



Universidad Tecnológica de la Mixteca

División de Estudios de Posgrado

Evaluación de la actividad antidiabética y antioxidante *in vitro* de extractos polares de *Justicia spicigera* y elucidación estructural de los compuestos fenólicos mayoritarios.

T e s i s

Para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

Presenta:

I. A. Nancy Girón Cruz

Director de Tesis:

Dr. Raúl Salas Coronado

Huajuapán de León, Oaxaca, México, Mayo 2015.

Este trabajo se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de Productos Naturales y Alimentos, pertenecientes al Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca bajo la dirección del Dr. Raúl Salas Coronado y con apoyo de una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de los compuestos aislados, se obtuvieron en la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, con el apoyo de una beca mixta de movilidad otorgada por CONACYT bajo la supervisión del Dr. Lemuel Pérez Picaso.

Parte de este trabajo se presentó en el 49° Congreso Mexicano de Química y 33° Congreso Nacional de Educación Química, en la modalidad de Cartel Profesional, organizado por la Sociedad Química de México, en Mérida, Yucatán, México, llevado a cabo el 19 de Septiembre del 2014.

Dedicatoria

A Dios por guiar mis pasos y darme fuerza para seguir adelante.

A mis padres María y Melchor, por brindarme su amor incondicional, su apoyo y enseñarme que los sueños se logran a base de esfuerzo y dedicación.

A mis hermanos Guadalupe, Melchor y German, por compartir momentos inolvidables, por estar siempre conmigo y animarme a seguir adelante.

A mis sobrinas Karla, Lilian y Madai, por llenar mi vida de luz, amor, felicidad y alegría.

Agradecimientos

A mi familia por brindarme su apoyo y estar siempre conmigo en los momentos difíciles.

A mis amigos Magdalena, Erick, Francisco, Karla, Tenoch, Analleli, Enrique, Armando, Stefi, Armando N., Ricardo y Brenda por compartir momentos inolvidables.

A la Dra. Aida, la Dra. Paula, Luz, Mayra y al Dr. Carlos por brindarme su amistad.

A mi director de tesis el Dr. Raúl Salas Coronado por brindarme la oportunidad de trabajar con él, así como también por los conocimientos brindados durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez por los conocimientos adquiridos durante el proceso de purificación y aislamiento de los compuestos aislados en este proyecto.

Al Dr. Lemuel Pérez Picaso y la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec (UNPA) por su apoyo durante la adquisición de espectros de RMN de los compuestos aislados.

Al Dr. Rogelio Valadez Blanco por los consejos brindados durante el periodo de tutorado.

A mis evaluadores la Dra. Beatriz, Dra. Norma, M. C. Alma y la Dra. Luicita por las aportaciones a este proyecto.

A la M. C. Ernestina Cedillo Portugal por el apoyo brindado en la identificación taxonómica de muestras de *Justicia spicigera*.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el programa de maestría.

Al municipio de Asunción Cuyotepeji por las facilidades otorgadas durante la colecta de muestras de *J. spicigera*.

Resumen

En el presente proyecto se cuantificaron fenoles totales en siete extractos crudos obtenidos a partir de infusiones, decocciones, y asistidos por ultrasonido utilizando agua y disolventes orgánicos de diferente polaridad de hojas de *J. spicigera*. También se determinó el contenido de flavonoides totales y la actividad antirradicalar frente al DPPH[•] en fracciones provenientes de una limpieza realizada por extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés). Estos extractos se denominaron extractos limpios, a quienes se les cuantificó el contenido de flavonoides totales a tres diferentes longitudes de onda ($\lambda = 405, 490$ y 515 nm) y los resultados se expresaron como la suma de la fracción H₂O y MeOH/H₂O al 50%. Los extractos obtenidos por ultrasonido que presentaron el mayor contenido de fenoles totales fueron el de etanol al 70% (EtOH-SC) y acetona al 70% (ACT-SC), 618.62 ± 4.82 y 610.81 ± 8.32 mg EAG/100 g muestra seca, respectivamente. Los valores obtenidos para flavonoides totales variaron significativamente en función de la longitud de onda utilizada para la lectura de la absorbancia. La correlación del contenido de flavonoides totales vs fenoles totales permitió proponer que a 490 nm se obtienen los mejores resultados de la cuantificación de flavonoides totales. El extracto de etanol al 70% (EtOH-SL) obtenido por ultrasonido presentó el mayor contenido de flavonoides, 492.15 ± 5.77 mg EQ/100 g muestra seca, y la mejor actividad antirradicalar, IC₅₀ de 1115.00 ± 3.43 µg muestra seca/mL. Este mismo extracto presentó una de las mejores actividades antidiabéticas frente a la α -amilasa y la α -glucosidasa, con un IC₅₀ de 221.39 ± 1.59 y 115.72 ± 4.52 ppm, respectivamente. A partir de la correlación de Pearson y del análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) se concluye que los flavonoides presentes en la fracción H₂O de los extractos limpios son los responsables de la actividad antidiabética. Finalmente, a partir del extracto de EtOH al 70% se aislaron y caracterizaron por IR y RMN dos flavonoides, el 3,7-diramnósido kaempferol (kaempferitrina) y el 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol.

Índice de Contenido

	Página
Resumen	V
Índice de Contenido	VI
Índice de Apéndices	IX
Índice de Anexos	X
Índice de Figuras	XI
Índice de Tablas	XIII
Lista de Abreviaturas	XIV
Capítulo 1. Introducción	15
1.1. Originalidad.....	17
1.2. Objetivos	17
1.2.1. Objetivo general	17
1.2.2. Objetivos específicos.....	17
1.3. Metas	18
Capítulo 2. Análisis de Fundamentos	19
2.1. Características taxonómicas del género <i>Justicia</i>	19
2.2. Características taxonómicas y distribución geográfica de <i>J. spicigera</i>	20
2.3. Propiedades biológicas del género <i>Justicia</i>	21
2.4. Plantas con propiedades antidiabéticas	23
2.5. Propiedades de los compuestos fenólicos	24
2.6. Métodos de extracción	27
2.7. Extracción en fase sólida (SPE).....	27
2.8. Actividad antirradicalar de extractos de plantas	29
2.9. Actividad antidiabética de extractos de plantas	32
2.9.1. Actividad antidiabética <i>in vitro</i>	32

2.10. Separación y purificación de compuestos fenólicos	34
2.10.1. Cromatografía en capa fina	34
2.10.2. Cromatografía en columna	35
2.10.3. Cromatografía en placa semipreparativa	36
2.11. Elucidación estructural	36
2.11.1. Espectroscopía de infrarrojo	36
2.11.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	37
Capítulo 3. Metodología Experimental	44
3.1. Equipos, reactivos y disolventes	45
3.2. Obtención de la muestra	45
3.3. Preparación de la muestra	46
3.4. Obtención de los extractos crudos	46
3.5. Limpieza de los extractos por SPE	47
3.6. Cuantificación de fenoles totales en los extractos	49
3.7. Cuantificación de flavonoides totales en los extractos	49
3.8. Evaluación de la actividad antirradicalar de los extractos	50
3.9. Evaluación de la actividad antidiabética <i>in vitro</i>	52
3.9.1. Inhibición de la α -amilasa en presencia de los extractos	52
3.9.2. Inhibición de la α -glucosidasa en presencia de los extractos	53
3.10. Aislamiento de los compuestos fenólicos	54
3.10.1. Cromatografía en columna flash	55
3.10.2. Cromatografía en placa semipreparativa	56
3.10.3. Cristalización	57
3.11. Caracterización de los compuestos fenólicos presentes en los extractos	57
3.11.1. Obtención de espectros de IR	58
3.11.2. Espectroscopía de RMN	58
3.11.3. Determinación del punto de fusión	59
3.12. Análisis estadístico	60
Capítulo 4. Resultados y Discusiones	61
4.1. Cuantificación de fenoles totales	61
4.2. Cuantificación de flavonoides totales	66

4.3. Evaluación de la actividad antirradicalar	69
4.4. Evaluación de la actividad antidiabética <i>in vitro</i>	73
4.4.1. Inhibición de la α -amilasa en presencia de los extractos	73
4.4.2. Inhibición de la α -glucosidasa en presencia de los extractos	75
4.5. Relación del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides con la actividad antirradicalar y antidiabética <i>in vitro</i>	78
4.6. Caracterización de los compuestos fenólicos aislados de <i>J. spicigera</i>	82
4.6.1. Caracterización del di-(2-etilhexil) ftalato	83
4.6.2. Caracterización de la kaempferitrina.....	86
4.6.3. Caracterización del 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosido-7- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosido kaempferol	92
Capítulo 5. Conclusiones	102
Capítulo 6. Perspectivas	103
Capítulo 7. Referencias	104
Capítulo 8. Apéndices	113
Capítulo 9. Anexos	126

Índice de Apéndices

	Página
Apéndice 1. Relación entre el mecanismo de acción de fármacos y plantas.	113
Apéndice 2. Fenoles totales en extractos crudos y limpios de las hojas de <i>J. spicigera</i>	114
Apéndice 3. Flavonoides totales en equivalentes de (+)-catequina	115
Apéndice 4. Flavonoides totales en equivalentes de quercetina.	116
Apéndice 5. Curva de calibración en equivalentes de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.....	117
Apéndice 6. Curvas de calibración para la cuantificación de flavonoides totales en equivalentes de (+)-catequina y quercetina.	118
Apéndice 7. Curva de calibración en equivalentes de ácido gálico para la evaluación de la actividad antirradicalar frente al DPPH'.	119
Apéndice 8. IC ₅₀ del BHT para la evaluación de la actividad antirradicalar frente al DPPH'.	120
Apéndice 9. T _{EC50} de los extractos limpios de las hojas de <i>J. spicigera</i> frente al DPPH'.	121
Apéndice 10. Gráficos de extracción de componentes principales.....	125

Índice de Anexos

	Página
Anexo 1. Medicamentos orales para el tratamiento de la diabetes Tipo 2.	126

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Partes aéreas de: 1) <i>J. gendarussa</i> , 2) <i>J. pectoralis</i> , 3) <i>J. insularis</i> , 4) <i>J. adhatoda</i> , 5) <i>J. flava</i> , 6) <i>J. procumbes</i>	19
Figura 2. Hojas y flores de <i>J. spicigera</i>	20
Figura 3. Compuestos fenólicos representativos.	25
Figura 4. Biosíntesis de un lignano.	26
Figura 5. Extracción en fase sólida (SPE).	28
Figura 6. Ejemplo de HSQC en RMN.	39
Figura 7. Ejemplo de HMBC en RMN.	40
Figura 8. Procedimiento del tratamiento de la muestra.	44
Figura 9. 1) Planta de <i>J. spicigera</i> en su hábitat, 2) Hojas secas de <i>J. spicigera</i>	46
Figura 10. Diagrama para la obtención de extractos limpios.	48
Figura 11. Limpieza de extractos por SPE.	48
Figura 12. Contenido de fenoles totales en extractos crudos de <i>J. spicigera</i>	62
Figura 13. Comparativa del contenido de fenoles totales en hojas de especies de <i>Justicia</i>	63
Figura 14. Contenido de fenoles totales en extractos metanólicos de hojas de plantas antidiabéticas.	63
Figura 15. Contenido de fenoles totales de extractos limpios de <i>J. spicigera</i>	64
Figura 16. Porcentaje de recuperación de fenoles totales después de realizar SPE en extractos crudos de hojas de <i>J. spicigera</i>	65
Figura 17. Flavonoides totales de la suma de fracciones en equivalentes de quercetina de las hojas de <i>J. spicigera</i>	67
Figura 18. Flavonoides totales de la suma de fracciones en equivalentes de catequina de las hojas de <i>J. spicigera</i>	68

Figura 19. Extractos metanólicos de hojas de plantas antidiabéticas.....	69
Figura 20. IC ₅₀ de las fracciones de los extractos limpios de <i>J. spicigera</i>	70
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H en CD ₃ OD del ftalato.	84
Figura 22. Espectro de RMN ¹³ C en CD ₃ OD del ftalato.	85
Figura 23. Espectro de IR de la kaempferitrina.....	89
Figura 24. Espectro de RMN de ¹ H en CD ₃ OD de la kaempferitrina.	90
Figura 25. Espectro de RMN ¹³ C en CD ₃ OD de la kaempferitrina.....	91
Figura 26. Espectro de RMN de ¹ H en DMSO-d ₆ del 3- <i>O</i> -α-L-arabinopiranosido-7- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosido kaempferol.....	96
Figura 27. Espectro de RMN ¹³ C en DMSO-d ₆ del 3- <i>O</i> -α-L-arabinopiranosido-7- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosido kaempferol.	97
Figura 28. Espectro de RMN gHMBC del 3- <i>O</i> -α-L-arabinopiranosido-7- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosido kaempferol.	98
Figura 29. Espectro de RMN gHMBC del 3- <i>O</i> -α-L-arabinopiranosido-7- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosido kaempferol.	99
Figura 30. Espectro de RMN gHSQC del 3- <i>O</i> -α-L-arabinopiranosido-7- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosido kaempferol.	100
Figura 31. Espectro de RMN gHSQC del 3- <i>O</i> -α-L-arabinopiranosido-7- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosido kaempferol.	101

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Actividad biológica de especies pertenecientes al género <i>Justicia</i>	21
Tabla 2. Metabolitos secundarios aislados del género <i>Justicia</i> y su actividad biológica.	22
Tabla 3. Actividad antirradicalar de algunas plantas.....	30
Tabla 4. Actividad antirradicalar de <i>J. pectoralis</i>	31
Tabla 5. Actividad antirradicalar de extractos del tallo de <i>J. gendarussa</i>	31
Tabla 6. Bandas del espectro de IR de algunos flavonoides.	37
Tabla 7. Multiplicidad en RMN para ^1H	41
Tabla 8. Desplazamiento químico de protón.....	41
Tabla 9. Desplazamientos químicos de varios tipos de carbonos de flavonoides.	42
Tabla 10. Correlación de Pearson entre fenoles y flavonoides.....	67
Tabla 11. T_{EC50} y eficiencia antirradicalar (AE) de los extractos de <i>J. spicigera</i>	72
Tabla 12. IC_{50} de extractos limpios de <i>J. spicigera</i>	74
Tabla 13. IC_{50} de extractos limpios de <i>J. spicigera</i>	76
Tabla 14. Correlación de Pearson del contenido de fenoles y flavonoides totales vs actividad antirradicalar.....	79
Tabla 15. Correlación de Pearson de la actividad antidiabética de los extractos de <i>J. spicigera</i>	80
Tabla 16. Análisis de varianza para componentes principales.	81
Tabla 17. Extracción de elementos para el análisis de componentes principales.....	82
Tabla 18. Comparativo de ^1H y ^{13}C de la kaempferitrina con datos reportados.....	88
Tabla 19. gHSQC de 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosido-7- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosido kaempferol.....	93
Tabla 20. Comparativo de ^1H y ^{13}C del 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosido-7- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosido kaempferol con datos reportados.	94
Tabla 21. gHMBC para 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosido-7- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosido kaempferol.	95

Lista de Abreviaturas

ABTS ^{•+}	Catión radical ácido 2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolinal)-6-sulfónico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH [•]	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
EQ	Equivalentes de quercetina
FRAP	Poder antioxidante frente al ion férrico
gHMBC	Correlación heteronuclear de enlace múltiple en gradiente
gHSQC	Correlación cuántica heteronuclear simple en gradiente
IC ₅₀	Concentración de extracto requerida para inhibir el 50% del DPPH [•]
IR	Espectroscopía de infrarrojo
OMS	Organización mundial para la salud
ORAC	Capacidad de absorción de radicales oxígeno
PCA	Análisis de componentes principales
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
SPE	Extracción en fase sólida
TEAC	Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox
UV/Vis	Ultravioleta/visible

Capítulo 1. Introducción

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico que se caracteriza por la pérdida de la homeostasis de la glucosa con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Esto se refleja en la secreción de insulina, la acción de la insulina o en ambos. De acuerdo con datos de la OMS, se estima que el 3% de la población en el mundo padece diabetes y se espera que se duplique para el año 2025 a 6.5% aproximadamente. Para la comunidad médica continúa siendo un reto el empleo de medicamentos que no ejerzan efectos negativos en la salud de los pacientes diabéticos (Basha *et al.*, 2012).

La diabetes mellitus se puede clasificar en dos tipos principales, Tipo 1 o diabetes juvenil (insulinodependiente) y Tipo 2 o diabetes de adultos (no insulinodependiente). La diabetes Tipo 1 se presenta en la infancia, principalmente se debe a la destrucción de las células pancreáticas β , lo cual trae como consecuencia la deficiencia absoluta de insulina. La diabetes Tipo 2 está más asociada con la edad adulta, en este caso se desconoce por qué se da la resistencia a la insulina, sin embargo se asocia al impacto ambiental, los hábitos alimentarios, obesidad, a una etapa en una enfermedad determinada, entre otros aspectos (Hemalatha *et al.*, 2012).

El uso de medicamentos está restringido por sus propiedades farmacocinéticas y por los efectos secundarios adversos, Anexo 1. Por ejemplo, la glibenclamida puede llegar a provocar vómito, hipoglucemia, estreñimiento, hiperacidez gástrica, cefalea, entre otros. La metformina, otro medicamento empleado para tratar la diabetes Tipo 2, puede llegar a causar diarrea, gases, distensión abdominal, dolor muscular, etc. Por lo tanto la búsqueda de una nueva clase de compuestos es esencial para superar problemas asociados con la diabetes (Basha *et al.*, 2012).

De acuerdo a la OMS, aproximadamente el 80% de la población mundial, especialmente las poblaciones rurales de los países en desarrollo, ingieren infusiones o decocciones de plantas para tratar enfermedades como cáncer, diarrea, parasitarias, diabetes, etc., (Kadir *et al.*, 2012). Particularmente, personas con diabetes Tipo 2 utilizan plantas medicinales para regular los

niveles de glucosa en sangre, obteniendo resultados positivos. Sin embargo, los tratamientos siguen siendo empíricos y generalmente se desconoce su mecanismo de acción. Algunas plantas que comúnmente se utilizan para la diabetes en México son el aguacate, el nopal, la sábila, el wereke y el muicle (*Justicia spicigera*). Esta última planta, objeto del presente estudio, es un arbusto de hoja perenne con flores tubulares de color naranja que crece en climas cálidos y se extiende desde México hasta América del Sur (Ortiz-Andrade *et al.*, 2012).

Ortiz-Andrade *et al.* (2012), realizaron un estudio *in vivo* e *in vitro* relacionado con la evaluación de la actividad antidiabética de extractos etanólicos de *J. spicigera*. Los resultados del estudio *in vivo* demostraron que esos extractos poseen una fuerte actividad antidiabética respecto a la glibenclamida, repaglinida y saxagliptina, fármacos hipoglucemiantes comerciales. Los autores proponen cinco posibles mecanismos por los cuales se podría llevar a cabo la actividad antidiabética de los extractos de *J. spicigera*, 1) modular la acción y/o secreción de la insulina, 2) involucrar la participación de un sistema antioxidante, 3) aumentar el metabolismo de la glucosa en las células β , 4) activar un sistema enzimático y 5) servir como un mensajero de derivados de fosfolípidos. Actualmente no existe información en la literatura científica sobre los metabolitos secundarios de los extractos de *J. spicigera* que ejercen dicha actividad, ni sus mecanismos de acción.

Debido a lo anterior, en el presente proyecto se evaluó la actividad antidiabética *in vitro* de los extractos de *J. spicigera* a través de la inhibición enzimática de α -amilasa y α -glucosidasa. Adicionalmente, se determinó la actividad antirradicalar, y se cuantificaron los fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos. Finalmente, se caracterizaron los compuestos fenólicos mayoritarios, del extracto obtenido por ultrasonido usando como disolvente etanol acuoso al 70% (EtOH-SC), el cual presentó el mayor contenido de fenoles totales.

1.1. Originalidad

El objeto del presente estudio es *Justicia spicigera*, una planta que tiene propiedades antidiabéticas comprobadas (Ortiz-Andrade *et al.*, 2012). Sin embargo no existe suficiente información en la literatura científica sobre cuáles son los metabolitos secundarios y el mecanismo por el cual los extractos de *J. spicigera* ejercen dicha actividad. Así mismo, no se ha reportado la relación que existe entre la actividad antirradicalar y antidiabética de los extractos de la planta antes mencionada.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Obtener extractos ricos en compuestos fenólicos con actividad antirradicalar y antidiabética *in vitro* a partir de hojas de *Justicia spicigera*, utilizando diferentes técnicas de extracción.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Obtener extractos ricos en compuestos fenólicos a partir de las hojas de *J. spicigera*.
2. Determinar la actividad antidiabética y antirradicalar *in vitro* de los extractos.
3. Elucidar la estructura de los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el extracto con la más alta actividad antirradicalar.
4. Determinar la relación entre la actividad antirradicalar y antidiabética de los extractos.

