



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Licenciatura en Química

TESIS

**Búsqueda de metabolitos secundarios de la especie
Adolphia infesta y su evaluación biológica**

**Para obtener el título de
Licenciado en Química**

Presenta

Oliver Yarin Espinoza García

Directora

Dra. Reyna Zeferino Díaz

Codirector

Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

Pachuca de Soto, Hidalgo, noviembre 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
School of Engineering and Basic Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 18 de noviembre de 2025

Número de control: ICBI-D/2805/2025

Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Con Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio, le comunico que el Jurado asignado al egresado de la Licenciatura en Química **Oliver Yarin Espinoza García**, quien presenta el trabajo de titulación "**Búsqueda de metabolitos secundarios de la especie *Adolphia infesta* y su evaluación biológica**", ha decidido, después de revisar fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; dicho trabajo en la reunión de sinodales, **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente: Dra. Susana Rojas Lima

Secretario: Dra. Raquel Cariño Cortés

Vocal: Dra. Reyna Zeferino Díaz

Suplente: Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez
Director de ICBI

GVR/YCC



Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 40001
direccion_icbi@uaeh.edu.mx, vergara@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



2025



uaeh.edu.mx

Dedicatoria

Para mis padres por haber confiado y apoyado completamente en esta etapa de mi vida para que pudiera culminar mis estudios universitarios.

Agradecimientos

Principalmente a Dios por haberme dado la oportunidad de comenzar y terminar una carrera universitaria, dando sustento y tranquilidad durante todo este proceso.

A mis padres porque esto es por y para ellos, sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

A mi Padre por todo su sacrificio, paciencia y confianza para que yo pudiera estudiar una carrera universitaria. Siempre estaré agradecido por todo el esfuerzo que realizas para que nunca me falte nada aun estando lejos. Por toda la motivación que me das, por ser un ejemplo para mí y hacer todo esto posible.

A mi Madre por todo su sacrificio y apoyo emocional que me dio durante toda mi estancia universitaria. Gracias por todo tu tiempo para escucharme y ser un pilar en la casa para mis hermanos y mi padre. Te admiro mucho y quiero que te sientas orgullosa de mí.

A la Dra. Reyna Zeferino Díaz por su paciencia, confianza y apoyo. Siempre estuvo al pendiente de mi progreso durante este proyecto, ayudando y dando ánimos para concluirlo. Gracias por aceptarme como su asesorado de tesis, fue un placer y un orgullo.

Al Dr. J. Jesús Martín Torres por aceptarme dentro de su laboratorio, estar al pendiente y ser de apoyo en mi proyecto.

A la Dra. Raquel Cariño Cortés por su apoyo y aportación al proyecto.

A mi familia por haber sido parte y estar presente durante toda mi estancia universitaria.

A mis compañeros y amigos Gabriela Olvera, Ángel Trinidad, Patricia Damian, Leslie Torres por su amistad, apoyo y aportaciones.

Al resto de compañeros dentro del laboratorio por ser una gran compañía y apoyo durante todo este tiempo. Gracias por su amistad y compañía, sin ustedes todo este proceso no hubiera sido tan cómodo y divertido.

A las amistades que formé a lo largo de toda la carrera, por su compañía, y todos los buenos momentos juntos y por su confianza, hicieron de mi estancia universitaria un lugar muy agradable.

Abreviaturas y acrónimos

μL	Microlitro
A.	<i>Adolphia</i>
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
AcOEt	Acetato de Etilo
AO	Ácido oleanólico
B	Blanco
C	Carbono
CN	Control negativo
CnnE	Control negativo no enzimático
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear
CP	Control positivo
Dd	Doble de dobles
DG	Diabetes gestacional
DM1	Diabetes mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes mellitus Tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidracilo
EGG	Epigallocatequina
ERC	Enfermedad renal crónica
EtOH	Etanol
FRAP	Poder antioxidante reductor férrico
g	Gramo
H	Hidrógeno
HMBC	Correlación heteronuclear a enlaces múltiple
HSQC	Correlación heteronuclear de un único cuanto
J	Constante de acoplamiento
M	Molar
M	Múltiple

MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mg/mL	Miligramo por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol EqT/g	Milimol de Trolox por gramo de extracto
NaOH	Hidróxido de sodio
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -butanol
<i>p</i>-NPG	<i>p</i> -nitrofenol- α -D-glucopiranosido
ppm	Partes por millón
RL	Radicales libres
RLO	Radicales libre de oxígeno
RMN	Resonancia magnética nuclear
<i>s</i>	Simple
<i>t</i>	Triple
TLC	Cromatografía en capa fina
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
UA	Ácido ursólico

ÍNDICE

1. Introducción.....	10
2. Generalidades	12
2.1 Diabetes.....	12
2.1.1 Prediabetes	12
2.1.2 Diabetes en México y en el mundo	13
2.1.3 Tratamiento de la diabetes.....	14
2.1.3.1 Inhibidores de la enzima α -glucosidasa	14
2.1.4 Método para la determinación de la inhibición de α -glucosidasa	17
2.1. Oxidación.....	18
2.1.1. Estrés oxidativo	18
2.1.2. Radicales libres	19
2.1.2.1. Daños por radicales libres	20
2.1.3. Compuestos con actividad antioxidante	21
2.1.4. Ensayos para la determinación de la actividad antioxidante	22
2.1.4.1. Ensayo del 2,2'-azinobis(3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS ^{•+})	22
2.1.4.2. Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	23
2.1.4.3. Ensayo del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP).....	24
2.2. Familia Rhamnaceae	25
2.2.1. Género <i>Adolphia</i>	27
2.2.1.1. <i>Adolphia infesta</i>	27
3. Justificación.....	30
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivos	32
a. Objetivo general.....	32
b. Objetivos específicos	32
6. Procedimientos generales.....	33
6.1. Metodología general	34
6.2. Colecta y obtención de la especie	35

6.3.	Secado y trituración de la planta.....	35
6.4.	Obtención del extracto	35
6.5.	Particiones de AcOEt y <i>n</i> -butanol	36
6.6.	Obtención de metabolitos secundarios	37
6.7.	Pruebas para la determinación de la capacidad antioxidante	40
6.7.1.	Evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS	40
6.7.2.	Evaluación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.....	43
6.7.3.	Evaluación de la capacidad antioxidante por el método FRAP	44
6.8.	Evaluación de la actividad inhibidora de la α -glucosidasa	46
7.	Resultados y discusión.....	50
7.1.	Compuestos obtenidos de la especie <i>Adolphia infesta</i>	50
7.1.1.	Elucidación estructural del ácido ursólico	50
7.1.2.	Elucidación estructural de la (-)-Epigallocatequina (EGC)	57
7.2.	Evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS.....	63
7.3.	Evaluación de la capacidad antioxidante por el método DPPH	70
7.4.	Evaluación de la capacidad antioxidante por el método FRAP.....	74
7.5.	Evaluación de la actividad inhibidora de la α -glucosidasa	77
8.	Conclusiones.....	86
9.	Anexos	88
9.1.	Espectro de RMN COSY de la epigallocatequina adquirido a 400 MHz en acetona-d ₆	88
9.2.	Espectro de RMN HMBC de la epigallocatequina adquirido a 400 MHz en acetona-d ₆	89
9.3.	Desplazamientos de las señales de ¹ H y ¹³ C de la epigallocatequina (a 400 MHz en acetona-d ₆).....	90
9.4.	Espectro de RMN de ¹ H de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico adquirido a 400 MHz en CDCl ₃	91
9.5.	Espectro de RMN HSQC del ácido ursólico adquirido a 400 MHz en CDCl ₃	91
9.6.	Espectro de RMN HMBC del ácido ursólico adquirido a 400 MHz en CDCl ₃	93
9.7.	Espectro de RMN COSY del ácido ursólico adquirido a 400 MHz en CDCl ₃	94

9.8. Desplazamientos de las señales de ^1H y ^{13}C del ácido ursólico (a 400 MHz en CDCl_3)	95
--	----

1. Introducción

El uso de plantas medicinales es una práctica utilizada por los humanos desde la época prehispánica hasta la actualidad.¹ Este tipo de prácticas, a base de ensayo y error, ahora forman parte del conocimiento tradicional de las diferentes culturas que existen, por lo que se les llamó medicina tradicional.² Las plantas con propiedades medicinales no solo son beneficiosas para tratar diferentes enfermedades, sino que también se pueden utilizar como fuentes de alimentos nutritivos y materias primas esenciales para la supervivencia.³

México posee gran diversidad en su territorio, en él se puede encontrar hasta el 70% de toda la variedad de animales y plantas, debido a esto varios textos citan a México como “megadiverso”.⁴ El aprovechamiento de estas plantas como uso médico es utilizado tanto en pueblos indígenas como en las ciudades más desarrolladas del país. Una de las especies que abundan en México, de las cuales no existe mucha información sobre su uso dentro del campo de la medicina, es *Adolphia infesta*. También llamada comúnmente como Junco o Abrojo, originalmente de Texas, E.U.A. y México; norte, centro y sur. Se caracteriza por su forma de arbusto con ramas puntiagudas, color verde, por lo regular peludas, estriadas y levemente curvadas. Y puede alcanzar alturas máximas de 2.5 metros.⁵ De la planta *Adolphia infesta* se pueden obtener extractos que contienen metabolitos secundarios de interés, específicamente de la hoja, tallos y raíz. De

¹ Lietava, J. (1992). Medicinal plants in a Middle Paleolithic grave Shanidar IV? Journal Of Ethnopharmacology, 35(3), 263-266. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90023-k](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90023-k)

² Londoño, A. C. (2009). "Plantas medicinales aprobadas en Colombia (2 ed.)" de Ramiro Fonnegra G. y Silvia Luz Jiménez R. Revista Universidad De Antioquia, (296). <https://revistas.udea.edu.co/index.php/revistaudea/article/view/1722>

³ Pandey, G., & Madhuri, S. (2009b). Some medicinal plants as natural anticancer agents. Pharmacognosy Reviews, 3(6), 259-263. https://www.researchgate.net/profile/Govind_Pandey2/publication/270220138_Some_medicinal_plants_as_natural_anticancer_agents/links/54a382ac0cf256bf8bb0e3da.pdf

⁴ Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2018). México, biodiversidad que asombra. gob.mx. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/mexico-biodiversidad-que-asombra>

⁵ Hanan, A. M., & Mondragón, J. (2005). *Adolphia infesta* (Kunth) Meisn. conabio.gob.mx. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/rhamnaceae/adolphia-infesta/fichas/ficha.htm>

manera frecuente los metabolitos secundarios son los que le dan a la planta su uso terapéutico o medicinal ya que debido a estos pueden tener propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que se relacionan con enfermedades como el cáncer, la diabetes, aterosclerosis y neurodegenerativas.⁶

El cáncer es una de las enfermedades con elevada incidencia en la población por lo que es de interés general la búsqueda constante de nuevos compuestos que permitan contrarrestarlas. Los compuestos que presentan actividad antioxidante y/o antiinflamatoria tienen gran relevancia dado su potencial para contribuir a la prevención y al control del desarrollo y progresión del cáncer. En el presente trabajo, se llevó a cabo la purificación y caracterización de distintos metabolitos secundarios presentes en la planta, así como la evaluación biológica de sus extractos con efectos antidiabéticos y antioxidantes.

⁶ Rodríguez, M. J. (2021). Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Plant Extracts. *Antioxidants*, 10(6), 921. <https://doi.org/10.3390/antiox10060921>

2. Generalidades

2.1 Diabetes

Es una enfermedad metabólica perteneciente de tipo crónico-degenerativo, es decir, que avanza lento y permanece por un largo tiempo. Esta se distingue por mantener concentraciones altas de glucosa en sangre. Al no ser tratada a tiempo y de manera adecuada puede conllevar a otro tipo de enfermedades, como problemas cardiovasculares o daño renal. Existen diferentes tipos de diabetes, sin embargo, la más común es la DM2.⁷

2.1.1 Prediabetes

Es un punto intermedio en el cual durante el ayuno la concentración de glucosa en sangre se encuentra por arriba de los rangos normales, sin embargo, no es suficientemente elevada para padecer diabetes. La modificación del estilo de vida hacia hábitos más saludables constituye el factor más relevante para prevenir la progresión de la prediabetes hacia la diabetes mellitus tipo 2. En México, se estima que aproximadamente el 25% de pacientes prediabéticos avanzan a tener diabetes, esto en un lapso de entre 3 y 5 años, si no realizan cambios en la alimentación y la actividad física.⁸

⁷ Organización Panamericana de la Salud. (s/f). Diabetes. <https://www.paho.org/es/temas/diabetes>

⁸ Basto, A., López, N., Rojas, R., Aguilar, C. A., Moreno, G. L., Carnalla, M., Rivera, J. A., Romero, M., Barquera, S., & Barrientos, T. . (2023). Prevalencia de prediabetes y diabetes en México: Ensanut 2022. Salud Pública De México, 65, s163-s168. <https://doi.org/10.21149/14832>

2.1.2 Diabetes en México y en el mundo

Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensanut) realizada en el año 2021, demuestra que en México alrededor de 12 millones 400 mil personas sufren de diabetes. La DM2 suele ser más común en personas de la tercera edad, principalmente mujeres. La tasa de mortalidad por año es de 362 por cada 100 mil habitantes. Por otro lado, la diabetes mellitus tipo 1 se presenta en menor porcentaje en niños y jóvenes. La tasa de mortalidad es de 30 muertes por cada 100 mil habitantes por año. La atención o un control inadecuado de estas enfermedades pueden provocar consecuencias más severas, como daño renal, pérdida de la visión, amputaciones, infartos, problemas cardiovasculares, entre otros. La diabetes y sus secuelas pueden afectar gravemente nuestro estilo de vida e incluso llevar a la muerte. Es la segunda causa de muerte y principal causa de discapacidad en el país.⁹

La diabetes mellitus desde hace años es considerada una de las enfermedades no transmisibles más habituales en el mundo. Tanto países en vías de desarrollo como en desarrollo enfrentan este tipo de enfermedades. Sin embargo, los países con menos recursos son los más afectados. A pesar de que países de primer mundo tienen muchos menos casos registrados son quienes gastan al menos el 80% de recursos dedicados a la prevención y control de esta enfermedad.¹⁰ Los países con mayor número de casos registrados de diabetes en el mundo son: 1. China, 2. India,

⁹ Secretaría de salud. (2022). En México, 12.4 millones de personas viven con diabetes. gob.mx. <https://www.gob.mx/salud/prensa/547-en-mexico-12-4-millones-de-personas-viven-con-diabetes?idiom=es>

¹⁰ International Diabetes Federation. (2021). IDF Diabetes Atlas. 10th edn. <https://www.diabetesatlas.org>

3. EE.UU., 4. Brasil, 5. Rusia, 6. Indonesia, 7. México, 8. Egipto, 9. Japón y 10. Turquía.¹¹

Como ya se mencionó la diabetes mellitus tipo 2 solía estar presente sobre todo en adultos y adultos mayores, pero actualmente el número de casos ha crecido drásticamente en adolescentes. Este problema de salud se prevé tendrá un mayor impacto en grupos étnicos minoritarios más desfavorecidos, así como en países en desarrollo.

2.1.3 Tratamiento de la diabetes

2.1.3.1 *Inhibidores de la enzima α -glucosidasa*

Los inhibidores de la α -glucosidasa funcionan al bloquear las enzimas que descomponen los oligosacáridos en disacáridos y monosacáridos para su posterior absorción.¹² Las enzimas α -glucosidasa se encuentran en los bordes del cepillo del intestino delgado, al ser inhibidas generan una digestión más lenta de los carbohidratos, prolongando su absorción. Esto genera que después de cada ingesta de alimentos la concentración de glucosa en sangre sea menor durante más tiempo. En consecuencia, las concentraciones posprandiales de glucosa se mantienen más bajas y estables, contribuyendo al control glucémico en pacientes con diabetes mellitus.¹³

¹¹ Zimmet, P. Z., Magliano, D. J., Herman, W. H., & Shaw, J. E. (2013). Diabetes: a 21st century challenge. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(1), 56-64. [https://doi.org/10.1016/s2213-8587\(13\)70112-8](https://doi.org/10.1016/s2213-8587(13)70112-8)

¹² Alfaro, J., Simal, A., & Botella, F. (2000). Tratamiento de la diabetes mellitus. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 24(2), 33-43. <https://www.sanidad.gob.es/eu/biblioPublic/publicaciones/docs/mellitus.pdf>

¹³ Calle, A. L., & Charro, A. L.. (2001). Acarbosa y diabetes mellitus: Implicaciones prácticas. *Anales de Medicina Interna*, 18(5), 5-9. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000500001&lng=es&tlng=es.

Existen distintos inhibidores de la α -glucosidasa, por ejemplo: La acarbosa, voglibosa, miglitol y emiglitalo (Figura 1). De estos fármacos, la acarbosa es la más utilizada. Este es un fármaco el cual no se utiliza como primer tratamiento, sino que es un auxiliar o acompañante de otros medicamentos para el tratamiento de la DM2. Resulta ser un buen medicamento incluso para el sobrepeso corporal debido a que reduce los niveles de insulina después de comer.¹⁴

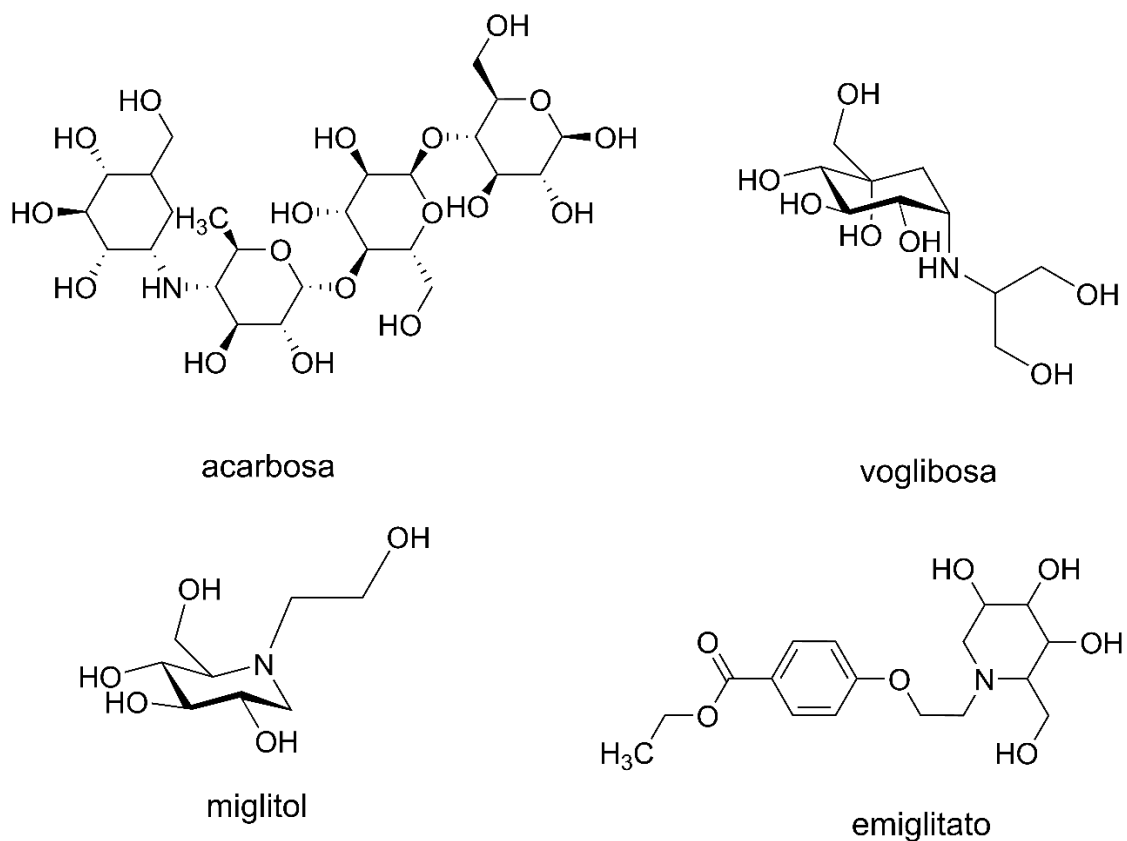


Figura 1. Medicamentos inhibidores de la α -glucosidasa.

