



---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA**

**LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**Evaluación antioxidante y antiurolítica de extractos de *Eriobotrya japonica in vitro***

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA**

**ANGEL TRINIDAD ISIDRO**

**DIRECTORA**

**Dra. RAQUEL CARIÑO CORTÉS**

**CODIRECTORA**

**Dra. MARITZA LÓPEZ HERRERA**

**Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, 2025.**



Mineral de la Reforma, Hgo., a 28 de febrero de 2025

Número de control: ICBI-D/272/2025  
Asunto: Autorización de impresión.

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

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado al Egresado de la Licenciatura en Biología **Angel Trinidad Isidro**, quien presenta el trabajo de titulación **“Evaluación antioxidante y antiurólítica de extractos de *Eriobotrya japonica* in vitro”**, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

**Presidente:** M. en C. Manuel González Ledesma

**Secretario:** Dra. Maritza López Herrera

**Vocal:** Dra. Raquel Cariño Cortés

**Suplente:** Dr. 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  
direccion\_icbi@uaeh.edu.mx,  
vergara@uaeh.edu.mx



## **Dedicatoria**

A mis padres Máximo y Gaudencia por su gran apoyo, disciplina y paciencia...

A mi pareja, Marina, que siempre me contagiaste de tu enorme carisma y positivismo...

A mi hermano, Alex, que sin saberlo has logrado llenarme de vida e inspiración...

## **Agradecimientos**

*A mis padres, por el apoyo incondicional, la confianza, la paciencia y el amor que recibí, por ser un gran pilar y fuente de inspiración durante toda mi trayectoria profesional hasta la culminación de mis estudios universitarios.*

*A mi pareja, Marina, por los ánimos, las pláticas de superación personal, el gran amor y no dejarme solo durante malos y buenos momentos durante el proceso, que hoy rinden frutos.*

*A mi hermano, por confiar en mí y tu gran entusiasmo que ilumina mi vida.*

*A mis abuelos, Adelaido y Ricarda, por ser una gran fuente de sabiduría y darle vida a este proyecto, sin su conocimiento botánico esta investigación no fuera posible.*

*Agradezco especialmente a:*

*Dra. Raquel Cariño Cortés*

*Dr. Jesús Martín Torres Valencia*

*Dra. Maritza López Herrera*

*Dra. Reyna Zeferino Díaz*

*Dra. Patricia Damián Nava*

*M. en C. Manuel González Ledesma*

*Por fungir como guías en cada área, durante la realización de este trabajo y por sus apreciables enseñanzas, consejos y paciencia.*

*A mis amigos, Gabriela Michelle y Oliver Yarin por guiarme en el laboratorio y hacer más ameno el trabajo, así como sus apreciables aportaciones y conocimientos compartidos en la parte química.*

*A mis grandes amistades de la carrera, Ana y Dayra Naian. Y amistades presentes; Marco Antonio, José Manuel, José Luis, Daniel por los grandes momentos y motivarme día con día.*

*A todas las personas implicadas y no menos importantes en el presente proyecto.*

*¡Por estar presentes muchas gracias!*

## Índice

Índice de figuras .....	7
Índice de tablas .....	9
Tabla de abreviaturas .....	10
Resumen .....	11
Abstract .....	12
1. Introducción .....	13
2. Antecedentes .....	15
2.1. Anatomía renal .....	15
2.2. Fisiología renal .....	16
2.3. Litiasis renal .....	17
2.4. Tratamiento y desventajas .....	20
2.5. Medicina tradicional como alternativa .....	22
2.6. Metabolitos secundarios .....	23
2.7. <i>Eriobotrya japonica</i> como especie potencial ante diversas patologías .....	24
2.8. Actividad biológica de metabolitos secundarios identificados en <i>E. japonica</i> .....	24
2.9. Actividad antioxidante .....	28
2.10. Actividad antiinflamatoria .....	29
2.11. Actividad antidiabética .....	30
2.12. Cromatografía .....	32
2.13. Cromatografía en columna (CC) .....	32
2.14. Cromatografía en capa fina (CCF) .....	33
2.15. Resonancia magnética nuclear de protón (RMN <sup>1</sup> H) .....	35
3. Justificación .....	36
4. Objetivos: .....	37
4.1. General .....	37
4.2. Específicos .....	37
5. Hipótesis .....	38
6. Materiales y métodos .....	39
6.1. Hojas de <i>E. japonica</i> para identificación .....	39
6.2. Extracto etanólico (EtOH) .....	41
6.3. Extracto acetato de etilo (AcOEt) .....	41
6.4. Actividad antioxidante .....	43
6.4.1. Determinación de actividad antirradical por el método DPPH• .....	43
6.4.2. Determinación de actividad antioxidante ABTS•+ .....	44
6.4.3. Determinación antioxidante por reducción del ión férrico FRAP .....	45
6.5. Actividad inhibitoria frente α-glucosidasa .....	46
6.6. Ensayo de cristalización (Cristales de oxalato de calcio) .....	49
Extractos de Cistona .....	49
6.6.1. Nucleación .....	50
6.6.2. Agregación .....	51
6.7. Cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina (CCF) .....	52
7. Resultados .....	56
7.1. Identificación del material vegetal .....	56

7.2.	Obtención de los extractos .....	57
7.2.1.	Extracto etanólico (EtOH) .....	57
7.2.2.	Extracto de acetato de etilo (AcOEt) .....	57
7.3.	Actividad antioxidante .....	58
7.4.	Actividad inhibitoria frente alfa glucosidasa .....	61
7.5.	Ensayos de cristalización .....	63
7.6.	Cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina (CCF) .....	65
8.	Discusión de resultados .....	69
8.1.	Rendimiento de extractos .....	69
8.2.	Actividad antioxidante .....	72
8.2.1.	Ensayo de DPPH• .....	72
8.2.2.	Ensayo de ABTS•+ .....	74
8.2.3.	Ensayo de FRAP+ .....	75
8.3.	Actividad inhibitoria frente $\alpha$ -glucosidasa .....	76
8.4.	Ensayo de cristalización (Cristales de oxalato de calcio) .....	77
8.5.	Cromatografía y resonancia magnética nuclear .....	79
9.	Conclusiones .....	80
10.	Bibliografía .....	81
11.	ANEXOS .....	90
11.1.1.	Método de DPPH .....	90
11.1.2.	Método de ABTS•+ .....	91
11.1.3.	Método de FRAP .....	92
13.	Imágenes al microscopio del ensayo de cristalización .....	95

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Corte sagital del riñón. ....	16
<b>Figura 2.</b> Proceso de formación de un cálculo de oxalato de calcio. Tomado y modificado de: Oner et al., 2008 .....	19
<b>Figura 3.</b> Sedimento urinario de pacientes con cálculos de oxalato de calcio (a), cistina (b), estruvita (c), fosfato de calcio (d), ácido úrico (e). Tomado de: Kasper et al., 2016; Das et al., 2017; Abba et al., 2015; y Luciano & Perazella, 2015. ....	20
<b>Figura 4.</b> Diagrama esquemático que ilustra la separación por cromatografía en columna de un extracto de los componentes A y B. Tomado de: Skoog <i>et al.</i> , 2013. ....	33
<b>Figura 5.</b> Cromatografía en capa fina ascendente. Esquemas y fotografías tomados de: A) Corzo, 2019; B) Fotografía proporcionada por Oliver Yarin Espinosa García en el laboratorio del AAQ. ....	34
<b>Figura 6.</b> Polígono muestreado (parcela). Imagen procesada con Google Earth de autoría propia. ....	40
<b>Figura 7.</b> Esquematación del proceso de colecta y obtención de extractos en etanol-acetato de etilo. ....	42
<b>Figura 8.</b> A) Estructura del DPPH previo a la reacción y B) después de la reacción antioxidante. Tomado de: Tovar & Marino, 2013. ....	43
<b>Figura 9.</b> A) Estructura del ABTS <sup>•+</sup> antes de la reacción y B) después de la reacción antioxidante. Tomado de: Tovar & Marino, 2013. ....	44
<b>Figura 10.</b> Estructura del FRAP antes y posterior de la reacción. Tomado de: Vázquez-Ovando, 2022. ....	46
<b>Figura 11.</b> Hidrólisis enzimática del p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (p-NFGP) por acción de la $\alpha$ -Glucosidasa ( $\alpha$ -GLC) liberando unidades de p-nitrofenolato y $\alpha$ -D-glucosa. Tomado de: Avellaneda, 2013. ....	47
<b>Figura 12.</b> Acomodo esquemático de los tubos de ensaye de los extractos (100-1,000 $\mu$ g/mL), control y los blancos del ensayo de nucleación. ....	51
<b>Figura 13.</b> Acomodo esquemático de los tubos de ensaye de los extractos (100-1,000 $\mu$ g/mL), control y los blancos del ensayo de agregación. ....	52
<b>Figura 14.</b> A) Árbol de <i>Eriobotrya japonica</i> (E. japonica) en la parcela. B) Hoja de E. japonica. vista abaxial (envés de la hoja) C) Hoja de E. japonica. vista adaxial (haz de la hoja). ....	56
<b>Figura 15.</b> Actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método de DPPH $\cdot$ de los extractos EtOH y AcOEt de las hojas de <i>Eriobotrya japonica</i> . ....	59
<b>Figura 16.</b> Actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método de ABTS $\cdot+$ de los extractos EtOH y AcOEt de las hojas de <i>Eriobotrya japonica</i> .....	60
<b>Figura 17.</b> Actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método de FRAP de los extractos EtOH y AcOEt de las hojas de <i>E. japonica</i> . ....	61
<b>Figura 18.</b> Actividad inhibitoria frente a $\alpha$ -glucosidasa del extracto EtOH de las hojas de <i>Eriobotrya japonica</i> , cada concentración fue corrida por triplicado. ....	62
<b>Figura 19.</b> Actividad inhibitoria frente a $\alpha$ -glucosidasa del extracto AcOEt de las hojas de <i>Eriobotrya japonica</i> , cada concentración fue corrida por triplicado. ....	62

<b>Figura 20.</b> Porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos (EtOH), acetato de etilo (AcOEt) frente a la cistona (Cys) como control en las concentraciones evaluadas. Dónde * es $P < 0.5$ , ** $P < 0.001$ y *** $P < 0.0001$ .....	64
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos (EtOH), acetato de etilo (AcOEt) ante la cistona (Cys) como control dentro de las concentraciones evaluadas. Dónde * es $P < 0.05$ , ** $P < 0.001$ y *** $P < 0.0001$ .....	65
<b>Figura 22.</b> Ejemplo de agrupación al aplicar CCF al observar que se tienen compuestos similares a la misma altura (Columna 1). .....	67
<b>Figura 23.</b> Aglomeración de compuestos en la agrupación 20-26 de la columna 1, visibles a luz ultravioleta (UV) aplicando CCF sin aplicar revelador (CoCl). .....	67
<b>Figura 24.</b> Comparación del extracto de la agrupación 18-28 resultante de la columna 2 (REJ) frente a la referencia de ácido oleanólico (RAO). .....	68
<b>Figura 25.</b> Gráfica de comparativa del clima en Jordania (Aqaba); con distintos factores climáticos. Gráfico tomado de: Weather Spark, 2024. ....	71
<b>Figura 26.</b> Gráfica de comparativa del clima en Putian, Fujian, China; con distintos factores climáticos. Gráfico tomado de: Weather Spark, 2024. ....	72
<b>Figura 27.</b> Gráfica de comparativa del clima en Túnez; con distintos factores climáticos. Gráfico tomado de: Weather Spark, 2024. ....	72
<b>Figura 28.</b> Curva patrón para la determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> por el método de DPPH. ....	91
<b>Figura 29.</b> Curva patrón para la determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> por el método de ABTS•+. ....	92
<b>Figura 30.</b> Curva patrón para la determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> por el método de FRAP. ....	93

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Compuestos reportados en <i>E. japonica</i> .....	25
<b>Tabla 2.</b> Coordenadas UTM del polígono de estudio (parcela).....	40
<b>Tabla 3.</b> Sistemas empleados en CC (Columna 1).....	53
<b>Tabla 4.</b> Sistemas empleados en CC (Columna 2).....	54
<b>Tabla 5.</b> Valores de la actividad antioxidante in vitro de los extractos EtOH y AcOEt de las hojas de <i>Eriobotrya japonica</i> .....	58
<b>Tabla 6.</b> Agrupaciones de los eluatos aplicando CCF de la columna uno.....	65
<b>Tabla 7.</b> Agrupaciones de los eluatos aplicando CCF de la columna dos.....	66
<b>Tabla 8.</b> Preparación de las soluciones para la curva patrón Trolox.....	90
<b>Tabla 9.</b> Preparación de las soluciones para la curva patrón Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS•+.....	91

## Tabla de abreviaturas

<b>°C</b>	Grados centígrados	<b>M</b>	Mol
<b>A.C</b>	Antes de Cristo	<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>ABTS<sup>•+</sup></b>	ácido 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)	<b>hrs</b>	Horas
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo	<b>p-NFGP</b>	p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio
<b>CC</b>	Cromatografía en columna	<b>Pe</b>	Punto de ebullición
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina	<b>CoCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de cobalto
<b>cm</b>	Centímetros	<b>MeOH</b>	Metanol
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2	<b>Mg</b>	Miligramos Equivalentes Trolox
<b>D.C</b>	Después de Cristo	<b>EqTrolox</b>	
<b>DM</b>	Diabetes mellitus	<b>TPTZ</b>	2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triacina
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil	<b>L</b>	Litro
<b><i>E. japonica</i></b>	<i>Eriobotrya japonica</i>	<b>Cys</b>	Cistona
<b>Ej.</b>	Ejemplo	<b><math>\mu</math>M</b>	Micromol
<b>ERN</b>	Especies reactivas de Nitrógeno	<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ERO's</b>	Especies reactivas de Oxígeno	<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O</b>	Fosfato de sodio monobásico monohidrato
<b>EtOH</b>	Etanol	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>FRAP</b>	Poder de reducción antioxidante del ion férrico	<b>BGC</b>	Línea de células de la granulosa bovina
<b>g</b>	Gramos	<b>Bel-7402</b>	Línea celular maligna humana proveniente de cáncer cervical
<b>Hgo</b>	Hidalgo	<b>HeLa</b>	Línea celular maligna humana proveniente de cáncer cervical de Henrietta Lacks
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1-beta	<b>Fe<sup>3+</sup>-TPTZ</b>	Complejo férrico tripiridil triazina
<b>IL-6</b>	Interleucina 6	<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible	<b>AINEs</b>	Antiinflamatorios no esteroideos
<b>kg</b>	Kilogramos	<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>mg</b>	Miligramos	<b>msnm</b>	metros sobre el nivel del mar
<b>Min</b>	Minutos	<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>mL</b>	Mililitros	<b><math>\alpha</math>-GLC</b>	$\alpha$ -Glucosidasa
<b>mm</b>	Milímetros	<b>mV</b>	milivoltios
<b>mM</b>	Milimol	<b>-OH</b>	radical hidróxilo
<b>N</b>	Norte	<b>CAS</b>	Chemical Abstracts Service identificación numérica única para compuestos químicos
<b>nm</b>	Nanómetros	<b>UTM</b>	Universal Transverse Mercator (Sistema de coordenadas)
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear		
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear de protón		
<b>sPLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>		
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa		
<b>UV</b>	Ultravioleta		
<b>W</b>	Oeste		
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa		
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro		

## Resumen

*Eriobotrya japonica* (*E. japonica*) o Níspero, es un árbol frutal de la familia Rosaceae, sus hojas se utilizan ampliamente en la medicina herbaria tradicional para tratar alteraciones pulmonares, gástricas y renales. Es una especie subtropical introducida, entre los principales compuestos de interés se encuentran los polifenoles, flavonoides, sesquiterpenos, saponinas, ácidos orgánicos, entre otros. En el presente trabajo se obtuvieron los extractos en etanol y acetato de etilo por maceración y concentración en rotavapor. Los resultados indicaron que ambos extractos tuvieron una buena actividad capturante de iones hierro con FRAP<sup>+</sup>. Inhibieron en al menos 97% la actividad de la alfa-glucosidasa en comparación con la acarbosa (70%) para ambos extractos obtenidos de *E. japonica*. Además, fueron efectivos en la inhibición de la formación de urolitos de oxalato de calcio *in vitro* en fases tempranas (nucleación) donde se llega a un nivel de sobresaturación determinado (alto o bajo), en particular, un nivel de sobresaturación bajo induce la aparición de la litiasis en el tracto urinario promoviendo así la aglomeración de moléculas cristalinas, finalmente se evidenció la presencia de ácido ursólico y ácido oleanólico, posibles candidatos para la actividad antiurolítica, mediante técnicas de cromatografía en columna(CC) y capa fina (CCF) para su identificación y resonancia magnética nuclear (RMN) para la determinación de las estructuras.

## **Abstract**

*Eriobotrya japonica* (*E. japonica*), commonly known as loquat, is a fruit tree that belongs to the Rosaceae family. Leaves of *E. japonica* are widely used in traditional herbal medicine for the treatment of pulmonary, gastric, and renal disorders. This subtropical species has been introduced, and among the key compounds of interest are polyphenols, flavonoids, sesquiterpenes, saponins, and organic acids, among others. In the present study, ethanol and ethyl acetate extracts were obtained through maceration and concentration using a rotary evaporator. The results indicated that both extracts exhibited good iron ion chelation activity with FRAP+. They inhibited  $\alpha$ -glucosidase activity by at least 97%, in comparison to acarbose (70%) for both extracts obtained from *E. japonica*. Additionally, they were effective in inhibiting the formation of calcium oxalate uroliths in vitro during the early stages (nucleation), reaching a determined level of supersaturation (high or low). Notably, a low level of supersaturation induces the formation of urinary tract stones, promoting the aggregation of crystalline molecules. Finally, the presence of ursolic acid and oleanolic acid, potential candidates for anti-urolithic activity, was evidenced through column chromatography (CC) and thin-layer chromatography (TLC) for identification, and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy for structural determination.

## 1. Introducción

La litiasis renal tiene una prevalencia mundial de alrededor de 2-20%, en México los datos epidemiológicos son casi nulos por la carencia de registros de atención hospitalaria que corresponden a este padecimiento (Ortegón-Gallareta *et al.*, 2019), la litiasis se caracteriza por la formación de cristales de composición diversa, pero la aglomeración de estos compuestos es denominada de manera técnica como cálculos, litos o “piedras en el riñón” coloquialmente, dicha aglomeración afecta principalmente a las vías del tracto urinario (Atilano & Espinosa, 2003). Entre los principales factores toma renombre la susceptibilidad genética, dicho de otro modo, existe una predisposición hereditaria y se presentan en familias con antecedentes de litiasis renal. Desde luego, participan otros factores que dan lugar a la formación de cristales como los factores medioambientales en donde la baja ingesta de líquidos y la dieta tienen gran relevancia (Negri *et al.*, 2013).

El cólico nefrítico es uno de los motivos de consulta de urgencia más frecuentes, es un dolor intenso causado por la obstrucción de las vías urinarias, su tratamiento farmacológico está dirigido a aliviar el dolor y facilitar la expulsión del cálculo. En esta directriz, se recomienda el uso de la escalera analgésica de la Organización Mundial de la Salud (OMS), creada inicialmente para el tratamiento del dolor relacionado con el cáncer, pero aplicable para tratar cualquier tipo de dolor. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), opioides, antiespasmódicos y corticoides para reducir la percepción del dolor y bloqueadores de canales de calcio y alfa-bloqueadores para facilitar la expulsión del cálculo. Sin embargo, todos tienen efectos adversos que van desde mareos, cefalea, retención urinaria, taquicardia, depresión respiratoria hasta la tolerancia y el riesgo de dependencia (IMSS, 2019). Por lo tanto, es importante investigar alternativas naturales eficaces y seguras, cuyos metabolitos secundarios presentes en especies de plantas que se han utilizado tradicionalmente aún no se tenga suficiente evidencia científica.

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos que demuestran una expresión de individualidad de las especies, de modo que todos los metabolitos en

las especies desempeñan algún papel vital para el bienestar del productor (Wink, 2002). Estos últimos están implicados en su crecimiento, desarrollo y reproducción, además de que los metabolitos secundarios juegan un papel muy importante en la respuesta evolutiva para su adaptación ante el estrés ambiental y en la defensa frente a potenciales depredadores y patógenos. La bioactividad de los metabolitos ha sido estudiada con gran interés, específicamente en el área de la farmacéutica, cosmética, agrícola y nutracéutica (Suárez-Medina & Coy-Barrera, 2016).

Dentro de la familia Rosaceae, existe un grupo significativo de angiospermas con 46 especies registradas en Hidalgo de las cuales solo una es endémica dentro del estado. Entre dicha familia se encuentra el género *Eriobotrya* con aproximadamente 30 especies nativas de Asia, una de ellas el níspero, *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl., es ampliamente cultivada al punto de ser naturalizada localmente (Rzedowski, 2021). El níspero es considerado un remedio ancestral dentro de la medicina tradicional y que además ha demostrado ser un remedio casero potencial para tratar la diabetes mellitus, enfermedades inflamatorias y problemas cardíacos, esto gracias a las propiedades biológicas, entre ellas antioxidante, antitumoral, antibacteriano y antiinflamatorio que contienen las hojas y frutos del árbol (Khouya *et al.*, 2022), sin embargo los estudios científicos enfocados a la actividad antiurolítica son empíricos (Mokdad *et al.*, 2015), hasta el momento no existen estudios específicos y concluyentes que validen su eficacia en el tratamiento directo de los cálculos biliares. Por tanto, el presente proyecto pretende evaluar el efecto de los extractos de *E. japonica* en pruebas de actividad antioxidante y antiurolítica (cristales de oxalato de calcio) con el fin de aportar al registro de usos medicinales obtenidos a partir del níspero, además de incentivar a su conservación y aportar evidencias del uso tradicional dentro de la comunidad de Ixtlapala, Tlanchinol, Hgo., localidad de inspiración para este proyecto de investigación.

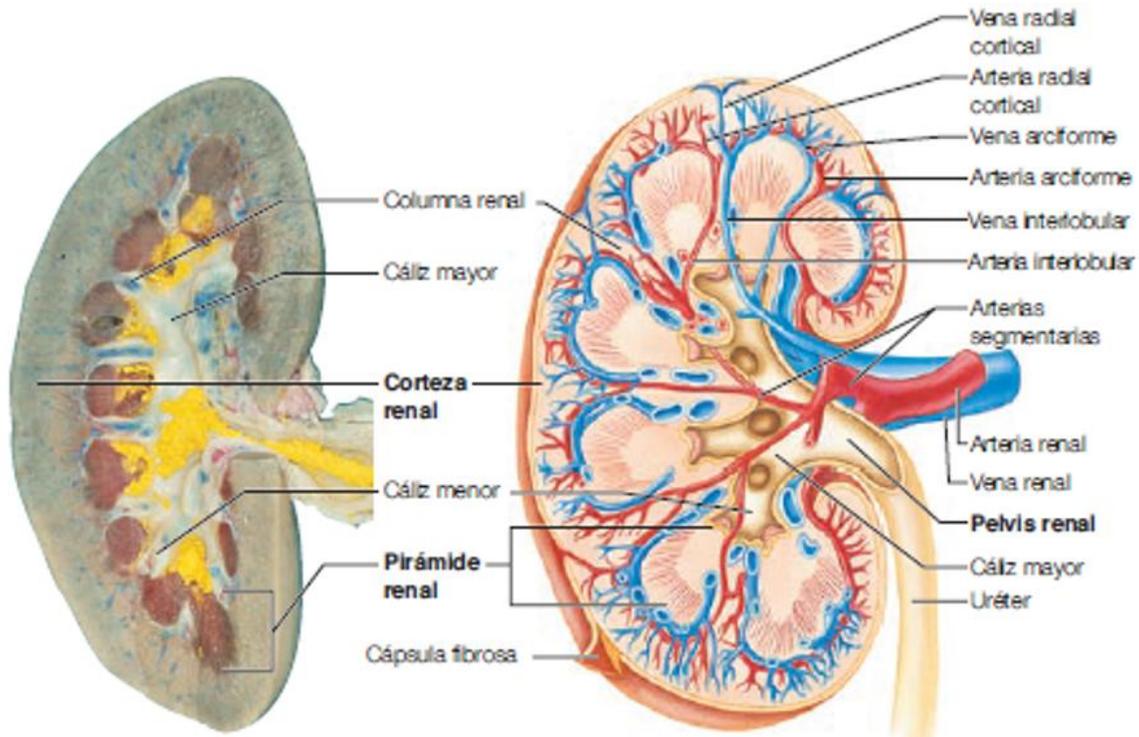
## **2. Antecedentes**

### **2.1. Anatomía renal**

El sistema urinario está constituido principalmente por los riñones que son dos órganos responsables de producir la orina, misma que es conducida en los conductos excretores, donde se localizan los cálices, pelvis y uréteres, hacia la vejiga. Posteriormente, es evacuada fuera del organismo por medio de la uretra. Los riñones presentan un rasgo distintivo, que es que presentan una morfología muy parecida a la de una habichuela, además de ser alargados y aplanados. Posee dos caras: una anterior que se caracteriza por ser lisa y convexa, mientras que la posterior es casi plana, por otra parte, los riñones también poseen polos; el superior es redondeado y ancho, mientras que el polo inferior tiene la singularidad de ser más fino y alargado (Figura 1) (Gabriel, 2015).

