



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
LICENCIATURA EN QUÍMICA

TESIS

ESTUDIO DE LA ESPECIE GLANDULARIA
TEUCRIIFOLIA, ELUCIDACIÓN DE SUS
METABOLITOS SECUNDARIOS Y SU
EVALUACIÓN BIOLÓGICA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTA

Gabriela Michelle Olvera Jiménez

DIRECTORA

Dra. Reyna Zeferino Díaz

CODIRECTOR

Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

Pachuca de Soto, Hgo., 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 21 de noviembre de 2025

Número de control: ICBI-D/2986/2025

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 a la egresada de la Licenciatura en Química **Gabriela Michelle Olvera Jiménez**, quien presenta el trabajo de titulación "**Estudio de la especie *Glandularia teucriifolia*, elucidación de sus metabolitos secundarios 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 del 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
dirección_icbi@uah.edu.mx, vergarar@uah.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



2025



uah.edu.mx

Dedicatoria

Dedico esta tesis a la memoria de mi padre Gabriel Olvera López, quien siempre será una gran inspiración y orgullo para mí. Y a mi madre Juana Jiménez Dávila, quien con su amor y apoyo me sigue impulsando a superar cualquier obstáculo.

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a Dios por darme la fuerza y el entendimiento en cada etapa de mi vida.

Agradezco a mi asesora de tesis, la Dra. Reyna Zeferino Díaz, por su orientación, su compromiso y la paciencia que tuvo conmigo, no tengo palabras para agradecerle todo el apoyo que me brindó.

Al Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia, le agradezco por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto en su laboratorio, y por su valiosa contribución en el proceso y elaboración del mismo.

De igual manera, agradezco a la Dra. Raquel Cariño Cortés por los conocimientos que me compartió en las ramas de biología y medicina.

Gracias al comité evaluador por su apoyo y sus aportaciones.

Gracias a mis padres por confiar en mí, por alentarme a no rendirme y sobre todo gracias por su apoyo constante en mi vida.

Agradezco a mis hermanos Angie, May, Jesús y Bely, por alegrar mis días con sus ocurrencias, por escucharme y por su firme e incondicional apoyo, todos son un gran ejemplo de vida a seguir.

Gracias a toda mi familia por sus consejos y su constante soporte a lo largo de mi vida. Sin su ayuda, la culminación de esta etapa no habría sido posible.

A Mau, tu apoyo constante durante esta etapa ha sido fundamental para alcanzar mis objetivos, tu compañía y amor han sido un pilar en mi vida.

A mis grandes amigos Oliver Espinoza, Ángel Trinidad, Brandon Gutiérrez y Patricia Damián gracias por su apoyo tanto académico como personal. Su amistad ha sido un gran aporte que ha traído tranquilidad y felicidad a mi vida.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, su apoyo constante y su gran sentido del humor hicieron más agradable mi estancia en el laboratorio.

Abreviaturas y acrónimos

ABTS• ⁺	Ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin)-6-sulfónico
CC	Cromatografía en Columna
DEPT	Mejora sin distorsión mediante transferencia de polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
DM	Diabetes Mellitus
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DMID	Diabetes Mellitus Insulino Dependiente
DMNID	Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
FRAP	Poder antioxidante reductor férrico
<i>G. teucriifolia</i>	<i>Glandularia teucriifolia</i> (M.Martens & Galeotti) Umber
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria Media 50
<i>p</i> -NPG	<i>p</i> -nitrofenol- α -D-glucopiranósido
ppm	Partes por millón
R _f	Factor de retardo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TLC	Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography)
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5,-triazina

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES	3
2.1. Diabetes	3
2.2. Tipos de diabetes	3
2.3. Proceso de digestión de Carbohidratos	4
2.4. Inhibidores de α -glucosidasa	9
2.5. Oxidación	11
2.6. Determinación de capacidad antioxidant	12
2.6.1. Capacidad antioxidant del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH \cdot)	13
2.6.2 Capacidad Antioxidante del catión radical ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS \cdot^+)	14
2.6.3. Capacidad Antioxidante del poder antioxidant reductor de iones férricos (FRAP)	14
3. ANTECEDENTES	16
3.1 Familia Verbenaceae y su estudio etnobotánico	16
3.3 Estudio biológico de especies de la familia Verbenaceae	17
3.2 <i>Glandularia teucriifolia</i> (M. Martens & Galeotti) Umber	17
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVOS	21
4.1. Objetivo general	21
4.2. Objetivos específicos	21
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	22
5.1. Procedimientos generales	22

5.2. Colecta de especie y obtención de extractos	22
5.2.1. Obtención de extracto metanólico	22
5.2.2. Obtención de particiones de AcOEt y <i>n</i> -BuOH	23
5.3. Separación cromatográfica de extractos.....	23
5.4. Aislamiento de metabolitos secundarios	23
5.4.1 Obtención de la mezcla de ácido oleanólico y ácido ursólico	23
5.4.2. Obtención del ácido ursólico.....	24
5.4.3. Obtención de clorofila.....	25
5.4.4. Obtención del compuesto verbascósido	26
5.5. Estudio biológico	27
5.5.1. Actividad de inhibición frente a α -glucosidasa	27
5.5.2. Actividad antioxidante.....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1. Compuestos obtenidos de <i>G. teucriifolia</i>	35
6.1.1 Elucidación estructural de la mezcla de triterpenos	35
6.1.2. Elucidación estructural del ácido ursólico	38
6.1.3. Elucidación estructural de la clorofila a.....	40
6.1.4. Elucidación estructural del verbascósido	43
6.2. Estudio Biológico	46
6.2.1. Actividad de inhibición de la enzima α -glucosidasa	46
6.2.2. Determinación de la Capacidad Antioxidante	50
7. CONCLUSIONES	59
8. ANEXOS.....	60

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que afecta a miles de personas en el mundo; ocurre cuando el páncreas no produce insulina suficiente para mantener los niveles normales de glucosa en la sangre, lo cual provoca un mal funcionamiento en diferentes partes del cuerpo como riñones, corazón, ojos, pies, sistema nervioso, entre otros. Por esta razón, se buscan constantemente alternativas para el tratamiento de esta enfermedad.¹

A lo largo del tiempo, se han utilizado productos naturales como medicina alternativa para tratar enfermedades crónicas, particularmente en lugares aislados en donde el acceso a fármacos es limitado.²

Las plantas son organismos que poseen dos procesos metabólicos, el metabolismo primario y el metabolismo secundario. Los metabolitos primarios, también llamados centrales, intervienen directamente en el crecimiento, desarrollo fisiológico y reproducción de una planta, tales como: polisacáridos, alcoholes, aminoácidos, entre otros.³ Estos metabolitos están estrechamente relacionados con los metabolitos secundarios ya que los primarios desarrollan rutas para la síntesis de los segundos.

Los metabolitos secundarios también conocidos como productos naturales, no tienen una función directa en los procesos metabólicos primarios, pero son importantes para la interacción con el entorno, como mecanismos de defensa, producción de pigmentos, etc. Los metabolitos secundarios se clasifican en varias clases de acuerdo con su estructura química: fenólicos, alcaloides, saponinas,

¹ Cuenca-Villalobos, L.P., Uriarte-Sandoval, M.A., Rodríguez-Díaz, J.L., & Bitanga, M.P. (2020). Uso de la medicina no convencional por pacientes diabéticos. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 24(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552020000100008&lng=es&tLng=es

² Tello-Ortega, K. E., Hernández-Santiago, E., & Rodríguez-Ortíz, G. (2020). Medicina alternativa complementaria en el tratamiento de enfermedades crónicas en el sur de Oaxaca, México. *CIENCIA Ergo Sum*, 27(2), 1-10. <https://doi.org/10.30878/ces.v27n2a8>

³ Elshafie, H. S., Camele, I., & Mohamed, A. A. (2023). A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3266. <https://doi.org/10.3390/ijms24043266>

terpenos, lípidos y carbohidratos. Además, se consideran relevantes por sus múltiples usos clínicos debido a su actividad biológica.^{3,4}

Existen estudios que comprueban que especies de la familia Verbenaceae tienen metabolitos secundarios con un potencial terapéutico significativo en tratamiento de diferentes enfermedades entre ellas la DM.⁵ Por lo que se cree que *Glandularia teucriifolia*, planta perteneciente a esta familia, podría tener metabolitos secundarios similares.

Uno de los estudios más utilizados para evaluar el efecto hipoglucemiante de una planta es el análisis de la actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa, esta enzima es fundamental en la digestión y degradación de carbohidratos, lo que está relacionado directamente con el control de los niveles de glucosa en la sangre y, por lo tanto, con la DM.⁶

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio químico y biológico de la especie *Glandularia teucriifolia*. A partir del extracto metanólico y de las particiones de acetato de etilo (AcOEt) y de *n*-butanol (*n*-BuOH) se aislaron metabolitos secundarios, de los cuales se identificaron, una mezcla de triterpenos, una clorofila y un glicósido. Asimismo, se evaluó la actividad inhibitoria de α -glucosidasa y la actividad antioxidante tanto del extracto como de las particiones.

Este estudio se realizó con la finalidad de contribuir a la búsqueda de productos naturales con potencial terapéutico para el tratamiento de la diabetes mellitus, buscando promover un avance en la ciencia y la medicina.

⁴ Hussein, R. A., & Anssary, A. A. (2019). Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. En M. R. A. F. A. El Shemy (Ed.), *Pharmacognosy – Medicinal Plants* (pp. 1-28). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76139>

⁵ Castro Juárez, C. J., Villa Ruano, N., Ramírez García, S. A., & Ponce Macotela, M. (2014). Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 101-120. <https://www.medicgraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2014/cpm1411.pdf>

⁶ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. (s.f.). *Desarrollo de fármacos antidiabéticos, utilizando las proteínas PTP1B y alfa-glucosidasa como blancos moleculares*. Recuperado el 17 de marzo de 2025 de: <http://biosensor.facmed.unam.mx/index.php/ptp-1b-alpha-glucosidasa/>

2. GENERALIDADES

2.1. Diabetes

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica, se caracteriza por variaciones en la secreción de insulina y un aumento significativo en los niveles de glucosa en la sangre (hiperglucemia). Esto provoca un desajuste tanto en la utilización de hidratos de carbono como en los metabolismos lipídicos y proteicos.⁷ La DM es una enfermedad progresiva que en caso de descontrol origina complicaciones cardiacas, vasculares, ceguera, insuficiencia renal, entre otras.

2.2. Tipos de diabetes

Los 3 tipos principales de diabetes son: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y diabetes mellitus gestacional (DG). Existen otros tipos de DM que son menos comunes, algunos son directamente una subclasificación de los grupos principales y otros pueden ser causados por condiciones médicas específicas.

La DM1 también conocida como diabetes insulinodependiente (DMID) inicia, en la mayoría de los casos, desde la infancia o adolescencia y requiere tratamiento con insulina durante toda la vida. La causa de la DM1 es la destrucción autoinmune de las células productoras de insulina, llamadas células β -pancreáticas.⁸

La DM2, también llamada diabetes mellitus no insulinodependiente (DMNID), es el tipo más frecuente de DM ya que representa entre el 90 y el 95% de los casos. Se presenta comúnmente en personas mayores de 45 años de edad con niveles

⁷ Ríos Hidalgo, N., Ochoa Asse, R., Ríos Rodríguez, J. J., Goti Parada, M. A., Pérez Cárdenas, J. C., Ferrer Rodríguez, M. d. Á., Kessel Bauzá, E., Magáz Cáceres, M. d. J., Guerra Fournier, C., & Valdés Díaz, O. (2016). *Patología general* (pp. 140–147). Plaza de la Revolución, Cuba: Editorial Ciencias Médicas. ISBN 978-959-212-884-2.

⁸ Cervantes-Villagrana, R. D., & Presno-Bernal, J. M. (2013). Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 21(3), 98–106. pp. 98–100. <https://www.medicgraphic.com/pdfs/endoc/er-2013/er133a.pdf>

deficientes de insulina lo que provoca un aumento repentino de la concentración de glucosa en la sangre.⁹

La diabetes mellitus gestacional (DMG), se caracteriza por presentar hiperglucemia durante el periodo de gestación. Esto ocurre debido a que las hormonas de la placenta interfieren con la capacidad de producir insulina.

La DMG tiene complicaciones tanto fetales como maternas. Dentro de las complicaciones fetales se encuentran la macrosomía, hipoglucemia neonatal, policitemia, aumento de la mortalidad perinatal, entre otros. Las complicaciones maternas incluyen preeclampsia, riesgo elevado de desarrollar DM y mayor riesgo de parto por cesárea.¹⁰

La hiperglucemia, también llamada prediabetes es una condición en la que los niveles de glucosa en la sangre son más altos de lo normal pero no lo suficiente como para considerarse diabetes. Esta condición genera que las células del cuerpo no respondan de manera normal, forzando al páncreas a producir más insulina.¹¹

2.3. Proceso de digestión de Carbohidratos

Los carbohidratos son macronutrientes que almacenan energía, para que el cuerpo pueda absorberlos y metabolizarlos, es necesario que sean digeridos en monosacáridos. En el cuerpo, la digestión de los polisacáridos como el almidón consta de dos pasos, el primer paso inicia en la boca por medio de la enzima α -amilasa salival, el segundo paso continúa en la segunda porción del duodeno en donde los jugos pancreáticos liberan la enzima α -amilasa pancreática, la cual, transforma los polímeros originales en oligosacáridos.¹²

⁹ Mediavilla Bravo, J. J. (2002). La diabetes mellitus tipo 2. *Medicina Integral*, 39(1), 25–35. Recuperado el 3 de marzo de 2025 de <http://elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-pdf-13025480>

¹⁰ Kunarathnam, V., Vadakekut, E. S., & Mahdy, H. (2025, 15 de septiembre). *Gestational Diabetes*. En *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Recuperado el 11 de marzo de 2025 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545196/>

¹¹ Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. (s.f.). *Prediabetes*. MedlinePlus. Recuperado el 9 de abril de 2025, de <https://medlineplus.gov/spanish/prediabetes.html>

¹² Waasdorp Hurtado, C. (s. f.). *Carbohydrate Digestion and Absorption*. NASPGHAN. Recuperado el 25 de septiembre de 2024, de https://www.naspghan.org/files/documents/pdfs/training/curriculum-resources/physiology-series/Carbohydrate_digestion_NASPGHAN.pdf

Las enzimas glucosidasas son esenciales en la degradación de carbohidratos a monosacáridos para que el organismo pueda absorberlos mejor. Lo hacen a través de un proceso de hidrólisis, catalizando la ruptura del enlace glucosídico de los carbohidratos y liberando glucosa.¹³

Se ha comprobado que la inhibición de estas enzimas retarda la absorción de glucosa, provocando una disminución de la hiperglucemia postprandial, característica de la DM.

Dentro de las amilasas se encuentra la enzima α -amilasa salival, es un componente de las glándulas salivales que cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -(1,4) de los polisacáridos¹⁴ (Figura 1, 2).

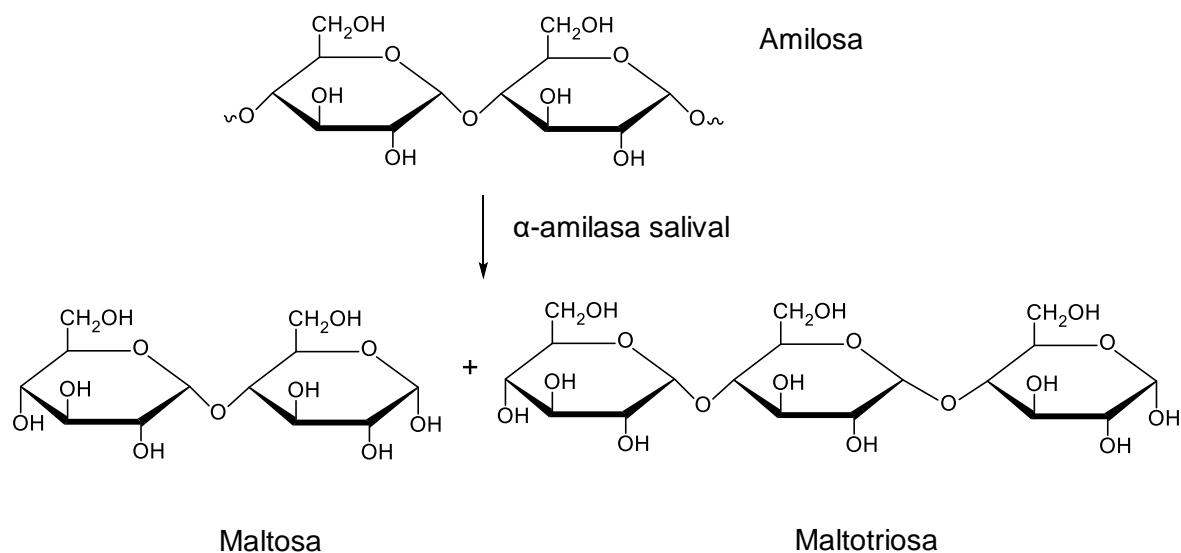


Figura 1. Hidrólisis del polisacárido amilosa catalizado por α -amilasa salival.

¹³ Moorthy, N. S., Ramos, M. J., & Fernandes, P. A. (2012). Studies on α -Glucosidase Inhibitors Development: Magic molecules for the treatment of carbohydrate mediated diseases. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(8), 713 - 720. <https://doi.org/10.2174/138955712801264837>

¹⁴ Universidad Autónoma de Sinaloa, Dirección General de Escuelas Preparatorias, & Academia Estatal de Biología. (2011). Bioquímica (1.^a ed., pp. 69–70). UAS. https://dgep.uas.edu.mx/librosdigitales/5to_SEMESTRE/44_Bioquimica.pdf

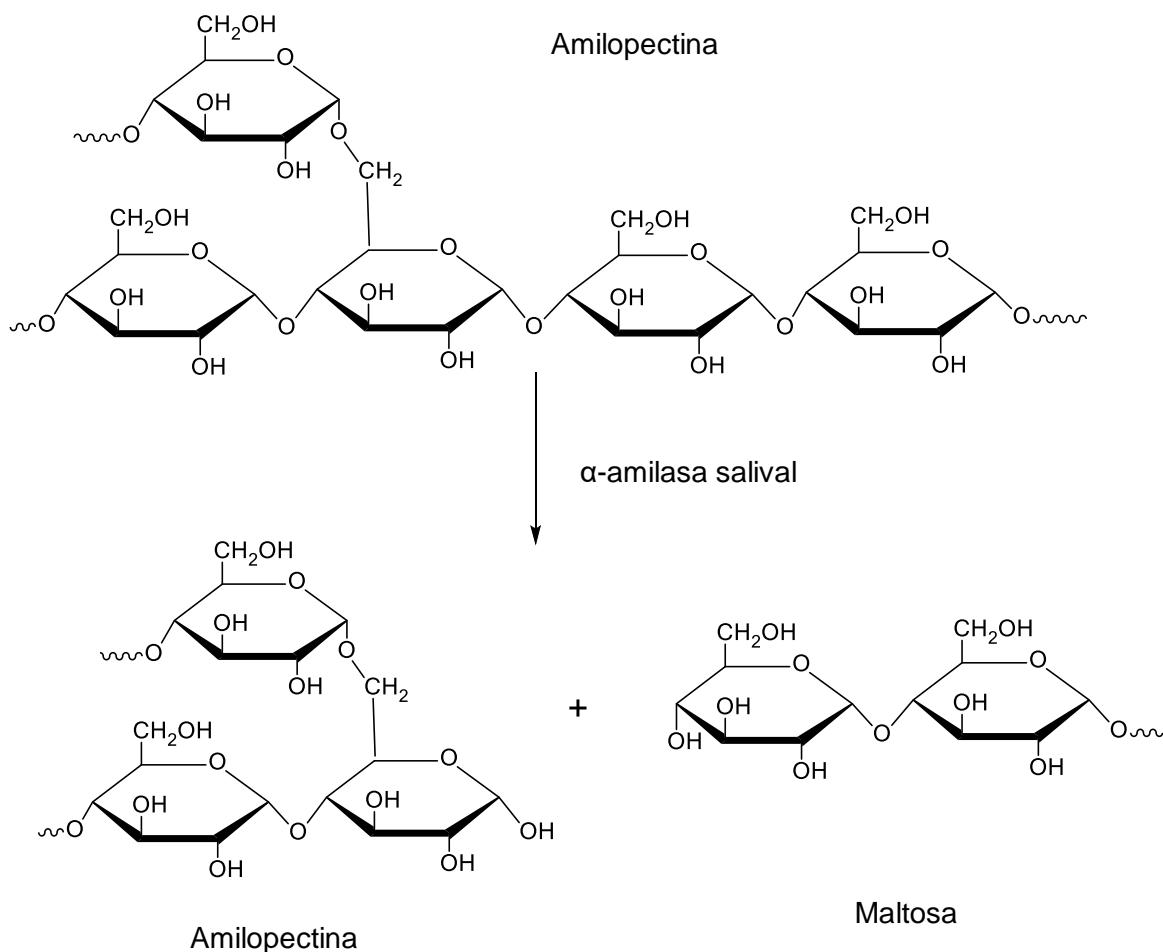


Figura 2. Hidrólisis del polisacárido amilopectina catalizado por α -amilasa salival.