¹⁴ Van de Laar, F. A., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., Van de Lisdonk, E. H., Rutten, G. E., & Van Weel, C. (2005). Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. Cochrane Library, 2009(1). <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003639.pub2>

A pesar de que existen ya medicamentos para la inhibición de la α -glucosidasa, desde hace varias décadas se buscan nuevos productos naturales similares o mejores que los ya existentes. Dentro de los productos naturales más importantes y con mejor actividad para la inhibición de la α -glucosidasa están los disacáridos, tioazúcares, alcaloides polihidroxilados, aminociclitoles, polifenos, terpenoides, etc. Algunos ejemplos de los productos naturales de mayor interés son la nojirimicina (iminoazúcar), el salacinol y kotalanol (tioazúcares) (Figura 2) extraídos de la planta *Salacia reticulata* (Hippocrateaceae) comúnmente conocida como “Kothala-humbutu” en ciertas zonas boscosas de India. Teniendo una actividad equivalente a la de acarbosa.¹⁵

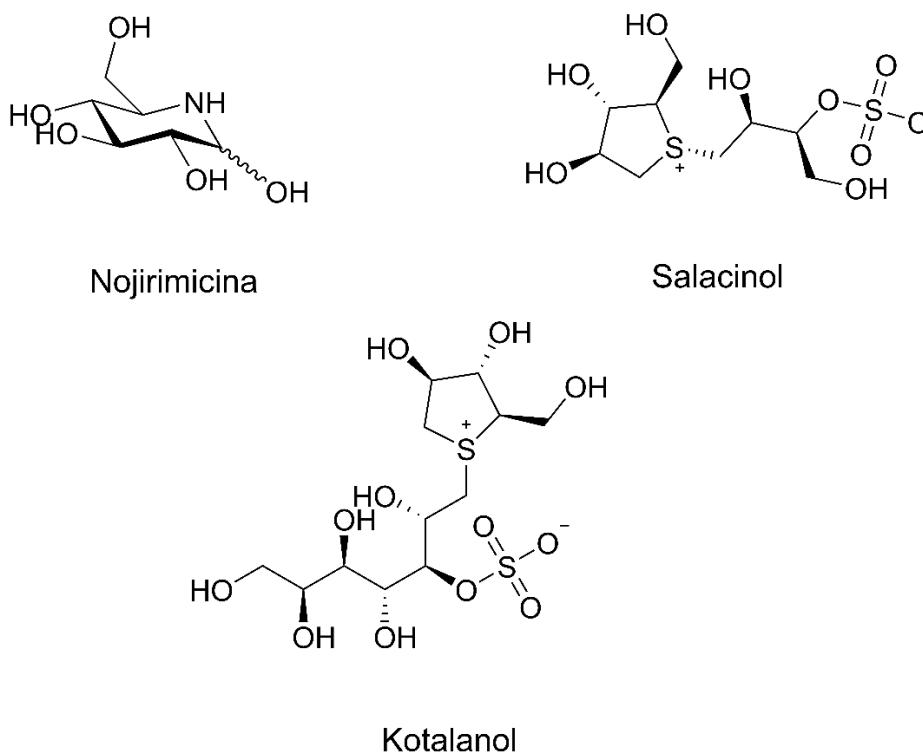


Figura 2. Metabolitos secundarios inhibidores de la α -glucosidasa.

¹⁵ Escandon, S. M. (2013). Efectos hipoglucemiantes y antihiper glucémicos de preparados y compuestos de la especie *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray (Asteraceae) [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/65353>

2.1.4 Método para la determinación de la inhibición de α -glucosidasa

La evaluación de la capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa de los extractos vegetales es de suma relevancia para comprender su potencial positivo en el manejo de la hiperglucemia posprandial.

Existen diferentes métodos para la evaluación de la inhibición de la enzima α -glucosidasa. Uno de los más conocidos es un ensayo en donde se emplea un sustrato llamado *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido. Haciendo reaccionar este sustrato con la α -glucosidasa da paso a una hidrólisis, liberando la D-glucosa y el *p*-nitrofenol (Figura 3), este último tiene una coloración amarilla en solución. A la cual se le puede medir la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm con ayuda de un espectrofotómetro para determinar la concentración de *p*-nitrofenol y obtener el porcentaje de inhibición de la α -glucosidasa.¹⁶

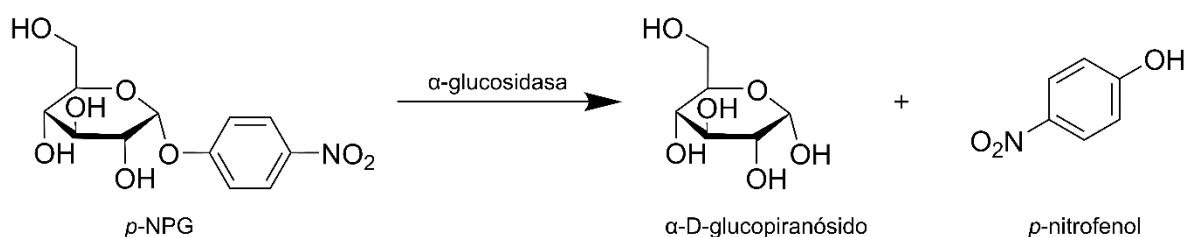


Figura 3. Hidrólisis del *p*-NPG por la enzima α -glucosidasa.

¹⁶ Granados, G., Castro, R., De Torres, N. W., & Salazar, R. (2017). Optimization and Validation of a Microscale In vitro Method to Assess α -Glucosidase Inhibition Activity. Current Analytical Chemistry, 14(5), 458-464. <https://doi.org/10.2174/1573411013666170911154755>

2.1. Oxidación

En el ámbito de la química, antes se creía que la oxidación era una reacción en la cual el oxígeno se unía a cualquier otro elemento, con el fin de producir un óxido. Después se dijo que oxidación era cuando un elemento perdía electrones y finalmente se podría decir que un elemento es oxidado cuando su número de oxidación aumenta.¹⁷ La reducción es lo contrario a la oxidación, estas son reacciones de óxido-reducción. Este tipo de reacciones tienen gran importancia en la bioquímica, dado que de ellas los seres vivos obtienen casi toda su energía. Por ejemplo: el CO₂ durante la fotosíntesis es reducido por la energía solar y los carbohidratos son formados a partir de la oxidación de H₂O. Sin embargo, la oxidación no siempre es buena, por ejemplo, por la formación excesiva de radicales libres de oxígeno (RLO) pueden dañar las macromoléculas y alterar algunos procesos celulares, dando lugar al estrés oxidativo, implicado en el desarrollo de diversas enfermedades crónicas y degenerativas como diabetes, hipertensión, cáncer, entre otras.¹⁸

2.1.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo ocurre cuando hay un exceso de radicales libres, moléculas inestables, en el cuerpo y no hay suficientes antioxidantes para neutralizarlos. El daño celular causado por las RLO y los RL afecta los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, los carbohidratos y los ácidos nucleicos. Esto desencadena una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula debido a la activación de una reacción en cadena. A largo

¹⁷ Ruiz, A. G., Silva, L. G., & Vázquez, A. M. (2005). Química universitaria. Pearson Education.

¹⁸ Elejalde Guerra, J.I.. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. Anales de Medicina Interna, 18(6), 50-59. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010&lng=es&tlng=es.

plazo, el estrés oxidativo puede contribuir al envejecimiento, la inflamación crónica, el cáncer y otras enfermedades.^{19, 20}

2.1.2. Radicales libres

Los radicales libres (RL) son moléculas que poseen un electrón desapareado, lo que las hace extremadamente reactivas y capaces de dañar otras moléculas, convirtiéndolas también en moléculas altamente reactivas.²⁵

El metabolismo del oxígeno, es esencial para la vida de los organismos aeróbicos, también puede resultar en la formación de moléculas conocidas como radicales libres de oxígeno (RLO). Estas moléculas son extremadamente reactivas.²¹

Los principales radicales libres de oxígeno son: 1) Radical hidroxilo (HO^\bullet), 2) Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 3) Anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), 4) Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), 5) Oxígeno nítrico (NO), 6) Peróxido (ROO) y 7) Ozono (O_3).

¹⁹ NIH. (s. f.). Estrés oxidativo. Cancer.gov.

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/estres-oxidativo>

²⁰ Ramos, M. L., Batista, C. M., Gómez, B. C., & Zamora, A. L. (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. Investigación en Salud, VIII (1), 7-15.

²¹ Sacerdote de Lustig, E., & Monte. (1994). Radicales libres de oxígeno y superóxido dismutasas: aspectos biológicos y médicos. Medicina, 54, 61-68. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/122742>

2.1.2.1. Daños por radicales libres

Los Radicales libres de oxígeno pueden generar alteraciones en lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos:

Los lípidos pueden ser oxidados, lo que genera su desnaturalización y afecta la función celular. La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados puede ser provocada por los RL, afectando las lipoproteínas y membranas celulares. Desatando cambios en su permeabilidad lo conducen al edema y muerte celular, y generando la placa ateromatosa, es decir, la acumulación de grasa en las paredes arteriales.²²

Los radicales libre no solo alteran a las células, sino también a las proteínas, por medio de algunas reacciones oxidativas como: Rompiendo la cadena de los polipéptidos, atacando a los enlaces insaturados, generando enlaces cruzados, hidroxilando a los compuestos aromáticos, etc. Esto modifica la función y la inhibición de la degradación de las proteínas. Se ha reportado que la acumulación de estas puede ser causa de algunas enfermedades, también modifica el envejecimiento y la apoptosis celular.²³

El ADN es importante debido a que es el portador de la información genética, portador de los genes hereditarios y funcionamiento vital de los organismos. También es la encargada de almacenar información para la formación de otras partes de la célula, por ejemplo, las proteínas. El ADN puede ser oxidado por los radicales libres de oxígeno y nitrógeno generando daños. Durante la lipoperoxidación (Oxidación de lípidos) se forman compuestos genotóxicos y electrofílicos. Estos interactuando con el ADN forman aductos, por ejemplo:

²² Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. The World Allergy Organization Journal, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/wox.0b013e3182439613>

²³ Jaramillo, F., & Valdivia, A. G. (2016). Fundamentos de estrés oxidativo celular (1.a ed.). Universidad Autónoma de Aguascalientes. https://editorial.uaa.mx/docs/zombis_fundamentos_estres_oxidativo_celular.pdf

- Trans-2,4-decadeinal
- 4-hidroxi-2-nonenal
- Malondialdehído

Cuando los aductos no se reparan, al replicarse el ADN puede generar mutaciones, y las modificaciones genéticas pueden ser el inicio de cáncer en el cuerpo.²⁴

2.1.3. Compuestos con actividad antioxidante

Existen diferentes maneras de obtener antioxidantes como es por medio de la dieta, dentro de los más importantes está la vitamina E, que la podemos encontrar en germen de trigo, aceites vegetales, almendras, frijol, etc. También la vitamina C que se encuentra en frutas como el limón, la naranja, el mango, la fresa y en verduras como el tomate, espinacas, repollo, lechuga, entre otros. Y los carotenoides que están presentes en verduras como la zanahoria, el tomate o el brócoli.²⁵

También existen los compuestos polifenólicos que tienen una gran actividad antioxidante los cuales se encuentran en verduras y frutas, sin embargo, a lo largo de los años se han estudiado especies vegetales las cuales producen estos metabolitos secundarios. Compuestos polifenólicos, tales como: flavonoides, ácidos fenólicos y taninos.²⁶

²⁴ Barrera, G. (2012). Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. ISRN Oncology, 2012, 1-21. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>

²⁵ Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea, 494. <https://doi.org/10.4067/s0718-04622006000200010>

²⁶ Mercado, G., De la Rosa Carrillo, L., Wall, A., Díaz, J. A. L., & Álvarez, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. Nutrición Hospitalaria, 28(1), 36-46. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>

2.1.4. Ensayos para la determinación de la actividad antioxidante

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos vegetales es importante para comprender su potencial beneficio para la salud. En los últimos años, se han adoptado una amplia gama de ensayos espectrofotométricos *in vitro* para medir esta capacidad de manera sencilla y reproducible. Estos métodos usualmente emplean un captador de radicales libres para simular el estrés oxidativo.

2.1.4.1. Ensayo del 2,2'-azinobis(3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS^{•+})

Este ensayo es uno de los más utilizados para la determinación de actividad antioxidante de frutas y verduras. Consiste en la preparación de un radical catiónico llamado ABTS^{•+}. Es de un color azul verdoso el cual puede ser reducido a ABTS con el uso de antioxidantes (Figura 4) y absorbe a una λ de 734 nm. El ABTS^{•+} se forma a partir de una reacción oxidativa de ABTS con persulfato de potasio. El porcentaje de inhibición es determinado a partir de la decoloración de la reacción.²⁷

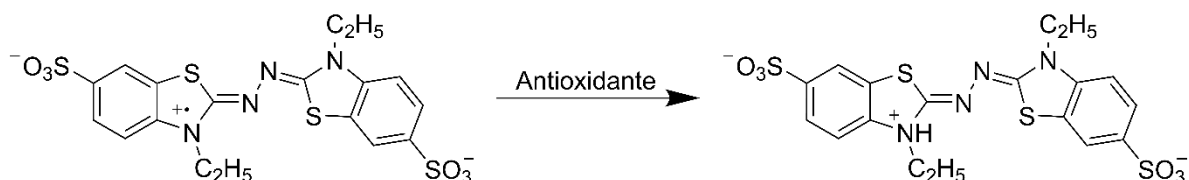


Figura 4. Reacción antioxidante del radical ABTS^{•+}.

²⁷ Rioja, A. P., Vizalque, B. E., Aliaga, E., Tejeda, L., Book, O., Mollinedo, P., & Peñarrieta, J. M. (2018). Determinación de la capacidad antioxidante total, fenoles totales, y la actividad enzimática en una bebida no láctea en base a granos de *Chenopodium quinoa*. Revista Boliviana de Química, 35(5), 168-176.

2.1.4.2. Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

El DPPH es un radical libre que puede reaccionar con antioxidantes los cuales pueden ceder un átomo de hidrógeno y convertir el DPPH• a su forma no radicalaria (Figura 5). El DPPH solo es soluble en medios orgánicos y absorbe a una λ de 515 nm. La determinación de la actividad se basa en la disminución de concentración de DPPH• antes y después de la reacción.²⁸

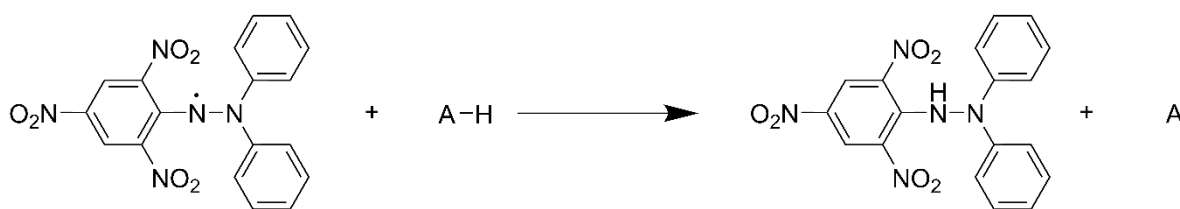


Figura 5. Reacción antioxidante del radical DPPH•.

²⁸ Guija, E., Inocente, M. Á., Ponce, J., & Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. Horizonte Médico, 15(1), 57-60.

2.1.4.3. Ensayo del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

Este ensayo se realiza en condiciones ácidas y consiste en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} (Figura 6), es decir, al hacer reaccionar el compuesto hierro-tripiridil-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) con un antioxidante se reduce a su forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ), produciendo un color azul intenso en la reacción, la cual absorbe a una λ de 593 nm.²⁹

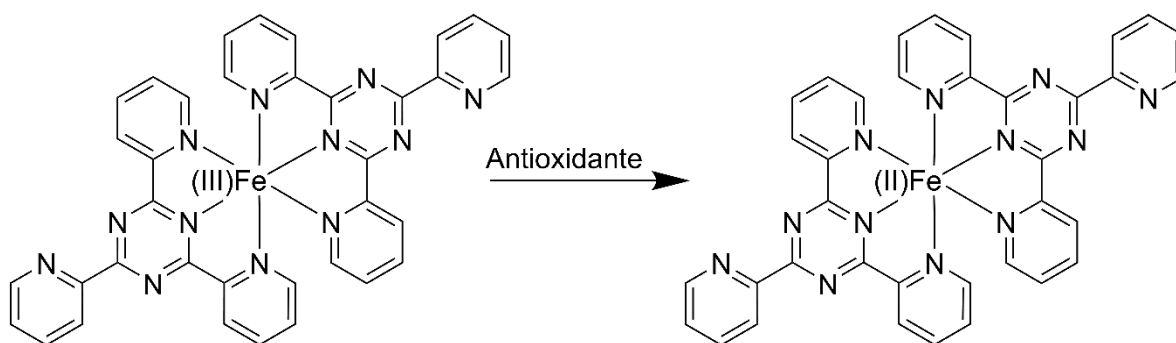


Figura 6. Reacción de reducción del complejo Fe^{3+} -TPTZ.

²⁹ Benítez, A., Villanueva, J., González, G., Alcántar, V. E., Puga, R., & Quintero, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). Deleted Journal, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>

2.2. Familia Rhamnaceae

Esta familia pertenece a la clase Equisetopsida y está dentro del orden de los rosales, incluye varios tipos de plantas, entre las trepadoras o lianas, arbóreas y arbustos, principalmente con espinas. Se caracterizan por sus hojas normalmente simples, distribución alternada y opuestas. Sus flores son poco notorias, actinomorfas, normalmente son perfectas. Tiene entre 4 y 5 sépalos unidos de manera libre. Sus frutos suelen ser bayas o drupas carnosas.³⁰

La familia Rhamnaceae se divide en 53 géneros de los cuales existen 875 especies.³¹

Rhamnaceae contiene especies que son utilizadas de diferentes formas, por ejemplo: Algunas especies generan frutos los cuales son consumidos por la gente debido a su sabor agradable o para la elaboración de bebidas carbonatadas y alcohólicas; *Ziziphus cinnamomum* y *Z. Cyclocardía*. Otras especies poseen frutos con mayores dimensiones los cuales se usan para hacer conservas o también bebidas alcohólicas, como el “ron de ponsigué”.³² También varias especies han presentado propiedades medicinales, esta familia en su composición fitoquímica suelen presentar compuestos relacionados con la quinina (Figura 7). Especies como *Rhamnus purshiana* y *R. Cathartica* poseen efectos laxantes en sus cortezas y la corteza de *Gouania domingensis* suele ser masticada por su efecto estimulante.³³

³⁰ Brizicky, G. K. (1964). THE GENERA OF RHAMNACEAE IN THE SOUTHEASTERN UNITED STATES. Journal of the Arnold Arboretum, 45(4), 439–463. <http://www.jstor.org/stable/43781515>

³¹ Medan, D., & Schirarend, C. (2004). Rhamnaceae. En Springer eBooks (pp. 320-338). https://doi.org/10.1007/978-3-662-07257-8_37

³² Hoyos, J. 1994. Frutales en Venezuela. Sociedad de Cs. Naturales La Salle. Caracas, Venezuela. 1-381 p.

³³ Boelcke, O. (1992). Plantas vasculares de la Argentina nativas y exóticas. Ed. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 367 p.

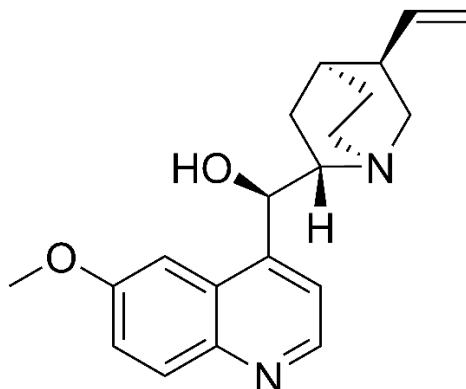


Figura 7. Estructura de la quinina.