Las longitudes de cada riñón generalmente van de los 10-12 cm de largo, de 5 a 7 cm de ancho y 3 cm de espesor, el peso es variable según el sexo puesto que los riñones en mujeres rondan los 135 g mientras que en los hombres es de 150 g, el color distintivo que poseen los riñones es rojo violáceo con una consistencia firme. Los riñones se mantienen fijos debido a una envoltura fibrosa, que es estructuralmente laminar de tejido conectivo que no se limita a extenderse alrededor del riñón, esto es, abarca a la glándula suprarrenal además de una cápsula adiposa, definiéndose como una cubierta de tejido adiposo blando que tiene lugar entre la fascia renal y la cápsula fibrosa dando paso al recubrimiento íntimo del riñón denominando espacio perirrenal (Gabriel, 2015).

Las nefronas son unidades funcionales y estructurales del riñón, cada nefrona cuenta con un glomérulo y un túbulo renal. Dentro de cada túbulo renal está contenida por una cápsula glomerular, túbulo contorneado proximal, asa de Henle y el túbulo contorneado distal. Las principales funciones que cumplen las nefronas son: la filtración, reabsorción y la excreción, esta última es sumamente importante para sacar del organismo fármacos y el exceso de iones, todo esto para mantener el equilibrio ácido-base en sangre (Marieb, 2008).



**Figura 1.** Corte sagital del riñón. Pueden observarse las estructuras que conforman el órgano y que clásicamente se conocen como corteza externa y regiones internas de la médula. La médula se divide en 8-10 masas de tejido en forma de cono llamadas pirámides renales. La base de cada pirámide se origina en el borde entre la corteza y termina en la papila, que se proyecta en el espacio de la pelvis renal. El borde externo de la pelvis renal se divide en los cálices mayores, que se extienden hacia abajo y se dividen en los cálices menores, que recogen la orina de los túbulos de cada papila. Esquema tomado de: Marieb, 2008.

## 2.2. Fisiología renal

Los riñones se encargan de mantener la pureza y el flujo constante de los fluidos internos, concretamente, son órganos homeostáticos del equilibrio hidroelectrónico. El filtrado de los fluidos propicia la expulsión de los iones en exceso y los desechos fuera del organismo por medio de la orina, simultáneamente, se reabsorben sustancias necesarias para ajuste preciso del volumen y de la composición urinaria que permita una homeostasis o equilibrio hidroelectrolítico y

por lo tanto del pH fisiológico. A la par que las funciones excretoras, los riñones regulan el volumen de la sangre, así como también de la composición química con el propósito de mantener el equilibrio entre el agua, las sales, ácidos y bases. Por otra parte, los riñones adquieren otras funciones reguladoras, como la producción de renina, enzima encargada de regular la presión sanguínea y la hormona eritropoyetina (propia de la enzima) que induce a la producción de glóbulos rojos en la médula ósea. Además de que ciertos órganos del aparato urinario como lo son: uréteres, la vejiga y la uretra almacenan temporalmente la orina y son conductos para llegar de una zona a otra (Marieb, 2008). Finalmente, los riñones se ven involucrados en el metabolismo de calcio, específicamente en la absorción de este mineral, por medio de una conversión del precursor en 1,25-dihidroxitamina D, proveniente de la vitamina D en la forma activa (Gabriel, 2015).

### **2.3. Litiasis renal**

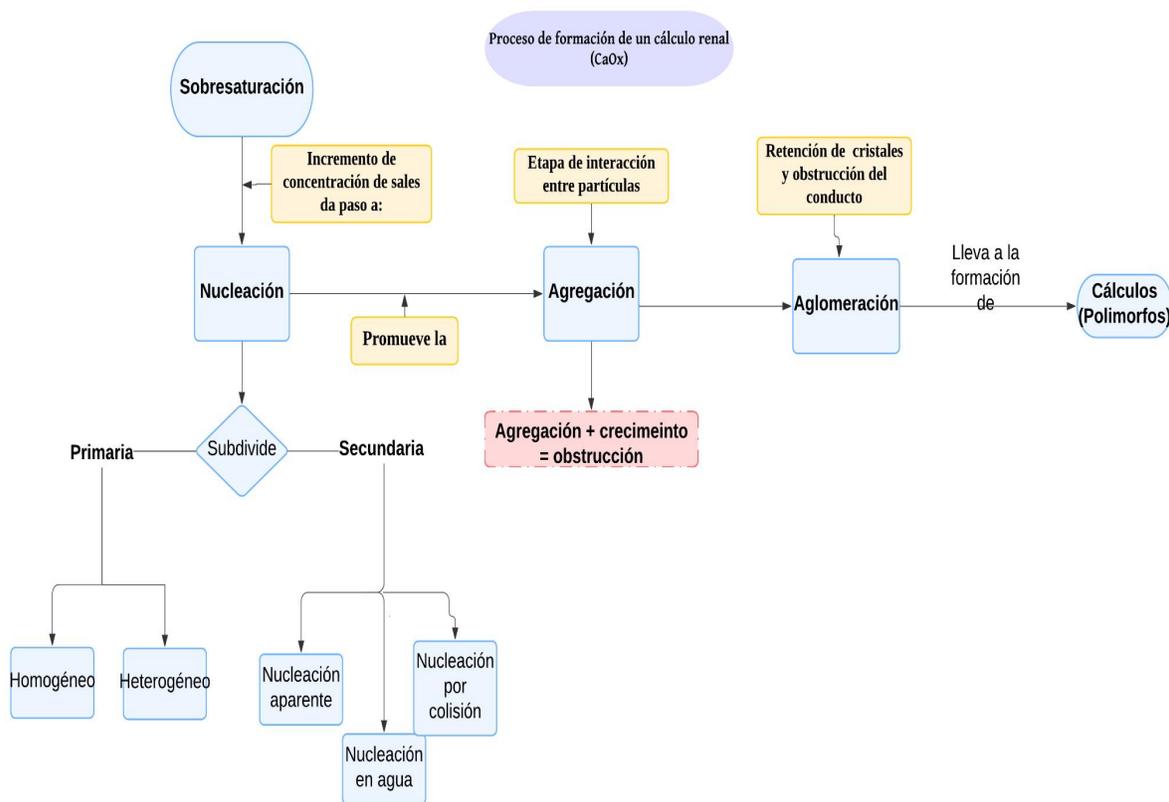
La litiasis renal o urolitiasis es una comorbilidad caracterizada por la aparición de cálculos que se alojan en el aparato urinario superior, suele ser asintomático, pero puede provocar hematuria (Kasper *et al.*, 2009). El síntoma más común es el cólico nefrítico que tiene lugar cuando el cálculo se rompe, posteriormente se deposita en el sistema colector del riñón, esto provoca el incremento de la presión intraluminal dando como resultado el cuadro doloroso (Boix *et al.*, 2007). La patología ha estado presente en el ser humano desde tiempo atrás, pues se tienen registros en momias egipcias y habitantes de lo que actualmente es Arizona. Aulus Cornelius Celsus (25 A.C.-50 D.C.), un enciclopedista muy importante en la medicina romana, fue el pionero en la implementación de algunas técnicas de litotricia como procedimiento para extraer los cálculos vesicales. No fue hasta la llegada de los rayos X que los cálculos ubicados en el riñón fueron diagnosticados con imagenología (Gacía-Nieto, 2013).

La litiasis renal es la tercera patología más frecuente en nefrología, después de la infección urinaria y la enfermedad benigna de próstata (Boix *et al.*, 2007), sin embargo, este padecimiento de acuerdo con Ortegón-Gallareta *et al.*, (2019)

aqueja entre el 2 y 20% de la población mundial. Actualmente se considera un padecimiento de origen idiopático, no obstante, se tiene certeza que algunas personas tienen mayor predisposición a presentar litiasis renal por cuestiones genéticas, sumado a una baja ingesta de agua y la dieta que se emplea cotidianamente (Negri *et al.*, 2013).

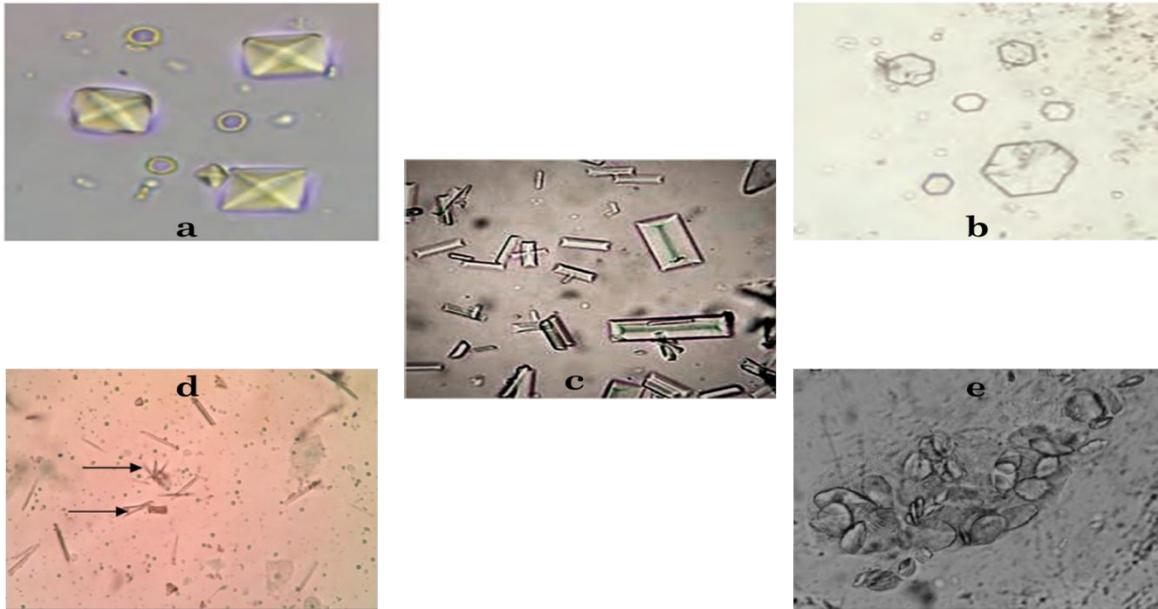
La formación de un cálculo renal (cristalogénesis) es consecuencia de un incremento en la concentración de sales a nivel urinario, lo anterior sucede en cuatro etapas (Figura 2): sobresaturación de la sal, aparición de un núcleo de cristales, retención de cristales en el epitelio (agregación) y finalmente la formación del cálculo (Herrera *et al.*, 2020); la sobresaturación se interpreta como una fuerza que obliga a la sal disuelta en la orina a transformarse en sólido, además intervienen fuerzas termodinámicas que propician la sobresaturación, por ende, a altas concentraciones de sales mayor saturación y esto promueve la cristalización. Posteriormente, la nucleación tiene lugar al obtenerse un nivel de sobresaturación determinado (alto o bajo), en particular, un nivel de sobresaturación bajo induce la aparición de la litiasis en el tracto urinario. El crecimiento, fase intermedia entre la nucleación y la agregación, determina el crecimiento de las moléculas cristalinas rudimentarias a cristales más desarrollados y de mayor tamaño dependiendo de la sobresaturación y el flujo de la orina (Sánchez, 2016).

Luego, en la agregación que resulta en una de las fases más importantes en la cristalogénesis intervienen fuerzas de atracción electrostáticas, simultáneamente existen interacciones entre macromoléculas renales y partículas cristalinas, por tal motivo, en cuestión de segundos pueden llegar a formarse cristales de hasta 200  $\mu\text{m}$ , tamaño suficiente para fijarse en el riñón y preparar el terreno al cálculo ya formado para obstruir el conducto colector de la orina (Sánchez, 2016). La sobresaturación de componentes a nivel urinario puede ocurrir por diversos factores, por mencionar algunos ejemplos: el volumen urinario reducido, excreción excesiva o bien insuficiente de compuestos, el pH urinario que genera una reducción en la solubilidad, etc. (Kasper *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Proceso de formación de un cálculo de oxalato de calcio. Tomado y modificado de: Oner et al., 2008.

Los tipos de cristales, según Herrera *et al.*, (2020); va a depender del componente principal, entre ellos el oxalato de calcio, fosfato de calcio, ácido úrico, estruvita y cistina (Figura 3). El pH favorece la formación de ciertos tipos de cálculos, tal es el caso de una orina con un  $\text{pH} < 5.6$  promueve la formación de cálculos de ácido úrico y cistina mientras que una orina con un  $\text{pH} > 6.8$  favorece a los de tipo fosfato de calcio y estruvita (magnesio-amonio-fosfato), en cambio los cálculos de oxalato de calcio no presentan una relación con el pH, pero de acuerdo con Kasper *et al.*, (2009) el 75% de las veces, los pacientes presentan cálculos de oxalato y fosfato de calcio en conjunto con otros cálculos mixtos mientras que el 15% corresponde a los cálculos de estruvita (magnesio-amonio-fosfato), el 5% de ácido úrico y finalmente solo el 1% a cálculos de cistina.



---

**Figura 3.** Sedimento urinario de pacientes con cálculos de oxalato de calcio (a), cistina (b), estruvita (c), fosfato de calcio (d), ácido úrico (e). Tomado de: Kasper et al., 2016; Das et al., 2017; Abba et al., 2015; y Luciano & Perazella, 2015.

---

## 2.4. Tratamiento y desventajas

La manifestación más común de la litiasis es el cólico nefrítico o cólico renouretral. Se trata de la presencia de cálculos en las papilas renales que frecuentemente migran hacia el uréter, ocasionando un cólico renouretral, caracterizado por un dolor intenso en la región lumbar o en sus flancos. El tratamiento tiene la finalidad de mitigar el dolor. Por otro lado, existe un tratamiento no farmacológico donde no se requiere de un fármaco como intermediario, y finalmente un tratamiento médico expulsivo, cuyo propósito es la eliminación del cálculo; siempre y cuando los cálculos sean pequeños, menores a 5 mm, ya que si el tamaño aumenta la probabilidad de expulsión se reduce, en consecuencia, el rango para una fácil expulsión sin usar algún analgésico ronda desde 1 mm a 5 mm con una probabilidad de hasta un 80% (Ferrer *et al.*, 2018).

*Tratamiento farmacológico:* la primera opción son los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), por ejemplo, el diclofenaco por vía intramuscular, que

reporta mayor evidencia para tratar el cólico nefrítico, además del ketorolaco, pero con un uso limitado debido a sus efectos nefrotóxicos. Como segunda opción se encuentran los opioides tales como el tramadol y la dipirona (metamizol).

- Desventajas: Fármacos como el ketorolaco ofrecen buena eficacia como el diclofenaco del cual cuenta con buena evidencia en su eficacia, pero tiene más efectos secundarios en comparación del diclofenaco. Mientras que, en el caso de los opioides, los cuales se indican cuando no existe un efecto o respuesta de los AINES ante el cólico nefrítico, pero estas pueden desencadenar efectos negativos mucho más pronunciados como: vómito, náuseas, estreñimiento y depresión respiratoria. Finalmente, la dipirona es otro fármaco que tiene cabida en el tratamiento del cólico nefrítico, pero se caracteriza por una baja eficacia en relación con los fármacos antes mencionados (Ferrer *et al.*, 2018).

*Tratamiento no farmacológico:* No existe evidencia para una recomendación concreta cuando se sufre del dolor agudo provocado por la obstrucción de los cálculos en la vía colectora, se habla de baños con agua caliente, así como también de la ingesta excesiva de líquidos, en cambio esto podría ser desacertado durante la fase aguda puesto que existe la posibilidad de favorecer a la sintomatología y la ruptura de la vía urinaria (Ferrer *et al.*, 2018).

*Tratamiento expulsivo:* Basado en el efecto o capacidad de distintos fármacos para disminuir el tono basal, contracciones, y peristaltismos ureterales facilitando su expulsión, entre ellos se encuentran los:

A) Los alfa-bloqueadores: particularmente la tamsulosina con 0.4 mg/día es la que reporta mayor eficacia para la expulsión de cálculos y la disminución de intensidad del dolor.

B) Bloqueantes del canal de calcio: en este grupo se encuentra el nifedipino como el más eficaz, ya que muestra un menor tiempo o periodo de expulsión similar a la tamsulosina.

C) Corticoides, no se tiene evidencia que respalde su uso en monoterapia, pero como complemento con los alfa-bloqueadores aceleran la expulsión en comparación con los alfa-bloqueadores de manera independiente.

D) Finalmente, dentro de los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 se destaca al tadalafilo con 10 mg/kg por día, debido a que demuestra un aumento en la probabilidad de expulsión en primera instancia, pero existen pocos estudios para mayor confianza en su implementación.

Desventajas: A) alfa-bloqueares se limita a casos de litiasis <10 mm y ubicadas en el uréter distal. B) Bloqueantes del canal de calcio: implican un riesgo de hasta el 15% de efectos negativos como hipotensión, palpitaciones, cefalea, vómitos y astenia. C) Corticoides: los resultados de eficacia son muy bajos, además de tener un perfil elevado de efectos secundarios al igual que los D) inhibidores de la fosfodiesterasa 5, que tienen escasa evidencia y respaldo para su uso (Ferrer *et al.*, 2018).

## **2.5. Medicina tradicional como alternativa**

La medicina tradicional es un fenómeno vigente dentro de la cultura mexicana que en términos generales se define como un conjunto de recursos y métodos curativos transmitidos y heredados que se explican desde una vertiente de cómo entender al mundo, mejor conocido como cosmovisión (Almaguer, 2003). El conocimiento empírico de la medicina tradicional no se limita al tratamiento o la prevención de enfermedades, ya que comprende desde prácticas curativas hasta un factor de identidad con raíces de los pueblos indígenas, además de cumplir un rol como acervo de basta información. La idea central de esta cosmovisión acorde con Almaguer, (2003) es que todo está conectado, por tanto, las partes del cuerpo humano se encuentran en una estrecha relación con los demás seres vivos (plantas, animales, objetos, seres humanos) y la naturaleza.

Lo anterior concibe un motivo para considerar a la medicina tradicional como una buena alternativa para explorar e indagar entre el amplio repertorio de conocimientos de carácter milenario, que sobreviven de generación en generación. Por lo cual, hace constar una relación próxima entre disciplinas con un objetivo en común, el diseñar e implementar programas de investigación y desarrollo que fomente la participación de distintos campos, tales como la etnobotánica (rama de la biología) y la medicina; dónde se rescate el bagaje médico cultural preservado en las comunidades. El principio es el aprovechamiento de la bioactividad de las plantas proporcionado por los metabolitos secundarios y de esta manera contribuir con evidencias científicas de interés e impacto para las comunidades que aportan *per se* el conocimiento ancestral (Bucay, 2006).

## **2.6. Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios se encuentran en cantidades más limitadas comparativamente con los metabolitos primarios, son derivados de compuestos clave intermediarios del metabolismo primario y con frecuencia únicos de especies particulares (Wink, 2002). Lo anterior, es un ejemplo de respuesta evolutiva química de las plantas que adquieren una función muy importante en su organismo, ya que la planta puede adaptarse al medio ambiente y al cambio climático, alelopatía, protección ante patógenos etc. Esto es, factores abióticos que rigen un hábitat tales como la temperatura, luz, radiación UV, agua disponible, entre otras promueven la biosíntesis o bioactividad de compuestos fenólicos (Ej. las cumarinas) mediante genes inducidos por la radiación UV en tejidos de las plantas, sobre todo en las hojas, como respuesta de protección. Actualmente la bioactividad de los metabolitos ha sido estudiada con gran interés, específicamente en el área de la farmacéutica por los beneficios que le ofrecen al ser humano en materia de salud humana y animal al reducir la incidencia de algunas enfermedades (Suárez-Medina & Coy-Barrera, 2016).

De acuerdo con Garcia-Oliveira *et al.*, (2020), la familia Rosaceae es la más estudiada y con mayor cantidad de reportes en estudios etnobotánicos por los

compuestos activos presentes en la gran mayoría de sus especies, además Ogah *et al.*, (2014) destaca que dentro de la familia convergen compuestos fenólicos y flavonoides importantes como el kaempferol y la quercetina entre otros que pueden ejercer una actividad protectora frente a enfermedades degenerativas, cardiovasculares y antidiabéticas.

### **2.7. *Eriobotrya japonica* como especie potencial ante diversas patologías**

*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. es un árbol perennifolio de hasta 10 m de alto y frutos que pertenece a la familia Rosaceae. La familia es cosmopolita, pero preferentemente de climas templados del hemisferio norte. Incluye cerca de 90 géneros y más de 3,000 especies, de los cuales 34 géneros y 192 especies se encuentran en México (Rzedowski, 2021). El género *Eriobotrya* contiene unas 30 especies que se distribuyen naturalmente en Asia oriental (Gu & Spongberg, 2003). La especie *E. japonica* es nativa de China, y ampliamente cultivada como ornamental y por sus frutos comestibles en climas tropicales y subtropicales del mundo (Idress et al., 2022).

Acorde con Delucchi & Keller, (2010) el níspero es una especie que se cultivaba con fines ornamentales y frutales, fue así como dio paso a su distribución hacia América Latina, partiendo de Europa en dirección a Florida y México entre los años 1867-1870, posteriormente se extendió a California y Brasil desde Japón. Específicamente en Argentina, Delucchi & Keller (2010) reportaron que *E. japonica* se dispersó de un cultivo en la provincia de Buenos Aires para después naturalizarse en los bosques de la provincia.

### **2.8. Actividad biológica de metabolitos secundarios identificados en *E. japonica***

Se han reportado diversos compuestos procedentes de *E. japonica*, con un amplio espectro de actividad biológica, tal como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Compuestos reportados en *E. japonica*.

Compuesto	No. CAS	Descripción	Actividad	Referencia
Flavonoides y compuestos fenólicos	-	<p>Flavonoides: caracterizados por una estructura benzo-γ-pirano, ampliamente distribuidos en el reino vegetal en forma de glicósidos su función en las plantas se centra en el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como atrayentes de animales en la oviposición, como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos, en la salud humana, la salud humana está relacionadas con la actividad antioxidante.</p> <p>Compuestos fenólicos: se caracterizan por poseer uno o más grupos hidroxilo (-OH), de reacción ácida, unidos a un anillo aromático (grupo fenol), sus funciones comprenden desde sustancias odoríferas y pigmentos que atraen a los agentes polinizadores, venenos y disuasorios alimentarios (algunos son tóxicos para mamíferos e insectos), compuestos alelopáticos, componentes estructurales, agentes antifúngicos y antimicrobianos.</p>	Actividad antioxidante	Maher <i>et al.</i> , (2015)
Ácido euscáfico	53155-25-2	Es un inhibidor de la ADN polimerasa, además induce apoptosis y detención del ciclo celular en células de carcinoma nasofaríngeo.	Antiinflamatorio, antidiabético y antitumoral	Jian <i>et al.</i> , (2020)
Ácido tormentico	13850-16-3	Es un compuesto clasificado como un triterpeno pentacíclico, se sintetizan a través de la vía del ácido mevalónico. Desempeñan un papel importante en la defensa de las plantas contra numerosos patógenos y plagas	Antitumoral, antiinflamatorio, antibacteriano, antidiabético	Jian <i>et al.</i> , (2020)
Ácido corosólico	4547-24-4	Ácido estructuralmente es similar al ácido ursólico para tratar la diabetes y el sobrepeso. Su estructura es un triterpeno pentacíclico.	Antiinflamatorio, antidiabético y antitumoral	Banno <i>et al.</i> , (2005); Zhu <i>et al.</i> , (2022)
Ácido ursólico	77-52-1	Triterpeno pentacíclico incluye 10 carbonos quirales, puede ser beneficioso para el tratamiento de diversas condiciones como la hiperglucemia, hiperlipidemia, infecciones bacterianas y virales, antimicrobianos, hipolipidémicos, hipoglucemiantes, analgésicos y protectores en varios órganos.	Antiinflamatorio, antioxidante y antitumoral	Jian <i>et al.</i> , (2020); Zhang <i>et al.</i> , (2021); Zhu <i>et al.</i> , (2022)

Tabla 1. Continuación

Compuesto	No. CAS	Descripción	Actividad	Referencia
Uvaol	545-46-0	Compuesto triterpeno pentacíclico que ejerce propiedades farmacológicas como antiinflamatorio y de cicatrización de heridas. El uvaol tiene efectos inhibitorios sobre la liberación de óxido nítrico (NO).	Antiinflamatorio	Zhou <i>et al.</i> , (2019)
Éster metílico del ácido ursólico	32208-45-0	Derivado esterificado del Ácido ursólico, muestra actividad inhibidora del crecimiento frente a cuatro líneas de células tumorales, HL-60, BGC, Bel-7402 y Hela.	Antitumoral	Rollinger <i>et al.</i> , (2010)
Ácido maslinico	4373-41-5	Lípido pentacíclico de naturaleza terpénica, en la planta posee una función de antimicrobianos ha mostrado de forma preliminar propiedades antitumorales, antiinflamatorias, activadoras del sistema inmune	Antiinflamatorio y antitumoral	Jian <i>et al.</i> , (2020); Zhu <i>et al.</i> , (2022)
Ácido oleanólico	508-02-1	Ácido triterpénico pentacíclico Conocido por sus efectos farmacológicos y gran versatilidad, entre los cuales se destacan sus propiedades antitumorales y antiinflamatorias.	Antiinflamatorio y antitumoral	Banno <i>et al.</i> , (2005); Zhou <i>et al.</i> , (2019)
Ácido arjunólico	465-00-9	Es una saponina triterpenoide que posee actividad antioxidante conocida, así como también, beneficioso en la protección contra el daño hepático y de hepatocitos inducido por paracetamol.	Antioxidante	Banno <i>et al.</i> , (2005)
Ácido betulínico	472-15-1	Pentacíclico con actividades biológicas notables; entre ellas se destacan la antitumoral y antiinflamatorio.	Antitumoral y antiinflamatorio,	Banno <i>et al.</i> , (2005)
Quercetina	117-39-5	Pigmento vegetal (flavonoide) se encuentra presente generalmente como glicósidos en altas concentraciones tanto en frutas como en verduras a tiene efectos antioxidantes y antiinflamatorios esencialmente.	Antiinflamatorio, antialérgico y antioxidante	Banno <i>et al.</i> , (2005)

Tabla 1. Continuación

Compuesto	No. CAS	Descripción	Actividad	Referencia
Catequina	225937-10-0	Es un antioxidante polifenólico por excelencia que se encuentra en el té y que ayuda a proteger las células del daño causado por los radicales libres, entre otras.	Antioxidante, antiinflamatorio, antidiabético y antitumoral	Zhu <i>et al.</i> , (2022)
Ácido clorogénico	327-97-9	Compuesto fenólico formado por la presencia de un ácido químico y un cinámico, en este caso, de los cafeolquínicos. La función la capacidad para quemar grasas. Esto posible debido a la mejora del metabolismo y a su capacidad para reducir ácidos grasos y transformarlos en energía, a la vez que se distribuye de una mejor forma la grasa corporal en el cuerpo	Antidiabético, antitumoral y antioxidante	Park <i>et al.</i> , (2019)
Ácido gálico	149-91-7	Ácido fenólico natural que es soluble en agua, se encuentra tanto en su forma libre formando parte de taninos. Su nombre se refiere a las agallas donde se lo encuentra y no al elemento galio. Tiene usos en la industria farmacéutica como patrón para determinar el contenido de fenoles de diversos analitos mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu y como antioxidante.	Antioxidante	Chen <i>et al.</i> , (2008)
Amigdalósido	29883-15-6	Compuesto que ha sido objeto de investigación debido a su potencial para liberar cianuro de hidrógeno tras la hidrólisis enzimática. Además, se estudia el papel de la amigdalina en la biología vegetal para comprender su impacto sobre los herbívoros y cómo puede influir en las interacciones ecológicas entre plantas y otros organismos	Antitumoral, antiinflamatorio, antitusígeno (tratar la tos)	Zhu <i>et al.</i> , (2022)

## 2.9. Actividad antioxidante

Además del uso ornamental y frutal reportado en la literatura, existe un compendio de propiedades bioactivas que se le otorgan al níspero, específicamente en la medicina tradicional china. Como primer atributo, la actividad antioxidante que de acuerdo con Vázquez-Ovando *et al.* (2022) se define como una sustancia o molécula de origen exógeno (derivan de los alimentos en la dieta) o endógeno (propios del organismo) con capacidad de contrarrestar la acción oxidante de los radicales libres, específicamente de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) por medio de liberación de electrones al medio.