La enzima α -amilasa pancreática, continúa la digestión del almidón en una parte del intestino delgado llamada duodeno. Esta enzima es secretada por el páncreas, cataliza la hidrólisis del almidón en los enlaces glucosídicos α -(1,4) produciendo una mezcla de oligosacáridos, maltosa y maltotriosa¹⁵ (Figura 3).

¹⁵ Brayer, G. D., Luo, Y., & Withers, S. G. (1995). The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science*, 4(9), 1730–1742. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040908>

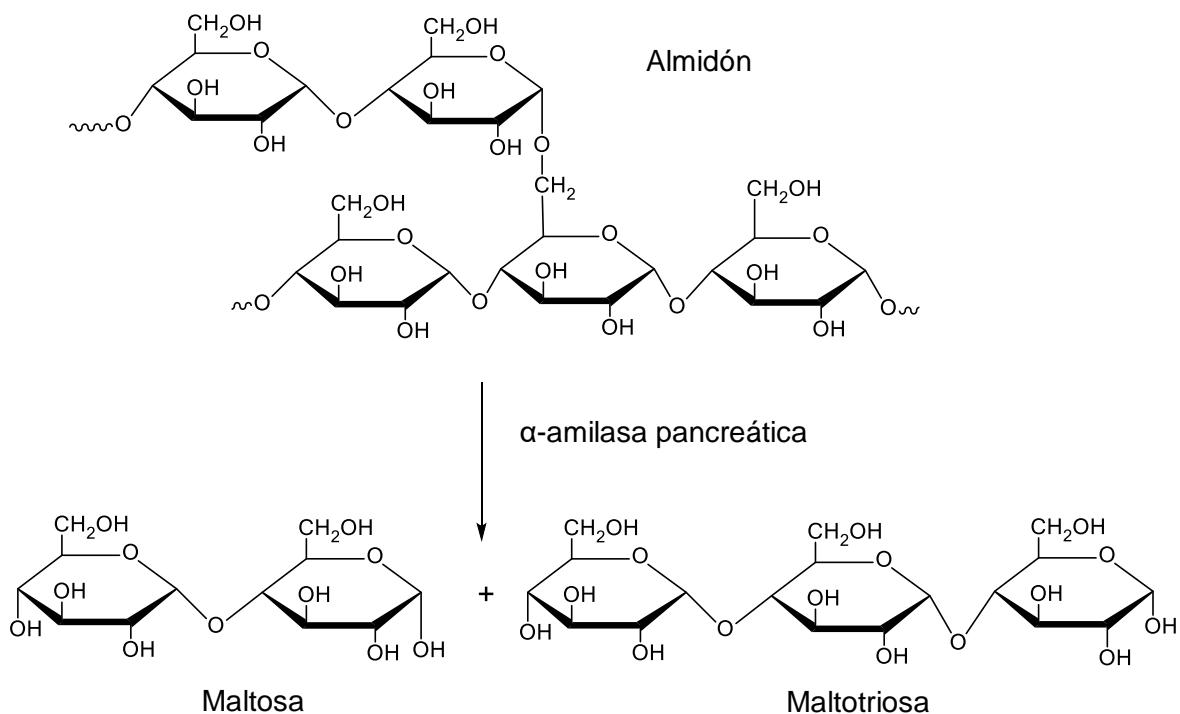


Figura 3. Hidrólisis de los polisacáridos catalizados por α -amilasa pancreática.

La Maltasa es una enzima α -glucosidasa que forma parte importante en el proceso de la descomposición de la maltosa. Esta enzima, cataliza la hidrólisis del disacárido maltosa para formar dos moléculas de glucosa (Figura 4) o de la maltotriosa para formar tres moléculas de glucosa (Figura 5), las cuales pueden ser absorbidas por el organismo.¹⁶

¹⁶ Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2002). Metabolismo de los hidratos de carbono 1: procesos anaerobios. En *Bioquímica* (3a ed., p. 529). Pearson Educación.

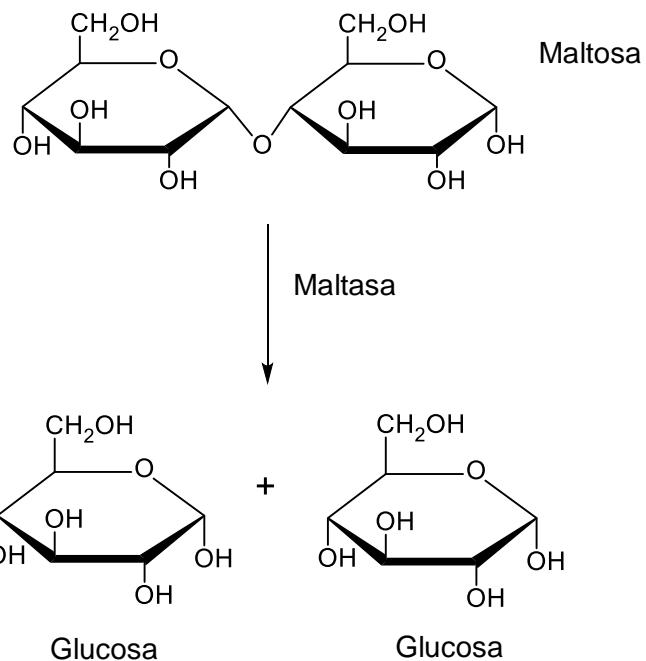


Figura 4. Hidrólisis de la maltosa, formando dos moléculas de glucosa.

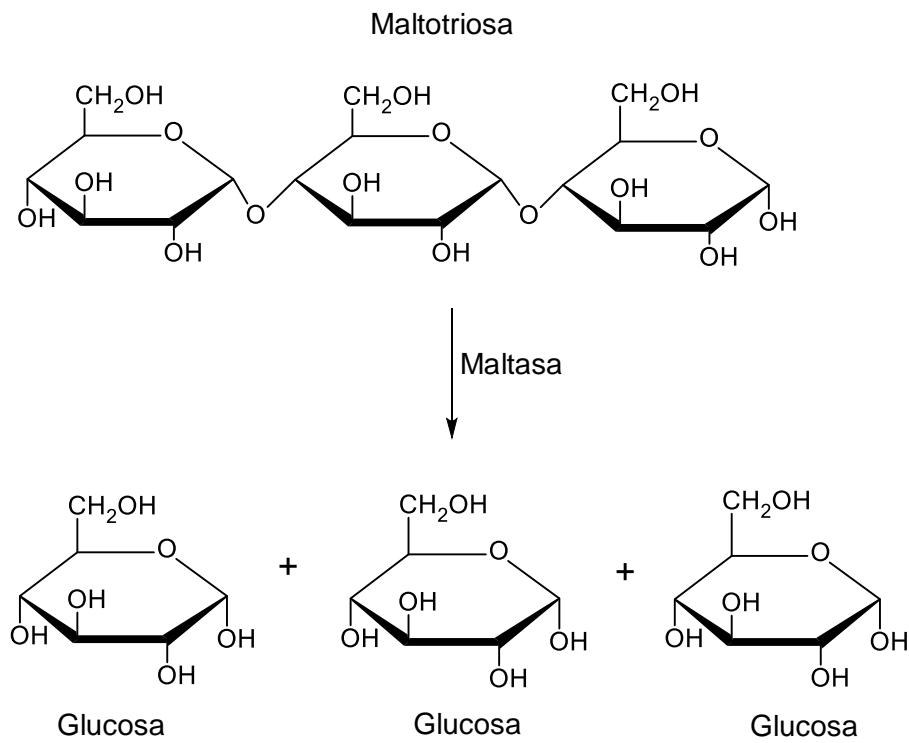


Figura 5. Hidrólisis de la maltotriosa para formar tres moléculas de glucosa.

La sacarasa es una enzima que hidroliza la sacarosa, rompiendo el enlace α -(1,2) entre la fructosa y la glucosa (Figura 6), permitiendo su absorción.¹⁷

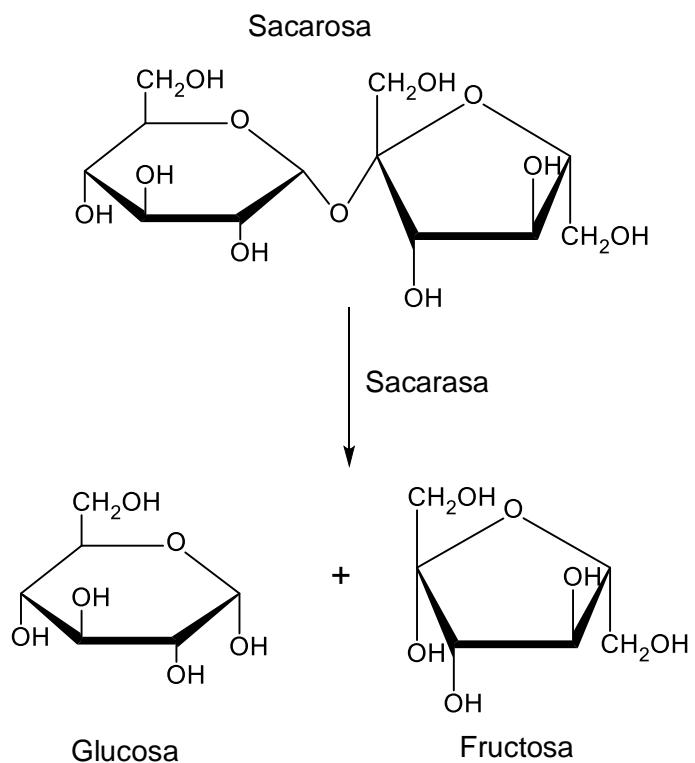


Figura 6. Hidrólisis de la sacarosa por medio de la sacarasa para formar glucosa y fructosa.

2.4. Inhibidores de α -glucosidasa

Los inhibidores de α -glucosidasa (IAG) son medicamentos antihiperglucémicos utilizados en el control del nivel de glucosa en pacientes con DM2.

La función de estos inhibidores es retrasar temporalmente la absorción de los carbohidratos, modulando así la hiperglucemia posprandial; es decir, los niveles de glucosa en sangre aumentan más lentamente después de las comidas.

¹⁷ Lozano Teruel J. A., Galindo Cascales J. D., García-Borrón Martínez J. C., Martínez-Liarte J. H., Peñafiel García R. & Solano Muñoz F. (2005). Nutrición, absorción y transporte. En *Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud* (3a ed., pp. 178 - 180) McGraw-Hill Interamericana de España.

Actualmente, solo se usan tres inhibidores de α -glucosidasa en el campo clínico acarbosa, miglitol y voglibosa (Figura 7).¹⁸

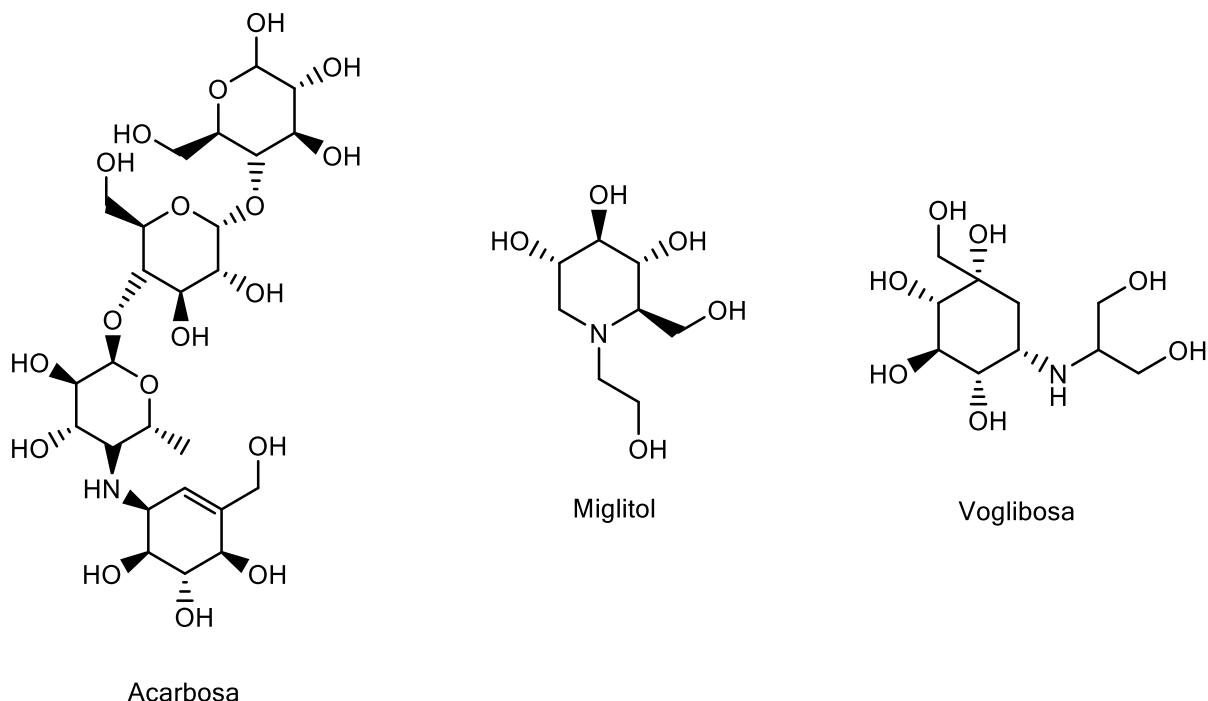


Figura 7. Estructuras de Acarbosa, Miglitol y Voglibosa

Los IAG actúan mediante la inhibición competitiva y reversible de las α -glucosidases intestinales. Disminuyen la absorción de carbohidratos en el intestino delgado, convirtiendo los carbohidratos complejos no absorbibles en carbohidratos simples absorbibles. Estos fármacos son principalmente utilizados en personas con DM2, ya que se ha demostrado una buena tolerancia en estos pacientes. No obstante, a pesar de su importante función, existen efectos adversos gastrointestinales como la diarrea, el dolor abdominal y las flatulencias.¹⁹

¹⁸ Dirir, A. M., Daou, M., Yousef, A. F., & Yousef, L. F. (2022). A review of α -glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes. *Phytochemistry Reviews*, 21(4), 1049-1079. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09773-1>

¹⁹ Hedrington, M. S., & Davis, S. N. (2019). Considerations when using alpha-glucosidase inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, 20(18), 2229-2235. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1672660>

2.5. Oxidación

La oxidación es un proceso químico que se genera cuando una sustancia entra en contacto con una molécula oxidante como el oxígeno, de ahí su nombre. Sin embargo, muchas oxidaciones pueden llevarse a cabo sin la intervención de oxígeno por ejemplo las deshidrogenaciones.²⁰

Siempre que ocurre una oxidación, debe haber una reducción. A esta relación se le conoce como reacción de óxido-reducción (redox), dentro de este proceso se lleva a cabo una transferencia de electrones que produce un cambio en los números de oxidación de los elementos implicados. Los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía a partir de estas reacciones.

En una reacción redox el elemento que se oxida pierde electrones y aumenta su número de oxidación, mientras que el elemento que se reduce, gana electrones y disminuye su número de oxidación. Entre las reacciones químicas redox se encuentran la corrosión, la combustión, la fotosíntesis, entre otras.²¹

El estrés oxidativo (EO) aparece cuando el proceso de oxidación es continuo, provocando un desbalance de los mecanismos responsables de la producción y neutralización de compuestos reactivos que causan un daño molecular oxidativo.²²

Esta variación surge por el aumento en la producción de radicales libres (RL) o de especies reactivas oxidantes oxígeno / nitrógeno (ROS/RNS) y la disminución de la capacidad de defensa antioxidante.²³ El EO provoca un daño celular y un deterioro funcional del organismo producido por los RL, este proceso conduce a la aparición de enfermedades crónico-degenerativas y acelera el proceso de envejecimiento.²⁴

²⁰ Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., & Weil, P. (2007). Oxidación Biológica. En *Harper: bioquímica ilustrada* (29a ed., p. 115). McGraw-Hill eBooks.

²¹ Chang, R., & College, W. (2002). Reacciones de oxidación y reducción. En *Química* (7a ed., pp. 116-117). McGraw-Hill Interamericana.

²² Fernández, J. M., Da Silva-Grigoletto, M. E., & Túñez-Fiñana, I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 2(1), 19-34. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-andaluza-medicina-del-deporte-284-articulo-estres-oxidativo-inducido-por-el-13134195>

²³ Pearson, T., Popescu, B.O., & Cedazo-Mínguez, A. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 427318. <https://doi.org/10.1155/2014/427318>

²⁴ Jang, Y.C., & Van Remmen, H. (2009). The mitochondrial theory of aging: Insight from transgenic and knockout mouse models. *Experimental Gerontology*, 44(4), 256-260. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.12.010>

Los radicales libres (RL) son compuestos que tienen una configuración espacial inestable y en su estructura atómica presentan un electrón desapareado en su último orbital, lo que los convierte en compuestos altamente reactivos. Los RL son capaces de reaccionar con diversas biomoléculas a través de su oxidación.

Dentro de las ROS se encuentran especies como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ión superóxido (O_2^-), el oxígeno singlete (1O_2), el radical hidroxilo (OH^-), radicales alcoxi y peroxy (RO^\bullet y ROO^\bullet), radical hidroperoxilo ($ROOH^\bullet$).

Las RNS incluyen radicales libres como: óxido nítrico (NO^\bullet), Dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet), Peroxinitrito ($ONOO^-$).

También se encuentran RL provenientes de azufre, como el radical tio (RS $^\bullet$) y provenientes del cloro como el ácido hipocloroso (HOCl).²²

La vida media de un RL es de microsegundos, pero en los organismos vivos, tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un daño tanto en el núcleo como en las membranas celulares a moléculas como el ADN, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos. Así mismo, provocan un daño celular y alteran la homeostasis del organismo.²⁵

Los antioxidantes son sustancias que retardan o previenen la oxidación de otras moléculas, neutralizando la acción oxidante de los RL u otras especies reactivas de oxígeno sobre el organismo, mediante la liberación de electrones al medio.²⁶

Actúan reduciendo los procesos oxidativos que dañan a las células, ralentizando el proceso de envejecimiento y previniendo el desarrollo de diversas enfermedades.

2.6. Determinación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante total (CAT) se refiere al potencial que tiene un compuesto para inhibir la oxidación de un sustrato en cantidades que van desde 1 a 1000 mg/L.

²⁵ Goodarzi, S., Rafiei, S., Javadi, M., Khadem Haghigian, H., & Noroozi, S. (2018). A review on antioxidants and their health effects. *Journal of Nutrition and Food Security*, 3(2): 106-112. <http://jnfs.ssu.ac.ir/article-1-158-en.pdf>

²⁶ Vázquez-Ovando, A., Mejía-Reyes, J. D., García-Cabrera, K. E., & Velázquez-Ovalle, G. (2022). Capacidad antioxidante: conceptos, métodos de cuantificación y su aplicación en la caracterización de frutos tropicales y productos derivados. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 9(1), 9-33. <https://doi.org/10.23850/24220582.4023>

Existen múltiples métodos para determinar la capacidad antioxidante, como: métodos competitivos (ensayos ORAC y TRAP), ensayos de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), ensayos de lipoproteínas, entre otros.²⁷

Un análisis complementario son los métodos de actividad hacia radicales libres estables (DPPH[•], ABTS^{•+}) y el método de reducción de iones metálicos (FRAP).

2.6.1. Capacidad antioxidante del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•])

El ensayo DPPH[•] es un método común para evaluar la capacidad antioxidante de un compuesto. El DPPH[•] es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa. Está basado en la capacidad de los antioxidantes para donar electrones y neutralizar el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) (Figura 8).

El DPPH[•] es un radical que presenta un color púrpura, es estable y es adecuado para evaluar compuestos lipofílicos (o poco polares). Durante la reacción, se produce un cambio de color (de púrpura a incoloro o amarillo pálido) que se mide a 517 nm; esta decoloración se utiliza como un indicador de la eficacia antioxidante. Los resultados se pueden comparar utilizando un estándar antioxidante, como trolox, ácido ascórbico u otros compuestos similares.²⁸

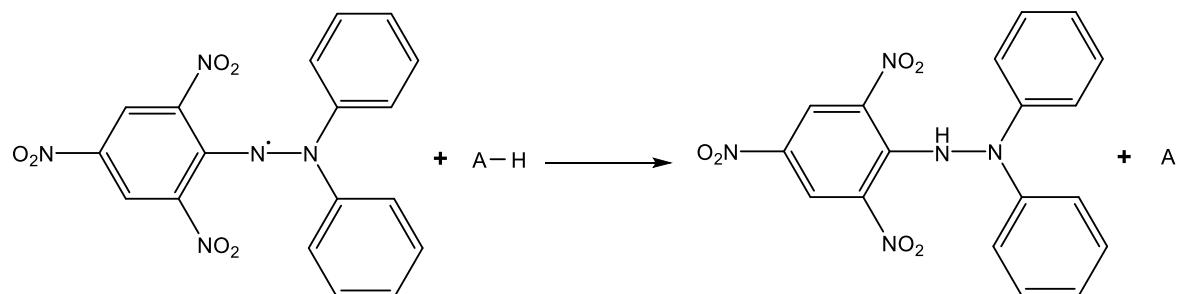


Figura 8. Reacción de la actividad antioxidante con el radical DPPH[•].

