a metabolitos nuevos que sean de interés, y por lo tanto, contar con una especie que sea potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, este proyecto describe el estudio químico-farmacológico de una especie de la familia Asteraceae: *Z. augusta*, así, este proyecto pretende contribuir al conocimiento de principios activos hipoglucemiantes para su posible uso en el tratamiento de la diabetes, una de las enfermedades más comunes a nivel mundial.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Obtener productos naturales que tengan actividad antidiabética a partir de *Z. augusta* del Estado de Hidalgo, mediante aislamiento y caracterización de sus principales metabolitos secundarios y evaluación de la actividad hipoglucemiante del extracto metanólico para su posible uso en el tratamiento de la diabetes.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la actividad de inhibición de la enzima α -glucosidasa del extracto metanólico.
2. Aislar y caracterizar los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos por métodos cromatográficos y espectroscópicos.
3. Contribuir al conocimiento fitoquímico del género *Zaluzania*.
4. Llevar a cabo el primer estudio químico-biológico de las raíces de la especie *Zaluzania augusta*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Procedimientos generales

El aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios se realizó mediante técnicas cromatográficas: cromatografía en columna y cromatografía en columna flash en gel de sílice de fase normal.

Durante el fraccionamiento se llevó a cabo el monitoreo de las separaciones cromatográficas mediante cromatografía en capa fina (TLC), utilizando cromatofolios de 0.2 mm de espesor. La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV UPV modelo UVLS-28 a una longitud de onda de 254 nm. También, se empleó como agente revelador una solución de cloruro de cobalto (II).

Se empleó hexano, cloroformo (CHCl_3), acetato de etilo (AcOEt), acetona y metanol (MeOH) para la extracción y separación de los metabolitos secundarios, los cuales fueron obtenidos de manera comercial y se destilaron previo a su uso.

Los experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) en 1D y 2D se realizaron en un espectrómetro Bruker Ascend 400. Los desplazamientos químicos de todos los espectros se dan en ppm y no están referenciados con la señal del disolvente residual, excepto el Espectro 11, el cual está referenciado con la señal de la acetona- d_6 residual ($\delta_{\text{C}} = 29.8$). Las constantes de acoplamiento (J) están en Hz.

El punto de fusión fue determinado en un aparato Electrothermal modelo IA9000 y no está corregido.

El espectro infrarrojo (IR) se obtuvo en película sobre una placa de seleniuro de zinc en un equipo Perkin Elmer modelo GX.

La rotación óptica a 25° ($[\alpha]^{25}$) fue medida en un polarímetro Perkin Elmer modelo 341, utilizando lámpara de sodio y de mercurio.

La determinación estructural de rayos X de monocristal se realizó utilizando un difractómetro Gemini (Agilent), con detector Atlas usando radiación de cobre, Cu K α ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$), la correlación e integración de datos se llevó a cabo utilizando los paquetes de software CryAlisPro. La solución y el refinamiento de la estructura se efectuaron en el programa Olex 2 v1.2.

Las absorbancias fueron registradas utilizando un espectrofotómetro Thermo Electron Corporation modelo Multiskan EX.

5.2. Colecta e identificación botánica de especie

El material vegetal (*Z. augusta*) fue recolectado en el municipio de Epazoyucan, Hidalgo, México, sobre la carretera Pachuca-Tulancingo, el 8 de octubre del 2022.

El ejemplar de la especie fue identificado por el profesor Manuel González Ledesma, director del Herbario del Área Académica de Biología, ICBI (número de depósito JM Torres-Valencia 168).

5.3. Obtención de extractos

5.3.1. Secado y molienda

El material vegetal fue separado en parte aérea y raíz de manera manual, posteriormente, se secó a la sombra y a temperatura ambiente. El material fue triturado mecánica y manualmente.

5.3.2. Extracto metanólico

Se obtuvo el extracto metanólico de las raíces de *Z. augusta*, para ello se efectuó una extracción por maceración a partir de 570.69 g de material vegetal seco y molido (raíces), con 1.45 L de MeOH por 8 días a temperatura ambiente, posteriormente, se filtró por gravedad y se concentró a presión reducida a una temperatura de 40°C con ayuda de un rotavapor. Se obtuvo un rendimiento del 3.66% (20.9034 g de extracto seco).

5.3.3. Extracto con hexano, con cloroformo y con acetato de etilo

Se obtuvieron tres extractos de polaridades diferentes, para ello al extracto metanólico seco de las raíces de *Z. augusta* (10 g) se le adicionó hexanos (250 mL) y se dejó macerando durante 24 h. Posteriormente, se filtró y se separó la fase de hexanos y el residuo no disuelto. La fase de hexanos obtenida se concentró. Al residuo insoluble en hexanos se le adicionaron 250 mL de CHCl_3 y se dejó macerando 24 h. Pasadas las 24 h, se filtró para separar la fase de CHCl_3 del residuo insoluble. La fase de CHCl_3 obtenida se concentró en el rotavapor. Al residuo insoluble en CHCl_3 se le adicionaron 250 mL de AcOEt y se dejó macerar durante 24 h. Luego se filtró y se concentró en el rotavapor para obtener el extracto de AcOEt.

Las fases orgánicas obtenidas de hexano, CHCl_3 y AcOEt fueron secadas y pesadas. El resto de sólido insoluble se guardó.

Con el fin de eliminar restos de posibles compuestos no polares, el sólido obtenido con CHCl_3 y con AcOEt fueron lavados con hexanos, cuya fase orgánica de hexanos obtenida y sólido no disuelto fueron separados por filtración, los sólidos obtenidos fueron secados.

5.4. Extracción y aislamiento de los principales metabolitos secundarios

Se realizó cromatografía en columna empleando 1 g del concentrado obtenido con AcOEt de *Z. augusta*, usando la técnica de cromatografía rápida. La columna se empacó con sílice (138 g) y se eluyó utilizando un gradiente de elución: hexano (250 mL), hexano-AcOEt (90:10 → 10:90, 250 mL de cada sistema), AcOEt (250 mL) y metanol (200 mL). Se colectaron 45 fracciones de 60 mL, las cuales fueron monitoreadas por TLC. Se obtuvo un polvo blanquecino en las fracciones 29-33.

Las fracciones 29-33 se cristalizaron mediante la adición de propanol y hexano en proporción 1:3. En todas las fracciones puestas a cristalizar, a excepción de la fracción 32, se obtuvieron cristales del compuesto **1**, obteniendo 26.6 mg en 29, 2.3 mg en 30, 9.5 mg en 31 y 15.5 mg en 33, sumando un total de 53.3 mg del compuesto **1** puro. (Figura 33)

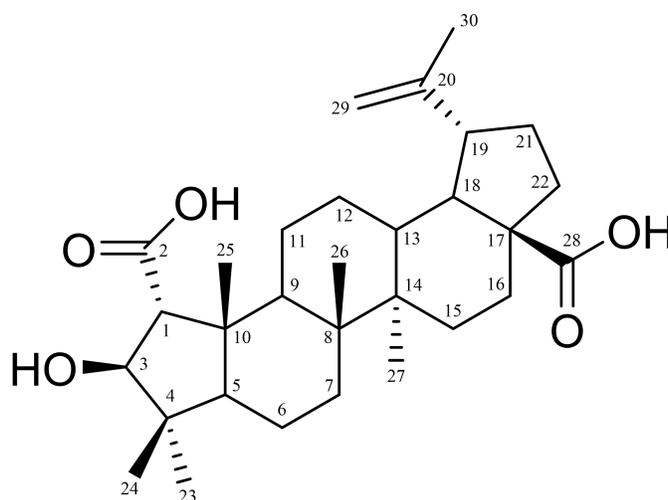


Figura 33. Estructura del ácido ceanótico.

El compuesto **1**, se analizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C en 1D y 2D en acetona deuterada (acetona- d_6), posteriormente, una vez que se conoció su estructura, fue analizado en piridina deuterada (piridina- d_5), este último como medio de

comparación con lo reportado. Se obtuvo además su espectro IR y se analizó por difracción de rayos-X de monocristal.

Los eluatos 37-38 y 39-42 se combinaron en 2 fracciones primarias (A [37-38], B [39-42]) de acuerdo con su similitud presentada en TLC. Las fracciones A-B se concentraron y se obtuvieron 16.3 mg de A y 96.4 mg de B.

La fracción A (16.3 mg), se purificó mediante cromatografía en columna, usando sílice (24 g) y se eluyó con hexano-AcOEt (7:3 → 0:1, 50 mL de cada sistema). Se colectaron 25 fracciones de 16 mL. En la fracción 14 (6.5 mg), se obtuvo un sólido amarillo, el cual analizado por RMN de ¹H, derivó en el compuesto **2** (Figura 34).

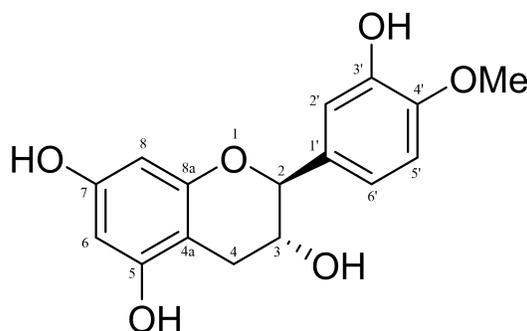


Figura 34. Estructura de la (-)-4'-O-metilcatequina.

La fracción B (96.4), se purificó mediante cromatografía en columna, usando sílice (24 g) y se eluyó con hexano-AcOEt (7:3 → 3:7, 50 mL de cada sistema). Se colectaron 25 fracciones de 18 mL. En la fracción 4 (35.7 mg), se obtuvo un sólido amarillo, el cual analizado por RMN de ¹H, derivó en la mezcla de compuestos **4** (Figura 35) y **5** (Figura 36).

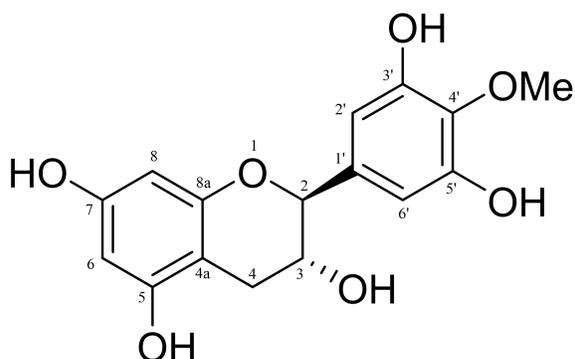


Figura 35. Estructura de la (-)-4'-O-metilgalocatequina

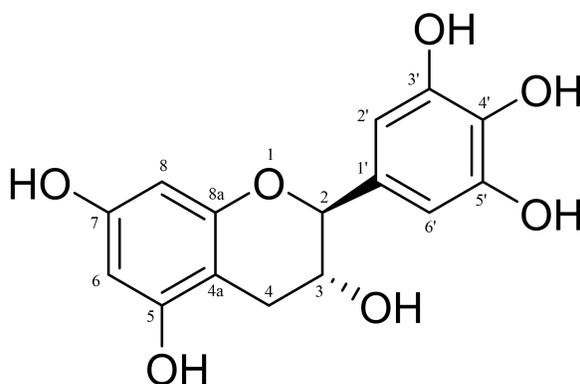


Figura 36. Estructura de la (-)-galocatequina.

Se realizó cromatografía en columna empleando 1 g del concentrado obtenido con CHCl_3 de *Z. augusta*, usando la técnica de cromatografía rápida. La columna se empacó con sílice (138 g) y se eluyó utilizando hexano- CHCl_3 (60:40 \rightarrow 10:90, 250 mL de cada sistema). Se colectaron 30 fracciones de 50 mL, las cuales fueron monitoreadas por TLC. En la fracción 18 se obtuvieron cristales, los cuales fueron analizados mediante RMN de ^1H , cuyo análisis derivó en el compuesto **3** (22.2 mg) (Figura 37).

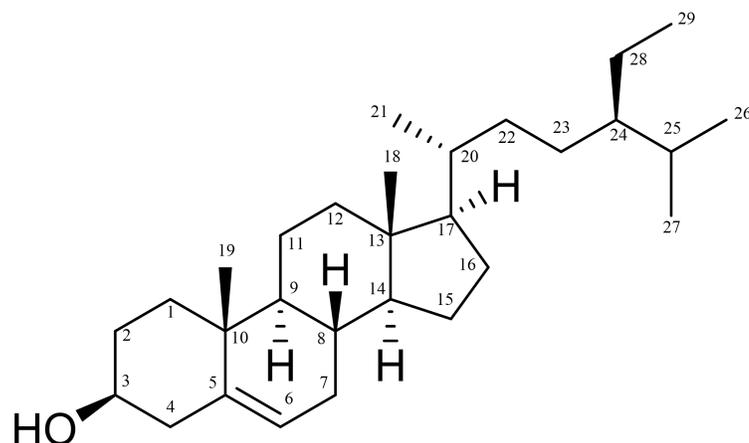


Figura 37. Estructura del β -sitosterol.

5.5. Determinación de la capacidad antioxidante método DPPH

El ensayo antioxidante mide el decremento en la absorbancia del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), dada la reacción con el antioxidante de prueba (Figura 38).⁵⁶ Para evaluar esta actividad se siguió el protocolo reportado por Lim y Teo (2019) con algunas modificaciones.⁵⁷

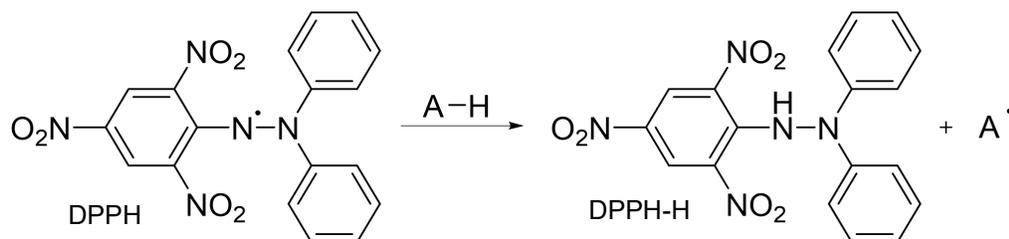


Figura 38. Reacción de actividad antioxidante con el radical DPPH.