Los radicales libres contienen electrones que no se encuentran apareados en sus respectivos orbitales, dicho de otra manera, son moléculas inestables puesto que los electrones encuentran una estabilidad consistente cuando se encuentran apareados, por tanto, las hace reactivas frente a otras especies debido a que los electrones no apareados tienden a formar pares. Los radicales libres pueden ceder o captar electrones a otra molécula, pero esto conlleva la transformación de la otra molécula que recibe o pierde electrones, que consecuentemente pasa a ser un radical libre, generalmente con alta reactividad. Entonces es posible notar una tendencia a reacciones en cadena por parte de los radicales libres, por ende, se asume que “un radical suscita a otro radical y así consecutivamente” (Carvajal, 2019).

Por otro lado, las ERO's son compuestos derivados del oxígeno, de los cuales solo algunos son radicales libres y otros dan origen a alguno de estos que se da a nivel celular y a su vez interactúan con el DNA, proteínas, lípidos y carbohidratos, lo que desencadena alteraciones en vías metabólicas y de membranas (Hernández *et al.*, 2019). Por lo antes mencionado, la forma más eficiente de abastecer el organismo de antioxidantes para su protección es de manera exógena, esto es, ingesta de alimentos ricos en vitamina E, vitamina C, carotenoides, compuestos fenólicos (isoflavonas, flavonoides, quercetina) con la finalidad de inhibir el efecto causado en el daño celular por los radicales libres y

las ERO's (Vázquez-Ovando *et al.* 2022). Para el caso de *Eriobotrya japonica* (*E. japonica*) Maher *et al.*, (2015) reportan actividad antioxidante por medio de la prueba de DPPH• en un extracto etanólico-acetato de etilo (2:1) cuyo contenido principal son compuestos fenólicos y flavonoides, de este modo logra evidenciar una correlación entre el contenido de dichos compuestos y la actividad antioxidante.

Del mismo modo, Seong *et al.*, (2019) observaron un comportamiento dosis-dependiente del extracto de *E. japonica* en la prueba de ABTS\*\* gracias a la actividad antioxidante de compuestos naturales, tales como vitaminas, minerales y polifenoles, que a menudo se les atribuye la captación de radicales libres. Sin embargo, en una revisión de varios autores Zhu *et al.*, (2022) indican que los extractos de etanol de hojas de *E. japonica* muestra una buena actividad antioxidante debido a su alto contenido de polifenoles y quercetina, siendo incluso mucho más potentes que la actividad del ácido ascórbico que es empleado como referencia en las curvas patrón de la prueba DPPH.

## **2.10. Actividad antiinflamatoria**

La inflamación se ve implicada en muchas enfermedades, que actúa activamente como una de las causas dependiendo de la zona alojada, por ejemplo, la diabetes, infecciones respiratorias, enfermedades pulmonares, cáncer y artritis (Zhu *et al.*, 2022). Durante el proceso inflamatorio, los macrófagos producen óxido nítrico, citoquinas y enzimas proinflamatorias como la fosfolipasa A2 secretada (sPLA2), que catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana para producir ácido araquidónico libre y lisofosfolípidos. Se ha demostrado que las sPLA2 son las responsables dentro de la biosíntesis de mediadores lipídicos en las células inflamatorias. Las enzimas sPLA2 constituyen una familia heterogénea dividida en 11 grupos (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA y XIIB). El grupo IIA de sPLA2 fue detectado inicialmente en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, revelando que el grupo IIA de sPLA2 está involucrado en el proceso inflamatorio, y se han descubierto numerosos inhibidores de la fosfolipasa A2, cuya eficacia ha

sido comprobada en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Maher *et al.*, 2015)

La medicina tradicional china le otorga un gran número de usos a *E. japonica*, uno de los más investigados es como modulador de procesos inflamatorios en las hojas y esto es posible debido a la bioactividad que ofrecen los ácidos triterpénicos y las epicatequinas presentes en las hojas, además del ácido gálico que puede ser un compuesto clave en la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias (Matalka *et al.*, 2016). Recientemente, Zhu *et al.*, (2022) y colaboradores reportaron la identificación y el aislamiento de cuarenta y siete tipos de ácidos triterpénicos encontrados en las hojas de esta especie, entre los más significativos para la actividad antiinflamatoria se encuentra el ácido euscáfico, ácido tormentico, ácido corosólico, ácido maslínico, ácido oleanólico y ácido ursólico. Por ejemplo, el ácido torméntico obtenido de las hojas de *E. japonica* ha demostrado reducir las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, mediante iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, así como suprimir la vía MAPK/NF- $\kappa$ B. Además, el ácido tormentico tiene efectos antioxidantes reduciendo peróxidos lipídicos y especies reactivas de oxígeno (ERO's), induciendo la activación de hemo oxigenasa-1 en el hígado. Estos efectos antiinflamatorios y antioxidantes podrían prevenir el daño hepático causado por la sobredosis de acetaminofén al suprimir las vías de señalización MAPK y NF- $\kappa$ B mediadas por ERO's.

### **2.11. Actividad antidiabética**

Los datos indican que la obesidad y el sobrepeso ocupan el quinto lugar de muertes a nivel mundial, los antes mencionados se consideran factores de riesgo importantes para desarrollar otras enfermedades, como la diabetes, hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares (Fu *et al.*, 2019). Una de las estrategias por las que se opta para el tratamiento de la hiperglucemia postprandial, que es un aumento de glucosa en sangre en aquellas personas que no llevan una alimentación adecuada, diagnosticados con diabetes mellitus II es con el uso de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa con el objetivo de disminuir la captación de

carbohidratos mediante el intestino. La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica asociada con defectos en la secreción y sensibilidad a la insulina. La DM puede ser tipo I o tipo II, dependiendo de los eventos que conducen a la hiperglucemia. La diabetes tipo II principalmente reduce la captación de glucosa y representa el 90% de la carga global de la diabetes (Zhu *et al.*, 2022).

En este sentido, la literatura reporta algunos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa como la acarbosa y voglibosa, que permiten controlar la hiperglucemia posprandial, sin embargo, se ha observado que las personas presentan síntomas producidos por estos medicamentos (efectos secundarios) tales como vómitos, náuseas, hinchazón, etc. Una de las recomendaciones para contrarrestar estas enfermedades es con la limitación de ingesta energética de grasas totales y azúcares. Además, la inhibición de enzimas específicas como la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa en la diabetes tipo II como una de las principales estrategias para contrarrestar las alteraciones metabólicas relacionadas con la hiperglucemia y la diabetes tipo II, sin embargo, los efectos secundarios de los fármacos sintéticos actuales conllevan efectos secundarios notables (Fu *et al.*, 2019).

Lo anterior refleja la importancia de buscar alternativas naturales u opciones que demuestren efectos menos agresivos y cumplir con los criterios de viabilidad y baja toxicidad para el tratamiento de la diabetes mellitus II (Rincón-Silva *et al.*, 2019). De esta manera, Toshima *et al.*, (2010) evidenció trece inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa o maltasa, que incluyen catequinas, teaflavinas junto a sus derivados teasinensinas y strictinina (tanino) presentes en la infusión de las hojas de esta especie, además los extractos de las hojas y sus constituyentes aislados, como polisacáridos, ácidos orgánicos, flavonoides y ácidos triterpénicos totales, han mostrado efectos antidiabéticos notables (Zheng *et al.*, 2019 en Chen *et al.*, 2009).

Los polisacáridos son biomoléculas activas biológicamente en la medicina herbal china que poseen propiedades antidiabéticas y solo unos pocos efectos secundarios. Entre los principales contribuyentes hacia los efectos antidiabéticos y anti-obesidad de las hojas de níspero se encuentran los fenoles y terpenoides

identificados en extractos de etanol o metanol (*Fu et al.*, 2019). La literatura también añade propiedades anticancerígenas y antitumorales, esto por la presencia de aceites esenciales, ácidos triterpénicos y glucósidos sesquiterpénicos.

## **2.12. Cromatografía**

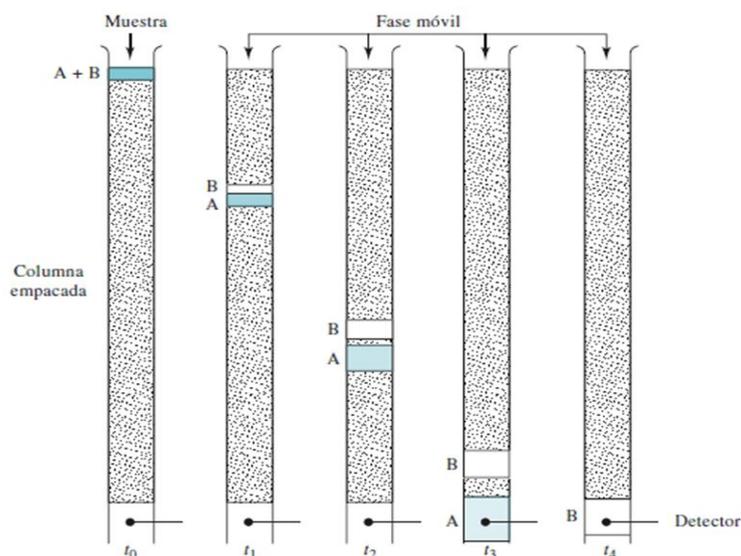
El término deriva de las palabras griegas “chrom” (color) y “graphe” (escribir), que básicamente significa: escribir en colores, por lo tanto es un método o técnica que se utiliza de manera frecuente para la separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas complejas, no obstante, esto no implica de manera forzosa que los compuestos a separar posean un color, pero sí de que puedan colorearse a través de una reacción química para poder visualizar su ubicación una vez separados. Por lo tanto, el fundamento de la cromatografía se basa en que los compuestos de una mezcla o extracto se separan por diferencias en las velocidades a las cuales son arrastrados por una fase móvil, que puede ser líquida o bien gaseosa, mediante una fase estacionaria fija (sílice). La fase estacionaria es aquella que se encuentra fija en determinado lugar, es decir, en una columna o superficie plana, mientras que la fase móvil es aquel que se desplaza sobre la fase estacionaria o por medio de ésta acarreado con ella la mezcla de analitos (*Skoog et al.*, 2013).

## **2.13. Cromatografía en columna (CC)**

La técnica de CC consiste en un tubo estrecho, con dimensiones específicas que está empacado con un sólido inerte, finalmente dividido que sostiene la fase estacionaria en su superficie la fase móvil (que es introducida en la boquilla o cabeza de la columna) y usa los espacios entre las partículas del empaque, lugar dónde ocurre la elución para forzar a los compuestos del extracto a separarse a través de la columna por medio de la adición continua de una fase móvil nueva. Se entiende por elución al proceso de lavado de solutos por medio de una fase

estacionaria con el movimiento de una fase sólida, la fase móvil que sale de la columna se denomina eluido, también conocido como eluato (Skoog *et al.*, 2013).

Con la primera adición de la fase móvil, el eluyente (disolvente para el acarreo de compuestos de un extracto), la porción contenida en la fase móvil se mueve hacia abajo de la columna y con posteriores adiciones acarrea a las moléculas de soluto hacia abajo por la columna en una serie de transferencias continuas entre las dos fases. Preferentemente, las diferencias de velocidad resultantes provocan que los componentes de una mezcla se separen en bandas, o zonas, a lo largo de la longitud de la columna (Skoog *et al.*, 2013).



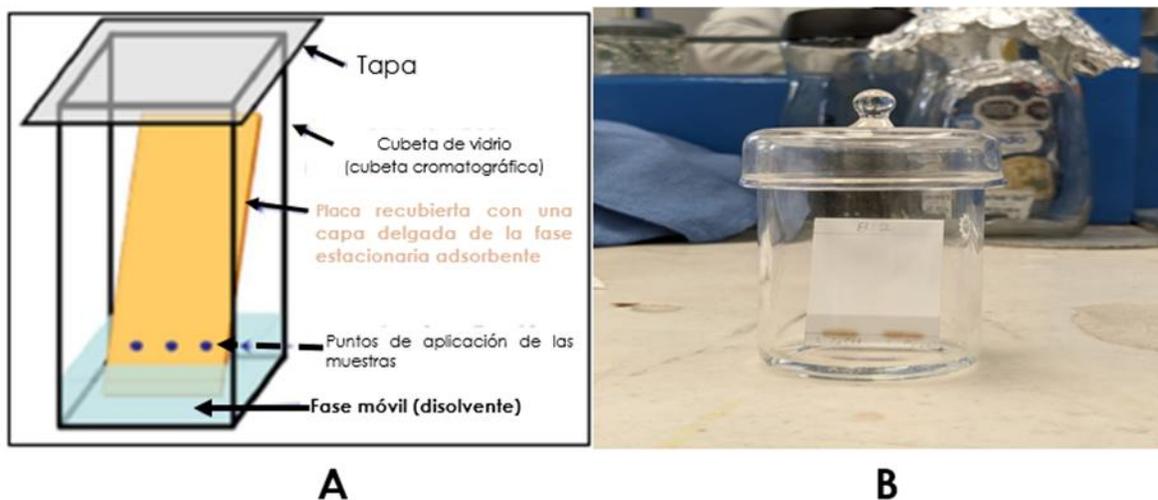
**Figura 4.** Diagrama esquemático que ilustra la separación por cromatografía en columna de un extracto de los componentes A y B. Tomado de: Skoog *et al.*, 2013.

## 2.14. Cromatografía en capa fina (CCF)

La CCF es una técnica analítica que se caracteriza por ser efímera y sencilla. Se basa en la separación de los compuestos de un extracto por la migración que presentan dichos compuestos sobre una capa delgada de adsorbente, que a su

vez se encuentra sostenido por una superficie plana inerte. Esta técnica permite determinar la pureza de un compuesto, es decir, si posterior a un proceso cromatográfico de separación en columna, el compuesto presenta varias manchas, este compuesto no está del todo puro y es un indicador de que no se separó de las impurezas de manera adecuada. De igual manera posibilita la comparación de muestras, de modo que si dos muestras corren igual en la placa es probable que sean idénticas, pero si corren distinto entonces puede que hablemos de sustancias diferentes (Corzo, 2019).

El proceso de separación tiene como fundamento el fenómeno de adsorción, dónde la muestra que se pretende analizar se siembra cerca de un extremo de la placa cromatográfica, posteriormente la placa es colocada dentro de una cámara cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente) y a medida que dicha mezcla de disolvente asciende por capilaridad por medio del adsorbente se produce un reparto diferencial y visual de los productos presentes en la muestra, entre el disolvente y el adsorbente (Corzo, 2019) .



---

**Figura 5.** Cromatografía en capa fina ascendente. Esquemas y fotografías tomados de: A) Corzo, 2019; B) Fotografía proporcionada por Oliver Yarin Espinosa García en el laboratorio del AAQ.

---

### **2.15. Resonancia magnética nuclear de protón (RMN $^1\text{H}$ )**

La espectroscopia de RMN fue desarrollada a finales de 1940 con el objetivo de estudiar los núcleos atómicos, posteriormente en 1951, se descubrió que la espectroscopia de RMN podía utilizarse para definir estructuras de los compuestos orgánicos, puesto que cualquier molécula, ión o radical puede poseer diversas estructuras dependientes de las disposiciones de sus electrones y que cambian ciertas propiedades (Valcárcel, 2008).

La resonancia como definición, es un fenómeno que se produce como consecuencia de una vibración con frecuencia equivalente a otra vibración primeramente establecida. La resonancia magnética nuclear es una técnica espectroscópica con mucho poder que facilita el estudio a niveles atómicos de moléculas que resulten de interés biológico. Dicho de otra manera, es una herramienta fundamental para la determinación de estructuras de biomoléculas en solución y sus interacciones respectivamente, además del estudio cinéticos de reacciones e inclusive el diagnóstico por imágenes en medicina (Córsico *et al.*, 2013).

### 3. Justificación

El níspero (*Eriobotrya japonica*) es un árbol frutal introducido que pertenece a la familia rosácea y es ampliamente cultivado en parcelas de la localidad de Ixtlapala, Tlanchinol, Hgo. La especie *E. japonica* a menudo es empleado con fines medicinales en la localidad para atenuar el dolor intenso que generan los cálculos renales, mejor conocido como cólico nefrítico o incluso para la expulsión de dichos cálculos (actividad antiurolítica). Otros ejemplos de usos y terapias reportadas por localidades del Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala y Veracruz son; para tratamiento de la mala circulación de la sangre, limpiar el riñón, combatir el ácido úrico, tratar la diabetes y templar los nervios. En este sentido, la medicina oriental, pionero de la investigación y registro de la bioactividad de esta especie muestra un gran interés y enfoque en estudios para tratamiento de la diabetes mellitus tipo II, enfermedades inflamatorias, anticancerígenas y en problemas cardíacos, sin embargo, los estudios de *E. japonica* sobre la actividad antiurolítica son relativamente escasos o nulos.

El presente estudio, pretende evaluar el efecto de los extractos en etanol y de acetato de etilo de *E. japonica* sobre la actividad antioxidante y antiurolítica (en cristales de oxalato de calcio) que contribuyan a determinar la eficacia de la infusión o té, producto de las hojas de *E. japonica* y aportar evidencias que incentiven la conservación y el uso tradicional de las infusiones dentro de la comunidad de Ixtlapala, Tlanchinol, Hgo.

## 4. Objetivos:

### 4.1. General

Evaluar la capacidad antioxidante, antiurolítica y como inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* de extractos en etanol y de acetato de etilo de *Eriobotrya japonica* (*E. japonica*), mediante pruebas *in vitro* para determinar el efecto antirradical, inhibición de cristales y como antidiabético.

### 4.2. Específicos

1. Muestrear y realizar la identificación taxonómica de la especie de estudio, y depositar un ejemplar en el Herbario, para la asignación de Voucher.
2. Obtener el extracto etanólico y de acetato de etilo de las hojas de la especie mediante maceración y concentración en rotavapor, para obtener el rendimiento y disponer de la cantidad total requerida para las pruebas *in vitro*.
3. Determinar el efecto antioxidante de los extractos obtenidos mediante las técnicas con DPPH•, ABTS•+ y FRAP+, para determinar su eficacia antirradical.
4. Determinar si los extractos inhiben o promueven la formación de cristales de oxalato de calcio, mediante ensayos de nucleación y agregación *in vitro*.
5. Determinar la actividad los extractos de *E. japonica* frente la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, mediante pruebas *in vitro*, para evaluar el posible mecanismo inhibidor de la absorción de glucosa post-prandial en comparación con la acarbosa.
6. Identificar los principales compuestos presentes en los extractos de *E. japonica*, mediante cromatografía en capa fina, columna y RMN, para determinar los posibles metabolitos responsables de la actividad biológica a evaluar.

## **5. Hipótesis**

El efecto de los extractos sobre el crecimiento de cristales de oxalato de calcio (CaOx) *in vitro* serán significativos por efecto de los compuestos polares y apolares presentes en las hojas del níspero, en consecuencia, los cristales CaOx se verán inhibidos en sus fases iniciales. Además, los extractos presentarán una buena actividad antioxidante e inhibidora de la actividad de alfa glucosidasa *in vitro*.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Hojas de *E. japonica* para identificación

Las hojas de *Eriobotrya japonica*, níspero, fueron colectados en la localidad de Ixtlapala, Tlanchinol, Hgo. México, con una altitud de 949 msnm (Figura 6), con coordenadas UTM descritas en la tabla 2. La recolección se hizo el 17 de enero, aproximadamente a las 15:00 hrs. que corresponde a la temporada de invierno del 2023 dentro de una parcela privada, bajo el consentimiento del dueño. Fue seleccionado un único árbol maduro con 10 años aproximadamente de ser cultivado, con una altura aproximada de 5 m de altura, puesto que los demás ejemplares dentro de la parcela no cumplían con el requisito de madurez, ni de altura.

El árbol ubicado en el centro de la parcela se encuentra expuesto a sol, pero cabe recalcar que no es el más alto de la parcela. Se colectó alrededor de 1,200 gramos de hoja en peso fresco en la parte baja de la copa, a una altura máxima de 1.80 m; se seleccionaron aquellas hojas completas sin algún signo de daño físico y se excluyeron también aquellas que se mostraban carcomidas por algún herbívoro.

Las hojas colectadas seleccionadas tenían que cumplir con una medida promedio de 15-25 cm, robusta y dura al tacto, descartando las hojas más pequeñas y blandas.

Punto	Coordenadas UTM	
	X	Y
1	528368.039	2324264.026
2	528406.923	2324242.817
3	528367.925	2324188.661
4	528357.693	2324155.228
5	528322.998	2324177.734

**Tabla 2.** Coordenadas UTM del polígono de estudio (parcela).

Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico en un lugar alejado del sol, fresco y seco, cuidando los parámetros ya mencionados para su transporte. Un ejemplar se depositó en el Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB)-ICBI siguiendo las indicaciones del Mtro. Manuel Ledezma y asignando el identificador “Angel Trinidad Isidro, #1, HGOM”, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Las muestras fueron dispuestas en bolsas de plástico, posteriormente lavadas y cepilladas suavemente para remover el polvo (Figura 7).



---

**Figura 6.** Polígono muestreado (parcela). Imagen procesada con Google Earth de autoría propia.

---

Posteriormente del lavado se extendieron sobre hojas blancas o papel absorbente a la intemperie para que éstas logaran secarse con mayor rapidez y lograr que la hoja tome un aspecto rígido y crujiente para lograr una trituration exitosa

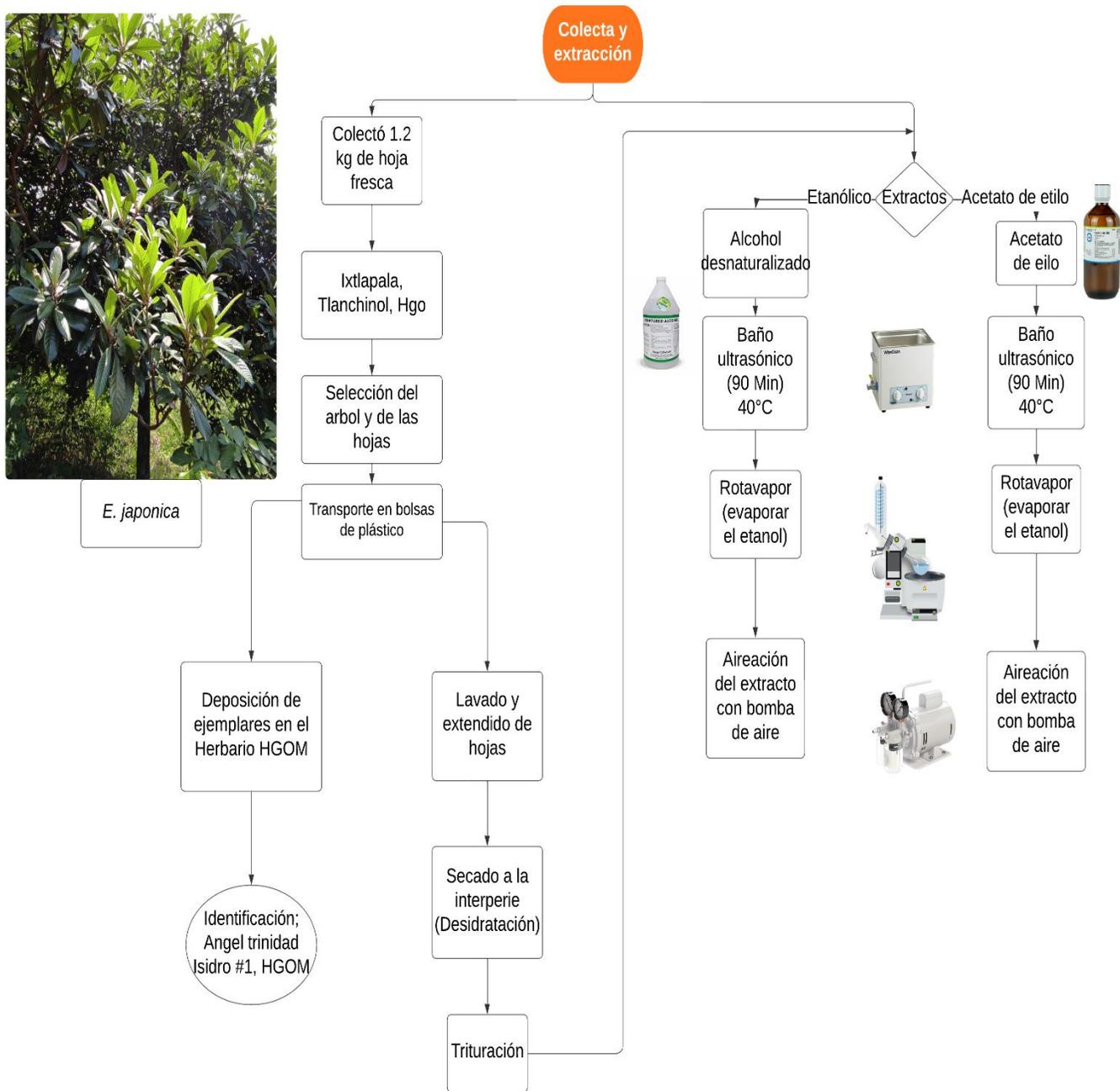
(deshidratación). Las hojas de *E. japonica* se trituraron después de extenderlas por una semana.