²⁷ López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>

²⁸ Musa, K.H., Abdullah, A., Kuswandi, B. & Hidayat, M.A. (2013). A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 141(4): 4102-4106. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.112>

2.6.2 Capacidad Antioxidante del catión radical ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+})

El ensayo ABTS^{•+}, anteriormente conocido como ensayo de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC por sus siglas en inglés), mide la capacidad de los antioxidantes para neutralizar el radical catión ABTS^{•+} (Figura 9). Este radical presenta un color verde con absorción a 754 nm, que en presencia de antioxidantes disminuye su intensidad. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} está determinado en función a la concentración. Este método es favorable para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos.²⁹

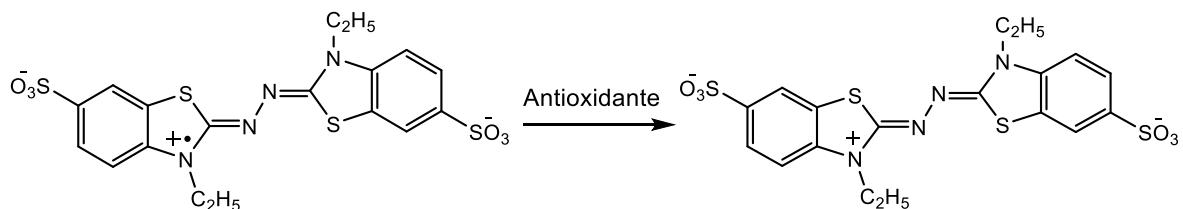


Figura 9 Reacción de la actividad antioxidante con el radical ABTS^{•+}.

2.6.3. Capacidad Antioxidante del poder antioxidante reductor de iones férricos (FRAP)

El ensayo de poder antioxidante reductor del ion férrico (FRAP) es un método basado en la reducción del complejo del ligando de iones férricos (Fe³⁺) al complejo ferroso (Fe²⁺) (Figura 10). Los resultados se expresan como equivalentes micromolares de Fe²⁺ o en relación con un estándar antioxidante.³⁰

Este método se lleva a cabo bajo condiciones ácidas (pH 3.6), la actividad antioxidante se determina al medir el aumento de la absorbancia a 593 nm lo que genera una coloración azul intensa. Tiene afinidad a compuestos hidrofílicos.

²⁹ Aguirre, O., Barreiro, W., & López, F. (2015). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). *Revista de Tecnología*, 14(2). <https://doi.org/10.18270/rt.v14i2.1868>

³⁰ Benzie, I. F., & Devaki, M. (2017). The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for nonenzymatic antioxidant capacity: Concepts, procedures, limitations, and applications. En R. Apak, E. Capanoglu & F. Shahidi (Eds.), *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity* (Cap.5). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch5>

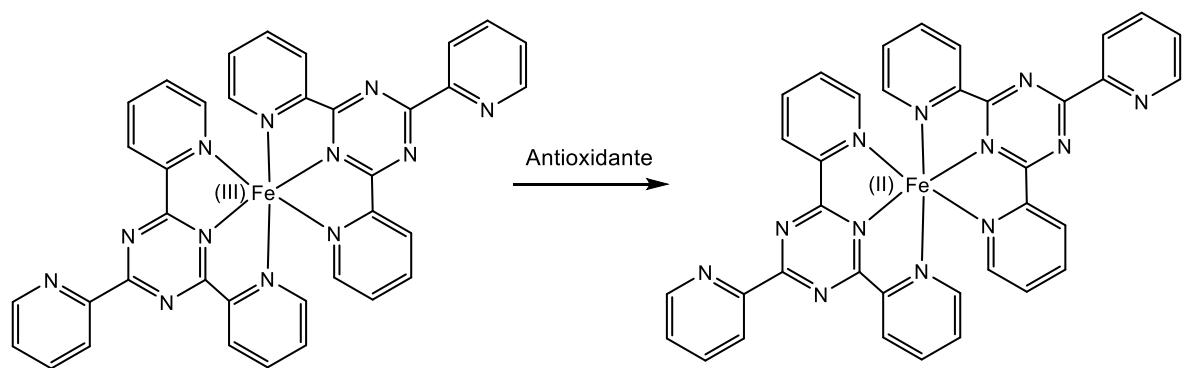


Figura 10 Reacción de reducción del complejo Fe^{3+} -TPTZ.

3. ANTECEDENTES

3.1 Familia Verbenaceae y su estudio etnobotánico

La familia Verbenaceae se compone de cerca de 35 géneros y más de 1000 variedades distribuidas en regiones templadas y cálidas de los dos hemisferios, mayormente en América. En México se han identificado 26 géneros y aproximadamente 286 especies.³¹

Numerosas especies pertenecientes a la familia Verbenaceae han sido empleadas en la medicina tradicional, por lo que han sido siempre de uso común para el tratamiento de diversas dolencias, incluyendo afecciones dermatológicas y lesiones cutáneas (picazón, cortes, úlceras, eccema, varicela, sarna, lepra y como antiséptico para tratar heridas); trastornos respiratorios (asma y bronquitis); síndromes de dolor e inflamación (hinchazones, dolor de estómago, dolor de muelas, dolor de cabeza y reumatismo); y enfermedades sistémicas graves (fiebre biliar, tétanos, malaria y tumores).^{31,32}

Por lo que es necesario su estudio químico y biológico para garantizar la eficacia y estandarizar su uso terapéutico. La especie *Glandularia teucriifolia* pertenece a esta familia por lo que se cree que también podría tener propiedades medicinales.

Además de su empleo como medicina alternativa, algunas especies de esta familia desempeñan un rol significativo en el ámbito culinario. Principalmente se emplean en la elaboración de bebidas, como condimento de comidas y para saborizar infusiones, siendo las hojas la parte de la planta más utilizada para estos fines.³³

³¹ López-Villafranco, M., Aguilar-Contreras, A., Aguilar-Rodríguez, S., & Xolalpa-Molina, S. (2017). Las Verbenaceae empleadas como recurso herbolario en México: una revisión etnobotánica-médica / The Verbenaceae used as an herbal resource in Mexico: an ethnobotanical-medical review. *Polibotánica*, (44). <https://doi.org/10.18387/polibotanica.44.15>

³² Ramírez, J., Armijos, C., Espinosa-Ortega, N., Castillo, L. N., & Vidari, G. (2025). Ethnobotany, Phytochemistry, and Biological Activity of Extracts and Non-Volatile Compounds from *Lantana camara* and Semisynthetic Derivatives-An Updated Review. *Molecules*, 30(4), 851. <https://doi.org/10.3390/molecules30040851>

³³ Moroni, P., Ais, J., & O'Leary, N. (2022). Las Verbenáceas comestibles de América: Una revisión bibliográfica. *Darwiniana, nueva serie*, 10(1), 307–323. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2022.101.1023>

3.3 Estudio biológico de especies de la familia Verbenaceae

Diversos estudios han analizado plantas de la familia Verbenaceae como: *Lantana camara*, *Verbena carolina*, *Lippia origanoides Kunth*, *Aloysia citrodora*, etc.

En conjunto, estas investigaciones evidencian que dichas plantas poseen una amplia variedad de propiedades biológicas como propiedades antiartríticas, antiaspergillus, antibacterianas, anticancerígenas, cardioactivas, antifertilidad, antifiláricas, hepatoprotectoras, antihiperglucémicas, antihiperlipidémicas, antiinflamatorias, insecticidas, antimicrobianas, antimutagénicas, ansiolíticas, nematocidas, antioxidantes, antiproliferativas, antiprotozoarias, antipiréticas, antitrombina, antitumorales, antiulcerogénicas, antiulrolitiasis, antivirales y cicatrizantes.^{32,34,35,36}

Además, investigaciones reportan el aislamiento de metabolitos secundarios como esteroides, terpenoides, saponinas, iridoides, flavonoides y feniletanoides.^{37,38}

El identificar estas moléculas, permite analizar el compuesto específico responsable de la actividad biológica en extractos y a su vez, pueden servir como punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos.

3.2 *Glandularia teucriifolia* (M. Martens & Galeotti) Umber

Glandularia teucriifolia (M. Martens & Galeotti) Umber es una hierba perenne rustrera, se caracteriza por ser muy ramificada, enraizando en los nudos. Sus hojas

³⁴ Babar, V. B., Khapale, P. R., & Nagarale, S. N. (2019). Preliminary investigation and in-vitro anticancer activity of *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(5), 2524–2527.

³⁵ Cardullo, N., Maccaronello, A. E., Melilli, B., Vitiello, L., Scamporrino, A. A., Silva, A. M., Sciacca, C., & Bacler, A. (2024). Recovery of verbascoside from *Lantana camara* pruning waste for development of phytosomes with antioxidant and hypoglycemic properties. *Industrial Crops and Products*, 207, 117765. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117765>

³⁶ Tammar, S., Salem, N., Aidi Wannes, W., Limam, H., Bourgou, S., Fares, N., Dakhlaoui, S., Hammami, M., Khammassi, S., Del Re, G., Hessini, K., & Msada, K. (2021). Chemometric Profiling and Bioactivity of Verbena (*Aloysia citrodora*) Methanolic Extract from Four Localities in Tunisia. *Foods*, 10(12), 2912. <https://doi.org/10.3390/foods10122912>

³⁷ Kubica, P., Wróbel, K., Szymańska, I., Ekiert, H., & Szopa, A. (2020). Production of Verbascoside, Isoverbascoside and Phenolic Acids in Callus, Suspension, and Bioreactor Cultures of *Verbena officinalis* and Biological Properties of Biomass Extracts. *Molecules*, 25(23), 5609. <https://doi.org/10.3390/molecules25235609>

³⁸ Ribeiro, F. P., de Oliveira, M. S., Feitosa, A. d. O., Marinho, P. S. B., Marinho, A. M. d. R., de Aguiar Andrade, E. H., & Ribeiro, A. F. (2018). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the *Lippia origanoides* Kunth Essential Oil from the Carajás National Forest, Brazil. *Journal of Chemistry*, 2018, Article ID 8243673. <https://doi.org/10.1155/2018/8243673>

son opuestas, con forma triangular ovalada dividida. Las flores de *G. teucriifolia* se agrupan en espigas terminales, los pétalos son de color violeta (Figura 11).³⁹

Es una planta nativa de México Central, Golfo de México, Noreste, Sureste, y Suroeste de México⁴⁰ (Figura 12). Es común encontrar esta planta en bosques de encinos y zonas encharcadas. Tiene capacidad de florecer durante todo el año.

Los nombres populares de esta planta son coloradillo, moradilla o moradita. Las personas la utilizan para tratar enfermedades como la bronquitis, afecciones del estómago, daños renales, entre otros.³¹



Figura 11. Especie *G. teucriifolia* colectada en “El Guajolote” Epazoyucan, Hidalgo, México.

³⁹ World Flora Online. (s.f.) Plant List | World Flora Online. Recuperado el 23 de marzo de 2024 de <https://worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000332406>

⁴⁰ World Flora Online (2025): *Verbena teucriifolia* M.Martens & Galeotti. Recuperado el 18 de abril de 2024 de <https://worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000332406#distributionMap>

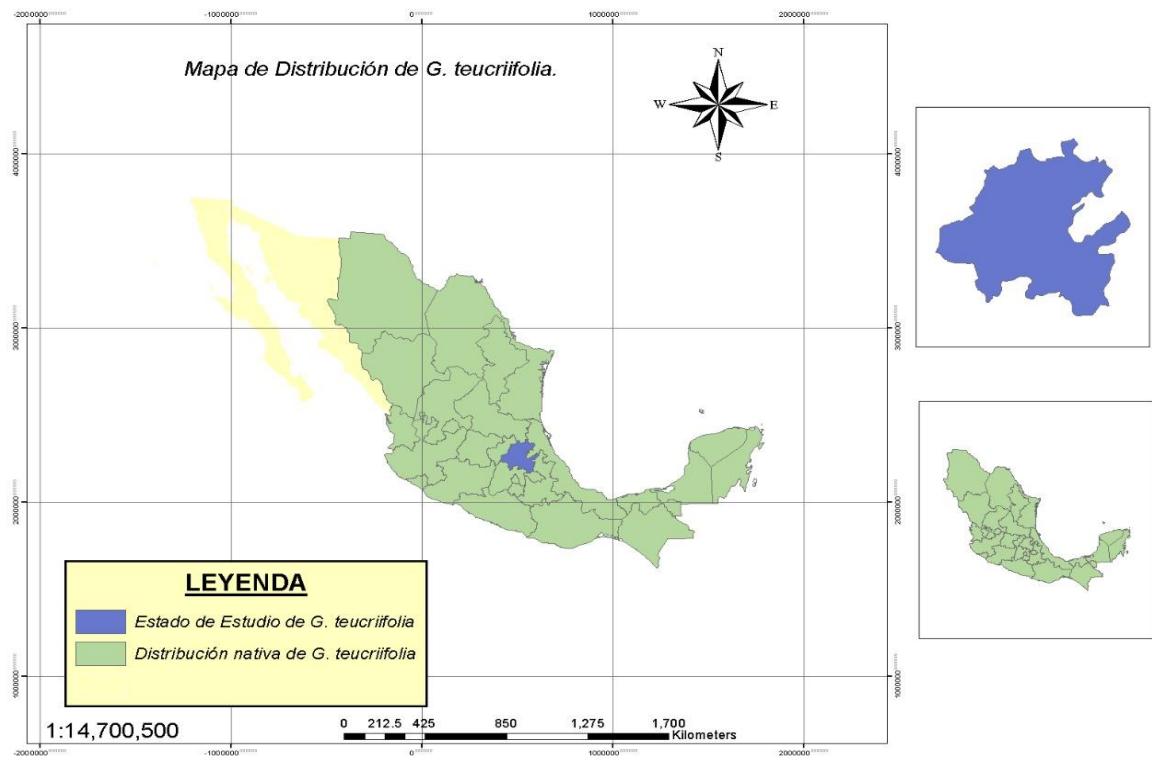


Figura 12. Distribución de la especie *G. teucriifolia* en México.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de plantas medicinales (PM) como medicina alternativa se ha practicado desde la antigüedad, especialmente en lugares donde el acceso a fármacos es limitado. Esto hace importante el estudio de PM para conocer las moléculas a las que se les puede atribuir la posible actividad farmacológica.

Varias especies de la familia Verbenaceae, son empleadas como recurso herbolario en México. Dado que la planta *G. teucriifolia* pertenece a esta familia, se podría suponer que tiene metabolitos secundarios similares que puedan tener actividad biológica relevante. Hasta nuestro conocimiento, esta planta no cuenta con estudios químicos ni biológicos, por lo que en este proyecto se pretende llevar a cabo su estudio fitoquímico y realizar evaluaciones biológicas *in vitro* que nos brinden esta información. El estudio fitoquímico se efectuará mediante métodos cromatográficos y técnicas espectroscópicas, mientras que para la evaluación biológica se usarán pruebas conocidas de inhibición de la enzima α -glucosidasa y de captura de radicales. Estas pruebas podrían representar un indicador de valor medicinal de la especie, particularmente en enfermedades crónicas como la diabetes mellitus.⁴¹

⁴¹ Burgos-Morón, E., Abad-Jiménez, Z., Marañón, A. M., Iannantuoni, F., Escribano-López, I., López-Domènech, S., Salom, C., Jover, A., Mora, V., Roldan, I., Solá, E., Rocha, M., & Víctor, V. M. (2019). Relationship between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1385. <https://doi.org/10.3390/jcm8091385>

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Analizar la composición química, la actividad hipoglucemiente y la actividad antioxidante de la planta *G. teucriifolia* mediante el estudio químico, la inhibición de la enzima α -glucosidasa y ensayos antioxidantes, para contribuir al conocimiento de productos naturales con posible uso para la diabetes y el estrés oxidativo.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener el extracto metanólico de *G. teucriifolia* así como sus particiones de AcOEt y *n*-BuOH para separar los metabolitos de acuerdo a su polaridad.
- Aislar y caracterizar los principales metabolitos secundarios presentes en *G. teucriifolia* mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas para purificar e identificar moléculas con actividad biológica relevante.
- Estudiar la actividad de inhibición de la enzima α -glucosidasa del extracto metanólico y sus particiones, mediante pruebas *in vitro*, para determinar su potencial terapéutico contra la diabetes.
- Evaluar la capacidad de captura de radicales libres del extracto metanólico y las particiones de *G. teucriifolia*, por medio de ensayos espectrofotométricos como DPPH \cdot , ABTS \cdot^+ y FRAP, para conocer su posible uso en el estrés oxidativo.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. Procedimientos generales

El aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios se realizó mediante métodos cromatográficos. 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 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 , respectivamente. Los desplazamientos químicos de todos los espectros se dan en ppm; las constantes de acoplamiento (J) están en Hz. El punto de fusión fue determinado en un aparato Electrothermal modelo IA9000 y no está corregido. El espectro infrarrojo (IR) se obtuvo en película sobre una placa de seleniuro de zinc en un equipo Perkin Elmer modelo GX. La rotación óptica a 25° ($[\alpha]^{25}$) fue medida en un polarímetro Perkin Elmer modelo 341, utilizando lámpara de sodio.

5.2. Colecta de especie y obtención de extractos

Glandularia teucriifolia se colectó el día 28 de agosto del 2024 en la comunidad “El Guajolote” en el municipio de Epazoyucan, estado de Hidalgo, México. La especie se secó a la sombra durante 15 días a temperatura ambiente y se pulverizó con un molino eléctrico.

5.2.1. Obtención de extracto metanólico

Se pesaron 150 g de la planta triturada y se adicionaron 550 mL de metanol; posteriormente, esta mezcla se sometió a un proceso de sonicación en un baño de

ultrasonido durante 60 minutos a 60°C, seguido por filtración y concentrado en el rotavapor. El proceso anterior se repitió 4 veces usando las mismas cantidades de planta y metanol, para obtener un total de 25.36 g (4.26%).

5.2.2. Obtención de particiones de AcOEt y *n*-BuOH

El extracto MeOH (6 g) se disolvió en H₂O dest. (200 mL), se colocó en un embudo de separación de 500 mL y se extrajo dos veces con AcOEt (200 mL). Se separaron las fases orgánica y acuosa. Esta última fase se extrajo ahora con *n*-butanol (*n*-BuOH, 150 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron en el rotavapor para obtener las particiones correspondientes, AcOEt (2.12 g; 35.59%), *n*-BuOH (3.25 g, 54.56%).

El extracto metanólico y las particiones se analizaron por RMN ¹H para observar de manera preliminar la mezcla de sus componentes.

5.3. Separación cromatográfica de extractos

El extracto y sus particiones se analizaron mediante TLC usando distintas proporciones de eluyente, con la finalidad de observar su comportamiento y trasladar estas condiciones a la cromatografía en columna.

Para el extracto metanólico y la partición de AcOEt de *G. teucriifolia* se empleó un gradiente de concentración de Hexano-AcOEt (9:1 a 6:4). Asimismo, para la partición *n*-BuOH se utilizó un sistema de AcOEt-acetona-H₂O-CH₃COOH (50:40:1:0.2).

5.4. Aislamiento de metabolitos secundarios

5.4.1 Obtención de la mezcla de ácido oleanólico y ácido ursólico

Se inició la purificación de la partición de AcOEt, utilizando 1 g de muestra. El proceso se realizó mediante cromatografía en columna en donde se utilizó como fase estacionaria 7 pulgadas de gel de sílice. El proceso anterior se realizó en una columna cromatográfica de 50 mm de diámetro con 142.7 g de gel de sílice. La

columna se empacó con 250 mL de Hexano. Para la purificación de la muestra se utilizó como fase móvil un sistema de Hexano y AcOEt en un gradiente de concentración desde Hexano-AcOEt (9:1) hasta Hexano-AcOEt (1:1).

Se colectaron 40 fracciones de 20 mL, se concentraron de manera individual y se analizaron por TLC; Finalmente se agruparon de acuerdo a su similitud de factor de retención (R_f). Esto condujo a las fracciones **A**, **B** y **C**.

De la fracción **B** se obtuvo un espectro de RMN de 1H en el cual se observaron señales características de una mezcla de compuestos triterpénicos como el ácido oleanólico y ácido ursólico. Por lo que se realizó una recromatografía para intentar separar la mezcla de triterpenos.

De la mezcla se obtuvieron 260.3 mg, mismos que se purificaron mediante CC. Se utilizó una columna de 30 mm de diámetro con 7 pulgadas de la fase estacionaria equivalentes a 42 g de gel de sílice.