Rhamnaceae se puede encontrar tanto en regiones tropicales como templadas. En México se han identificado 11 géneros. Esta familia es de gran importancia debido a su uso medicinal, industrial y como forma de decoración.³⁴

³⁴ Standley, P. C. (1920). Trees and shrubs of Mexico. Contributions from the United States National Herbarium, v. 23. Washington, Govt. Print. Off, 1920-1926. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.15726>

2.2.1. Género *Adolphia*

El género *Adolphia* fue acuñado por el botánico suizo Carl Daniel Friedrich Meissner en “Plantarum vascularium genera: secundum ordines naturales digesta eorumque differentiae et affinitates tabulis diagnostacis expositae (Los géneros de plantas vasculares: dispuestos según los órdenes naturales y presentadas sus diferencias y afinidades en tablas diagnósticas)” entre 1836 y 1843.³⁵ El nombre es en honor al botánico francés Adolphe Theodor (de) Brongniart quien estudió por mucho tiempo la familia Rhamnaceae.³⁶

Este género fue creado específicamente para la especie mexicana *A. infesta* (1837), posteriormente en 1876 S. Watson registró una nueva especie para las plantas encontradas en California y Baja California (*A. californica*).³⁷

2.2.1.1. *Adolphia infesta*

La especie *Adolphia infesta* lleva como nombre científico *Adolphia infesta* (Kunth) Meisn (Figura 8). Es un arbusto que mide alrededor de 50 cm hasta 2 metros de altura. Se caracteriza por sus ramas delgadas y estiradas, las cuales tienen espinas color verde con una longitud de aproximadamente 6 cm.³⁸ Presenta hojas pequeñas con estípulas de forma triangular, su pecíolo es menor a 1.5 mm. Generalmente se pueden observar flores apiladas debajo de las espinas. Las flores son perfectas y

³⁵ Meissner, C. F., & Weidmann, N. (1836). Plantarum vascularium genera: secundum ordines naturales digesta eorumque differentiae et affinitates tabulis diagnostacis expositae. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.44043>

³⁶ Burkhardt, L. (2016). Verzeichnis eponymischer Pflanzennamen. Index of Eponymic Plant Names. Index de Noms Eponymes des Genres Botaniques. <https://doi.org/10.3372/epolist2016>

³⁷ Abrams, L. R., & Ferris, R. S. (1923). An illustrated flora of the Pacific States: Washington, Oregon, and California. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.4657>

³⁸ Christie, K., Currie, M., Davis, L., Hill, E., Neal, S., & Ayers, T. (2005). Vascular plants of Arizona: Rhamnaceae. CANOTIA, 2(1), 23-46. https://canotia.org/volumes/CANOTIA_2006_Vol2_1_Christie_et_al_Rhamnaceae.pdf

levemente blancas, tienen un tubo floral pequeño, de 1.5 m de altura. También presenta un fruto seco y dehiscente.³⁹



Figura 8. *Adolphia infesta* (Imagen modificada).⁴⁰

Esta especie se ha identificado en estados como Chihuahua, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Puebla, Oaxaca y al suroeste de Estados Unidos de América (Texas) (Figura 9).⁴¹

³⁹ Tortosa, R. D. (1993). REVISION DEL GENERO ADOLPHIA (RHAMNACEAE-COLLETIEAE). Darwiniana, 32(1/4), 185–189. <http://www.jstor.org/stable/23222966>

⁴⁰ Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Adolphia infesta* (Kunth) Meisn., ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:1062395>

⁴¹ Nava, R. F. (1996). FAMILIA RHAMNACEAE. FLORA DEL BAJÍO Y DE REGIONES ADYACENTES, 74. <https://doi.org/10.21829/fb.243.1996.43>

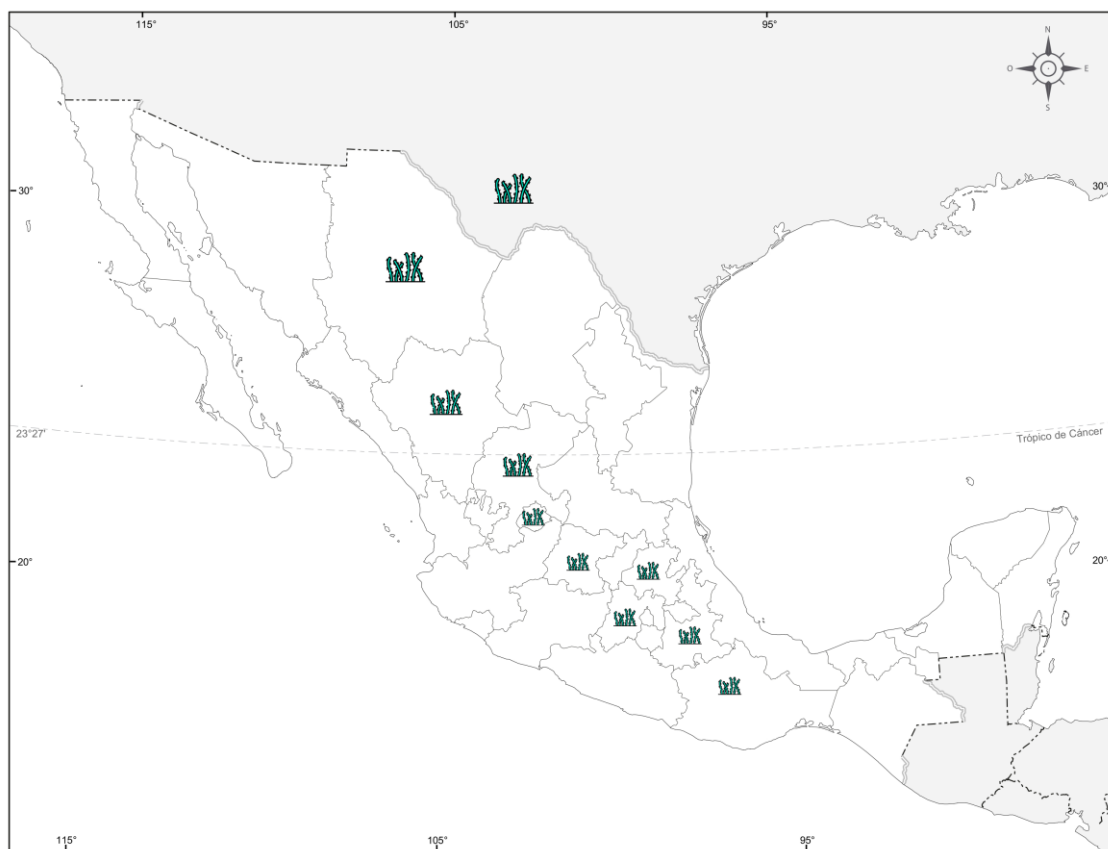


Figura 9. Distribución de la especie *A. infesta* en México y E.U.A.

De esta especie no se han encontrado registros de su composición fitoquímica, ni de su evaluación biológica ante alguna enfermedad. La única referencia que se tiene y de manera empírica es la de los habitantes de la comunidad de Tepeyahualco, Puebla. En donde lo usan para tratar principalmente la diabetes.

3. Justificación

En la actualidad la diabetes mellitus e insuficiencia renal son una de las principales enfermedades causantes de muerte en México y en el mundo. El padecimiento de diabetes mellitus tipo 2 está aumentando drásticamente en la población mundial. Se tenía previsto que para el año 2025 las personas con diabetes alcanzarían la cifra de 380 millones y para el 2030 aproximadamente 438 millones, no obstante, en la actualidad ya se ha superado esa cifra.^{42 43} El tratamiento para el control de este tipo de enfermedades en algunos casos es costoso o no es accesible para todos, por lo que es necesario buscar alternativas ante este tipo de problemas.

La especie *Adolphia infesta* se ha utilizado de manera local en diversos municipios como tratamiento alternativo para curar la diabetes o contrarrestar algunas de sus complicaciones como el daño renal. Sin embargo, no cuenta con estudios químicos ni biológicos que muestren si posee dicha actividad y cuáles podrían ser los principios activos presentes en esta planta.

Por lo tanto, debido a su uso regular como medicamento alternativo y accesibilidad a las personas de esas comunidades, se considera importante realizar un estudio fitoquímico de la especie *Adolphia infesta* para identificar sus principales metabolitos secundarios y evaluar su actividad biológica en ensayos *in vitro*. Por ende, se espera llevar a cabo un análisis para poder aislar e identificar metabolitos secundarios principales, medir su capacidad antioxidante y su capacidad hipoglucemiante. Esta investigación es de interés en el campo de los Productos Naturales.

⁴² Reyes, F. A., Pérez, M. L., Figueredo, E. A., Ramírez, M., & Jiménez, Y. (2015). Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. CORREO CIENTÍFICO MÉDICO DE HOLGUÍN, 20(1), 98-121. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812016000100009

⁴³ Soto, G., Moreno, L., & Pahua, D. (2015). Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. Revista de la Facultad de Medicina, 59(6), 8-22. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422016000600008&lng=es&tlng=es.

4. Hipótesis

1. El extracto metanólico de *Adolphia infesta* contiene metabolitos secundarios de interés químico y biológico, que pueden ser identificados por técnicas espectroscópicas y purificados mediante métodos convencionales como cromatografía en columna.
2. El extracto metanólico presenta actividad biológica ante los diferentes ensayos *in vitro* como la inhibición de la enzima α -glucosidasa y las pruebas para medir su capacidad antioxidante, debido a la estructura química de los principales metabolitos secundarios presentes en el extracto de la planta.

5. Objetivos

a. Objetivo general

Caracterizar fitoquímicamente los principales metabolitos secundarios de la especie *Adolphia infesta* y determinar su actividad biológica mediante ensayos *in vitro* para establecer su potencial farmacológico.

b. Objetivos específicos

- 1) Obtener el extracto metanólico de la parte aérea y de raíz de la especie *Adolphia infesta* y obtener sus particiones de AcOEt, n-BuOH y acuosa mediante técnicas de extracción por maceración y extracción líquido-líquido.
- 2) Purificar los metabolitos principales de las particiones y elucidar su estructura química mediante la aplicación de técnicas cromatográficas y espectroscópicas, para la caracterización fitoquímica de la especie.
- 3) Evaluar la actividad antidiabética del extracto metanólico y sus particiones a través del ensayo *in vitro* de inhibición de la enzima α -glucosidasa, para determinar su potencial como agente hipoglucemiante.
- 4) Determinar la capacidad antioxidante del extracto metanólico y sus particiones por medio de ensayos *in vitro*, para establecer su potencial en la neutralización de radicales libres y su posible uso farmacológico.

6. Procedimientos generales

El aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios se realizó mediante técnicas cromatográficas. Los extractos y sus particiones se analizaron mediante la técnica de cromatografía en capa fina o TLC (Thin-layer chromatography) por sus siglas en inglés y cromatografía en columna. Para observar las placas (TLC) se utilizó una lámpara 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) (CoCl_2) y revelador de cloruro férrico (FeCl_3 1%). Se empleó hexano, cloroformo (CHCl_3), acetato de etilo (AcOEt), acetona, metanol (MeOH) y *n*-butanol 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 equipo Bruker Ascend 400, a 400 y 100 Hz para ^1H y ^{13}C . Se utilizaron distintos disolventes deuterados, CDCl_3 , acetona- d_6 y DMSO-d_6 . Los desplazamientos químicos de todos los espectros se dan en ppm; las constantes de acoplamiento (J) están en Hz. 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°C ($[\alpha]_D^{25}$) fue medida en un polarímetro Perkin Elmer modelo 341, utilizando lámpara de sodio.

6.1. Metodología general

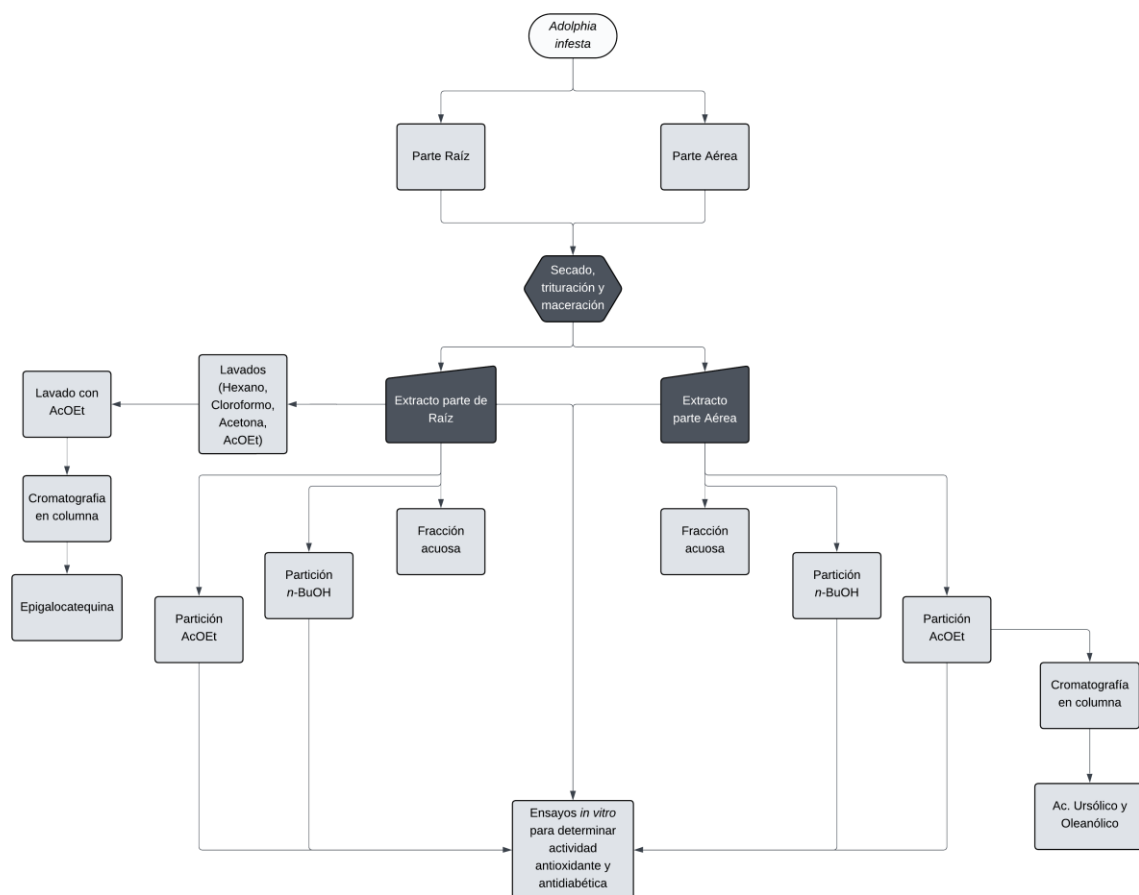


Diagrama 1. Esquema de metodología general.

6.2. Colecta y obtención de la especie

La especie *Adolphia infesta* fue recolectada en el municipio Tepeyahualco, Puebla México, aproximadamente en 19.493273° latitud norte y -97.505830° longitud oeste el día 11 de diciembre del 2022.

6.3. Secado y trituración de la planta

La especie se mantuvo dentro de un almacén libre de luz solar y a temperatura ambiente hasta su secado total. La raíz fue separada de la parte aérea. La parte de raíz fue recortada y triturada con ayuda de un molino manual. Por otro lado, la parte aérea fue recortada en pequeños trozos con ayuda de unas tijeras de poda.

6.4. Obtención del extracto

Después del secado y triturado de la planta se obtuvieron 200 g de la parte aérea y 443 g de la parte de raíz. Por medio del proceso de maceración se colocaron en dos matraces Erlenmeyer agregando 1L y 1.5 L de MeOH como disolvente. Se dejaron macerar durante 15 días.

Posteriormente se retiraron los restos sólidos mediante filtración y se concentró el extracto bajo presión reducida en un rotavapor. Se obtuvieron 116 g (26%) de un sólido color rojo-anaranjado perteneciente a la raíz y 23.30 g (11.7%) de un sólido color verde de la parte aérea (Tabla 1).

6.5. Particiones de AcOEt y *n*-butanol

Del extracto metanólico de raíz se tomaron 2.5 g y se diluyeron en 150 mL de agua, la fase orgánica se extrajo con AcOEt (3 x 100 mL), y después con *n*-butanol (3 x 100 mL). Ambas particiones fueron secadas con sulfato de sodio anhidro, filtradas y concentradas a presión reducida en un rotavapor.

Para la parte aérea se realizó el mismo procedimiento; sin embargo, se tomaron inicialmente 10 g del extracto metanólico, los cuales se diluyeron en 600 mL de agua y se utilizó AcOEt (3 x 400 mL) para la primera extracción y *n*-butanol (3 x 400 mL) para la segunda extracción.

Las cantidades y rendimientos se describen en la Tabla 1.

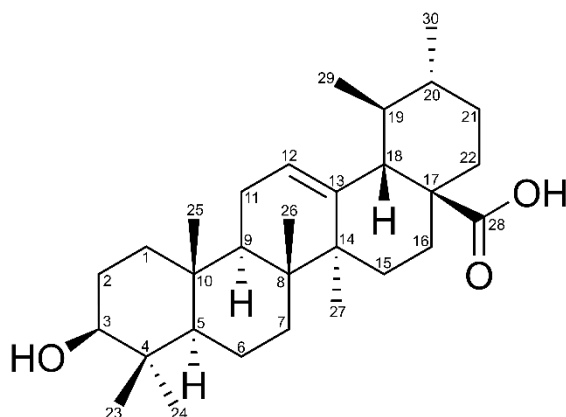
Tabla 1. Cantidad obtenida en gramos de las particiones de la parte aérea y de raíz de *A. infesta*.

<i>Parte</i>	<i>Extracto</i>	<i>Extracto usado en partición</i>	<i>Partición AcOEt</i>	<i>Partición n- butanol</i>	<i>Fracción acuosa</i>
<i>Aérea</i>	23.30 (11.7%)	10.00	2.30 (23.0%)	1.61 (16.1%)	5.27 (52.7%)
<i>Raíz</i>	116.00 (26.0%)	2.50	0.34 (13.7%)	0.87 (34.9%)	0.88 (35.5%)

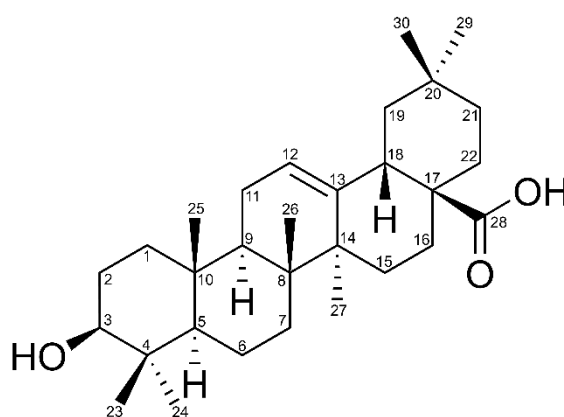
6.6. Obtención de metabolitos secundarios

Se realizó cromatografía en columna utilizando el método flash. Se empleó una columna de 30 mm de diámetro, 42 g de gel de sílice y se humectó con hexano. Se agregaron 0.35 g de una muestra que contenía la partición de AcOEt de la parte aérea. La columna se eluyó empleado un gradiente de elución, iniciando por Hexano (200 mL), mezcla de hexano/AcOEt en una proporción de 9:1 hasta 7:3 (200 mL de cada proporción) y finalmente MeOH (200 mL). Se lograron obtener 34 fracciones. Cada una fue monitoreada por TLC. Las fracciones 18-24 se juntaron y se obtuvieron 16 mg de un polvo verde muy claro. Mediante un espectro de RMN de ^1H se observó que se trataba de una mezcla de los ácidos oleanólico y ursólico (Figura 10), por lo que se decidió realizar una cromatografía de esta muestra.

Para separar la mezcla de triterpenos se preparó una columna de 15 mm de diámetro con 7.5 g de gel de sílice, en donde se agregó el polvo verde (16 mg) de la columna anterior. Se humectó con hexano. La elución se realizó agregando 50 mL de Hexano, mezcla de hexano/AcOEt en una proporción de 9:1 y 8:2 (100 mL de cada proporción), después CH_2Cl_2 (50 mL) y finalmente AcOEt (50 mL). Se obtuvieron 26 fracciones y se analizaron por TLC. La fracción 23 se analizó por medio de RMN de ^1H y ^{13}C en 1D y 2D.



Ácido ursólico



Ácido oleanólico

Figura 10. Triterpenos presentes en la partición de AcOEt de parte aérea de *A. infesta*.

En la fracción recuperada de MeOH de la primera columna se pudo observar mediante un espectro de RMN de ^1H , las señales características a un flavonoide de tipo catequina. Esta molécula se intentó purificar reiteradamente mediante cromatografía en columna con un gradiente de polaridad (hexano-AcOEt 1:1 a 0:1), pero fue inestable y no se obtuvo un espectro con buena pureza, por lo que se intentó enriquecer una muestra a partir del extracto mediante lavados de distintas polaridades a una muestra de extracto como se explica a continuación. Se tomaron 2 g del extracto metanólico de la parte de raíz de *A. infesta* y se colocaron en un vaso de precipitado para hacerle una serie de extracciones con la finalidad de enriquecer la fracción que contenía la catequina. Se le hicieron los siguientes lavados. Se agregaron 30 mL de hexano y se colocó en el sonicador durante 10 segundos, posteriormente se dejaron decantar los sólidos flotantes y se extrajo el hexano (se repitió el procedimiento 5 veces con el mismo disolvente). Se realizó el mismo procedimiento con cloroformo y acetona. Mediante TLC se monitorearon los lavados realizados con el fin de identificar el compuesto mayoritario en la extracción con diferentes disolventes, siendo el de acetona el que presentaba al compuesto de interés. Después se tomó el lavado de acetona, se dejó secar y se le realizaron

lavados de la misma manera, pero con AcOEt hasta ver el compuesto mayoritario en los lavados con este disolvente. Posteriormente esta partición fue purificada mediante cromatografía en columna.

Se agregaron 50 mg de la extracción con AcOEt (obtenidos a partir de los lavados anteriores) a una columna de 15 mm de diámetro previamente empacada con 7.5 g de gel de sílice y se humectó con hexano. La columna se eluyó empleado un gradiente de elución. Se inició una mezcla de hexano:AcOEt (50 mL) una proporción de 9:1 hexano:AcOEt hasta 1:9 hexano:AcOEt (50 mL de cada proporción), AcOEt (50 mL) y finalmente 50 mL de MeOH. Se lograron obtener 36 fracciones. Cada una fue monitoreada por TLC. La fracción 32 se separó y se analizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C en 1D y 2D, lo cual condujo a proponer que se trata de una catequina, conocida como epigalocatequina (Figura 11)

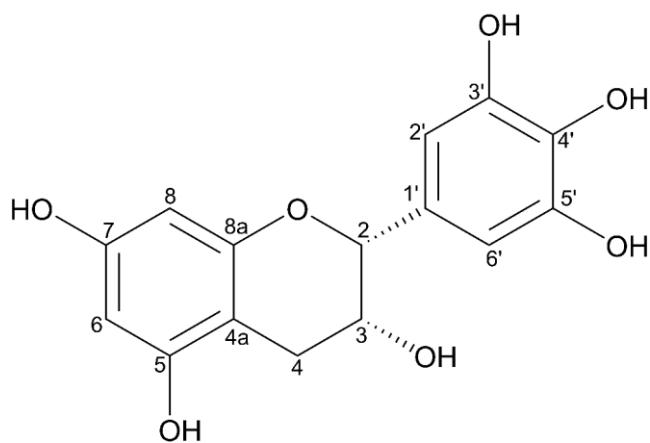


Figura 11. Epigalocatequina.

6.7. Pruebas para la determinación de la capacidad antioxidante

El extracto metanólico, así como las particiones de AcOEt y *n*-BuOH perteneciente a la parte de Raíz se sometieron a diferentes pruebas para poder determinar su capacidad antioxidante. Las pruebas utilizadas fueron: ABTS, DPPH y FRAP.