### **6.2. Extracto etanólico (EtOH)**

La hoja triturada de *E. japonica* se disolvió en alcohol etílico dentro de un frasco con una capacidad de 5 L con 3 litros de disolvente aproximadamente, seguidamente se deja en baño ultrasónico a tres ciclos con los siguientes parámetros: 90 min. al 80% de poder a 30-40°C. Posteriormente, se realizó el filtrado en un embudo de cristal con filtros para separar el material orgánico del disolvente, luego, la evaporación del disolvente a presión reducida en rotavapor (BUCHI RII) a 40 °C, con 2x de rotación, vigilando constantemente el bombeo con agua fría y la bomba de vacío. Finalmente, se redujo el extracto con bomba de aire hasta lograr una evaporación completa del etanol (Figura 7).

### **6.3. Extracto acetato de etilo (AcOEt)**

El proceso para el extracto con acetato de etilo es similar al EtOH, como fue descrito anteriormente, la hoja triturada de *E. japonica* se disolvió en acetato de etilo dentro de un frasco de vidrio con capacidad de 5 L con 3 litros de disolvente aproximadamente, más tarde se dispone en baño ultrasónico con tres ciclos bajo los siguientes parámetros: 90 min. al 80% de poder a 30-40°C. Posteriormente, se realizó el filtrado en un embudo de cristal con filtros para separar el material orgánico del disolvente, seguidamente, la separación del disolvente se dio a presión reducida en rotavapor (BUCHI RII) a 40 °C, con 2x de rotación, vigilando constantemente el bombeo con agua fría y la máquina de vacío. Como último paso, se aireó el extracto con bomba de aire hasta lograr una evaporación del acetato de etilo (Figura 7).

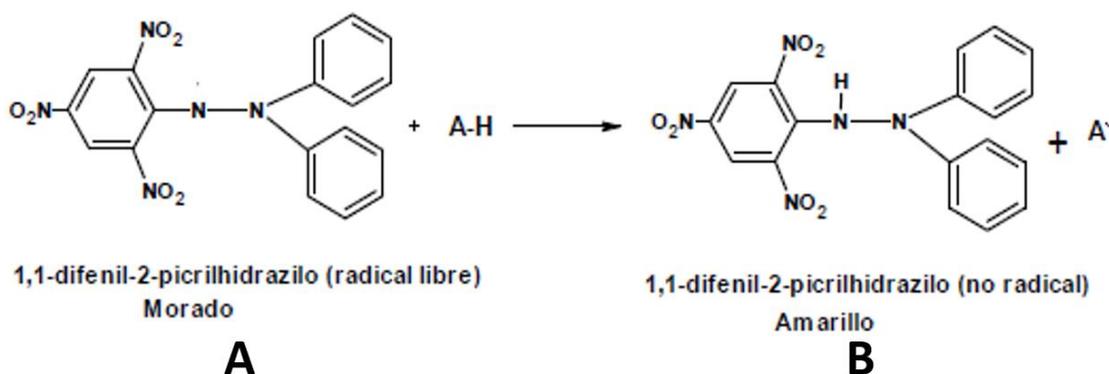


**Figura 7.** Esquematzación del proceso de colecta y obtención de extractos en etanol-acetato de etilo.

## 6.4. Actividad antioxidante

### 6.4.1. Determinación de actividad antirradical por el método DPPH•

La capacidad antirradical de *E. japonica* se determinó bajo el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, mejor conocido por sus siglas en inglés, DPPH siguiendo el proceso descrito por Morales & Jiménez-Pérez, (2001), donde un radical libre estable dentro de una solución etanólica adquiere una coloración característica de violeta intenso, si a esta solución se le adiciona una sustancia capaz de atrapar radicales libres como el Trolox, el electrón disponible (no apareado) del DPPH se aparea, por ende, inicia una decoloración que va hasta un tono amarillento (Figura 8).



**Figura 8. A)** Estructura del DPPH previo a la reacción y **B)** después de la reacción antioxidante. Tomado de: Tovar & Marino, 2013.

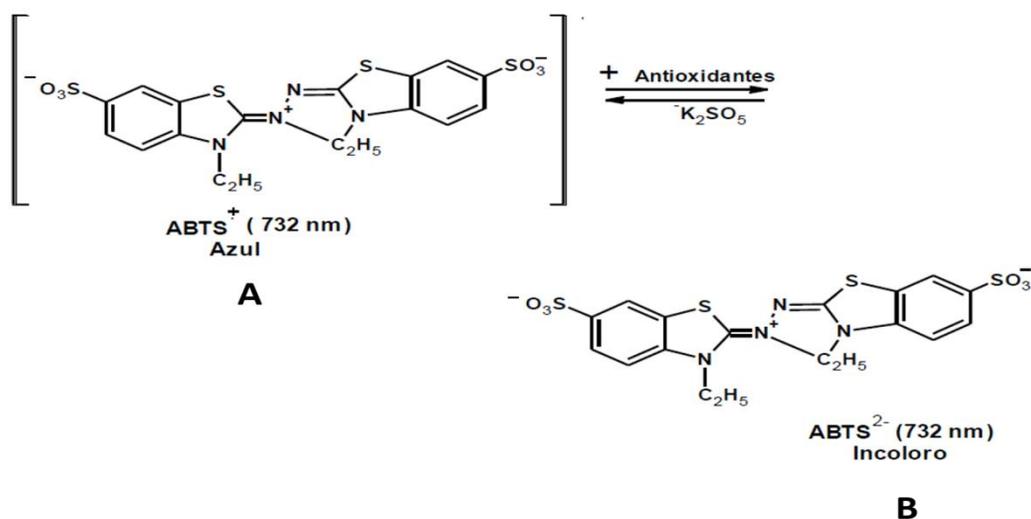
Los extractos etanólicos (EtOH) y de acetato de etilo (AcOEt) se diluyeron 1:10 (5 mg/mL), 1:25 (2 mg/mL), 1:50 (1 mg/mL), 1:75 (0.66 mg/mL) y 1:100 (0.5 mg/mL), el stock de ambos extractos se mantuvo en una concentración de 50 mg/mL. Las diluciones 1:25-1:75 son producto de la dilución 1:10 en ambas fracciones de los extractos y la solución de DPPH 7 mM en agua destilada.

Para el procedimiento se mezclaron 400  $\mu$ L de cada una de las muestras diluidas en 2 mL (reduciendo cantidades 100  $\mu$ L de muestra + 500  $\mu$ L DPPH) en tubos de ensaye, posteriormente se procedió a agitar en vórtex para después dejar en

reposo a temperatura ambiente durante una hora. Las muestras se agitaron nuevamente previo a la lectura de la absorbancia a 520 nm. El agua destilada fue usada como blanco. Se realizó una curva patrón con Trolox, dónde los valores obtenidos de cada concentración fueron extrapolados dentro de la curva patrón y los resultados se expresan en miligramos equivalentes de Trolox por 100 g de peso fresco (Anexo 1).

#### 6.4.2. Determinación de actividad antioxidante ABTS<sup>•+</sup>

La determinación de actividad antioxidante por ABTS<sup>•+</sup>, se realizó en base al método que plantea Re *et al.* (1999), dónde se ve involucrada la producción directa del cromóforo ABTS<sup>•+</sup> verde azulado, mediante una reacción entre el ABTS<sup>•+</sup> y el persulfato de potasio. Por lo antes expuesto, al adicionar la solución de los antioxidantes al radical preformado, se reduce a ABTS<sup>2-</sup> como se muestra en la figura 9.



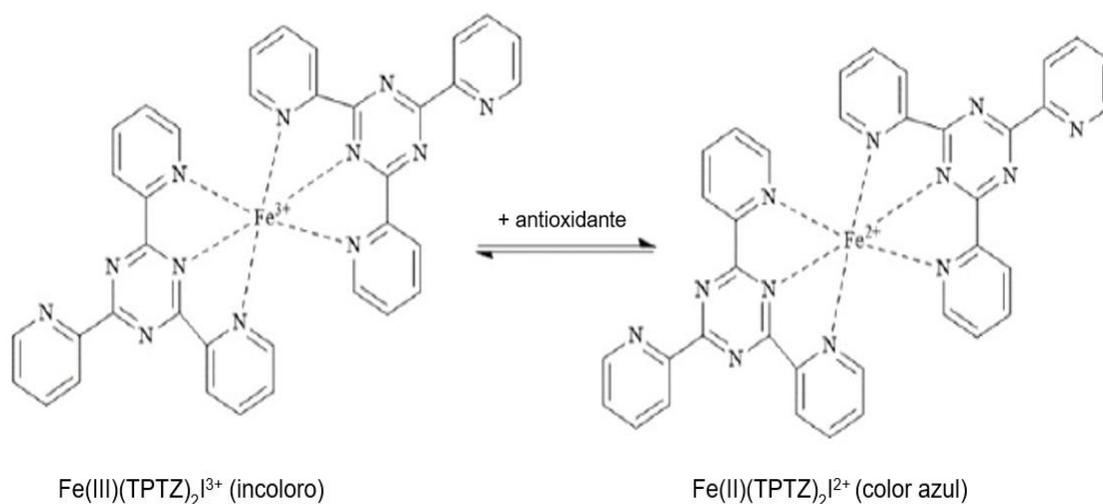
**Figura 9.** A) Estructura del ABTS<sup>•+</sup> antes de la reacción y B) después de la reacción antioxidante. Tomado de: Tovar & Marino, 2013.

Se preparó 10 mL de ABTS<sup>•+</sup> al 7 mM/L y 10 mL de persulfato potásico al 2.45 mM/L, para después mezclar las soluciones antes mencionadas, se incubó por toda una noche (lapso de 12-16 hrs) en completa oscuridad y a temperatura ambiente. Del mismo modo, se preparó tampón fosfato 5 mM, con pH 7.4 en agua desionizada, y se ajusta el pH con NaOH o HCl al 1M, de ser necesario. Posteriormente a la mezcla de ABTS<sup>•+</sup> y persulfato potásico, recién incubado, se le agrega tampón fosfato hasta obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$  a 734 nm con 30°C. Se realizó una curva patrón de Trolox al 300  $\mu$ M + etanol, por ende, se llevaron a cabo las siguientes cantidades en  $\mu$ L: 2,000  $\mu$ L + 0  $\mu$ L EtOH (300  $\mu$ M), 1,500  $\mu$ L + 500  $\mu$ L EtOH (225  $\mu$ M), 1,000  $\mu$ L + 1,000  $\mu$ L EtOH (150  $\mu$ M), 500  $\mu$ L + 1,500  $\mu$ L EtOH (37.5  $\mu$ M), 250  $\mu$ L + 1,750  $\mu$ L EtOH (15  $\mu$ M), 0  $\mu$ L + 2,000  $\mu$ L EtOH (0  $\mu$ M).

Las medidas para cada muestra de estudio se realizaron vertiendo 100  $\mu$ L de muestra en diluciones: 1:10 (5 mg/mL), 1:50 (2 mg/mL), y 1:100 (0.5 mg/mL) + 500  $\mu$ L ABTS<sup>•+</sup> en tubos de ensaye, posteriormente se llevaron las muestras a vórtex y se dejó reposar por 7 minutos, finalmente se midió la absorbancia a 734 nm. El agua destilada fue usada como blanco. Se construyó una curva patrón con Trolox para aplicar los valores obtenidos de cada extracto que se expresan en miligramos equivalentes de Trolox por 100 g de peso fresco (Anexos).

#### **6.4.3. Determinación antioxidante por reducción del ión férrico FRAP**

La determinación de la capacidad antioxidante por el método de FRAP se realizó de acuerdo al método inscrito por Benzie & Strain (1996). A un pH bajo, donde el complejo férrico tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) es reducido a su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) el color característico que desarrolla es un azul intenso con una absorbancia máxima a 593 nm. La reacción es inespecífica y cualquier reacción mediana con un potencial de reducción, bajo las condiciones de reacción el  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ puede lograr una reducción a su forma  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ. Las condiciones favorecedoras para la reducción del complejo y el desarrollo de color refieren que un antioxidante está presente en la muestra (Figura 10).



**Figura 10.** Estructura del FRAP antes y posterior de la reacción. Tomado de: Vázquez-Ovando, 2022.

Se preparó una solución amortiguadora 0.3 M con pH de 3.6 a partir de ácido acético y acetato de sodio, una solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM y una solución de TPTZ a 10 mM la cual se aforo con HCl. Para llevar a cabo la preparación del reactivo FRAP se añadieron 25 mL de la solución amortiguadora de acetatos, 2.5 mL de la solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM y 2.5 mL de la solución de TPTZ 10 mM.

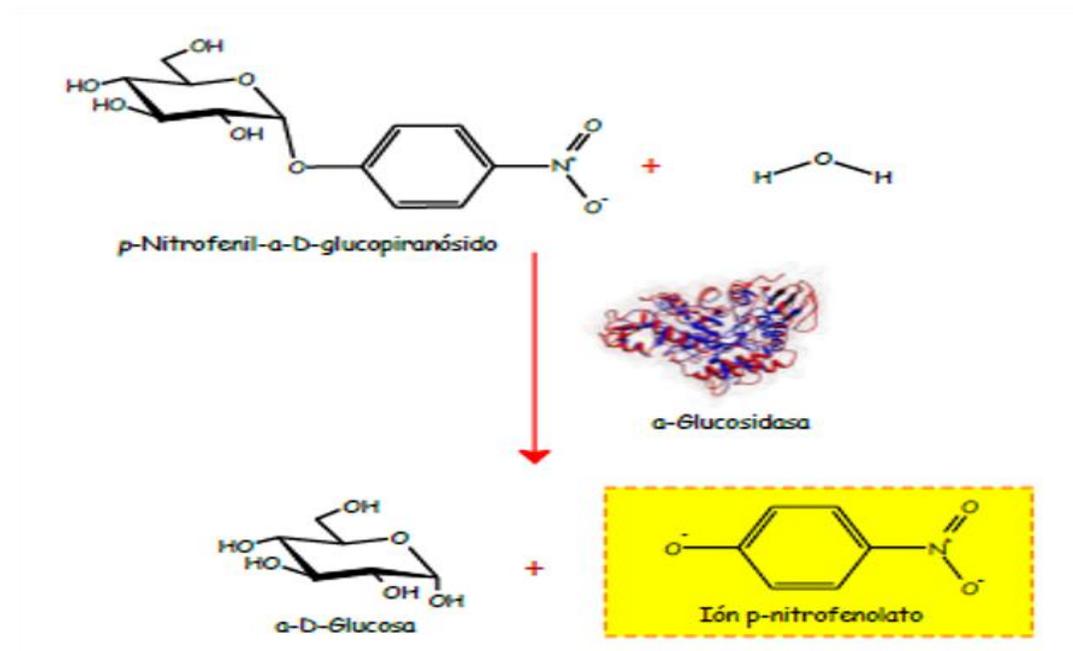
Posteriormente, se utilizaron tubos eppendorf en donde se agregaron 300  $\mu\text{L}$  del reactivo FRAP recién preparados, 10  $\mu\text{L}$  del extracto y 30  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La reacción se dejó incubar a 37°C durante 30 minutos a completa oscuridad.

### 6.5. Actividad inhibitoria frente $\alpha$ -glucosidasa

La actividad inhibitoria de  $\alpha$ -Glucosidasa en los extractos se basa en la hidrólisis enzimática del sustrato de origen sintético, esto es, p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (p-NFGP) que por acción de la  $\alpha$ -Glucosidasa provoca la liberación de unidades de p-nitrofenolato y  $\alpha$ -D-glucosa (Figura 11). El ión p-nitrofenolato denota una coloración amarillenta que indica la reacción de hidrólisis

enzimática, pero esto no sucede en todos los casos. Por lo anterior, se han hecho modificaciones a la técnica original con la finalidad de intensificar el color, por ende, la clave radica en adicionar una solución básica con el propósito de crear un ambiente denso en electrones para que el anión p-nitrofenolato entre en resonancia y logre una estabilidad.

Para que se cumpla adecuadamente lo antes mencionado es necesario considerar que toda la concentración sustrato (p-NFGP) ha reaccionado con la enzima, además de no presentar falsos positivos en los resultados, puesto que el sustrato p-NFGP es susceptible de reaccionar frente a una hidrólisis básica (Avellaneda, 2013).



**Figura 11.** Hidrólisis enzimática del p-Nitrofenil-α-D-glucopiranosido (p-NFGP) por acción de la α-Glucosidasa (α-GLC) liberando unidades de p-nitrofenolato y α-D-glucosa. Tomado de: Avellaneda, 2013.

La preparación de soluciones se siguió de acuerdo a Kim *et al.*, (2001) y Kwon (2006) con ciertas modificaciones:

A. Solución NaOH 1M

La solución de NaOH se prepara previamente para llevar a pH 6.8, la solución tampón fosfato pesando 400 mg de NaOH, para posteriormente en matraz aforado de 10 mL se enrasa con agua destilada y se almacena a 4°C.

#### B. Solución tampón fosfato 100 mM

La solución tampón fosfato se prepara pesando 345 mg de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  en un vaso de precipitado de 50 mL al cual se le adiciona 20 mL de agua destilada, posteriormente se homogeniza hasta la completa disolución de los cristales. Finalmente se ajusta a pH 6.8 con una solución de NaOH 1M gota a gota con ayuda de un pH/mV/°C-metro, posteriormente se trasvasa la solución ajustada a un matraz de aforo de 250 mL y se enrasa con agua destilada. La solución se almacena a 4°C por un máximo de dos días, por lo cual es necesaria la preparación de la solución para cada medición

#### C. Solución enzimática 0,1 U/ML

La solución enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* se prepara pesando 2 mg de enzima (polvo blanco) en matraz de aforo de 1 mL el cual fue enrasado con tampón fosfato (solución madre). Para almacenar la solución se utilizan tubos Eppendorf de 1.5 mL y mantienen a -20°C. Al momento de realizar el ensayo se descongela un eppendorf en hielo y se toma una alícuota de 6.3  $\mu\text{L}$  con micropipeta y se coloca en un tubo de 15 mL. Finalmente se adicionan 1993.7  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato y se mantiene a 4°C hasta la medición.

#### D. Solución de pnpG 5 Mm

La solución se realiza pesando 15.761 mg en un matraz aforado de 10 mL protegido de la luz y se enrasa con solución tampón fosfato. Se lleva al sonicador hasta completa dilución de los cristales y se trasvasa a un tubo falcon de 15 mL protegido de la luz y se mantiene a 4°C hasta el momento de la medición.

#### E. Solución de DMSO 11.5% (en caso de ser necesario como disolvente de los extractos)

La solución de DMSO se prepara para no superar el 1% en el pocillo de reacción de la microplaca. Se toman 2.8 mL de DMSO puro en un matraz aforado de 25 mL y se enrasa con agua destilada. La solución se almacena a 4°C hasta el momento de la medición.

#### F. Extractos y acarbossa

Para los extractos inicialmente se prepara una solución madre de 1.15 mg/mL para que el pocillo de reacción de la microplaca las concentraciones sean del orden de los g/mL. De los extractos descritos previamente (extracto etanólico y de acetato de etilo), se tomó 11.5 mg de cada uno respectivamente diluido en 10 mL de DMSO 11.5%, posteriormente se hacen diluciones en tubos eppendorf. En primera instancia se hacen diluciones 1:10 y a 1:100, dónde se pipetea 100 µL de la solución madre (1.15 mg/mL) + 900 µL de DMSO 11.5%, una vez analizado el porcentaje de inhibición se hacen ajustes necesarios en las concentraciones a ensayar.

La solución de acarbossa se prepara de la misma forma en concentraciones que fluctúan entre 0.0026 y 13.0435 mg/mL.

#### **6.6. Ensayo de cristalización (Cristales de oxalato de calcio)**

El ensayo de cristalización se realizó siguiendo el proceso de Mosquera *et al.* (2021) con cierta estandarización en la técnica basada en el método de Patel *et al.* (2012) en el ensayo de nucleación y en Bawari *et al.* (2018) para el ensayo de agregación.

#### **Extractos de Cistona**

1. Pulverizar la tableta.
2. Tomar el polvo de la tableta de Cistona (evitar el excipiente amarillo).
3. De la tableta previamente pulverizada pesar 0.1 g ó 100,000 µg en 100 mL (1000 µg/mL).

4. Diluciones seriadas a partir del “stock 0.1 g/100 mL (1000 µg/mL); 800 µg/mL, 600 µg/mL, 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL en agua destilada.
5. Tomar 10 mL de cada dilución en tubos y llevar a centrifuga a 1,500 rpm por 5 min a 4°C.
6. Evitar el sedimento al tomar cada mL por dilución.

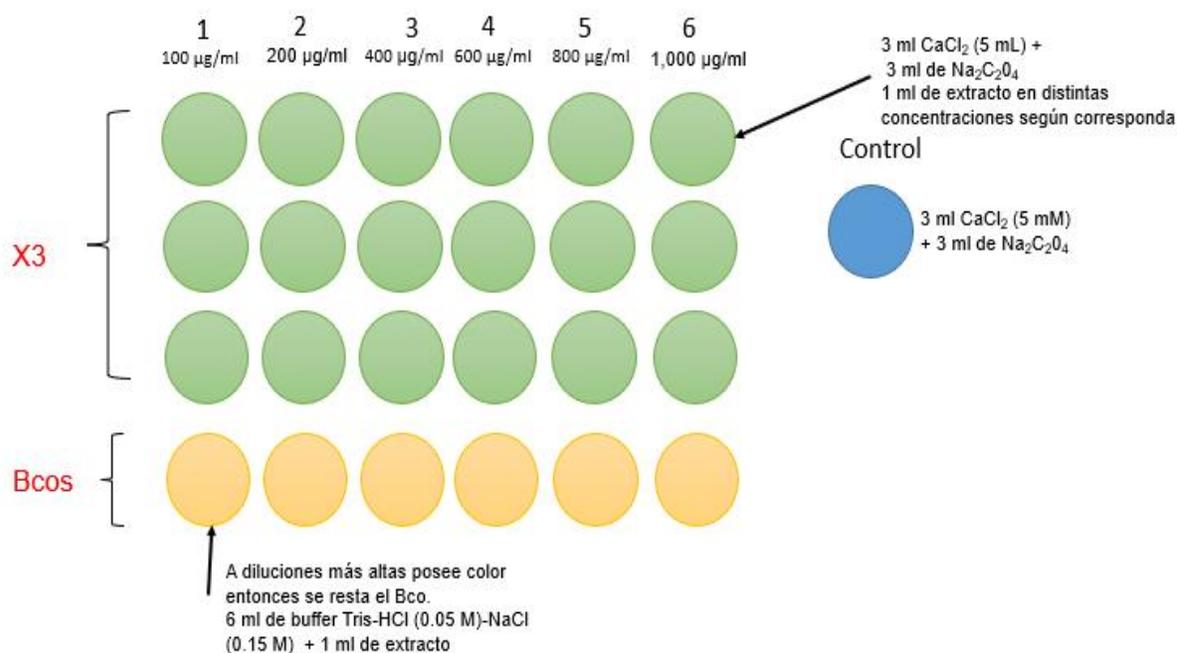
### 6.6.1. Nucleación

El proceso por el que se forman núcleos en una solución se denomina nucleación. La nucleación es un paso muy importante en el mecanismo general de la urolitiasis renal, es el acontecimiento inicial en la precipitación sal-cálculo Oner *et al.*, (2018).