1.3. Metas

Objetivo 1

- 1.1. Obtener una muestra homogénea de las hojas de *J. spicigera*.
- 1.2. Obtener un método eficiente de extracción de compuestos fenólicos de las hojas de *J. spicigera*.

Objetivo 2

- 2.1 Determinar la actividad antidiabética mediante la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.
- 2.2 Determinar la actividad antirradicalar mediante la reducción del DPPH*.
- 2.3 Cuantificar los fenoles y flavonoides totales de los extractos.

Objetivo 3

- 3.1 Separar mediante métodos cromatográficos los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el extracto que contenga el mayor contenido de estos compuestos.
- 3.2 Caracterizar los compuestos fenólicos aislados mediante técnicas espectroscópicas.

Objetivo 4

- 4.1 Correlacionar la actividad antidiabética con la actividad antirradicalar mediante una correlación de Pearson.

Capítulo 2. Análisis de Fundamentos

En la presente sección se describen las características taxonómicas de *Justicia spicigera* y algunas propiedades biológicas tanto para esta planta como para otras del mismo género. También se describen los métodos utilizados para la determinación de la actividad antidiabética y antirradicalar, así como los métodos para la elucidación estructural de los metabolitos secundarios aislados.

2.1. Características taxonómicas del género *Justicia*

El género *Justicia*, Figura 1, se encuentra distribuido ampliamente por todo el mundo y se caracteriza por tener usos medicinales, algunos de los cuales ya han sido estudiados (Corrêa & Alcântara, 2012).



Figura 1. Partes aéreas de: 1) *J. gendarussa*, 2) *J. pectoralis*, 3) *J. insularis*, 4) *J. adhatoda*, 5) *J. flava*, 6) *J. procumbens*.

2.2. Características taxonómicas y distribución geográfica de *J. spicigera*

En algunos estados como Yucatán a *J. spicigera* se le conoce con el nombre de chak lool, ts'i'its y yichkaan, y en la Huasteca Potosina se le conoce comúnmente como muicle o muite (Ortiz-Andrade *et al.*, 2012).

Se puede describir como una hierba erecta o trepadora perene. Sus hojas son pecioladas con un margen de la hoja que generalmente es entero. Las brácteas y bractéolas son generalmente visibles y superpuestas. La corola se puede observar, con un labio posterior que es generalmente de dos lóbulos, un labio anterior que es de tres lóbulos, dos estambres y una cápsula con cuatro semillas, Figura 2 (Ortiz-Andrade *et al.*, 2012).

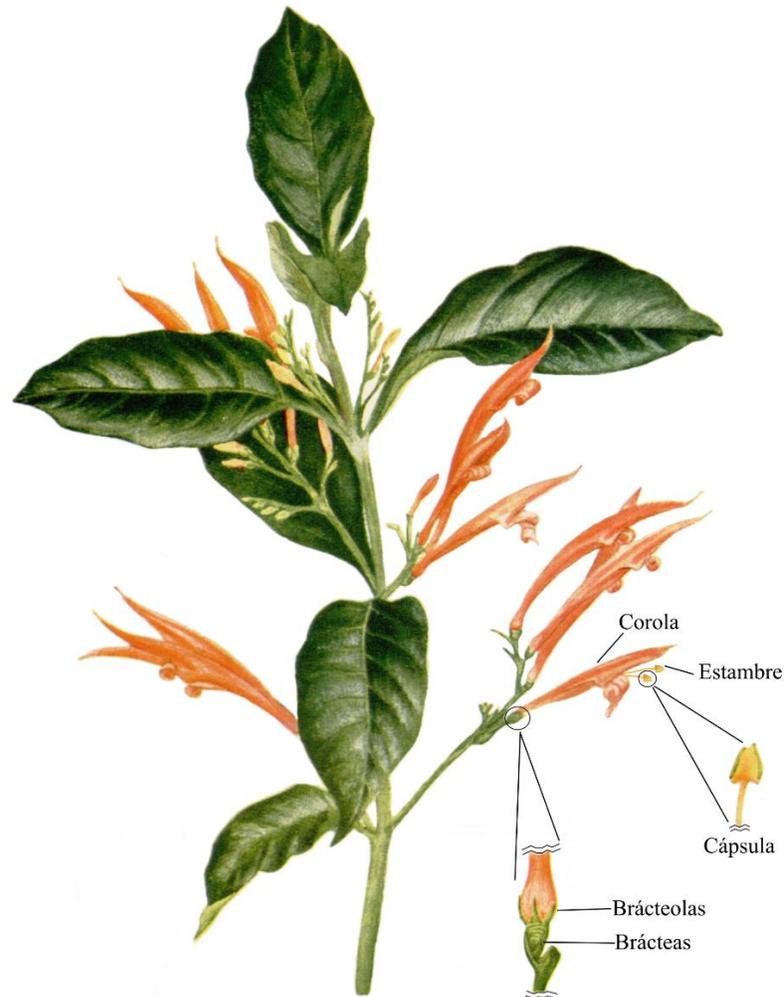


Figura 2. Hojas y flores de *J. spicigera*.

2.3. Propiedades biológicas del género *Justicia*

En la Tabla 1 se muestran algunas especies del género *Justicia* así como su actividad biológica, y en la Tabla 2 se muestran los metabolitos secundarios, presentes en el género *Justicia*, que poseen actividad biológica (Corrêa & Alcântara, 2012).

Tabla 1. Actividad biológica de especies pertenecientes al género *Justicia*.

Especies	Parte estudiada	Actividad biológica	Ensayo	País
<i>neesii</i>	Parte aérea	Anticancerígena	Extracto etanólico	India
<i>pectoralis</i>	Hojas y tallo	Antidiabética	Infusión	Colombia
<i>sericea</i>	Parte aérea	Antiinflamatoria	Extracto etanólico	Perú
	Hojas	Antiinflamatoria	Decocción	México
<i>spicigera</i>	Parte aérea	Anticancerígena y antidiabética	Decocción	México
	Hojas	Antidiabética	Infusión	México

La infusión de las hojas de *J. spicigera* se emplea para la hipertensión, la anemia, durante periodos de menstruación en mujeres, parásitos intestinales, inflamación, diarrea, depurativo de la sangre y leucemia (Cáceres-Cortés *et al.*, 2001; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2009). También se le han atribuido propiedades anticancerígenas y antidiabéticas (Ortiz-Andrade *et al.*, 2012).

Tabla 2. Metabolitos secundarios aislados del género *Justicia* y su actividad biológica.

Compuesto	Actividad biológica	Especie	Extracto
Umbeliferona	Antiinflamatoria	<i>pectoralis</i>	EtOH
3',4'-Dihydroxiflavonol	Antirradicalar y antidiabética	<i>cataractae</i>	EtOH
Apigenina	Antiinflamatoria y antitumoral	<i>gendarussa</i>	EtOH
Kaempferitrina	Antiinflamatoria y antidiabética	<i>spicigera</i>	CHCl ₃
Vitexina	Antiinflamatoria	<i>gendarussa</i>	EtOH
10H-Quindolina	Antitumoral	<i>betonica</i>	EtOAc
Jusbetonina	Antitumoral	<i>betonica</i>	MeOH
Vasicina	Antiinflamatoria	<i>adhatoda</i>	EtOH
Alantoina	Antiinflamatoria	<i>spicigera</i>	
Helioxantina	Antitumoral	<i>flava</i>	EtOH
Taiwanina	Antitumoral	<i>procumbes</i>	EtOH
Justicidina B	Antiinflamatoria y citotóxica	<i>purpurea</i>	MeOH
Diphyllina	Citotóxica	<i>extensa</i> <i>procumbens</i> <i>ciliata</i>	EtOH MeOH MeOH
Elenosido	Antiinflamatoria	<i>hyssopifolia</i>	EtOH
Ciliatosido A	Antiinflamatoria	<i>ciliata</i>	MeOH
(+) -Isolariciresinol	Antiinflamatoria	<i>flava</i>	EtOH

2.4. Plantas con propiedades antidiabéticas

Se ha reportado la existencia de 800 plantas utilizadas para el control de la diabetes en todo el mundo; de las cuales, se ha comprobado experimentalmente que 450 poseen propiedades antidiabéticas. Sin embargo, el mecanismo de acción solo se ha comprobado en 109 plantas, Apéndice 1 (Kumar *et al.*, 2011). Los mecanismos de acción antidiabética propuestos para las plantas se enlistan a continuación, de los cuales los más estudiados son los mecanismos 3 y 9 (Bhushan *et al.*, 2010):

1. Estimulan la síntesis y/o liberación de insulina
2. Mimetizan a la insulina
3. Incrementan el metabolismo de la glucosa
4. Incrementan la utilización de glucosa periférica
5. Inhiben la absorción de glucosa en el tracto gastrointestinal
6. Reducen los niveles de glucosa en sangre por regeneración de células β
7. Reducen la insulinoresistencia
8. Disminuyen la gluconeogénesis y glicogénesis
9. Inhiben a las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa

A continuación se mencionan algunos ejemplos representativos de mecanismos de acción de plantas antidiabéticas:

Basha *et al.* (2012), evaluaron la actividad antidiabética *in vitro* de las hojas de *Psidium guajava*. Los extractos metanólicos de esta planta presentan un efecto potencial de la inhibición de la difusión de glucosa usando un tubo de diálisis. En ese estudio se muestra la inhibición de la difusión y consecuentemente un posible efecto sobre el movimiento de la glucosa en el tracto intestinal (Mecanismo 5).

Los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Passiflora incarnata*, disminuyen los niveles de glucosa en ratones con diabetes inducida con estreptozotocina. Los extractos pueden estar involucrados en la liberación de insulina, aumentando la utilización de glucosa periférica (Mecanismos 4 y 6), esto está asociado con la regeneración de los islotes de Langerhans. Estos

islotos contienen células β , las cuales son las encargadas de producir insulina y se encuentran localizadas en el interior del páncreas (Gupta *et al.*, 2012).

Ramkumar *et al.* (2010), evaluaron la actividad antidiabética *in vitro* con el uso de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa de los extractos etanólicos de las hojas de *Gymnema montanum*. Los resultados obtenidos muestran que los extractos inhiben la actividad de estas enzimas y por lo tanto se reducen los niveles de glucosa en sangre. Esto indica que los extractos pueden suprimir la absorción de carbohidratos desde el intestino y con ello reducir la hiperglicemia, mediante la inhibición enzimática (Mecanismo 9).

En un estudio en el cual se evaluó la actividad antidiabética *in vivo* de los extractos de las hojas de *Biophytum sensitivum*, se encontró que estos extractos estimulan a las células β del páncreas para liberar insulina en conejos machos diabéticos, ejerciendo así una actividad hipoglucemiante. La administración del extracto *B. sensitivum* en ayunas a los conejos diabéticos mostraron un aumento significativo en los niveles séricos de insulina, lo que sugiere un modo de acción a nivel del páncreas. La respuesta hipoglicémica de esta planta es mediada a través de la estimulación de la síntesis/liberación de insulina de las células β de los islotes de Langerhans (Mecanismo 3) (Patel *et al.*, 2012).

Los metabolitos secundarios presentes en plantas con propiedades antidiabéticas pertenecen a los grupos de compuestos químicos llamados: terpenos, sapogeninas, carotenoides, alcaloides, esteroides, taninos, polisacáridos, cumarinas, esteroides, ácidos fenólicos, lignanos y flavonoides (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005). Cabe mencionar que tanto los lignanos como los flavonoides, son compuestos fenólicos que están presentes en los extractos polares de plantas del género *Justicia*. Por tal motivo en la siguiente sección se describe la actividad biológica de estos dos grupos de compuestos.

2.5. Propiedades de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Sus estructuras pueden variar de una molécula fenólica simple a un polímero complejo de peso molecular alto. Los compuestos fenólicos se dividen en diversas clases, basándose en el número de anillos aromáticos que contengan y a los elementos

estructurales que se encuentren unidos a esos anillos. Los grupos principales de compuestos fenólicos son: ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, flavonoides y lignanos, Figura 3, (Ignat *et al.*, 2011).

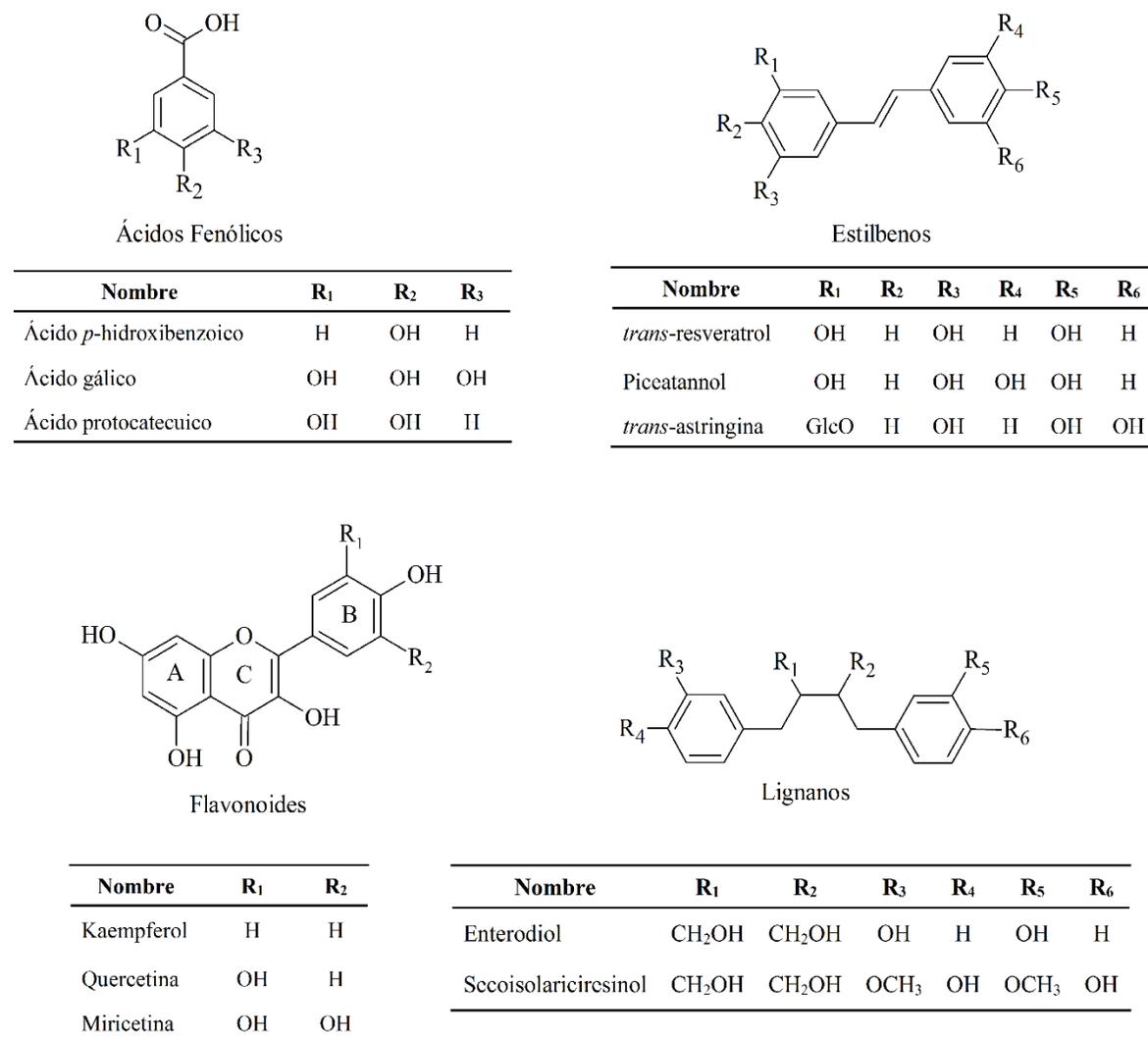


Figura 3. Compuestos fenólicos representativos.

Los flavonoides y lignanos se han identificado en el género *Justicia* y se les han atribuido una gran parte de las propiedades medicinales de esas plantas. A continuación se describen brevemente las características estructurales de estas dos clases de compuestos.

La estructura básica de los flavonoides es un núcleo flavano que está constituido por 15 átomos de carbono en tres anillos (C6-C3-C6), nombrados como A, C, B, respectivamente. Las clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y saturación del anillo C, mientras que los compuestos individuales difieren en la sustitución del anillo A y B. Las diferencias en la estructura y sustitución influyen en la estabilidad del radical y por lo tanto en las propiedades antioxidantes de los flavonoides (Wojdylo *et al.*, 2007).

Los flavonoides poseen propiedades biológicas tales como, actividad antimicrobiana, antiulcerosa, antiinflamatoria, antirradicalar, antitumoral, antiespasmódica, antidiabética, entre otras (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011).

Por otra parte, los lignanos son un grupo de compuestos comúnmente encontrados en las plantas, están constituidos por la unión de dos moléculas de compuestos fenólicos con cadenas insaturadas. En la Figura 4, se muestra un ejemplo de la biosíntesis de un lignano a partir del alcohol coniferílico. Estos metabolitos secundarios poseen una gama amplia de efectos benéficos a la salud, tales como actividad antirradicalar, antiviral, antitumoral, antidiabética, antiobesidad y contra enfermedades cardiovasculares (Smeds *et al.*, 2012).

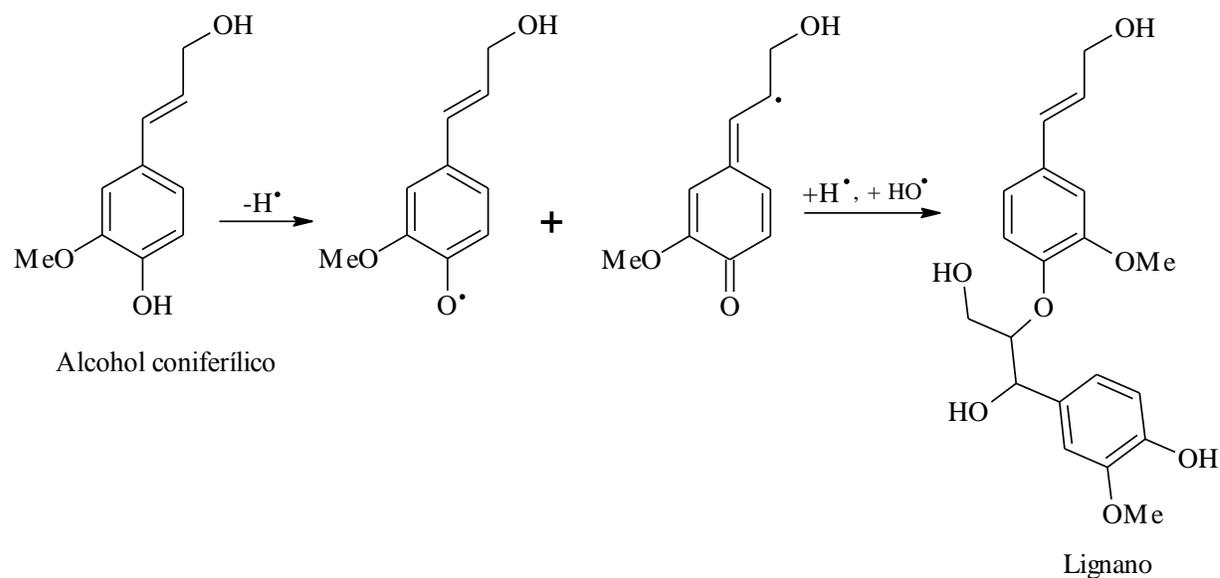


Figura 4. Biosíntesis de un lignano.

2.6. Métodos de extracción

Las técnicas de extracción para la obtención de compuestos bioactivos se pueden clasificar en tradicionales y modernas. Dentro de las técnicas tradicionales se encuentran la maceración, infusión, decocción y Soxhlet. En las técnicas modernas podemos encontrar a la extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido, extracción con fluidos supercríticos, entre otras. La infusión y la decocción son técnicas comúnmente utilizadas, la primera consiste en adicionar agua a punto de ebullición al material a extraer y se deja enfriar para posteriormente filtrar, en la segunda técnica se coloca el material a extraer con agua y se calienta hasta alcanzar el punto de ebullición, posteriormente se deja enfriar y se filtra (Brusotti *et al.*, 2014).

En el presente estudio fue de particular interés la extracción asistida por ultrasonido. En este tipo de extracción por lo general, se trabaja en un intervalo de 20 kHz a 100 MHz. Las ondas de ultrasonido pasan a través de un medio creando compresión y expansión. Este proceso produce un fenómeno llamado cavitación, que significa la producción, el crecimiento y el colapso de las burbujas que se crean en el medio. El mecanismo de extracción por ultrasonido implica principalmente tres fenómenos físicos, la difusión a través de la pared de la célula, el crecimiento y rompimiento de la burbuja. Para que una extracción por ultrasonido sea eficaz depende de diversos factores, tales como el contenido de humedad de la muestra, el tamaño de las partículas después de una molienda, el disolvente, la temperatura y el tiempo de exposición de la muestra a las ondas de ultrasonido (Azmir *et al.*, 2013).