6.7.1. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

Con base en la metodología realizada por Kushoski y col. se llevó a cabo la reacción de ABTS (7mM) con persulfato de potasio (2.45 mM) para generar el radical ABTS^{•+} incubando en oscuridad y temperatura ambiente durante 16 horas.⁴⁴ Después de tener el ABTS^{•+} formado se llevó a dilución con solución tampón fosfato monosódico (5 mM) a pH 7.4 hasta obtener una lectura de 0.70 (\pm 0.02) a una longitud de onda de 754 nm. Las muestras de *A. infesta* (Extracto, P. AcOEt, P. *n*-butanol) se diluyeron en EtOH hasta obtener concentraciones de 0.1 y 0.05 mg/mL.

En tubos Eppendorf se añadieron 980 μ L de la solución de ABTS^{•+} y 20 μ L de la muestra problema (Tabla 2). Se realizaron las lecturas de absorbancia a 754 nm después de 30 minutos de haber iniciado la reacción.

⁴⁴ Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. Food Science and Technology, 24(4), 691–693. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400036>

Tabla 2. Preparación de las muestras a diferentes concentraciones para el ensayo ABTS^{•+}.

<i>Ensayo</i>	<i>Concentración muestra problema (mg/mL)</i>	<i>Volumen de la muestra problema (μL)</i>	<i>Volumen solución de ABTS^{•+} (μL)</i>
1	0.1	20	980
2	0.05	20	980

Para la curva de calibración se utilizaron como antioxidantes de referencia un análogo a la vitamina E (Trolox) y la vitamina C. Para la curva de Trolox se prepararon soluciones en concentraciones de 0-300 μM diluido en EtOH. Primero se pesaron 3.75 mg de Trolox y se aforaron a 50 mL con EtOH, para obtener una muestra stock de 300 μM y realizar las diluciones para la curva (Tabla 3).

Tabla 3. Preparación de la curva de calibración de Trolox para el ensayo ABTS^{•+}.

<i>Ensayo</i>	<i>Concentración (μM)</i>	<i>Volumen Trolox (μL)</i>	<i>Volumen de EtOH (μL)</i>
1	300	1000	0
2	225	750	250
3	150	500	500
4	75	250	750
5	37.5	125	875
6	0	0	1000

Para la curva de la vitamina C se prepararon diluciones a concentraciones de 0-20 mg/dL diluidas en EtOH. Se pesaron 20 mg de vitamina C y se aforaron a 100 mL

con agua, para obtener una muestra stock de 20 mg/dL y realizar las siguientes diluciones para la curva (Tabla 4).

Tabla 4. Preparación de la curva de calibración de vitamina C para el ensayo ABTS^{•+}.

<i>Ensayo</i>	<i>Concentración (μM)</i>	<i>Volumen vitamina C (μL)</i>	<i>Volumen de EtOH (μL)</i>
1	1124.23	1000	0
2	843.175	750	250
3	562.1167	500	500
4	281.058	250	750
5	140.529	125	875
6	0	0	1000

Posteriormente a la preparación de las soluciones de las dos referencias se tomaron 20 μ L de cada concentración y se hicieron reaccionar con 980 μ L de la solución ABTS^{•+}, después de 30 minutos de haber iniciado la reacción se leyeron las absorbancias de la misma manera que con los extractos.

La actividad antioxidante resultante se expresa en micromol equivalente de Trolox por gramo del extracto (μ mol ET/g) o en micromol Equivalente de vitamina C por gramo del extracto (μ mol EVC/g).

6.7.2. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

Para la determinación de la capacidad antioxidante por medio del método DPPH se utilizó el método descrito por Cruz-Casino y col. en donde se preparó una solución de 7.4 mg de DPPH en 100 mL de EtOH.⁴⁵ Posteriormente se añadieron 1000 μ L de la solución de DPPH y 200 μ L de la dilución de la muestra problema en tubos Eppendorf (Tabla 5) La mezcla se agitó y homogeneizó con ayuda de un vortex y se dejó reaccionar en completa oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se midió la absorbancia a una longitud de onda de 520 nm.

Tabla 5. Preparación de las muestras a diferentes concentraciones para el ensayo DPPH*.

<i>Ensayo</i>	<i>Concentración muestra problema (mg/mL)</i>	<i>Volumen de la muestra problema (μL)</i>	<i>Volumen solución de DPPH* (μL)</i>
1	0.1	200	1000
2	0.05	200	1000

Para la curva de calibración también se utilizó como antioxidante de referencia el Trolox.

⁴⁵ Del Socorro Cruz, N., Cariño, R., La Cruz Neria, N., Sandoval, E. M., & Sumaya, M. T. (2023). Ultrasound with controlled temperature as an emerging technology for extraction of antioxidant compounds from by-products of mango (*Mangifera indica* L. var Ataulfo) juice. Emirates Journal Of Food And Agriculture, 35(2), 162-169. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2023.v35.i2.3013>

6.7.3. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método FRAP

Basándose en el procedimiento reportado por Benítez y col. para la determinación de la capacidad antioxidante de la especie *A. infesta* por el método FRAP.⁴⁶ Se preparó una solución amortiguadora 0.3 M a pH de 3.6 a partir de ácido acético y acetato de sodio (3.1 g), una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) y una solución de TPTZ (10 mM) la cual se aforo con HCl diluido (40 Mm).

Para llevar a cabo la preparación del reactivo FRAP se añadieron 25 mL de la solución amortiguadora, 2.5 mL de la solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM y 2.5 mL de la solución de TPTZ 10 mM.

Posteriormente, se utilizaron tubos eppendorf en donde se agregaron 900 μL del reactivo FRAP recién preparados, 30 μL de la muestra problema a diferentes concentraciones (0.1 y 0.05 mg/mL) y 90 μL de agua destilada (Tabla 6). La reacción se dejó incubar a 37°C durante 30 minutos a completa oscuridad. Después de este tiempo se tomaron las lecturas a 593 nm.

Tabla 6. Preparación de las muestras a diferentes concentraciones para el ensayo FRAP.

<i>Ensayo</i>	<i>Concentración muestra problema (mg/mL)</i>	<i>Volumen de la muestra problema (μL)</i>	<i>Volumen de reactivo FRAP (μL)</i>	<i>Volumen de agua destilada (μL)</i>
1	0.1	30	900	90
2	0.05	30	900	90

⁴⁶ Benítez, A., Villanueva, J., González, G., Alcántar, V. E., Puga, R., & Quintero, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-biológicas, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>

Se realizó la curva estándar utilizando soluciones de concentraciones conocidas de Hierro II. Es decir, soluciones de $\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ a concentraciones de 0-1000 μM como lo muestra la Tabla 7.

Tabla 7. Preparación de la curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ para el ensayo FRAP.

<i>Ensayo</i>	<i>Concentración de $\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ (μM)</i>	<i>Volumen de $\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ (μL)</i>	<i>Volumen de agua (μL)</i>
1	0	0	1000
2	100	100	900
3	250	250	750
4	500	500	500
5	750	750	250
6	1000	1000	0

La actividad antioxidante resultante se expresó en micromol de $\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ por gramo del extracto ($\mu\text{mol FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}/100\text{g}$) o $\mu\text{mol Efe}^{2+}/\text{g}$.

6.8. Evaluación de la actividad inhibidora de la α -glucosidasa

Para realizar la determinación de la actividad inhibidora de la α -glucosilada para los extractos de *Adolphia infesta* se llevó a cabo las metodologías de Kim y col. y Kwon.^{47, 48}

En donde se prepararon los reactivos a utilizar, que son:

Solución NaOH 1M

Se diluyen 400 mg de NaOH en agua destilada. Se adiciona a un matraz hasta completar el aforo a 10 mL.

Buffer de fosfatos 100mM

Se prepara a partir de 345 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ disueltos en 20 mL de agua destilada. Se mide el pH con ayuda de un potenciómetro y se ajusta con la solución preparada anteriormente (NaOH 1M) hasta un pH de 6.8. Se trasvasa a un matraz aforado de 25 mL y se afora con agua destilada.

Solución de DMSO al 11.5%

Se toman 2.8 mL de DMSO puro y se diluye con agua destilada para posteriormente llevarse a un aforo de 25 mL.

⁴⁷ Kim, Y., Jeong, Y., Wang, M., Lee, W., & Rhee, H. (2005). Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*, 21(6), 756-761. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.10.014>

⁴⁸ Kwon, Y. I., Jang, H. D., & Shetty, K. (2006). Evaluation of *Rhodiola crenulata* and *Rhodiola rosea* for management of type II diabetes and hypertension. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 15(3), 425–432.

Solución enzimática 0.1 U/mL

Se pesan 2 mg de la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae* y se lleva a un aforo de 1 mL con la solución buffer de fosfatos.

Solución de *p*-NPG 5mM

Se prepara a partir de 37.5 mg de *p*-NPG los cuales se llevaron a un aforo de 25 mL con la solución buffer de fosfatos. La solución se tiene que mantener en refrigeración a 4°C protegido de la luz.

Muestras

Para la preparación de las muestras se pesan 5.75 mg y se disuelven en 5 mL de la solución de DMSO al 11.5% para obtener soluciones stock de 1.15 mg/mL, posteriormente se hicieron diluciones a partir de la solución stock (1.15, 0.115, 0.0575, 0.0285 y 0.01425 mg/mL para el extracto metanólico. 1.15, 0.115, 0.0575, 0.0115, 0.00575, 0.00285 y 0.001425 mg/mL para la partición de AcOEt. Y 1.15, 0.115 y 0.0115 mg/mL para la partición de *n*-BuOH)

Solución de ácido gálico 20 mM

Se pesaron 85 mg de ácido gálico y se diluyeron en DMSO al 11.5% para después aforar a 25 mL.

Solución de Acarbosa 20 mM

Se pesaron 129.12 mg de acarbosa y se aforó con 10 mL de DMSO al 11.5%.

Procedimiento de la reacción

Para llevar a cabo la reacción de inhibición primero se agregaron los medios de reacción a la placa Elisa de 96 pocillos, es decir, se agregaron los medios de reacción: Buffer de fosfato (100 mM a pH 6.8) y *p*-Nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG) 5mM. Después se agregaron las muestras y se incubaron por primera vez a 37°C durante 5 minutos. Pasados los 5 minutos se les agregó la solución enzimática 0.1 U/mL para llevar a cabo la reacción. Se leyó la absorbancia al inicio a 405 nm y se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C para nuevamente leer la absorbancia a 405 nm.

En la Tabla 8 se muestra el protocolo para el ensayo de inhibición de la α -glucosidasa.

Tabla 8. Ensayo de inhibición de la α -glucosidasa.

Volumen (uL)	CN	B	CP	CNnE	M	CNE _m
Buffer de fosfatos 100mM	120	150	120	150	120	150
Diluciones de extractos	-	-	-	-	20	20
Referencia (Acarbosa o ácido gálico)	-	-	20	20	-	-
<i>p</i> -nitrofenil- α -D- Glucopiranosido (<i>p</i> - NPG)	60	60	60	60	60	60
DMSO (11.5%)	20	20	-	-	-	-
Incubar 5 minutos (37°C)						
Solución enzimática 0.1 U/mL	30	-	30	-	30	-
Leer absorbancia (405 nm) → Incubar 30 minutos(37°C) → Leer absorbancia (405 nm)						

Después de haber obtenido las lecturas de absorbancia se calcularon los porcentajes de inhibición de la enzima α -glucosidasa a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{(\Delta A_{CN} - \Delta A_B) - (\Delta A_M - \Delta A_{CNE})}{(\Delta A_{CN} - \Delta A_B)} \times 100$$

En donde:

A=Absorbancia

Δ =Diferencia entre la absorbancia del tiempo 0 y los 30 minutos

CN= Control Negativo

B=Blanco

M=Muestra

CNE=Control negativo no enzimático

7. Resultados y discusión

7.1. Compuestos obtenidos de la especie *Adolphia infesta*

Por medio de la técnica de cromatografía en columna se pudo aislar la epigallocatequina (Flavonoide de tipo catequina) y la mezcla de triterpenos de ácido ursólico y ácido oleanólico. Estos compuestos se elucidaron con ayuda de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C en una y dos dimensiones.

7.1.1. Elucidación estructural del ácido ursólico

Después de la cromatografía se obtuvieron 4 mg de un polvo color blanco, cuyo análisis por RMN de ^1H permitió identificar la mezcla de ácido ursólico (UA) y ácido oleanólico (OA) (Figura 12). Una cromatografía en columna subsecuente condujo a la purificación del UA.

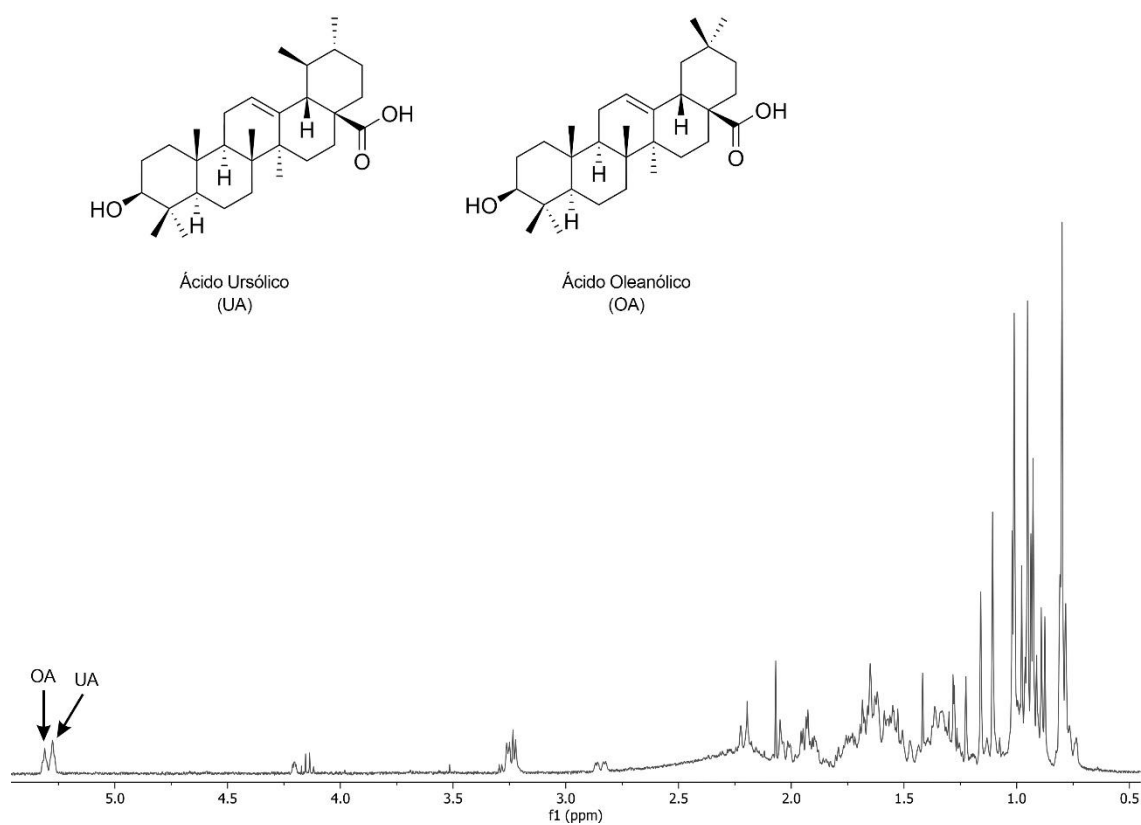


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H de la mezcla de UA y OA adquirido a 400 MHz en CDCl_3 .

El espectro de IR (Figura 13) mostró las siguientes bandas de absorción: 3424 cm^{-1} para el grupo OH, 2924 cm^{-1} perteneciente a los enlaces CH, 1720 cm^{-1} característica del enlace C=C y 1775 cm^{-1} perteneciente al grupo C=O.

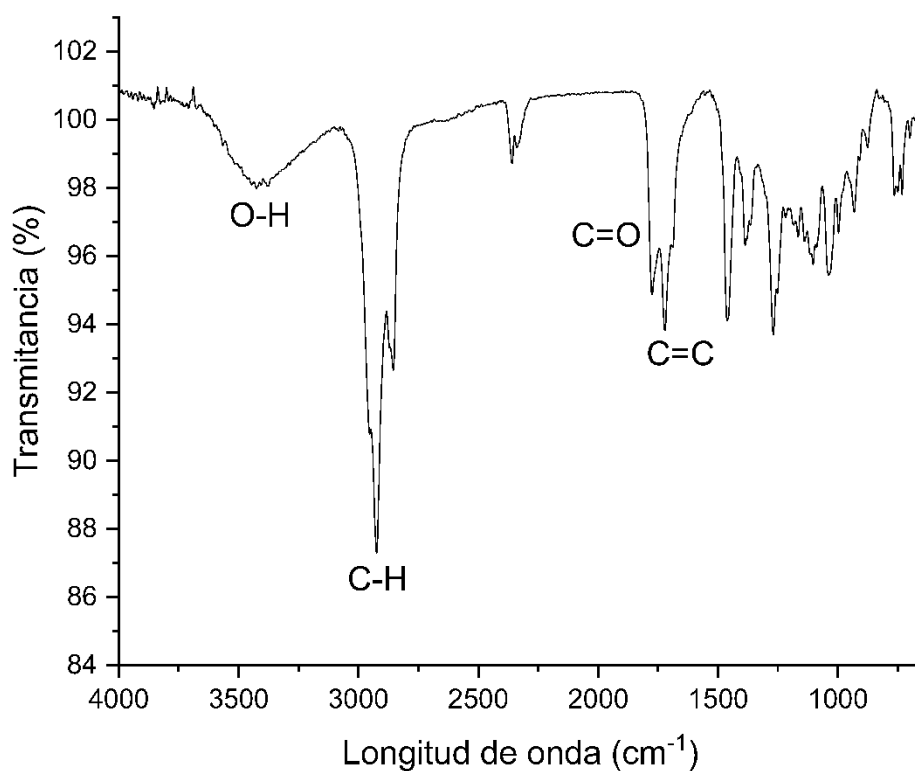


Figura 13. Espectro de infrarrojo del ácido ursólico.

En el espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 (Figura 14) perteneciente al ácido ursólico, se identificaron 10 señales de protón. Se observan cinco señales simples en 1.00, 0.77, 0.8, 0.93, y 1.09 ppm pertenecientes a los protones de metilos 23, 24, 25, 26, y 27 respectivamente. Tres señales dobles en 2.19, 0.86 y 0.95 ppm correspondientemente a los protones 18, 29 y 30 respectivamente. Para el protón del carbono 3 se observó una señal doble de dobles a 3.22 ppm y en 5.26 ppm se apreció una señal triple, la cual se asignó al protón 12. Estas dos últimas señales son las más representativas para la identificación del UA.

Los desplazamientos y constantes de acoplamiento se compararon con la literatura reportada por Tshilanda y col.⁴⁹ y Martins y col.⁵⁰. Los cuales se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Comparación de datos de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 del ácido ursólico.

Hidrógeno	$\delta\text{H Exp}$	$\delta\text{H Ref}$	$J \text{ Exp (Hz)}$	$J \text{ Ref (Hz)}$
3	3.22 (dd)	3.22 (dd)	11.1, 5.0	10.8, 4.9
12	5.26 (t)	5.27 (t)	3.67, 3.67	3.6, 3.5
18	2.19 (d)	2.2 (d)	11.21	11.7
23	1 (s)	1 (s)		
24	0.77 (s)	0.79 (s)		
25	0.8 (s)	0.81 (s)		
26	0.93 (s)	0.92 (s)		
27	1.09 (s)	1.10 (s)		
29	0.86 (d)	0.87 (d)	6.45	6.4
30	0.95 (d)	0.97 (d)	6.24	6.3

⁴⁹ Tshilanda, D. D., Onyamboko, D. N., Babady-Bila, P., Ngbolua, K., Tshibangu, D. S., Dibwe, E. D. F., & Mpiana, P. T. (2015). Anti-sickling Activity of Ursolic Acid Isolated from the Leaves of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae). *Natural Products And Bioprospecting*, 5(4), 215-221. <https://doi.org/10.1007/s13659-015-0070-6>

⁵⁰ Martins, D., Carrion, L. L., Ramos, D. F., Salomé, K. S., Da Silva, P. E. A., Barison, A., & Nunez, C. V. (2013). Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). *BioMed Research International*, 2013, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/605831>

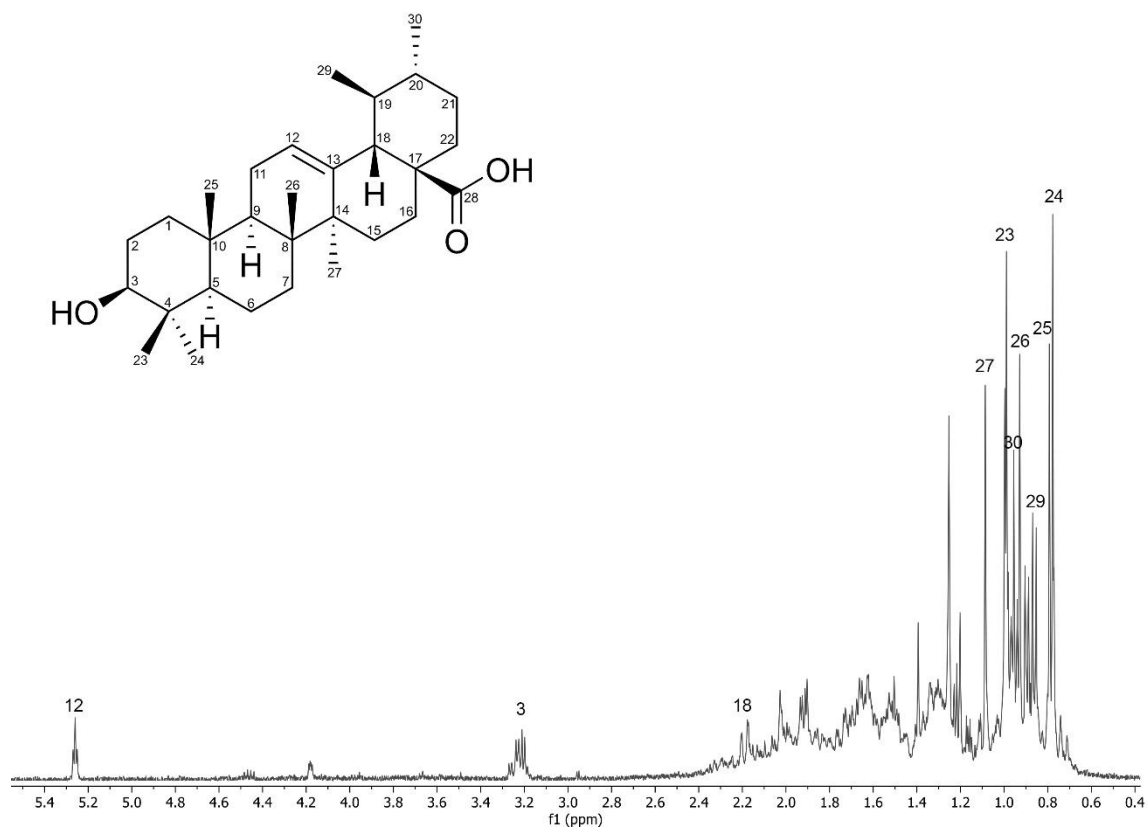


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H del ácido ursólico adquirido a 400 MHz en CDCl_3 .