Se preparó cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) al 5mM y oxalato de sodio (Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) al 7.5 mM en un buffer de Tris-HCL 0.05 M y NaCl 0.15 M con pH 6.5. Los extractos de *E. japonica* y la Cistona (1000 µg/mL, 800 µg/mL, 600 µg/mL, 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL) fueron diluidos en agua destilada respectivamente. Un mililitro de cada concentración (100µg/mL-1,000 µg/mL) del extracto y Cistona fueron mezclados en tubos de ensaye con 3 mL de la solución de CaCl<sub>2</sub>, descrita previamente, seguido de 3 mL Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, como control positivo se empleó 3 mL CaCl<sub>2</sub> y 3mL de Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Figura 12). Las mezclas se llevaron a incubación a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Finalmente se leyó en un espectrofotómetro a 620 nm, el porcentaje de inhibición de los cristales nucleados se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left( 1 - \frac{DO \text{ mtra} - DO \text{ bco}}{DO \text{ control}} \right) \times 100$$

Dónde DO Mtra es la densidad óptica de la muestra del Cistona o de *E. japonica*, mientras que la DO Bco es la densidad óptica del blanco de cada una de las muestras en distintas concentraciones (1000 µg/mL, 800 µg/mL, 600 µg/mL, 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL) + Buffer para restar el color de cada muestra. Finalmente, DO corresponde a la densidad óptica del control negativo.



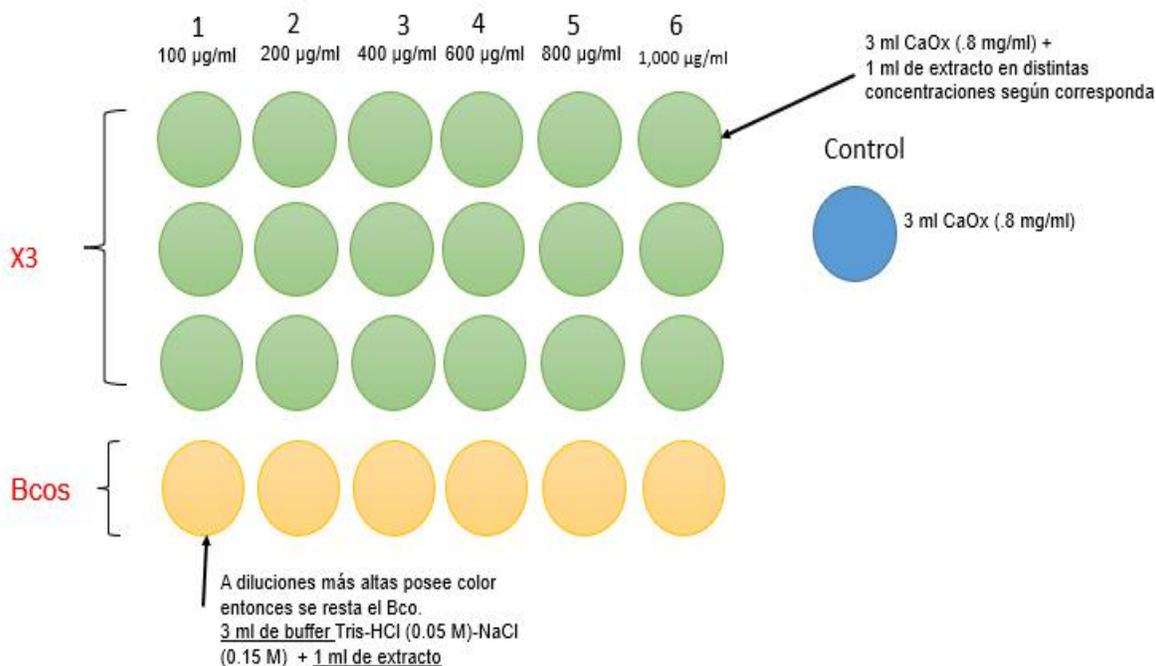
**Figura 12.** Acomodo esquemático de los tubos de ensayo de los extractos (100-1,000 µg/mL), control y los blancos del ensayo de nucleación.

### 6.6.2. Agregación

La agregación es un proceso rápido por el que la formación de partículas más grandes se produce en cuestión de segundos y, por lo tanto, se considera más crítico que la nucleación y el crecimiento de cristales en el proceso de formación de cálculos Oner *et al.*, (2018).

La mezcla de soluciones de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  a 50 mM cada uno a 60°C a baño maría por 1 hora, así como la incubación de toda una noche a 37°C mencionada en Jamshed & Jabeen (2022); Mosquera *et al.* (2021); Bawari *et al.* (2018); Patel *et al.* (2012), fue omitida debido a que se utilizó reactivo ( $\text{CaOx}$ ) di hidratado como reactivo. Con una solución de cristales  $\text{CaOx}$  a 0.8 mg/mL fue preparado en un buffer 0.05 M Tris-HCl y 0.15 M NaCl con pH 6.5. A un mililitro de las alícuotas de *E. japonica* (100µg/mL-1,000 µg/mL) se le adicionaron 3 mL de la solución de cristales  $\text{CaOx}$  (Figura 13), posteriormente se llevaron a incubación a 37° C por

media hora, se repite el mismo procedimiento antes descrito para el control (Cistona). Las mezclas se leyeron a una longitud de onda de 620 nm y finalmente el porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula descrita en el ensayo de nucleación.



**Figura 13.** Acomodo esquemático de los tubos de ensayo de los extractos (100-1,000 µg/mL), control y los blancos del ensayo de agregación.

### 6.7. Cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en columna (CC) de la parte de acetato de etilo (AcOEt) del extracto etanólico de *Eriobotrya japonica* se realizó siguiendo el procedimiento mencionado a continuación bajo la supervisión del Dr. Jesús Martín Torres Valencia en el Área Académica de Química (AAQ) de la UAEH.

En una columna de 5cm de diámetro interno x 60 cm de largo, se adicionó sílice hasta las 6 pulgadas (138 g aproximadamente). Posteriormente, se empacó en

seco y se estabilizó la columna con hexano. Enseguida se aplicó un gramo de muestra con un mililitro de disolvente (AcOEt) mezclado con 3-5 g de sílice preferentemente, en este caso en particular sólo se mezcló con 1.32 g por la dimensión del vial empleado y se llevó al horno para evaporar el disolvente y homogeneizar el extracto con la sílice.

La columna fue sometida a distintos sistemas como se muestra en la Tabla 1, con la finalidad de decidir que eluatos serían de interés y ser analizados por resonancia magnética nuclear (RMN), de este modo rastrear el ácido ursólico. Por lo anterior, se usó cromatografía en capa fina (CCF) que facilitó comparar las muestras, además de favorecer la determinación del grado de pureza de los eluatos obtenidos, para lo cual se utilizó como revelador el  $\text{CoCl}_2$  (Cloruro de cobalto). Las fracciones o eluatos derivados de la columna se depositaron en viales calculando un aproximado de 20-40 mL. Finalmente, para simplificar y acelerar el proceso de rastreo del ácido ursólico se optó por utilizar una referencia de ácido oleanólico, que es isómero del compuesto de interés.

**Tabla 3.** Sistemas empleados en CC (Columna 1).

No.	Sistema (Disolventes)	mL (Proporción)	Eluatos (Fracciones)
1	Hexano	250 mL	1-5
2	Hexano-AcOEt	9:1	6-10
3	Hexano-AcOEt	8:2	11-15
4	Hexano-AcOEt	7:3	16-23
5	Hexano-AcOEt	6:4	24-29
6	Hexano-AcOEt	5:5.	30-35
7	Hexano-AcOEt	4:5	36-41
8	Hexano-AcOEt	3:6	42-47
9	Hexano-AcOEt	2:8	48-52
10	Hexano-AcOEt	1:9	53-56
11	AcOEt	100 mL	57
12	Acetona	100 mL	58

Para la segunda columna con 30 mm de diámetro, se empacó con sílice hasta las 6 pulgadas, posteriormente se adiciono la muestra de los eluatos 20-26 con una muestra de 0.0872 g y se aplicaron los sistemas de la Tabla 2.

**Tabla 4.** Sistemas empleados en CC (Columna 2).

No.	Sistema (Disolventes)	mL (Proporción)	Eluatos (Fracciones)
1	Hexano	150 mL	1-5
2	Hexano-AcOEt	9:1	6-9
3	Hexano-AcOEt	8:2	10-17
4	Hexano-AcOEt	7:3	18-28
5	Hexano-AcOEt	6:4	29-38

6	Hexano-AcOEt	5:5	39-48
7	AcOEt	150 mL	49

Los eluatos o fracciones que se analizaron por RMN <sup>1</sup>H son 18-28 de la columna dos y las fracciones 7-13 columna uno. Cabe aclarar que esta parte fué realizada con la ayuda del Dr. Martín Torres Valencia del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEH.

### **Análisis estadístico**

Las determinaciones que incluyen en el presente trabajo fueron realizadas por triplicado.

Se realizó el análisis estadístico de los valores obtenidos en las pruebas antioxidantes *in vitro* (DPPH•, ABTS•+ y FRAP), ensayos de cristalización; nucleación, agregación y deplexión en el software Graphpad Prism 5.00 (Graphpad Software Inc. 992-2007) con un análisis simple de varianza (ANOVA) y la diferencia entre los grupos de concentraciones o tratamientos fue determinado en base al criterio de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Para el análisis de resultados de la actividad inhibitoria frente α-Glucosidasa se optó por un análisis estadístico descriptivo con ayuda del software Graphpad Prism 5.00, dónde se grafica la media aritmética (porcentaje de inhibición por concentración) de los ensayos por triplicado, de tal manera que, se logre observar una comparativa entre las concentraciones de los extractos.

Los valores en P<0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

## 7. Resultados

### 7.1. Identificación del material vegetal

La identificación se realizó con el apoyo del M. en C. Manuel Ledezma, investigador adjunto del área de Biología y la deposición de tres ejemplares en el Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB)-ICBI. Se realizó un registro con el nombre de la especie; *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. (Figura 14) y como colector/autor: “Angel trinidad Isidro #1, HGOM”, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.



---

**Figura 14.** A) Árbol de *Eriobotrya japonica* (*E. japonica*) en la parcela. B) Hoja de *E. japonica*. vista abaxial (envés de la hoja) C) Hoja de *E. japonica*. vista adaxial (haz de la hoja). Imagen de autoría propia. Árbol de Níspero cultivado por Adelaido Isidro, Ixtlapala, Tlanchinol, Hgo

---

## 7.2. Obtención de los extractos

### 7.2.1. Extracto etanólico (EtOH)

Partiendo desde la fase de colecta con el material en peso fresco (1,200 g) recabado en campo, se obtuvo un total 535.8 g de materia vegetal triturada una vez empleado el proceso de secado y trituración. Posteriormente, se empleó el proceso de extracción, y de esta manera obtener el extracto EtOH, descrito con mejor detalle dentro de la metodología. Lo anterior resulto en 20.83 g de extracto neto EtOH. Finalmente, siguiendo la fórmula para el cálculo del rendimiento esto se interpreta en un rendimiento de 1.73% en base fresca y 3.88% en base seca.

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso de la materia vegetal seca o triturada}} * 100$$

Fórmula para la obtención del rendimiento en peso seco

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso de la materia vegetal fresca}} * 100$$

Fórmula para la obtención del rendimiento en peso seco

### 7.2.2. Extracto de acetato de etilo (AcOEt)

Una vez que se obtuvo el extracto de AcOEt por medio del proceso descrito con anterioridad en el apartado de metodología y estableciendo como base fresca al material triturado, 535.8 g provenientes de las hojas colectadas en campo, y que al término del secado con aire se registró un peso de 48.98 g de extracto. Consecuentemente, se procedieron a hacer los cálculos con base en las fórmulas para llegar a los siguientes rendimientos: 9.14% de rendimiento en base seca y 4.08 en base fresca;

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso de la materia vegetal seca o triturada}} * 100$$

Fórmula para la obtención del rendimiento en peso seco

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso de la materia vegetal fresca}} * 100$$

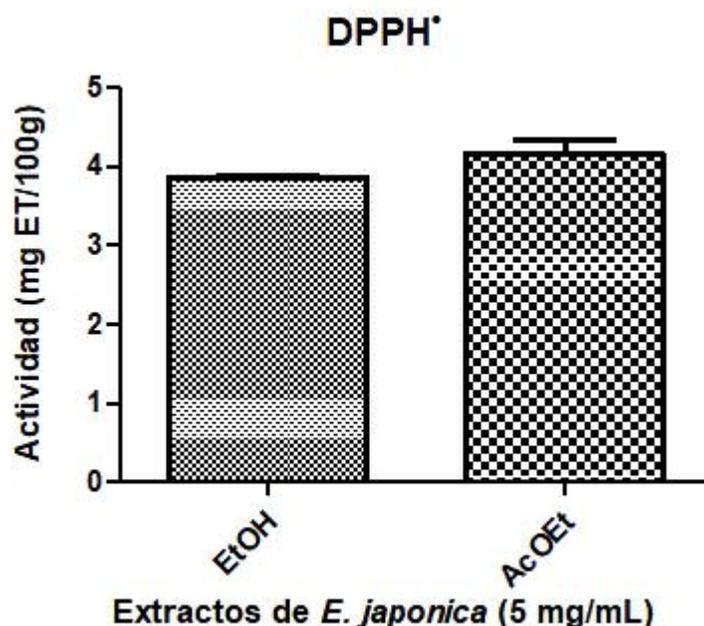
Fórmula para la obtención del rendimiento en peso seco

### 7.3. Actividad antioxidante

Los valores obtenidos de la actividad antioxidante en las hojas de *E. japónica* para la fracción etanólica (EtOH) y acetato de etilo (AcOEt) en una concentración de 5 mg/mL, se muestran en la Tabla 5 y se ven expresados en miligramos equivalentes trolox por cada 100 mg de extracto (mg EqTrolox/ 100 g). En la figura 15, se presenta la gráfica de la actividad antirradical para la prueba de DPPH•, dónde se observa que el extracto de AcOEt (4.2 mg EqTrolox/100 mg) presentó una mayor actividad respecto al extracto EtOH de *E. japonica*, pero esta diferencia no es significativa estadísticamente. Lo anterior podría explicarse en los compuestos de mediana o baja polaridad atrapados en el extracto de Acetato de etilo (AcOEt), mientras que, en el etanólico (EtOH) se extraen compuestos polares.

**Tabla 5.** Valores de la actividad antioxidante in vitro de los extractos EtOH y AcOEt de las hojas de *Eriobotrya japonica*.

Extracto	DPPH• (mg EqTrolox/100 g)	ABTS•+ (mg EqTrolox/100 g)	FRAP (µM EqFeSO <sub>4</sub> /g)
EtOH 1	3.9±0.015	0.018±0.000	420±23
AcOEt 1	4.2±0.180	0.027±0.003	450±6.4

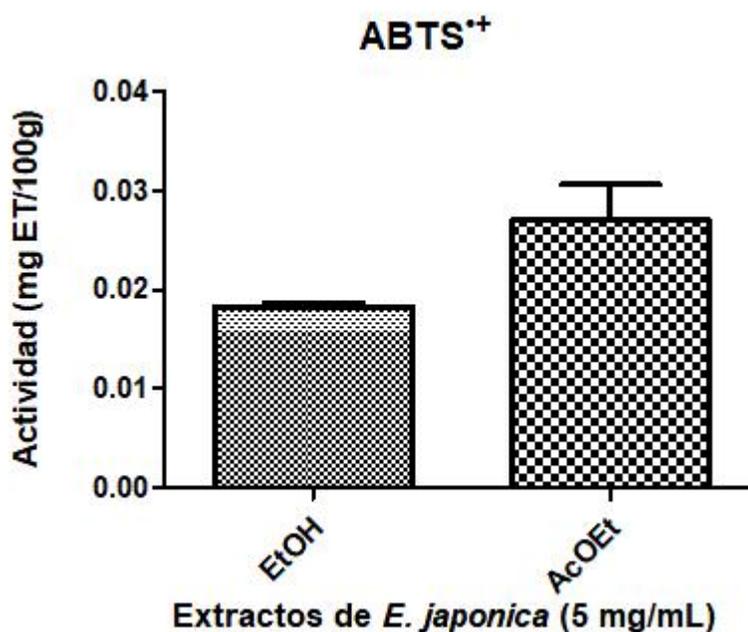



---

**Figura 15.** Actividad antioxidante *in vitro* por el método de DPPH<sup>•</sup> de los extractos EtOH y AcOEt de las hojas de *Eriobotrya japonica*.

---

Por otro lado, para los resultados para el método de ABTS<sup>•+</sup> en la fracción etanólica (EtOH) y acetato de etilo (AcOEt) con una concentración respectiva a 5 mg/mL, se expresan en miligramos equivalentes trolox por cada 100 mg de extracto (mg EqTrolox/ 100 g). Es posible observar una baja actividad en el extracto EtOH con 0.18 mg EqTrolox/ 100 g, con respecto al extracto de AcOEt se obtuvo 0.27 mg EqTrolox/ 100 g (Tabla 5). En la figura 16 se aprecia el comportamiento de los extractos para captar el radical. Los resultados mencionados anteriormente no son significativos estadísticamente al comparar ambos extractos, además demuestran una menor actividad antioxidante en el método de ABTS<sup>•+</sup> en comparación del método de DPPH<sup>•</sup>.



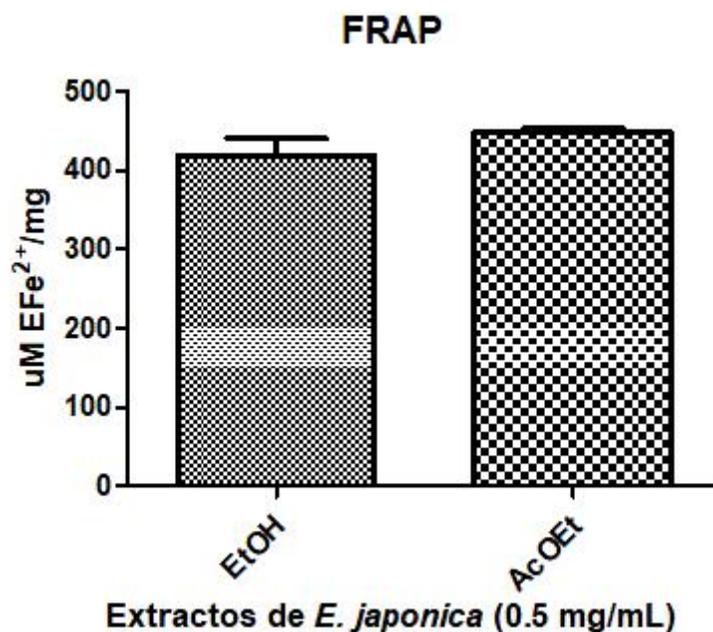

---

**Figura 16.** Actividad antioxidante in vitro por el método de ABTS<sup>•+</sup> de los extractos EtOH y AcOEt de las hojas de *Eriobotrya japonica*.

---

Finalmente, el ensayo FRAP, dónde básicamente se mide la reducción de un complejo formado por un cromógeno, normalmente de TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina), y hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) incoloro a un complejo ferroso  $\text{Fe}^{2+}$  de un intenso color azul verdoso en presencia de antioxidantes en un medio ácido, donde los resultados obtenidos en los extractos etanólico (EtOH) y de acetato de etilo (AcOEt) en una concentración de 0.5 mg/mL, se exponen en microgramos equivalentes sulfato ferroso por cada gramo de extracto ( $\mu\text{M EqFeSO}_4/\text{g}$ ).

La figura 17 muestra el grado de efectividad de ambos extractos para el ensayo FRAP, en la cual se observa que el extracto AcOEt tuvo mayor actividad en comparación al extracto EtOH, pero al someterse a una prueba de t independiente (Unpaired t test) se demuestra que no existen diferencias significativas en las medias de ambos extractos.



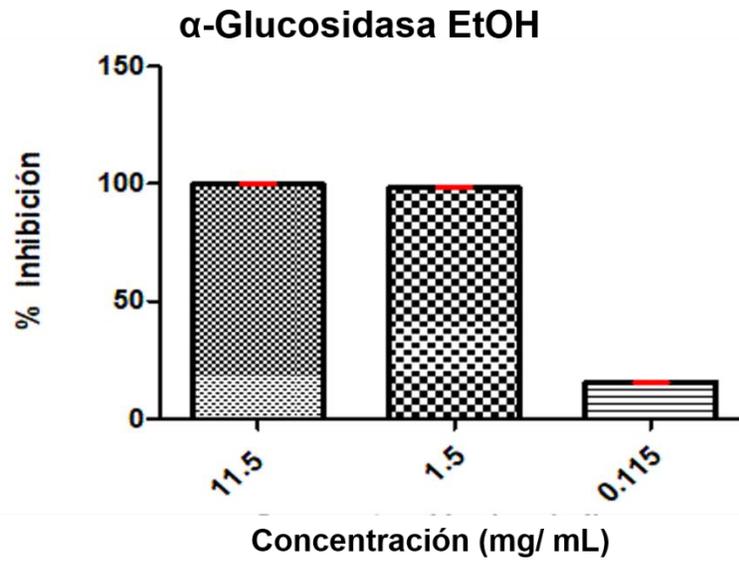

---

**Figura 17.** Actividad antioxidante in vitro por el método de FRAP de los extractos EtOH y AcOEt de las hojas de *E. japonica*.

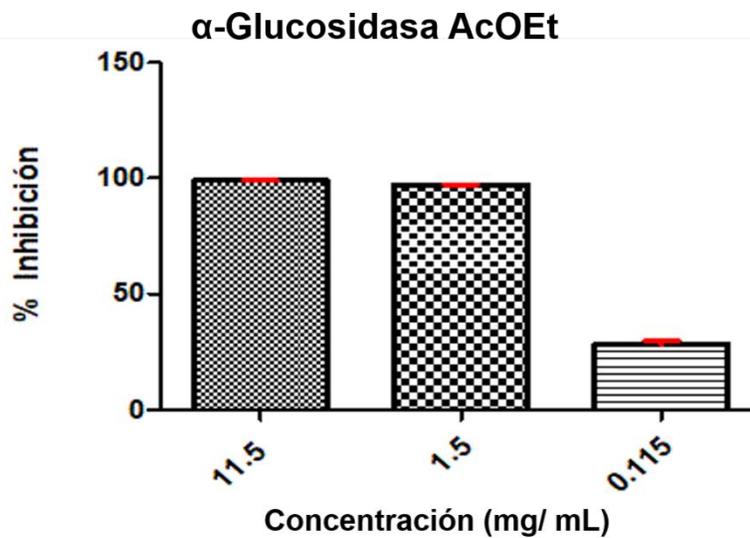
---

#### **7.4. Actividad inhibitoria frente alfa glucosidasa**

En las figuras 18 y 19, se observa el efecto inhibitorio de ambos extractos, donde el porcentaje de inhibición fue de 99.8 % para el extracto etanólico en una concentración de 11.5 mg/mL y del 98.9% por parte del extracto de acetato de etilo, respectivamente. En esta directriz, se pueden observar un 98% de uno y un 97% de otro en la segunda concentración. Finalmente, tanto el extracto EtOH como el de AcOEt obtienen un porcentaje de un 15% hasta un 28%; es decir que a partir de 1.15 mg/mL se logra una inhibición significativa ( $P < 0.05$ ), con respecto a la menor concentración.



**Figura 18.** Actividad inhibitoria frente a α-glucosidasa del extracto EtOH de las hojas de *Eriobotrya japonica*, cada concentración fue corrida por triplicado.



**Figura 19.** Actividad inhibitoria frente a α-glucosidasa del extracto AcOEt de las hojas de *Eriobotrya japonica*, cada concentración fue corrida por triplicado.

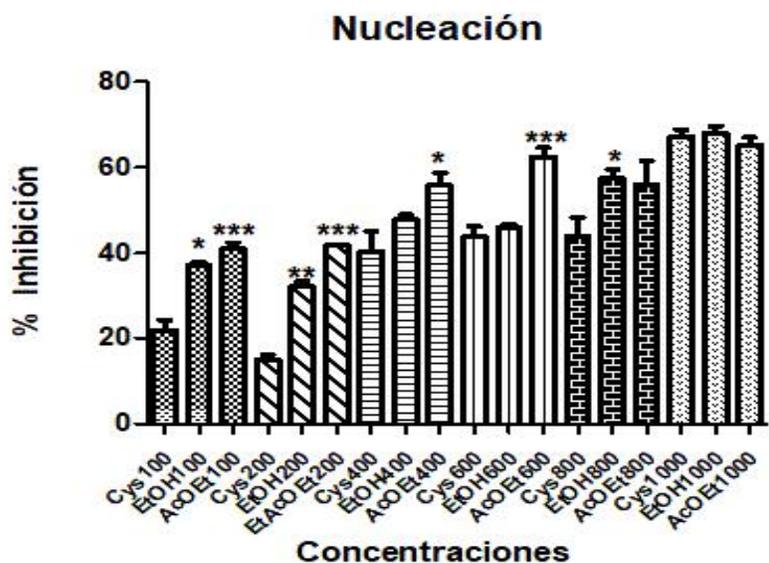
### **7.5. Ensayos de cristalización**

En la figura 20, se muestran los resultados del ensayo de nucleación, donde la Cistona (Cys) inhibió en un 22%, 15%, 40%, 43%, 44% y 67%, con 100, 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Tanto el extracto en etanol (EtOH) como el de acetato de etilo (AcOEt) tuvieron una mayor eficacia que la Cys en las dos primeras concentraciones (100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mientras que el AcOEt fue el único que mantuvo diferencias significativas en las siguientes dosis crecientes (400 y 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), la tendencia a una eficacia similar o ligeramente mayor por parte de ambos extractos se observó con las últimas dosis mayores (800 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Esto indica que los compuestos bioactivos encargados de inhibir el inicio o fase temprana de la formación de cristales de oxalato de calcio participan significativamente en toda la gama de concentraciones evaluada.