⁵⁶. Friaa, O. & Brault, D. (2006): "Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox and the free radical DPPH[•] in semi-aqueous solution", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4, pp. 2417–2423. Disponible en: <https://n9.cl/q60w1>

⁵⁷. Lim, W. & Teo, S. (2019): "Identification of antioxidant properties of *Morus rubra*", *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*, 12(1), pp. 31-34. Disponible en: <https://n9.cl/xcux1a>

Para evaluar esta actividad se utilizó el extracto metanólico de las raíces de *Z. augusta* (muestra). En tubos Eppendorf se mezclaron 200 μL de la respectiva dilución del extracto metanólico de prueba (muestra) con 1000 μL de una solución 0.1 mM de DPPH (Tabla 7), se homogeneizó y se dejó en reposo por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se midió la absorbancia a 517 nm una vez completados 30 minutos de incubación.

Tabla 7. Ensayo de la capacidad antioxidante DPPH.

Experimento	Concentración de muestra (mg/mL)	Volumen de muestra (μL)	Volumen de DPPH (μL)
1	0.5	200	1000
2	0.1	200	1000
3	0.05	200	1000
4	0.02	200	1000

Se utilizó una solución de Trolox como agente antioxidante de referencia, para ello, se realizó una curva de calibración, utilizando un gradiente de concentración de una solución de Trolox. Se preparó una solución madre de Trolox a una concentración de 1000 μM (se utilizaron 12.515 mg de Trolox y se disolvieron en 50 mL de EtOH). La curva de calibración se construyó de acuerdo a la Tabla 8.

Tabla 8. Curva de calibración Trolox para DPPH.

Experimento	Concentración de Trolox (μM)	Volumen de Trolox (μL)	Volumen de EtOH (μL)
1	1000	2000	0
2	800	1600	400
3	600	1200	800
4	400	800	1200
5	200	400	1600
6	100	200	1800
7	0	0	2000

Los resultados fueron expresados como actividad antioxidante equivalente a mmol de Trolox por gramo de extracto (mmol EqT/g), interpolando los datos obtenidos a través de la ecuación de la recta con la curva de calibración obtenida.

5.6. Determinación de la capacidad antioxidante método ABTS

El ensayo antioxidante mide el decremento en la absorbancia del radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), dada la reacción con el antioxidante de prueba (Figura 39).⁵⁸

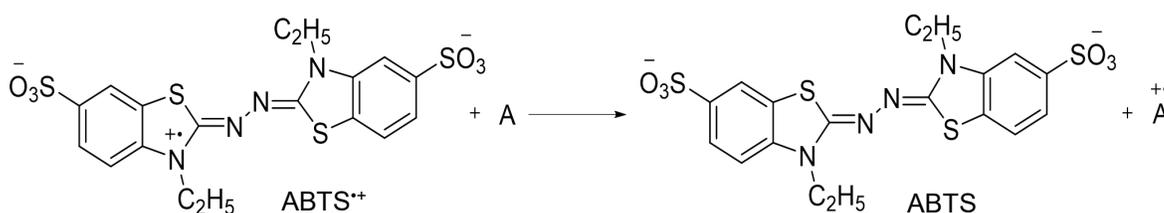


Figura 39. Reacción de actividad antioxidante con el radical ABTS^{•+}.

Para evaluar esta actividad se siguió el protocolo reportado por Kim et al. (2002) con algunas modificaciones.⁵⁹ El radical ABTS^{•+}, se obtuvo tras llevarse a cabo la reacción de ABTS 7 mM con persulfato potásico (2.45 mM, concentración final), incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS^{•+}, se diluyó con agua destilada hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 (±0.02) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción), a esta disolución se le llamó solución estandarizada.

- ⁵⁸. Ilyasov, I, Beloborodov, V., Selivanova, I. & Terekhov, R. (2020): "ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), pp. 1-27. Disponible en: <https://n9.cl/f2b3v>
- ⁵⁹. Kim, D, Lee, K., Lee, H. & Lee, C. (2002): "Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 3713-3717. Disponible en: <https://n9.cl/mfe6u>

En tubos Eppendorf se agregaron 980 μL de dilución del radical ABTS^{•+} estandarizada y se añadieron 20 μL de la dilución del extracto metanólico de prueba correspondiente (muestra) (Tabla 9). La absorbancia se midió transcurridos 30 minutos de reacción a 754 nm.

Tabla 9. Ensayo de la capacidad antioxidante ABTS.

Experimento	Concentración de muestra (mg/mL)	Volumen de muestra (μL)	Volumen de ABTS ^{•+} (μL)
1	1	20	980
2	0.5	20	980
3	0.1	20	980
4	0.05	20	980

El antioxidante de referencia, Trolox, se analizó en un rango de concentraciones de 0-1000 μM en EtOH, utilizando las mismas condiciones del método DPPH (Tabla 8).

Los resultados fueron expresados como actividad antioxidante equivalente a mmol de Trolox por gramo de extracto (mmol EqT/g), interpolando los datos obtenidos a través de la ecuación de la recta con la curva de calibración obtenida.

5.7. Determinación de la capacidad antioxidante método FRAP

El ensayo antioxidante mide el cambio en la absorbancia en la reacción de reducción del complejo Fe(III)-TPTZ al complejo Fe(II)-TPTZ con el antioxidante de prueba (Figura 40).⁶⁰ Para evaluar esta actividad se siguió el protocolo reportado por Benzie y Strain (2002) con algunas modificaciones.⁶¹

⁶⁰. Wojtunik, K. (2020): "Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes", *Molecules*, 25(22). Disponible en: <https://n9.cl/w93qn>

⁶¹. Benzie, I. & Strain, J. (1996): "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay", *Analytical Biochemistry*, 239, pp. 70-76. Disponible en: <https://n9.cl/skt79>



Figura 40. Reacción de reducción del complejo Fe³⁺-TPZT.

Para evaluar esta actividad se utilizó el extracto metanólico de las raíces de *Z. augusta* (muestra). Se preparó una solución buffer de acetato de sodio y ácido acético 0.3 M, a un pH de 3.6, una solución de TPTZ 10 mM aforada con HCl y una solución de FeCl₃·6H₂O a una concentración de 20 mM.

Para preparar el reactivo FRAP (complejo Fe(III)-TPTZ), se mezclaron 25 mL de la solución buffer de acetato de sodio 0.3 M, 2.5 mL de la solución TPTZ 10 mM y 2.5 mL de la solución de FeCl₃·6H₂O 20 mM.

En tubos Eppendorf, se agregaron 10 µL de cada extracto metanólico de prueba a su respectiva concentración (Tabla 10), con 300 µL del reactivo FRAP recién preparado y 30 µL de agua. La absorbancia de las muestras de estudio fue medida a 593 nm después de 30 minutos de incubación a oscuridad.

Tabla 10. Ensayo de la capacidad antioxidante FRAP.

Experimento	Concentración de muestra (mg/mL)	Volumen de muestra (µL)	Volumen de FRAP (µL)	Volumen de H ₂ O (µL)
1	0.1	10	300	30
2	0.04	10	300	30
3	0.02	10	300	30
4	0.01	10	300	30

Se construyó una curva de calibración, utilizando un gradiente de concentración de una solución de FeSO₄·7H₂O. Se preparó una solución madre de FeSO₄·7H₂O a una concentración de 1000 µM. La curva de calibración se construyó de acuerdo a la Tabla 11.

Tabla 11. Curva de calibración $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Experimento	Concentración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (μM)	Volumen de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (μL)	Volumen de H_2O (μL)
1	0	0	1000
2	100	100	900
3	250	250	750
4	500	500	500
5	750	750	250
6	1000	1000	0

Los resultados fueron expresados en μmol de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por gramo de extracto ($\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$), interpolando los datos obtenidos a través de la ecuación de la recta con la curva de calibración obtenida.

5.8 Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa

El ensayo de la actividad de la enzima α -glucosidasa mide la absorbancia del *p*-nitrofenol generado a través de la hidrólisis del *p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG) (Figura 41) utilizado como sustrato para poder determinar la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa del extracto de prueba.⁶²

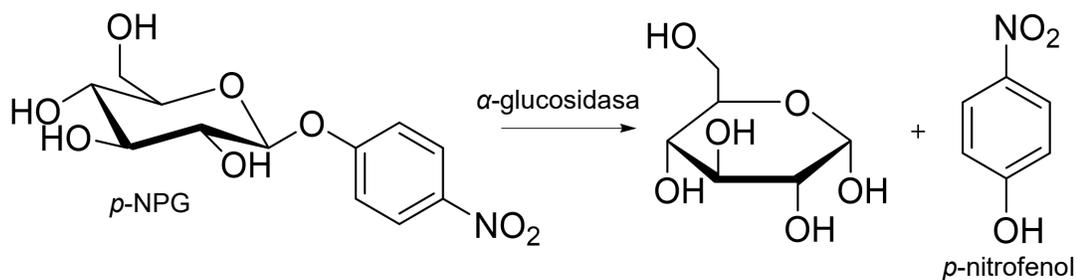


Figura 41. Hidrólisis del *p*-NPG por la enzima α -glucosidasa

⁶². Lankatillake, C., Luo, S., Flavel, M., Lenon, G., Gill, H., Huynh, T. & Dias, D. (2021): "Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in α -amylase, α -glucosidase and lipase assays", *Red de Plant Methods*, 17(3), pp. 2-19. Disponible en: <https://n9.cl/x3ygw>

Para evaluar la capacidad de inhibición de los extractos, se siguieron protocolos establecidos.^{63, 64} Para ello se empleó la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* a una concentración de 0.1 U/mL disuelta en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) 100 mM a un pH de 6.8. El sustrato *p*-NPG fue disuelto en PBS a una concentración de 5 mM.

Las mediciones realizadas fueron evaluadas por triplicado en placa ELISA de 96 pozos, mediante la adición de alícuotas de 20 μ L de los inhibidores de prueba (extracto), 60 μ L de sustrato (*p*-NPG) y el volumen necesario de la solución de PBS para alcanzar un volumen total de 200 μ L. Posteriormente, las mezclas de reacción fueron incubadas durante 5 minutos, a una temperatura de 37°C. Después de este período de incubación, se agregaron 30 μ L de la solución enzimática y se registró la absorbancia en el tiempo cero a 405 nm. Seguido, las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se registró la absorbancia en el tiempo final.

Como control positivo (CP), se empleó acarbosa, en un rango de concentraciones de 20 - 2×10^{-5} mg/mL disuelta en PBS. Para el control negativo (CN), el blanco (B) y el control negativo no enzimático (CNnE), se procedió de la misma manera que en los extractos de prueba, como lo indica la Tabla 12.

-
- ^{63.} Kim, Y., Jeong, Y., Wang, M., Lee, W. & Rhee, H. (2004): "Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia", *Nutrition*, 21, pp. 756-761. Disponible en: <https://n9.cl/zjt2o>
- ^{64.} Matsui, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T. & Osajima, Y. (1996): "In vitro survey of alpha-glucosidase inhibitory food components", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(12), pp. 2019-2022. Disponible en: <https://n9.cl/sz6lem>

Tabla 12. Ensayo de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

Solución	CP	CN	B	CNnE
PBS 100 mM (μ L)	120	120	150	150
Extracto de prueba (μ L)	0	0	0	20
Acarbosa (μ L)	20	0	0	0
<i>p</i> -NPG 0.5 mM (μ L)	60	60	60	60
Solución enzimática 0.1 U/mL (μ L)	30	30	0	0
MeOH (μ L)	0	20	20	0

La actividad del extracto metanólico se calculó como porcentaje de inhibición, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(\Delta A_{\text{CN}} - \Delta A_{\text{B}}) - (\Delta A_{\text{M}} - \Delta A_{\text{CNnE}})}{(\Delta A_{\text{CN}} - \Delta A_{\text{B}})} * 100\%$$

Donde:

Δ = Diferencia de las absorbancias entre el tiempo 0 y 30 min.

M= muestra (inhibidor de prueba)

Se determinó el valor de la concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) a partir de ecuación de la recta, interpolando los datos obtenidos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Compuestos aislados de *Z. augusta*

El extracto metanólico de la raíz de *Z. augusta*, permitió el aislamiento mediante técnicas cromatográficas del ácido ceanótico (**1**), de la (-)-4'-*O*-metilcatequina (**2**), del β -sitosterol (**3**) y una mezcla de dos compuestos (**4** y **5**). Las estructuras de estos compuestos fueron elucidadas mediante el empleo de diversas técnicas espectroscópicas, principalmente RMN en 1D y 2D, espectroscopia infrarroja y Rayos X. De acuerdo a la literatura química, los compuestos **1** y **2**, no habían sido aislados en el género *Zaluzania*.³⁶ Mientras que, el compuesto **3**, no había sido aislado en la especie *augusta*, pero sí en el género *Zaluzania* (únicamente en *Z. parthenioides*).^{36, 44}

Compuestos del tipo triterpeno, flavonoides del tipo catequina y galocatequina no han sido identificados ni aislados en especies de *Zaluzania*, siendo esta la primera vez que caracterizan dos de ellos en el género.³⁶

6.1.1. Elucidación estructural del ácido ceanótico (1)

El compuesto **1** (53.9 mg), se aisló como un sólido blanco cristalino. En el espectro IR (Figura 42), se observaron bandas características del estiramiento de los enlaces polares C-H en 2944 cm⁻¹, una banda de estiramiento característica de un grupo alcohol (C-3) en 3471 cm⁻¹, una banda de absorción de grupo carbonilo (C-2 y C-28) en 1687 cm⁻¹, además de una banda de absorción de un grupo metileno (C-20 y C-30) en 1738 cm⁻¹.