En el espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 (Figura 15) perteneciente al ácido ursólico se pueden observar 30 señales pertenecientes a los 30 carbonos de la molécula. De éstos diez son carbonos cuaternarios, dos terciarios, diez secundarios y ocho primarios.

La asignación de las señales se realizó mediante la comparación de los desplazamientos reportados por Tshilanda y col.⁵¹ y Martins y col.⁵², los cuales se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Comparación de datos de RMN de ^{13}C (400 MHz) en CDCl_3 del ácido ursólico.

C	Tipo	$\delta\text{H Exp}$	$\delta\text{H Ref}$	C	Tipo	$\delta\text{H Exp}$	$\delta\text{H Ref}$
1	CH ₂	38.7	38.6	16	CH ₂	24.4	24.3
2	CH ₂	28.3	28.2	17	C	48.1	48.1
3	CH	79.2	79.1	18	C	52.9	52.7
4	C	39	39	19	CH ₂	39.2	39.2
5	C	55.4	55.2	20	C	38.9	38.9
6	CH ₂	18.4	18.3	21	CH ₂	30.7	30.5
7	CH ₂	33.1	32.9	22	CH ₂	36.8	36.9
8	C	39.4	39.4	23	CH ₃	29.1	28.9
9	C	47.7	47.5	24	CH ₃	15.7	15.6
10	C	36.6	36.7	25	CH ₃	15.6	15.4
11	CH ₂	23.4	23.3	26	CH ₃	17.1	17.0
12	CH	126	125.9	27	CH ₃	23.7	23.6
13	C	138	138.1	28	CH ₃	179.4	180
14	C	42.1	42.0	29	CH ₃	17.2	17.1
15	CH ₂	28.16	28.1	30	CH ₃	21.3	21.4

⁵¹ Tshilanda, D. D., Onyamboko, D. N., Babady-Bila, P., Ngbolua, K., Tshibangu, D. S., Dibwe, E. D. F., & Mpiana, P. T. (2015). Anti-sickling Activity of Ursolic Acid Isolated from the Leaves of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae). *Natural Products And Bioprospecting*, 5(4), 215-221. <https://doi.org/10.1007/s13659-015-0070-6>

⁵² Martins, D., Carrion, L. L., Ramos, D. F., Salomé, K. S., Da Silva, P. E. A., Barison, A., & Nunez, C. V. (2013). Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). *BioMed Research International*, 2013, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/605831>

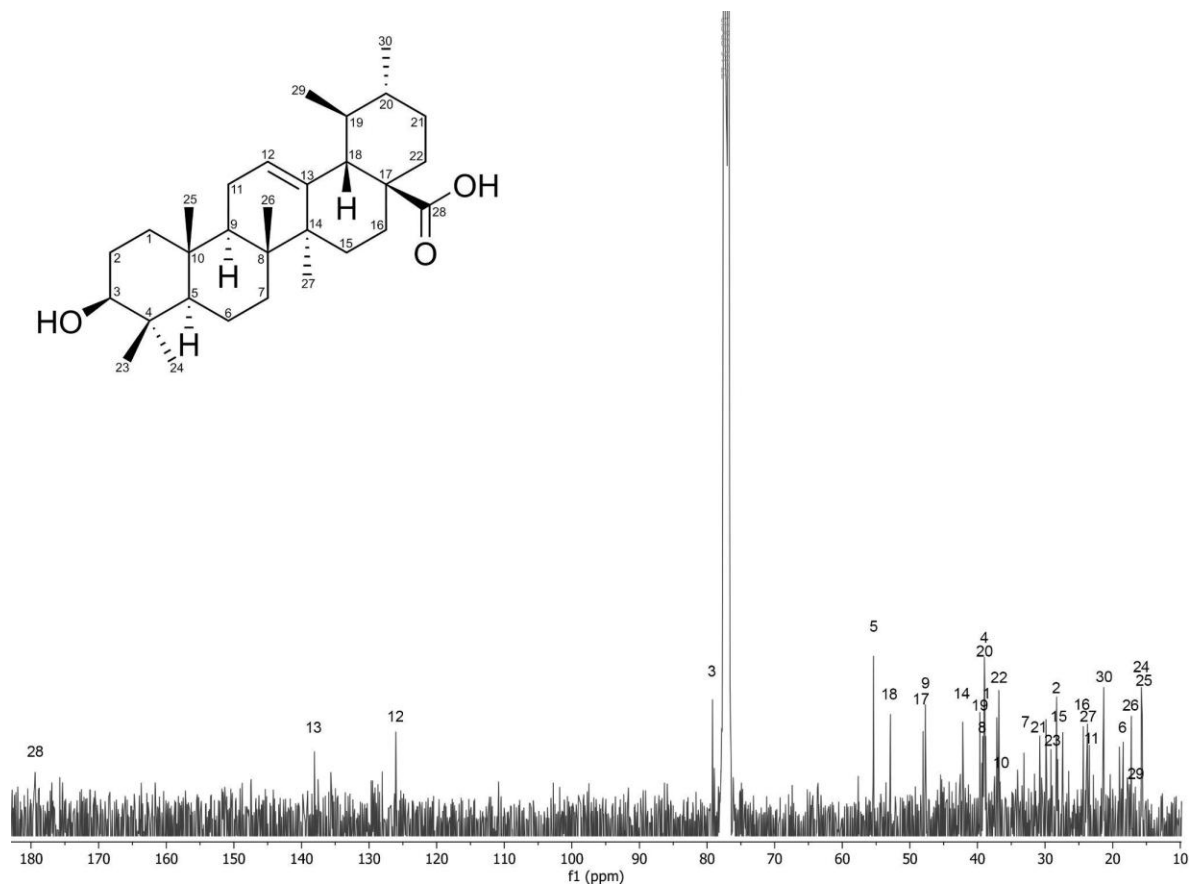


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C del ácido ursólico adquirido a 400 MHz en CDCl_3 .

El ácido ursólico es un triterpeno ampliamente estudiado por su alta frecuencia en muchas especies vegetales y su gran variedad de actividades biológicas, entre ellas: antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerígena, antiviral⁵³, antifúngico, antitumoral⁵⁴ y antioxidante.⁵⁵

⁵³ Babalola, I. T., & Shode, F. O. (2013). Ubiquitous Ursolic Acid: A Potential Pentacyclic Triterpene Natural Product. *Journal Of Pharmacognosy And Phytochemistry*, 2(2), 214-222. https://www.phytojournal.com/vol2Issue2/Issue_july_2013/37.1.pdf

⁵⁴ Pironi, A. M., De Araújo, P. R., Fernandes, M. A., Salgado, H. R. N., & Chorilli, M. (2017). Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Ursolic Acid: A Review. *Critical Reviews In Analytical Chemistry*, 48(1), 86-93. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1390425>

⁵⁵ Nascimento, P. D., Lemos, T., Bizerra, A., Arriaga, Â., Ferreira, D., Santiago, G., Braz-Filho, R., & Costa, J. (2014). Antibacterial and Antioxidant Activities of Ursolic Acid and Derivatives. *Molecules*, 19(1), 1317-1327. <https://doi.org/10.3390/molecules19011317>

7.1.2. Elucidación estructural de la (-)-Epigallocatequina (EGC)

Al extracto metanólico se le realizaron lavados con disolventes de distintas polaridades para obtener una fracción enriquecida con epigallocatequina. Posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna donde se obtuvieron 4 mg de un sólido anaranjado (Epigallocatequina).

El espectro de IR (Figura 16) mostró una banda de absorción del grupo O-H a 3323 cm^{-1} y una banda de absorción perteneciente a los enlaces C=C a 1610 cm^{-1} .

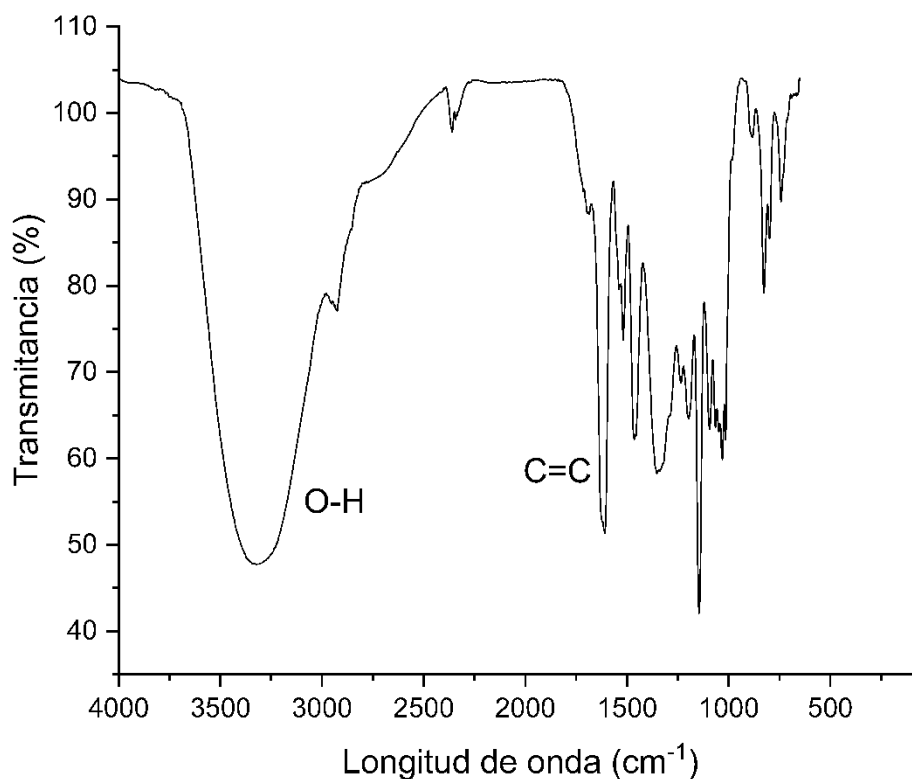


Figura 16. Espectro de infrarrojo del ácido ursólico.

En el espectro de RMN de ^1H en acetona- d_6 (Figura 17) perteneciente a la epigallocatequina, se identificaron seis señales de protón. Se observaron dos

señales simples a 4.81 y 6.57 ppm, la primera perteneciente al protón H-2 y la segunda pertenece a los protones H-2' y H-6' del anillo aromático que son equivalentes. Dos señales dobles a 5.91 y 6.01 ppm correspondientes a los protones H-8 y H-6, respectivamente. Para los protones del carbono 4 se observó una señal doble de dobles a 2.84 y 2.72 ppm, mientras que la señal en 4.18 ppm asignó a H-3.

Los desplazamientos y constantes de acoplamiento se compararon con la literatura reportada por Cai y col.⁵⁶ y David y col.⁵⁷. Estos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Comparación de datos de RMN de ^1H (400 MHz) en acetona- d_6 de la epigallocatequina.

Hidrógeno	$\delta\text{H Exp}$	$\delta\text{H Ref}$	$J \text{ Exp (Hz)}$	$J \text{ Ref (Hz)}$
2	4.81 (s)	4.82 (s)		
3	4.18 (t)	4.19 (m)	4.5, 4.5	4.5
4	2.84 (dd)	2.85 (dd)	4.5, 16.4	4.6, 16.5
	2.72 (dd)	2.72 (dd)	3.5, 16.5	3.3, 16.5
6	6.01 (d)	6.01 (d)	2.3	2.3
8	5.91 (d)	5.91 (d)	2.3	2.3
2', 6'	6.57 (s)	6.57 (s)		

⁵⁶ Cai, Y., Evans, F. J., Roberts, M. F., Phillipson, J. D., Zenk, M. H., & Gleba, Y. Y. (1991). Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, 30(6), 2033–2040. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85063-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85063-6)

⁵⁷ Davis, A. L., Cai, Y., Davies, A. P., & Lewis, J. R. (1996). ^1H and ^{13}C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 34(11), 887–890. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-458x\(199611\)34:11%3C887::aid-omr995%3E3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-458x(199611)34:11%3C887::aid-omr995%3E3.0.co;2-u)

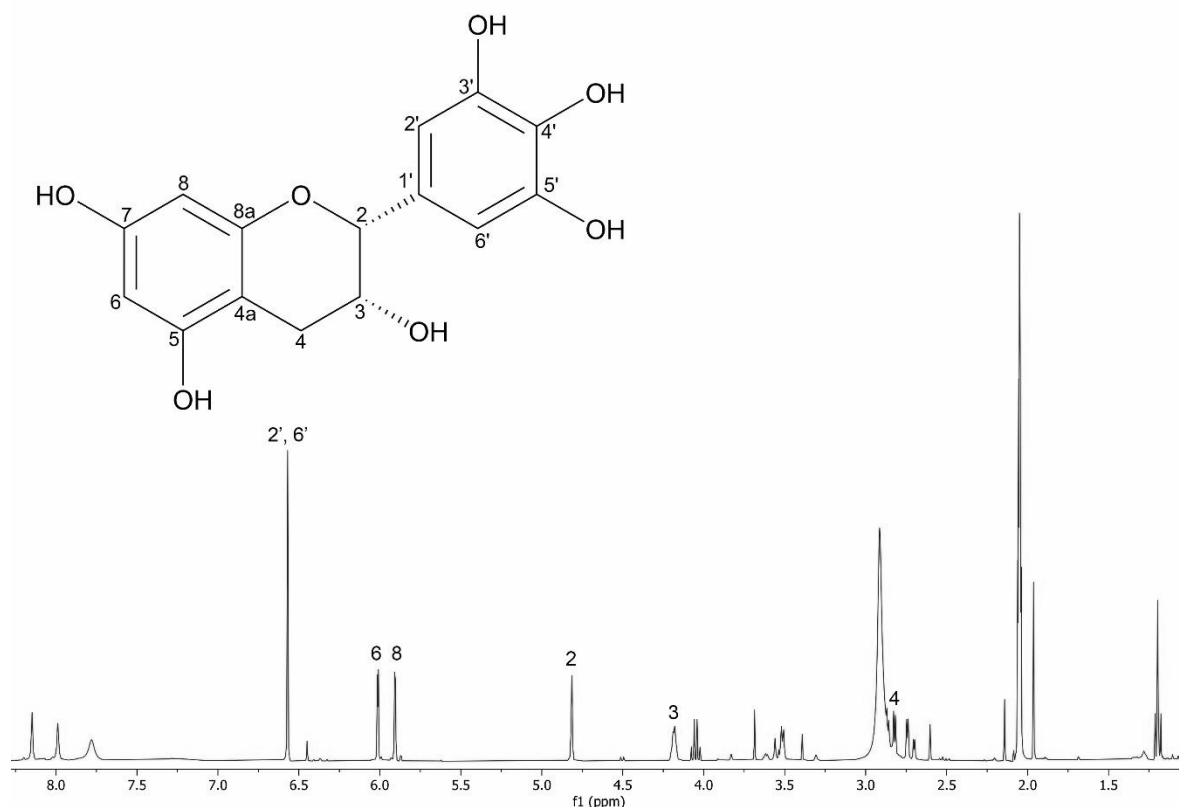


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H de la epigallocatequina adquirido a 400 MHz en acetona- d_6 .

En el espectro de RMN de ^{13}C en acetona- d_6 (Figura 18) observar 13 señales pertenecientes a los 15 carbonos presentes en la molécula. Seis de ellos son carbonos terciarios, uno secundario y ocho cuaternarios. Los carbonos 2' y 6' son equivalentes por simetría, sucede lo mismo con los carbonos 3' y 5'.

La asignación de las señales se realizó mediante la comparación de los desplazamientos reportados por Cai y col.⁵⁸ y David y col.⁵⁹ Los cuales se muestran en la Tabla 12.

⁵⁸ Cai, Y., Evans, F. J., Roberts, M. F., Phillipson, J. D., Zenk, M. H., & Gleba, Y. Y. (1991). Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, 30(6), 2033–2040. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85063-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85063-6)

⁵⁹ Davis, A. L., Cai, Y., Davies, A. P., & Lewis, J. R. (1996). ^1H and ^{13}C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 34(11), 887–890. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-458x\(199611\)34:11%3C887::aid-omr995%3E3.0.co:2-u](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-458x(199611)34:11%3C887::aid-omr995%3E3.0.co:2-u)

Tabla 12. Comparación de datos de RMN de ^{13}C (400 MHz) en acetona- d_6 de la epigallocatequina.

Carbono	Tipo	δH Exp	δH Ref
2	CH	79.41	79.46
3	CH	66.97	67.02
4	CH ₂	28.81	28.82
4a	C	99.85	99.92
5	C	157.45	157.57
6	CH	96.10	96.18
7	C	157.55	157.59
8	CH	95.64	95.73
8a	C	157.09	157.14
1'	C	131.52	131.56
4'	C	132.88	132.97
5'	C	146.10	146.17
6'	CH	106.89	106.97

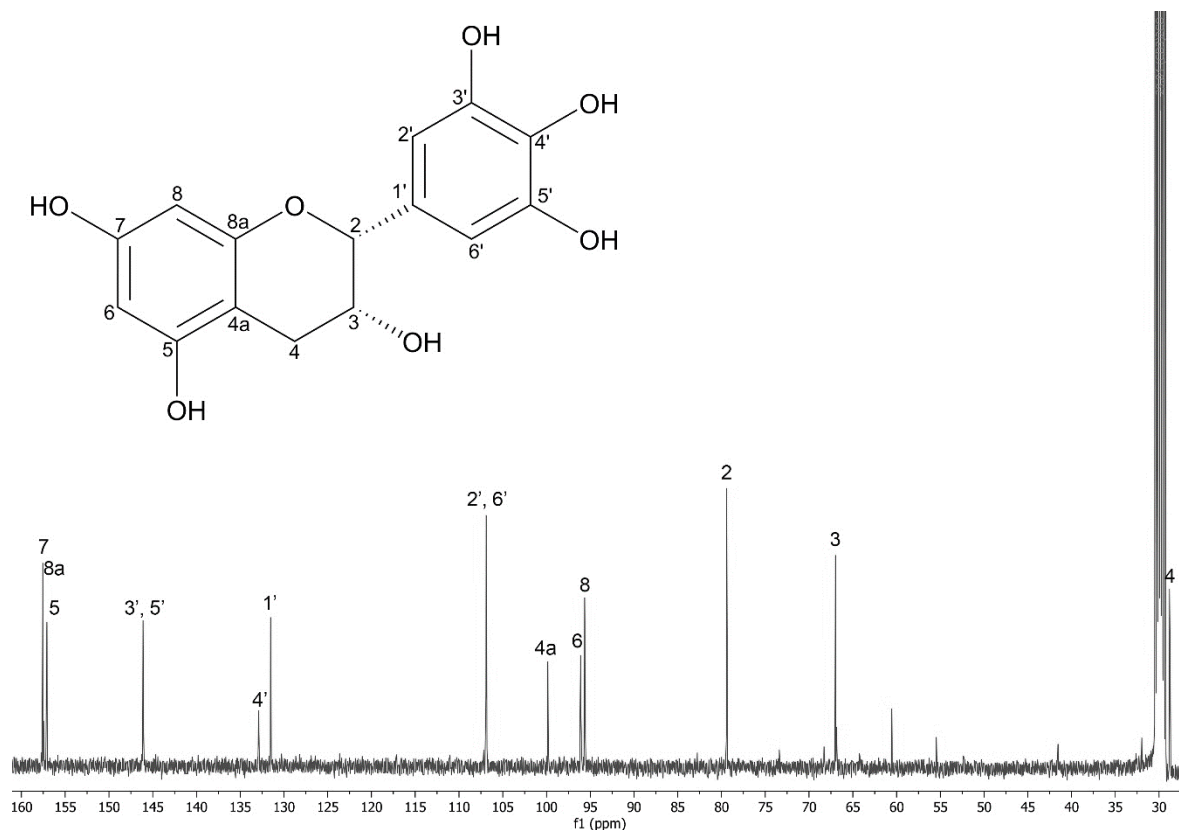


Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C de la epigallocatequina adquirido a 400 MHz en acetona- d_6 .