Se obtuvieron 27 fracciones de 20 mL. Mediante un análisis por TLC, se comparó con una muestra auténtica de ácido oleanólico las fracciones de esta cromatografía, indicando que en el vial número 16 coincidía para la mezcla de ácido oleanólico y ácido ursólico. Esta fracción (14 mg) se concentró y secó para su análisis por medio de RMN de 1H ; las señales evidenciaron una mezcla de los triterpenos ácido ursólico y oleanólico.

5.4.2. Obtención del ácido ursólico

La mezcla de triterpenos que aún no estaba purificada y que se obtuvo en el proceso anterior (74.7 mg), se sometió a CC utilizando una columna de 15 mm de diámetro y 7 pulgadas de la fase estacionaria (7.5 g de gel de sílice).

Se empacó la columna con 80 mL de éter de petróleo y se usó como fase móvil un sistema de éter de petróleo-AcOEt utilizando un gradiente de concentración de 9:1 a 7:3). Se colectaron 20 fracciones de 20 mL cada una, se concentraron de manera individual y se analizaron mediante TLC.

El compuesto se aisló como un sólido blanco (1mg) (Figura 13) el cual se elucidó mediante un espectro de RMN de ^1H , y comparación con datos descritos.⁴²



Figura 13. Sólido blanco, caracterizado como ácido ursólico.

5.4.3. Obtención de clorofila

De la fracción C se obtuvieron 55.6 mg de un compuesto color verde, mismo que se analizó mediante TLC con un revelador de CoCl_2 observando una coloración azul. Este compuesto fue elucidado por medio de un espectro de RMN de ^1H , sin embargo, se observaron algunas impurezas. Por lo que se optó por purificarlo por CC.

Se utilizó una columna cromatográfica de 15 mm con 7 pulgadas de la fase estacionaria, equivalente a 7.5 g de gel de sílice. Se empaquetó con 80 mL de Hexano y se usó como fase móvil un sistema de Hexano-AcOEt en diferentes proporciones (9:1, 8:2 y 7:3). En las fracciones 30-34 se obtuvo la clorofila (22.4 mg) la cual se analizó mediante TLC y RMN de ^1H .

Al comparar los espectros con la literatura⁴³ se corroboró que se trataba de una clorofila; los desplazamientos químicos se asignaron por comparación.

⁴² Mai, T. T. N., Minh, P. N., Phat, N. T., Chi, M. T., Duong, T. H., Phan, N. H. N., An, T. N. M., Dang, V., Van Hue, N., Anh, N. T. H., & Tri, M. D. (2024). In vitro and in silico docking and molecular dynamic of antimicrobial activities, alpha-glucosidase, and anti-inflammatory activity of compounds from the aerial parts of *Mussaenda saigonensis*. *RSC Advances*, 14(17), 12081-12095. <https://doi.org/10.1039/d4ra01865f>

⁴³ Lötjönen, S., Hynninen, P. H., Ahlberg, P., Kim, B. H., Pihlaja, K., Maartmann-Moe, K., & Wold, S. (1990). Chlorophylls. VII. A ^1H NMR Spectroscopic Study of the Phase-Test Intermediate of Chlorophyll a. *Acta Chemica Scandinavica* 44(3) 235–238. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.44-0235>

5.4.4. Obtención del compuesto verbascósido

Se realizó la purificación de la fracción polar (*n*-BuOH, 757.6 mg) mediante CC. Se utilizó una columna cromatográfica de 50 mm y 7 pulgadas de la fase estacionaria, que son 142.7 g de gel de sílice.

La columna se empacó con AcOEt, se usó como fase móvil un sistema de AcOEt-acetona en tres proporciones diferentes (9:1, 8:2 y 7:3), esto condujo a fracciones en las que nuestro compuesto de interés, estaba mezclado con otros componentes. Por lo que se agrupó y se purificó esta mezcla nuevamente mediante la técnica de CC (129.2 mg). Se utilizó una columna cromatográfica de 20 mm y 7 pulgadas de fase estacionaria (22 g).

La columna se empacó con 100 mL de AcOEt, y se usó como eluyente un sistema de AcOEt-acetona- H_2O - CH_3COOH (50:40:1:0.2). Se colectaron fracciones y se agruparon de acuerdo a su R_f . En esta columna se logró eliminar algunas impurezas de la mezcla, sin embargo, nuestro compuesto de interés seguía mezclado con otro compuesto.

Después de agrupar las fracciones de acuerdo a su R_f , se separó la mezcla para obtener el verbascósido puro. Para ello, se realizó una tercera CC. La mezcla pesó 71 mg, por lo que se utilizó una columna cromatográfica de 15 mm y 7 pulgadas de la fase estacionaria, equivalentes a 7.5 g de gel de sílice. Se usó como eluyente una mezcla de $CHCl_3$ -MeOH (4:1) y posteriormente $CHCl_3$ -MeOH- H_2O (70:29:1), lo cual separó el verbascósido de otro compuesto.

Finalmente se volvió a utilizar el sistema de AcOEt-acetona- H_2O - CH_3COOH (50:40:1:0.2), logrando así la purificación del compuesto de interés.

Se realizó TLC y se observó que el compuesto no tenía impurezas, por lo que se le determinó espectros de RMN de 1H y de ^{13}C , un espectro de 2 dimensiones y su rotación óptica. Se obtuvieron 9.2 mg del compuesto. De acuerdo a Sticher y Lahloub⁴⁴ se pudo confirmar que se trataba del verbascósido.

⁴⁴ Sticher, O., & Lahloub, M. (1982). Phenolic Glycosides of *Paulownia tomentosa* Bark. *Planta Medica*, 46(11), 145-148. <https://doi.org/10.1055/s-2007-970039>

5.5. Estudio biológico

5.5.1. Actividad de inhibición frente a α -glucosidasa

Se evaluó la capacidad de inhibición de la enzima α -glucosidasa del extracto metanólico de *G. teucriifolia*, así como de las particiones de AcOEt y de *n*-BuOH. Para llevar a cabo este estudio, se empleó la metodología descrita por Kim et al., y Kwon.^{45,46} Se prepararon las soluciones mostradas en la Tabla 1. Las soluciones stock tuvieron una concentración de 1.15 mg/mL.

Tabla 1. Preparación de soluciones para el estudio de la capacidad de inhibición de α -glucosidasa

solución	Preparación	Función
NaOH 1 M	Se diluyen 400 mg de NaOH en agua destilada. Se adiciona a un matraz hasta completar el aforo a 10 mL.	Solución para ajustar el pH del buffer de fosfatos (pH = 6.8).
Solución Buffer de fosfatos 100 mM	Se pesan 345 mg de NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O y se diluyen en 20 mL de agua destilada. Se determina el pH y se ajusta a 6.8. Se trasvaza a un matraz y se afora a 25 mL con agua destilada.	Solución para mantener el pH constante.
Solución enzimática 0.1 U/mL	Se pesan 2 mg de la enzima α -glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i> , se diluye y se afora a 1 mL con la solución buffer de fosfatos.	Enzima utilizada para evaluar la inhibición de su actividad.
Solución de <i>p</i> NPG 5 mM	Se pesan 37.5 mg de <i>p</i> NPG, se diluye y trasvaza un matraz aforado completando el volumen a 25 mL con la solución buffer de fosfatos.	Sustrato de la enzima. Se libera <i>p</i> -nitrofenol cuando es hidrolizado por la enzima, a este se le mide la absorción.

⁴⁵ 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>

⁴⁶ 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 de DMSO al 11.5%	Se colocan 2.8 mL de DMSO puro en un matraz aforado de 25 mL y se completa el volumen con agua destilada.	Solución para disolver el extracto o particiones.
Solución de ácido gálico 20 mM	A 0.2 mL de la solución stock se le adicionaron 9.8 mL de DMSO al 11.5% para tener así 10 mL de una solución 20 mM.	Compuesto de referencia para inhibir la enzima α -glucosidasa.
Solución de Acarbosa	Se pesan 129.12 mg de acarbosa se disuelven y se aforan a 10 mL con una solución de DMSO al 11.5% para obtener una solución 20 mM.	Compuesto de referencia para inhibir la enzima α -glucosidasa.

A partir de la concentración original (1.15 mg/mL) se realizaron 2 diluciones, tanto para el extracto metanólico como para las particiones de AcOEt y de *n*-BuOH.

Para la dilución 1, se utilizaron 100 μ L muestra y 900 μ L de DMSO (11.5%), dando como resultado una concentración de 0.115 mg/mL. Para la dilución 2, se utilizaron 10 μ L muestra y 990 μ L de DMSO (11.5%), dando como resultado una concentración de 0.0115 mg/mL.

La prueba de inhibición de α -glucosidasa se realizó en microplacas de 96 pocillos, (Tabla 2). Este protocolo de ensayo de inhibición de α -glucosidasa se realizó por triplicado para el extracto metanólico y para las particiones de AcOEt y de *n*-BuOH con sus respectivas diluciones. Primero se agregó el Buffer de fosfatos 100 mM, seguido DMSO al 11.5%, posteriormente se adicionó el extracto o el control positivo (acarbosa o ácido gálico) y el sustrato *p*-NPG. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 37°C. A continuación, se adicionó la solución enzimática con concentración de 0.1 U/mL.

Se midió la absorbancia al inicio (tiempo 0) a 405 nm, luego se dejó incubar por 30 minutos a 37°C y se realizó otra lectura a 405 nm (tiempo 30).

Como control positivo se utilizó acarbosa en un rango de concentraciones (2×10^{-3} -20 mg/mL).

Tabla 2. Protocolo para la preparación de controles para estudio de la capacidad de inhibición de α -glucosidasa.

Volumen (μ L)	CN	B	CP	CNnE	M	CNEm
Buffer de fosfatos 100 mM	120	150	120	150	120	150
Triplicado	360	450	360	450	360	450
DMSO (11.5%)	20	20	-	-	-	-
Triplicado	60	60	-	-	-	-
Extracto	-	-	-	-	20	20
Triplicado	-	-	-	-	60	60
Control Positivo (acarbosa o ácido gálico)	-	-	20	20	-	-
Triplicado	-	-	60	60	-	-
p-NPG	60	60	60	60	60	60
Triplicado	180	180	180	180	180	180
Incubar 5 minutos (37°C)						
Solución enzimática 0.1 U/mL	30	-	30	-	30	-
Triplicado	90	-	90	-	90	-
Medir la absorbancia a 405 nm, incubar 30 minutos a 37°C y medir nuevamente la absorbancia a 405 nm.						

CN: Control Negativo, B: Blanco, CP: Control Positivo, CNnE: Control Negativo no enzimático, M: Muestra, CNEm: Control Negativo enzimático

Finalmente, se calcularon los porcentajes de inhibición de la enzima α -glucosidasa por medio de la siguiente ecuación:

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

En donde:

Δ = Diferencia de absorbancia (entre tiempo 0 y tiempo 30)

A = Absorbancia

B = Blanco

CN = Control Negativo

CNE = Control negativo no enzimático

M = Muestra

5.5.2. Actividad antioxidante

Como parte de la actividad biológica, se evaluó la capacidad antioxidante del extracto original y de las particiones de AcOEt y de *n*-BuOH empleando tres métodos complementarios, DPPH[•], ABTS^{•+} y FRAP.

5.5.2.1. Ensayo de actividad antioxidante por el método DPPH[•]

Se utilizó el procedimiento descrito por Goyal et al.⁴⁷ ligeramente modificado. Para ello se preparó una solución 0.135 mM de DPPH[•] en etanol, se pesaron 0.0045 g de DPPH[•] y se disolvieron en EtOH, posteriormente, la solución se trasvasó a un matraz y se aforó a 100 mL con en EtOH.

La reacción se llevó a cabo en tubos Eppendorf. Se tomó una alícuota de 1000 µL de la solución DPPH[•] y se le adicionó 200 µL de la respectiva dilución del extracto metanólico y de las particiones de AcOEt y *n*-BuOH (Tabla 3).

Tabla 3. Preparación de soluciones para el estudio de la actividad antioxidante por medio del ensayo DPPH[•].

Experimento	Concentración de muestra (mg/mL)	Volumen de la muestra (µL)	Volumen de la solución de DPPH [•] (µL)
1	0.1	200	1000
2	0.05	200	1000

⁴⁷ Goyal, S., Pandey, H., Guleria, K., & Tewari, G. (2021). Variation in Antioxidant Activity and Antioxidant Constituents of *Thymus Serpyllum* L. Grown in Different Climatic Conditions of Uttarakhand Himalayas. *Defence Life Science Journal*, 6(2), 109-116. <https://doi.org/10.14429/dlsj.6.15759>

La mezcla se homogeneizó con ayuda de un vórtex y se dejó reposar en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalizado el tiempo de reacción, se determinó la absorbancia a 520 nm. Posteriormente se cuantificó la actividad antioxidante mediante la elaboración de curvas de calibración en las que se emplearon la Vitamina E (Trolox) y la Vitamina C como compuestos antioxidantes de referencia.

Para la curva de calibración de Trolox se prepararon soluciones con concentraciones de 0 a 300 μM y se midió la absorbancia (ver Tabla 4).

Tabla 4. Concentración y valores promedio de absorbancia para la construcción de la curva de calibración de Trolox para el ensayo DPPH \cdot .

Concentración (μM)	Absorbancia
300	0.274
225	0.522
150	0.770
75	1.080
57.5	1.138
0	1.312

Para la curva de calibración de la Vitamina C, se prepararon soluciones con concentraciones de 0 a 1124.233 μM , y se midió la absorbancia (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración y valores promedio de absorbancia para la construcción de la curva de calibración de Vitamina C para el ensayo DPPH \cdot .

Concentración (μM)	Absorbancia
1124.23	0.073
843.17	0.108
562.12	0.292
281.06	0.590
0	1.214

5.5.2.2. Ensayo de actividad antioxidante por el método ABTS^{•+}

Para la determinación de la actividad antioxidante por este método se requiere preparar un radical catiónico ABTS^{•+}. De acuerdo con metodología reportada por Rajurkar y Hande⁴⁸, este radical se forma a partir de la reacción de 7 mM del reactivo ABTS^{•+} y 2.45 mM de persulfato de potasio.

Antes de su uso, esta mezcla se almacena en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h. Posteriormente, la solución se diluye en metanol, hasta obtener una absorbancia de 0.700 +/- 0.02 a 734 nm.

Se realizaron diluciones del extracto metanólico, así como de sus particiones. Se adicionaron 20 μ L de las respectivas diluciones de la muestra a 980 μ L de la solución de ABTS^{•+} (Tabla 6). Pasados 30 minutos, se midió su absorbancia a 754 nm.

Tabla 6. Preparación de soluciones para el estudio de la actividad antioxidante por medio del ensayo ABTS^{•+}.

Experimento	Concentración de muestra (mg/mL)	Volumen de la muestra (μ L)	Volumen de la solución de ABTS ^{•+} (μ L)
1	0.1	20	980
2	0.05	20	980

Para la curva de calibración Trolox, se prepararon soluciones con concentraciones de 0 a 300 μ M y se midió la absorbancia (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración y valores promedio de absorbancia para la construcción de la curva de calibración de Trolox para el ensayo ABTS^{•+}.

Concentración (μ M)	Absorbancia
300	0.321
225	0.424
150	0.468
75	0.495

⁴⁸ Rajurkar, N., & Hande, S. (2011). Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(2), 146. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.91574>

37.5	0.522
0	0.548

Para la curva de calibración de la Vitamina C, se prepararon soluciones con concentraciones de 0 a 1124.23 μM y se midió su absorbancia (Tabla 8).

Tabla 8. Concentración y valores promedio de absorbancia para la construcción de la curva de calibración de la Vitamina C para el ensayo ABTS^{•+}.

Concentración (μM)	Absorbancia
1124.23	0.006
843.17	0.148
562.12	0.430
281.06	0.515
0	0.584

5.5.2.3. Ensayo de actividad antioxidante por el método FRAP

Para analizar la capacidad antioxidante del extracto original y de las particiones de *G. teucriifolia* por medio del método FRAP se tomó en cuenta procedimientos descritos en la literatura.^{49,50}

Primero se preparó una solución FRAP. En donde se mezclaron 10 mL de buffer de acetatos 300 mM (se ajustó el pH a 3.6 con ácido acético), con 1 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM disuelto en agua destilada y 1 mL de TPTZ 10 mM disuelto en HCl 40 mM.

La reacción se llevó a cabo en tubos Eppendorf. Se añadieron 10 μL de la muestra correspondiente de *G. teucriifolia* con 300 μL de la solución FRAP y 30 μL de agua destilada. La reacción se dejó incubar a 37°C durante 30 minutos (Tabla 9).

⁴⁹ Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996): “The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay”. *Analytical Biochemistry*, 239(1) 70-76. <https://n9.cl/skt79>

⁵⁰ Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2004). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1721(1-3), 174-184. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.11.001>

Tabla 9. Preparación de soluciones para el estudio de la actividad antioxidante por medio del ensayo FRAP.

Experimento	Concentración de muestra (mg/mL)	Volumen de muestra (μL)	Volumen del reactivo FRAP (μL)	Volumen de agua destilada (μL)
1	0.1	10	300	30
2	0.05	10	300	30

Para la curva de calibración de trolox, se usaron concentraciones de entre 0 a 300 μM (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración y valores promedio de absorbancia para la construcción de la curva de calibración de Trolox para el ensayo FRAP.

Concentración (μM)	Absorbancia
300	0.088
225	0.1043
150	0.1123
75	0.1403
37.5	0.162
0	0.1737

Para la curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se usaron concentraciones de entre 0 a 1 μM (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración y valores promedio de absorbancia para la construcción de la curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para el ensayo FRAP.

Concentración (μM)	Absorbancia
1	0.0945
0.75	0.13
0.1	0.321
0	0.366

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Compuestos obtenidos de *G. teucriifolia*

Mediante técnicas cromatográficas se aislaron y purificaron compuestos de interés biológico.

De la partición de AcOEt se aisló una mezcla de los ácidos ursólico y oleanólico y la clorofila a. Estos compuestos fueron elucidados mediante RMN de ^1H y de ^{13}C en 1D y 2D. También se determinó su actividad óptica y su espectro de infrarrojo (IR).

En la partición de *n*-BuOH se encontró un glicósido el cual se aisló, purificó y elucidó mediante RMN y comparación con datos descritos como verbascósido.

6.1.1 Elucidación estructural de la mezcla de triterpenos

La mezcla de ácidos oleanólico y ursólico (14 mg) se aisló como un sólido blanco, al cual se le determinó un espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 (Figura 14).

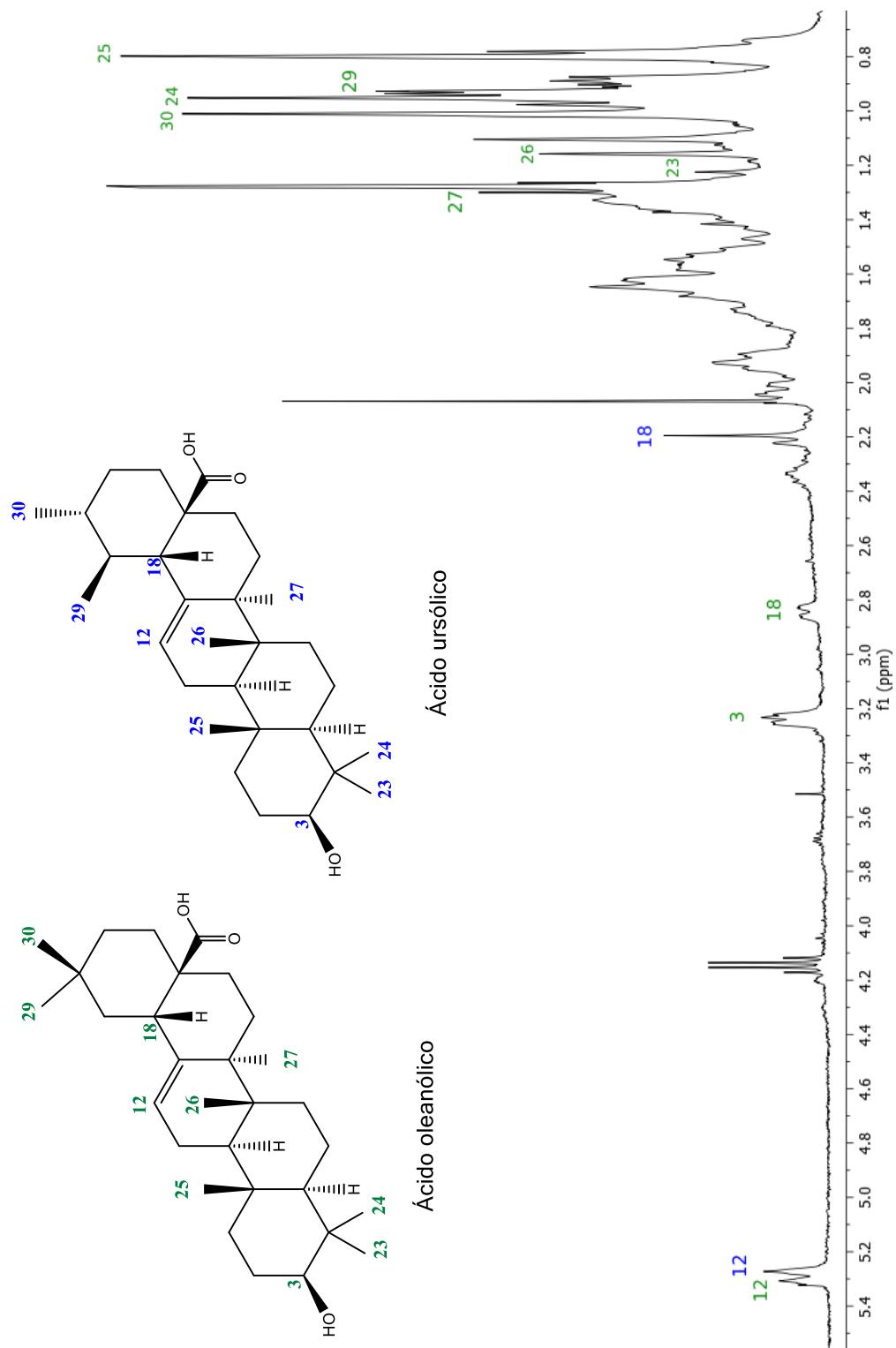


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 , conteniendo los ácidos oleanólico y ursólico.