Li *et al.* (2005) emplearon la extracción por ultrasonido con metanol por 30 min en las hojas frescas, corteza fresca y corteza seca de *Eucommia ulmodies*. Ellos encontraron una recuperación del 70% de ácido clorogénico por encima de las recuperaciones obtenidas mediante el uso de técnicas de extracción convencionales.

2.7. Extracción en fase sólida (SPE)

Generalmente, las muestras obtenidas a partir de la extracción están constituidas de una mezcla compleja de sustancias químicas, por lo que se torna importante un tratamiento posterior

previo al estudio de los componentes químicos, incluyendo el aislamiento y caracterización. Para lograr esto, existen diversos tratamientos que se pueden aplicar a una muestra, los más comunes son: la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida (SPE). La SPE tiene las ventajas de realizarse en tiempos cortos, se utilizan muestras pequeñas (de 50 a 100 μL), y por lo tanto se requiere de un consumo de disolventes reducido. Los cartuchos de SPE pueden estar constituidos por sorbentes en fase normal y en fase reversa (He *et al.*, 2007).

Para llevar a cabo la extracción en fase sólida, se deben realizar los pasos siguientes:

1. Acondicionamiento del cartucho
2. Aplicación de la muestra
3. Elución de solutos retenidos (interferencias)
4. Elución del analito de interés
5. Limpieza del cartucho

Los analitos de interés se retendrán por el sorbente y posteriormente serán eluidos dependiendo de la afinidad que tengan con el material del sorbente y la fase móvil, Figura 5, (Harris, 2007).

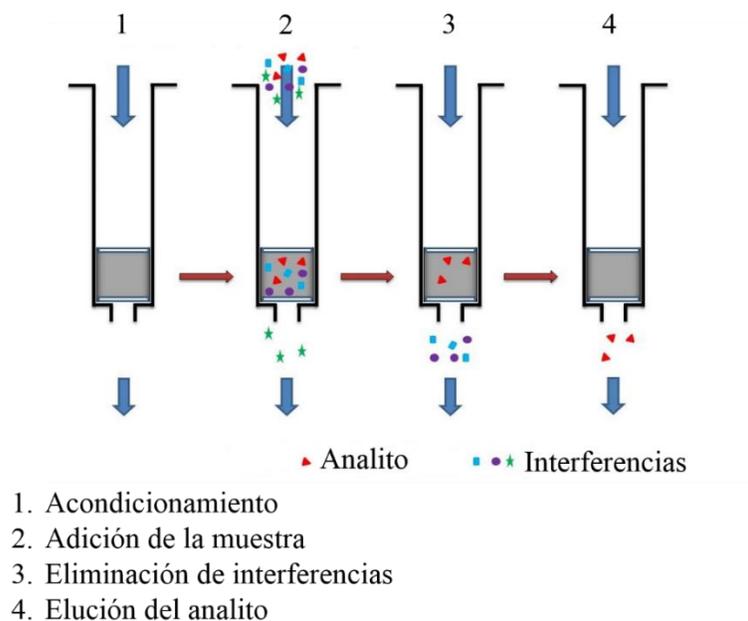


Figura 5. Extracción en fase sólida (SPE).

2.8. Actividad antirradicalar de extractos de plantas

En el cuerpo humano el desequilibrio entre especies antioxidantes y oxidantes conduce al daño celular y problemas en la salud. Esto trae como consecuencia el desarrollo de enfermedades degenerativas, cardiovasculares, cáncer, diabetes, entre otras. Por lo tanto es necesario que el ser humano consuma fuentes de antioxidantes no enzimáticos, tales como, ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenoides, flavonoides, entre otros (Krishnaiah *et al.*, 2011).

Dentro de los métodos para determinar la actividad antirradicalar de los extractos de las plantas se encuentran el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH \cdot), del catión radical ABTS $^{2+}$, entre otros. El radical DPPH \cdot es relativamente estable y tiene una coloración azul intensa en disolución. Este radical tiene un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 515 nm por lo que puede utilizarse para evaluar la actividad antirradicalar de extractos. La reacción del radical DPPH \cdot se lleva a cabo a través de la transferencia de un radical hidrógeno desde el antioxidante al DPPH \cdot produciendo una decoloración de la disolución que puede medirse espectrofotométricamente. Otro método muy utilizado es el del radical catión ácido 2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS $^{2+}$) que se basa en su reducción en presencia de antioxidantes donadores de electrones. Esta reducción produce una decoloración medible espectrofotométricamente a 734 nm (Krishnaiah *et al.*, 2011).

La actividad antirradicalar ha sido investigada ampliamente en diversas plantas. En la Tabla 3, se presenta el contenido de fenoles totales y la actividad antirradicalar de extractos de algunas plantas. La actividad antirradicalar está expresada en equivalentes de trolox (TEAC) (Wojdylo *et al.*, 2007). Cabe hacer mención que el trolox es un antioxidante sintético hidrofílico de actividad antirradicalar alta y se utiliza en los estudios como referencia.

Tabla 3. Actividad antirradicalar de algunas plantas.

Planta	Parte estudiada	Fenoles totales (mg EAG ^b /100 g)	TEAC ^a (μ M trolox/100 g)	
			ABTS ⁺⁺	DPPH [*]
<i>Tanacetum vulgare</i>	Hoja	1.68 \pm 0.02	37.30 \pm 2.09	469.00 \pm 9.00
<i>Juglans regia</i>	Hoja	0.24 \pm 0.03	27.30 \pm 0.34	119.00 \pm 3.07
<i>Archangelica officinalis</i>	Hoja	0.29 \pm 0.01	0.45 \pm 0.01	7.34 \pm 1.41
<i>Salvia officinalis</i>	Parte aérea	8.25 \pm 0.09	17.00 \pm 0.23	41.20 \pm 1.11
<i>Melisa officinalis</i>	Parte aérea	13.20 \pm 0.13	10.60 \pm 0.09	36.10 \pm 1.03

^aTEAC, Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox. ^bEAG, Equivalentes de ácido gálico. Los resultados están expresados en peso seco.

Adicionalmente, existen estudios que demuestran una relación directa entre actividad antirradicalar y antidiabética. Khalil *et al.* (2008), evaluaron la actividad antirradicalar de los extractos acuosos de las hojas de *Bauhinia forficata* y *Cissus sicyoides*, las cuáles poseen actividad antidiabética. Los resultados obtenidos por el método de ABTS⁺⁺ fueron para *B. forficata* una IC₅₀ = 8.00 \pm 0.07 μ g/mL y para *C. sicyoides* una IC₅₀ = 13.0 \pm 0.2 μ g/mL expresados en equivalentes de trolox. Estos resultados indican que los extractos acuosos de estas plantas poseen actividad antirradicalar, siendo los compuestos fenólicos los responsables de diversas actividades como la anticancerígena, antidiabética, entre otras. Esto demuestra que la actividad antirradicalar está asociada con la prevención del estrés oxidativo y éste último con la diabetes.

Chatterjee *et al.* (2012), evaluaron la actividad antirradicalar y antidiabética de la fracción de acetato de etilo de los extractos metanólicos acuosos de la semilla de *Eugenia jambolana*. Los resultados obtenidos muestran que la fracción de acetato de etilo puede ayudar a contrarrestar la diabetes y el estrés oxidativo, esto se debe a los fitoconstituyentes presentes en los extractos como el ácido gálico.

Existen algunos reportes de la evaluación de la actividad antirradicalar para algunas especies del género *Justicia*. Lizcano *et al.* (2010), evaluaron la actividad antirradicalar de las hojas y el tallo de *Justicia pectoralis*, Tabla 4.

Tabla 4. Actividad antirradicalar de *J. pectoralis*.

Parte estudiada	Fenoles totales (mg EAG ^b /100 g)	Flavonoides totales (mg EC ^c /100 g)	TEAC ^a (μmol trolox/100 g)	ORAC ^d (μmol trolox/100 g)
Hoja	565.00 ± 1.00	75.00 ± 4.00	1880.00 ± 7.00	8970.00 ± 37.00
Tallo	118.00 ± 0.00	12.00 ± 0.00	530.00 ± 7.00	2190.00 ± 100.00

^aTEAC, Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox. ^bEAG, Equivalentes de ácido gálico. ^cEC, Equivalentes de catequina. ^dORAC, Capacidad de absorción de radicales oxígeno. Los resultados están expresados en peso seco.

Sulaiman *et al.* (2011), evaluaron la actividad antirradicalar del tallo de *J. gendarussa* con diferentes disolventes, Tabla 5.

Tabla 5. Actividad antirradicalar de extractos del tallo de *J. gendarussa*.

Disolvente	Fenoles totales (mg EAG ^a /100 g)	Flavonoides totales (mg EQ ^b /100 g)	FRAP ^c (mg EAG ^a /100 g)	DPPH ^c (mg EAG ^a /100 g)
Acetona 70%	40.00 ± 0.10	120.00 ± 0.00	40.00 ± 0.00	70.00 ± 0.10
Etanol 70%	180.00 ± 1.20	210.00 ± 0.30	40.00 ± 0.00	40.00 ± 0.10
Metanol 70%	20.00 ± 0.10	110.00 ± 0.10	30.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00
Agua destilada	10.00 ± 0.10	10.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00	30.00 ± 0.00

^aEAG, Equivalentes de ácido gálico. ^bEQ, Equivalentes de quercetina. ^cFRAP, Poder antioxidante frente al ion férrico. Los resultados están expresados en peso seco.

Los resultados anteriores muestran que la actividad antirradicalar es dependiente de la especie estudiada, la parte de la planta, el disolvente y método utilizado para la extracción.

Además es importante mencionar que aunado a lo anterior también el estado de madurez y las condiciones ambientales de la planta, así como el método de obtención de los extractos afectan significativamente la actividad antirradicalar.

2.9. Actividad antidiabética de extractos de plantas

Los efectos antidiabéticos de los extractos de plantas pueden ser estudiados usando modelos *in vivo* o usando una variedad de sistemas *in vitro*. Los sistemas *in vitro* juegan un papel muy importante en la evaluación de la actividad antidiabética de los fármacos, y proporcionan las herramientas iniciales para la selección de un gran número de candidatos terapéuticos potenciales. Estos sistemas pueden proporcionar información útil sobre el mecanismo de acción del agente terapéutico. Los materiales biológicos en los sistemas *in vitro* pueden ser órganos enteros, tejidos, cultivos celulares, entre otros. En los sistemas *in vivo*, se emplean animales vivos, los cuales son necesarios para estudiar cómo se comportan en condiciones clínicas o fisiopatológicas (Thorat *et al.*, 2012). Los métodos propuestos para evaluar la actividad antidiabética de los extractos polares de *J. spicigera* en el presente proyecto consistieron en modelos *in vitro*. Consecuentemente a continuación se describen de manera breve.

2.9.1. Actividad antidiabética *in vitro*

Investigaciones recientes indican que niveles de glucosa postprandial altos en la sangre son el factor más importante que favorece el inicio y desarrollo de la diabetes Tipo 2, denominada hiperglicemia postprandial. Esta hiperglicemia es una absorción rápida de la glucosa en el intestino después de ingerir alimentos, en la cual la α -amilasa y α -glucosidasa juegan un papel importante debido a la hidrólisis del almidón y de oligosacáridos. La inhibición de estas enzimas puede controlar la elevación de los niveles de glucosa en sangre. Por lo tanto es importante establecer estrategias para reducir la hiperglicemia postprandial a través de la inhibición de la actividad de estas enzimas (Dong *et al.*, 2012).

Actualmente, los inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa como la acarbosa, voglibosa y miglitol son utilizados ampliamente en pacientes con diabetes Tipo 2. Sin embargo, se ha

documentado que estos inhibidores sintéticos tienen efectos indeseables tales como diarrea y cólicos abdominales. Hoy en día se han estudiado inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa provenientes de fuentes naturales, especialmente de plantas del género *Gymnema*, tales como *G. sylvestre*, *G. inodorum* y *G. yunnanense* (Ramkumar *et al.*, 2010). También se ha demostrado que extractos de la cáscara de *Camellia sinensis* tienen la capacidad de inhibir la α -amilasa y α -glucosidasa (Wang *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en este último estudio mostraron que los responsables de la bioactividad de estos extractos son los compuestos fenólicos.

Ramírez *et al.* (2012) evaluaron la inhibición de la enzima α -glucosidasa, procedente de la mucosa intestinal de ratas Sprague Dawley, en presencia de extractos macerados de etanol al 60% de plantas antidiabéticas, los porcentajes de inhibición de estas plantas se encontraron en un intervalo de 0 a 85%, resaltando a *Camellia sinensis* y *Justicia spicigera* con un 85.0 ± 1.3 y $0.4 \pm 1.5\%$ de inhibición respectivamente. Los resultados obtenidos por estos autores demuestran el posible mecanismo de acción de algunas plantas antidiabéticas.

Dentro de los métodos para evaluar la actividad antidiabética se encuentra la inhibición de α -amilasa, este método se fundamenta en la inhibición de la enzima en presencia del extracto a evaluar. La reacción se inicia cuando se adiciona el sustrato (almidón), el cual al ser hidrolizado en presencia de la enzima, propicia la liberación de azúcares reductores. Los azúcares reductores liberados, reaccionan con un reactivo colorimétrico (ácido 3,5-dinitrosalicílico), el cual es reducido produciendo un cambio de color que puede ser medido espectrofotométricamente e indicar de manera indirecta el efecto del extracto sobre la actividad enzimática (Nickavar & Yousefian, 2011). De manera análoga, la inhibición de la α -glucosidasa se determina por la adición de esta enzima al extracto a evaluar. Para iniciar la reacción es necesario adicionar un sustrato (*p*-nitrofenil glucopiranosido), que al ser consumido durante la reacción libera al *p*-nitrofenol. Éste último compuesto puede ser medido espectrofotométricamente e indicar de manera indirecta el efecto del extracto sobre la actividad enzimática (Eom *et al.*, 2012).

En el presente estudio se utilizaron estos métodos de evaluación de la actividad antidiabética.

2.10. Separación y purificación de compuestos fenólicos

La cromatografía es una técnica ampliamente utilizada para separar y purificar, a partir de un extracto obtenido de fuentes naturales, diversos compuestos entre ellos los fenólicos. En el proceso de separación por cromatografía existen dos fases, una móvil y una estacionaria. La muestra es transportada por la fase móvil a través de la fase estacionaria. Los compuestos quedan retenidos y son eluidos hasta obtenerlos puros o en mezcla, esto está en función de la composición de la muestra así como de la polaridad de ambas fases. Dentro de las técnicas cromatográficas se encuentran la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (GC), la cromatografía en columna, en placa semipreparativa, en capa fina, entre otras.

2.10.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) es una técnica sencilla y rápida, que es utilizada ampliamente para identificar de manera cualitativa compuestos de interés. La TLC ayuda a determinar el grado de pureza de un compuesto así como también permite la comparación entre muestras o incluso realizar el seguimiento de los productos de una reacción.

En las placas utilizadas en TLC, la fase estacionaria se encuentra soportada sobre una lámina de plástico o aluminio que generalmente es gel de sílice (SiO_2) o alúmina (Al_2O_3). Esta fase debe ser inerte con los compuestos a analizar. Por otra parte, la fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes orgánicos de distinta polaridad.

En una cámara saturada con la fase móvil se coloca una placa (fase estacionaria) con la muestra a analizar y a medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través de la fase estacionaria se produce la separación de los compuestos presentes en la muestra.

La distancia recorrida por un compuesto y por la fase móvil desde la base de la placa se conoce como factor de retención (R_f) y tiene un valor que es constante para cada compuesto dependiendo de las condiciones cromatográficas determinadas.

El R_f se puede calcular como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}$$

Generalmente para lograr observar los compuestos en la fase estacionaria se requiere un revelado utilizando luz ultravioleta de una longitud de onda de 254 ó 365 nm. Cuando no es posible observar los compuestos a estas longitudes se requiere llevar a cabo alguna reacción química en la fase estacionaria para producir el revelado de los compuestos. Los reactivos más comunes utilizados para el revelado en TLC son el yodo y el ácido sulfúrico (Sherma & Fried, 2003).

2.10.2. Cromatografía en columna

En este tipo de cromatografía se hace uso de una columna de vidrio vertical en la cual la fase estacionaria puede ser gel de sílice (SiO_2) o alúmina (Al_2O_3). La fase estacionaria no debe de ser soluble en la fase móvil y no debe de reaccionar con la muestra a purificar.

La muestra previamente llevada a sequedad se disuelve en una pequeña cantidad de disolvente y se coloca en la parte superior de la columna que previamente ha sido empacada con la fase estacionaria. Posteriormente se adiciona la fase móvil a la columna y los compuestos presentes en la muestra son arrastrados por esta fase a través de la columna ya sea por gravedad o por presión de aire (flash). La composición de la fase móvil está basada en la polaridad de los compuestos de interés. Dependiendo de la naturaleza de los componentes del extracto, éstos logran establecer interacciones con la fase estacionaria y la móvil. Los compuestos en la columna no avanzan a la misma velocidad, algunos de ellos se retienen fuertemente en la fase estacionaria y avanzan lentamente. Los compuestos de baja retención avanzan a mayor velocidad. Las interacciones de los componentes de la muestra con la fase estacionaria y móvil permiten que los compuestos se transporten a diferentes velocidades y por consiguiente se obtiene la separación de éstos.

Este tipo de cromatografía se apoya de la TLC para ir monitoreando si los compuestos que se van separando de la muestra están puros o bien en mezcla (Li *et al.*, 2007).

2.10.3. Cromatografía en placa semipreparativa

En este tipo de cromatografía generalmente se emplea una placa de vidrio de 20x20 cm o de 20x40 cm con un espesor aproximado de 0.2 mm. La cantidad de muestra utilizada en este tipo de placas es del orden de apenas unos miligramos, por ejemplo en una placa de 20x20 cm se colocan de 10 a 100 mg de muestra. La muestra se disuelve en un volumen pequeño de disolvente previo a su aplicación en la placa. La fase móvil se determina por medio de TLC previo a la placa semipreparativa. Posteriormente, la placa se introduce en un tanque o cuba previamente saturado con la fase móvil. La separación se lleva a cabo de manera similar que en la TLC. Una vez concluida la separación, la placa se seca y los compuestos separados se identifican por UV (254 y 365 nm). Posteriormente las bandas que contienen a los compuestos se raspan y el polvo obtenido (fase estacionaria y compuesto) se disuelve en un disolvente capaz de extraer al compuesto (Li *et al.*, 2007).

2.11. Elucidación estructural

La elucidación estructural de los compuestos químicos puros se realiza a través de la interpretación de los datos espectroscópicos obtenidos a partir de espectroscopía de infrarrojo (IR) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). A continuación se describirán brevemente estas técnicas.

2.11.1. Espectroscopía de infrarrojo

La región del infrarrojo en el espectro electromagnético se puede dividir en tres regiones infrarrojo cercano (NIR), 12800-4000 cm^{-1} , infrarrojo medio, 4000-400 cm^{-1} e infrarrojo lejano, 400-10 cm^{-1} . Para la elucidación estructural se utiliza la espectroscopía de infrarrojo medio.

La espectroscopía de infrarrojo medio se utiliza para identificar grupos funcionales en una molécula y esto se logra a partir de los movimientos vibracionales de los enlaces en la estructura molecular inducidos por la presencia de luz infrarroja. Los movimientos vibracionales de las moléculas poseen niveles de energía cuantizados. Estos movimientos se clasifican en dos grupos, vibraciones de estiramiento y de flexión. La energía requerida para producir estas

vibraciones depende principalmente del tamaño de los átomos y al tipo de enlace que los une. Esto permite distinguir a los grupos funcionales en bandas características ya reportadas en la literatura (Stuart, 2005). En la Tabla 6, se muestran las bandas del espectro de IR de flavonoides examinados, así como también las asignaciones para los compuestos citados (Heneczowski *et al.*, 2001).

Tabla 6. Bandas del espectro de IR de algunos flavonoides.

Grupo asignado a la banda dada	Flavonoide			
	Flavona	Fisetina	Miricetina	Quercetina
	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)			
	1649	1619	1638	1638
		1332 m	1377	1368, 1355, 1348
Banda C=O	1313 w	1304	1333, 1326	1317, 1296
Vibraciones de deformación -C-OH	1283 w	1285 m, 1252 w		1245, 1211
	1260 w	1252 w	1228, 1202	
	1224 m	1193 m	1186	
Vibraciones de estiramiento -C-OH		1129, 1112 m – s	1168 s	1164 s, 1142 m

s – fuerte; m- mediano; w-débil; vw – muy débil.
 $\tilde{\nu}$, número de onda.