Para descartar la obtención de una catequina distinta a la EGC se obtuvieron los espectros en 2D (HMBC, HSQC y COSY) del compuesto. Con el espectro de HSQC (Figura 19) se pudo comprobar de manera más confiable la obtención de la EGC observando la correlación directa de cada ^1H con su carbono.

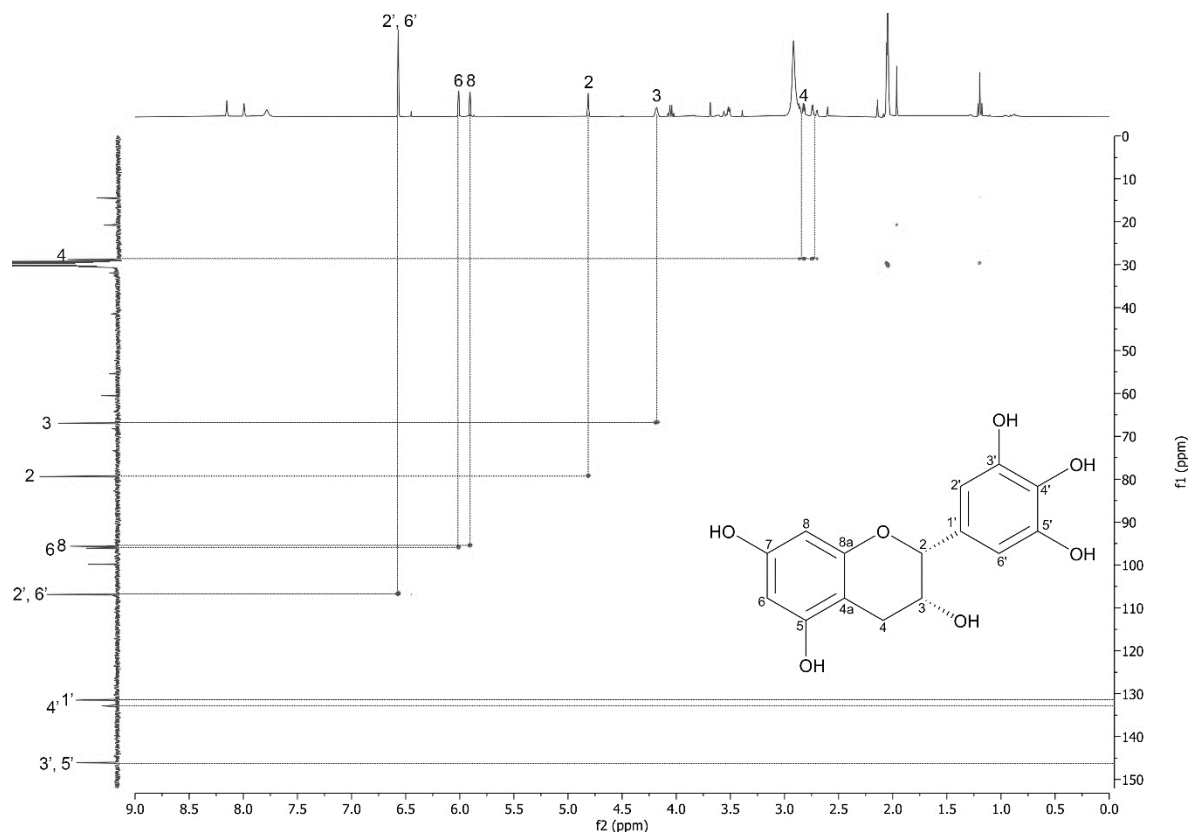


Figura 19. Espectro de RMN HSQC de la epigallocatequina adquirido a 400 MHz en acetona- d_6 .

La familia de las catequinas ha demostrado tener efecto positivo en contra de muchas enfermedades. En este caso se ha logrado aislar la epigallocatequina en la cual se han encontrado variedad de estudios comprobando sus efectos antioxidantes, antimutagénicos, anticancerígenos⁶⁰, antidiabéticos⁶¹ y antivirales.⁶²

⁶⁰ MC, S., K, S., & Kuttan, R. (2002). Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *Journal Of Ethnopharmacology*, 83(1-2), 109-116. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00217-9](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00217-9)

⁶¹ Babu, P. V. A., Liu, D., & Gilbert, E. R. (2013). Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 24(11), 1777-1789. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.06.003>

⁶² Song, J., Lee, K., & Seong, B. (2005). Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research*, 68(2), 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.06.010>

7.2. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

Con ayuda de las curvas de calibración obtenidas a partir del antioxidante de referencia Trolox y vitamina C se interpolaron los datos recuperados de la prueba realizada a la especie *A. infesta* y así calcular el contenido de $\mu\text{mol ET/g}$ o $\mu\text{molEVC/g}$ según sea el caso.

Con los datos obtenidos (Tabla 13) para realizar la curva de calibración de Trolox (Figura 20) se pudo determinar un valor de coeficiente de determinación muy cercano a 1 (0.9917) por lo cual es funcional para la interpolación.

Tabla 13. Curva de calibración de Trolox para el método ABTS.

Soluciones de Trolox						
Concentración (μM)	300	225	150	75	57.5	0
Absorbancia	0.3215	0.4000	0.4415	0.4950	0.5220	0.5480

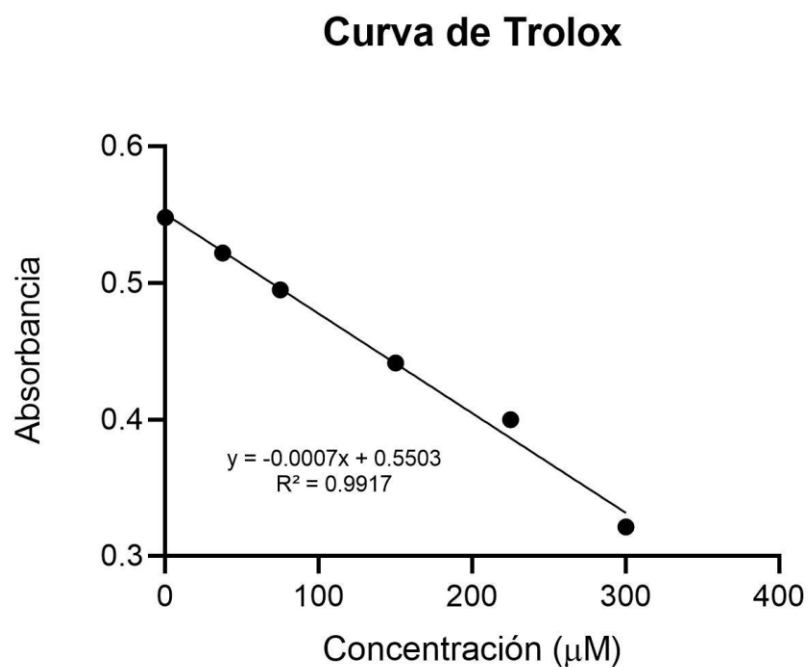


Figura 20. Curva de calibración de Trolox para la prueba ABTS.

Con los datos obtenidos (Tabla 14) para realizar la curva de calibración de vitamina C (Figura 21) se pudo determinar un valor de coeficiente de determinación muy cercano a 1 (0.9996) por lo cual es funcional para la interpolación.

Tabla 14. Curva de calibración de vitamina C para el método ABTS.

Concentración (μM)	1124.23	843.175	281.058	140.529	0
Absorbancia	0.0060	0.1480	0.4300	0.5150	0.5840

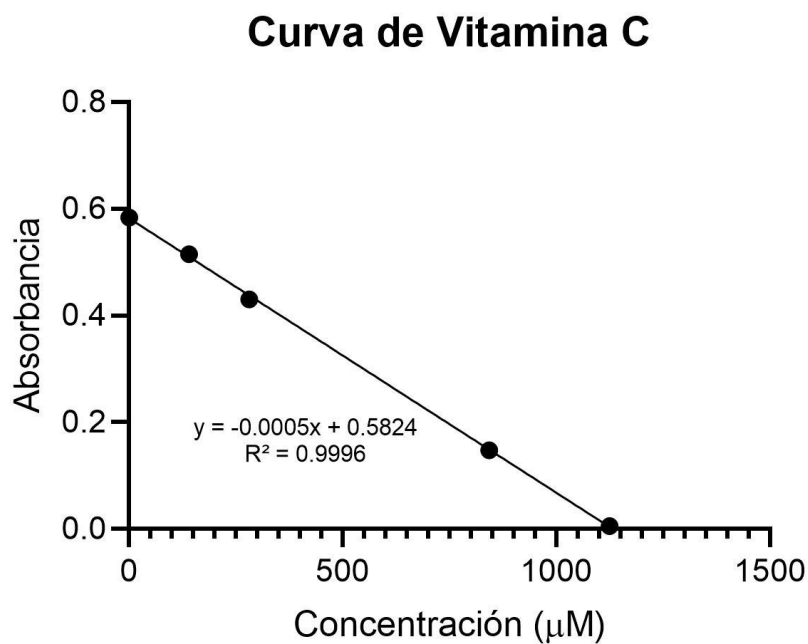


Figura 21. Curva de calibración de vitamina C para la prueba ABTS.

Con el extracto metanólico, las particiones de AcOEt y *n*-BuOH obtenidas de la parte de raíz se prepararon concentraciones de 0.1 y 0.05 mg/mL, las cuales se utilizaron para realizar el método ABTS, obteniendo las absorbancias (Tabla 15) y determinar su actividad antioxidante.

Tabla 15. Concentración vs absorbancias

Método	Concentración (mg/mL)	Promedio absorbancia (Extracto Metanólico)	Promedio absorbancia (Partición AcOEt)	Promedio absorbancia (Partición <i>n</i> - BuOH)
ABTS	0.1	0.391	0.194	0.441
	0.05	0.564	0.532	0.529
DPPH	0.1	0.440	0.531	0.815
	0.05	0.734	0.817	1.022
FRAP	0.1	0.163	0.225	0.139
	0.05	0.142	0.167	0.128

Se muestra a continuación los datos de actividad antioxidante para el extracto y las particiones de AcOEt y *n*-BuOH (Tabla 16 y 17).

Tabla 16. Actividad antioxidante de *A. infesta* para ABTS en $\mu\text{mol ET/g}$.

Concentración (mg/mL)	Extracto metanólico	Partición de AcOEt	Partición de <i>n</i> -BuOH
0.1	113.54	254.50	77.83
0.05	-	26.14	30.42
- No presentó actividad antioxidante			

Tabla 17. Actividad antioxidante de *A. infesta* para ABTS en $\mu\text{mol EVC/g}$.

Concentración (mg/mL)	Extracto metanólico	Partición de AcOEt	Partición de <i>n</i> -BuOH
0.1	191.06	388.40	141.06
0.05	36.13	100.80	106.80

En las gráficas de las Figuras 22 y 23 se puede observar que la fracción de AcOEt obtuvo mayor actividad antioxidante.

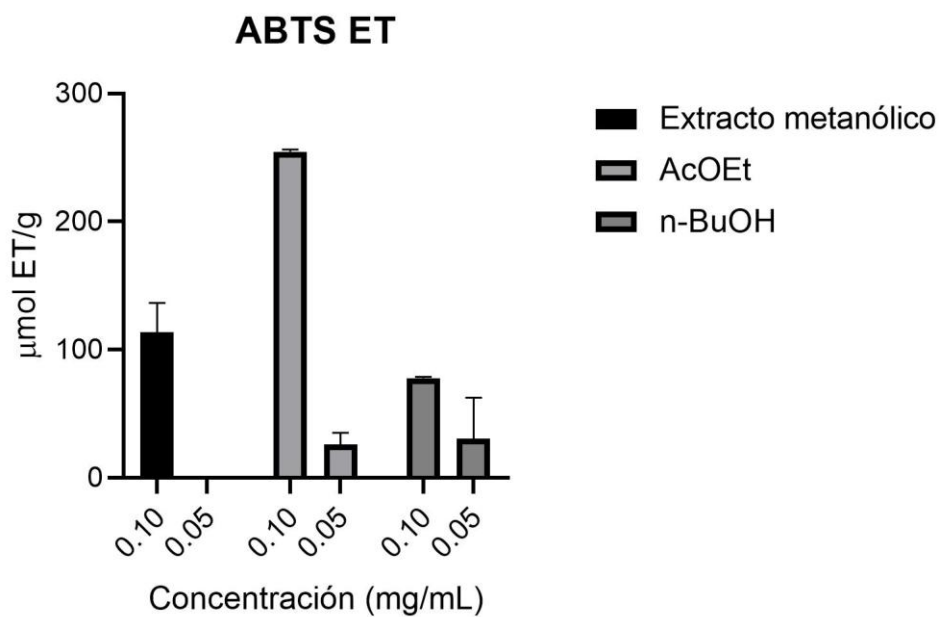


Figura 22. Actividad antioxidante del extracto metanólico, fracción de AcOEt y n-BuOH de raíz de *A. infesta* por el método ABTS utilizando la curva de Trolox.

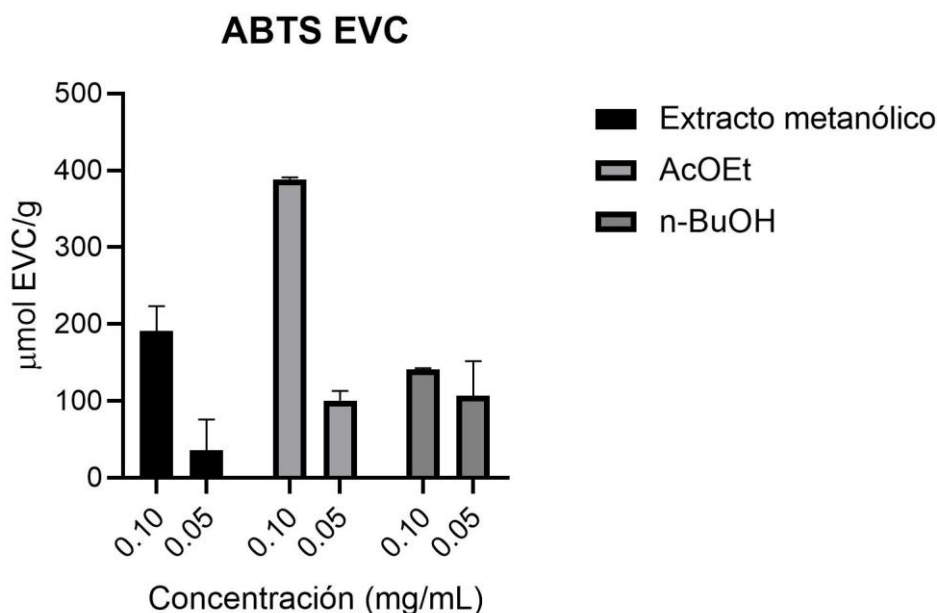


Figura 23. Actividad antioxidante del extracto metanólico, fracción de AcOEt y n-BuOH de raíz de *A. infesta* por el método ABTS utilizando la curva de vitamina C.

Especies de la misma familia (Rhamnaceae) como *Ziziphus jujuba* y *Ziziphus lotus* han demostrado tener una buena actividad antioxidante ante la prueba del radical ABTS. Los resultados obtenidos de *A. infesta* muestran tener un poder antioxidante similar a *Z. jujuba*.^{63,64} Valores entre 243-564 $\mu\text{mol ET/g}$ para *Z. jujuba*, y 10-255 $\mu\text{mol ET/g}$ para *A. infesta*, teniendo los valores más altos la partición de AcOEt. Yan y col. Mencionan que esta actividad antioxidante se debe al alto contenido de compuestos fenólicos, haciendo énfasis en flavonoides en donde proantocianidinas como la catequina y epicatequina predominan.

⁶³ Damiano, S., Forino, M., De, A., Vitali, L. A., Lupidi, G., & Tagliatela-Scafati, O. (2017). Antioxidant and antibiofilm activities of secondary metabolites from *Ziziphus jujuba* leaves used for infusion preparation. *Food Chemistry*, 230, 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.141>

⁶⁴ Yan, M., Wang, Y., Watharkar, R. B., Pu, Y., Wu, C., Lin, M., Lu, D., Liu, M., Bao, J., & Xia, Y. (2022). Physicochemical and antioxidant activity of fruit harvested from eight jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) cultivars at different development stages. *Scientific Reports*, 12(1), 2272. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06313-5>

Los resultados expresados en $\mu\text{mol EVC/g}$ fueron comparados con los reportados de *Z. lotus* demostrando tener actividad antioxidante, sin embargo, significativamente menor a la de *Z. lotus*.

Letaief y col. Concluyen que las particiones de MeOH y AcOET de la raíz de *Z. lotus* tienen mayor actividad antioxidante ya que es donde se encuentra en mayor cantidad los fitoconstituyentes.⁶⁵

⁶⁵ Letaief, T., Garzoli, S., Masci, V. L., Mejri, J., Abderrabba, M., Tiezzi, A., & Ovidi, E. (2021). Chemical Composition and Biological Activities of Tunisian *Ziziphus lotus* Extracts: Evaluation of Drying Effect, Solvent Extraction, and Extracted Plant Parts. *Plants*, 10(12), 2651. <https://doi.org/10.3390/plants10122651>

7.3. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

Con ayuda de la curva de calibración obtenida a partir del antioxidante de referencia Trolox se lograron interpolar los datos recuperados de la prueba realizada a la especie *A. infesta* y así calcular el contenido en $\mu\text{mol ET/g}$.

Con los datos obtenidos (Tabla 18) para realizar la curva de calibración de Trolox (Figura 24) se pudo determinar un valor de coeficiente de determinación muy cercano a 1 (0.9963) lo cual es funcional para la interpolación.

Tabla 18. Curva de calibración de Trolox para el método DPPH.

Soluciones de Trolox						
Concentración (μM)	300	225	150	75	57.5	0
Absorbancia	0.2737	0.5217	0.7700	1.0803	1.1380	1.3123

Curva de Trolox

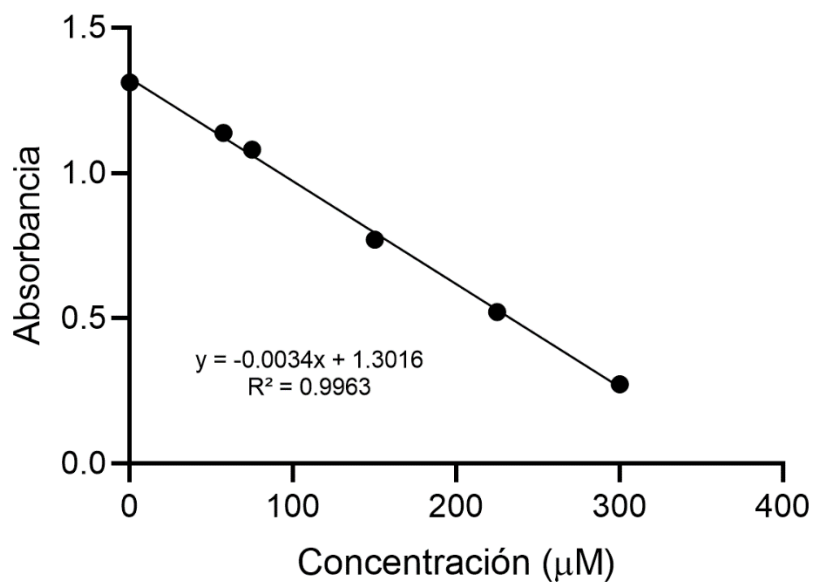


Figura 24. Curva de calibración de Trolox para la prueba DPPH.

Con el extracto metanólico, las fracciones de AcOEt y *n*-BuOH obtenidas de la parte de raíz se prepararon concentraciones de 0.1 y 0.05 mg/mL, las cuales se utilizaron para realizar el método DPPH, obteniendo las absorbancias (Tabla 15) y determinar su actividad antioxidante.

Después de la interpolación se obtuvieron los siguientes datos para el extracto metanólico, las fracciones de AcOEt y *n*-BuOH (Tabla 19).

Tabla 19. Actividad antioxidante de *A. infesta* para DPPH en $\mu\text{mol ET/g}$.

Concentración (mg/mL)	Extracto metanólico	Partición de AcOEt	Partición de n-BuOH
0.1	15.20	13.59	8.58
0.05	20.02	17.08	9.85

En la gráfica de la figura 25 se puede observar que el extracto metanólico obtuvo mayor actividad antioxidante.