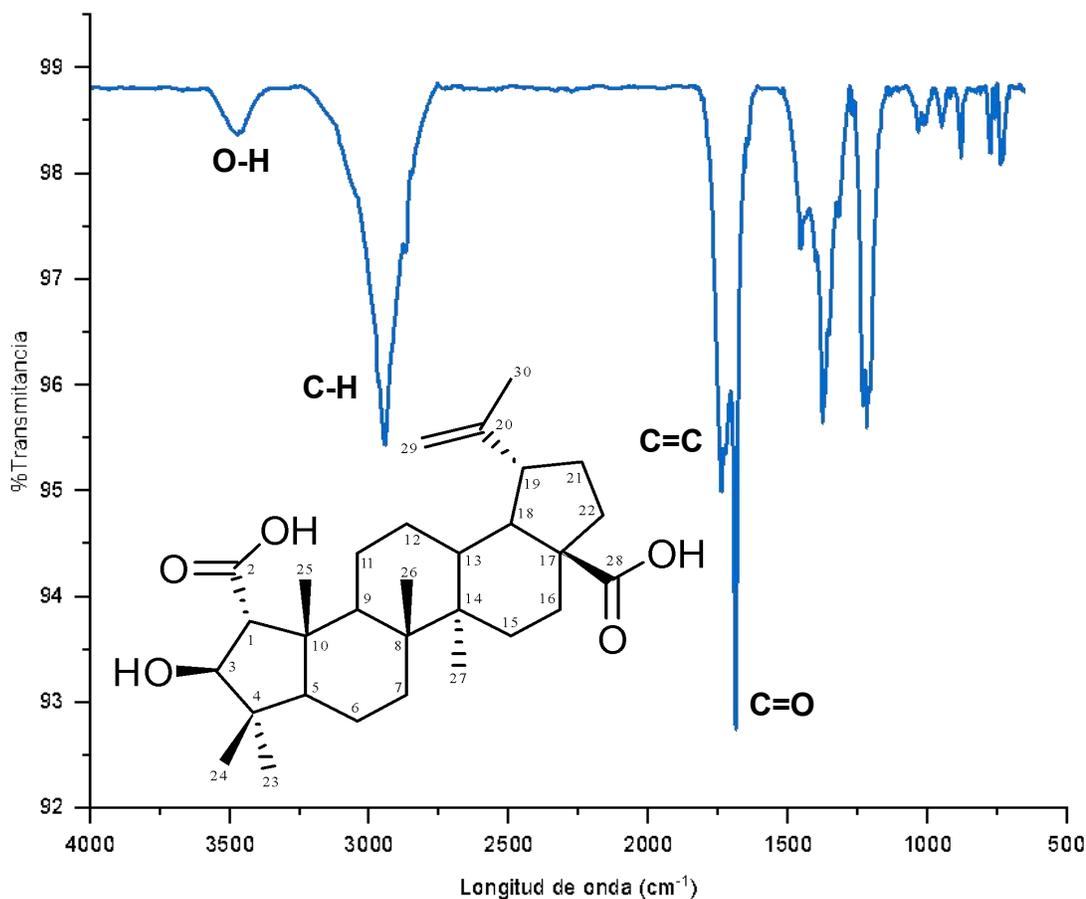


Figura 42. Espectro infrarrojo del compuesto 1 adquirido en película.

En el espectro APT (Espectro 1), se pueden observar 30 señales para átomos de carbono, de los cuales, 6 corresponden a grupos metilo (CH_3), 9 a metilenos (CH_2), 6 a metinos (CH) y 9 correspondientes a carbonos cuaternarios (C).

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 43) en acetona- d_6 , se detectaron 30 señales distintas (Tabla 13), que coinciden con número de carbonos del compuesto 1. Dichas señales fueron asignadas en su totalidad con ayuda del espectro APT y en comparación con los desplazamientos descritos por Li et al. (1997)⁶⁵.

⁶⁵. Li, X., Cai, L. & Wu, C. (1997): "Antimicrobial compounds from *Ceanothus americanus* against oral pathogens", *Phytochemistry*, 46. Disponible en: <https://n9.cl/3ga6n>

Tabla 13. Datos de RMN ^{13}C (400 MHz) en acetona- d_6 del ácido ceanótico.

Carbono	Tipo	δ_{C}	Carbono	Tipo	δ_{C}
1	CH	65.3	16	CH ₂	32.0
2	C	175.6	17	C	55.9
3	CH	84.2	18	CH	49.1
4	C	43.0	19	CH	47.0
5	CH	56.5	20	C	150.7
6	CH ₂	18.4	21	CH ₂	30.4
7	CH ₂	34.0	22	CH ₂	36.7
8	C	42.9	23	CH ₃	30.5
9	CH	44.4	24	CH ₃	19.0
10	C	49.00	25	CH ₃	17.9
11	CH ₂	23.5	26	CH ₃	16.1
12	CH ₂	25.4	27	CH ₃	14.3
13	CH	38.5	28	C	176.6
14	C	41.5	29	CH ₃	109.0
15	CH ₂	29.8	30	CH ₂	18.8

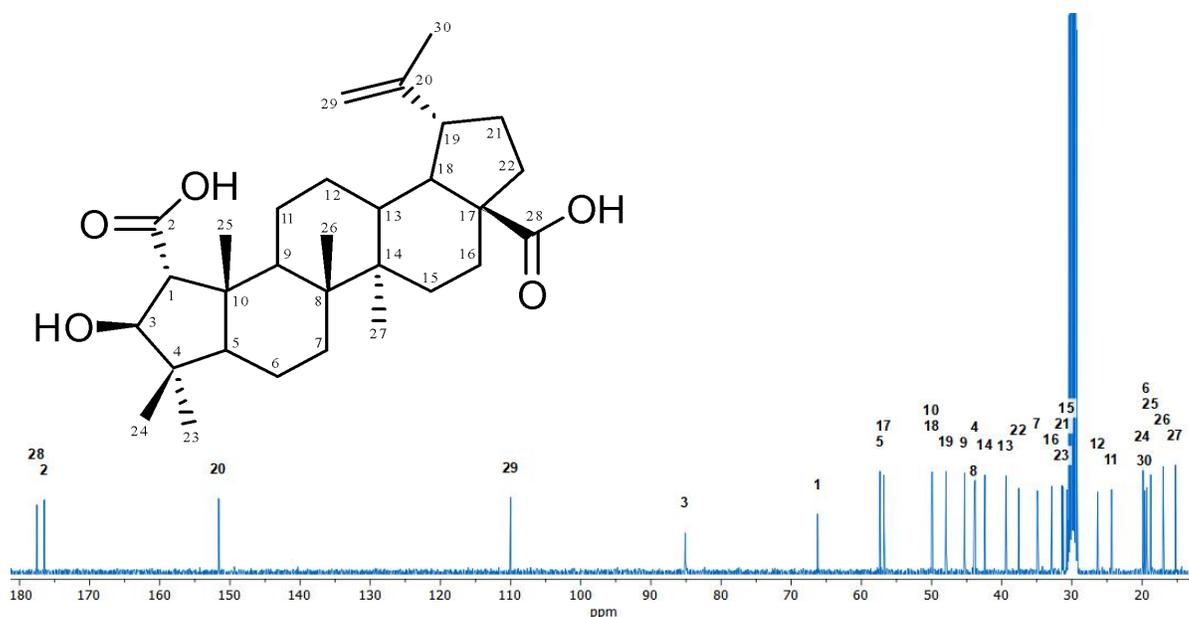


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **1** adquirido a 400 MHz en acetona- d_6 .

En el espectro de RMN de ^1H en acetona- d_6 (Figura 44), se observaron cinco señales simples en 1.12, 1.09, 0.99, 0.98 y 0.93 ppm correspondientes a grupos metilo Me-25, Me-23, Me-26, Me-27 y Me-24 respectivamente. Se observó una señal simple en 1.70 ppm correspondiente al Me-30 unido al alqueno. En 2.35 y 3.05 ppm se observaron dos señales triples de dobles correspondientes a los protones H-13 y H-19 respectivamente. La señal simple en 2.55 ppm fue asignada a protón H-1. La señal simple en 4.16 ppm se asignó al protón base de oxígeno H-3. Las señales simples en 4.73 y 4.60 ppm fueron asignadas a los protones vinílicos H-29 y H-29' (Tabla 14). Dichas señales fueron asignadas con ayuda del espectro HSQC (Espectro 2) y HMBC (Espectro 4), además de la comparación con los desplazamientos descritos por Li et al. (1997)⁶⁵.

Tabla 14. Datos de RMN ^1H (400 MHz) en acetona- d_6 del ácido ceanótico.

Hidrógeno	δ_{H}	J (Hz)
1	2.55 (s)	
3	4.16 (s)	
13	2.35 (td)	4, 12
19	3.05 (td)	5, 11
23	1.09 (s)	
24	0.93 (s)	
25	1.12 (s)	
26	0.99 (s)	
27	0.98 (s)	
29	4.73 (s), 4.60 (s)	
30	1.70 (s)	

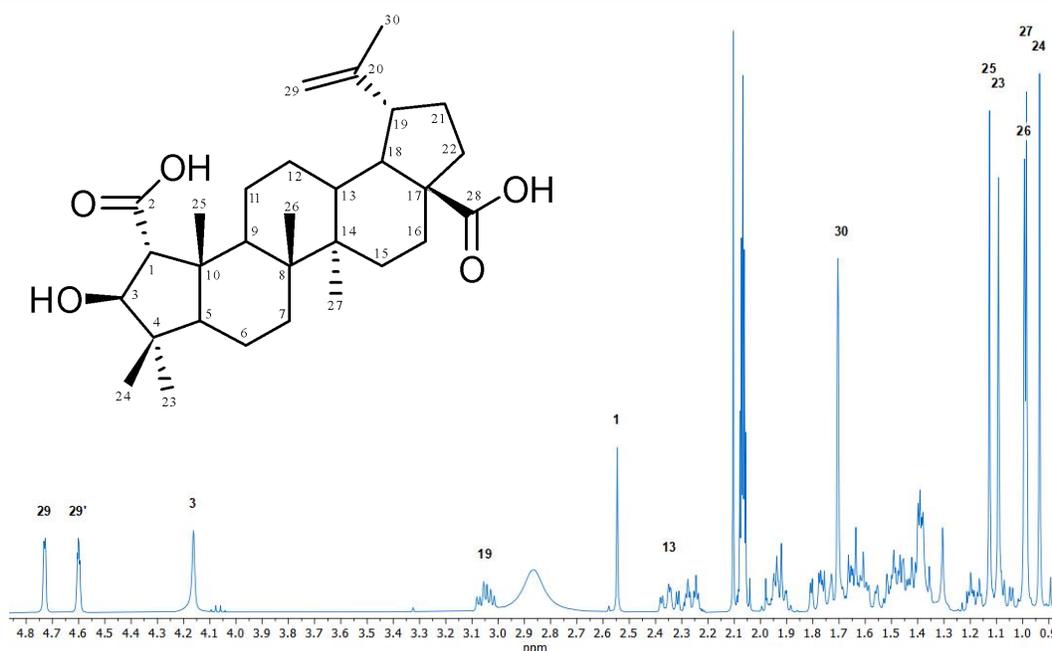


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **1** adquirido a 400 MHz en acetona- d_6 .

Las correlaciones del espectro HMBC (Espectro 4), se muestran en la siguiente tabla, las cuales fueron utilizadas como medio de confirmación en la asignación de los átomos de carbono e hidrógeno.

Tabla 15. Correlaciones en el espectro HMBC (400 MHz) en acetona- d_6 del ácido ceanótico.

Hidrógeno	Correlación (C)	Hidrógeno	Correlación (C)
1	3, 5, 9, 25	16	15, 18, 22
2	1, 3, 25	17	13, 15, 16, 18, 21, 22
3	1, 23, 24	18	12, 13, 16, 19, 21, 22, 29
4	1, 3, 5, 6, 23, 24	19	18, 21, 22, 29, 30
5	1, 3, 6, 7, 23, 24, 25	20	18, 19, 21, 29, 30
6	5, 7	21	18, 19, 22, 29
7	5, 6, 9, 26	22	16, 18, 19, 21
8	6, 7, 9, 11, 13, 15, 26, 27	23	3, 5, 24
9	1, 5, 7, 11, 12, 25, 26	24	3, 5, 23
10	1, 3, 5, 6, 9, 11, 25	25	1, 5, 9

11	9, 12, 13	26	7, 9
12	9, 11, 13, 18	27	13, 15
13	11, 12, 15, 18, 19, 27	28	16, 18, 22
14	7, 9, 12, 13, 15, 16, 18, 26, 27	29	19, 30
15	16, 27	30	19, 29

En el espectro de RMN de ^{13}C en piridina- d_5 (Espectro 6), se identificaron 30 señales distintas, confirmando el número de átomos carbono del compuesto **1**. Los datos obtenidos comparados con los reportados en la literatura en el mismo disolvente,⁶⁵ se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Comparación de datos de RMN ^{13}C (400 MHz) en piridina- d_5 del ácido ceanótico.⁶⁵

Carbono	Tipo	δ_{C} Ref	δ_{C} Exp	Carbono	Tipo	δ_{C} Ref	δ_{C} Exp
1	CH	67.0	66.8	16	CH ₂	32.9	32.7
2	C	178.0	177.9	17	C	56.6	56.4
3	CH	84.7	84.5	18	CH	49.7	49.5
4	C	43.8	43.6	19	CH	47.6	47.4
5	CH	57.0	56.8	20	C	151.2	150.9
6	CH ₂	19.1	18.9	21	CH ₂	31.3	31.0
7	CH ₂	34.7	34.5	22	CH ₂	37.5	37.3
8	C	43.5	43.3	23	CH ₃	31.5	31.2
9	CH	45.1	44.8	24	CH ₃	20.3	20.1
10	C	49.6	49.4	25	CH ₃	18.8	18.6
11	CH ₂	24.2	24.0	26	CH ₃	17.0	16.8
12	CH ₂	26.2	26.0	27	CH ₃	15.1	14.8
13	CH	39.1	38.9	28	C	178.8	178.7
14	C	42.1	41.9	29*	CH ₂	19.6	109.5
15	CH ₂	30.5	30.3	30*	CH ₃	109.8	19.3

*Átomos de hidrógenos intercalados en su numeración por la referencia.