Se observaron las señales características del ácido oleanólico a δ 5.30 ppm y del ácido ursólico a δ 5.27 ppm, correspondientes al protón H-12 de cada compuesto, respectivamente. En δ 3.22 ppm se observa una señal doble de dobles correspondiente al protón H-3 (base de alcohol). En δ 2.82 ppm también se observó una señal doble de dobles, esta corresponde al protón H-18 del ácido oleanólico, mientras que para el ácido ursólico corresponde un valor de δ 2.19 ppm. En frecuencias más bajas se muestran señales asignadas a los siete metilos alifáticos en δ 1.32, 1.22, 1.15, 0.98, 0.95, 0.92, 0.78 ppm, correspondientes a los protones de los metilos CH₃-27, CH₃-23, CH₃-26, CH₃-30, CH₃-24, CH₃-29, CH₃-25, respectivamente. En la Tabla 12 se muestran los datos obtenidos, los cuales se compararon con los descritos ^{42,51} en donde las señales que los diferencian están marcadas de color verde y azul para los ácidos oleanólico y ursólico respectivamente.

El valor de su punto de fusión fue de 224°C a 234°C. Así mismo se calculó su valor de R_f el cual fue de 0.48 en un sistema Hexano-AcOEt (7:3).

Tabla 12. Comparación de desplazamientos del ácido oleanólico y ursólico con la literatura.

Protón	δ_H en ppm			
	Ácido Oleanólico		Ácido Ursólico	
	Referencia ^{42,51}	Experimental	Referencia ^{42,51}	Experimental
3	3.22	3.22	3.23	3.23
12	5.28	5.30	5.23	5.27
18	2.82	2.82	2.19	2.19
23	1.20	1.22	0.92	0.92
24	0.94	0.95	0.93	0.95
25	0.78	0.78	0.78	0.76
26	1.13	1.15	0.80	0.82
27	1.35	1.30	1.08	1.10
29	0.91	0.92	0.86	0.88
30	0.98	1.00	0.95	0.95

⁵¹ Fadipe, V. O., Opoku, A. R., Singh, M., Pereira, A. R., Rijo, P., & Mongalo, N. I. (2020). Antimycobacterial, antiplasmodial studies and cytotoxicity of oleanolic acid and its derivative from *Syzygium aromaticum* Linn (Myrtaceae). *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(2), 1–12. <https://doi.org/10.19277/bbr.17.2.233>

6.1.2. Elucidación estructural del ácido ursólico

El ácido ursólico (1.0 mg) también se aisló como un sólido blanco, al cual se le determinó un espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 (Figura 15).

En 5.28 ppm se observó la señal triple, característica del protón H-12 del ácido ursólico. En 3.23 ppm se observó una señal doble de dobles que corresponde al protón H-3. En 2.19 ppm hay una señal doble de dobles, debida al protón H-18.

En frecuencias bajas, se muestran cinco señales simples en 1.10, 0.76, 0.92, 0.80, 0.97 ppm, correspondientes a los protones de los metilos terciarios CH_3 -27, CH_3 -24, CH_3 -23, CH_3 -26, CH_3 -25, respectivamente y dos señales dobles de 0.88 y 0.95 ppm para los metilos CH_3 -29 y CH_3 -30. Los datos obtenidos comparados con la literatura^{42,52} se muestran en la Tabla 13.

Así mismo, se determinó su R_f con un valor de 0.43 usando como sistema una mezcla de Hexano-AcOEt (7:3), y la rotación óptica, con un valor de $[\alpha]_D=+19.6$ ($c = 0.05$, CHCl_3). Su punto de fusión fue de 206°C.

⁵² Deng, R., Ren, Z., Tang, T., Wang, X., & Liu, P. (2025). Extraction, isolation and cytotoxic activities of triterpene saponins from ornamental and medicinal plant *Lysimachia christinae*. *Separation and Purification Technology*, 362, Artículo 131700. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2025.131700>

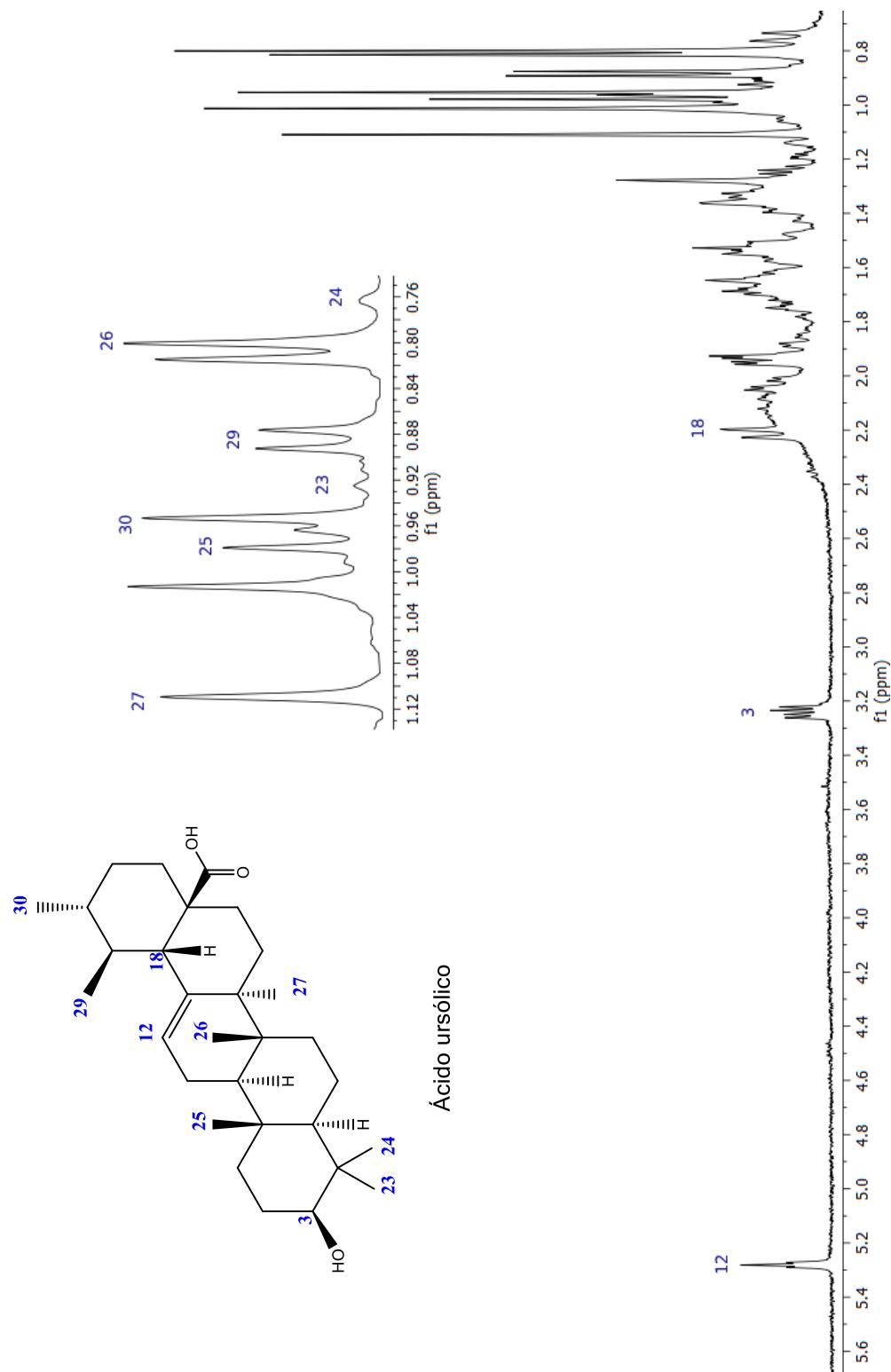


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 del ácido ursólico.

Tabla 13. Comparación de desplazamientos y constantes de acoplamiento del ácido ursólico, con la literatura.

Protón	δ (ppm) Referencia	δ (ppm) Experimental	J (Hz) Referencia	J (Hz) Experimental
3	3.23	3.23	5.0 (1H, dd)	4.94
12	5.26	5.28	3.5 (1H, t)	3.65
18	2.19	2.19	-	-
23	0.92	0.92	-	-
24	0.93	0.95	-	-
25	0.78	0.76	-	-
26	0.80	0.80	-	-
27	1.08	1.10	-	-
29	0.86	0.87	6.4 (3H, d)	6.47
30	0.95	0.97	6.4 (3H, d)	6.25

6.1.3. Elucidación estructural de la clorofila a

La clorofila a (Figura 16) se aisló como un sólido de color verde intenso, se obtuvieron 22.4 mg. De acuerdo al análisis espectroscópico reportado^{43,53,54} se confirmó que se trataba de la clorofila a.

Se determinó un espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 (Figura 17). Entre sus señales más características se encuentran las de los protones vinílicos β , α y δ en 9.71, 9.57 y 8.75 ppm, respectivamente, así como las señales en 8.02 y 6.27 de los protones vinílicos de las posiciones 2a y 2b. Asimismo, las señales simples en 3.88 para el OMe del grupo éster, y las señales de los metilos vinílicos 1a, 3a y 5a entre 3.20 y 4.0 ppm. Los datos obtenidos se compararon con la literatura^{43,53,54} y se muestran en la Tabla 14.

El punto de fusión de la sustancia fue de 172°C.

⁵³ Abraham, R. J., & Rowan, A. E. (1991). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of Chlorophyll. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*. Recuperado de <https://epub.ub.uni-muenchen.de/2343/index.html>

⁵⁴ Smith, K. M., Goff, D. A., & Abraham, R. J. (1984). The NMR spectra of porphyrins. 27-proton NMR spectra of chlorophyll-a and pheophytin-a. *Organic Magnetic Resonance*, 22(12), 779-783. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270221210>

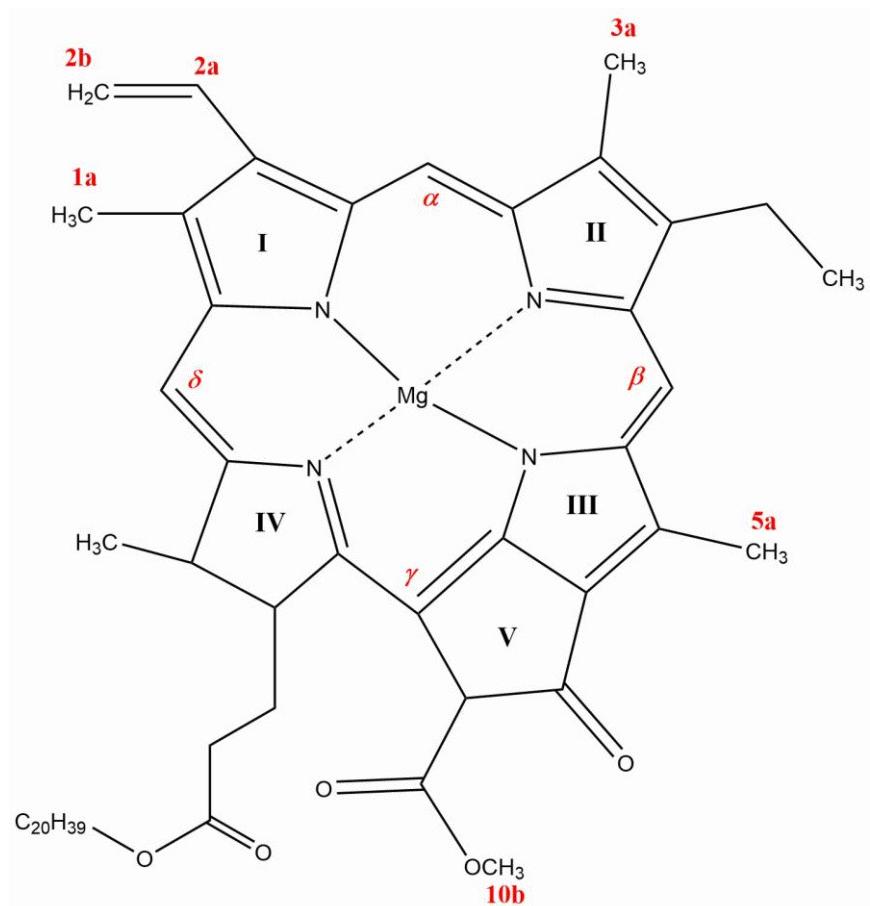


Figura 16. Estructura de la clorofila a.

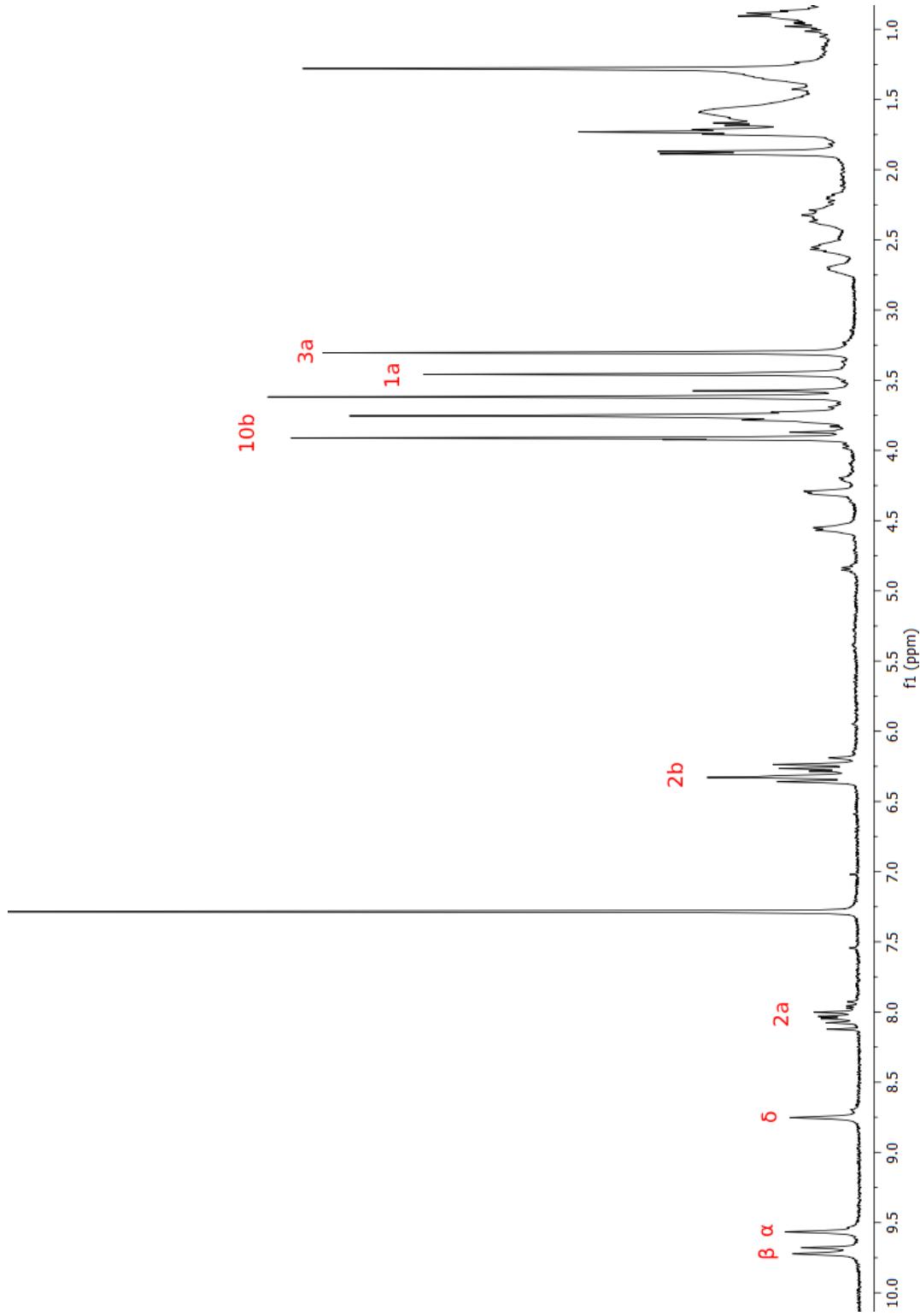


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 de la clorofila α .

Tabla 14. Comparación de desplazamientos de la clorofila α , con la literatura.

Protón	δ (ppm) Referencia	δ (ppm) Experimental
β	9.54	9.71
α	9.29	9.57
δ	8.32	8.75
2a	7.98	8.02
2b	6.19	6.27
10b	3.99	3.88
1a	3.30	3.46
3a	3.27	3.31

6.1.4. Elucidación estructural del verbascósido

El verbascósido, también llamado acteosido (Figura 18), un compuesto conocido por sus importantes propiedades biológicas, se aisló como una solución oleosa de color amarillo (9.2 mg).

Este compuesto se identificó mediante RMN de ^1H en CD_3OD . (Figura 19). Se compararon los datos experimentales con losaa descritos^{44,55} (ver Tabla 15).

Se obtuvo un R_f de 0.425, en un sistema de $\text{AcOEt}\text{-acetona}\text{-H}_2\text{O}\text{-CH}_3\text{COOH}$ (5:4:0.5:0.1) y una rotación óptica de $[\alpha]_D=-60.8$ ($c = 0.7$, MeOH). Su punto de fusión arrojó un valor de 226.7°C.

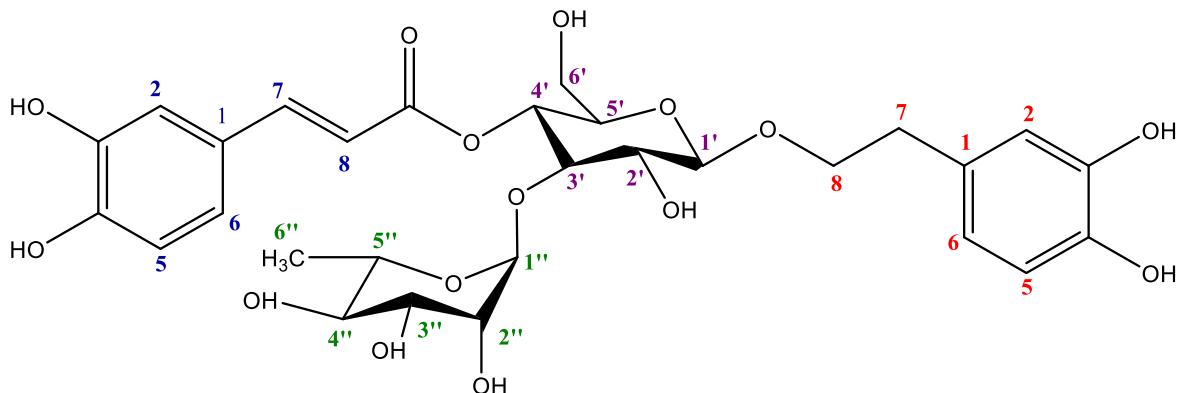


Figura 18. Estructura del verbascósido.