2.11.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica no destructiva, usada para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos. En esta técnica espectroscópica se analizan los núcleos atómicos con un número impar de partículas nucleares (protones y neutrones) y/o masa atómica impar. Los núcleos de elementos más estudiados en compuestos orgánicos son ¹H, ¹³C, ¹⁹F y ³¹P. Estos núcleos son magnéticamente activos debido a que poseen un espín nuclear diferente de cero, generando que se comporten como pequeños imanes. Para lograr medir el fenómeno de RMN es necesario llevar a cabo una perturbación de la orientación de los espines nucleares y esto se logra utilizando un campo magnético potente, superior a los 60 MHz. Cabe hacer mención que en ausencia de un campo magnético externo, los espines nucleares se encuentran orientados al azar. Sin embargo, cuando una muestra se

coloca en un campo magnético externo, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado espín β . La diferencia de energía entre los dos estados de espín α y β , depende de la fuerza del campo magnético aplicado, cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética y de población habrá entre los dos estados de espín. La población de estados de espín más abundante es la α . Para llevar a cabo el fenómeno de RMN se inducen pulsos de radiofrecuencia (de 10 MHz a 1 GHz) favoreciendo la inversión del estado de espín α a β produciéndose una absorción de energía. Cuando los estados de espín regresan a su estado basal emiten esa energía en forma de señales cuya frecuencia depende de una diferencia de energía entre los dos estados de espín α y β . Finalmente estas señales son registradas y expresadas como una gráfica obteniéndose el espectro de RMN. Los electrones vecinos a un núcleo pueden afectar el campo magnético local produciéndose un fenómeno denominado diamagnetismo que consiste en una modificación de energía de los estados de espín por la circulación de los electrones sobre los estados de espín. Esto trae como consecuencia que la frecuencia de resonancia de un núcleo esté en función de su ambiente químico. En un espectro de RMN este efecto se cuantifica a través de los denominados desplazamientos químicos (δ) expresados en ppm y referenciados al tetrametilsilano (TMS) para ^1H y ^{13}C . Otra variable medida en los espectros es la constante de acoplamiento (J) que se mide en Hz entre picos de una señal múltiple. Esta variable proporciona información sobre la geometría de la molécula debido a que permite conocer cómo está la vecindad de los núcleos observados.

En RMN se pueden realizar experimentos mono y bidimensionales. Los experimentos monodimensionales proporcionan información sobre los δ , así como de sus J . En experimentos bidimensionales homonucleares se pueden analizar los δ y sus correlaciones entre núcleos acoplados, analizar interacciones entre protones a distancia, etc. En experimentos bidimensionales heteronucleares, se pueden analizar correlaciones a través de un enlace entre un protón y un heteronúcleo (^{13}C) al que está directamente unido o también a una distancia de 2 o 3 enlaces, por citar algunos casos. Dentro de los experimentos homonucleares se encuentran la correlación espectroscópica (COSY), correlación espectroscópica total (TOCSY) y el efecto nuclear overhauser (NOESY). Entre los experimentos bidimensionales heteronucleares se encuentran la correlación cuántica heteronuclear múltiple (HMQC), la correlación cuántica

heteronuclear simple (HSQC), la correlación heteronuclear de enlace múltiple (HMBC) y el efecto espectroscópico heteronuclear overhuser (HOESY) (Breitmaier, 2002).

En el espectro de HSQC se detectan las correlaciones entre dos diferentes tipos de núcleos que se encuentran separados por un enlace. Los desplazamientos químicos de los núcleos de los átomos representados en las coordenadas X e Y se identifican como una señal por par de núcleos acoplados, Figura 6.

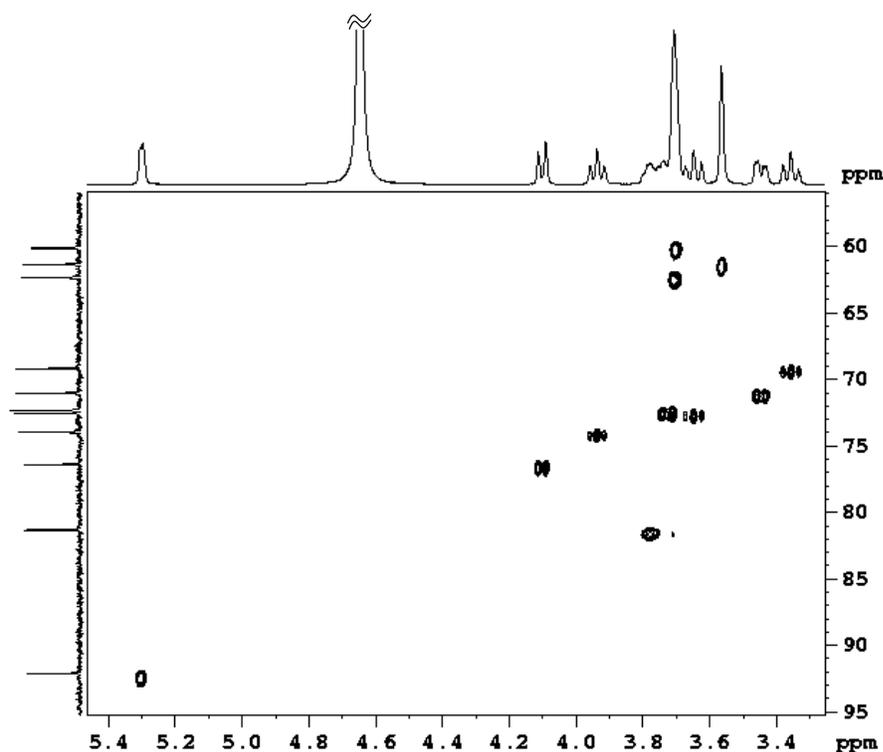


Figura 6. Ejemplo de HSQC en RMN.

En un espectro de HMBC, las señales de los núcleos de ^1H y ^{13}C se correlacionan y con ello se conoce la distancia a dos o tres enlaces. En algunas ocasiones se pueden observar correlaciones hasta cuatro enlaces. En el eje X se coloca el espectro de ^1H y en el eje Y el espectro de ^{13}C , Figura 7.

Los experimentos en RMN en gradiente denotados por una g seguida del nombre del experimento (gHMBC, gHSQC, etc.) proporcionan resultados más óptimos que aquellos sin gradiente y con una menor interferencia de los espectros estudiados (Breitmaier, 2002).

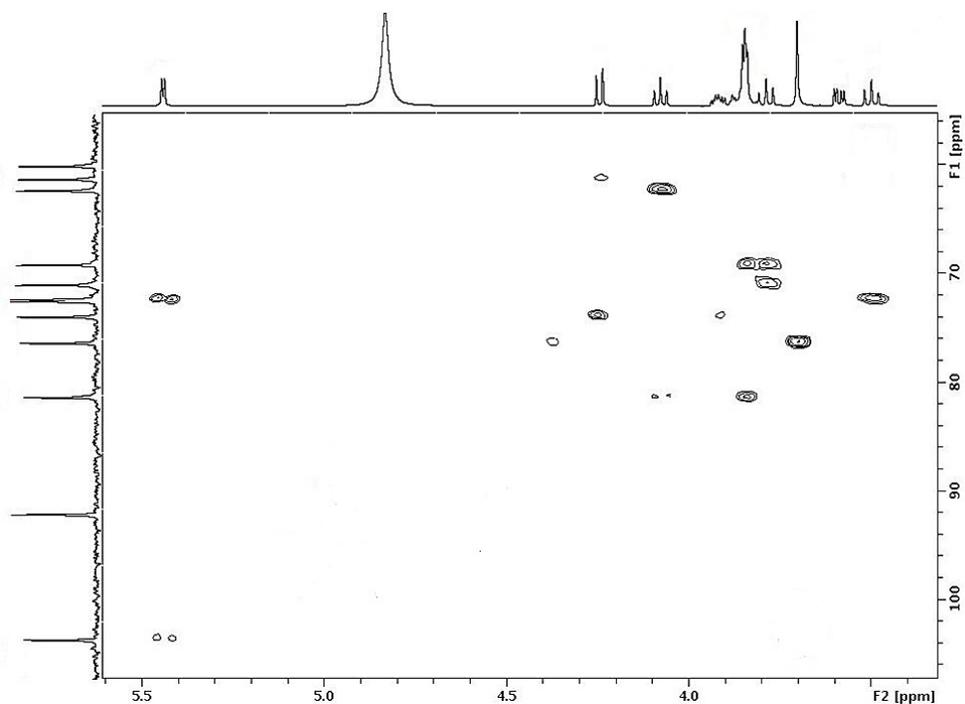


Figura 7. Ejemplo de HMBC en RMN.

2.11.2.1. RMN de ^1H

La intensidad, multiplicidad y δ de las señales en un espectro de RMN de ^1H permite determinar el número de núcleos y su naturaleza en una molécula. Generalmente el δ para ^1H se encuentra en un intervalo de 0 a 12 ppm. Las señales múltiples poseen una proporción definida y representan un conjunto de ^1H de un sólo tipo. La multiplicidad de la señal se debe al efecto magnético que ejercen los ^1H vecinos sobre el ^1H resonante, a esto se le denomina acoplamiento espín-espín. Estos acoplamientos comúnmente son a tres enlaces y se definen como $^3J_{\text{H-H}}$. La multiplicidad se puede representar como un triángulo de Pascal en el cual se puede relacionar el número de ^1H con el número de picos y la relación de intensidad que guardan estos picos entre sí (Breitmaier, 2002), Tabla 7.

Tabla 7. Multiplicidad en RMN para ^1H .

Protones equivalentes en carbonos adyacentes	Numero de picos (n+1), multiplicidad	Relaciones en intensidad, integral
0	1 (simple)	1
1	2 (doble)	1 1
2	3 (triple)	1 2 1
3	4 (cuádruple)	1 3 3 1
4	5 (quíntuple)	1 4 6 4 1
5	6 (séxtuple)	1 5 10 10 5 1
6	7 (séptuple)	1 6 15 20 15 6 1

En la Tabla 8 se representan los δ de ^1H más representativos para flavonoides y glicosilflavonoides.

Tabla 8. Desplazamiento químico de protón.

Desplazamiento químico δ (ppm)	Tipos de protones
1.0 – 1.2	Metilo de ramnosa (da)
1.7	Metilos del grupo isopentenilo
3.0 – 4.8	H de azúcares
3.5	Metileno del grupo isopentenilo
3.7 – 4.1	Metoxilos aromáticos
4.1 – 4.6	Protones 2 y 3 de isoflavanonas
4.2 – 6.0	H-1 de azúcares , protón 2 de flavanoles y flavanonas (dd)
5.4	H-2 de flavanoles y flavanonas (dd)
5.9 – 6.0	Metilendioxi
6.0 – 6.8	H-3, 6 y 8 de flavonas
6.8 – 8.0	H aromáticos del anillo B
7.5 – 8.0	H-2 de isoflavanonas
12.0 – 14.0	H de hidroxilo 5

da, doble ancho. dd, doble de doble.

2.11.2.2. RMN de ^{13}C

La espectroscopía de RMN de ^{13}C permite determinar los diferentes tipos de átomos de carbono presentes en una molécula. Los δ de ^{13}C se encuentran en un intervalo de 0 a 220 ppm. Este tipo de RMN es menos sensible que la de ^1H debido a la baja abundancia natural del ^{13}C (1.1 %) (Breitmaier, 2002).

En la Tabla 9 se presentan los δ de RMN de ^{13}C para varios tipos de carbonos de flavonoides.

Tabla 9. Desplazamientos químicos de varios tipos de carbonos de flavonoides.

Desplazamiento químico δ (ppm)	Tipos de carbonos
18	C-6 de ramnosa
30	C-4 de flavan-3-oles
42 – 46	C-3 de flavanonas
56 – 61	Metoxilos
60 – 80	C-OH de carbohidratos
70 – 75	C-3 de flavanoles
80	C-2 de flavanonas
85	C-2 de flavanoles
100 – 115	C-3 de flavonas, C-1 de carbohidratos, C-10 de flavonas 5-hidroxiladas
115 – 128	Aromáticos con H
145	C-3 de flavonoles, C-5 de flavonas 5-hidroxiladas, C-3 y C-4 de antocianinas
150 – 165	C aromáticos hidroxilados y metoxilados, C-2 de flavonas, C-4' oxigenado, C-9 de flavonas.
175 – 178	Carbonilo C-4 sin OH en C-5 en flavonas, C-4 de flavonoles
182	Carbonilo C-4 con OH en C-5 de flavonas
190 – 196	Carbonilo C-4 de flavanonas
197 – 200	Carbonilo C-4 de flavanoles

En RMN de ^{13}C es posible diferenciar entre un C-glicosilflavonoide y un O-glicosilflavonoide. En los O-glicósidos, el carbono del fragmento de azúcar unido al flavonoide a través del oxígeno presenta un desplazamiento químico alrededor de 100 ppm, Tabla 9. En los C-glicósidos éste carbono se encuentra en alrededor de 75 ppm. Por otro lado, en los C-glicósidos el carbono de la aglicona enlazado al carbohidrato está en alrededor de 10 ppm a frecuencias más altas respecto a los flavonoides sin sustituyente.

Capítulo 3. Metodología Experimental

En la presente sección se describen los equipos, reactivos y disolventes utilizados durante el desarrollo experimental de este proyecto. Así mismo, se describen las técnicas empleadas para la cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales y la evaluación de la actividad antirradicalar y antidiabética *in vitro*. Por último, se describe la metodología para el aislamiento e identificación de los compuestos fenólicos aislados a partir de las hojas de *J. spicigera*. En la Figura 8, se muestra el esquema de la metodología general llevada a cabo en el presente proyecto.

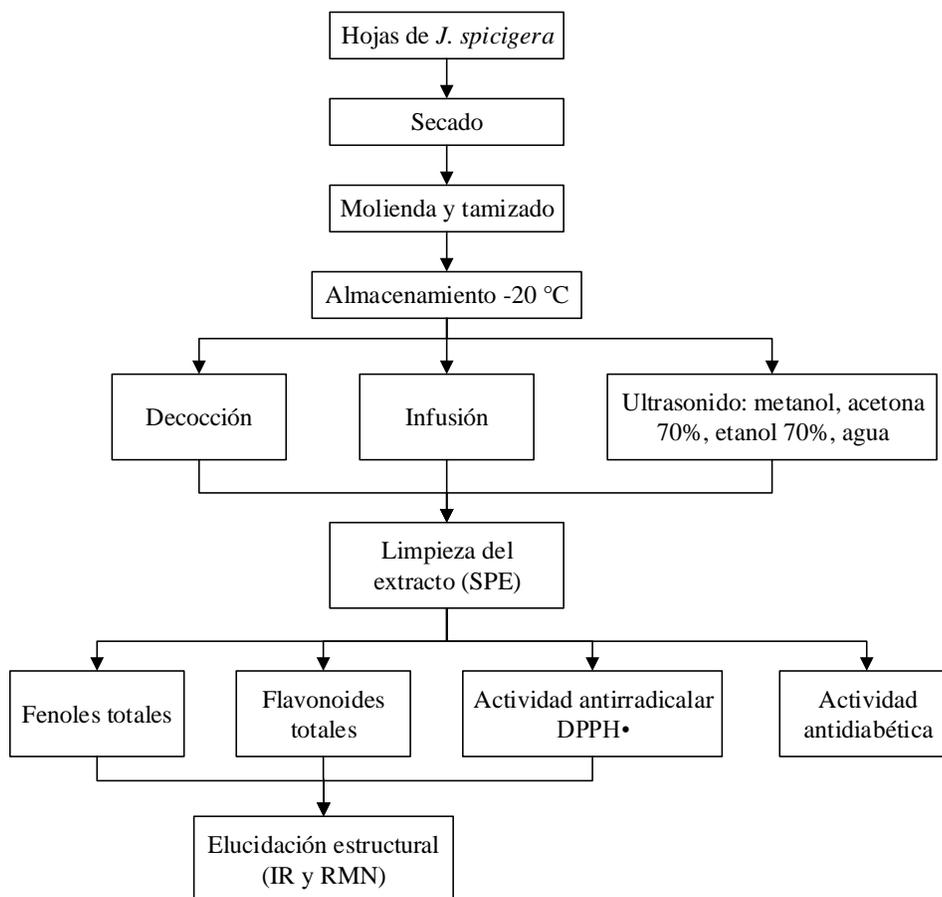


Figura 8. Procedimiento del tratamiento de la muestra.

3.1. Equipos, reactivos y disolventes

El trabajo experimental se desarrolló en los laboratorios de Productos Naturales y Alimentos del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca. A continuación se enlistan los equipos y reactivos utilizados en este proyecto.

Termobalanza Sartorius MA4, Balanza analítica Sartorius BL210S, molino ciclónico Foss Cyclotec 1093, Sonicador Ultrasonic Cleaner SB-3200 DTN, lector de microplacas BioTek® ELx808, parrillas de calentamiento CIMAREC®, vórtex Barnstead International type 16700 Mixer e IKA® vórtex 3, rotavapor de vacío IKA® RU10, recirculador de agua ECO10 SEV, balanza granataria OHAUS®, FT-IR Alpha Bruker, RMN 400 MHz Varian, equipo para punto de fusión SEV, tubos para RMN de 5 mm, cámara para TLC 20x20 cm, Cartuchos Supelco ENVI-18, micropipetas, tamiz #60, gel de sílice Merck malla 230-400, material de vidrio.

MeOH 99.5%, EtOH 99.5%, acetona 99.5%, ácido gálico monohidratado 98%, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH') <100%, (+)-catequina hidratada 96%, reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M, NaOH en lentejas 99%, Na₂CO₃ 99%, NaNO₂ 97%, AlCl₃•6H₂O 99.4%, BHT 99%, quercetina ≥95%, almidón de papa, ácido 3,5-dinitrosalicílico ≥98%, KNaC₄H₄O₆•4H₂O, *p*-nitrofenil glucopiranosido ≥99%, hexano 95%, CHCl₃ 99%, AcOEt 99%, CD₃OD, DMSO-d₆, Acarbosa ≥95%, α-amilasa de páncreas porcino (EC 3.2.1.1), α-glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20).

Los reactivos y disolventes utilizados fueron grado analítico. Los disolventes y el H₂O, se destilaron y degasificaron antes de ser utilizados para cada experimento.

3.2. Obtención de la muestra

La muestra de *J. spicigera* se colectó en el mes de agosto del 2013 en el municipio de Asunción Cuyotepeji, ubicado en la región de la mixteca, Oaxaca. Los arbustos de *J. spicigera* se ubicaron a una altitud de 1765 m y en las siguientes coordenadas geográficas 17° 55' 45.12'' N y -97° 40' 22.44'' O. Se revisó que la muestra estuviera en buen estado, es decir, que no presentara ninguna enfermedad o plaga. Posteriormente, la muestra se transportó a los laboratorios de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), y dos especímenes de la

planta se enviaron al herbario de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH) en donde la M. C. Ernestina Cedillo Portugal llevó a cabo su identificación taxonómica y su depósito en el herbario, asignándole el número de registro 25224.

3.3. Preparación de la muestra

El proceso de secado consistió en colocar las hojas de *J. spicigera* entre papel periódico, Figura 9. El papel se cambió constantemente hasta alcanzar una remoción del 90% de humedad presente en las hojas, una vez deshidratadas se molieron en un molino ciclónico. Finalmente, la muestra se tamizó a través de una malla número 60, el polvo que se obtuvo se almacenó en frascos de color ámbar a -20 °C.



Figura 9. 1) Planta de *J. spicigera* en su hábitat, 2) Hojas secas de *J. spicigera*.

3.4. Obtención de los extractos crudos

Se utilizaron tres métodos de extracción: decocción, infusión y por ultrasonido, en este último método se usaron diferentes disolventes, MeOH, EtOH al 70%, acetona al 70% y H₂O desionizada. El uso de estos tres métodos tuvo la finalidad de determinar el efecto del método de extracción sobre la actividad antidiabética y antirradicalar del extracto. A continuación se describe brevemente cada uno de los métodos de extracción utilizados.

Decocción. Se pesaron 700 mg del polvo de *J. spicigera* y se adicionaron 5 mL de H₂O desionizada. Esta mezcla se calentó en una parrilla eléctrica con agitación magnética. Una vez alcanzado el punto de ebullición se retiró de la fuente de calor y se dejó enfriar. Posteriormente se filtró sobre papel Whatman No. 1. El filtrado se almacenó a -20 °C en un frasco color ámbar hasta su análisis (Cruz-Gallegos, 2012).