En el espectro de RMN de ^1H en piridina- d_5 (Espectro 7), se observaron cinco señales simples en 1.41, 1.37, 1.26, 1.13 y 1.05 ppm correspondientes a grupos metilo Me-25, Me-23, Me-26, Me-27 y Me-24, respectivamente. Se observó una señal simple en 1.64 correspondiente al Me-30 unido al alqueno. En 2.76 y 3.49 ppm se observaron dos señales triples de dobles correspondientes a los protones H-13 y H-19, respectivamente. La señal simple en 3.19 ppm fue asignada al protón H-1. La señal simple en 4.17 ppm se asignó al protón base de oxígeno H-3. Las señales simples en 4.84 y 4.64 ppm fueron asignadas a los protones vinílicos H-29 y H-29' (Tabla 17).

Los datos obtenidos comparados con los reportados en la literatura en el mismo disolvente,⁶⁵ se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Comparación de datos de RMN ^1H (400 MHz) en piridina- d_5 del ácido ceanótico.⁶⁵

Hidrógeno	δ_{H} Ref	δ_{H} Exp	J Exp (Hz)	J Ref (Hz)
1	3.19 (s)	3.19 (s)		
3	4.18 (s)	4.17 (s)		
13	2.76 (dt)	2.76 (td)	12, 3	12, 3
19	3.49 (m)	3.49 (td)	11, 4	
23	1.42 (s)	1.37 (s)		
24	1.27 (s)	1.05 (s)		
25	1.38 (s)	1.41 (s)		
26	1.15 (s)	1.26 (s)		
27	1.07 (s)	1.13 (s)		
29	1.66 (s)	*4.84 (s), 4.64 (s)		
30	4.85 (s), 4.66 (s)	1.64 (s)		

*Átomos de hidrógenos intercalados en su numeración por la referencia.

La rotación óptica específica con lámpara de sodio fue de $[\alpha]_D^{25} = +31.05$ (c 0.96, MeOH), dicha rotación óptica concuerda con lo reportado en la literatura.⁶⁵ Además, se midió la rotación óptica específica con lámpara de mercurio a 578, 546, 436 y 365 nm (Tabla 18).

Tabla 18. Rotación óptica específica a con lámpara de mercurio a diferentes longitudes de onda.

Longitud de onda (nm)	578	546	436	365
$[\alpha]^{25}$	+32.63	+37.26	+65.47	+108.21

El punto de fusión determinado para el compuesto **1**, fue de 333-334°C, el cual concuerda con lo reportado.⁶⁵

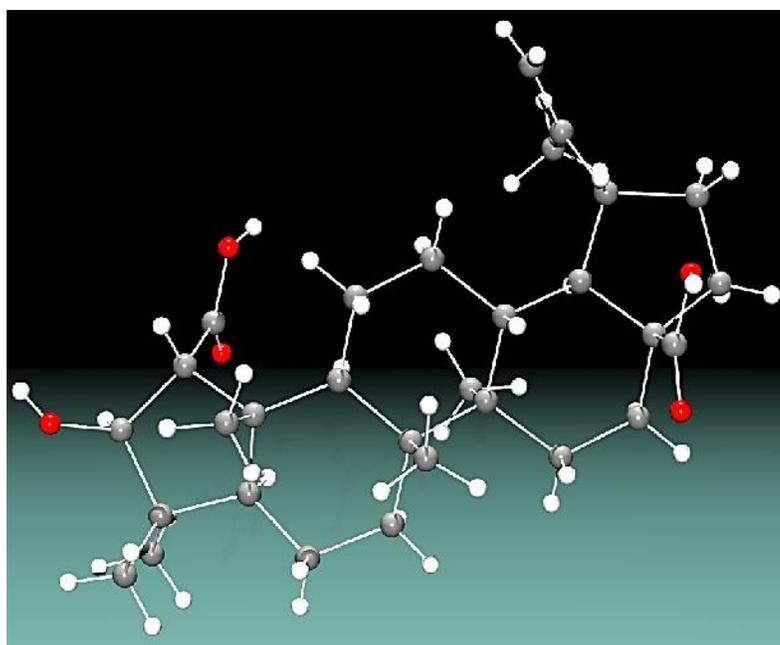


Figura 45. Estructura molecular del ácido ceanótico (**1**) determinada por difracción de rayos X.

6.1.2. Elucidación estructural de la (-)-4'-O-metilcatequina (**2**)

Se aislaron 6.5 mg del compuesto **2** como un sólido amarillo

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 46) en acetona- d_6 , se observaron 16 señales distintas (Tabla 19), correspondientes al número de carbonos del compuesto **2**. Dichas señales fueron asignadas en su totalidad con ayuda del espectro HSQC (Espectro 8) y por comparación con los desplazamientos descritos por Marimoto *et al.* (1984)⁶⁶.

Los datos obtenidos comparados con los reportados en la literatura en el mismo disolvente,⁶⁶ se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Comparación de datos de RMN ^{13}C (400 MHz) en acetona- d_5 de la (-)-4'-O-metilcatequina.⁶⁶

Carbono	Tipo	δ_{C} Ref	δ_{C} Exp	Carbono	Tipo	δ_{C} Ref	δ_{C} Exp
2	CH	82.1	82.6	8a	C	157.4	157.8
3	CH	68.0	68.3	1'	C	133.0	133.5
4	CH ₂	28.1	28.91	2'	CH	115.0	115.0
4a	C	100.4	100.6	3'	C	146.9	147.2
5	C	156.4	156.9	4'	C	148.1	148.1
6	CH	95.2	95.5	5'	CH	112.0	112.1
7	C	157.0	157.2	6'	CH	119.6	119.7
8	CH	96.1	96.2	OMe	CH ₃	56.3	56.3

⁶⁶. Marimoto, S., Nonaka, G., Nishioka, I., Ezaki, N. & Takizawa, N. (1984): "Tannins and Related Compounds. XXIX. Seven New Methyl derivatives of Flavan-3-ols and 1,3-Diarylpropan-2-ol from *Cinnamomum cassia*, *C. obtusifolium* and *Lindera umbellata* var. *membranacea*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 6. Disponible en: <https://n9.cl/a1s5h>

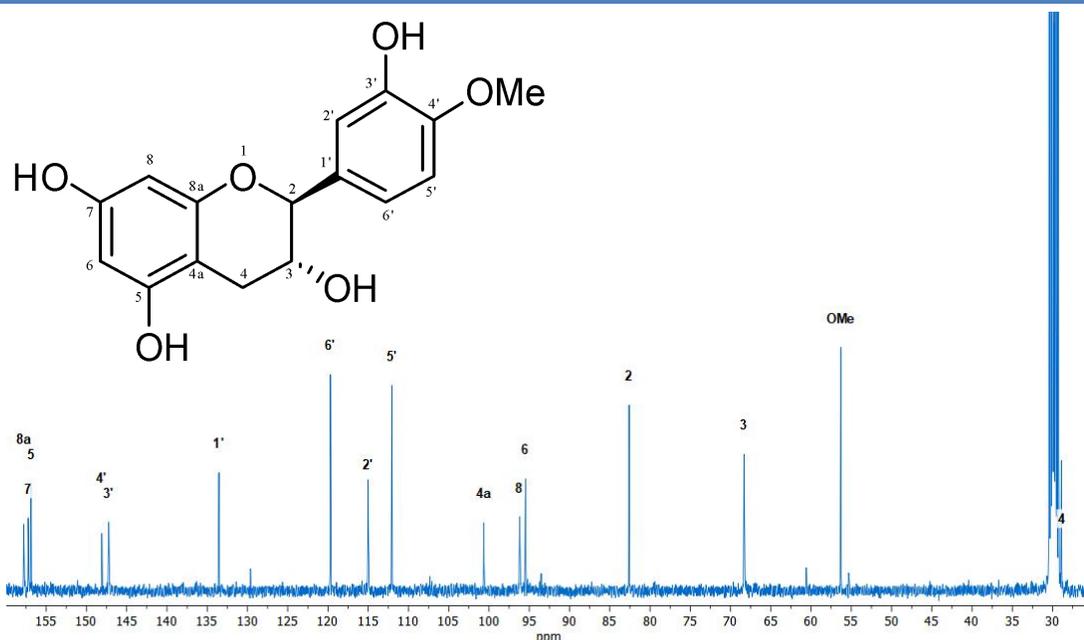


Figura 46. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **2** adquirido a 400 MHz en acetona- d_6 .

En el espectro de RMN de ^1H en acetona- d_6 (Figura 47), se observaron tres señales múltiples en 2.55, 2.93 y 4.03 ppm correspondientes a los protones H-4 β , H-4 α y H-3 respectivamente. En 3.98 y 4.62 ppm se observaron dos señales dobles correspondientes al protón base de oxígeno H-3 y al protón H-2 respectivamente. Las señales dobles en 5.90 y 6.05 ppm fueron asignadas a los protones H-6 y H-8, respectivamente. La señal doble de dobles en 6.87 ppm se asignó al protón H-6'. En 6.93 y 6.93 ppm se observaron dos señales dobles correspondientes a los protones H-5' y H-2', respectivamente. Las señales simples en 8.04 y 8.24 ppm se asignaron a los protones bases de oxígeno H-5 y H-7, respectivamente.

Finalmente, se observó una señal simple en 3.86 ppm correspondiente al grupo metilo Me-4', cuya unión al átomo de oxígeno del C-4' forma la 4'-O-metilcatequina (Figura 34), dicha unión se propone en base al acoplamiento del H-5' con los hidrógenos del OMe del C-4' en el espectro COSY (Espectro 9).

Las señales fueron asignadas en su totalidad, con ayuda del espectro COSY (Espectro 9) y en comparación con los desplazamientos descritos por Marimoto et al. (1984)⁶⁶. Los datos obtenidos comparados con los reportados en la literatura en el mismo disolvente,⁶⁶ se muestran en la Tabla 20.

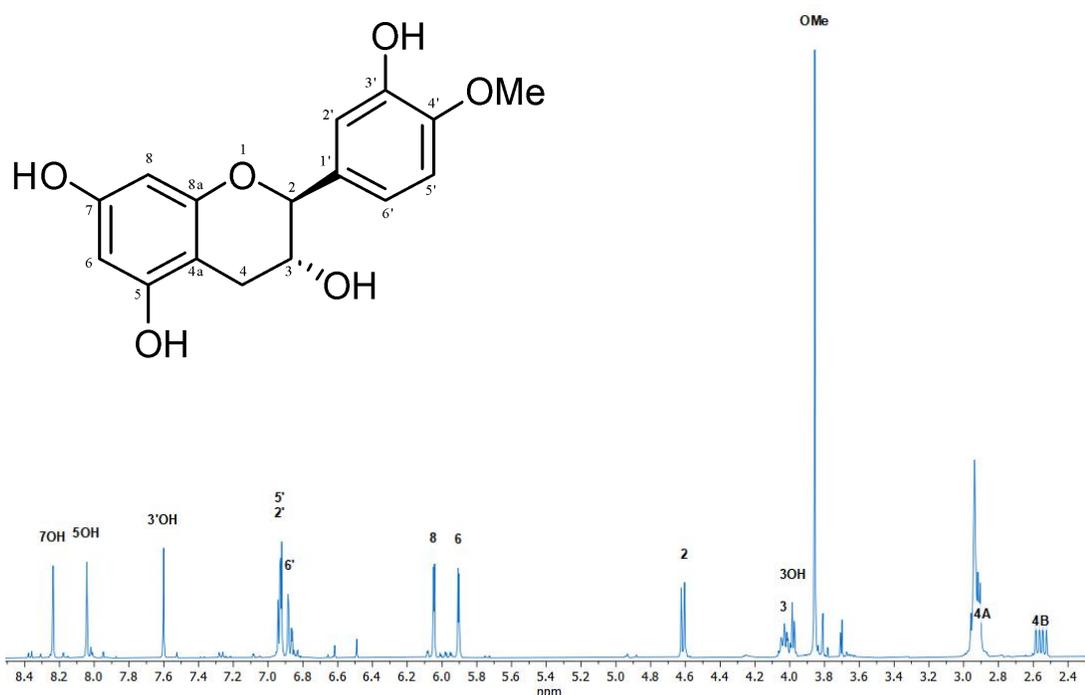


Figura 47. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **2** adquirido a 400 MHz en acetona-d₆.

Tabla 20. Comparación de datos de RMN ¹H (400 MHz) en acetona-d₆ de la (-)-4'-O-metilcatequina.⁶⁶

Hidrógeno	δ _H Ref	δ _H Exp	J Exp (Hz)	J (Hz) Ref
2	4.61 (d)	4.62 (d)	8	8
3	4.00 (m)	4.03 (m)		
4α	3.20 (m)	2.93 (dd)	16, 5	
4β	2.30 (m)	2.55 (dd)	16, 8	
6	5.89 (d)	5.90 (d)	2	2
8	6.03 (d)	6.05 (d)	2	2
2'	6.90 (d)	6.93 (d)	2	2

OMe	3.84 (s)	3.86 (s)		
5'	6.95 (d)	6.93 (d)	8	8
6'	6.81 (dd)	6.87 (dd)	2, 8	2, 8

Con base en la constante de acoplamiento observada para el átomo de hidrógeno en la posición 2, el sustituyente del C-2 está en orientación *trans* con respecto al sustituyente en C-3.⁶⁶

La rotación óptica específica a 25°C con lámpara de sodio fue de $[\alpha]_D^{25} = -7.2$ (c 0.65, MeOH), dicha rotación óptica es próxima al valor reportado en la literatura,⁶⁶ pero de signo contrario, teniendo en este caso el enantiómero levógiro, la (-)-4'-O-metilcatequina (Figura 34).