⁵⁵ Wang, Y., Zhou, S., Xu, G., & Gao, Y. (2015). Interference of phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* with the MTT Assay. *Molecules*, 20(5), 8060-8071. <https://doi.org/10.3390/molecules20058060>

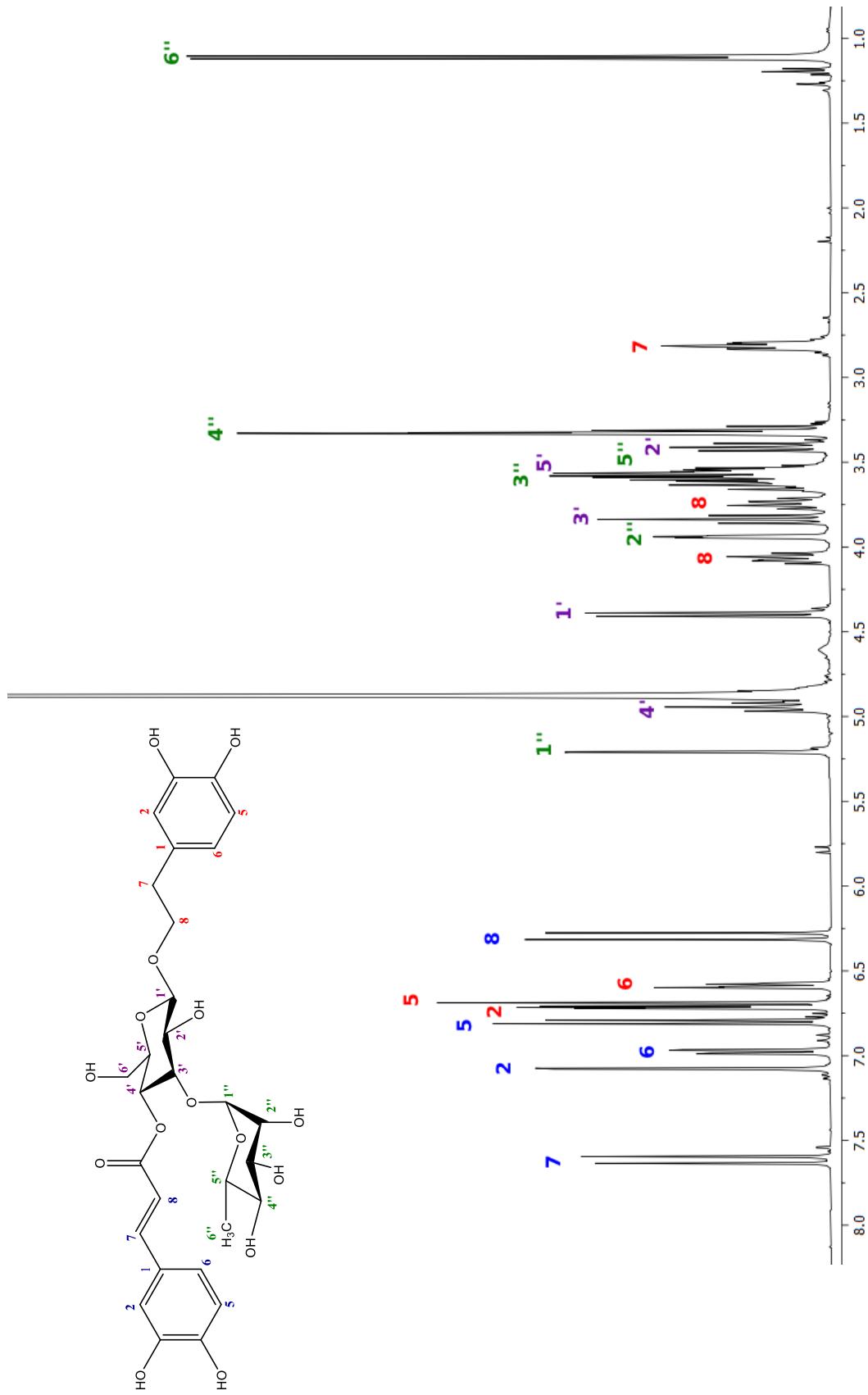


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CD_3OD del verbascósido.

Tabla 15. Comparación de los valores de desplazamiento y constante de acoplamiento del verbascósido de acuerdo a la literatura.

Protón	δ (ppm)	δ (ppm)	J (Hz)	J (Hz)
	Referencia	Experimental	Referencia	Experimental
2	6.69	6.72	2.0 (d)	2.07
5	6.67	6.70	8.0 (d)	8.05
6	6.56	6.59	1.9, 8.0 (dd)	2.09, 8.05
7	2.79	2.81	-	-
8	4.04	4.07	-	-
	3.73	3.74	-	-
8-O-Glc				
1'	4.37	4.40	7.9 (d)	7.85
2'	3.39	3.41	7.9, 9.2 (dd)	7.88, 9.16
3'	3.81	3.84	9.2 (t)	9.2
4'	4.91	4.94	9.7,9.8(t)	9.48
5'	3.59	3.58	-	-
3'-O-Rha				
1''	5.19	5.21	1.8 (d)	1.84
2''	3.92	3.94	1.8, 3.0 (dd)	1.82, 3.29
3''	3.57	3.58	-	-
4''	3.30	3.33	-	-
5''	3.55	3.56	-	-
6''	1.09	1.11	6.2 (3H,d)	6.22
4'-O-Caf				
2	7.05	7.08	1.9 (d)	2.08
5	6.78	6.80	8.0 (d)	8.22
6	6.94	6.98	1.9, 8.0 (dd)	2.07, 8.27
7	7.59	7.61	15.9 (d)	15.85
8	6.26	6.30	15.9 (d)	15.88

6.2. Estudio Biológico

6.2.1. Actividad de inhibición de la enzima α -glucosidasa

Se evaluó la actividad de inhibición de la enzima α -glucosidasa en el extracto metanólico y en las particiones de AcOEt y *n*-BuOH para ello se evaluaron concentraciones de 1.15 mg/mL, 0.115 mg/mL y 0.0115 mg/mL.

6.2.1.1. Inhibición del extracto metanólico

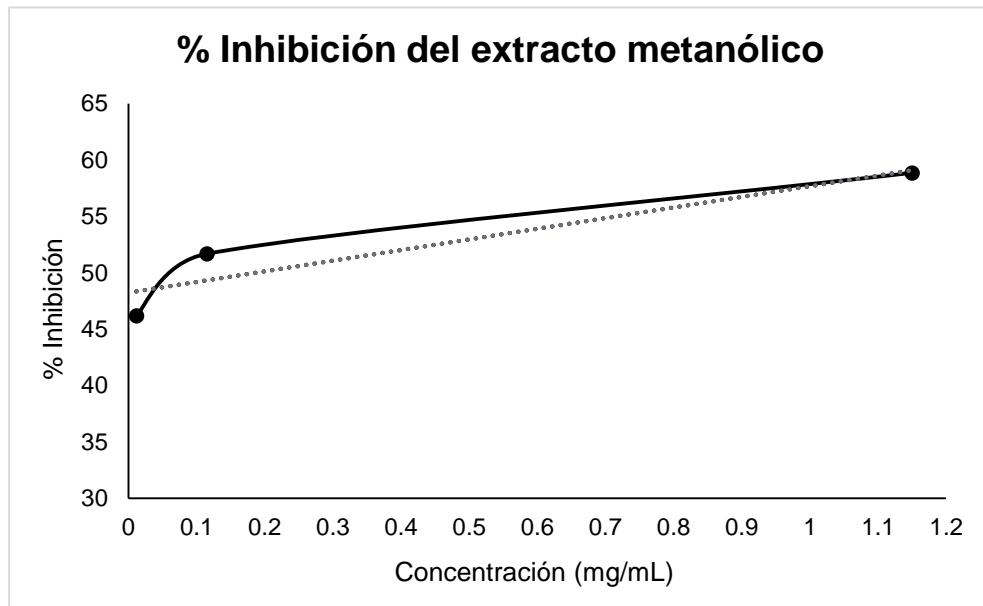
El porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa del extracto metanólico, se evaluó mediante tres concentraciones (Tabla 16).

El valor de IC₅₀ obtenido fue de 0.065 mg/mL (Gráfica 1). Este resultado indica que el extracto metanólico de *G. teucriifolia* presenta una actividad inhibidora mayor si se compara con el IC₅₀ de 0.420 mg/mL reportado en la literatura para el extracto metanólico de *Verbena Officinalis*.⁵⁶

Tabla 16. Concentración y porcentaje de inhibición de α -glucosidasa del extracto metanólico de *G. teucriifolia*.

Concentración (mg/mL)	% Inhibición
1.15	58.864
0.115	51.685
0.0115	46.190

⁵⁶ Nisar, R., Ahmad, S., Khan, K.-u.-R., Sherif, A. E., Alasmari, F., Almuqati, A. F., Ovatlarnporn, C., Khan, M. A., Umair, M., Rao, H., et al. (2022). Metabolic profiling by GC-MS, in vitro biological potential, and in silico molecular docking studies of *Verbena officinalis*. *Molecules*, 27(19), 6685. <https://doi.org/10.3390/molecules27196685>



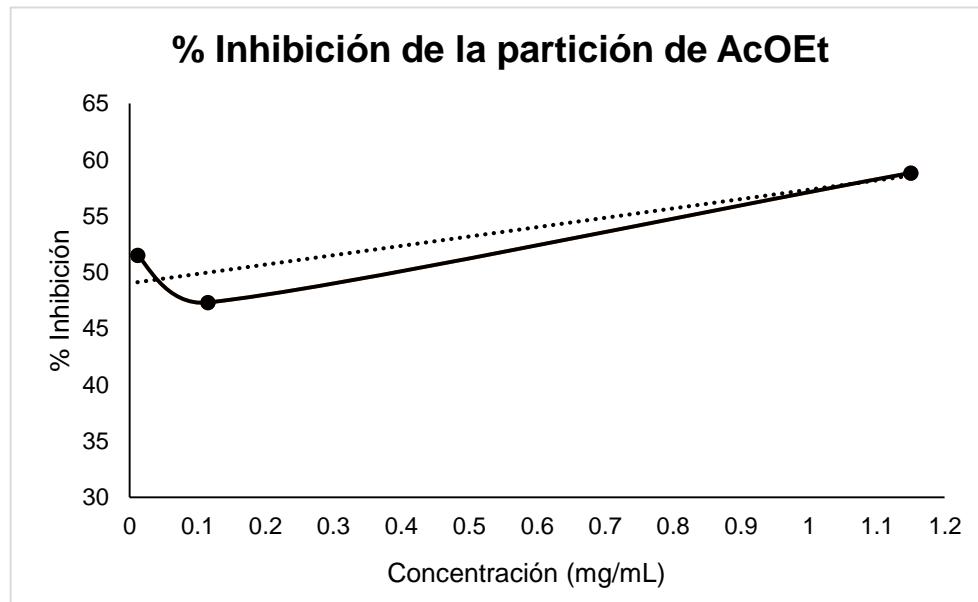
6.2.1.2. Inhibición de la partición de AcOEt

Para evaluar la actividad inhibidora de α -glucosidasa de la partición de AcOEt, se evaluaron las mismas concentraciones que el ensayo anterior, obteniendo porcentajes de inhibición mayores al 50 % (Tabla 17),

Se obtuvo un valor de IC_{50} de 0.033 mg/mL (Gráfica 2). En comparación con el valor de IC_{50} de 0.685 mg/mL, reportado en la literatura para la partición de AcOEt de *Verbena Officinalis*,⁵⁶ la partición de *G. teucriifolia* exhibe una actividad mayor.

Tabla 17. Concentración y porcentaje de inhibición de α -glucosidasa de la partición de AcOEt de *G. teucriifolia*.

Concentración (mg/mL)	% de Inhibición
1.15	59.414
0.115	48.059
0.0115	52.198



Gráfica 2. Porcentaje de inhibición vs concentración de la partición de AcOEt.

6.2.1.3. Inhibición de la partición de *n*-BuOH

Para la partición de *n*-BuOH se evaluó la actividad inhibidora de α -glucosidasa (Tabla 18) el cual, mostró un $IC_{50} = 0.496$ mg/mL, (Gráfica 3).

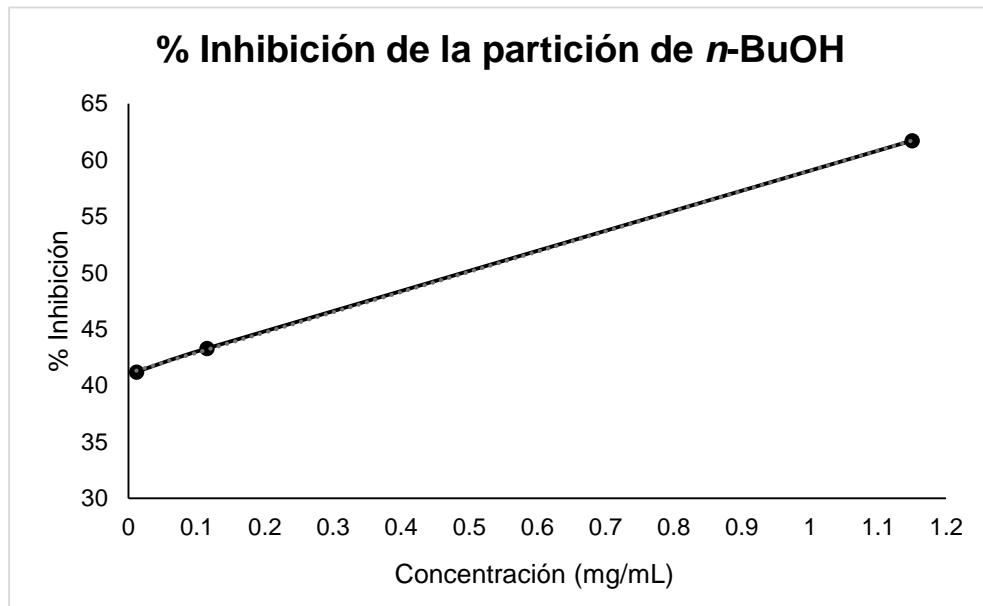
En comparación con lo reportado en la literatura,⁵⁶ la partición de *n*-BuOH de *Verbena Officinalis* no presenta actividad frente a α -glucosidasa.

Por otro lado, diversos estudios señalan que el verbascósido posee un IC_{50} de 0.195 mg/mL frente esta enzima⁵⁷. Dado que este compuesto es el componente mayoritario de la partición de *n*-BuOH de *G. teucriifolia*, es probable que la actividad observada se deba a su presencia.

Tabla 18. Concentración y porcentaje de inhibición de α -glucosidasa de la partición de *n*-BuOH de *G. teucriifolia*.

Concentración (mg/mL)	% de Inhibición
1.15	61.722
0.115	43.297
0.0115	41.209

⁵⁷ Khound, P., Sarma, H., Sarma, P. P., Jana, U. K., & Devi, R. (2023). *Ultrasound-assisted extraction of verbascoside from Clerodendrum glandulosum leaves for analysis of antioxidant and antidiabetic activities*. *ACS Omega*, 8(23), 20360–20369. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00173>



Gráfica 3. Porcentaje de inhibición vs concentración de la partición de *n*-BuOH.

De acuerdo a los datos reportados, la partición de AcOEt presenta un mayor porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa, lo cual se puede atribuir a que, debido a su polaridad, en esta partición se encuentra el ácido oleanólico y el ácido ursólico.

6.2.2. Determinación de la Capacidad Antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto metanólico así como de las particiones de AcOEt y de *n*-BuOH de la especie *G. teucriifolia* mediante tres ensayos complementarios, DPPH[•], ABTS^{•+} y FRAP.

6.2.2.1. Capacidad Antioxidante por el método DPPH[•]

Para evaluar la capacidad antioxidante del extracto metanólico, se interpolaron los datos obtenidos en una curva de calibración de Trolox (Gráfica 4). Los resultados fueron expresados en $\mu\text{mol ET/g muestra}$.

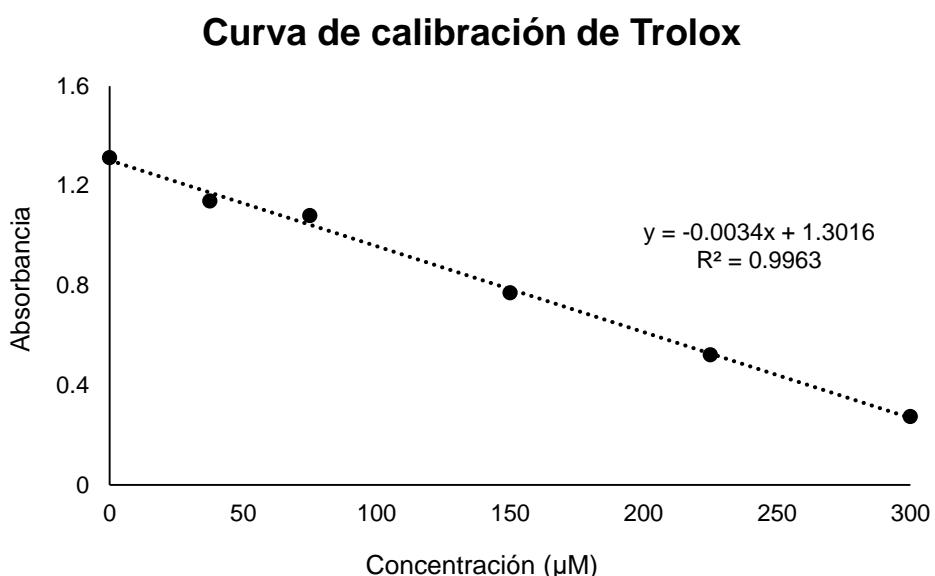


Tabla 20. Resultados de la capacidad antioxidante DPPH• P. AcOEt.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	µmol ETrolox/g muestra
0.1	0.839	6.808 ± 1.760
0.05	0.997	8.940 ± 0.835

La actividad antioxidante por el método DPPH• de la partición de *n*-BuOH se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21. Resultados de la capacidad antioxidante DPPH• P. *n*-BuOH.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	µmol ETrolox/g muestra
0.1	0.574	10.705 ± 0.061
0.05	0.846	13.390 ± 3.145

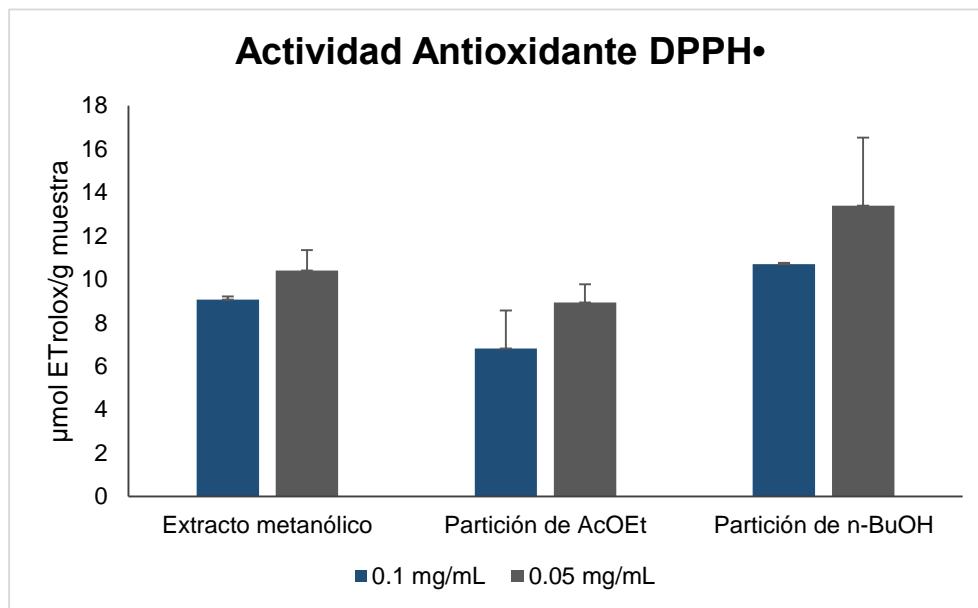
Los valores obtenidos en este estudio de actividad antioxidante por el método DPPH•, fueron contrastados con otras especies de la misma familia. Fernández-Rosillo y Aguirre Vargas⁵⁸, reportaron que extractos de la especie *Lippia alba* presentan una actividad antioxidante de 12.24 µmol ETrolox/g muestra.

Los resultados en este estudio oscilaron en un rango de 6 a 14 µmol ETrolox/g muestra, lo que hace que este estudio sea comparable con la actividad reportada para *Lippia alba*, lo que sitúa los resultados dentro del comportamiento común de especies de la familia Verbenaceae.

En la gráfica 5, se puede observar que la partición de *n*-BuOH tiene una mayor actividad antioxidante, la cual se puede atribuir al verbascósido presente en mayor proporción en esta polaridad. De acuerdo a Rossi et. al.,⁵⁹ los extractos ricos en verbascósido presentan propiedades medicinales significativas, entre las que se encuentran, buena actividad antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana.