Infusión. A 700 mg del polvo de *J. spicigera* se le adicionaron 5 mL de H₂O desionizada en ebullición. Se agitó y se dejó en reposo por 15 min. Posteriormente se filtró sobre un papel Whatman No. 1. El filtrado se almacenó a -20 °C en un frasco color ámbar hasta su análisis (Cruz-Gallegos, 2012).

Extractos por ultrasonido: MeOH, EtOH 70%, acetona 70%, H₂O. Se pesaron 100 mg del polvo de *J. spicigera*, se colocaron en un tubo eppendorf y posteriormente se adicionó 1 mL de disolvente. La mezcla se expuso a un baño de ultrasonido a 35 °C por 15 min. Después, el extracto se centrifugó, decantó, y se colocó en un matraz bola, este procedimiento se realizó por duplicado. El disolvente se removió en un rotavapor a 40 °C a vacío. Los extractos obtenidos se almacenaron a -20 °C en un frasco color ámbar hasta su análisis.

3.5. Limpieza de los extractos por SPE

La etapa de limpieza de los extractos tuvo como objetivo eliminar las clorofilas, debido a que estas absorben aproximadamente a 510 nm y consecuentemente producen interferencia en la cuantificación de flavonoides y la evaluación de la actividad antirradicalar frente al DPPH[•].

La extracción en fase sólida (SPE) se llevó a cabo en tres etapas, utilizando cartuchos Supelco ENVI-18 en fase reversa. En una primera etapa, el cartucho se acondicionó con 5 mL de H₂O, y después se adicionaron 4.4 mg de extracto. Cabe hacer mención, que los extractos no acuosos (MeOH, acetona al 70% y EtOH al 70%) primero se llevaron a sequedad en un rotavapor a 40 °C y posteriormente se redisolviéron en 5 mL de H₂O previo a la adición al cartucho acondicionado. En una segunda etapa se adicionaron 5 mL de MeOH/H₂O (50/50). Finalmente en la tercera etapa se adicionaron al cartucho 5 mL de MeOH. Como producto de la elución se obtuvieron tres fracciones, H₂O, MeOH/H₂O (50/50) y MeOH. Las fracciones de H₂O y MeOH/H₂O (50/50) se utilizaron para llevar a cabo el análisis cuantitativo de fenoles y

flavonoides totales así como para evaluar la actividad antirradicalar y antidiabética *in vitro*, Figura 10 y Figura 11. Todos las fracciones se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Las fracciones de MeOH se desecharon.

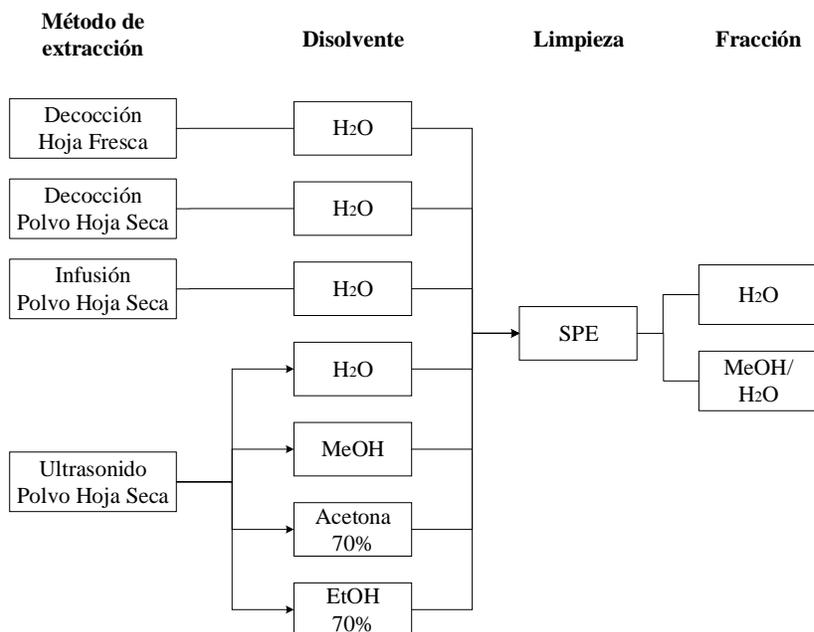


Figura 10. Diagrama para la obtención de extractos limpios.

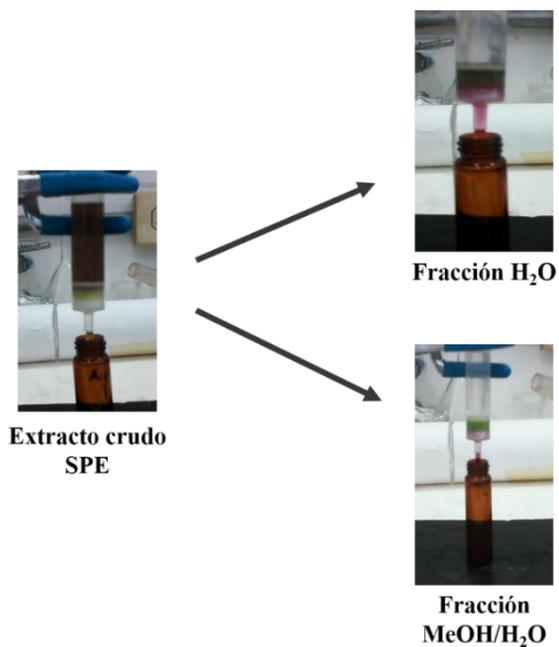


Figura 11. Limpieza de extractos por SPE.

3.6. Cuantificación de fenoles totales en los extractos

Preparación de soluciones.

EtOH al 90% (v/v). Se mezclaron 90 mL de EtOH con 10 mL de H₂O.

Na₂CO₃ al 0.5% (p/v). Se pesaron 50 mg de Na₂CO₃ y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, posteriormente éste se aforó con H₂O.

Reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M. Se transfirieron 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M a un matraz volumétrico de 10 mL, posteriormente se llevó a cabo el aforé con H₂O en ausencia de luz.

Ácido gálico a 100 ppm. Se pesó 1 mg de ácido gálico y se disolvió en EtOH al 90% hasta un volumen de 10 mL. Los estándares de ácido gálico de 5, 10, 15, 20 y 25 ppm se prepararon a partir de la solución de ácido gálico de 100 ppm.

Cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu (Julián-Loeza et al., 2011). 40 µL del extracto o del estándar se mezclaron con 40 µL del Reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 M en una microplaca. La mezcla se dejó en reposo por 3 min a temperatura ambiente y se agitó por 15 s a velocidad baja. Pasado este tiempo, a la mezcla anterior se le adicionaron 40 µL de Na₂CO₃ al 0.5%. La mezcla se dejó reposar por 30 min a 40 °C y se agitó por 1 min a velocidad media. La absorbancia de la muestra y de los estándares se determinó a 750 nm. Al blanco de la muestra o del estándar se le adicionaron H₂O en lugar del reactivo de Folin-Ciocalteu. El estándar de 25 ppm se utilizó como blanco de los estándares. Para la curva de calibración se utilizó ácido gálico como estándar. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.7. Cuantificación de flavonoides totales en los extractos

Preparación de soluciones.

NaNO₂ al 1.5% (p/v). 375 mg de NaNO₂ se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL y éste se aforó con H₂O.

AlCl₃ al 3% (p/v). 300 mg de AlCl₃•6H₂O se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y éste se aforó con H₂O.

NaOH 1 M. 400 mg de NaOH se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y éste se aforó con H₂O.

(+)-Catequina 1000 ppm. 10 mg de (+)-catequina se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y éste se aforó con MeOH en ausencia de luz. A partir de esta solución se prepararon estándares de 10, 20, 30, 40 y 50 ppm.

Quercetina 1000 ppm. 10 mg de quercetina se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y éste se aforó con MeOH en ausencia de luz. A partir de esta solución se prepararon estándares de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm.

Cuantificación de flavonoides por el método de AlCl₃ (Julián-Loeza *et al.*, 2011). En un vial ámbar se mezcló 1 mL del extracto o del estándar con 1 mL de NaNO₂ al 1.5%. La mezcla se agitó por 5 min en un vórtex a temperatura ambiente. 50 µL de esta mezcla se colocó en una microplaca, posteriormente se le agregaron 50 µL de AlCl₃ al 3% y se agitó por 1 min. Después se le adicionaron 50 µL de NaOH 1 M y se agitó por 1 min. Pasado este tiempo se determinó la absorbancia a 405, 490 y 515 nm. El blanco de la muestra o del estándar contenía H₂O en lugar de AlCl₃. El estándar de 50 ppm se utilizó como blanco de los estándares. Para la curva de calibración se utilizaron estándares de (+)-catequina y quercetina. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.8. Evaluación de la actividad antirradicalar de los extractos

Preparación de soluciones

Solución patrón de DPPH• al 0.1% (p/v). Se pesaron 10 mg de DPPH•, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y éste se aforó con MeOH en ausencia de luz. A partir de esta solución se preparó el DPPH• 0.004%, la cual se resguardó de la luz y se dejó en refrigeración entre mediciones.

Ácido gálico a 100 ppm. Se pesó 1 mg de ácido gálico y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y éste se aforó con EtOH al 90%. A partir de ésta solución se prepararon los estándares de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.5 ppm.

Soluciones de extractos. Estas soluciones se prepararon a concentraciones que permitieron reducir al DPPH• entre el 20 y el 90%.

Evaluación de la actividad antirradicalar (Julián-Loeza *et al.*, 2011). 70 µL del extracto o del estándar se mezclaron con 70 µL de DPPH• al 0.004% en una microplaca, y se dejó en reposo por 30 min a temperatura ambiente en ausencia de luz y con agitación. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 515 nm. La mezcla de 70 µL del DPPH• al 0.004% y 70 µL de MeOH se usó como control. Para obtener la absorbancia del blanco de los estándares se utilizó la solución de menor concentración (0.5 ppm de ácido gálico). La actividad antirradicalar se expresó como el porcentaje de inhibición $[(A_{\text{control}} - A_{\text{extracto}}) / A_{\text{control}}] * 100$. Para conocer el valor del IC₅₀ se graficó el %Inhibición vs concentración y a partir de la ecuación de la curva obtenida se encontró a que concentración correspondía el 50% de inhibición. El valor IC₅₀, que corresponde a la cantidad de muestra requerida para reducir el 50% del radical DPPH• se reportó en kg de muestra seca (ms)/kg de DPPH•.

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{A_{\text{DPPH}\bullet} - A_{\text{EXT}}}{A_{\text{DPPH}\bullet}} \right] \times 100$$

Cinética de eficiencia antirradicalar. La cinética se realizó con el extracto a la concentración de IC₅₀. Se realizó una lectura de absorbancia en intervalos de 30 s durante 120 min. Los valores de absorbancia se utilizaron para calcular los porcentajes de DPPH• remanente que a su vez se usaron para calcular el valor T_{EC50}. Para obtener la curva en la cual se identificó el tiempo donde inició el estado estable, T_{EC50}, se obtuvo la primera deriva de los valores de absorbancia de %DPPH• remanente, posteriormente se graficaron las diferencias Δ(% DPPH• remanente) vs tiempo y se encontró el valor del T_{EC50}. Con los valores de IC₅₀ y T_{EC50} se calculó la eficiencia antirradicalar (AE) expresada como kg de DPPH•/kg muestra seca (ms)•min.

$$AE = \frac{1}{IC_{50} \times T_{EC50}}$$

3.9. Evaluación de la actividad antidiabética *in vitro*

3.9.1. Inhibición de la α -amilasa en presencia de los extractos

Preparación de soluciones.

Solución de almidón 0.25% (p/v). 62.5 mg de almidón de papa se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL y éste se aforó con H₂O, posteriormente se colocó en un baño de H₂O a 100 °C por 15 min.

Solución de α -amilasa de páncreas porcino. Se colocaron 53 μ L de la enzima en un matraz volumétrico de 100 mL y éste se aforó con un buffer de fosfato de potasio 20 mM (pH 6.9). La solución de la enzima se almacenó a 4 °C por no más de 30 días.

Solución de reactivo colorimétrico (DNS). Se prepararon 25 mL de una solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico. En un matraz aforado de 25 mL se colocó NaOH 0.4 M y se disolvió con 10 mL de H₂O, una vez disuelto el NaOH se le adicionó KNaC₄H₄O₆•4H₂O 1 M con 10 mL de H₂O, posteriormente se le adicionó lentamente ácido 3,5-dinitrosalicílico 0.044 M y se aforó con H₂O. La solución de DNS se almacenó a 4 °C por no más de 15 días.

Solución de acarbosa (Control positivo) 2000 ppm. 50 mg de acarbosa se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL y éste se aforó con un buffer de fosfatos (pH 6.9). A partir de esta solución se prepararon estándares de 25, 50, 100, 150 y 200 ppm.

Evaluación de la actividad antidiabética in vitro frente a α -amilasa (Ali et al., 2006). En un vial ámbar se colocaron 300 μ L del extracto o control, 160 μ L de H₂O y 400 μ L de almidón de papa, y estos se mezclaron a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de la solución de la enzima y se incubó en un baño de agua por 10 min a temperatura ambiente. De la mezcla anterior se colocaron 200 μ L en un vial ámbar y se le adicionaron 100 μ L del reactivo DNS, la mezcla se agitó y colocó en un baño de H₂O a 85 °C por 30 min. Posteriormente ésta mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le adicionaron 900 μ L de H₂O y se midió la absorbancia en un lector de microplacas a 515 nm. Como control positivo se usó acarbosa. Como blanco de los estándares se utilizó el estándar de 25 ppm en ausencia de DNS.

El porcentaje de inhibición de α -amilasa se calculó con la fórmula siguiente:

$$\% I_{\alpha\text{-amilasa}} = \left(1 - \frac{\Delta A_{\text{muestra}}}{\Delta A_{\text{control}}}\right) * 100$$

Donde:

$$\Delta A_{\text{control}} = A_{\text{prueba}} - A_{\text{blanco}}$$

$$\Delta A_{\text{muestra}} = A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}$$

Los valores de $\% I_{\alpha\text{-amilasa}}$ se utilizaron para construir una curva que relaciona éste valor vs concentración de extracto en ppm. A partir de la ecuación de la curva obtenida, se encontró el IC_{50} de los extractos estudiados. El valor de IC_{50} corresponde a la cantidad de extracto utilizado para inhibir el 50% la actividad enzimática.

3.9.2. Inhibición de la α -glucosidasa en presencia de los extractos.

Preparación de soluciones.

Solución de α -glucosidasa. Se colocaron en un matraz volumétrico 1.111 U/mL de α -glucosidasa y éste se aforó con un buffer de fosfatos 0.1 M (pH 6.7).

Solución de p-nitrofenil glucopiranosido (pNGP) 2.5 mM. 7.5 mg de pNGP se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y éste se aforó con un buffer de fosfato (pH 6.7).

Solución de Na_2CO_3 0.1 M. 265 mg de Na_2CO_3 se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL y éste se aforó con un buffer de fosfatos (pH 6.7).

Solución de acarbosa (Control positivo) 2000 ppm. 50 mg de acarbosa se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL y éste se aforó con un buffer de fosfatos (pH 6.7). A partir de esta solución se prepararon estándares de 50, 100, 200, 400 y 800 ppm.

Evaluación de la actividad antidiabética in vitro frente a α -glucosidasa (Liu *et al.*, 2011). Se colocaron en una microplaca 40 μ L del extracto o control y 20 μ L del pNGP 2.5 mM e

incubaron por 5 min a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 20 µL de la solución de la enzima y se incubó por 30 min a 37 °C, se agitó por 30 s a velocidad media. Después se adicionaron 60 µL de Na₂CO₃ 0.1 M y se agitó por 15 s a velocidad media, por último se realizó la lectura de la absorbancia a 405 nm. Como control positivo se usó acarbosa. Como blanco de los estándares se utilizó el estándar de 50 ppm en ausencia del pNGP 2.5 mM. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$\% I_{\alpha\text{-glucosidasa}} = \left(1 - \frac{\Delta A_{\text{muestra}}}{\Delta A_{\text{control}}} \right) * 100$$

Donde:

$$\Delta A_{\text{control}} = A_{\text{prueba}} - A_{\text{blanco}}$$

$$\Delta A_{\text{muestra}} = A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}$$

Los valores de % I_{α-glucosidasa} se utilizaron para construir una curva que relaciona éste valor vs concentración de extracto en ppm. A partir de la ecuación de la curva obtenida, se encontró el IC₅₀ de los extractos estudiados. El valor de IC₅₀ corresponde a la cantidad de extracto utilizado para inhibir el 50% de la enzima α-glucosidasa.

3.10. Aislamiento de los compuestos fenólicos

Previo a la purificación por métodos cromatográficos se llevó a cabo un proceso de extracción asistida por ultrasonido con EtOH al 70% a 35 °C por 15 min. Para la extracción se utilizaron 50 g del polvo de las hojas de *J. spicigera*, ésta muestra se colocó en un frasco color ámbar de 1000 mL y se le adicionaron 500x2 mL de EtOH al 70%. El extracto obtenido se filtró en papel Whatman No. 1, se llevó hasta sequedad a 40 °C a presión reducida y se almacenó a -20 °C. El extracto seco se redisolvió en 30 mL de H₂O y se realizaron extracciones líquido-líquido con hexano, cloroformo (CHCl₃) y acetato de etilo (AcOEt), utilizando volúmenes de 60x8, 60x8 y 60x11 mL respectivamente. Las fracciones orgánicas obtenidas se llevaron a sequedad a 40 °C a presión reducida, posteriormente se pesaron y almacenaron a -20 °C.

Para la separación y aislamiento de flavonoides se utilizó la fracción de AcOEt, la cual primero se llevó a un análisis cualitativo utilizando TLC, con el objetivo de identificar los compuestos más abundantes. Posteriormente se evaluaron mezclas de disolventes de diferente polaridad para llevar a cabo la mejor separación de los constituyentes en el extracto a través de cromatografía flash. La mezcla de disolventes que permitió la separación de los flavonoides fue AcOEt: EtOH: HCO₂H en una relación de volúmenes de 78.3: 4: 1, respectivamente.

3.10.1. Cromatografía en columna flash

Empacado de la columna. En el fondo de la columna de 50 mm de diámetro por 60 cm de altura se colocó algodón para retener a la sílice. Por otro lado en un vaso de precipitados de 250 mL se mezcló un volumen aproximado de 140 mL de sílice con 150 mL de hexano. Esta mezcla se vertió cuidadosamente a la columna hasta alcanzar una altura aproximada de 21 cm. A continuación se adicionó hexano a la columna con presión de aire hasta alcanzar una columna uniforme y libre de burbujas de aire. En algunos casos se requirió hacer una purificación adicional de fracciones obtenidas de la columna anterior y esto se llevó a cabo utilizando una columna de 25 cm de diámetro por 60 cm de altura.

Purificación de la muestra (fracción de AcOEt). Se adicionaron con una pipeta Pasteur a la columna aproximadamente 600 mg de la muestra disuelta en una mínima cantidad de MeOH (2 mL). Después la columna se eluyó con los eluyentes siguientes: 200 mL de hexano, 400 mL de hexano:CHCl₃ (50:50 v/v), 100 mL de hexano:CHCl₃ (70:30 v/v), 200 mL de CHCl₃, 300 mL de CHCl₃:AcOEt (60:40 v/v), 100 mL de CHCl₃:AcOEt (50:50 v/v), 100 mL de CHCl₃:AcOEt (40:60 v/v), 300 mL de CHCl₃:AcOEt (30:70 v/v), 100 mL de CHCl₃:AcOEt (20:80 v/v), 900 mL de CHCl₃:AcOEt (10:90 v/v), 1000 mL de AcOEt.

En hexano:CHCl₃ (50:50) eluye un compuesto denominado M1, en CHCl₃:AcOEt (60:40 v/v) eluye un compuesto que se denominó M2, en CHCl₃:AcOEt (30:70 v/v) eluyen en mezcla los compuestos denominados M2 y M3, en CHCl₃:AcOEt (20:80 v/v) eluyen en mezcla los compuestos M3 y M4, en CHCl₃:AcOEt (10:90 v/v) eluyen en mezcla los compuestos M4, M5 y M6, en AcOEt eluyen los compuestos M6 y M7.

Lavado de la columna. La columna se lavó con 200 mL de EtOH, posteriormente se adicionaron 900 mL de MeOH y finalmente 300 mL de acetona.

Purificación del compuesto M7. En una columna cromatográfica de 25 cm de diámetro por 60 cm de altura, empacada de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente, se adicionaron 374 mg de una muestra denominada MX redisuelta en 3 mL MeOH. Esta muestra se obtuvo a partir de M3, M4, M5, M6 y M7 de la columna previamente descrita. La columna se eluyó con los eluyentes siguientes: 100 mL de hexano, 200 mL de CHCl₃, 100 mL de CHCl₃:AcOEt (60:40), 100 mL de CHCl₃:AcOEt (50:50), 100 mL de CHCl₃:AcOEt (40:60), 100 mL de CHCl₃:AcOEt (30:70), 100 mL de CHCl₃:AcOEt (20:80), 300 mL de CHCl₃:AcOEt (10:90), 1100 mL de CHCl₃:AcOEt (5:95) y 1500 mL de AcOEt. La columna se lavó con 100 mL de EtOH, posteriormente se adicionaron 600 mL de MeOH y finalmente 200 mL de acetona.