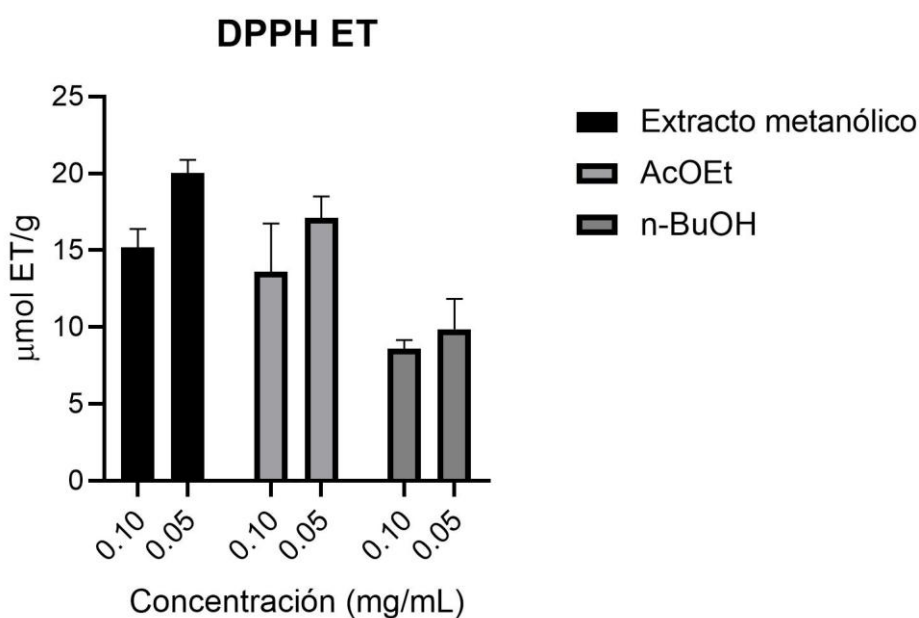


Figura 25. Actividad antioxidante del extracto metanólico, fracción de AcOEt y n-BuOH de raíz de *A. infesta* por el método DPPH utilizando la curva de Trolox.

Los datos obtenidos se compararon con los de *Hovenia dulcis* y *Hovenia acerba* (especies de la misma familia). *A. infesta* demostró tener una capacidad antioxidante positiva principalmente en el extracto metanólico, sin embargo, por debajo que las reportadas de las dos especies de *Hovenia*. (20.9 contra 32.33 y

59.4 $\mu\text{mol ET/g}$ respectivamente). Mediante HPLC y Espectrometría de Masas se aislaron y caracterizaron diferentes compuestos de *H. acerba*, revelando la existencia de especies como la epigallocatequina, epicatequina, galocatequina, catequina y terpenos como el ácido oleanólico y ursólico. Principalmente en el extracto metanólico y extracto etanólico.⁶⁶

⁶⁶ Peng, H., Deng, Z., Chen, X., Sun, Y., Zhang, B., & Li, H. (2018). Major chemical constituents and antioxidant activities of different extracts from the peduncles of *Hovenia acerba* Lindl. *International Journal Of Food Properties*, 21(1), 2135-2155. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1497059>

7.4. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método FRAP

Con ayuda de la curva de calibración obtenida a partir de la referencia de $\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ se lograron interpolar los datos recuperados de la prueba realizada a la especie *A. infesta* y así calcular el contenido de $\mu\text{mol Efe}^{2+}/\text{g}$.

Con los datos obtenidos (Tabla 20) para realizar la curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ (Figura 26) se pudo determinar un valor de coeficiente de determinación muy cercano a 1 (0.9868) por lo cual es funcional para la interpolación

Tabla 20. Curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ para el método FRAP.

Concentración (mM)	1000	750	1000	0
Absorbancia	0.0945	0.1300	0.3210	0.3660

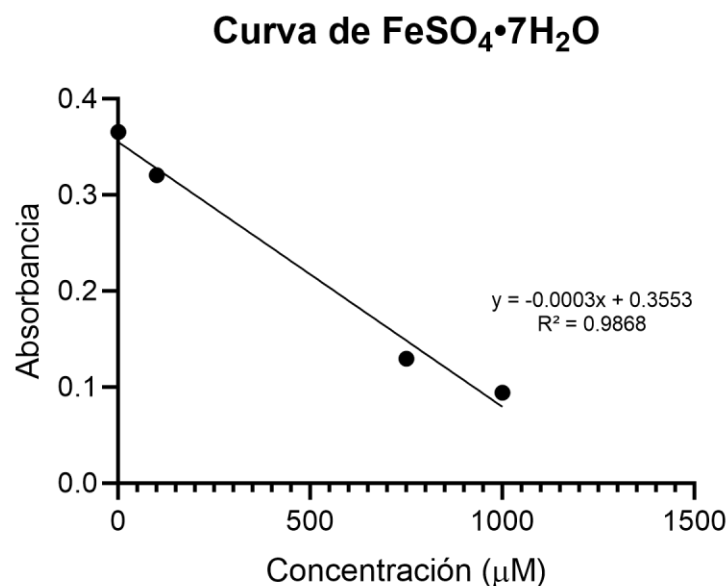


Figura 26. Curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para la prueba FRAP.

Con el extracto metanólico, las fracciones de AcOEt y *n*-BuOH obtenidas de la parte de raíz se prepararon concentraciones de 0.1 y 0.05 mg/mL, las cuales se utilizaron para realizar el método FRAP, obteniendo las absorbancias (Tabla 15) y determinar su actividad antioxidante.

Después de la interpolación se obtuvieron los siguientes datos para el extracto metanólico, las fracciones de AcOEt y *n*-BuOH (Tabla 21).

Tabla 21. Actividad antioxidante de *A. infesta* por FRAP en $\mu\text{mol EFe}^{2+}/\text{g}$.

Concentración (mg/mL)	Extracto metanólico	Partición de AcOEt	Partición de <i>n</i> -BuOH
0.1	217.09	147.6733333	244.4788889
0.05	483.2911111	424.7355556	513.5133333

En la gráfica de las Figura 27 se puede observar que la fracción de *n*-BuOH obtuvo mayor actividad antioxidante.

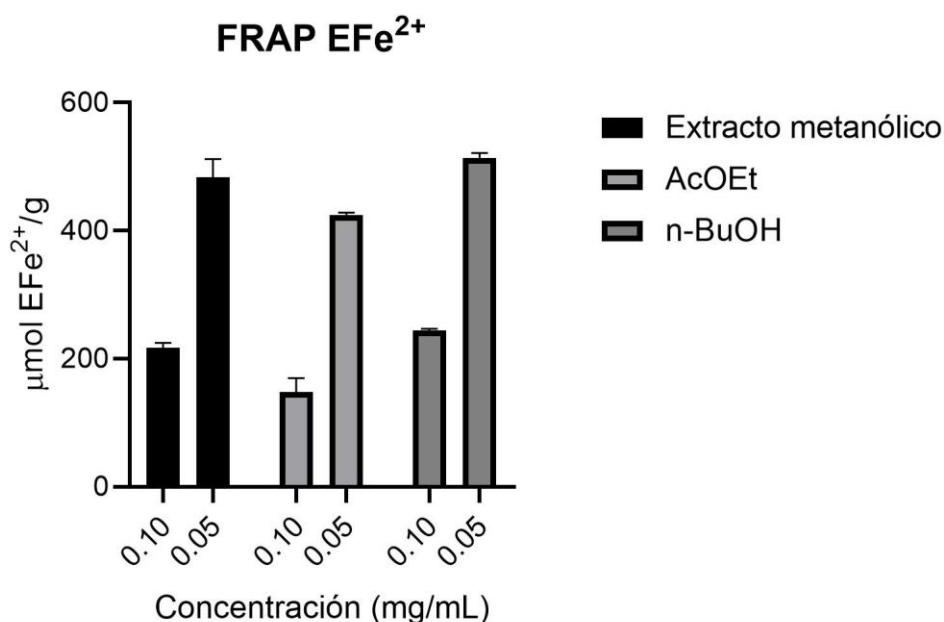


Figura 27. Actividad antioxidante del extracto metanólico, fracción de AcOEt y *n*-BuOH de raíz de *A. infesta* por el método FRAP utilizando la curva de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Los resultados obtenidos muestran una actividad antioxidante positiva, comparando con algunas otras especies de la familia Rhamnaceae suelen estar dentro del promedio o por encima en algunos casos comparando las concentraciones de las muestras utilizadas. Por ejemplo, es el caso de los extractos de semilla, pulpa y cascara del fruto de la especie *Hovenia dulcis*, en donde muestran resultados entre 75.22 y 690.68 $\mu\text{mol EFe}^{2+}/\text{g}$.⁶⁷ El extracto y particiones de *A. infesta* tuvieron resultados entre 147 y 513 $\mu\text{mol EFe}^{2+}/\text{g}$, sin embargo, las concentraciones

⁶⁷ Rydlewski, A. A., De Moraes, D. R., Rotta, E. M., Claus, T., Vagula, J. M., Da Silva, M. C., Santos, O. O., Junior, & Visentainer, J. V. (2017). Bioactive Compounds, Antioxidant Capacity, and Fatty Acids in Different Parts of Four Unexplored Fruits. Journal Of Food Quality, 2017, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2017/8401074>

utilizadas fueron ligeramente menores. Esta actividad puede deberse a compuestos fenólicos presentes en la planta, como es la epigallocatequina. Se han encontrado estudios en donde se pone a prueba el flavonoide aislado ante FRAP y muestra resultados significativamente mayores.⁶⁸

7.5. Evaluación de la actividad inhibidora de la α -glucosidasa

Para evaluar la inhibición de la enzima α -glucosidasa, el extracto metanólico, la fracción de AcOEt y de *n*-BuOH de la parte de raíz de la especie se diluyeron a

⁶⁸ Moldoveanu, S. C., & Oden, R. (2021). Antioxidant Character and Levels of Polyphenols in Several Tea Samples. ACS Omega, 6(15), 9982-9988. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05818>

diferentes concentraciones. Así mismo nuestro fármaco de referencia (Acarbosa) y el ácido gálico se diluyeron a la misma concentración.

El extracto metanólico muestra tener una buena actividad inhibidora (Figura 28) con un IC_{50} de 0.05635 (Tabla 22).

Tabla 22. Concentración vs % Inhibición de la enzima α -glucosidasa e IC_{50} del extracto metanólico de raíz de *A. infesta*.

<i>Extracto metanólico</i>		
<i>Concentración (mg/mL)</i>	<i>Inhibición (%)</i>	<i>IC₅₀ (mg/mL)</i>
1.15	98.55	0.05635
0.115	78.84	
0.0575	53.27	
0.0285	19.73	
0.01425	2.01	

% de inhibición del Extracto metanólico

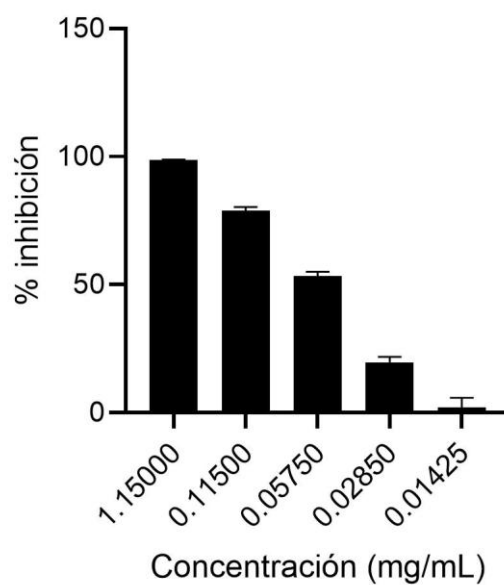


Figura 28. Inhibición de la enzima α -glucosidasa del extracto metanólico de raíz de *A. infesta*.

La partición de AcOEt muestra tener gran actividad inhibidora, incluso en menores concentraciones (Figura 29) con un IC_{50} de 0.01001 (Tabla 23).

Tabla 23. Concentración vs % Inhibición de la enzima α -glucosidasa e IC_{50} de la partición de AcOEt de raíz de *A. infesta*.

Partición de AcOEt		
Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	IC_{50} (mg/mL)
1.15	99.29	0.01001
0.115	96.40	
0.0575	93.13	
0.0115	66.96	
0.00575	5.50	
0.00285	2.09	
0.001425	2.22	

% de inhibición de la fracción de AcOEt

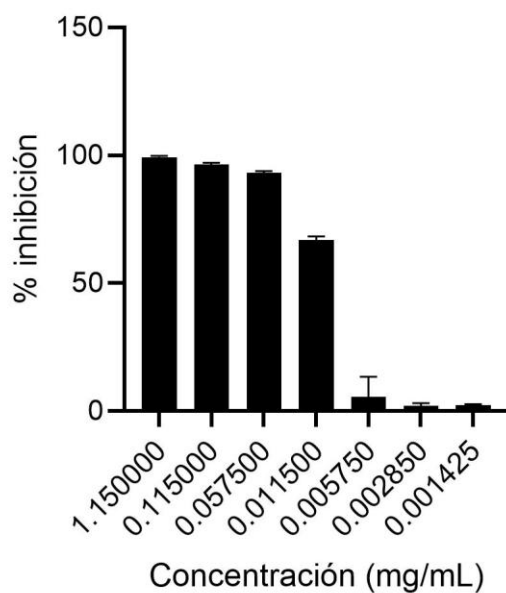


Figura 29. Inhibición de la enzima α -glucosidasa de la fracción de AcOEt de raíz de *A. infesta*.

La partición de *n*-BuOH muestra tener una buena actividad inhibidora (Figura 30) con un IC₅₀ de 0.1440 (Tabla 24). Sin embargo, no es mejor que la partición de AcOEt y la fracción metanólica.

Tabla 24. Concentración vs % Inhibición de la enzima α -glucosidasa e IC₅₀ de la partición de *n*-BuOH de raíz de *A. infesta*.

Partición de <i>n</i> -BuOH		
Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
1.15	89.22	0.1440
0.115	46.25	
0.0115	24.12	

% de inhibición de la fracción de *n*-BuOH

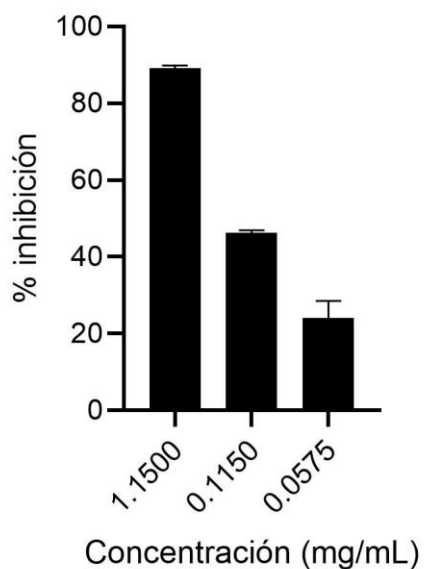


Figura 30. Inhibición de la enzima α -glucosidasa de la fracción de *n*-BuOH de raíz de *A. infesta*.

Dados los resultados obtenidos se puede notar que la fracción de AcOEt y el extracto metanólico son los que presentan mayor porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa, esto se debe a la presencia de flavonoides y triterpenos, los cuales se encuentran principalmente en polaridades medias como es el caso del AcOEt o en el extracto metanólico ya que ahí se encuentran las moléculas de menor polaridad hasta las de mayor polaridad, incluyendo todas aquellas moléculas con actividades biológicas.

La acarbosa obtuvo una buena actividad sólo a concentraciones altas (Figura 31), obteniendo un IC_{50} de 8.061 (Tabla 25).

Tabla 25. Concentración vs % Inhibición de la enzima α -glucosidasa e IC_{50} de la acarbosa.

Solución acarbosa		
Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	IC_{50} (mg/mL)
20	71.65	8.061
2	18.62	
0.2	7.44	

% de inhibición de la acarbosa

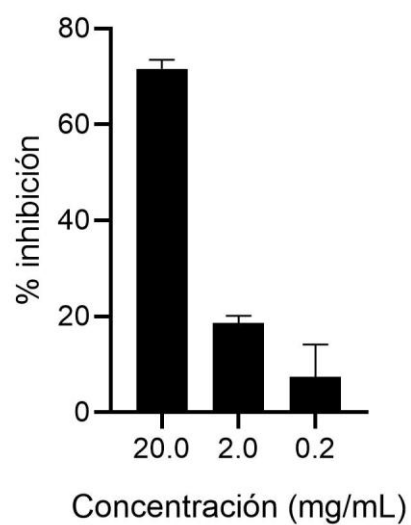


Figura 31. Inhibición de la enzima α -glucosidasa de la acarbosa.

El ácido gálico no mostró actividad inhibidora que compita con las otras muestras (Figura 32), lo cual ni a concentraciones altas se pudo obtener un rango de inhibición suficiente para determinar el IC_{50} (Tabla 26).

Tabla 26. Concentración vs % Inhibición de la enzima α -glucosidasa del ácido gálico.

Solución de ácido gálico

Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)
20	37.24
2	28.55
0.2	22.96
0.02	22.55
0.002	19.44

% de inhibición del ácido gálico

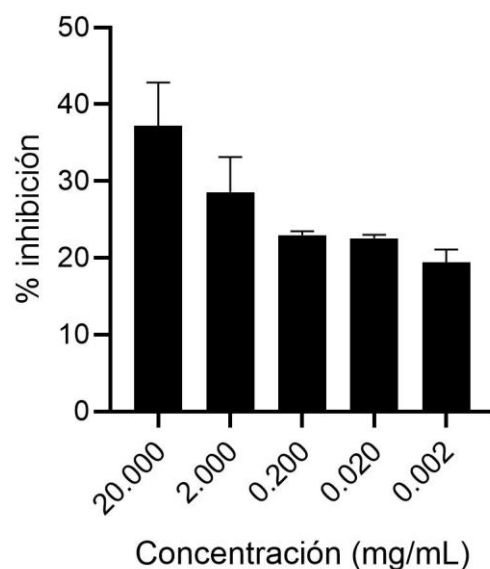


Figura 32. Inhibición de la enzima α -glucosidasa del ácido gálico.

El fármaco acarbosa resultó tener mejor porcentaje de inhibición respecto al ácido gálico, sin embargo, en comparación con el extracto y las fracciones de AcOEt y *n*-BuOH podemos observar que la fracción de AcOEt tiene un IC₅₀ de 0.01001 mg/mL

y la acarbosa un IC₅₀ de 8.061 mg/mL, lo cual evidencia la mayor capacidad de *A. infesta* para inhibir la enzima α -glucosidasa.

8. Conclusiones

- Se logró aislar e identificar un flavonoide de tipo epigallocatequina en la fracción de AcOEt de la parte de raíz de la especie *A. infesta*.
- Se consiguió aislar e identificar de manera parcial la mezcla de triterpenos; ácido ursólico y ácido oleanólico en la fracción de AcOEt de la parte aérea de la especie *A. infesta*.
- Se realizó el ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa del extracto metanólico, la fracción de AcOEt y *n*-Butanol de la parte de raíz de la especie *A. infesta*. Se calculó la IC₅₀ de los resultados experimentales del extracto y de las referencias y se compararon, los cuales presentaron resultados superiores a la del medicamento acarbosa y a la del polifenol ácido gálico.
- Se realizaron los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP del extracto metanólico, la fracción de AcOEt y *n*-Butanol de la parte de raíz de la especie *A. infesta*, para comprobar su efecto antioxidante. Los resultados mostraron que tanto el extracto como las particiones de AcOEt y *n*-BuOH tuvieron mayor efecto que los estándares Trolox y vitamina C.
- Se comprobó mediante búsquedas bibliográficas que el flavonoide de tipo epigallocatequina es el principal responsable de la actividad antioxidante e inhibidora de la enzima α -glucosidasa.
- Se utilizó la técnica espectroscópica de RMN de ¹H y ¹³C en 1D y 2D para la identificación y elucidación de los compuestos aislados.

- Los resultados de este trabajo, composición química y evaluación de las propiedades antioxidantes e inhibición de la enzima alfa-glucosidasa de la especie *Adolphia infesta*, contribuyen a validar su uso tradicional para el tratamiento de la diabetes.