6.1.3. Elucidación estructural del β -sitosterol (3)

El compuesto obtenido **3** (22.2 mg) se aisló como un sólido cristalino.

En el espectro de RMN de ¹H en CDCl₃ (Figura 48), se observó una señal múltiple en 3.41 ppm (*J*= 11, 5) correspondiente al protón H-3. La señal doble en 5.33 ppm (*J*= 4) se asignó al protón H-6. Las señales dobles en 0.81 (*J*= 8), 0.85 (*J*= 7) y 0.92 ppm (*J*= 6) fueron asignadas a los protones H-26, H-27 y H-21 respectivamente. En 1.01 y 0.68 ppm se observaron dos señales simples correspondientes a los protones H-18 y H-19. Se asignó a dicho compuesto en comparación con datos reportados.^{67, 68}

⁶⁷. Prakash, V. & Prakash, I. (2012): "Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*", *International Current Pharmaceutical Journal*, 9. Disponible en: <https://n9.cl/b8zckv>

⁶⁸. Cayme, J. & Ragasa, C. (2004): "Structure elucidation of β -stigmasterol and β -sitosterol from *Sesbania grandiflora* (Linn.) Pers. and β -carotene from *Heliotropium indicum* Linn. by NMR spectroscopy", *KIMIKA*, 20. Disponible en: <https://n9.cl/xe4wme>

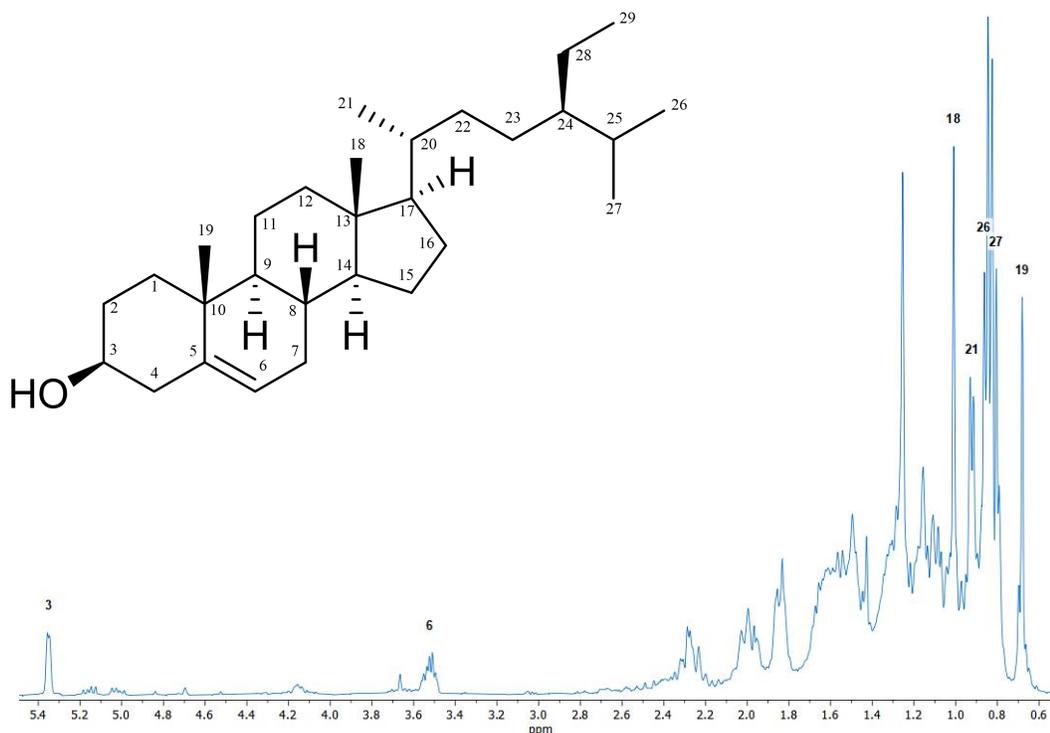


Figura 48. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **3** adquirido a 400 MHz en CDCl₃.

6.1.4. Elucidación estructural parcial de la (-)-4'-O-metilgalocatequina (**4**) y de la (-)-galocatequina (**5**)

La mezcla de compuestos **4** y **5** fue aislada como un sólido amarillo (35.7 mg).

En el espectro de RMN de ¹H en acetona-d₆ (Figura 49) se observaron tres señales múltiples en 2.56, 2.87 y 4.03 ppm correspondientes a los protones H-4_β, H-4_α y H-3 respectivamente. En 4.13 y 4.59 ppm se observaron dos señales dobles correspondientes al protón base de oxígeno H-3 y al protón H-2 respectivamente. Las señales dobles en 5.91 y 6.04 ppm fueron asignadas a los protones H-8 y H-6 respectivamente. La señal simple en 6.49 ppm se asignó a los protones H-6' y H-2'. En 8.05 ppm se observó una señal simple correspondiente a los protones bases de oxígeno H-3' y H-5'. Las señales simples en 8.10 y 8.27 ppm se asignaron a los protones bases de oxígeno H-5 y H-7 respectivamente.

Finalmente, se observó una señal simple en 3.80 ppm correspondiente al grupo metilo Me-4', cuya unión al átomo de oxígeno del C-4' forma la 4'-O-metilgalocatequina (Figura 35). Los datos obtenidos comparados con los reportados,⁶⁹ se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Comparación de datos de RMN ¹H (400 MHz) de la (-)-4'-O-metilgalocatequina.⁶⁸

Hidrógeno	δ_H Ref *	δ_H Exp **	J Exp (Hz) **	J Ref (Hz) *
2	4.59 (s)	4.59 (d)	7	
3	3.99 (m)	4.03 (m)		
4 α	2.84 (dd)	2.87 (dd)	16, 5	16, 5
4 β	2.56 (dd)	2.56 (dd)	16, 8	16, 8
6	5.95 (d)	6.04 (d)	2	2
8	5.86 (d)	5.91 (d)	2	2
2', 6'	6.42 (s)	6.49 (s)		
OMe	3.80 (s)	3.80 (s)		

*En metanol-d₄

**En acetona-d₆

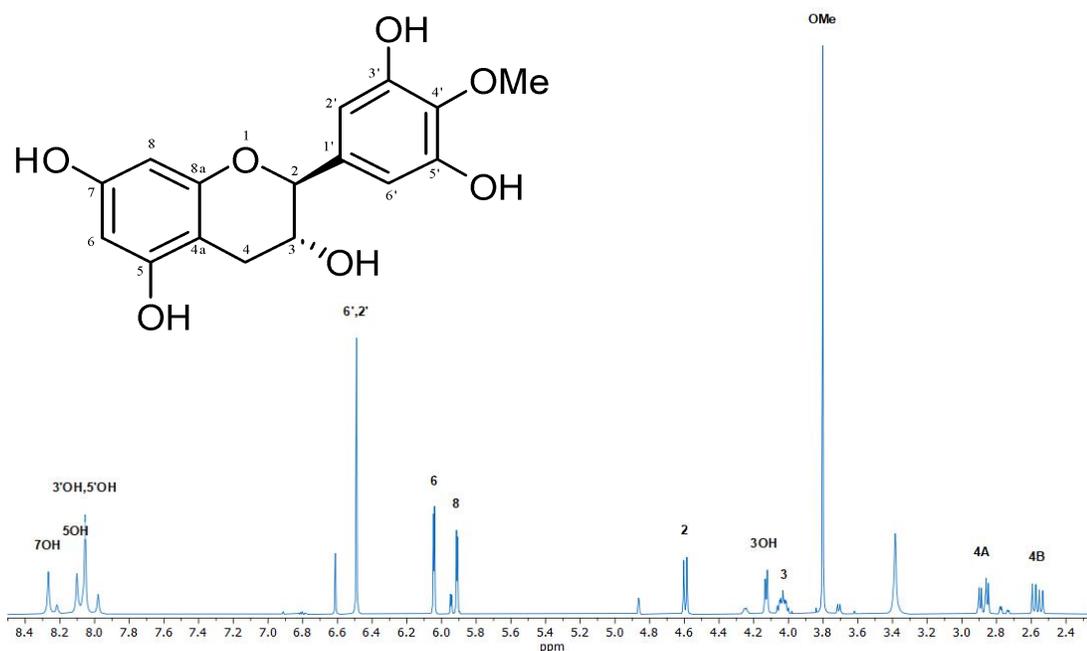


Figura 47. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **4** adquirido a 400 MHz en acetona-d₆.

Con base en la constante de acoplamiento observada para el átomo de hidrógeno en la posición 2, el sustituyente del C-2 está en orientación *trans* con respecto al sustituyente en C-3.⁶⁶

Además, se observó una señal doble de dobles en 2.75 ppm ($J= 16, 3$) correspondiente al protón H-4 α . En 4.25 y 5.95 ppm ($J= 2$) se observaron dos señales dobles correspondientes al protón base de oxígeno H-3 y al protón H-8 respectivamente. La señal simple en 6.62 ppm se asignó a los protones H-6' y H-2' (Espectro 10). Dichas señales aparecen en menor abundancia a las reportadas en el compuesto **4**, con lo cual, se propone la mezcla de dos compuestos similares, con cambio en el sustituyente en C-4', este segundo compuesto se propone con sustituyente OH en el C-4', debido a la señal en 7.98 ppm, correspondiente al protón base de oxígeno H-4', siendo así la galocatequina (compuesto **5**) el compuesto en menor proporción (Figura 36).⁶⁹

Por último, se midió la rotación óptica específica a 25°C con lámpara de sodio de la mezcla, con el fin de determinar únicamente el tipo de enantiómeros obtenidos, se obtuvo que los compuestos están en su forma levógira (-).

^{69.} Nawi, L., Wan, Z., Ahmat, N., Puteh, C., Takaya, Y., Salihah, A., Adnan, N. & Zakirah, S. (2023): "Chemotaxonomic Relationship of Oligomer Resveratrol in Three Malaysian *Dipterocarpus* Species from the Taxonomic Tribe of Dipterocarpaceae", *Indonesian Journal Chemistry*. Disponible en: <https://n9.cl/hmd12>

6.2. Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa

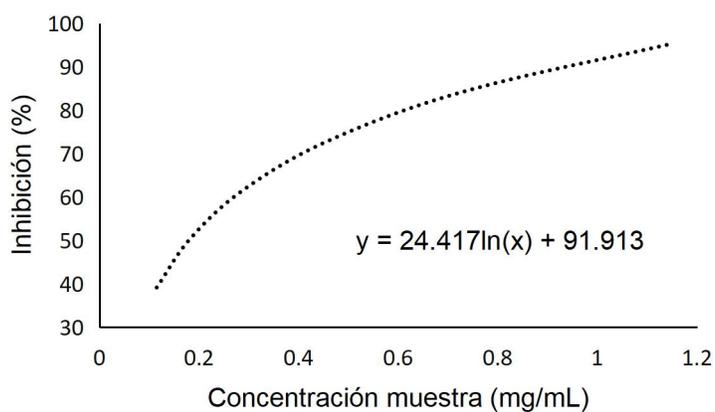
Diversos investigadores han enfocado sus esfuerzos en la búsqueda de productos naturales que inhiban la enzima α -glucosidasa.^{70, 71, 72} Algunos autores concluyen que flavonoides y polifenoles así como sus derivados glicosilados resultan ser inhibidores efectivos de esta enzima.⁷³ Con la finalidad de comprobar si las raíces de *Z. augusta* son responsables de la actividad biológica propuesta, se procedió a determinar su efecto inhibitorio sobre α -glucosidasa.

El extracto metanólico de las raíces de *Z. augusta* fue evaluado en un rango de concentraciones entre 1.15 y 0.115 mg/mL. Los extractos mostraron tener capacidad inhibitoria contra la enzima, con una IC₅₀ del orden de 0.18 mg/mL, en comparación con la acarbose utilizada como control positivo (IC₅₀= 0.47 mg/mL). El IC₅₀ obtenido para el extracto, es más de 2.5 veces más pequeño que el fármaco utilizado como comparación (acarbose), comprobando de esta manera el efecto antidiabético supuesto por la medicina tradicional.

-
70. Abesundara, K., Matsui, T. & Matsumoto, K. (2004): " α -Glucosidase Inhibitory Activity of Some Sri Lanka Plant Extracts, One of Which, *Cassia auriculata*, Exerts a Strong Antihyperglycemic Effect in Rats Comparable to the Therapeutic Drug Acarbose", *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 2541–2545. Disponible en: <https://n9.cl/jdbrsc>
71. Andrade, A., Becerra, J. & Cárdenas, R. (2008): "Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes", *Journal of Ethnopharmacology*, 116, pp. 27-32. Disponible en: <https://n9.cl/gwd7o>
72. Lankatillake, C., Luo, S., Flavel, M., Lenon, G., Gill, H., Huynh, T. & Dias, D. (2021): "Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in α -amylase, α -glucosidase and lipase assays", *Plant Methods*, 17(3). Disponible en: <https://n9.cl/hmd12>
73. Jung, M., Park, M., Lee, H., Kang, Y., Kang, E. & Kim, S. (2006): "Antidiabetic agents from medicinal plants", *Current Medicinal Chemistry*, 13(10), pp. 1203-1218. Disponible en: <https://n9.cl/43r2k>

Tabla 22. Inhibición (%) e IC₅₀ del extracto MeOH de la raíz de *Z. augusta*.