⁵⁸ Fernández-Rosillo, F., & Aguirre-Vargas, E. B. (2024). Variación estacional del rendimiento de extracción y actividad biológica *in vitro* del aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano). *Revista Científica Dékamu Agropec*, 5(2), 1-12. <https://doi.org/10.55996/dekamuagropec.v5i2.273>

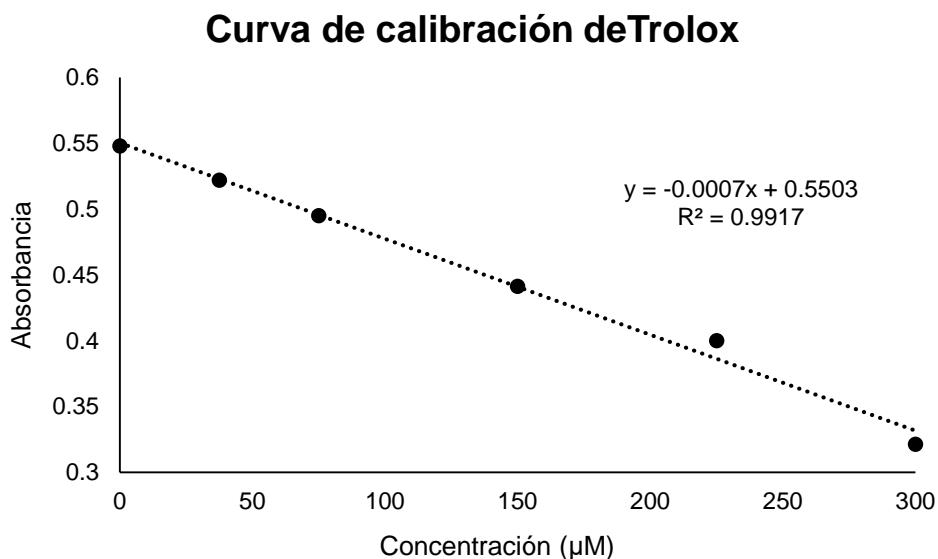
⁵⁹ Rossi, R., Mainardi, E., Vizzarri, F., & Corino, C. (2024). Verbascoside-rich plant extracts in animal nutrition. *Antioxidants*, 13(1), 39. <https://doi.org/10.3390/antiox13010039>



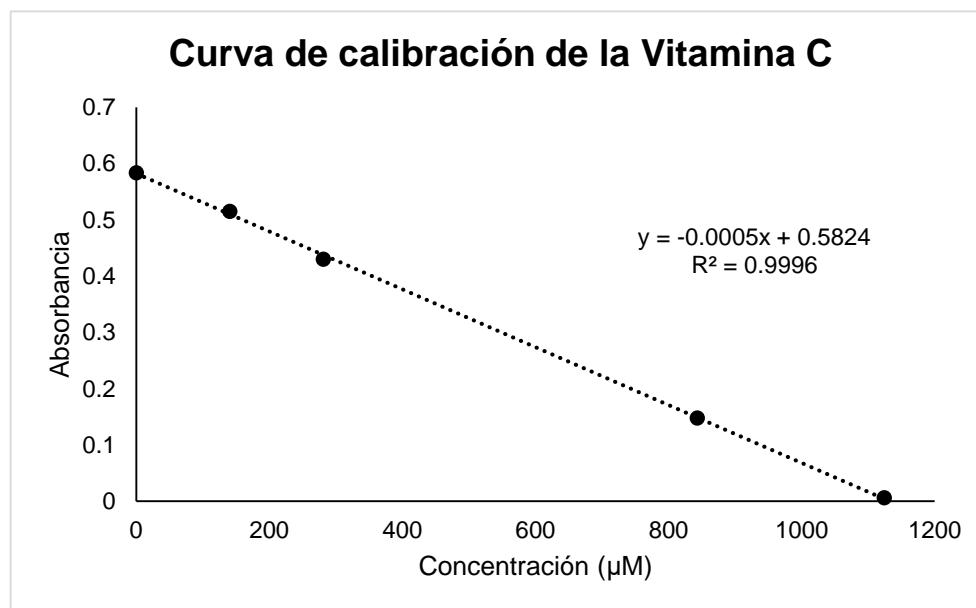
Gráfica 5. Comparación de la actividad antioxidante por el método DPPH•, del extracto metanólico y de las particiones de AcOEt y *n*-BuOH.

6.2.2.2. Capacidad Antioxidante por el método ABTS•⁺

Para la evaluación de la actividad antioxidante por el método ABTS•⁺, se realizaron dos curvas de calibración con los antioxidantes de referencia Trolox (Gráfica 6) y Vitamina C (Gráfica 7). Los resultados fueron expresados en mmol ET/g muestra para el antioxidante Trolox y μmol EVC/100 g para el antioxidante Vitamina C.



Gráfica 6. Curva de calibración de Trolox, para evaluar la capacidad antioxidante ABTS^{•+} del extracto metanólico y de las particiones de AcOEt y *n*-BuOH de *G. teucriifolia*.



Gráfica 7. Curva de calibración de Vitamina C, para evaluar la capacidad antioxidante ABTS^{•+} del extracto metanólico y de las particiones de AcOEt y *n*-BuOH de *G. teucriifolia*.

La actividad antioxidante por el método ABTS^{•+} del extracto metanólico se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22. Resultados de la capacidad antioxidante ABTS^{•+} del extracto metanólico.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	mmol ET/g muestra	μmol EVC/g muestra
0.1	0.468	0.059 ± 0.030	114.4 ± 42.462
0.05	0.578	-	33.80 ± 21.213

- No presentó actividad antioxidante

La actividad antioxidante por el método ABTS^{•+} de la partición de AcOEt se muestra en la Tabla 23.

Tabla 23. Resultados de la capacidad antioxidante ABTS^{•+} P. AcOEt.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	mmol ET/g muestra	μmol EVC/g muestra
0.1	0.468	0.106 ± 0.009	180.4 ± 13.228

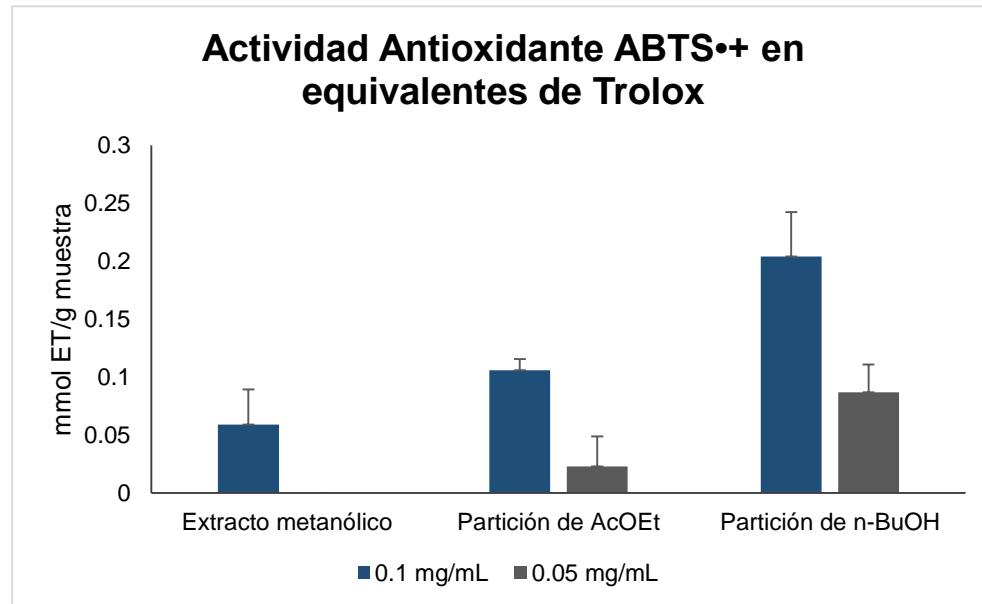
0.05	0.578	0.023 ± 0.026	96.13 ± 36.350
------	-------	---------------	----------------

La actividad antioxidante por el método ABTS^{•+} de la partición de *n*-BuOH se muestra en la Tabla 24.

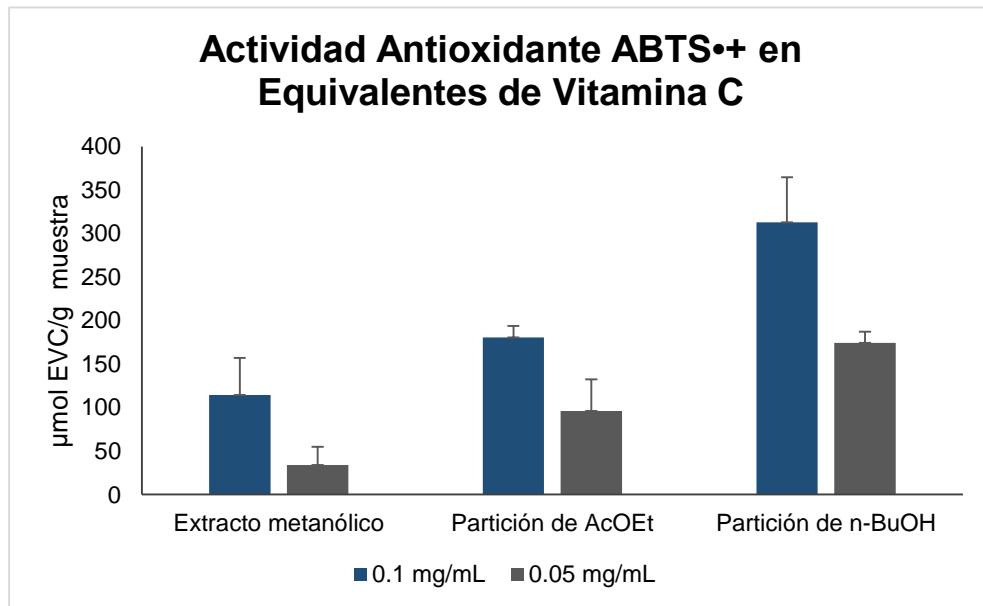
Tabla 24. Resultados de la capacidad antioxidante ABTS^{•+} P. *n*-BuOH.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	mmol ET/g muestra	μmol EVC/g muestra
0.1	0.468	0.204 ± 0.038	312.73 ± 51.733
0.05	0.578	0.087 ± 0.024	174.13 ± 13.013

En las gráficas 8 y 9 se observan los resultados de la actividad antioxidante por el método ABTS^{•+} expresados en mmol ET/g muestra, para el antioxidante Trolox y en μmol EVC/g muestra, para el antioxidante Vitamina C.



Gráfica 8. Comparación de la actividad antioxidante por el método ABTS^{•+} en equivalentes de Trolox del extracto metanólico y de las particiones de AcOEt y *n*-BuOH.



Gráfica 9. Comparación de la actividad antioxidante por el método ABTS^{•+} en equivalentes de Vitamina C del extracto metanólico y de las particiones de AcOEt y *n*-BuOH.

Los valores de la actividad antioxidante (ABTS^{•+}) obtenidos en el presente estudio se compararon con los reportados para otras especies de la misma familia. Villegas-Aguilar et. al.,⁶⁰, documentaron que extractos de la especie *Lippia citriodora* presentan una actividad antioxidante de 1.13 ± 0.06 mmol ET/g muestra; en este ensayo se obtuvieron valores entre 0.023 ± 0.026 y 0.204 ± 0.03 mmol ET/g muestra, por lo que los resultados de esta investigación que se sitúan dentro del comportamiento antioxidante son moderados (100-500 μ mol ET/g muestra) en las especies pertenecientes a la familia Verbenaceae.

De igual manera, los resultados se expresaron en μ mol EVC/g muestra. Al contrastarlos con datos reportados en estudios previos⁶¹, los cuales indican valores de actividad antioxidante comprendidos entre 67 ± 20 y 516 ± 20 μ mol EVC/g muestra, se observa que los extractos obtenidos en el presente estudio tienen un

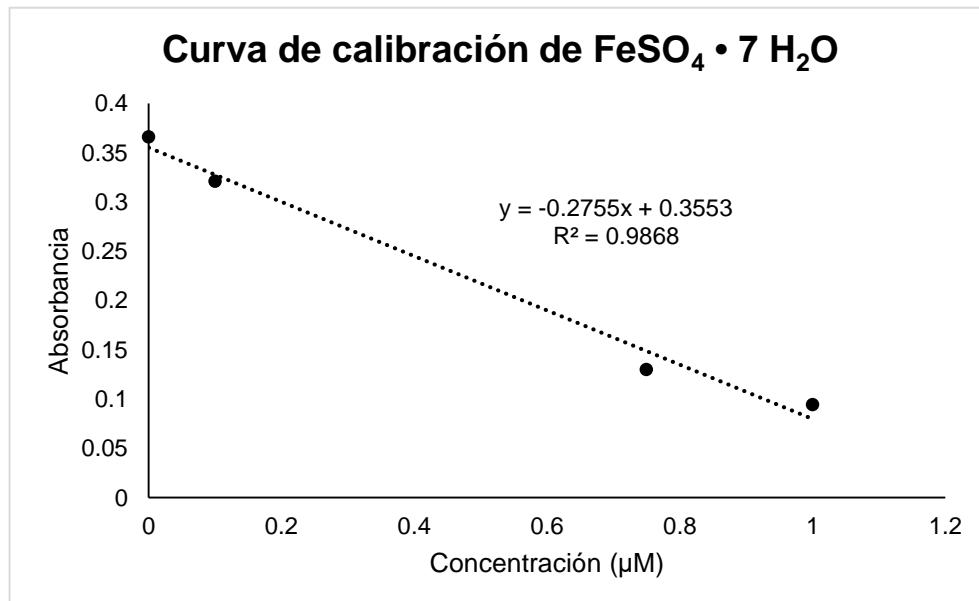
⁶⁰ Villegas-Aguilar, M. d. C., Cádiz-Gurrea, M. d. I. L., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2021). Comparative Evaluation of the Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols in Different Natural Sources. *Medical Sciences Forum*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.3390/CAHD2020-08614>

⁶¹ Portmann, E., López Nigro, M. M., Reides, C. G., Llesuy, S., Ricco, R. A., Wagner, M. L., Gurni, A. A., & Carballo, M. A. (2012). Aqueous extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae): Assessment of antioxidant capacity and DNA damage. *International Journal of Toxicology*, 31 (2), 192-202. <https://doi.org/10.1177/1091581812436726>

comportamiento similar con valores de entre 33.80 ± 21.21 y 312.73 ± 51.73 $\mu\text{mol EVC/g muestra}$, cuya actividad también se considera moderada.

6.2.2.3. Capacidad Antioxidante por el método FRAP

Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP se usó una curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Gráfica 10). Los resultados fueron expresados en $\text{mmol EFe}^{2+}/\text{g}$ de muestra.



Gráfica 10. Curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, para evaluar la capacidad antioxidante FRAP del extracto metanólico y de las particiones de AcOEt y *n*-BuOH de *G. teucriifolia*.

La actividad antioxidante por el método FRAP del extracto metanólico se muestra en la Tabla 25.

Tabla 25. Resultados de la capacidad antioxidante FRAP del extracto metanólico.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	mmol EFe ²⁺ /g muestra
0.1	0.177	0.197 ± 0.014
0.05	0.130	0.502 ± 0.008

La actividad antioxidante por el método FRAP de la partición de AcOEt se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Resultados de la capacidad antioxidante FRAP P. AcOEt.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	mmol EFe ²⁺ /g muestra
0.1	0.177	0.215 ± 0.017
0.05	0.130	0.506 ± 0.034

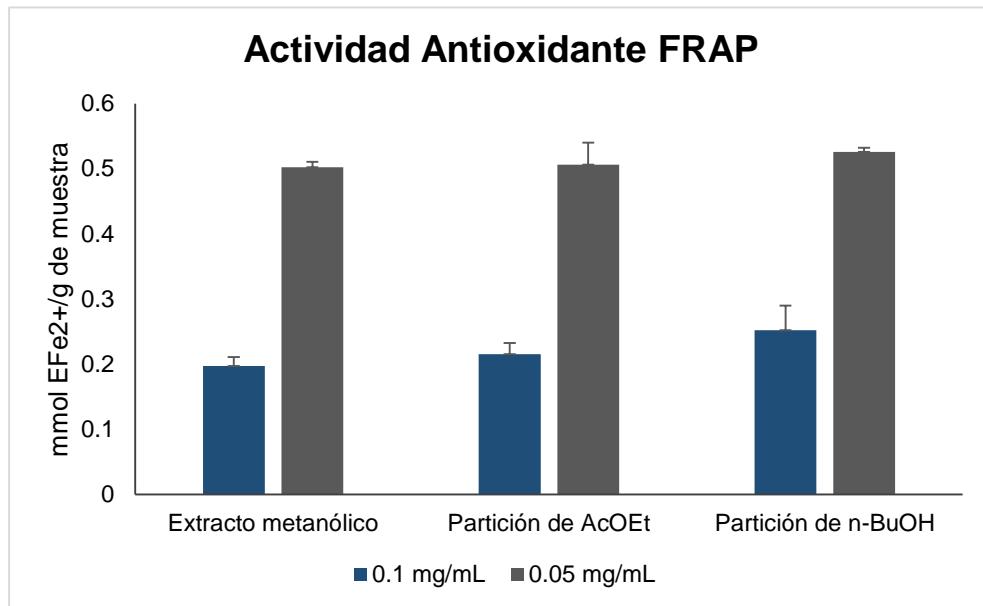
La actividad antioxidante por el método FRAP de la partición de *n*-BuOH se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27. Resultados de la capacidad antioxidante FRAP P. *n*-BuOH.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia	mmol EFe ²⁺ /g muestra
0.1	0.177	0.252 ± 0.038
0.05	0.130	0.526 ± 0.006

De acuerdo a los resultados de esta prueba (Gráfica 11), el extracto que presenta una mayor actividad antioxidante es el extracto de *n*-BuOH, los resultados fueron comparados con extractos de la planta *Verbena Officinalis* y *Aloysia citrodora*, plantas pertenecientes a la familia verbenaceae. Polumackanycz et. al.,⁶² señalan que los valores de las pruebas de actividad antioxidante FRAP de distintos extractos oscilan entre 0.37 ± 0.07 y 0.91 ± 0.01 mmol EFe²⁺/g muestra, lo que hace que sea comparable con los valores obtenidos en este ensayo ya que se encuentran en un rango de 0.197 ± 0.014 a 0.526 ± 0.006 mmol EFe²⁺/g muestra.

⁶² Polumackanycz, M., Petropoulos, S. A., Añíbarro-Ortega, M., Pinela, J., Barros, L., Plenis, A., & Viapiana, A. (2022). *Chemical composition and antioxidant properties of common and lemon verbena*. *Antioxidants*, 11(11), 2247. <https://doi.org/10.3390/antiox11112247>



Gráfica 11. Comparación de la actividad antioxidante por el método FRAP, del extracto metanólico y de las particiones de AcOEt y *n*-BuOH.

7. CONCLUSIONES

Del extracto metanólico de *Glandularia teucriifolia* se realizaron particiones de AcOEt y de *n*-BuOH, de las cuales se lograron aislar compuestos con actividad biológica importante.

De la partición de AcOEt se aisló una mezcla de triterpenos, que se identificaron como ácido oleanólico y ácido ursólico mediante RMN ^1H . A esta mezcla se le determinó su punto de fusión el cual fue de 224.0°C-234°C. Posteriormente, esta mezcla se purificó, obteniendo el ácido ursólico, al cual se le determinó un espectro de RMN de ^1H y su rotación óptica. Además, de esta partición, también se aisló un compuesto de color verde oscuro que mediante sus datos físicos y espectroscópicos (RMN de ^1H) y comparación con la literatura, se identificó como clorofila a.

De la partición de *n*-BuOH, se aisló y purificó el verbascósido, el cual también se caracterizó mediante sus datos físicos y espectroscópicos, principalmente por RMN de ^1H y de ^{13}C .

La evaluación de la capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa por el extracto y las particiones de AcOEt y *n*-BuOH, evidenció que éstos tienen buena actividad, dado que presentaron IC₅₀ de 0.065, 0.033 y 0.496 mg/mL, respectivamente, mejor que el estándar acarbosa (IC₅₀ = 8.061 mg/mL). Esta actividad se podría atribuir a los triterpenos pentacíclicos (ácido ursólico y oleanólico) y al polifenol verbascósido, los principales metabolitos presentes en el extracto.

Finalmente, se evaluó la capacidad antioxidante del extracto y sus particiones por medio de las pruebas DPPH \cdot , ABTS $^{\cdot+}$ y FRAP. En las tres pruebas, la partición de *n*-BuOH presenta la mayor capacidad antioxidante.

En los resultados de las pruebas FRAP y DPPH \cdot se observa una capacidad antioxidante mayor a concentraciones bajas, esto se debe a interacciones de los metabolitos secundarios con los antioxidantes. El metabolito principal de esta partición es el verbascósido, el cual, por su naturaleza polifenólica, podría ser el responsable de esta capacidad de captura de radicales libres.