En CHCl₃:AcOEt (60:40) se eluyó un compuesto denominado M3, en CHCl₃:AcOEt (30:70) eluyen en mezcla los compuestos M3 y M4, en CHCl₃:AcOEt (20:80) eluyen en mezcla los compuestos M4 y M5, en CHCl₃:AcOEt (10:90) eluyen en mezcla los compuestos M5 y M6, en CHCl₃:AcOEt (5:95) eluye el compuesto M6, en AcOEt continúa eluyendo M6 y después la mezcla de M6 con M7 para finalizar solo con M7.

3.10.2. Cromatografía en placa semipreparativa

Debido a que M5 presentaba impurezas identificadas a través de TLC expuestas a luz UV de 254 nm se procedió a purificarla utilizando cromatografía en placa semipreparativa. En una placa semipreparativa de 20x20 cm se trazó una línea recta a 2 cm de su base y posteriormente se aplicaron 7.2 mg de M5 redisueltos en 1 mL de MeOH por medio de un capilar. Después la placa se colocó en una campana de extracción para auxiliar la evaporación de la acetona utilizada para aplicar M5. Para la elución se utilizaron 150 mL de fase móvil constituida de AcOEt: EtOH: HCO₂H (78.3: 4: 1). Ésta mezcla se colocó en la cuba de elución con la finalidad de saturar la atmósfera antes de colocar la placa. Posteriormente se introdujo verticalmente la placa y la fase móvil ascendió por capilaridad. Cuando la fase móvil se encontraba a una distancia aproximada de 2 cm de la parte superior de la placa, se suspendió la elución y se retiró la placa. Para secar la placa, se colocó en una campana de extracción. Después se identificó el

compuesto de interés y se marcó con un lápiz el contorno de la superficie de la placa que contenía dicho compuesto y la porción de esa fase estacionaria se retiró cuidadosamente con una espátula. Una vez obtenida la fase estacionaria conteniendo al compuesto de interés se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se le adicionaron 20x7 mL de MeOH para extraer al compuesto y se filtró con papel Whatman No. 1 y evaporó a 40 °C a presión reducida.

3.10.3. Cristalización

El compuesto M6 obtenido de la purificación en columna flash, precipitó durante la evaporación del disolvente observándose la formación de un polvo de color amarillo. Éste polvo se filtró sobre papel Whatman No. 1 y se secó a temperatura ambiente por 12 h. El polvo seco de M6 (65.5 mg) se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 25 mL y se le adicionaron 10 mL de acetona. La mezcla se calentó hasta disolver totalmente el polvo, después se dejó enfriar, al matraz se le colocó un tapón de algodón y se almacenó durante 24 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se obtuvieron cristales de color amarillo en forma de agujas, los cuales se filtraron sobre papel Whatman No.1, se lavaron con CHCl_3 y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los cristales secos se colocaron en un vial previamente pesado y etiquetado. El rendimiento de M6 fue de 7.2% a partir del extracto de AcOEt.

El compuesto M7 (20.6 mg) se cristalizó utilizando el procedimiento de cristalización de M6. Los cristales obtenidos fueron de color amarillo en forma de agujas con rendimiento de 2.0% a partir del extracto de AcOEt.

3.11. Caracterización de los compuestos fenólicos presentes en los extractos

La caracterización de los compuestos fenólicos puros aislados se realizó mediante la adquisición de sus datos espectroscópicos de IR, RMN, el análisis e interpretación. El análisis e integración de la información proporcionada por los datos anteriores condujeron a una hipótesis estructural; la estructura de los compuestos se corroboró comparando los parámetros obtenidos con los reportados en la literatura química. Adicionalmente se determinó el punto de fusión de los compuestos puros.

3.11.1. Obtención de espectros de IR

Para la adquisición de espectros de infrarrojo se utilizó un espectrómetro de transformada de Fourier (FT-IR) Alpha Bruker con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR). El análisis se llevó a cabo en fase sólida.

3.11.2. Espectroscopía de RMN

La adquisición de los datos de RMN se llevó a cabo en los laboratorios de Química de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec bajo la supervisión del Dr. Lemuel Pérez Picaso, en el marco de una estancia de investigación financiada por CONACYT con una beca mixta.

Si los compuestos a analizar se encontraban con disolvente se procedió a evaporar éste y se dejó secar hasta asegurarse de no retener residuos de disolvente. Posteriormente dependiendo de la polaridad del compuesto, éste se disolvió en un disolvente deuterado y se colocó en un tubo de vidrio de 5 mm de diámetro, el tubo con el compuesto se insertó en el equipo de RMN de 400 MHz marca Varian a temperatura ambiente y se llevó a cabo la adquisición de datos.

Los compuestos M1 y M6, de forma independiente, se disolvieron en metanol deuterado (CD_3OD) y se realizaron experimentos de ^1H y ^{13}C , como referencia se utilizó al CD_3OD [^1H (3.31 ppm) y ^{13}C (49.15 ppm)].

El compuesto M7 se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO-d_6) y se realizaron experimentos de ^1H , ^{13}C , gHSQC y gHMBC, como referencia se utilizó al DMSO-d_6 [^1H (2.5 ppm) y ^{13}C (39.5 ppm)].

Compuesto M1 (di-(2-etilhexil) ftalato) (Fernández-Rojas, 2006). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD); 7.72 (dd, 2H, $J = 6.0, 3.6$ Hz), 7.62 (dd, 2H, $J = 6.0, 3.6$ Hz), 4.21 (dd, 4H, $J = 5.6, 2.0$ Hz), 1.68 (m, 2H), 1.47-1.28 (m, 16H), 1.0-0.86 (m, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD); 169.4, 133.7, 132.5, 130.0, 69.2, 40.30, 31.8, 30.3, 25.1, 24.2, 14.6, 11.6.

Compuesto M6 (kaempferitrina) a 49 °C (Valente *et al.*, 2009). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD); 7.78 (dd, 2H, $J = 6.8, 2.0$ Hz), 6.94 (dd, 2H, $J = 6.8, 2.0$ Hz), 6.70 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.46 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 5.56 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 5.41 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 4.22 (dd, 1H, $J =$

3.2, 1.2 Hz), 4.03 (dd, 1H, $J = 3.2, 1.6$ Hz), 3.83 (dd, 1H, $J = 9.2, 3.6$ Hz), 3.72 (dd, 1H, $J = 9.2, 3.6$ Hz), 3.62 (dq, 1H, $J = 5.6, 3.6$ Hz), 3.48 (t, 1H, $J = 9.4$, Hz), 3.37 (dq, 1H, $J = 6.0, 2.4$ Hz), 3.35 (dd, 1H, $J = 6.0, 2.8$ Hz), 1.26 (d, 3H, $J = 5.6$ Hz), 0.95 (d, 3H, $J = 5.2$ Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD); 179.9, 163.8, 163.1, 161.8, 160.0, 158.3, 136.7, 132.1, 122.7, 116.8, 107.8, 103.7, 100.8, 100.2, 95.9, 73.9, 73.5, 72.5, 72.4, 72.2, 72.1, 71.9, 71.5, 18.2, 17.8.

Compuesto M7 (3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol) (Valente *et al.*, 2009; Fraisse *et al.*, 2000). ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6); 8.20 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz), 6.89 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz), 6.83 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 6.45 (d, 1H, $J = 2.12$ Hz), 5.55 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 5.35 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz), 3.84 (ddd, 1H, $J = 1.8$ Hz), 3.75 (dt, 1H, $J = 4.7, 6.7$ Hz), 3.66 (m), 3.62 (m), 3.57 (m), 3.52 (m), 3.42 (dq, 1H, $J = 9.2, 6.3$ Hz), 3.30 (dt, 1H, $J = 9.4$ Hz), 3.20 (dd, 2H, $J = 2.4, 11.1$ Hz), 1.12 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6); 177.7, 161.6, 160.9, 160.3, 156.8, 155.9, 133.8, 131.2, 120.5, 115.3, 105.6, 101.2, 99.4, 98.3, 94.3, 71.6, 71.6, 70.8, 70.3, 70.1, 69.8, 66.1, 64.3, 17.9.

Los datos de RMN obtenidos para cada uno de los compuestos se compararon con datos reportados en la literatura científica. Cabe hacer mención que en el caso del compuesto M7 solo se encontró un artículo donde se reportan datos espectroscópicos de RMN de ^1H , Yonekura-Sakakibara *et al.* (2008), la asignación de los datos de RMN de ^{13}C se llevó a cabo por el análisis de los espectros de gHMBC y gHSQC.

3.11.3. Determinación del punto de fusión

En la platina metálica de un fusiómetro marca SEV se colocó el compuesto M6 contenido entre dos cubreobjetos limpios y se inició el calentamiento a incrementos de temperatura de entre 3 y 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$. El punto de fusión se determinó con un termómetro de mercurio registrando la temperatura inicial y final del proceso de fusión de M6. Para M7 se siguió el mismo procedimiento que para M6.

3.12. Análisis estadístico

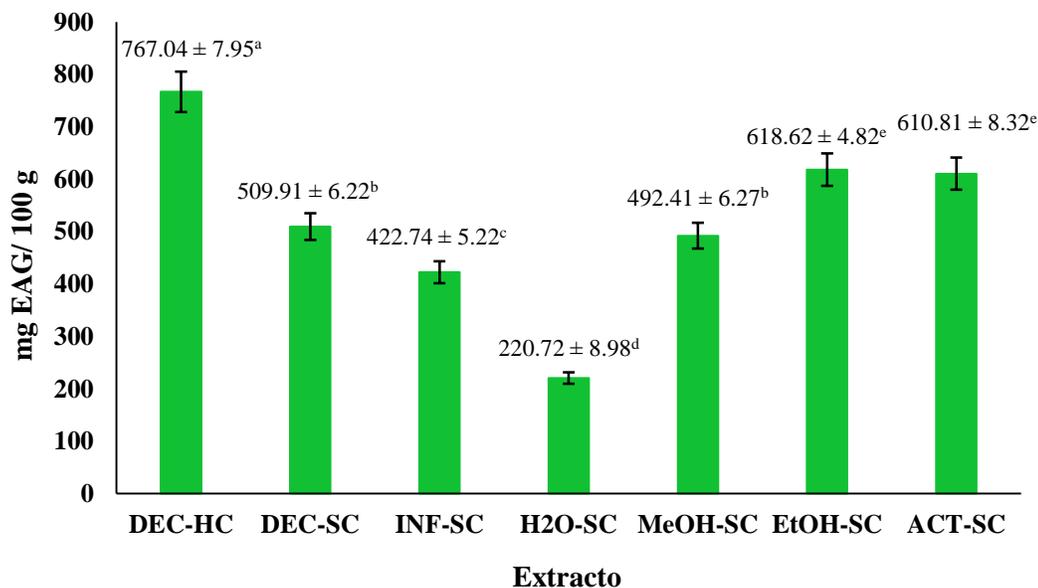
Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA. Los valores promedio obtenidos de las diferentes pruebas se analizaron mediante un comparativo de medias con un $p < 0.05$, utilizando la prueba de Duncan (Walpole *et al.*, 1999). El objetivo de este análisis consistió en determinar si existía diferencia significativa entre los valores obtenidos para cada extracto en las pruebas estudiadas. También, se llevaron a cabo correlaciones de Pearson para el contenido de fenoles totales, flavonoides totales, la actividad antidiabética expresada como IC_{50} para la α -amilasa y α -glucosidasa, así como la actividad antirradicalar frente al DPPH*. Así mismo se llevó a cabo un análisis de correlaciones por componentes principales (PCA) para determinar la relación entre las pruebas antes mencionadas. Estas correlaciones permitieron determinar interdependencias entre las actividades estudiadas. Los cálculos estadísticos se llevaron a cabo en el software SPSS Statistics de IBM®.

Capítulo 4. Resultados y Discusiones

En la presente sección se muestran los resultados y discusiones de la evaluación de la actividad antirradicalar y antidiabética de los extractos crudos y limpios de hojas de *J. spicigera*. Así como también el análisis de los datos espectroscópicos obtenidos para la elucidación estructural de los compuestos aislados.

4.1. Cuantificación de fenoles totales

Se cuantificó el contenido de fenoles totales en siete diferentes extractos crudos de *J. spicigera*. Como se puede observar en la Figura 12, el extracto de la decocción de hoja fresca (DEC-HC) posee un contenido alto de fenoles totales, 767.04 ± 7.95 mg EAG/100 g, con respecto a los otros seis extractos. Esto se debe a que la muestra al no ser procesada conserva un mayor contenido de compuestos fenólicos. Además, al realizar un análisis de los extractos DEC-SC e INF-SC, se demuestra que la decocción es un método de extracción de compuestos fenólicos de hojas de *J. spicigera* más eficiente que la infusión. También se determinó que los extractos de EtOH-SC y ACT-SC, obtenidos por ultrasonido utilizando etanol y acetona al 70% en agua respectivamente, presentan un contenido de fenoles totales de 618.62 ± 4.82 y 610.81 ± 8.32 mg EAG/100 g, Figura 12. Está demostrado que el uso de disolventes orgánicos polares mezclados con agua promueven de manera más eficiente la extracción de los compuestos fenólicos. Esto se debe a que los compuestos fenólicos tienen estructuras orgánicas con un número importante de grupos hidroxilo o fragmentos hidrofílicos, por ejemplo un azúcar, (Spigno & De Faveri, 2007).



DEC-HC, DEC-SC, Extracto por decocción de muestra húmeda y seca respectivamente. INF-SC, Extracto por infusión de muestra seca. H₂O-SC, MeOH-SC, EtOH-SC, ACT-SC, Extracto acuoso, metanol, etanol 70%, acetona 70% respectivamente, obtenidos por ultrasonido. Los datos expresados son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar. Las letras mostradas como superíndice representan los datos que son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Se realizó un ANOVA y la prueba de Duncan para el análisis estadístico.

Figura 12. Contenido de fenoles totales en extractos crudos de *J. spicigera*.

El contenido de fenoles totales del extracto EtOH-SC de *J. spicigera*, 618.62 ± 4.82 mg EAG/100 g, es seis veces mayor que el valor reportado por García-Márquez *et al.* (2012), 101.88 ± 2.42 mg EAG/100 g, para un extracto macerado de etanol al 50% de las hojas de *J. spicigera*.

Al comparar el contenido de fenoles totales del extracto metanólico de hojas de *J. spicigera* (MeOH-SC) con extractos metanólicos de hojas de otras especies de *Justicia*, se encontró que los valores obtenidos en el presente trabajo son de 13 a 16 veces superiores a los reportados por Sulaiman *et al.* (2013), Figura 13. El valor del extracto de MeOH-SC es tres veces mayor que el valor reportado para el extracto macerado de MeOH al 80% de *J. galeopsis*, 189.8 ± 4.7 mg EAG/100 g, Konan *et al.* (2014), y es de dos a seis veces mayor a los reportados para maceraciones de otras plantas antidiabéticas, Figura 14, Basar *et al.* (2013).

Lo anterior demuestra que en general la extracción asistida por ultrasonido permite extraer y conservar una cantidad mayor de compuestos fenólicos que una simple maceración.

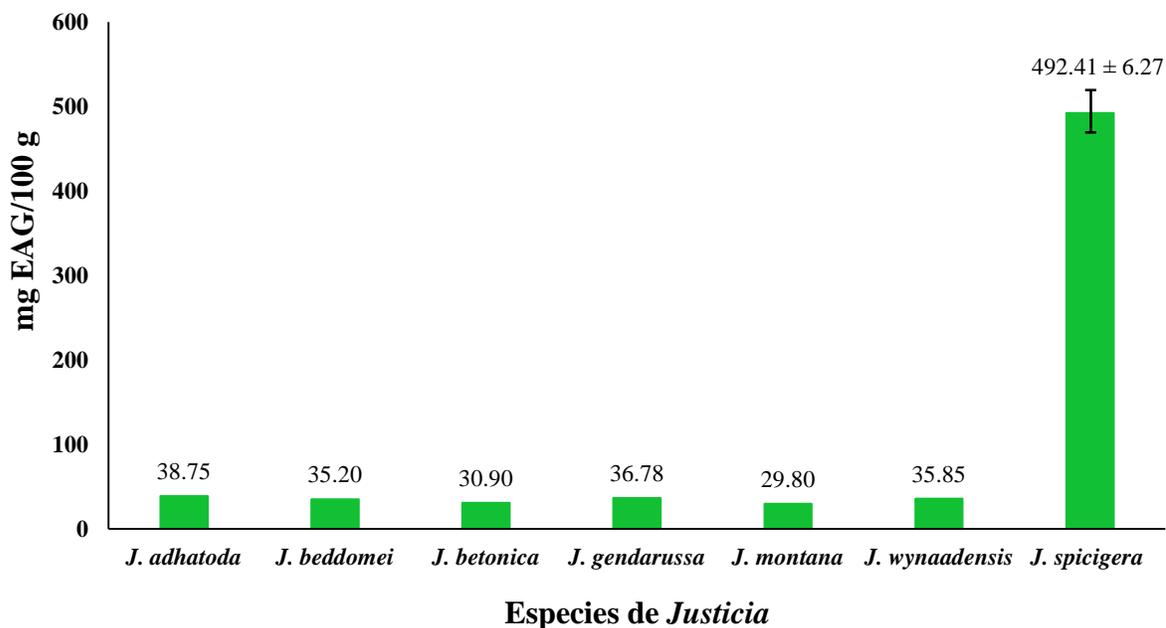


Figura 13. Comparativa del contenido de fenoles totales en hojas de especies de *Justicia*.

Nota: Los datos reportados por Sulaiman *et al.* (2013), Figura 13, no reportan valores de desviación estándar.

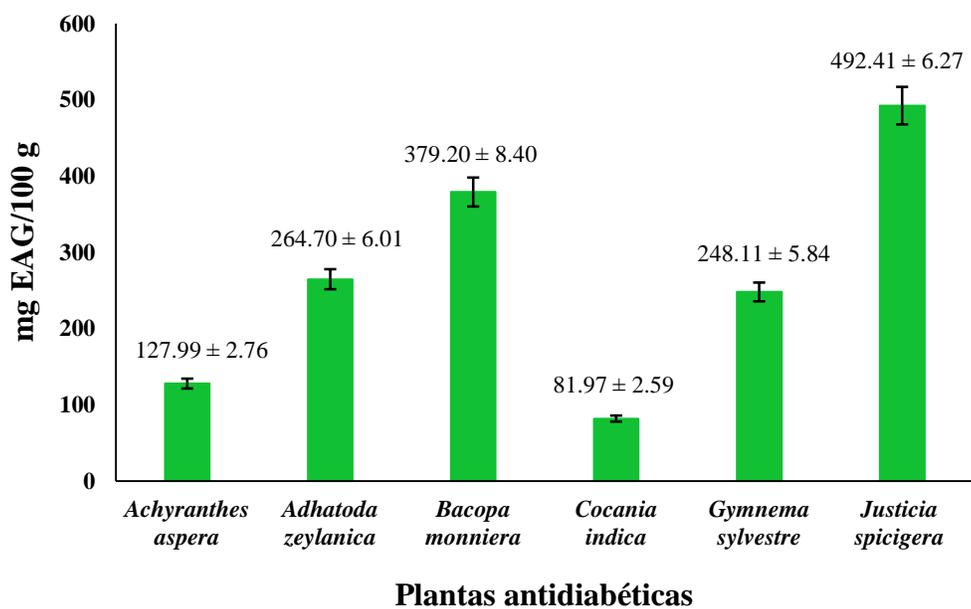
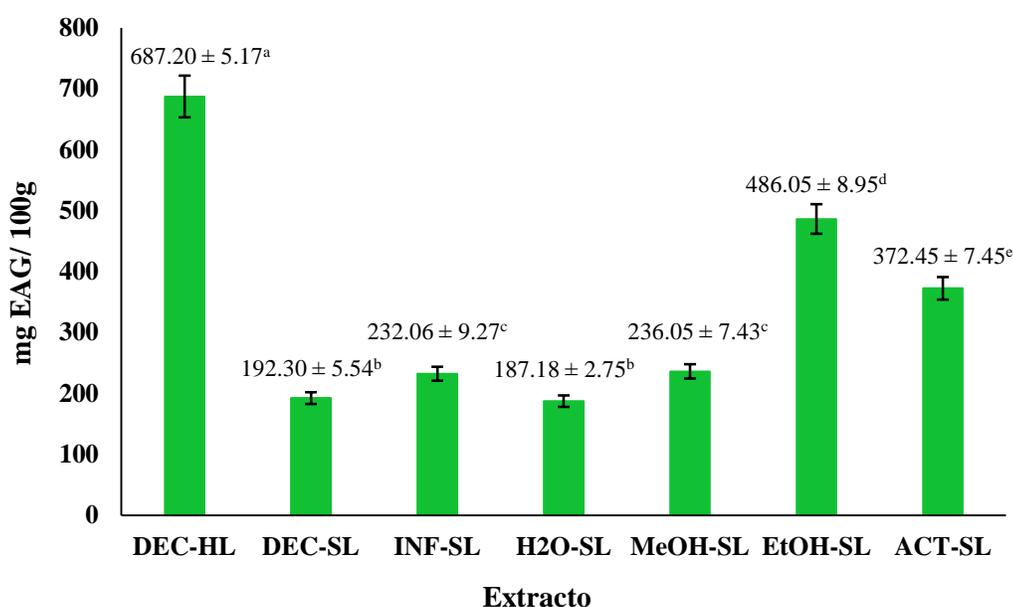


Figura 14. Contenido de fenoles totales en extractos metanólicos de hojas de plantas anti-diabéticas.