9. Anexos

9.1. Espectro de RMN COSY de la epigalocatequina adquirida a 400 MHz en acetona- d_6 .

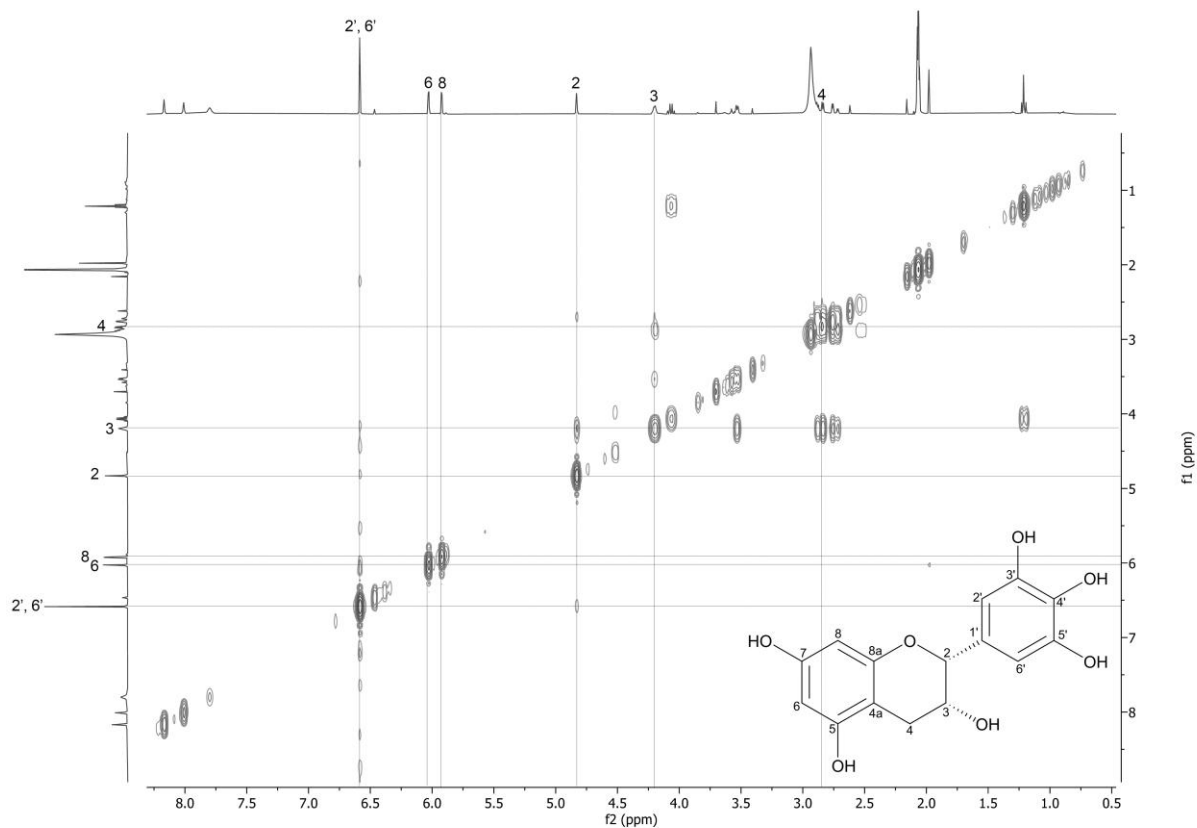


Figura 33. Espectro de RMN COSY de la epigalocatequina adquirida a 400 MHz en acetona- d_6 .

9.2. Espectro de RMN HMBC de la epigallocatequina adquirida a 400 MHz en acetona-d₆.

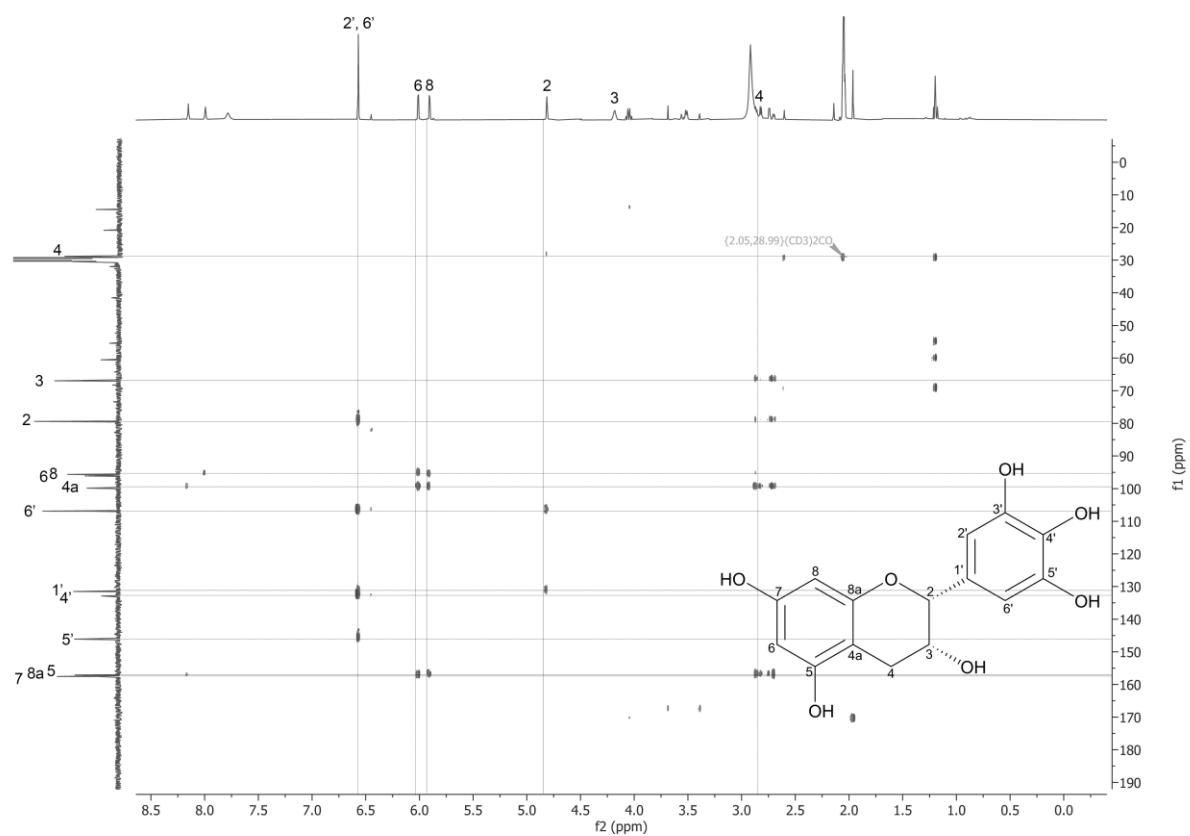


Figura 34. Espectro de RMN HMBC de la epigallocatequina adquirida a 400 MHz en acetona-d₆.

9.3. Desplazamientos de las señales de ^1H y ^{13}C de la epigallocatequina (a 400 MHz en acetona- d_6)

Epigallocatequina

Polvo anaranjado (4 mg). R_f. 0.67. Sobre gel de sílice en TLC, desarrollada con AcOEt/MeOH (8:2 v/v). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -47.7 (c 0.24, ETOH). ^{13}C -NMR (400 MHz, acetona- d_6) δ 28.81 (C4), 66.97 (C3), 79.41 (C2), 95.64 (C8), 6.1 (C6), 99.85 (C4a), 106.89 (C2', C6'), 131.52 (C1'), 132.88 (C4'), 146.1 (C3', C5'), 157.45 (C5), 157.55 (C7), 157.09 (C8a). ^1H -NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 6.57 (2H, s, H-2', H-6'), 6.01 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-8), 5.91 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-6), 4.81 (1H, s, H-2), 4.18 (1H, t, $J=4.5$, 4.5 Hz, H-3), 2.84 (1H, dd, $J=16.4$, 4.5 Hz, H-4), 2.72 (1H, dd, $J=16.5$, 3.5 Hz, H-4).

9.4. Espectro de RMN de ^1H de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico adquirido a 400 MHz en CDCl_3 .

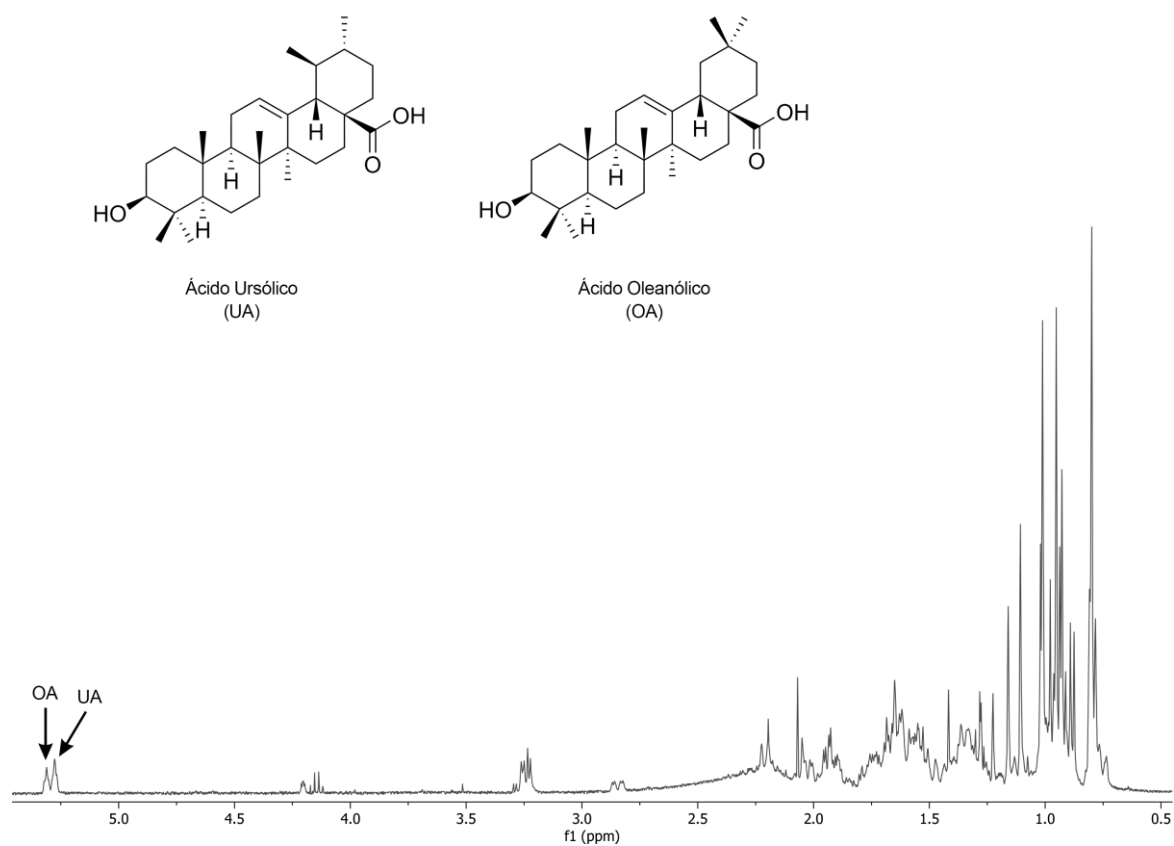


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico adquirido a 400 MHz en CDCl_3 .

9.5. Espectro de RMN HSQC del ácido ursólico adquirido a 400 MHz en CDCl_3 .

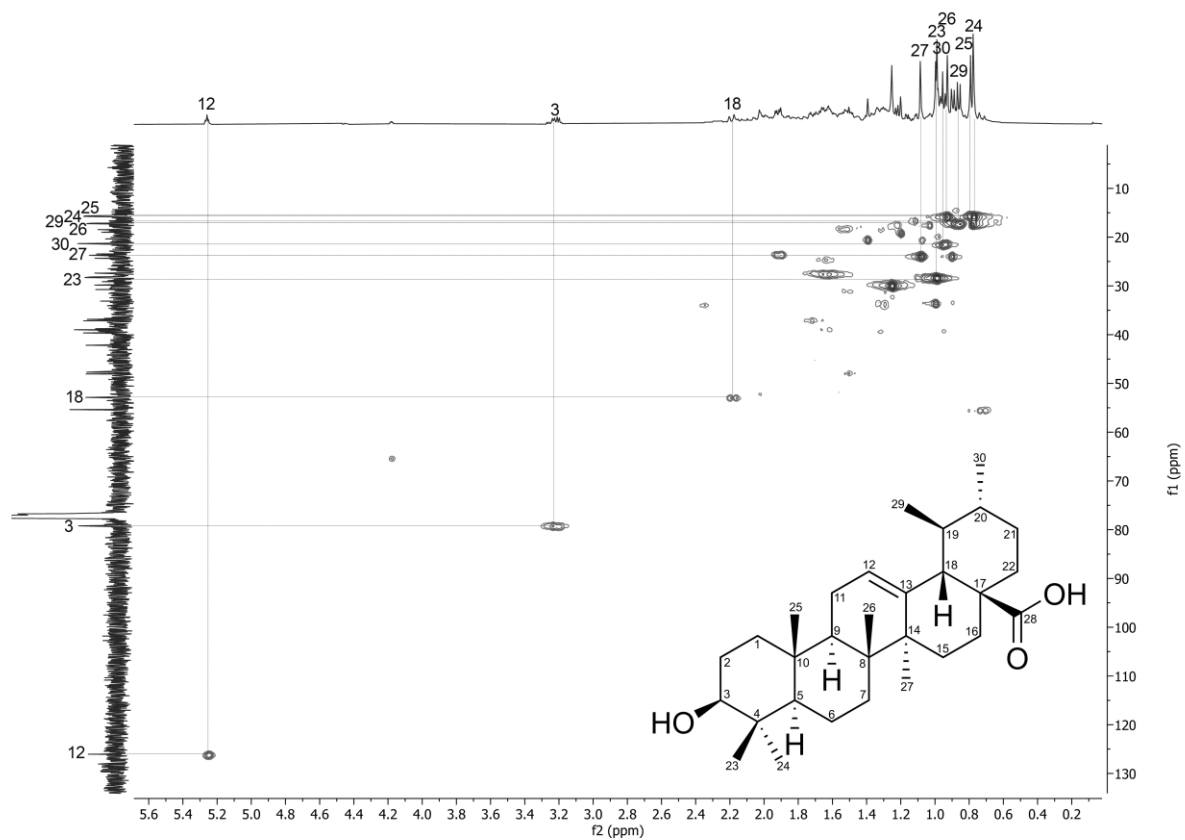


Figura 36. Espectro de RMN HSQC del ácido ursólico adquirido a 400 MHz en CDCl_3 .

9.6. Espectro de RMN HMBC del ácido ursólico adquirido a 400 MHz en CDCl_3 .

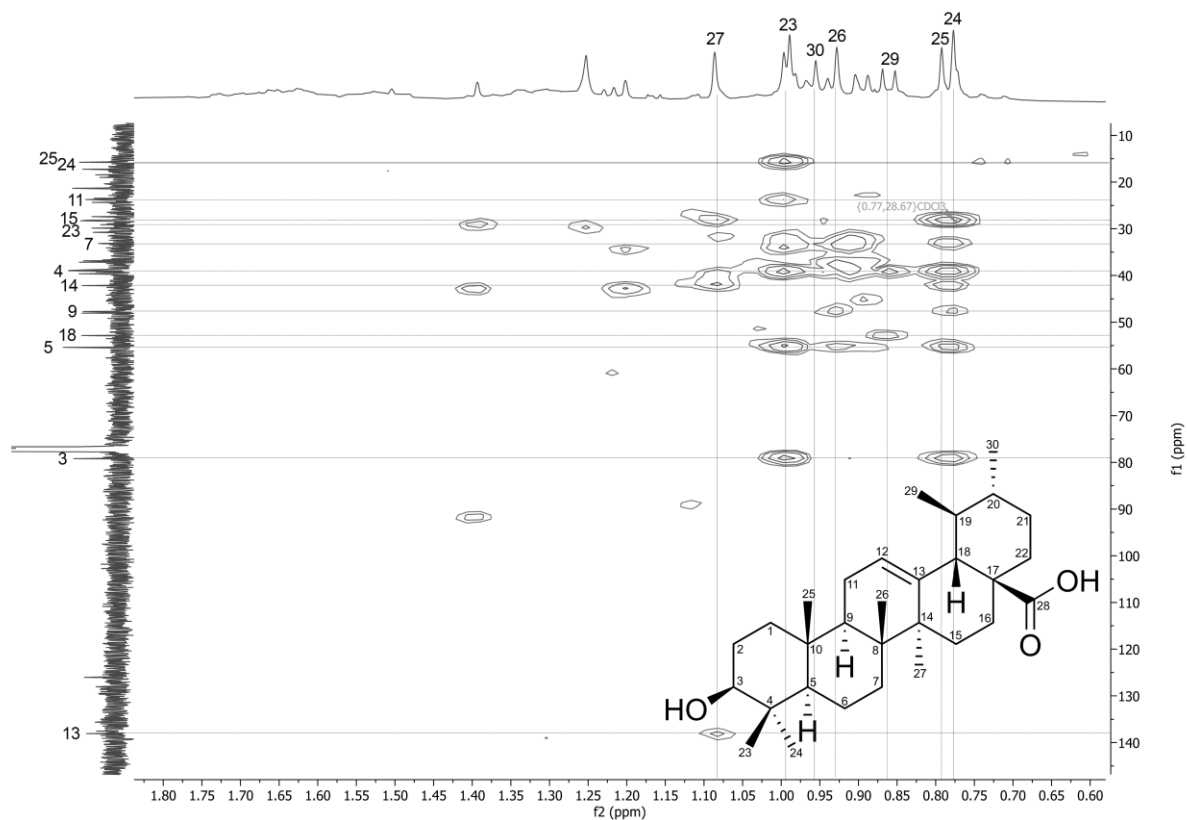


Figura 37. Espectro de RMN HMBC del ácido ursólico adquirido a 400 MHz en CDCl_3 .

9.7. Espectro de RMN COSY del ácido ursólico adquirido a 400 MHz en CDCl₃.

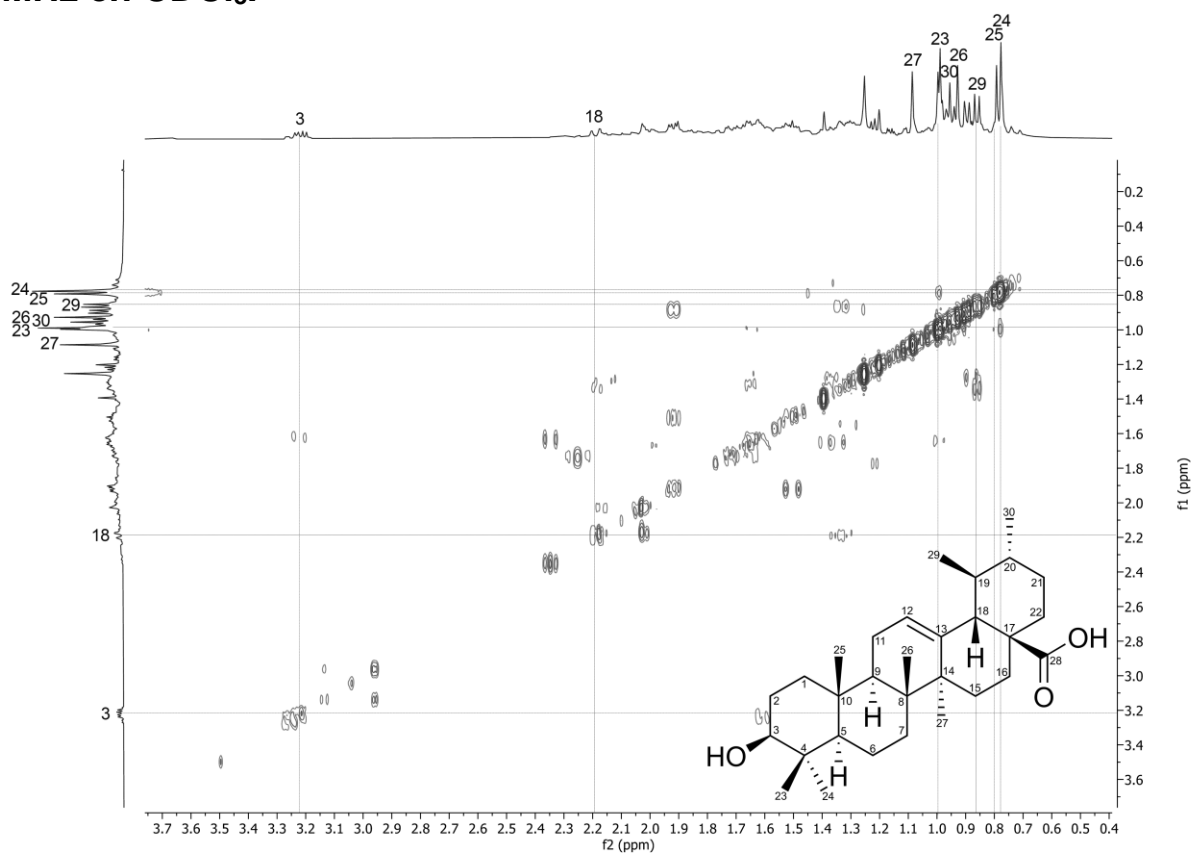


Figura 38. Espectro de RMN COSY del ácido ursólico adquirido a 400 MHz en CDCl₃.

9.8. Desplazamientos de las señales de ^1H y ^{13}C del ácido ursólico (a 400 MHz en CDCl_3)

Ácido ursólico

Polvo blanco (4 mg). Rf. 0.34. Sobre gel de sílice en TLC, desarrollada con Hex/AcOEt (7:3 v/v) ^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 38.7 (C1), 28.3 (C2), 79.2 (C3), 39 (C4), 55.4 (C5), 18.4 (C6), 33.1 (C7), 39.4 (C8), 47.7 (C9), 36.6 (C10), 23.4 (C11), 126 (C12), 138 (C13), 42.1 (C14), 28.16 (C15), 24.4 (C16), 48.1 (C17), 52.9 (C18), 39.2 (C19), 38.9 (C20), 30.7 (C21), 36.8 (C22), 29.1 (C23), 15.7 (C24), 15.6 (C25), 17.1 (C26), 23.7 (C27), 179.4 (C28), 17.2 (C29), 21.3 (C30). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.22 (1H, *dd*, $J=11.1$, 5.0 Hz, H-3), 5.26 (1H, *t*, $J=3.6$ Hz, H-12), 2.19 (1H, *d*, $J=11.2$ Hz, H-18), 1.00 (1H, *s*, H-23), 0.77 (1H, *s*, H-24), 0.8 (1H, *s*, H-25), 0.93 (1H, *s*, H-26), 1.09 (1H, *s*, H-27), 0.86 (1H, *d*, $J=6.4$ Hz, H-29), 0.95 (1H, *d*, $J=6.2$ Hz, H-30).