8. ANEXOS

8.1 Espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz en CD_3OD del verbascósido

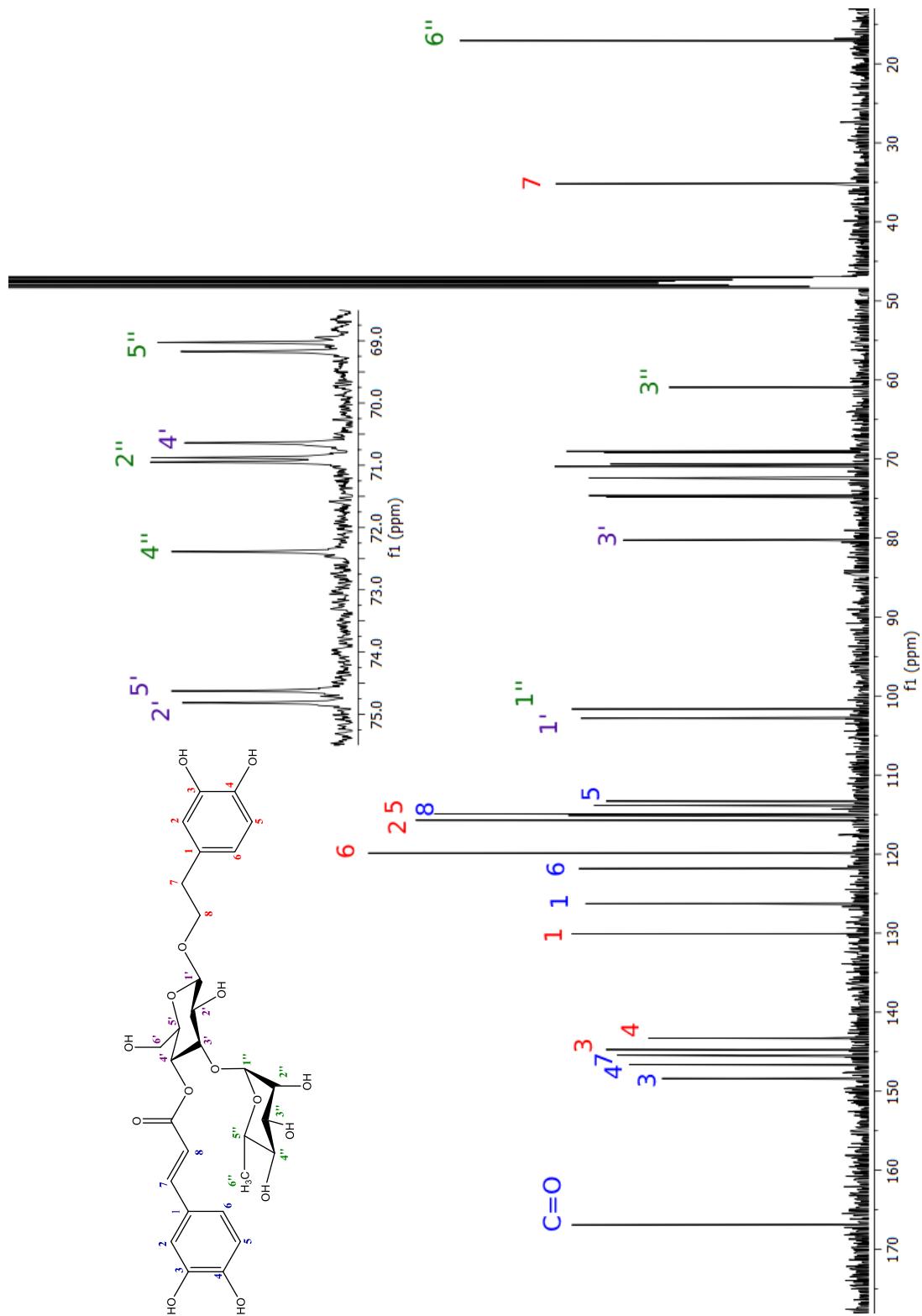


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz) en CD_3OD del verbascósido.

8.2 Espectro de RMN HSQC a 400 MHz en CD₃OD del verbascósido

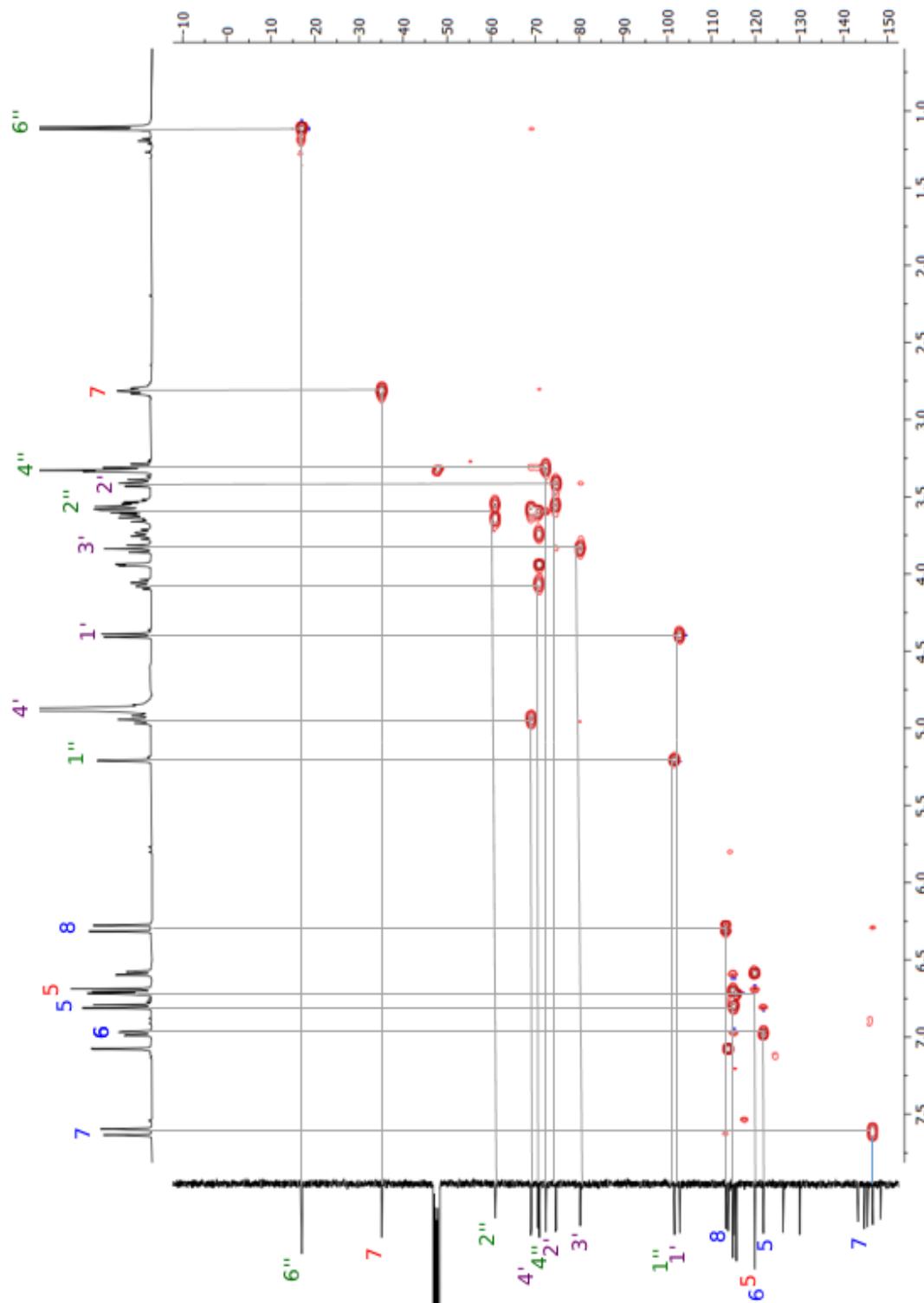


Figura 21. Espectro de RMN HSQC (400 MHz) en CD₃OD del verbascósido.

8.3 Espectro de RMN DEPT 135 del verbascósido

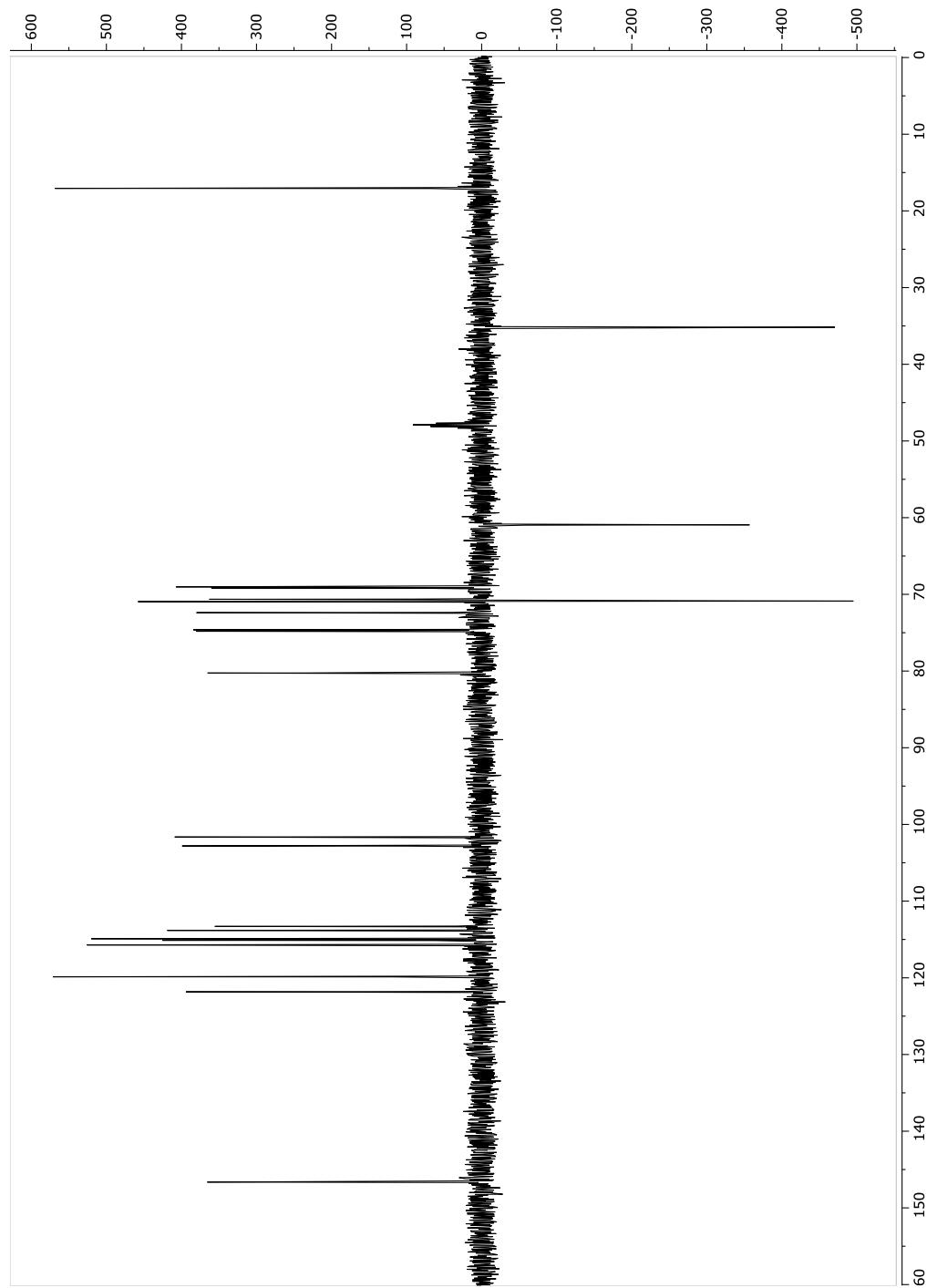
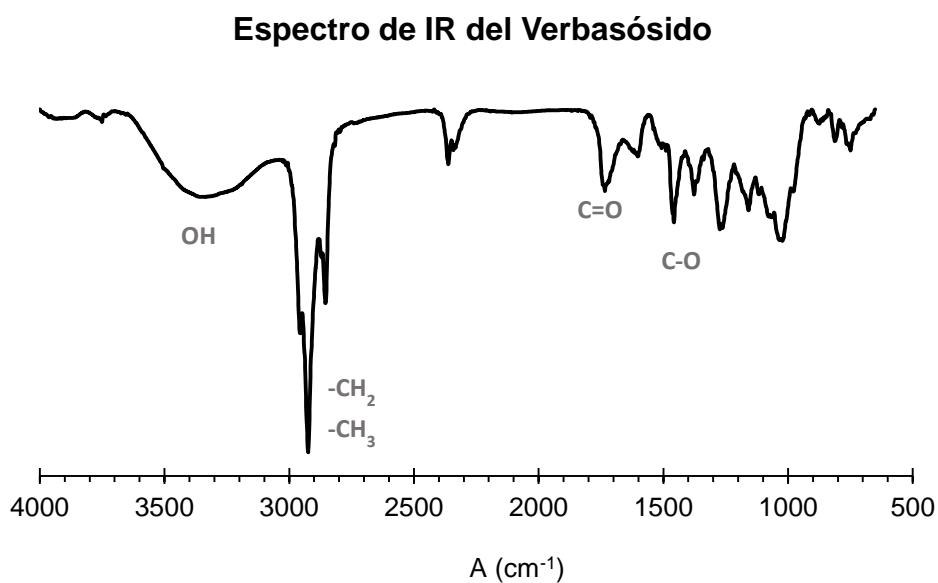
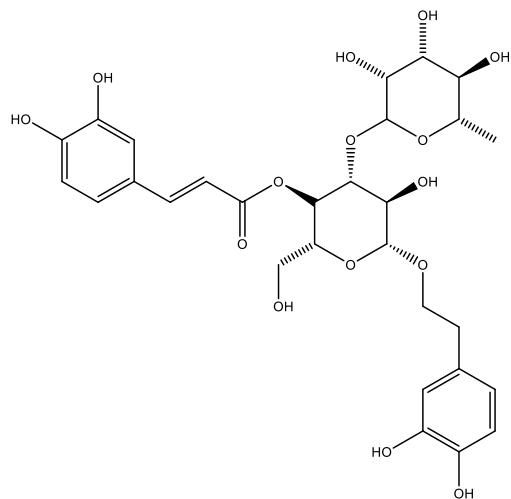


Figura 22. Espectro de RMN DEPT 135 del verbascósido.

8.4 Espectro de IR del verbascósido

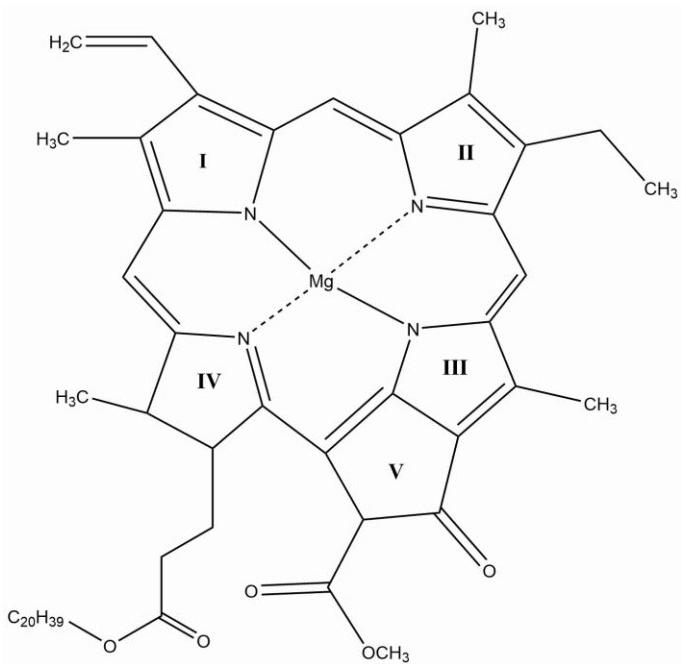


IR_{VMAX} 3345, 2925, 1735, 1602, 1458 cm⁻¹

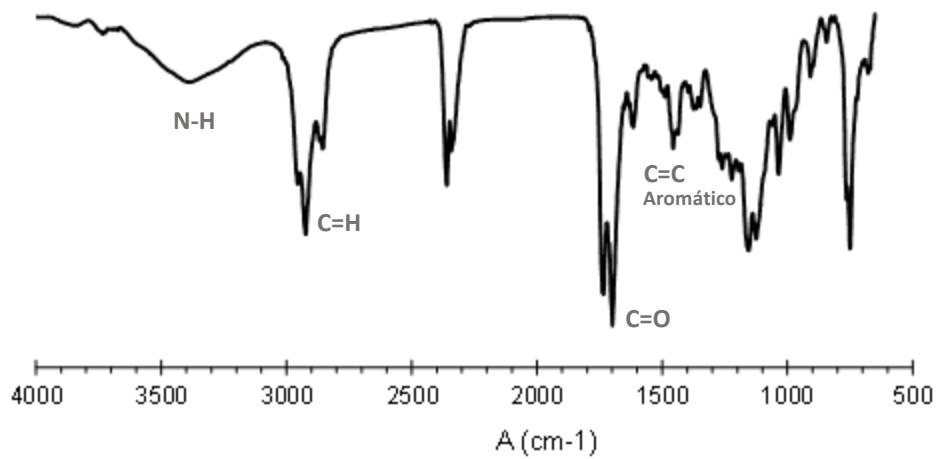
Figura 23. Espectro de Infrarrojo del verbascósido

Verbascósido: muestra oleosa de color amarillo (9.2 mg). R_f de 0.425, en TLC mediante el sistema AcOEt-acetona-H₂O-CH₃COOH (5:4:0.5:0.1). Rotación óptica $[\alpha]_D=-60.8$ ($c = 0.7$, MeOH). Punto de fusión 226.7 °C.

8.5 Espectro de IR de la clorofila



Espectro de IR de la Clorofila



IR_{VMAX} 3389, 2923, 1698, 1617 cm⁻¹

Figura 24. Espectro de Infrarrojo de la clorofila.

Clorofila: sólido verde (22.4 mg). R_f de 0.297, en TLC mediante el sistema Hexano-AcOEt (7:3). Punto de fusión 172 °C.

8.6 Espectro de IR del ácido ursólico

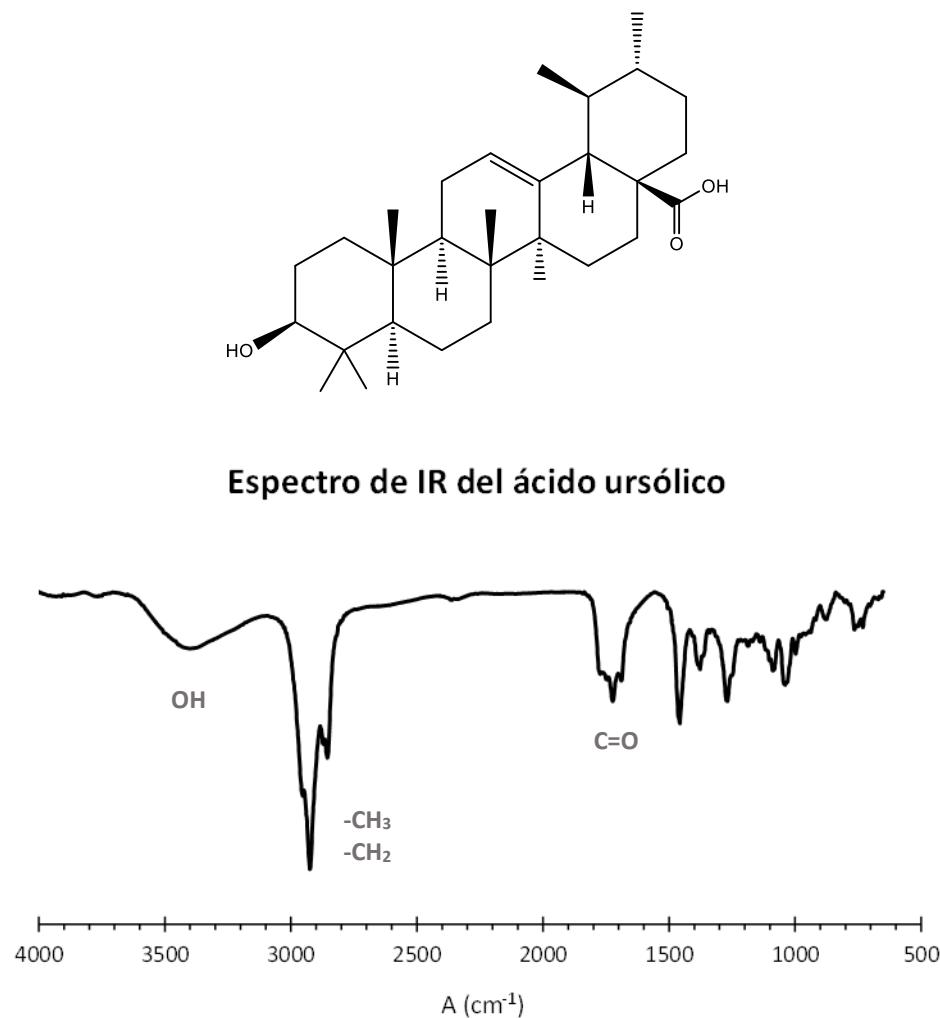


Figura 25. Espectro de Infrarrojo del ácido ursólico.

Ácido ursólico: sólido blanco (1 mg). R_f de 0.43, en TLC mediante el sistema Hexano-AcOEt (7:3). $[\alpha]_D = +19.6$ ($c = 0.05$, $CHCl_3$). Punto de fusión 206 °C.