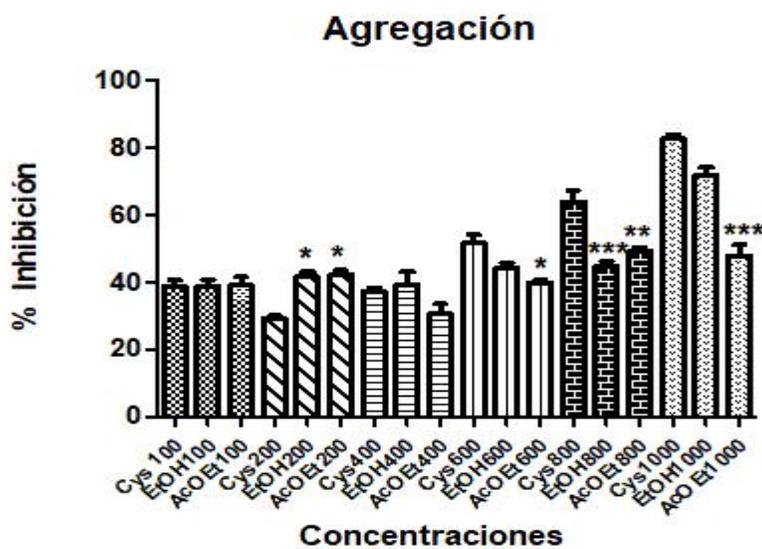
En contraparte, la figura 21 indica los resultados para el ensayo de agregación, de la cual la Cys logró una inhibición de 39%, 29%, 37%, 51%, 64% y 82% en concentraciones 100, 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, entonces, es posible ver un comportamiento de inhibición dosis-dependiente desde los 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Particularmente, en los extractos EtOH y AcOEt se mostraron más eficaces exclusivamente en la segunda concentración (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de manera significativa, sin embargo, la Cys tuvo un mejor desempeño palpable a medida que la dosis se incrementó de manera gradual, esta tendencia colocó a la Cys como el más eficaz para la fase de agregación, fase que se caracteriza por la aglomeración de los cristales debido a las interacciones entre partículas cristalinas y macromoléculas urinarias por medio de fuerzas de atracción electrostática, promoviendo la formación de cristales de diversa composición.

Al endosar ambas observaciones es importante precisar que tanto el extracto EtOH como de AcOEt presentan compuestos bioactivos potenciales para el tratamiento de las fases tempranas de la urolitiasis (nucleación), de modo que es un buen candidato para uso preventivo de modo que puede fungir como suplemento, o valdría la pena su integración en los hábitos alimenticios, puesto

que, en las fases o procesos de formación de dichos cristales resulta complejo para ambos extractos superar la eficacia del control (Cys).



**Figura 20.** Porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos (EtOH), acetato de etilo (AcOEt) frente a la cistona (Cys) como control en las concentraciones evaluadas. Dónde \* es  $P < 0.5$ , \*\* $P < 0.001$  y \*\*\* $P < 0.0001$



**Figura 21.** Porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos (EtOH), acetato de etilo (AcOEt) ante la cistona (Cys) como control dentro de las concentraciones evaluadas. Dónde \* es  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  y \*\*\* $P < 0.0001$

### 7.6. Cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en columna (CC) permitió obtener cincuenta y ocho eluatos acorde con la tabla 3, con cantidades de aproximadamente 20 a 40 mL, por lo anterior se optó por aplicar CCF con la finalidad de observar aquellos eluatos que contenían bandas (compuestos) muy similares, a una altura similar (Figura 22-23) y agrupar dichos eluatos (Tabla 6). Una vez agrupados los eluatos de interés, es decir aquellos eluatos dónde posiblemente esté el ácido ursólico, por medio de CFF se rastrea entre las agrupaciones con ayuda de una referencia de ácido oleanólico, isómero del ácido ursólico (Figura 24).

**Tabla 6.** Agrupaciones de los eluatos aplicando CCF de la columna uno.

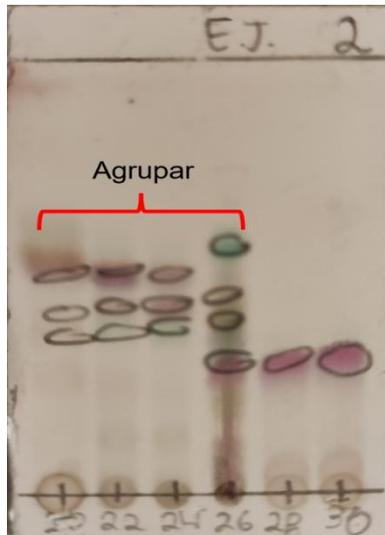
Agrupación (No)	Sistema	Peso vial (g)	Peso vial c/muestra	Peso total de muestra (g)
1-6	Hexano	8.3854	-	-
7-13	Hexano-AcOEt (9:1,8:2)	9.4036	-	-
15-19	Hexano-AcOEt (8:2,7:3)	9.0772	-	-
20-26	Hexano-AcOEt (7:3,6:4)	9.4926	9.5798	0.0872
27-31	Hexano-AcOEt (6:4,5:5)	13.1246	-	-

Posteriormente, la agrupación 20-26 de la Tabla 6 fue el candidato a una segunda columna por la aglomeración de compuestos que presentaba, de este modo al aplicar los sistemas de la Tabla 4 se obtuvieron cuarenta y ocho viales con 20-40 mL de eluato aproximadamente, mismos que se agruparon de la siguiente manera (tabla 7).

**Tabla 7.** Agrupaciones de los eluatos aplicando CCF de la columna dos.

Agrupación (No)	Sistema	Peso vial (g)	Peso vial c/muestra	Peso total de muestra (g)
1-5	Hexano	-		
6-9	Hexano-AcOEt (9:1)	-		
10-17	Hexano-AcOEt (8:2)	-		
18-28	Hexano-AcOEt (7:3)	-		
29-38	Hexano-AcOEt (6:4)	69.84	78.4794	0.6394
39-49	Hexano-AcOEt (5:4)	-		

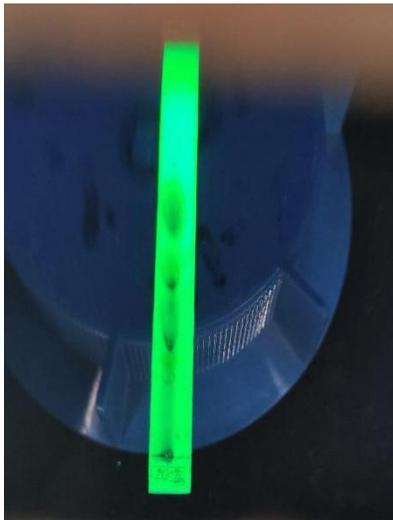
Los eluatos o fracciones que fueron evaluados a RMN <sup>1</sup>H son 18-28 de la columna dos y las fracciones 7-13 de la columna uno, a razón de las coincidencias con la referencia empleada (ácido oleanólico).



---

**Figura 22.** Ejemplo de agrupación al aplicar CCF al observar que se tienen compuestos similares a la misma altura (Columna 1).

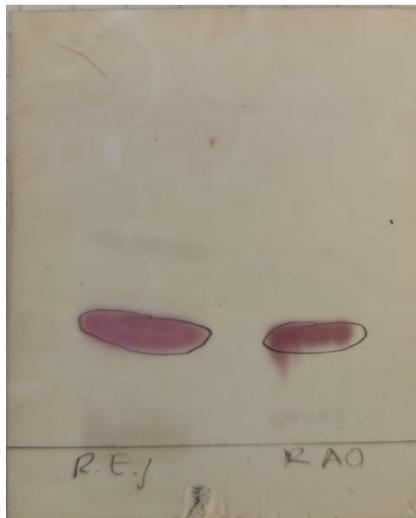
---



---

**Figura 23.** Aglomeración de compuestos en la agrupación 20-26 de la columna 1, visibles a luz ultravioleta (UV) aplicando CCF sin aplicar revelador (CoCl).

---



---

**Figura 24.** Comparación del extracto de la agrupación 18-28 resultante de la columna 2 (REJ) frente a la referencia de ácido oleanólico (RAO).

---

## 8. Discusión de resultados

### 8.1. Rendimiento de extractos

El rendimiento es una expresión cuantitativa de la eficiencia de un determinado procedimiento experimental, por lo tanto, se determinó la efectividad de las técnicas empleadas en la extracción de compuestos de *E. japonica* mediante la fórmula descrita en el apartado de resultados con la finalidad de evaluar la eficacia de dichos extractos de naturaleza etanólica y de acetato de etilo frente a tres líneas de investigación (antioxidante,  $\alpha$ -Glucosidasa y antiurolítico). Las hojas de níspero poseen una larga historia de uso medicinal tradicional, principalmente empleado en China, por lo tanto esto generó un foco de atención en las hojas de la especie y gracias a las investigaciones a lo largo de estos años se han concretado registros de propiedades benéficas, tales como antitumoral, antivirales, antioxidantes, así como efectos de reducción de azúcar en sangre y lípidos en sangre, regulación del sistema inmunológico, antiinflamatorios, mejora de la función hepática y que alivian la tos, es así que las hojas de *E. japonica* están catalogados con un alto valor medicinal (Zhu *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, (2023); Liu *et al.*, 2016)

El presente estudio se centró en la obtención de extractos EtOH y de AcOEt de las hojas de *E. japonica*; cuyos porcentajes de rendimiento obtenidos fueron de 1.73% y 4.08% en base fresca respectivamente, en contraste en base seca se obtuvo hasta 3.88% y 9.14%; Abdelrahman *et al.* (2022) obtuvieron rendimientos en base seca de la hoja, semilla y la fruta de *E. japonica*, dónde el menor rendimiento obtenido fue en las hojas con 17.4% de la fracción EtOH por el método de concentración en rotavapor a 40° C. Por lo cual, en el presente trabajo se optó por tomar esta técnica de extracción. En el mismo sentido Huang *et al.* (2017) sometieron a extracción las hojas de esta especie con EtOH industrial dónde obtuvieron un rendimiento de 1.90%.

Por otro lado, Maher *et al.*, (2015) obtuvieron fracciones extraídas secuencialmente con diferentes solventes resultando así un rendimiento del 9% en

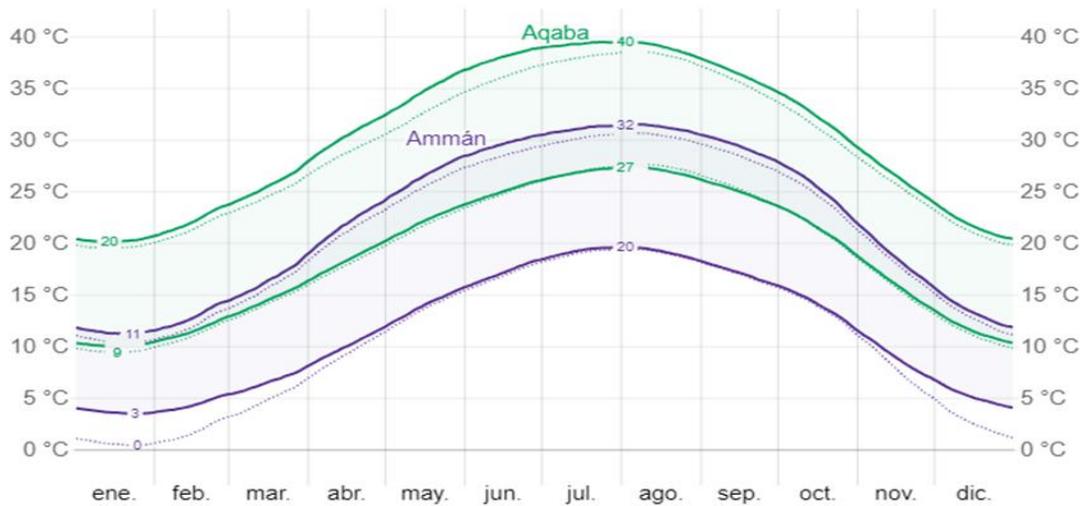
peso seco. La variación en el rendimiento del extracto de *E. japonica* entre los autores y el obtenido en el presente trabajo, puede tener explicación con el estrés ambiental abiótico al que se ve sometida la especie, esto conlleva una alteración en el metabolismo de las plantas, que se traduce en la inhibición o promoción de metabolitos secundarios, es por ello que el estudio del metabolismo secundario de las plantas suele arrojar rendimientos variables debido a la sensibilidad del metabolismo. Además, intervienen otros factores como la colecta de hojas jóvenes o viejas, pues se sabe que las hojas jóvenes acumulan metabolitos más rápidamente que las hojas más viejas (Qaderi *et al.*, 2023).

Por lo antes mencionado, a continuación, se contrasta los factores abióticos (clima, lluvia, temperatura) a los cuales la planta estuvo sometida en el tiempo de colecta; Abdelrahman *et al.*, (2022) colectaron en el mes de mayo en Jordania (Figura 25), en determinado periodo de tiempo las temperaturas promedio rondaban los 35°C, en otras palabras, temperaturas altas durante el día y con lluvia muy escasa (2.1 mm) predominaban durante dicho mes.

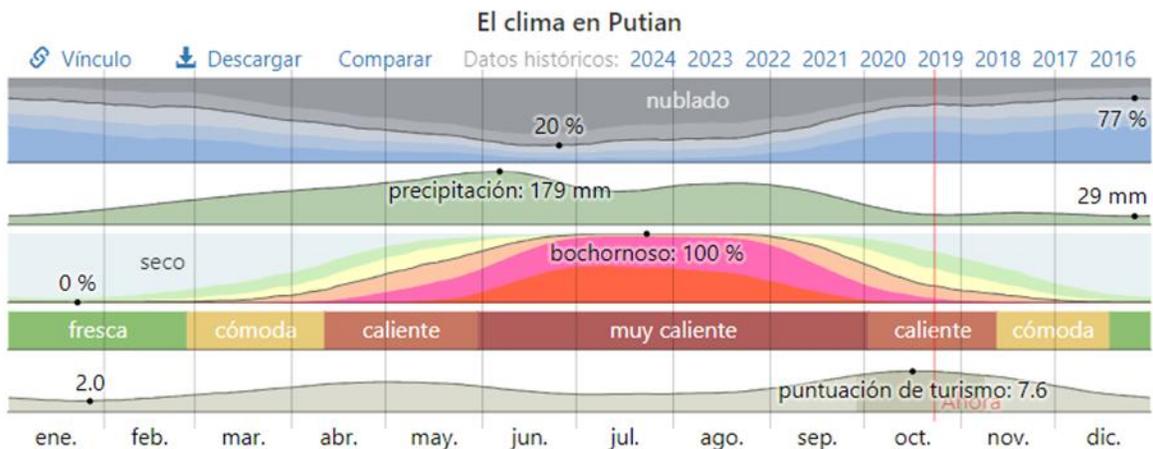
Huang *et al.*, (2017) recolectaron las hojas de *E. japonica* en el mes de junio en Putian, China. Este mes en específico representa una transición entre temperaturas bajas y cálidas a temperaturas más altas (27° C) pero tolerables, sin embargo, este mes en Putian se caracteriza por ser más lluvioso y con cielos nublados (Figura 26). Finalmente, Maher *et al.* (2015); realizaron la colecta en el mes de junio en Túnez (Figura 27) cuyo promedio de temperatura albergaba los 27°C, una época seca, con escasez de lluvia (13 mm) y cielos parcialmente despejados.

Es posible concluir que los factores abióticos si influyen de manera directa con el rendimiento de los extractos, por lo anterior, existen coincidencias con Huang *et al.* (2017) en el rendimiento obtenido en base fresca de los extractos EtOH de *E. japonica*, probablemente por los bajos niveles de estrés de la especie, ya que la zona de Tlanchinol, Hgo (lugar de colecta en el presente proyecto) es característico por ser una zona húmeda con lluvias frecuentes, temperaturas en promedio de 16-24° C, con precipitación de 1900-2100 mm según la INEGI, 2010.

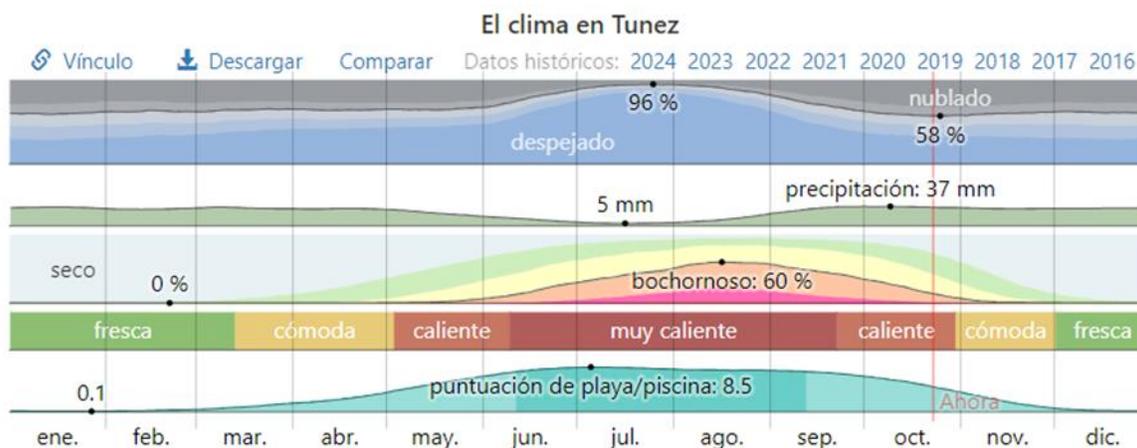
Además, en dicha parcela la especie no posee ningún depredador natural puesto que es una especie introducida en esta parte del globo terráqueo y esto puede explicar la ligera diferencia con Huang *et al.*, (2017), puesto que en Putian, China; *E. japonica* es una especie endémica y, por lo tanto, existen depredadores (factores bióticos) que la obligue a producir mayor cantidad de metabolitos secundarios y, por ende, se obtiene un mayor rendimiento.



**Figura 25.** Gráfica de comparativa del clima en Jordania (Aqaba); con distintos factores climáticos. Gráfico tomado de: Weather Spark, 2024.



**Figura 26.** Gráfica de comparativa del clima en Putian, Fujian, China; con distintos factores climáticos. Gráfico tomado de: Weather Spark, 2024.



**Figura 27.** Gráfica de comparativa del clima en Túnez; con distintos factores climáticos. Gráfico tomado de: Weather Spark, 2024.

## 8.2. Actividad antioxidante

### 8.2.1. Ensayo de DPPH•

Existe un amplio repertorio de estudios que demuestran y sustentan los efectos benéficos al consumir frutas y vegetales, ya que a nivel mundial se reconoce la capacidad de las especies vegetales para proporcionar metabolitos secundarios que a su vez aportan actividades antioxidantes. En este sentido, en el resumen que Zhu *et al.* (2022) y colaboradores desarrollaron, exhiben a los extractos de las hojas de *E. japonica* con muy buena actividad antioxidante debido a los ácidos triterpénicos, los fenoles totales, los flavonoides y los polisacáridos presentes en las hojas.

Partiendo de los resultados obtenidos, en el ensayo de DPPH• se demostró que el extracto EtOH tuvo capacidades antioxidantes de  $3.9 \pm 0.015$  mg Eq Trolox/100 g

mientras que el extracto de acetato de etilo  $4.2 \pm 0.18$  mg Eq Trolox/100 mg. De acuerdo con los resultados estadísticos, se obtiene un valor de  $P = 0.1733$ , por lo tanto, no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) comparando ambos extractos. Lo anterior, difiere con la capacidad antioxidante reportada por Barbi *et al.* (2017); con cantidades de 11.17 mg Eq Trolox/100 g con extractos de naturaleza metanólica (MeOH), mientras que Rivas *et al.* (2022) registraron capacidades antioxidantes que oscilaban los 14 y 25.3 mg Eq Trolox/100g en extractos acuosos obtenidos mediante baño ultrasónico.

Es posible notar una capacidad antioxidante bastante baja, en comparación con lo registrado por Barbi *et al.*, (2017) y Rivas *et al.* (2022); una de las posibles razones se encuentra con la observación que hicieron Mogole *et al.* (2020), puesto que notaron una actividad antioxidante muy pobre en extractos de acetato de etilo y hexano mientras que el extracto en MeOH tenía el mejor desempeño para la captación de radicales libres. Por lo descrito, se pone en evidencia que a medida que se aumenta la polaridad en los solventes aumenta el poder reductor, lo que es también directamente proporcional al aumento en la concentración de compuestos polifenólicos y flavonoides. Por ende, la actividad antioxidante y el contenido fenólico se documentan con una correlación positiva de modo que los extractos empleados por Rivas *et al.* (2022) al tratarse de extractos acuosos, posee mayor polaridad (la tabla de disolventes más usados en orden de polaridad en anexos).

Retomando el tema del impacto de ciertos factores ambientales sobre la especie, como una segunda posible explicación; Cao *et al.*, (2019) fundamenta que la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos pueden verse significativamente influenciadas por numerosos factores endógenos y exógenos. Los factores intrínsecos incluyen el genotipo y la condición fisiológica en cambio los factores exógenos reflejan los estímulos ambientales bióticos y abióticos que ocurren durante el período de crecimiento de la planta, como la depredación por insectos fitófagos o animales herbívoros, la disponibilidad de luz y agua, la composición del suelo, la temperatura y la interacción con patógenos y parásitos.

### 8.2.2. Ensayo de ABTS•+

El ensayo arrojó resultados de  $0.018 \pm 0.00033$  mg Eq Trolox/100 g para el extracto EtOH, y un total de  $0.027 \pm 0.00036$  mg Eq Trolox/100 g en el caso del extracto de AcOEt. A tenor de los resultados estadísticos partiendo de una prueba t independiente (Unpaired t test) arrojan un valor de  $P=0.0749$ , por lo tanto, no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) comparando dichos extractos respectivamente, por ende, es posible notar una actividad escasa capturante del radical preformado, y se refleja una ausencia de reducción en el radical preformado (ABTS•+).

En comparación con Zhang *et al.* (2015); que obtuvo un resultado de 7.30 a 12.77 mg Eq Trolox/g en distintos cultivos de níspero seleccionados al azar, lo que indica una actividad mucho más pronunciada en comparación con lo obtenido en el presente estudio. Dicho comportamiento ya se había observado con el ensayo DPPH• lo cual fundamenta más la influencia de los factores endógenos y exógenos sobre la biosíntesis y acumulación de compuestos, razón por la cual existe variación en la actividad antioxidante desempeñada por *E. japonica*.

En este sentido, Seong *et al.* (2019); registraron una buena actividad dosis dependiente en el ensayo de ABTS•+, dicha investigación fue realizada en Hwasun, Corea, dónde la colecta tuvo lugar a comienzos de año con un clima seco, poca lluvia y con temperaturas bajas ( $4-9^{\circ}\text{C}$ ), viéndose implicados los factores extrínsecos desafiantes, descartando a insectos fitófagos o animales herbívoros, puesto que en Corea la especie es introducida y por ende no tiene depredadores naturales en la zona. La buena actividad dosis-dependiente según Mogole *et al.* (2020) ocurre por el alto contenido de flavonoides (quercetina, catequina y epicatequina) y ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico, ácido cafeico y ácido cumárico) que fungen como agentes reductores en las muestras y a su vez provoca la reducción del complejo férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ )

### 8.2.3. Ensayo de FRAP+

Finalmente, los resultados obtenidos en el ensayo FRAP+ fueron de  $420 \pm 23$  y  $450 \pm 6.4$   $\mu\text{M}$  Eq  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  en los extractos EtOH y de AcOEt respectivamente y conforme a los resultados estadísticos al aplicar una prueba t independiente (Unpaired t test) arrojan un valor de  $P=0.2831$ , por lo tanto, no existen diferencias significativas ( $P<0.05$ ) comparando el extracto EtOH y AcOEt. En contraste, Uysal *et al.* (2017) cuyo método se basó en el secado de las hojas de *E. japonica* a temperatura ambiente por 10 días, las hojas secas se trituraron hasta obtener un polvo fino. Se extrajeron las muestras de hojas usando etanol como disolvente en diferentes concentraciones (10, 50 o 90%) a temperaturas de 20, 40 o 60 °C y durante diferentes tiempos de extracción (60, 120 o 180 min).

De esta manera, se hace hincapié en el resultado que se registró en una concentración EtOH al 90%, con una temperatura de 40° a 120 min, obteniendo una capacidad capturante de iones hierro de 141.86 mg Eq Trolox/g, puesto que los parámetros antes mencionados son los más aproximados a los empleados en el presente trabajo; por otro lado, Barbi *et al.* (2017) estimaron una actividad antioxidante dentro de un rango de 24.4 a 155.7 mg Eq Trolox/g, la variación puede tener explicación en el contenido de compuestos bioactivos responsables buena actividad capturante de iones hierro, donde según Liu *et al.*, 2016 los principales responsables son la cinchonina II b, la cinchonina I a, la epicatequina (polifenoles), 3-O-L-ramnósido de quercetina (flavonoide) y la arbutina, entre otros que se encuentran en constante cambio por condiciones ambientales determinados por la región.

A manera de conclusión y en sintonía con Parrado (2021); aquellos árboles sin prácticas agronómicas (fertilización y el riego) presentan una cantidad importante de fitoquímicos debido al déficit de nutrientes y agua, que restringe el crecimiento de las plantas reduciendo la actividad fotosintética, consecuentemente los carbohidratos no estructurales tienden a acumularse y con ello se sintetizan mayor cantidad de sustancias de defensa basadas en carbono pertenecientes a los metabolitos secundarios, es decir, los factores intrínsecos (Ej. genotipo y

ontogenia) y extrínsecos (temperatura, luz, humedad, herbivoría, etc.) son un fuerte determinante para la actividad que desempeñan en *E. japonica*, además de las técnicas de extracción empleadas y la polaridad del disolvente. Sin embargo, otro factor que muy probablemente influya es la época o estación del año, Cao *et al.* (2019) demuestra que la mejor época para obtener una buena actividad antioxidante, así como de compuestos fenólicos es en el mes de noviembre en China, se requiere más investigación para determinar la mejor época de colecta para obtener mayores índices de actividad antioxidante en Ixtlapala, Tlanchinol, Hgo, México.