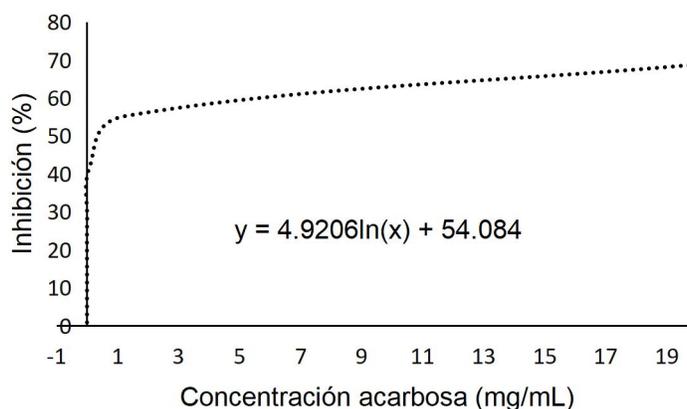
Extracto metanólico de raíces de <i>Z. augusta</i>		
Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
1.15	91.00	
0.575	84.59	0.18
0.115	37.24	



Gráfica 1. Inhibición (%) vs concentración muestra (mg/mL).

Tabla 23. Inhibición (%) e IC₅₀ de la acarbosa.

Solución acarbosa		
Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
20	70.97	
2	56.99	
0.2	42.06	
2x10 ⁻³	26.59	0.47
2x10 ⁻⁴	12.08	
2x10 ⁻⁵	0.32	



Gráfica 2. Inhibición (%) vs concentración acarbosa (mg/mL).

6.3. Determinación de la capacidad antioxidante método DPPH

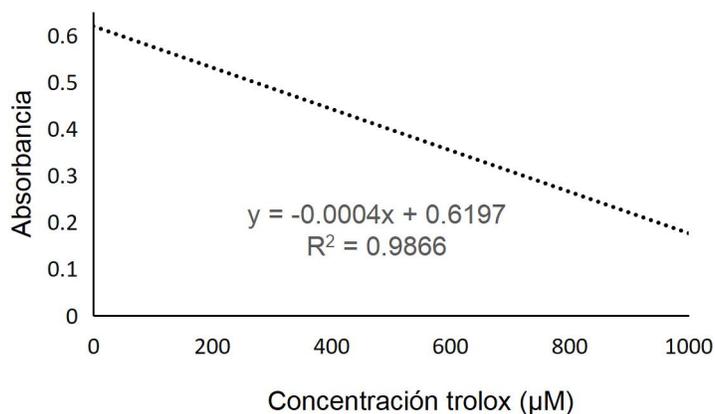
Como estudio extra y con el fin de comprobar si el extracto metanólico tiene actividad relacionada con la capacidad antioxidante, se procedió a determinar su posible efecto con los métodos DPPH, ABTS y FRAP.

El extracto metanólico de la raíz de *Z. augusta* fue sometido a evaluación antioxidante por el método DPPH utilizando un rango de concentraciones entre 0.5 y 0.02 mg/mL.

Los datos obtenidos fueron interpolados a partir de la curva de calibración del antioxidante de referencia Trolox (Gráfica 3) para calcular el contenido de mmol EqT/g. Se llegó a 903.4 mmol EqT/g para la concentración más alta y a 137.6 mmol EqT/g para la concentración más baja utilizada del extracto (Tabla 25).

Tabla 24. Curva de calibración Trolox, ensayo DPPH y ABTS.

Solución Trolox							
Concentración (µM)	1000	800	600	400	200	100	0
Absorbancia	0.2035	0.2380	0.3320	0.4560	0.5390	0.5805	0.6145

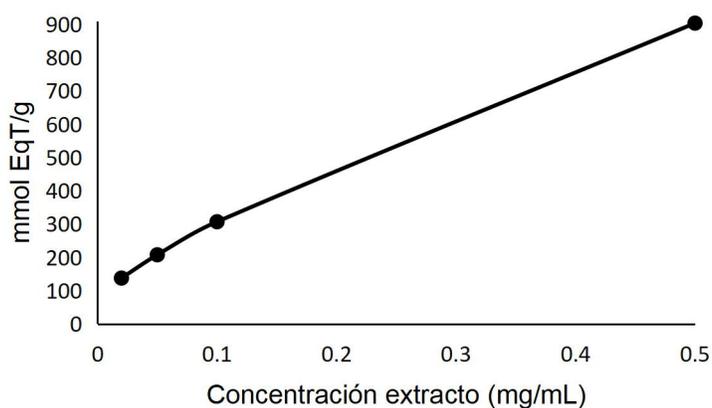


Gráfica 3. Curva de calibración con Trolox, ensayo DPPH y ABTS.

A continuación, se muestra la gráfica con la curva concentración-respuesta del extracto metanólico evaluado.

Tabla 25. Absorbancia y mmol EqT/g del extracto MeOH de la raíz de *Z. augusta*, ensayo DPPH.

Extracto metanólico de raíces de <i>Z. augusta</i>				
Concentración (mg/mL)	0.5	0.1	0.05	0.02
Absorbancia	0.2580	0.4750	0.5370	0.5650
mmol EqT/g	903.4	306.9	207.6	137.6



Gráfica 4. mmol EqT/g vs concentración de extracto (mg/mL), ensayo DPPH.

6.4. Determinación de la capacidad antioxidante método ABTS

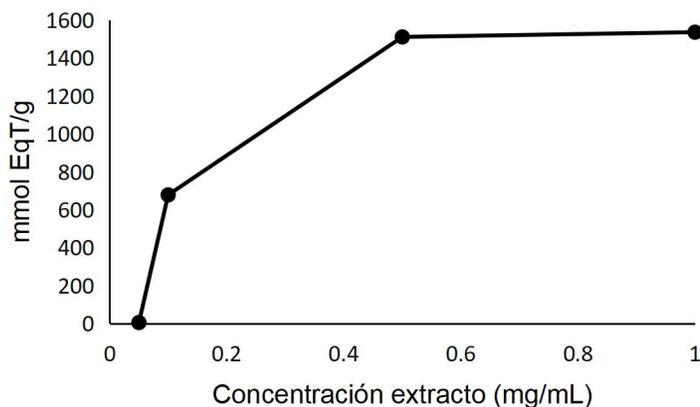
El extracto metanólico de la raíz de *Z. augusta* fue sometido a evaluación antioxidante por el método ABTS utilizando un rango de concentraciones entre 1 y 0.05 mg/mL.

Los datos obtenidos fueron interpolados a partir de la curva de calibración del antioxidante de referencia Trolox (Gráfica 3) para calcular el contenido de mmol EqT/g. Se llegó a 1535 mmol EqT/g para la concentración más alta y a 5.5 mmol EqT/g para la concentración más baja utilizada del extracto (Tabla 26).

A continuación, se muestra la gráfica con la curva concentración-respuesta del extracto metanólico evaluado.

Tabla 26. Absorbancia y mmol EqT/g del extracto MeOH de la raíz de *Z. augusta*, ensayo ABTS.

Extracto metanólico de raíces de <i>Z. augusta</i>				
Concentración (mg/mL)	1	0.5	0.1	0.05
Absorbancia	0.0055	0.0155	0.3485	0.6175
mmol EqT/g	1535.5	1510.5	678.0	5.5



Gráfica 5. mmol EqT/g vs concentración de extracto (mg/mL), ensayo ABTS.

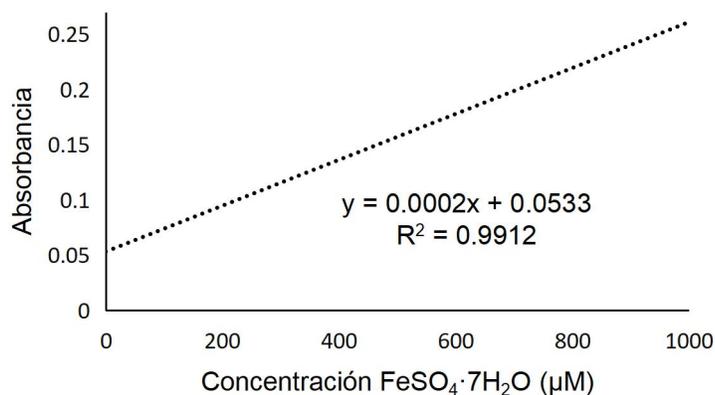
6.5. Determinación de la capacidad antioxidante método FRAP

El extracto metanólico de la raíz de *Z. augusta* fue sometido a evaluación antioxidante por el método FRAP utilizando un rango de concentraciones entre 0.1 y 0.01 mg/mL.

Los datos obtenidos fueron interpolados a partir de la curva de calibración del antioxidante de referencia $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Gráfica 5) para calcular el contenido de $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$. Se llegó a 881.83 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ para la concentración más alta y a 155.17 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ para la concentración más baja utilizada del extracto (Tabla 28).

Tabla 27. Curva de valoración con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ensayo FRAP.

Solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$						
Concentración (μM)	1000	750	500	250	100	0
Absorbancia	0.2545	0.2190	0.1610	0.0955	0.0710	0.0590

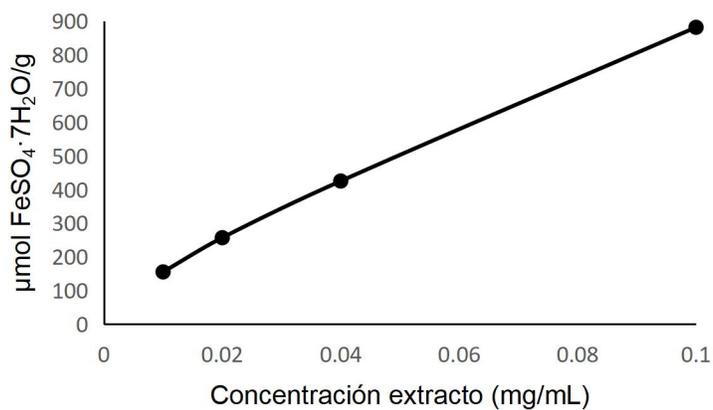


Gráfica 5. Curva de calibración con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ensayo FRAP.

A continuación, se muestra la gráfica con la curva concentración-respuesta del extracto metanólico evaluado.

Tabla 28. Absorbancia y $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ del extracto MeOH de la raíz de *Z. augusta*, ensayo FRAP.

Extracto metanólico de raíces de <i>Z. augusta</i> .				
Concentración (mg/mL)	0.1	0.04	0.02	0.01
Absorbancia	0.0055	0.0155	0.3485	0.6175
$\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$	881.83	425.17	256.83	155.17



Gráfica 6. $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ vs concentración de extracto (mg/mL), ensayo FRAP.

7. CONCLUSIONES

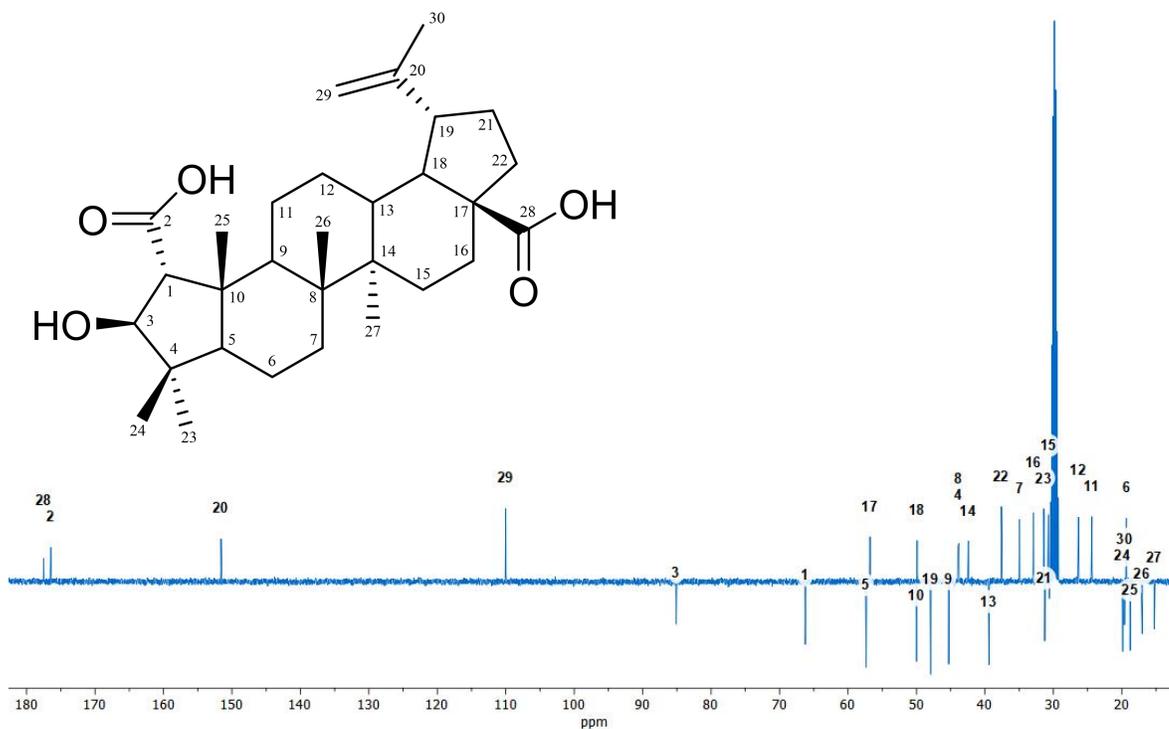
1. Se aislaron tres compuestos del extracto metanólico de *Z. augusta*, cuyas estructuras químicas fueron elucidadas mediante el análisis de técnicas espectroscópicas, principalmente por RMN de ¹H y ¹³C en 1D y 2D, además de la comparación con los datos espectroscópicos descritos previamente.
2. De los tres compuestos aislados se identificó el triterpeno ácido ceanótico (**1**), al flavonoide (-)-4'-O-metilcatequina (**2**) y al esteroil β-sitosterol (**3**).
3. Del extracto metanólico de *Z. augusta* se aislaron parcialmente dos flavonoides del tipo galocatequina, cuyas estructuras químicas fueron elucidadas parcialmente mediante el análisis de técnicas espectroscópicas, principalmente por RMN de ¹H en comparación con datos de la literatura química.
4. Se obtuvieron los espectros de RMN de ¹H y de ¹³C, APT, HSQC, HMBC, IR y Rayos X en el compuesto de mayor interés aislado: ácido ceanótico.
5. A través de la búsqueda bibliográfica se determinó que todos los compuestos aislados no habían sido identificados ni descritos en la especie *Z. augusta*, siendo esta la primera vez que el ácido ceanótico (**1**), la (-)-4'-O-metilcatequina (**2**) y el β-sitosterol (**3**) son aislados y descritos en la especie.
6. Se aislaron dos nuevos compuestos (ácido ceanótico y (-)-4'-O-metilcatequina), además de que se aisló el primer triterpeno (ácido ceanótico) y el primer compuesto del tipo catequina ((-)-4'-O-metilcatequina) en el género *Zaluzania*.
7. Se aisló el primer esteroil (β-sitosterol) en la especie *augusta*, el cual ya había sido identificado en *Z. parthenioides*.⁴⁴

8. Utilizando un gradiente de concentración del extracto metanólico, la raíz de *Z. augusta* fue evaluada en el ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa. El extracto metanólico en su mayor concentración, mostró tener una actividad de inhibición de la enzima α -glucosidasa excelente. Se calculó la IC₅₀ para el extracto y se obtuvo una IC₅₀ más de 2.5 veces mejor que la acarbosa, el cual es el fármaco más utilizado de su tipo.
9. Todos los extractos demostraron tener propiedades antioxidantes, siendo la técnica ABTS la que presentó los valores más altos.
10. Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen al conocimiento fitoquímico y farmacológico del género *Zaluzania*, además de que respaldan la importancia de la investigación química y farmacológica de las plantas, en términos de proporcionar información sobre el perfil químico de los géneros y las especies que las comprenden y la relevancia de identificar compuestos con actividad farmacológica para que puedan ser utilizados en el tratamiento de diversas patologías.