Para reducir las interferencias durante la cuantificación de flavonoides y la evaluación de la actividad antirradicalar y antidiabética en los extractos se llevó a cabo una etapa de limpieza por SPE. En la Figura 15, se presentan los resultados de la cuantificación de fenoles totales en los extractos limpios. El extracto DEC-HL posee el mayor contenido de fenoles totales, 687.20 ± 5.17 mg EAG/100 g, Figura 15, respecto al extracto crudo correspondiente, Figura 12. El extracto EtOH-SL, 486.05 ± 8.95 mg EAG/100 g, permitió la mayor conservación de compuestos fenólicos respecto a los otros extractos obtenidos a partir del polvo de *J. spicigera*.



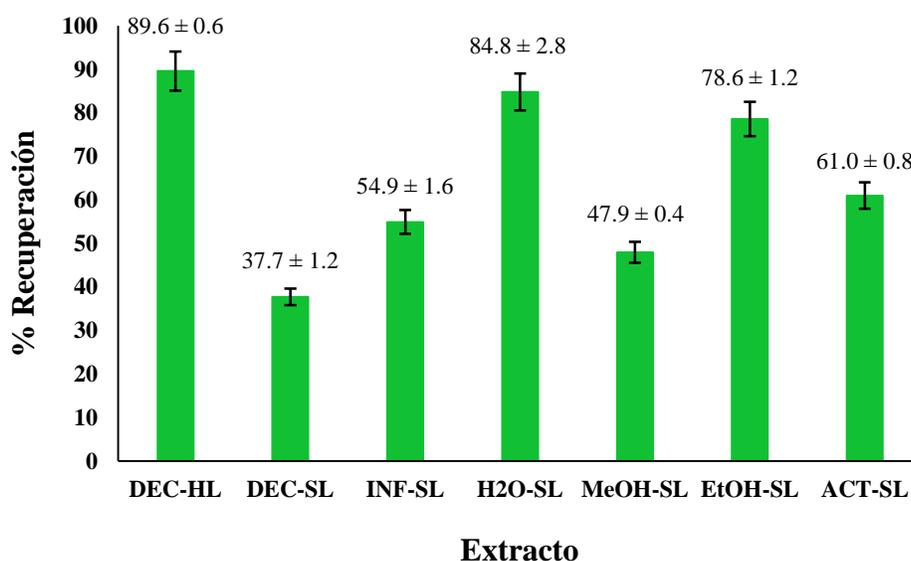
DEC-HL, DEC-SL, Extracto por decocción de muestra húmeda y seca respectivamente. INF-SL, Extracto por infusión de muestra seca. H₂O-SL, MeOH-SL, EtOH-SL, ACT-SL, Extracto acuoso, metanol, etanol 70%, acetona 70% respectivamente, obtenidos por ultrasonido. Los datos expresados son el promedio de tres mediciones \pm desviación estándar. Las letras mostradas como superíndice representan los datos que son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Se realizó un ANOVA y la prueba de Duncan para el análisis estadístico.

Figura 15. Contenido de fenoles totales de extractos limpios de *J. spicigera*.

En general, después de realizar la SPE se observa un decremento en el contenido de fenoles totales en los extractos limpios respecto a los extractos crudos, Figura 12 y Figura 15. Esta disminución se puede asociar a la polaridad de los compuestos presentes en las muestras o a la polaridad del eluyente, provocando que los compuestos fenólicos queden retenidos en el

cartucho y así mismo en algunos casos que exista una baja recuperación de estos compuestos. Este comportamiento también fue observado por Sadiki & Martin (2013), quienes realizaron un estudio de los compuestos fenólicos de la miel de maple utilizando SPE. El estudio consistió en variar las concentraciones de MeOH en el eluyente y evaluar el efecto de éste cambio de concentración sobre la recuperación de los compuestos fenólicos presentes en una muestra. Por ejemplo, los porcentajes de recuperación de catequina a concentraciones de MeOH de 0 y 20% en el eluyente fueron de 67.0 ± 12.0 a $87.0 \pm 16.0\%$.

Los porcentajes de recuperación de fenoles totales después de llevar a cabo la SPE de extractos crudos de hojas de *J. spicigera*, variaron dentro de un intervalo de 89.6 a 37.7 %. Los límites superior e inferior de éste intervalo quedaron definidos por los extractos DEC-HL y DEC-SL, respectivamente, Figura 16.



DEC-HL, DEC-SL, Extracto por decocción de muestra húmeda y seca respectivamente. INF-SL, Extracto por infusión de muestra seca. H₂O-SL, MeOH-SL, EtOH-SL, ACT-SL, Extracto acuoso, metanol, etanol 70%, acetona 70% respectivamente, obtenidos por ultrasonido. Los datos expresados son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar.

Figura 16. Porcentaje de recuperación de fenoles totales después de realizar SPE en extractos crudos de hojas de *J. spicigera*.

4.2. Cuantificación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales en los extractos de hojas de *J. spicigera* se llevó a cabo midiendo la absorbancia del complejo flavonoide-nitrito- AlCl_3 a tres distintas longitudes de onda, $\lambda = 405, 490$ y 515 nm. Estas longitudes de onda se han reportado en la literatura para cuantificar flavonoides totales en extractos. Sin embargo, no se tenía conocimiento sobre el efecto de esta variación en la cuantificación de los compuestos antes señalados. Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó un estudio para determinar en primer lugar si existía algún cambio significativo atribuido a la variación de la longitud de onda. Cabe hacer mención que también se evaluó el efecto del estándar, para ello se utilizaron dos flavonoides, la quercetina y la catequina. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17 y Figura 18. En la Figura 18 se puede apreciar que sobre todo cuando se utiliza catequina como estándar, se presenta una variación significativa en los valores de flavonoides totales. En esa misma figura se observa que a 515 nm se presentan los valores más pequeños, independientemente del extracto utilizado. Este mismo comportamiento se observa cuando se utiliza como estándar quercetina, Figura 17.

El extracto DEC-HL posee el mayor contenido de flavonoides totales en comparación con los otros seis extractos utilizando como estándar quercetina y catequina, Figura 17 y Figura 18. Comparando los resultados para la decocción e infusión del polvo, se puede observar que para las tres longitudes de onda la infusión presenta un contenido alto de flavonoides respecto a la decocción. Este resultado se debe a que la infusión es un método de extracción menos severo que la decocción. De los extractos obtenidos por ultrasonido, el extracto EtOH-SL presentó el mayor contenido de flavonoides totales a las tres distintas longitudes de onda tanto para quercetina como para catequina.

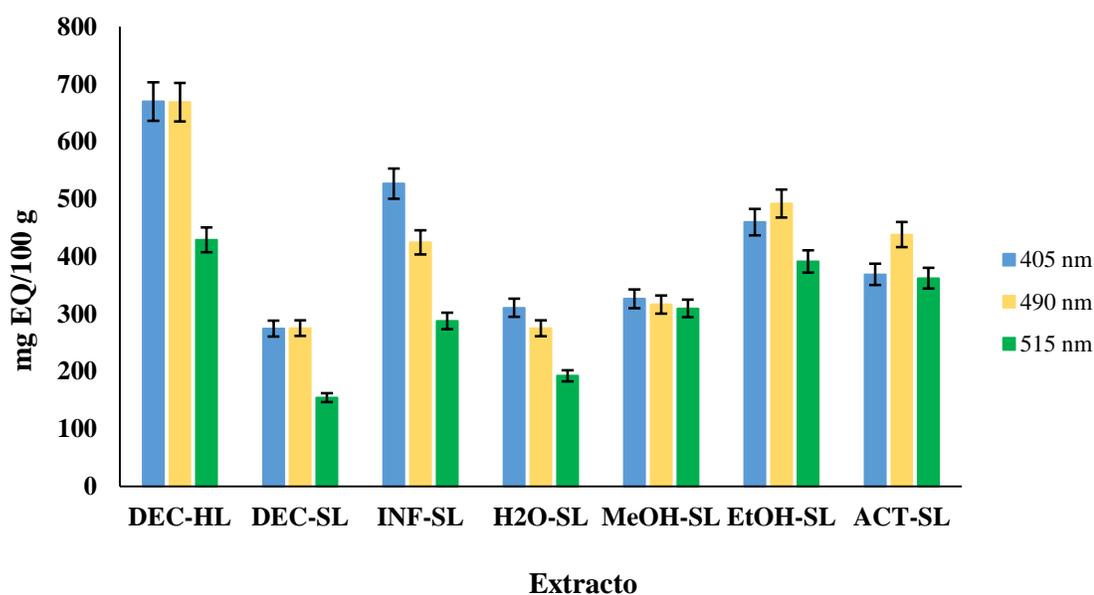
El coeficiente de correlación de Pearson, indica la relación lineal que existe entre dos variables a analizar (Fenoles/Flavonoides). El intervalo de este valor varía de $+1$ a -1 , indicando a esos valores una perfecta relación lineal positiva y negativa respectivamente entre las variables estudiadas. Al realizar la correlación de Pearson del contenido de fenoles totales vs flavonoides totales para el conjunto de valores de cada longitud de onda, se obtuvo una correlación de 0.95 y 0.96 a 490 nm para quercetina y catequina, respectivamente, Tabla 10. Esto indica que

independientemente del estándar utilizado, ésta longitud de onda es adecuada para reportar el contenido de flavonoides totales para extractos de hojas de *J. spicigera*.

Tabla 10. Correlación de Pearson entre fenoles y flavonoides.

Absorbancia @ λ	Correlación Fenoles/Flavonoides	
nm	(mg EAG ^a *100 g ⁻¹)/ (mg EQ ^b *100 g ⁻¹)	(mg EAG ^a *100 g ⁻¹)/ (mg EC ^c *100 g ⁻¹)
405	0.77	0.61
490	0.95	0.96
515	0.84	0.84

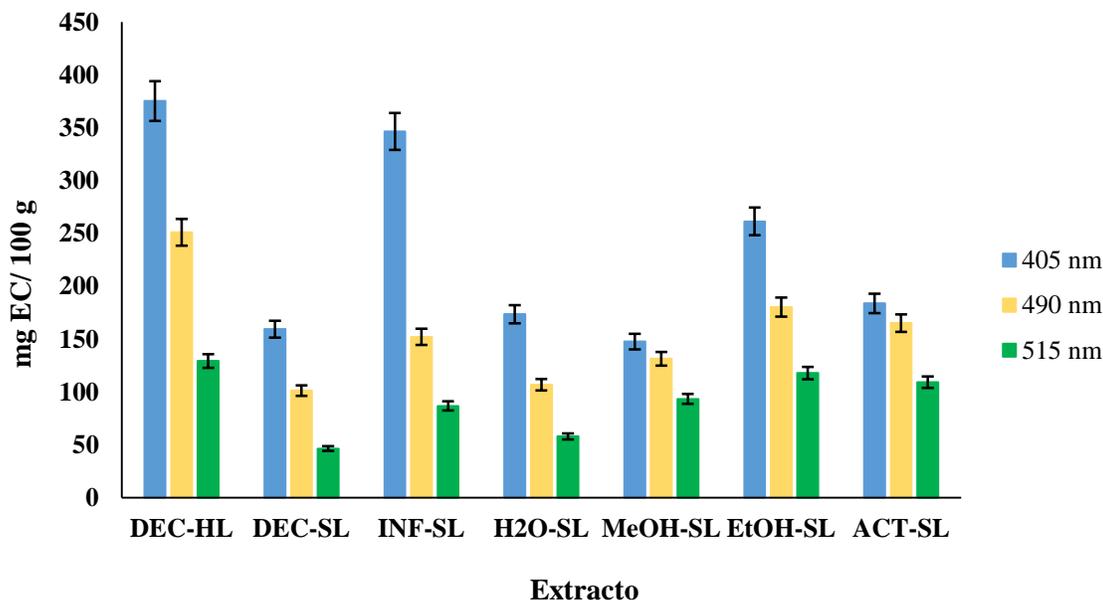
^aEAG, Equivalentes de ácido gálico. ^bEQ, Equivalentes de quercetina.
^cEC, Equivalentes de catequina.



λ (nm)	DEC-HL	DEC-SL	INF-SL	H ₂ O-SL	MeOH-SL	EtOH-SL	ACT-SL
■ 405	669.85 ± 8.32 ^a	274.59 ± 5.54 ^b	526.95 ± 5.87 ^c	310.76 ± 5.47 ^d	326.40 ± 5.18 ^d	459.75 ± 8.92 ^e	368.80 ± 5.99 ^f
■ 490	668.65 ± 9.24 ^a	275.27 ± 8.21 ^b	424.63 ± 8.22 ^c	275.10 ± 5.83 ^b	316.35 ± 7.64 ^d	492.15 ± 5.77 ^e	438.00 ± 9.13 ^c
■ 515	428.90 ± 9.24 ^a	154.12 ± 4.51 ^b	287.75 ± 7.03 ^c	192.27 ± 4.81 ^d	309.65 ± 6.26 ^e	391.25 ± 6.79 ^f	362.25 ± 8.04 ^g

DEC-HL, DEC-SL, Extracto por decocción de muestra húmeda y seca respectivamente. INF-SL, Extracto por infusión de muestra seca. H₂O-SL, MeOH-SL, EtOH-SL, ACT-SL, Extracto acuoso, metanol, etanol 70%, acetona 70% respectivamente, obtenidos por ultrasonido. Los datos expresados son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar. Las letras mostradas como superíndice para cada fila representan los datos que son significativamente diferentes (p<0.05). Se realizó un ANOVA y la prueba de Duncan para el análisis estadístico.

Figura 17. Flavonoides totales de la suma de fracciones en equivalentes de quercetina de las hojas de *J. spicigera*.



λ (nm)	DEC-HL	DEC-SL	INF-SL	H ₂ O-SL	MeOH-SL	EtOH-SL	ACT-SL
■ 405	375.35 ± 9.74 ^a	159.54 ± 4.72 ^b	346.58 ± 4.95 ^c	173.60 ± 4.66 ^d	147.80 ± 4.41 ^b	261.40 ± 7.60 ^e	183.95 ± 5.10 ^d
■ 490	251.15 ± 8.05 ^a	101.37 ± 2.28 ^b	152.20 ± 4.05 ^c	106.94 ± 1.62 ^b	131.46 ± 2.12 ^d	180.31 ± 4.24 ^e	165.21 ± 4.39 ^f
■ 515	129.40 ± 3.07 ^a	46.50 ± 1.36 ^b	86.75 ± 3.17 ^c	58.01 ± 1.45 ^d	93.35 ± 1.89 ^e	118.00 ± 3.67 ^f	109.25 ± 3.67 ^g

DEC-HL, DEC-SL, Extracto por decocción de muestra húmeda y seca respectivamente. INF-SL, Extracto por infusión de muestra seca. H₂O-SL, MeOH-SL, EtOH-SL, ACT-SL, Extracto acuoso, metanol, etanol 70%, acetona 70% respectivamente, obtenidos por ultrasonido. Los datos expresados son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar. Las letras mostradas como superíndice para cada fila representan los datos que son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Se realizó un ANOVA y la prueba de Duncan para el análisis estadístico.

Figura 18. Flavonoides totales de la suma de fracciones en equivalentes de catequina de las hojas de *J. spicigera*.

El extracto metanólico (MeOH-SL) de *Justicia spicigera* presentó un contenido de flavonoides totales de 309.65 ± 6.26 mg EQ/100 g a 515 nm el cual es 100 veces mayor que el reportado por extractos metanólicos obtenidos por extracción Soxhlet de hojas secas de *J. adhatoda*, *J. deddomei*, *J. betonica*, *J. gendarussa*, *J. montana*, *J. wynaadensis*, con un contenido de flavonoides totales de 2.80, 2.80, 2.86, 2.40, 1.89 y 2.85 mg EQ/100 g respectivamente, a una longitud de onda de 510 nm, Sulaiman *et al.* (2013). Esta misma tendencia también se observa con extracciones que utilizan otros disolventes, tales como agua, Krishna *et al.* (2009). La extracción por Soxhlet requiere periodos largos de extracción, superiores a las seis horas y temperaturas de ebullición del disolvente correspondiente lo cual puede conllevar a la degradación de algunos compuestos fenólicos, Wang & Weller (2006).

Al realizar un comparativo del contenido de flavonoides totales del extracto MeOH-SL calculado a 515 nm y utilizando como estándar catequina, con extractos macerados de hojas de otras plantas antidiabéticas a 510 nm (*A. aspera*, *A. zeylanica*, *C. indica* y *G. sylvestre*), Figura 19, se observó que con excepción de los extractos de *G. sylvestre* en general los extractos de *J. spicigera* contienen una mayor cantidad de flavonoides totales, Basar *et al.* (2013).

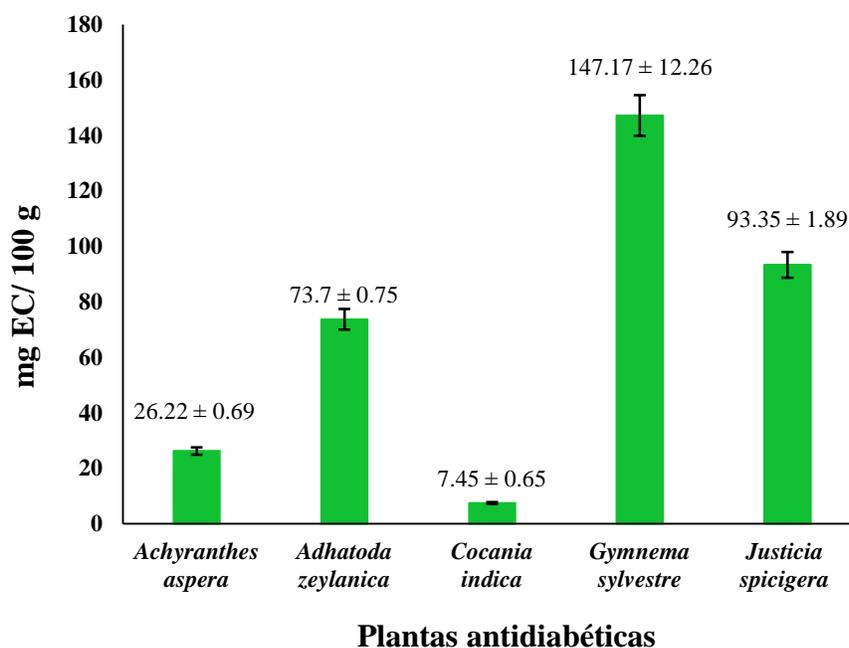


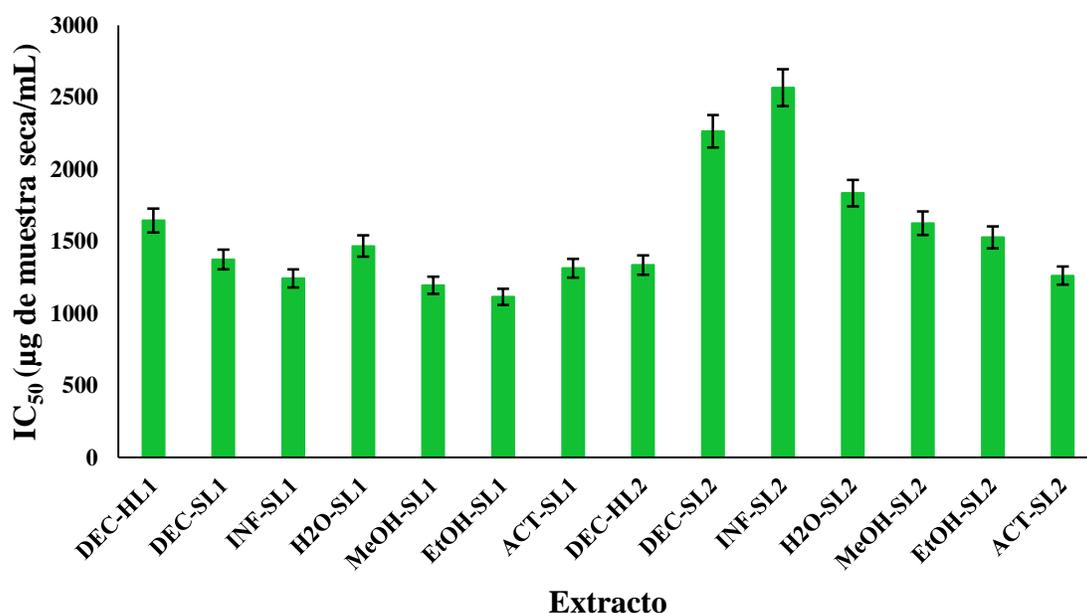
Figura 19. Extractos metanólicos de hojas de plantas antidiabéticas.