### **8.3. Actividad inhibitoria frente $\alpha$ -glucosidasa**

Los resultados estadísticos indican una actividad inhibitoria destacable en al menos dos concentraciones de ambos extractos (11.5 y 1.15 mg/mL), colocándose en un rango de porcentajes de inhibición desde 97% hasta un 99%; en comparación con la acarbosa que de acuerdo con Mogole *et al.*, (2020) se usa como estándar debido a que demuestra porcentajes que llegan al 99%. Los porcentajes obtenidos coinciden con Toshima *et al.* (2010), inclusive se observó que el efecto inhibitorio de las hojas de níspero ejercido sobre  $\alpha$ -glucosidasa son mucho más fuertes que el estándar (acarbosa).

La variabilidad de los porcentajes de inhibición de acuerdo con Silva *et al.* (2019) se ven influenciadas principalmente por sustituciones de grupos hidroxilo y metilo que se sitúan terminalmente como grupos laterales, que están en configuración simple, es decir, la gran capacidad inhibitoria parece deberse principalmente a la presencia de la cadena lateral de la  $\gamma$ -lactona, estructura química que se sitúa en las flavonas e isoflavonas, y los anteriores compuestos ya han sido reportados en *E. japonica*, actuando como estimuladores de la secreción de insulina y como inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa.

#### 8.4. Ensayo de cristalización (Cristales de oxalato de calcio)

En el ensayo de nucleación, el extracto EtOH y AcEt tuvieron una eficacia significativa, incluso mayor que la Cys en las concentraciones iniciales (100 y 200 µg/mL), sin embargo, solo el AcEt mantuvo una ventaja en dosis posteriores, comparado con el EtOH y el control, lo anterior también se evidencia con las imágenes a microscopio (Anexo 11.3) en el apartado de nucleación. De acuerdo con la polaridad de disolventes, el extracto que mostró mayor concentración de AU fue el extracto de AcOEt debido a que Jin *et al.* (1997); reportaron que el AU y el AO son hidrofóbicos y complejos, es decir, que dichos ácidos orgánicos presentes en las hojas de *E. japonica* no se disuelven en agua o extractos acuosos.

Además, otro factor a tomar en cuenta es la solubilidad del AO y el AU así pues Fan *et al.* (2011); evaluaron las solubilidades de AO y AU en metanol, etanol, 2-propanol y acetato de etilo con un rango de temperatura de 10°C a 56° C aproximadamente, dónde reportaron que a medida que se incrementa la temperatura también incrementa la solubilidad, pero esto variaba entre el AO y AU, ya que la solubilidad para AU queda registrado en el siguiente orden; 2-propanol > acetato de etilo > metanol > etanol, por otro lado el AO sigue el orden mencionado a continuación: acetato de etilo > 2-propanol > etanol > metanol. Se puede observar que ambos ácidos orgánicos son más afines a disolventes de mediana polaridad como el AcOEt, por lo anterior, es posible encontrar este tipo de ácidos orgánicos en el extracto de AcOEt en comparación del EtOH, mismas que tienen propiedades activas para el tratamiento de manera efectiva en funciones renales y hepáticos.

Por otro lado, el ensayo de agregación muestra a la Cys con una inhibición de 39%, 29%, 37%, 51%, 64% y 82% en concentraciones 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/mL respectivamente, con ello es posible determinar que el control tuvo mayor eficiencia sobre los extractos EtOH y AcOEt (Anexo 11.3), para la fase de agregación de cristales coincidiendo con Azarfar *et al.* (2020); que registran una eficacia destacable para el tratamiento de la litiasis urinaria con cistona

contrastado con un placebo, además de observar diferencias significativas en la disminución del tamaño de los cálculos y la tasa de expulsión en comparación de dicho placebo, además Zarin *et al.* (2020) reporta un porcentaje de inhibición de hasta un 53% de inhibición en el ensayo de agregación en 1 mg/mL de extracto de Cistona.

Con los datos reportados anteriormente, podemos concluir que el extracto AcEt tiene una buena respuesta de inhibición en dosis crecientes, es decir, una conducta dosis dependiente por el tipo de compuestos bioactivos presentes en el extracto que son afines a la polaridad del acetato de etilo, entre ellos el AU y el AO, sin embargo, esto solo se presenta en la primera fase de la cristalización (formación del cálculo), puesto que una vez iniciado el proceso de formación en la agregación del cálculo los extractos ya no presentan una buena actividad inhibitoria como la cistona (control). De acuerdo con Lobine *et al.*, (2020); la formación y deposición de cristales en los tejidos induce a otras complejidades en el tejido renal, tales como la inflamación, estrés oxidativo y apoptosis, es por ello que las actividades analgésicas, antiinflamatorias y antiespasmódicas desempeñan un papel fundamental en el tratamiento sintomático de la urolitiasis de las cuales el ácido ursólico y del ácido oleanólico son las mejores perfiladas con antecedentes de propiedades antiinflamatorios.

Así mismo se ha demostrado que un incremento en la concentración de oxalato de calcio desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los riñones, desencadenando lesiones endoteliales y apoptosis, que propician los sitios de formación de cálculos, de modo que, una reducción en el estrés oxidativo por efecto de la actividad antioxidante resulta en un enfoque terapéutico para el tratamiento de los cálculos puesto que estos triterpenos (AU y AO) muestran actividades inhibitorias de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), de esta manera se demuestra que los triterpenos son alternativas potenciales para la urolitiasis debido a la actividad diurética (Lobine *et al.*, 2020) .

### 8.5. Cromatografía y resonancia magnética nuclear

El extracto seleccionado de AcOEt fue seleccionado para las técnicas de cromatografía y resonancia magnética nuclear en función de la afinidad reportada para el AU y el AO. Dónde, los eluatos examinados por RMN  $^1\text{H}$  fueron los agrupados 26-28 y 30 de la columna dos y las fracciones 7-13 columna uno con ayuda de la referencia, el ácido oleanólico, ya aislado previamente.

Los resultados de la RMN demuestran la presencia de ambos ácidos orgánicos (Anexos 11.4), el AU y el AO dentro del extracto de AcOEt, lo cual confirma la afinidad de dichos ácidos orgánicos con lo reportado por Fan *et al.*, (2011). Estos triterpenos ya se han reportado previamente en las hojas de *E. japonica*, dependiendo de la etapa de desarrollo y del tipo de cultivar (Ahumada *et al.*, 2017). Entre los beneficios de dichos ácidos orgánicos se encuentran actividades antiinflamatorias, regulador de la obesidad, antioxidantes, antidiabéticos y anticancerígenos (Hyun *et al.*, 2022). De esta manera concluimos que tanto el AU y el AO podrían ser los responsables de la actividad antiurolítica en fases tempranas de la cristalización de oxalato de calcio *in vitro*, sin embargo, aún queda mucha investigación por hacer y llevar este proyecto a la fase *in vivo* con un esquema experimental preventivo.

## 9. Conclusiones

- Se contribuyó al acervo de especies estudiadas en el Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB)-ICBI con identificador “Angel trinidad Isidro, #1, HGOM.
- El extracto EtOH y AcOEt tuvieron un rendimiento de 1.73% y 4.08% en base fresca respectivamente.
- Los extractos EtOH y AcOEt presentaron una escasa actividad antioxidante en las pruebas empleadas, es posible que estos resultados se deban a a la baja herbivoría y condiciones de bajo estrés abiótico (factores extrínsecos) además de factores intrínsecos (genotipo), considerando los reportes que han existido.
- La actividad frente a  $\alpha$ -Glucosidasa de ambos extractos resultaron mucho mejores que la acarbosa en una concentración de 11.5 mg/mL.
- La actividad antiurolítica de los extractos EtOH y AcOEt resultaron efectivas para fases tempranas de la formación de cálculos, sin embargo, la cistona demostró ser mejor en la etapa de agregación.
- Se identificó la presencia de ambos ácidos orgánicos, el ácido ursólico y oleanólico por medio del espectro de RMN de protón.

## 10. Bibliografía

- Abba, Y., Abdullah, F. F. J., Daud, N. H. B. A., Shaari, R. B., Tijjani, A., Sadiq, M. A., Mohammed, K., Adamu, L., & Mohd, A. M. L. (2015). Clinical management of dietary induced urolithiasis associated with balanoposthitis in a Boer goat. *Open Veterinary Journal*, 5(1), 30–33.
- Abdelrahman, Z. R., Bustanji, Y., & Abdalla, S. (2022). Ethanol Extracts of *Eriobotrya japonica* (Loquat) Seeds, Leaves, and Fruits Have Anti-obesity and Hypolipidemic Effects in Rats. *Pharmacognosy Magazine*, 19(1), 56-65. <https://doi.org/10.1177/09731296221137432>
- Ahumada, J., Fuentealba, C., Olaeta, J. A., Undurraga, P., Pedreschi, R., Shetty, K., Chirinos, R., Campos, D., & Gálvez-Ranilla, L. (2017). Bioactive compounds of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cv. Golden Nugget and analysis of the in vitro functionality for hyperglycemia management. *Ciencia e Investigación Agraria*, 44(3), 271-283. <https://doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1816>
- Almaguer, J. A. (2003). La Medicina Mexicana en el contexto intercultural. Dirección de Medicina Tradicional y Desarrollo Intercultural, *Periódico la Jornada*. México, D.F. Pág. 5.
- Atilano, X., & Espinosa, M. Á. (2003). Aspectos nutriólogicos en la litiasis renal: relevancia de otros nutrimentos diferentes al calcio. *Nutrición Clínica*, 6(3), 270-282.
- Avellaneda, I. (2013). Evaluación de la actividad inhibitoria de la  $\alpha$ - Glucosidasa ( $\alpha$ -GLC) *in vitro* por extractos vegetales [Tesis de grado, Universidad Tecnológica de Pereira]. <https://www.redalyc.org/pdf/4419/441942930006.pdf>
- Azarfar, A., Rafiee, Z., Ravanshad, Y., Moghadam, N. S., & Bakhtiari, E. (2020). Effect of Herbal Formulation “Cistona®” on Urolithiasis. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 15(3), e69246. <https://doi.org/10.5812/jjnpp.69246>
- Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Taguchi, Y., Akazawa, H., Ukiya, M., Kimura, Y., Suzuki, T., & Nishino, H. (2005). Anti-inflammatory and Antitumor-Promoting Effects of the Triterpene Acids from the Leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(10), 1995-1999. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1995>
- Barbi, R. C. T., Teixeira, G. L., Hornung, P. S., Ávila, S., & Hoffmann-Ribani, R. (2017). *Eriobotrya japonica* seed as a new source of starch: Assessment of phenolic compounds, antioxidant activity, thermal, rheological and morphological properties. *Food Hydrocolloids*, 77, 646-658. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.006>
- Bawari, S., Sah, A. N., & Tewari, D. (2018). Antirolithiatic activity of *Daucus carota*: an *in vitro* study. *Pharmacognosy Journal*, 10(5), 880-884. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.5.148>
- Benzie, I. F., & Strain, S. (1996). The ferric reducing Ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

- Boix, C., López-Torres, J., Álvarez, L., Vázquez, M.C., Romero, E., Jiménez, M. D., López J.L. (2007). Litiasis renal. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 2(1), 32-38. Redalyc, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169617650007>
- Bucay, J. W. (2006). *Las Plantas Medicinales y las Ciencias: Una Visión Multidisciplinaria*. México, DF: Instituto politécnico Nacional.
- Calao-Pérez, M., Sandoval, C. V., Gómez-Conzatti, A., Cortés-Aguilar, G., Enríquez-González, A., & Rodríguez-Covarrubias, F. (2014). Frecuencia de alteraciones en el perfil de litiasis de pacientes con obesidad. *Revista Mexicana de Urología*, 74(5), 281-285. <https://doi.org/10.1016/j.uromx.2014.09.006>
- Cao, Y., Fang, S., Fu, X., Shang, X., & Yang, W. (2019). Seasonal Variation in Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Ilijinskaja. *Forests*, 10(8), 624. <https://doi.org/10.3390/f10080624>
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1): 91-100 pp.
- Chen, Z., Zhang, L., & Chen, G. (2008). Microwave-assisted extraction followed by capillary electrophoresis-amperometric detection for the determination of antioxidant constituents in Folium Eriobotryae. *Journal of Chromatography A*, 1193(1-2), 178-181. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.032>
- Córsico, B., Falomir Lockhart, L. J., Franchini, G. R., & Scaglia, N. (2013). Análisis estructural y funcional de macromoléculas. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). [https://www.researchgate.net/publication/346250563\\_Analisis\\_estructural\\_y\\_funcional\\_de\\_macromoleculas/fulltext/5fbe0a2ca6fdcc6cc66431fd/Analisis-estructural-y-funcional-de-macromoleculas.pdf](https://www.researchgate.net/publication/346250563_Analisis_estructural_y_funcional_de_macromoleculas/fulltext/5fbe0a2ca6fdcc6cc66431fd/Analisis-estructural-y-funcional-de-macromoleculas.pdf)
- Corzo, A. (2019). *Técnicas de análisis en química orgánica: Cromatografía cátedra de química orgánica y biológica* (1a ed.). Santiago del Estero: Universidad Nacional de Santiago del Estero - UNSE. Facultad de Ciencias Forestales. ISBN 978-987-1676-86-6. <https://fcf.unse.edu.ar/index.php/portfolio/sd-44-cromatografia/>
- Courbebaisse, M., & Daudon, M. (2016). Litiasis renal y nefrocalcinosis. *EMC-Tratado de Medicina*, 20(4), 1–6. [https://doi.org/10.1016/s1636-5410\(16\)80663-7](https://doi.org/10.1016/s1636-5410(16)80663-7)
- Das, P., Gupta, G., Velu, V., Awasthi, R., Dua, K., Malipeddi, H. (2017). Formation of struvite urinary stones and approaches towards the inhibition—A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96, 361–370. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.10.015>
- Deluchi, G., & Keller, H. (2010). La naturalización del “níspero”, *Eriobotrya japonica* (Rosaceae, Maloideae), en la Argentina. *Bonplandia*, 19(1), 71-77. <https://doi.org/10.30972/bon.1911335>

- Fan, J., Kong, T., Zhang, L., Tong, S., Tian, Z., Duan, Y., & Zhang, X. (2011). Solubilities of Ursolic Acid and Oleanolic Acid in Four Solvents from (283.2 to 329.7) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 56(5), 2723-2725. <https://doi.org/10.1021/je101309a>
- Ferrer, S., D. P. M. M. (2018). Actualización en el tratamiento de la litiasis renal. *Butlletí d'informació Terapèutica*, 29(4), 21-28.
- Fu, Y., Yuan, Q., Lin, S., Liu, W., Du, G., Zhao, L., Zhang, Q., Lin, D., Liu, Y., Qin, W., Li, D., & Wu, D. (2019). Physicochemical characteristics and biological activities of polysaccharides from the leaves of different loquat (*Eriobotrya japonica*) cultivars. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 274-281. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.157>
- Gabriel, A. (2015). Fisiología Renal. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 110 (9), 27-36.
- Gacía-Nieto V, L. M. (2013). el nefrólogo y la litiasis renal.¿lo toma o la deja? *Nefrología*, 33(3), 155-159. <https://www.revistanefrologia.com/es-pdf-X0211699513002970>
- Garcia-Oliveira, P., Fraga-Corral, M., Pereira, A. G., Lourenço-Lopes, C., Jimenez-Lopez, C., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Scientific basis for the industrialization of traditionally used plants of the Rosaceae family. *Food Chemistry*, 330, 127197. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127197>
- Gu C.Z. & Spongberg S.A. 2003. *Eriobotrya*. In: Wu Z.Y., Raven P.H., Hong D.Y. (eds.) Flora of China 9:138-141. <http://flora.huh.harvard.edu/china/PDF/PDF09/Eriobotrya.PDF>
- Hernández, D. R., Barrera, V., Briz, O., González, E. A., Laguna, K. D., Jardinez, A. S., Sánchez, M., & Matuz, D. (2019). El papel de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México*, 62(3), 6–19. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2019.62.3.03>
- Herrera, A.A., Álvarez, N.A., Jiménez, R., Morelli, I.E., Ruiz, E.D., Salazar, V., Soto, G.M. (2020). Nefrolitiasis: Una revisión actualizada. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina UCR-HSJD*, 10(3), 11-18. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/clinica/article/view/42134/44397>
- Huang, L., Guo, Y., Jin, T., Yan, K., Liu, X., He, S., Li, L., Gong, Y., Ma, J., Yu, H., Lu, Z., Liu, Y., Dong, W., & Yang, F. (2023). Extraction of triterpene acids from loquat leaves via a novel hydrophobic deep eutectic solvent screened by COSMO-SAC model. *Journal of Cleaner Production*, 427, 139274. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.139274>
- Huang, S., Lin, B., Li, B., Tan, B., & Hong, Y. (2017). Purification of total flavonoids from loquat leaves by macroporous resin and corresponding antioxidant capacity. *BIO Web of Conferences*, 8, 03010. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170803010>
- Hyun, M. K., Kim, D. H., Park, C. H., Noh, S. G., Choi, S., Lee, J. Y., Choi, J. H., Park, D., Choi, Y. J., & Chung, H. Y. (2022). Protective mechanisms of loquat leaf extract and ursolic acid

- against diabetic pro-inflammation. *Journal of Molecular Medicine*, 100(10), 1455-1464. <https://doi.org/10.1007/s00109-022-02243-x>
- Idress M., Li M., Pathak M.L., Qaiser M., Zhang Z., & Gao X.-F. 2022. A taxonomic revisión of the genus *Eriobotrya* Lindl. (Rosaceae). *Pakistan Journal of Botany* 54(3): 985-1017.
- Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). (2019). Diagnóstico y tratamiento del cólico renoureteral en el servicio de urgencias. Guía de práctica clínica: evidencias y recomendaciones. En [www.imss.gob.mx](http://www.imss.gob.mx). Coordinación Técnica de Excelencia Clínica. <http://imss.gob.mx/profesionales-salud/gpc>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2010). Compendio de información geográfica municipal 2010 (clave geoestadística 13073). [https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/13/13073.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/13/13073.pdf)
- Jamshed, A., & Jabeen, Q. (2022). Pharmacological evaluation of *Mentha piperita* against urolithiasis: An *In vitro* and *In vivo* study. *Dose-Response*, 20(1), 155932582110730. <https://doi.org/10.1177/15593258211073087>
- Jian, T., Chen, J., Ding, X., Lv, H., Li, J., Wu, Y., Ren, B., Tong, B., Zuo, Y., Su, K., & Li, W. (2020). Flavonoids isolated from loquat (*Eriobotrya japonica*) leaves inhibit oxidative stress and inflammation induced by cigarette smoke in COPD mice: the role of TRPV1 signaling pathways. *Food & Function*, 11(4), 3516-3526. <https://doi.org/10.1039/c9fo02921d>
- Jin, I. J., Ko, Y. I., Kim, Y. M., & Han, S. K. (1997). Solubilization of oleanolic acid and ursolic acid by cosolvency. *Archives of Pharmacal Research*, 20(3), 269-274. <https://doi.org/10.1007/bf02976156>
- Kasper, D. L., Braunwald, E., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D., Jameson, J. L., & Loscalzo, J. (2009). Harrison's Manual of Medicine (18a ed.). McGraw-Hill Medical, 2382-2386.
- Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Loscalzo, J., & Larry, J. (2016). Harrison. Principios de Medicina Interna 19a edición Vol. 2. In *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2, 1866-1874.
- Khamchun, S., Yoodee, S., & Thongboonkerd, V. (2021). Dual modulatory effects of diosmin on calcium oxalate kidney stone formation processes: Crystallization, growth, aggregation, crystal-cell adhesion, internalization into renal tubular cells, and invasion through extracellular matrix. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 141. 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111903>
- Khouya, T., Ramchoun, M., Elbouny, H., Hmidani, A., Bouhlali, E. dine T., & Alem, C. (2022). Loquat (*Eriobotrya Japonica* (Thunb.) Lindl.): Evaluation of Nutritional Value, Polyphenol Composition, Antidiabetic Effect, and Toxicity of Leaf Aqueous Extract. *SSRN Electronic Journal*, 296, 1-8. (. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4031562>

- Kim, T. muk, Paudel, K. R., & Kim, D. W. (2020). *Eriobotrya japonica* leaf extract attenuates airway inflammation in ovalbumin-induced mice model of asthma. *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112082. 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112082>
- Liu, Y., Zhang, W., Xu, C., & Li, X. (2016). Biological activities of extracts from Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.): A review. In *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17121983>
- Lobine, D., Ahmed, S., Aschner, M., Khan, H., Mirzaei, H., & Mahomoodally, M. F. (2020). Antirolithiatic effects of pentacyclic triterpenes: The distance traveled from therapeutic aspects. *Drug Development Research*, 81(6), 671-684. <https://doi.org/10.1002/ddr.21670>
- Luciano, R. L., & Perazella, M. A. (2015). Crystalline-induced kidney disease: a case for urine microscopy. *Clinical Kidney Journal*, 8(2), 131–136. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfu105>
- Maher, K., Yassine, B. A., & Sofiane, B. (2015). Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Eriobotrya japonica* leaves extracts. *African Health Sciences*, 15(2). <https://doi.org/10.4314/ahs.v15i2.39>
- Marieb, E. (2008). Anatomía y fisiología humana. 9a Edición. In *Anatomía y Fisiología Humana 9a Edición*. 518-527.
- Matalka, K., Abdulridha, N., Badr, M., Mansoor, K., Qinna, N., & Qadan, F. (2016). *Eriobotrya japonica* Water Extract Characterization: An Inducer of Interferon-Gamma Production Mainly by the JAK-STAT Pathway. *Molecules*, 21(6), 722. <https://doi.org/10.3390/molecules21060722>
- Mogole, L., Omwoyo, W. N., & Mtunzi, F. M. (2020). Phytochemical screening, anti-oxidant activity and  $\alpha$ -amylase inhibition study using different extracts of loquat (*Eriobotrya japonica*) leaves. *Heliyon*, 6(8), e04736. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04736>
- Mokdad, I., Kilani-Jaziri, S., Mustapha, N., Bedoui, A., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2015). Evaluation of the antimutagenic, antigenotoxic, and antioxidant activities of *Eriobotrya japonica* leaves. *Pharmaceutical Biology*, 53(12), 1786-1794. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1008145>.
- Morales, F. J., & Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72(1), 119–125. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00239-9)
- Mosquera, D. M. G., Ortega, Y. H., Quero, P. C., Martínez, R. S., & Pieters, L. (2020). Antirolithiatic activity of *Boldoa purpurascens* aqueous extract: An in vitro and in vivo study. *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 1-8. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.112691>
- Mun, J., Park, J., Yoon, H. G., You, Y., Choi, K. C., Lee, Y. H., Kim, K., Lee, J., Kim, O. K., & Jun, W. (2019). Effects of *Eriobotrya japonica* Water Extract on Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Impairment. *Journal of Medicinal Food*, 22(12). <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.4493>

- Negri, A. L., Spivacow, F. R., & del Valle, E. E. (2013). La dieta en el tratamiento de la litiasis renal-bases fisiopatológicas. *Medicina (Argentina)*, 73(3), 267-271.
- Ogah, O., Watkins, C. S., Ubi, B. E., & Oraguzie, N. C. (2014). Phenolic compounds in Rosaceae fruit and nut crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(39), 9369–9386. <https://doi.org/10.1021/jf501574g>
- Oner, M., Koutsoukos, P. G., & Robertson, W. G. (2022). Kidney stone formation-Thermodynamic, kinetic, and clinical aspects. In *Water-Formed Deposits: Fundamentals and Mitigation Strategies*, 4. 511-517. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822896-8.00035-2>
- Ortegón-Gallareta, R., Aguilar-Moreno, J., Álvarez-Baeza, A., Méndez-Domínguez, N., & Pech-Cervantes, P. I. (2019). Perfil epidemiológico de las hospitalizaciones por urolitiasis en el Estado de Yucatán, México. *Revista Mexicana de Urología*, 79(5), 1–11. <https://doi.org/10.48193/rmu.v79i5.517>
- Park, B., Nomura, T., Fukudome, H., Onjo, M., Shimada, A., & Samejima, H. (2019). Chemical Constituents of the Leaves of *Eriobotrya japonica*. *Chemistry Of Natural Compounds*, 55(5), 942-944. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02854-w>
- Parrado, L.X. 2021. Caracterización morfológica, fisicoquímica y fitoquímica de níspero (*Eriobotrya japonica* Lindl.) en tres regiones de México. Tesis para maestría en ciencias. Universidad de Chapingo, México: 13-14 pp.
- Patel, P. K., Patel, M. A., Vyas, B. A., Shah, D. R., & Gandhi, T. R. (2012). Antiurolithiatic activity of saponin rich fraction from the fruits of *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. (Solanaceae) against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(1), 160-170. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2012.08.043>
- Perez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145. ISSN: 1989-3620
- Qaderi, M. M., Martel, A. B., & Strugnell, C. A. (2023). Environmental factors regulate plant secondary metabolites. *Plants*, 12(3), 447. <https://doi.org/10.3390/plants12030447>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Rincón-Silva, J. D., Rincon-Silva, N. G., & Acosta-Vargas, J. S. (2019). Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de diabetes mellitus. *Biociencias*, 14(2), 129–148. <https://doi.org/10.18041/2390-0512/biociencias.2.6026>
- Rivas, M., Zaldaña, J., Gálvez, A., Castillo, U. G., Menjívar, J., Martínez, M. L., & Núñez, M. J. (2022). Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante en frutos de la flora salvadoreña. *Revista Minerva*, 3(2), 21-33. <https://doi.org/10.5377/revminerva.v3i2.12472>