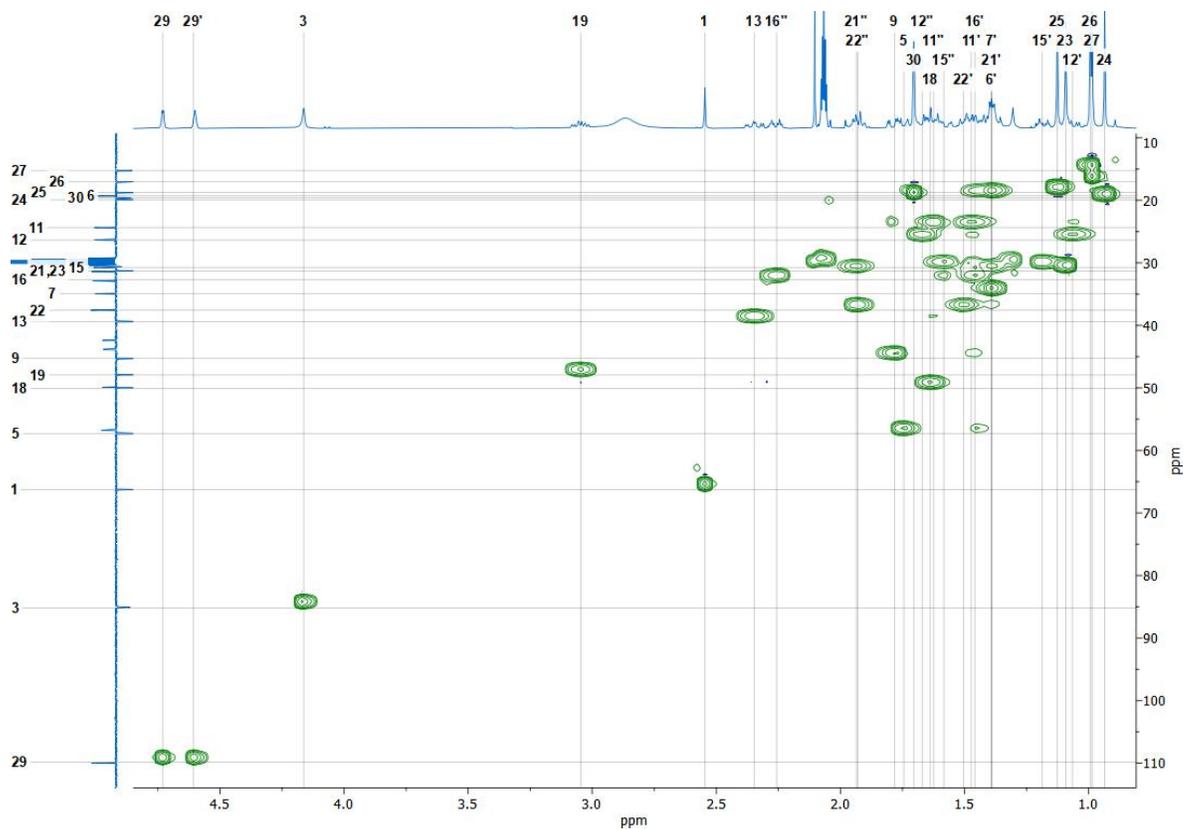
8. ANEXOS

8.1. Compuesto 1, ácido ceanótico

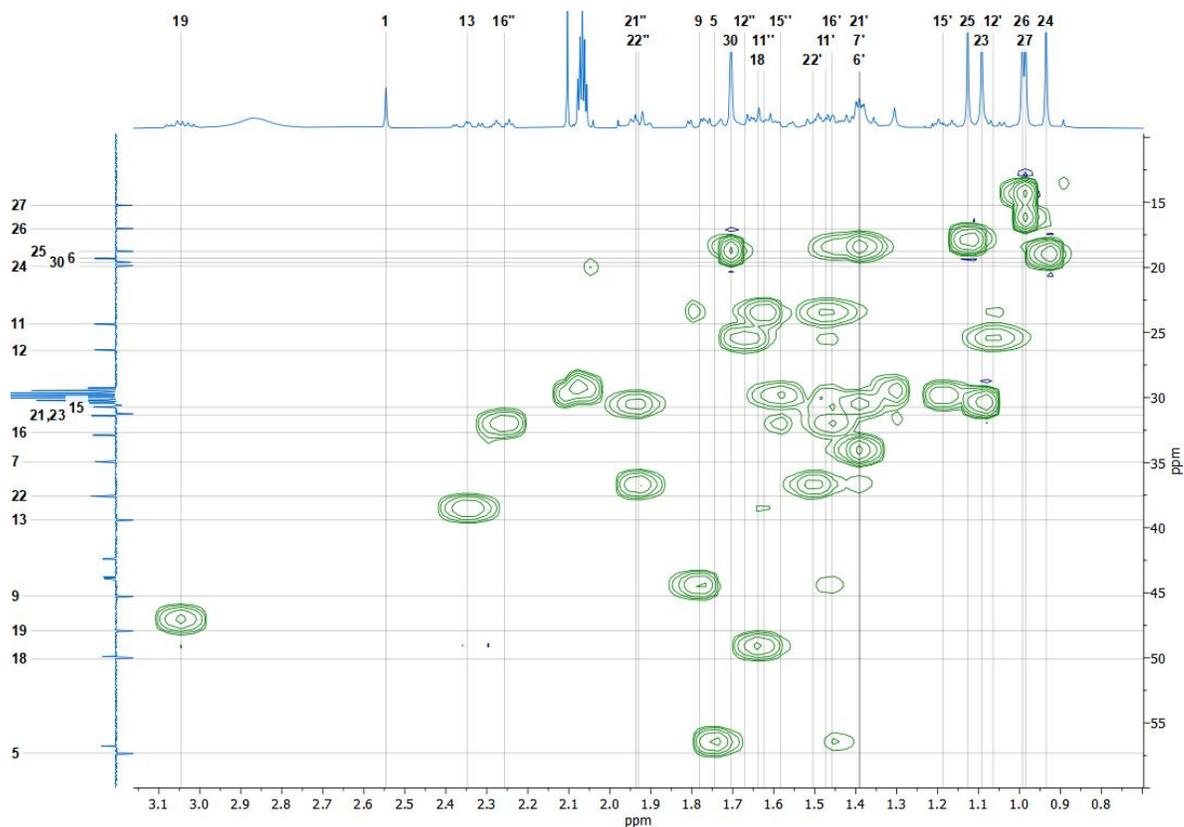
8.1.1. Espectro 1. Espectro APT del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en acetona-d₆.



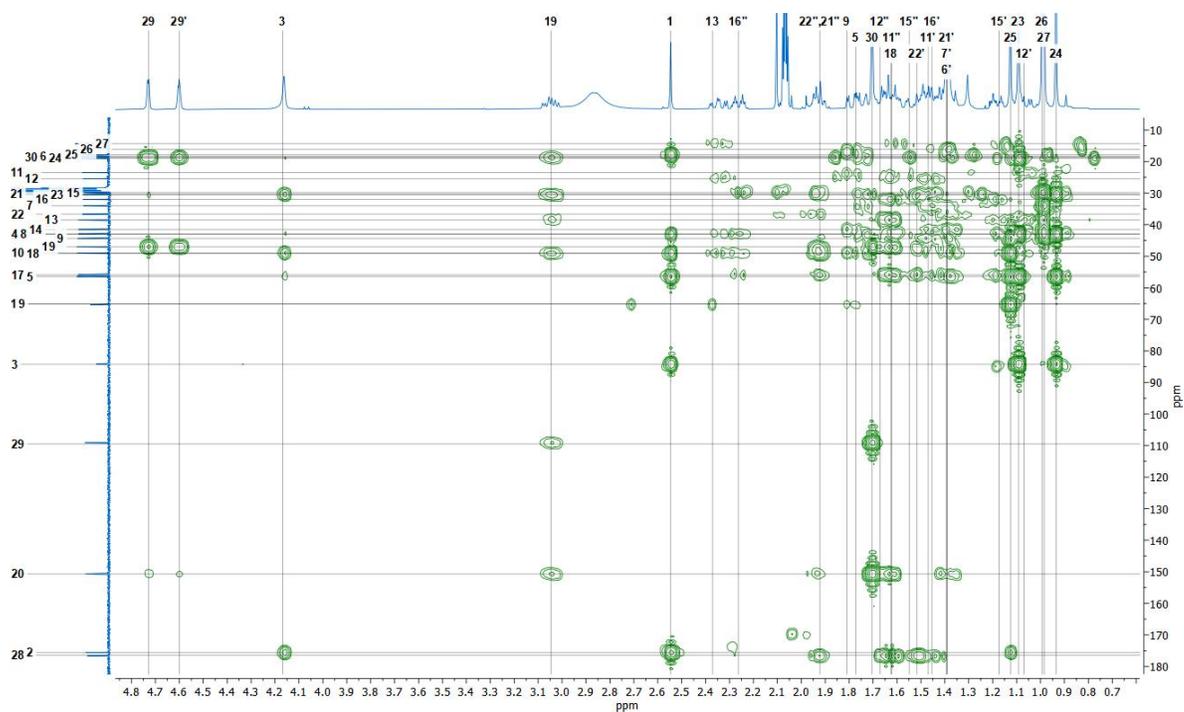
8.1.2. Espectro 2. Espectro HSQC del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en acetona-d₆.



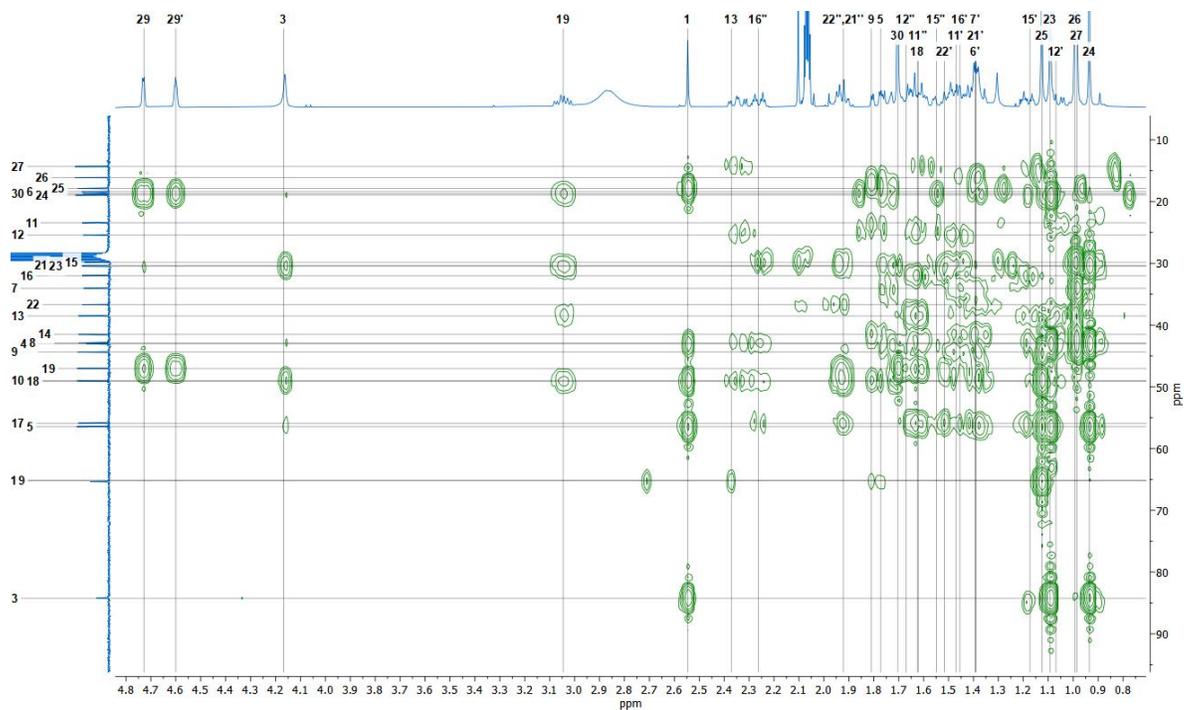
8.1.3. Espectro 3. Espectro HSQC ampliación del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en acetona-d₆.



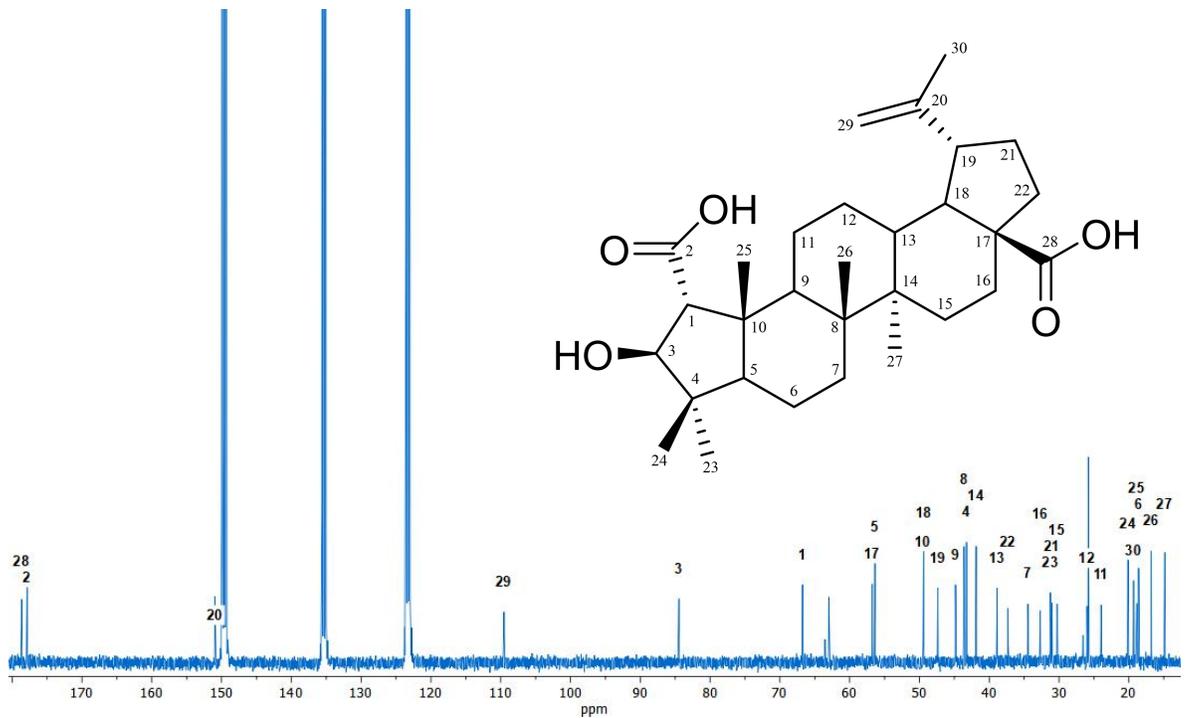
8.1.4. Espectro 4. Espectro HMBC del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en acetona-d₆.



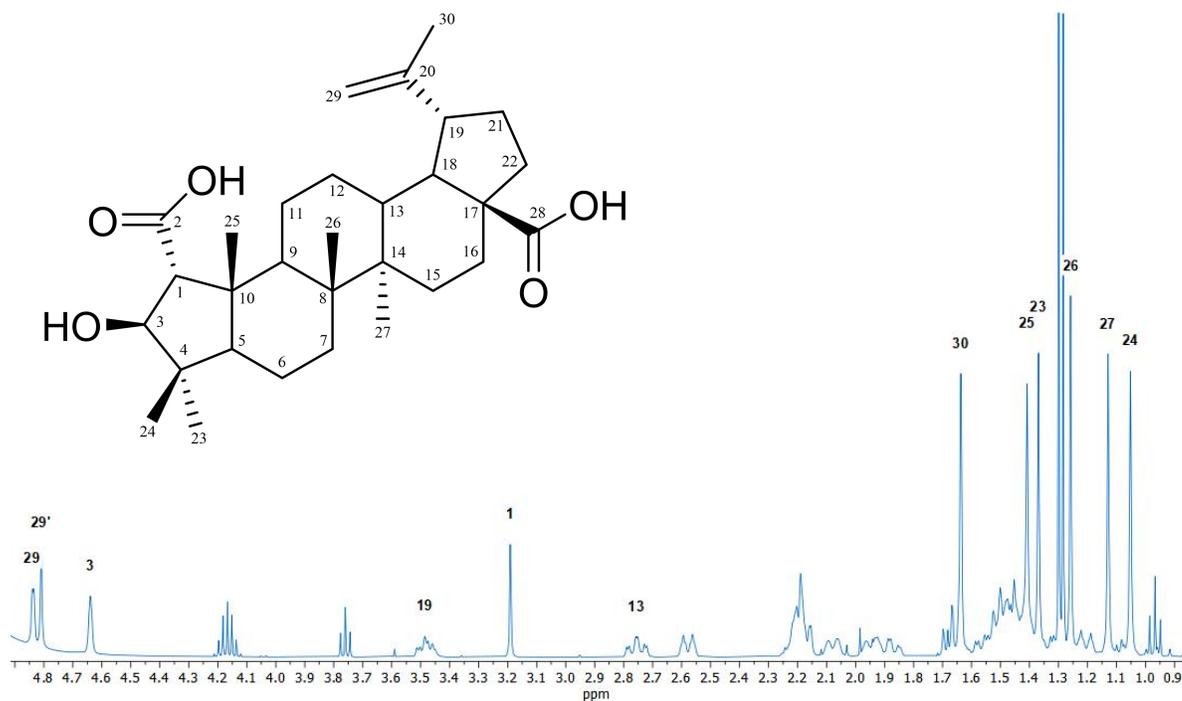
8.1.5. Espectro 5. Espectro HMBC ampliación del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en acetona-d₆.



8.1.6. Espectro 6. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en piridina- d_5 .



8.1.7. Espectro 7. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 1 adquirido a 400 MHz en piridina- d_5 .

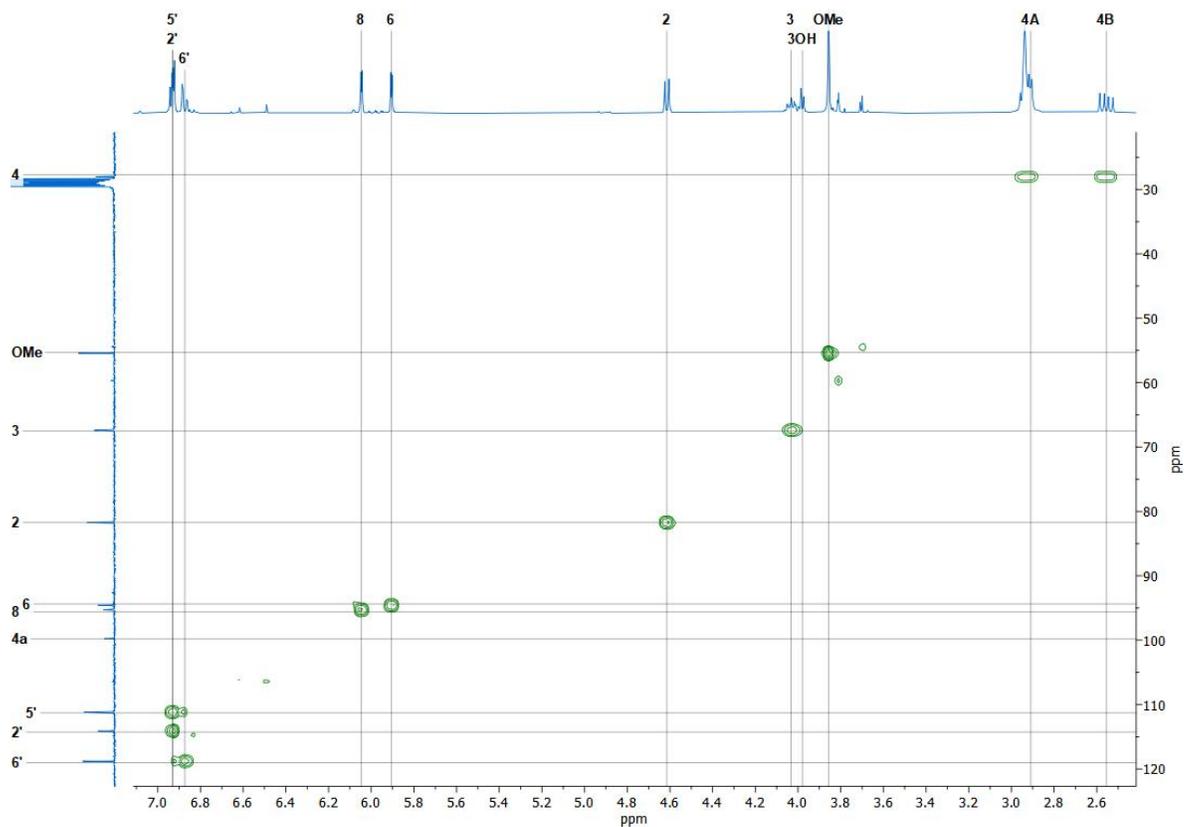


8.1.8. Tabla 1, datos cristalográficos del compuesto 1

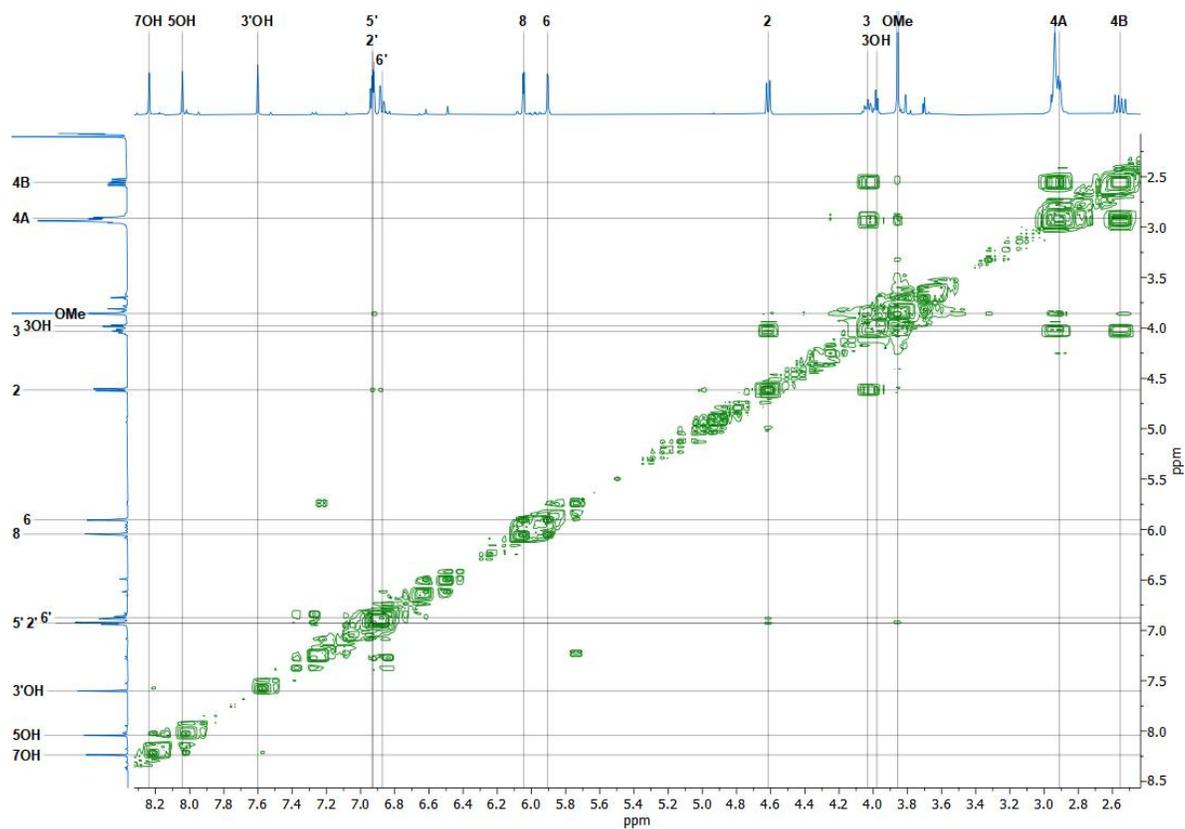
Fórmula empírica	C ₃₀ H ₄₆ O ₅
Peso molecular	486.7 g/mol
Temperatura/K	295
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>a</i> /Å	8.7938 (2)
<i>b</i> /Å	17.4176 (3)
<i>c</i> /Å	20.5276 (3)
Volumen/Å ³	3144.15 (10)
Z	4
ρ calculada g/cm ³	1.155
Coeficiente de absorción mm ⁻¹	0.614
F(000)	1200.0
Tamaño de cristal/mm ³	0.4 × 0.4 × 0.2
Radiación	Cu K α (λ = 1.54184)
Intervalo de θ para los datos colectados/°	6.656 a 154.868
Intervalos de índice	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 11, -19 ≤ <i>k</i> ≤ 21 ≤ -25 ≤ <i>l</i> ≤ 24
Reflexiones colectadas	15107
Reflexiones independientes	6581 [<i>R</i> _{int} = 0.0274, <i>R</i> _{sigma} = 0.0305]
Datos/ restricciones/ parámetros	6581/4/375
Bondad de ajuste en F ²	1.035
Índice final de R [<i>I</i> ≥ 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0509, <i>wR</i> ₂ = 0.1385
Índice final de R [todos los datos]	<i>R</i> ₁ = 0.0545, <i>wR</i> ₂ = 0.1442
Parámetro de Flack	0.04(10)
Máxima y mínima diferencia de $\rho(r)$ / e Å ⁻³	0.26/-0.24

8.2. Compuesto 2, (-)-4'-O-metilcatequina

8.2.1. Espectro 8. Espectro HSQC del compuesto 2 adquirido a 400 MHz en acetona-d₆.



8.2.2. Espectro 9. Espectro COSY del compuesto 2 adquirido a 400 MHz en acetona-d₆.



8.3. Compuesto 3, (-)-gallocatequina

8.3.1. Espectro 10, Espectro de RMN de ¹³C del compuesto 5 adquirido a 400 MHz en piridina-d₅.