- Rollinger, J. M., Kratschmar, D. V., Schuster, D., Pfisterer, P. H., Gummy, C., Aubry, E. M., Brandstötter, S., Stuppner, H., Wolber, G., & Odermatt, A. (2010). 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibiting constituents from *Eriobotrya japonica* revealed by bioactivity-guided isolation and computational approaches. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(4), 1507-1515. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.01.010>
- Rzedowski, J. (2021). La familia Rosaceae en México. *Polibotánica*, (51). <https://doi.org/10.18387/polibotanica.51.1>
- Sánchez, I. (2016). Modelo fisicoquímico de nucleación y crecimiento de cristales en interfases y membranas biológicas. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, España. Tesis para el grado de ingeniería. 25-27 pp.
- Seong, N.-W., Oh, W.-J., Kim, I.-S., Kim, S.-J., Seo, J.-E., Park, C.-E., Kim, D.-Y., Ko, J.-W., & Kim, J.-C. (2019). Efficacy and local irritation evaluation of *Eriobotrya japonica* leaf ethanol extract. *Laboratory Animal Research*, 35(1). <https://doi.org/10.1186/s42826-019-0003-3>
- Shahat, A. A., Ullah, R., Alqahtani, A. S., Alsaid, M. S., Hussein, H. A., & al Meanazel, O. T. R. (2018). Hepatoprotective effect of *Eriobotrya japonica* leaf extract and its various fractions against carbon tetra chloride induced hepatotoxicity in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3782768>
- Silva, J. D. R., Rincon-Silva, N. G., & Vargas, J. S. A. (2019). Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de diabetes mellitus. *Revista Biociencias*, 14(2), 129-148. <https://doi.org/10.18041/2390-0512/biociencias.2.6026>
- Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Cengage Learning. 863-875.
- Suárez-Medina, K., & Coy-Barrera, E. (2016). Diversidad de los compuestos orgánicos bioactivos de origen natural: una singularidad manifestada por la plasticidad en el metabolismo secundario. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 252–269. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2031>
- Tan, B. X., Yang, L., Huang, Y. Y., Chen, Y. Y., Peng, G. T., Yu, S., Wu, Y. N., Luo, H. bin, & He, X. X. (2017). Bioactive triterpenoids from the leaves of *Eriobotrya japonica* as the natural PDE4 inhibitors. *Natural Product Research*, 31(24). <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1300796>
- Toshima, A., Matsui, T., Noguchi, M., Qiu, J., Tamaya, K., Miyata, Y., Tanaka, T., & Tanaka, K. (2010). Identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from a new fermented tea obtained by tea-rolling processing of loquat (*Eriobotrya japonica*) and green tea leaves. *Journal of The Science of Food And Agriculture/Journal of The Science of Food And Agriculture*, 90(9), 1545-1550. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3983>

- Tovar, J., & Marino, O. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera [Trabajo de grado para optar al título de Químico Industrial]. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA.
- Uysal, S., Cvetanović, A., Zengin, G., Đurović, S., & Aktumsek, A. (2017). Optimization of the extraction process of antioxidants from loquat leaves using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), e13185. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13185>
- Valcárcel, J., González, H., & Valcárcel, D. H. (2008). Espectroscopía. Fundamento de la resonancia magnética nuclear. *Entornos*, 21, 89-94.
- 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>
- Weather Spark. (2024). El tiempo durante todo el año en cualquier lugar del mundo - Weather Spark: <https://es.weatherspark.com/>
- Wink, M. (2002). Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach P.M. Dewick; Wiley, Chichester, UK, 2002, 2nd ed. 34-95, ISBN 0-471-49641-3. *Phytochemistry*, 60(6), 648. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00176-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00176-0)
- Xiao, S., Wang, W., & Liu, Y. (2023). Research Progress on Extraction and Separation of Active Components from Loquat Leaves. *Separations*, 10(2), 126. <https://doi.org/10.3390/separations10020126>
- Zarin, M. A., Tan, J. S., Murugan, P., & Ahmad, R. (2020). Investigation of potential anti-urolithiatic activity from different types of Musa pseudo-stem extracts in inhibition of calcium oxalate crystallization. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03113-0>
- Zhang, J., Li, W., Bian, P., Yang, L., Liu, H., Pan, D., & Dou, Z. (2021). Ursolic acid treats renal tubular epithelial cell damage induced by calcium oxalate monohydrate via inhibiting oxidative stress and inflammation. *Bioengineered*, 12(1), 5450-5461. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1955176>
- Zhang, S., Zhang, H., Shi, L., Li, Y., Tuerhong, M., Abudukeremu, M., Cui, J., Li, Y., Jin, D., Xu, J., & Guo, Y. (2021). Structure features, selenylation modification, and improved anti-tumor activity of a polysaccharide from *Eriobotrya japonica*. *Carbohydrate Polymers*, 273, 118496. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118496>
- Zhang, W., Zhao, X., Sun, C., Li, X., & Chen, K. (2015). Phenolic Composition from Different Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Cultivars Grown in China and Their Antioxidant Properties. *Molecules*, 20(1), 542-555. <https://doi.org/10.3390/molecules20010542>

- Zhao, L., Chen, J., Lv, H., Ao, X., Ren, B., Li, W. (2015). A New Sesquiterpene Glycoside from the Leaves of *Eriobotrya japonica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(6). <https://doi.org/10.1007/s10600-015-1502-6>
- Zheng, Y., Bai, L., Zhou, Y., Tong, R., Zeng, M., Li, X., & Shi, J. (2019). Polysaccharides from Chinese herbal medicine for anti-diabetes recent advances. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1240–1253. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.10.072>
- Zhou, X., Chen, H., Wei, F., Zhao, Q., Su, Q., Lei, Y., Yin, M., Tian, X., Liu, Z., Yu, B., Bai, C., He, X., & Huang, Z. (2019). The Inhibitory Effects of Pentacyclic Triterpenes from Loquat Leaf against Th17 Differentiation. *Immunological Investigations*, 49(6), 632-647. <https://doi.org/10.1080/08820139.2019.1698599>
- Zhu, X., Wang, L., Zhao, T., & Jiang, Q. (2022). Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicity of *Eriobotrya japonica* leaves: A summary. *Journal of Ethnopharmacology*, 298(115566). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115566>

## 11. ANEXOS

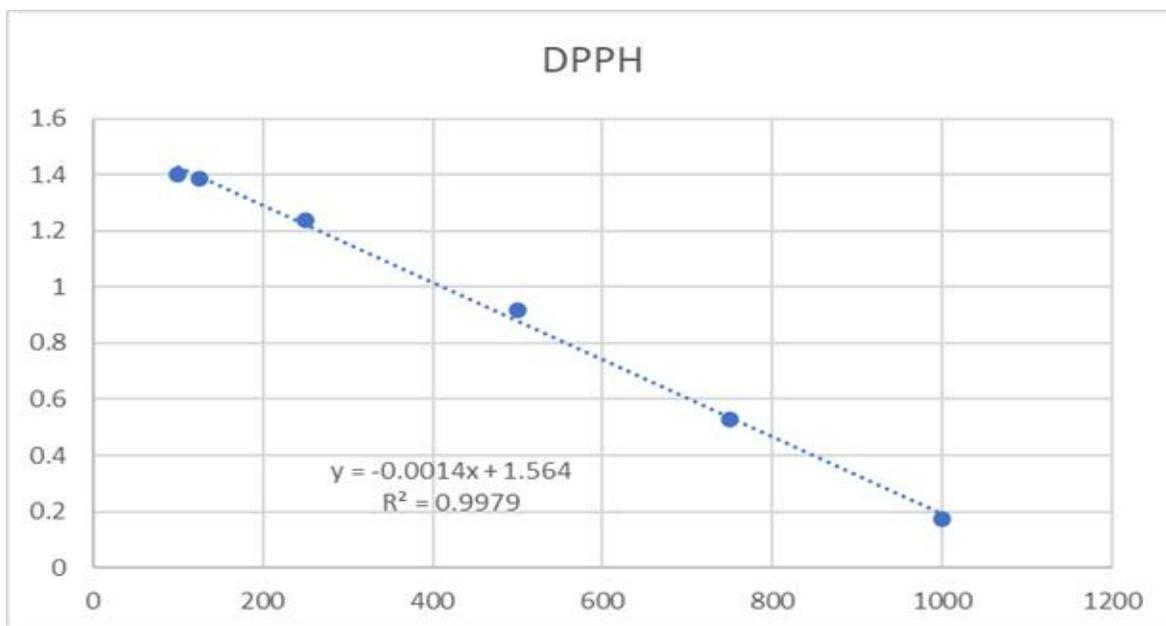
### 11.1. Preparación de curvas patrón

#### 11.1.1. Método de DPPH

Para esta técnica la curva patrón se preparó con la solución Trolox en las concentraciones indicadas a continuación. Después, se tomaron X  $\mu$ l de Trolox + Y  $\mu$ l de Etanol para ser agitados en un vórtex. Al terminar el procedimiento se incubaron por 60 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm en celdas de plástico con alícuotas de un mililitro por triplicado. En la figura 28 se observa la curva patrón para la determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH con su respectivo coeficiente de correlación (R).

**Tabla 8.** Preparación de las soluciones para la curva patrón Trolox.

Trolox (mg/ml)	$\mu$ l de Trolox	$\mu$ l de EtOH
300	100	0
225	75	25
150	50	50
75	25	75
37.5	12.5	87.5
0	0	100



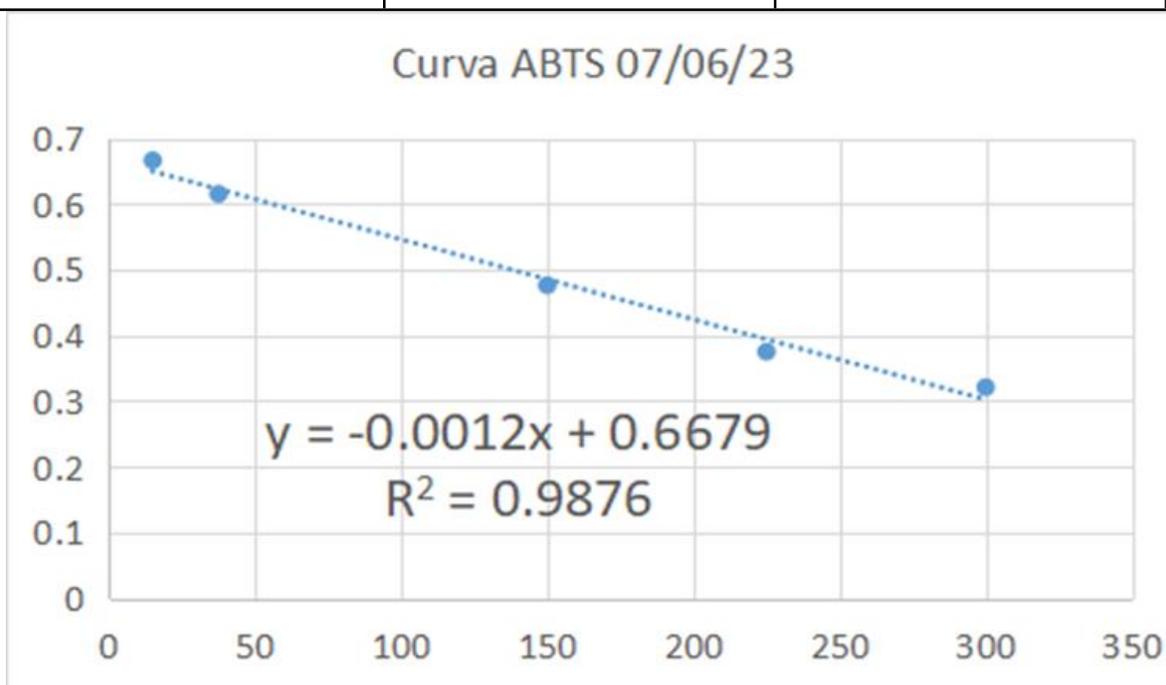
**Figura 28.** Curva patrón para la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* por el método de DPPH.

### 11.1.2. Método de ABTS•+

La curva patrón se realizó con una solución de Trolox previamente preparada, bajo las concentraciones presentadas en la tabla 7. Para preparar la curva patrón se tomaron 20  $\mu$ l de cada concentración dentro de la tabla, más 980  $\mu$ l de la solución que se elaboró con el radical ABTS•+ pH 7.4. Después se incubaron durante media hora en la oscuridad y al concluir este tiempo se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm en celdas de plástico con alícuotas de un mililitro por triplicado. En la figura 29 se observa la curva patrón para la determinación de capacidad antioxidante por el método de ABTS•+ con su respectivo coeficiente de correlación (R).

**Tabla 9.** Preparación de las soluciones para la curva patrón Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS•+.

Trolox (mg/ml)	μl de Trolox	μl de ABTS
300	100	0
225	75	25
150	50	50
75	25	75
37.5	12.5	87.5
0	0	100




---

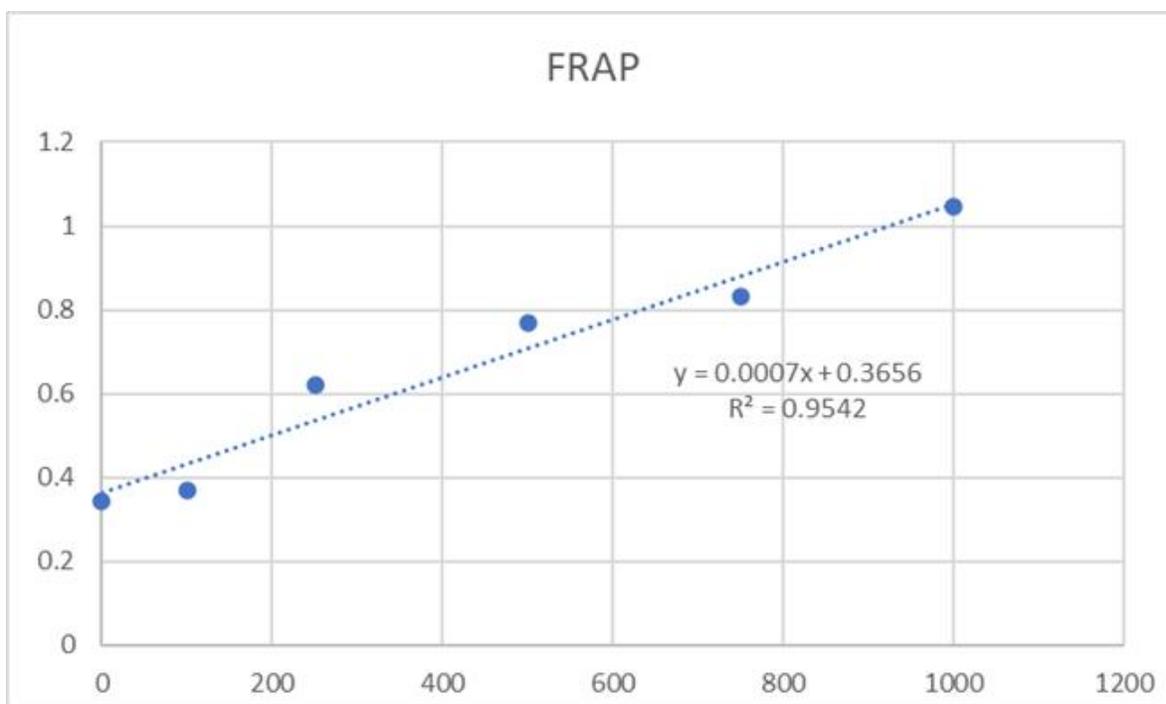
**Figura 29.** Curva patrón para la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* por el método de ABTS•+.

---

### 11.1.3. Método de FRAP

Se construyó una curva de calibración utilizando soluciones de concentraciones de FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O a concentraciones de 0-1000 μM. Bajo las mismas condiciones señaladas en la sección de materiales y métodos. La reacción se dejó incubar a 37°C durante 30 minutos a completa oscuridad.

Al concluir este tiempo se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 733 nm en microplaca con alícuotas de 340  $\mu$ L aproximadamente por triplicado. En la figura 30 se observa la curva patrón para la determinación de capacidad antioxidante por el método de FRAP con su respectivo coeficiente de correlación (R).



---

**Figura 30.** Curva patrón para la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* por el método de FRAP.

---

## 12. Tabla de disolventes más usados en orden de polaridad

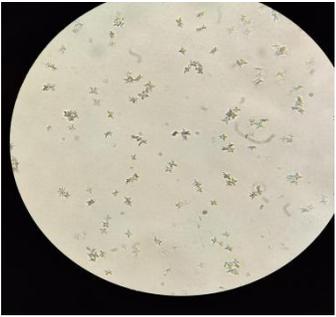
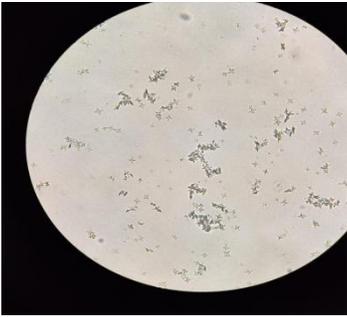


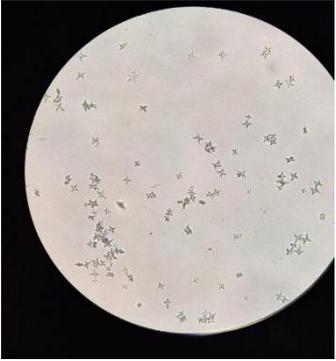
Disolventes	Formula	Pe °C	Densidad
Éter de petróleo	Mezcla de hidrocarburos	35-60°	0.640
Hexano	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	69°	0.659
Tolueno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	110°	0.865
Benceno	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	80°	0.874
Éter	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	35°	0.706
Tetracloruro de carbono	CCl <sub>4</sub>	77°	1.604
Cloroformo	CHCl <sub>3</sub>	61°	1.492
Cloruro de metileno- Diclorometano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40°	1.325
Acetato de etilo	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	77°	0.902
Acetona	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	56°	0.791
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	78°	0.785
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	65°	0.791
Agua	H <sub>2</sub> O	100°	1.000

### 13. Imágenes al microscopio del ensayo de cristalización

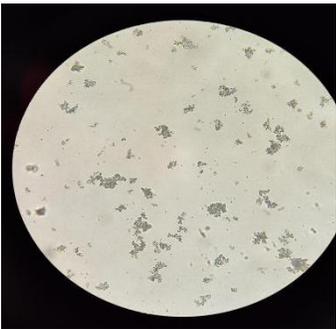
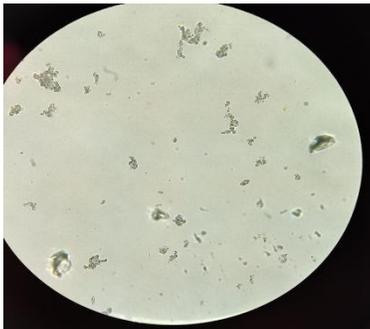
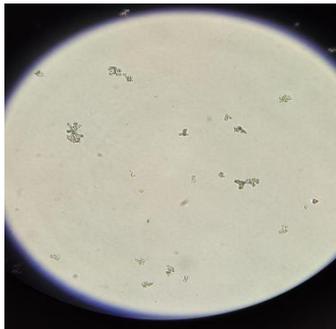
- Nucleación

*Extractos*

Objetivo	Extracto etanólico (EtOH)		
	Concentración		
	100 µg/m	400 µg/m	1,000 µg/m
40x			

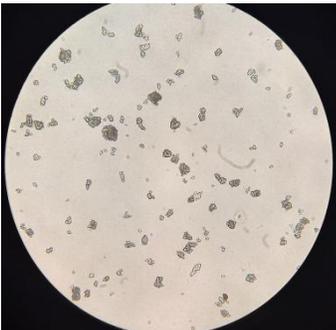
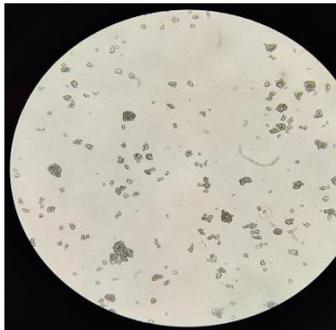
Objetivo	Extracto acetato de etilo (AcEt)		
	Concentración		
	100 µg/m	400 µg/m	1,000 µg/m
40x			

*Control*

Objetivo	Cistona (Cys)		
	Concentración		
	100 µg/m	400 µg/m	1,000 µg/m
40x			

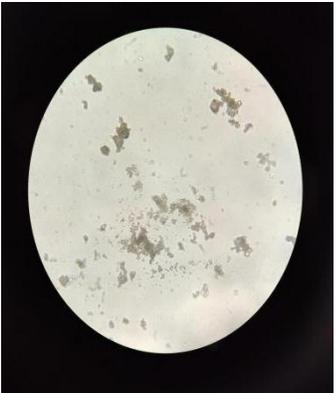
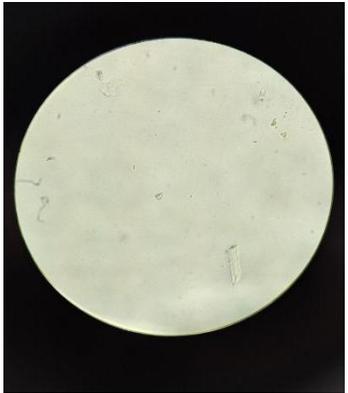
- Agregación

*Extractos*

Objetivo	Extracto etanólico (EtOH)		
	Concentración		
	100 µg/m	400 µg/m	1,000 µg/m
40x			

Objetivo	Extracto acetato de etilo(AcEt)		
	Concentración		
	100 µg/m	400 µg/m	1,000 µg/m
40x			

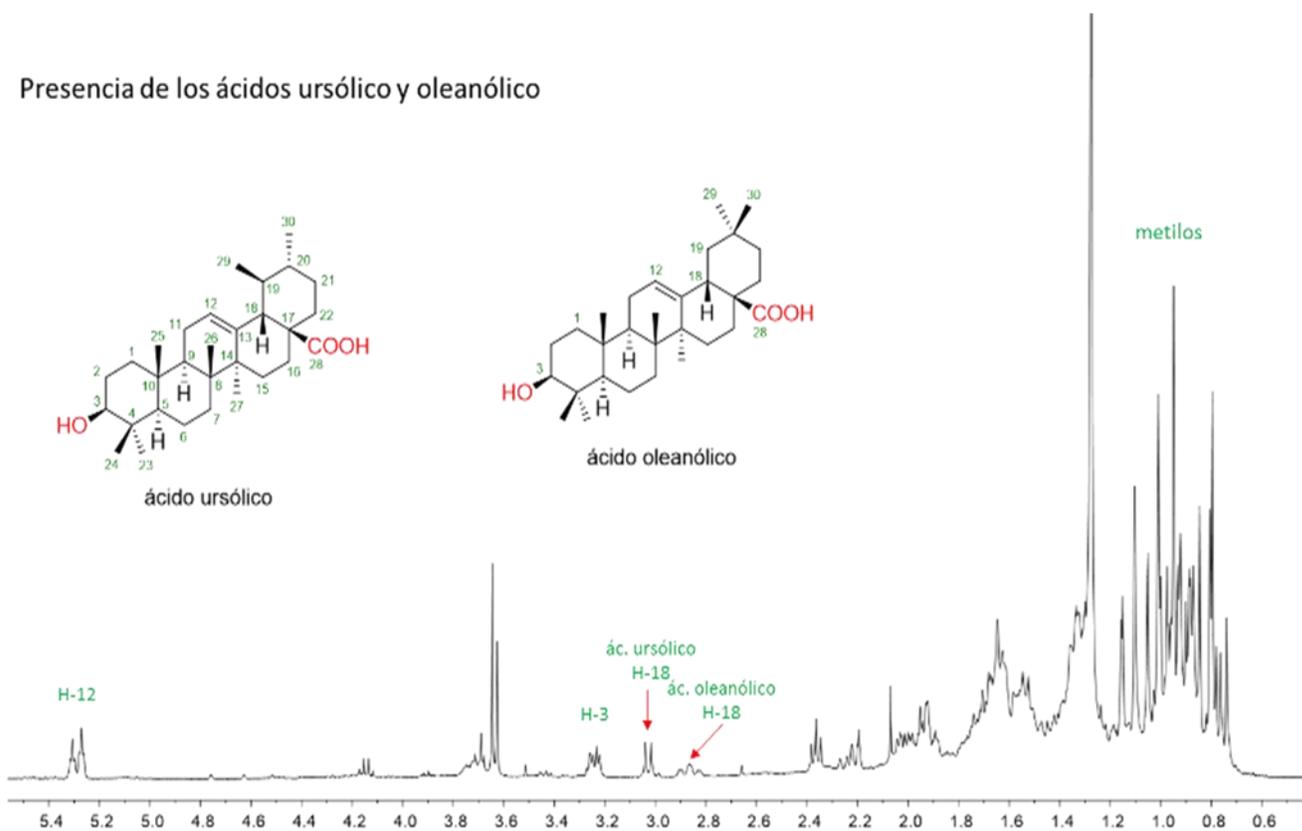
*Control*

Objetivo	Extracto de cistona (Cys)		
	Concentración		
	100 µg/m	400 µg/m	1,000 µg/m
40x			

## 14. Resonancia Magnética nuclear

A. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz), en  $\text{CDCl}_3$ , de la fracción 26–28, CC parte AcOEt.

Presencia de los ácidos ursólico y oleanólico



B. Comparación de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz), en  $\text{CDCl}_3$ , de la fracción 26–28 y muestra auténtica del ácido oleanólico.