En el presente proyecto se determinó a través de una correlación de Pearson para extractos de *J. spicigera* que a una longitud de onda de 490 nm es adecuado reportar el contenido de flavonoides totales independientemente del estándar utilizado.

4.3. Evaluación de la actividad antirradicalar

Como se puede observar en la Figura 20, en general los extractos de la fracción H₂O presentan una actividad antirradicalar alta respecto a la fracción MeOH/H₂O. El extracto EtOH-SL1 presentó el valor más bajo de IC₅₀, 1115.00 ± 3.43 µg de muestra seca (ms)/mL e indica que tiene la mejor actividad antirradicalar de todos los otros extractos estudiados. Los extractos obtenidos por ultrasonido a partir del polvo de las hojas de *J. spicigera* muestran valores de IC₅₀

bajos para ambas fracciones en comparación con la decocción e infusión obtenidos a partir del polvo. Los extractos INF-SL2 y DEC-SL2 con un IC₅₀ de 2567.00 ± 86.22 y 2264.00 ± 93.40 µg ms/mL respectivamente, presentaron los valores más altos, esto indica que poseen la menor actividad antirradicalar que el resto de los extractos. Se puede observar en la Figura 20 que el método de extracción así como el disolvente influyen en la actividad antirradicalar de un extracto. Los extractos obtenidos por ultrasonido y que recibieron una etapa de limpieza por SPE mediante elución con agua en general presentaron una buena actividad antirradicalar.



DEC-HL1	1645.00 ± 64.28 ^a	DEC-SL1	1375.00 ± 28.85 ^b	EtOH-SL1	1115.00 ± 3.43 ^e
DEC-HL2	1336.00 ± 22.80 ^d	DEC-SL2	2264.00 ± 93.40 ^e	EtOH-SL2	1528.00 ± 55.99 ^f
INF-SL1	1243.00 ± 56.75 ^g	H2O-SL1	1468.00 ± 57.98 ^h	ACT-SL1	1314.00 ± 52.04 ⁱ
INF-SL2	2567.00 ± 86.22 ^j	H2O-SL2	1835.00 ± 67.45 ^k	ACT-SL2	1262.00 ± 22.56 ^l
MeOH-SL1	1195.00 ± 21.88 ^m	MeOH-SL2	1626.00 ± 12.76 ⁿ		

DEC-HL1, DEC-HL2, Extracto por decocción de muestra húmeda, fracción H₂O y MeOH/H₂O. DEC-SL1, DEC-SL2, Extracto por decocción de muestra seca, fracción H₂O y MeOH/H₂O. INF-SL1, INF-SL2, Extracto por infusión de muestra seca, fracción H₂O y MeOH/H₂O. H₂O-SL1, H₂O-SL2, Extracto acuoso por ultrasonido, fracción H₂O y MeOH/H₂O. MeOH-SL1, MeOH-SL2, Extracto de metanol por ultrasonido, fracción H₂O y MeOH/H₂O. EtOH-SL1, EtOH-SL2, Extracto de etanol por ultrasonido al 70%, fracción H₂O y MeOH/H₂O. ACT-SL1, ACT-SL2, Extracto de acetona por ultrasonido al 70%, fracción H₂O y MeOH/H₂O. Los datos expresados son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar. Las letras mostradas como superíndice representan los datos que son significativamente diferentes (p<0.05). Se usó un ANOVA y la prueba de Duncan para el análisis estadístico.

Figura 20. IC₅₀ de las fracciones de los extractos limpios de *J. spicigera*.

Para calcular la eficiencia antirradicalar se llevaron a cabo la cinéticas que permitieron conocer el tiempo necesario para alcanzar el estado estable (T_{EC50}) para cada una de las fracciones de los extractos de *J. spicigera*, Apéndice 9. En general los extractos presentan valores de T_{EC50} en un intervalo de 11 a 46 min, estos valores son menores al BHT, 115 min, utilizado como control. El extracto H₂O-SL1 presentó el valor de T_{EC50} más bajo, 11 min, en comparación con los otros extractos. La fracción H₂O de los extractos DEC-HL1 y DEC-SL1 presentaron valores de T_{EC50} más bajos, 35 y 15 min respectivamente, que el extracto de INF-SL1, 46 min. En general los extractos obtenidos por ultrasonido, Apéndice 9, presentan tiempos menores a los 30 min, esto puede estar asociado a la variación estructural que presentan los compuestos fenólicos en los distintos extractos, producto de las condiciones de extracción, polaridad del disolvente, uso del ultrasonido así como temperatura y tiempos de extracción.

En la Tabla 11 se muestra el valor de T_{EC50} para cada uno los extractos, así como su eficiencia antirradicalar (AE) expresada en kg de DPPH'/kg muestra seca (ms)*min. Se puede observar que a pesar de que un extracto posea un T_{EC50} pequeño no necesariamente indica que tenga una eficiencia antirradicalar alta. Los extractos H₂O-SL1 y EtOH-SL1 muestran una eficiencia antirradicalar alta respecto a los otros extractos. De acuerdo a la clasificación reportada por Gramza *et al.* (2005) para la eficiencia antirradicalar, el extracto H₂O-SL1 presenta una AE moderada, y para el resto de los extractos se consideran que poseen una AE baja.

Los extractos limpios MeOH-SL1 y MeOH-SL2 de *J. spicigera* presentaron valores de IC_{50} de 59.75 y 82.30 kg ms/kg DPPH' respectivamente. Estos valores son altos respecto a los reportados por Marathakam *et al.* (2012), IC_{50} de 40.05 kg ms/kg DPPH', para el extracto metanólico de la parte aérea de *J. beddomei*. Sin embargo el IC_{50} de MeOH-SL1 y MeOH-SL2 son dos veces menores al reportado por Chandrashekar & Bhagya (2013), IC_{50} de 150.0 kg ms/kg DPPH', para el extracto metanólico de las hojas de *J. gendarusa*.

Los extractos EtOH-SL1 y EtOH-SL2 de *J. spicigera* presentaron valores de IC_{50} de 55.75 y 76.40 kg ms/kg DPPH', respectivamente. Estos valores son tres y dos veces menores a los reportados por Chandrashekar & Bhagya (2013), IC_{50} de 145.5 kg ms/kg DPPH', para el extracto etanólico de las hojas de *J. gendarusa*.

Tabla 11. T_{EC50} y eficiencia antirradicalar (AE) de los extractos de *J. spicigera*.

Extracto	IC ₅₀ (kg ms/kg DPPH')	T _{EC50} (min)	AE (x10 ⁻³) (kg DPPH'/kg ms*min)
DEC-HL1	82.25	35	0.35
DEC-HL2	66.80	22	0.68
DEC-SL1	68.75	15	0.97
DEC-SL2	113.20	33	0.27
INF-SL1	62.15	46	0.35
INF-SL2	128.35	20	0.39
H₂O-SL1	73.40	11	1.24
H₂O-SL2	78.55	22	0.58
MeOH-SL1	59.75	18	0.93
MeOH-SL2	82.30	16	0.67
EtOH-SL1	55.75	18	1.12
EtOH-SL2	76.40	28	0.47
ACT-SL1	65.70	23	0.66
ACT-SL2	63.10	28	0.57
BHT	1.42	115	6.12

DEC-HL1, DEC-HL2, Extracto por decocción de muestra húmeda, fracción H₂O y MeOH/H₂O. DEC-SL1, DEC-SL2, Extracto por decocción de muestra seca, fracción H₂O y MeOH/H₂O. INF-SL1, INF-SL2, Extracto por infusión de muestra seca, fracción H₂O y MeOH/H₂O. H₂O-SL1, H₂O-SL2, Extracto acuoso por ultrasonido, fracción H₂O y MeOH/H₂O. MeOH-SL1, MeOH-SL2, Extracto de metanol por ultrasonido, fracción H₂O y MeOH/H₂O. EtOH-SL1, EtOH-SL2, Extracto de etanol por ultrasonido al 70%, fracción H₂O y MeOH/H₂O. ACT-SL1, ACT-SL2, Extracto de acetona por ultrasonido al 70%, fracción H₂O y MeOH/H₂O.

Los extractos de MeOH-SL1 y MeOH-SL2 de *J. spicigera* presentaron valores de T_{EC50} de 18 y 16 min respectivamente. Estos valores de T_{EC50} son dos veces menores a los reportados por Kumar *et al.* (2014) para el extracto metanólico de las hojas de *J. adhatoda*, T_{EC50} de 40 min.

Los extractos de *J. spicigera*, H₂O-SL1 y H₂O-SL2 presentan valores de T_{EC50} de 11 y 22 min respectivamente, estos valores son similares a los reportados por Gramza *et al.* (2005) para extractos acuosos de extractos de té negro y verde, T_{EC50} de 21.3 y 15.3 min respectivamente. Así mismo los extractos de EtOH-SL1 y EtOH-SL2 de *J. spicigera* presentaron valores de T_{EC50} de 18 y 28 min respectivamente, estos valores también son similares a los reportados por Gramza *et al.* (2005) para extractos de etanol al 95% de extractos de té negro y verde, T_{EC50} de 19.0 y 20.3 min respectivamente Cabe hacer mención que se ha reportado que los extractos de éstos tes presentan una actividad antirradicalar alta.

4.4. Evaluación de la actividad antidiabética *in vitro*

Generalmente la actividad antidiabética *in vitro* para α -amilasa y α -glucosidasa se expresa como porcentaje de inhibición, y de manera más limitada se ha utilizado la concentración de extracto necesaria para inhibir en un 50% la actividad de la enzima (IC_{50}). También no está bien establecido un método para llevar a cabo estas pruebas debido a que existen ciertas diferencias en el procedimiento tal como la longitud de onda utilizada para la determinación de la absorbancia, el origen de la enzima, las cantidades adicionadas de los reactivos, los tiempos entre cada reacción, el orden de los reactivos, la temperatura, entre otros. Cabe resaltar que en este estudio se llevaron a cabo diversos experimentos para encontrar las condiciones (temperatura, concentración de enzima, sustrato e inhibidor) de reacción de las enzimas. Así mismo, se realizó una adaptación de la reacción enzimática a un lector de microplacas y para determinar la confiabilidad del método adaptado y se utilizó como control positivo a la acarbosa. Los valores de IC_{50} obtenidos para la acarbosa se compararon con valores reportados en la literatura.

4.4.1. Inhibición de la α -amilasa en presencia de los extractos

Cabe resaltar que en la literatura no se han reportado estudios en el género *Justicia* relacionados con la actividad antidiabética *in vitro* utilizando pruebas de inhibición de la enzima α -amilasa. Por lo tanto en la presente sección se hacen comparativos de los resultados obtenidos con valores reportados para algunas especies de plantas que presentan actividad antidiabética.

Los porcentajes de inhibición para los extractos a diferentes concentraciones, Tabla 12, se encuentran en un intervalo del 28 al 84%. Así mismo estos extractos presentan valores de IC_{50} altos respecto a la acarbosa.

Los extractos EtOH-SL1 e INF-SL1, que presentaron valores de IC_{50} de 221.39 ± 1.59 y 225.98 ± 2.57 ppm respectivamente, fueron los extractos de mayor actividad de todos los extractos estudiados.

Los porcentajes de inhibición de la enzima α -amilasa que presentaron los extractos metanólicos MeOH-SL1 y MeOH-SL2 a concentraciones en un intervalo de 100 a 500 ppm para

J. spicigera son de 31.4 a 77.9 y de 29.9 a 74.1%, respectivamente. Estos porcentajes son similares, 55.8 a 75.6%, a los reportados por Alejandro-Espinoza *et al.* (2013), a ese mismo intervalo de concentración para extractos metanólicos de las hojas de *Oreocallis grandiflora*. Los extractos MeOH-SL1 y MeOH-SL2 poseen un IC₅₀ de 246.01 ± 3.87 y 263.38 ± 1.56 ppm, respectivamente. Estos valores son diez veces menores a los reportados por Ramachandran & Rajasekaran (2014), para extractos metanólicos de las flores de *Tectona grandis*, 2240 ppm. Esta planta se utiliza en India para tratar la diabetes y se han reportado estudios de su actividad antidiabética *in vivo* e *in vitro*, Ramachandran & Rajasekaran (2014).

Tabla 12. IC₅₀ de extractos limpios de *J. spicigera*.

	% Inhibición	IC ₅₀ (ppm)
Acarbosa	24.5 – 62.4*	138.03 ± 1.28
DEC-HL1	35.2 – 77.9	238.69 ± 3.19 ^d
DEC-SL1	30.3 – 76.5	261.98 ± 1.96 ^g
INF-SL1	37.0 – 77.9	225.98 ± 2.57 ^{a,h}
H₂O-SL1	28.2 – 80.7	250.62 ± 3.50 ^{b,e}
ACT-SL1	35.3 – 76.4	254.58 ± 3.25 ^e
EtOH-SL1	35.3 – 82.1	221.39 ± 1.59 ^a
MeOH-SL1	31.4 – 77.9	246.01 ± 3.87 ^b
DEC-HL2	38.2 – 75.7	231.41 ± 3.29 ^{e,f}
DEC-SL2	32.9 – 76.7	239.68 ± 2.98 ^d
INF-SL2	32.2 – 76.6	263.94 ± 3.21 ^g
H₂O-SL2	33.6 – 72.1	252.76 ± 3.01 ^e
ACT-SL2	32.8 – 82.2	235.65 ± 2.73 ^{d,f}
EtOH-SL2	32.9 – 83.7	230.31 ± 2.90 ^{c,h}
MeOH-SL2	29.9 – 74.1	263.38 ± 1.56 ^g

*Acarbosa a concentraciones de 25 a 200 ppm. Todos los extractos a concentraciones de 100 a 500 ppm. Acarbosa, IC₅₀ = 112.90 ± 1.31 ppm, Sivashanmugan & Chatterjee (2013). DEC-SL1, DEC-SL2, Extracto por decocción de muestra húmeda, fracción H₂O y MeOH/H₂O. DEC-SL1, DEC-SL2, Extracto por decocción de muestra seca, fracción H₂O y MeOH/H₂O. INF-SL1, INF-SL2, Extracto por infusión de muestra seca, fracción H₂O y MeOH/H₂O. H₂O-SL1, H₂O-SL2, Extracto acuoso por ultrasonido, fracción H₂O y MeOH/H₂O. MeOH-SL1, MeOH-SL2, Extracto de metanol por ultrasonido, fracción H₂O y MeOH/H₂O. EtOH-SL1, EtOH-SL2, Extracto de etanol por ultrasonido al 70%, fracción H₂O y MeOH/H₂O. ACT-SL1, ACT-SL2, Extracto de acetona por ultrasonido al 70%, fracción H₂O y MeOH/H₂O. Los datos expresados son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar. Las letras mostradas como superíndice para la columna de IC₅₀ representan los datos que son significativamente diferentes (p<0.05). Se realizó un ANOVA y la prueba de Duncan para el análisis estadístico.

Los porcentajes de inhibición de los extractos H₂O-SL1 y H₂O-SL2 para *J. spicigera* a 100 ppm son altos, 28.2 y 33.6% respectivamente, en comparación con los reportados por Orhan *et al.* (2013), 18.9%, para extractos acuosos de *Cistus laurifolius*. Esta planta con propiedades antidiabéticas se utiliza en la medicina tradicional de Turquía.

Los extractos de EtOH al 70%, EtOH-SL1 y EtOH-SL2 de *J. spicigera* a una concentración de 100 pm presentan porcentajes de inhibición de la α -amilasa de 35.3 y 32.9% respectivamente. Estos porcentajes de inhibición son superiores a los reportados por Lordan *et al.* (2013), para tres algas utilizadas contra la diabetes procedentes de Irlanda. Los porcentajes de inhibición a una concentración de 100 ppm de extractos de etanol al 80% para estas tres algas fueron *Ascophyllum nodosum*, 16%, *Fucus serratus*, 26% y *Pelvetia canaliculata*, 17%.

En general los extractos obtenidos a partir de hojas de *J. spicigera* presentaron un intervalo de porcentajes de inhibición amplio con valores superiores a los reportados para plantas antidiabéticas de distintas partes del mundo.

4.4.2. Inhibición de la α -glucosidasa en presencia de los extractos

En el presente proyecto se muestran los resultados obtenidos de la inhibición de la α -glucosidasa en presencia de extractos de hojas de *J. spicigera*, así la inhición de esta enzima respecto a otras plantas antidiabéticas.

Los porcentajes de inhibición para los extractos, Tabla 13, se encuentran en un intervalo de 31 al 94%. Los extractos presentan una buena inhibición enzimática en comparación con el control.

Los valores de IC₅₀ de algunos extractos reportados en la Tabla 13 son menores a los obtenidos para la acarbosa utilizada como control. Esto indica que los extractos de *J. spicigera* presentan una buena actividad para inhibir a la enzima. Los extractos con mayor actividad antidiabética expresada como IC₅₀ para inhibir a la α -glucosidasa son EtOH-SL1, EtOH-SL2 y DEC-HL2, 115.72 ± 4.52 , 105.71 ± 3.52 y 111.42 ± 4.56 ppm respectivamente. Los extractos de etanol al 70%, EtOH-SL1 y EtOH-SL2, provenientes de los polvos de las hojas secas de *J. spicigera*, tienen buena actividad tanto por inhibir a la α -amilasa como a la α -glucosidasa. Cabe

hacer mención que estos extractos tienen el mayor contenido de compuestos fenólicos, Figura 15.

Tabla 13. IC₅₀ de extractos limpios de *J. spicigera*.

	% Inhibición	IC ₅₀ (ppm)
Acarbosa	28.5 – 85.5*	157.96 ± 1.96
DEC-HL1	44.8 – 87.9	140.32 ± 3.20 ^{c,d}
DEC-SL1	39.1 – 88.7	172.01 ± 4.90 ⁱ
INF-SL1	45.7 – 85.6	134.38 ± 5.64 ^c
H₂O-SL1	42.7 – 89.4	164.87 ± 3.62 ^{g,h}
ACT-SL1	44.2 – 88.3	147.88 ± 2.34 ^{e,f}
EtOH-SL1	47.3 – 92.3	115.72 ± 4.52 ^b
MeOH-SL1	42.0 – 90.8	155.01 ± 2.19 ^{f,g}
DEC-HL2	49.6 – 90.6	111.42 ± 4.56 ^{a,b}
DEC-SL2	45.2 – 91.8	142.43 ± 4.26 ^{d,e}
INF-SL2	36.4 – 92.8	174.62 ± 4.81 ⁱ
H₂O-SL2	31.2 – 88.2	181.28 ± 4.65 ⁱ
ACT-SL2	41.8 – 93.6	153.41 ± 4.38 ^f
EtOH-SL2	49.5 – 93.5	105.71 ± 3.52 ^a
MeOH-SL2	43.7 – 82.6	167.2 ± 5.69 ^h

*Acarbosa a concentraciones de 50 a 800 ppm. Todos los extractos a concentraciones de 100 a 500 ppm. Acarbosa, IC₅₀ = 159.28 ± 0.69 ppm, Sivashanmugan & Chatterjee (2013). DEC-HL1, DEC-HL2, Extracto por decocción de muestra húmeda, fracción H₂O y MeOH/H₂O. DEC-SL1, DEC-SL2, Extracto por decocción de muestra seca, fracción H₂O y MeOH/H₂O. INF1-SL, INF-SL2, Extracto por infusión de muestra seca, fracción H₂O y MeOH/H₂O. H₂O-SL1, H₂O-SL2, Extracto acuoso por ultrasonido, fracción H₂O y MeOH/H₂O. MeOH-SL1, MeOH-SL2, Extracto de metanol por ultrasonido, fracción H₂O y MeOH/H₂O. EtOH-SL1, EtOH-SL2, Extracto de etanol por ultrasonido al 70%, fracción H₂O y MeOH/H₂O. ACT-SL1, ACT-SL2, Extracto de acetona por ultrasonido al 70%, fracción H₂O y MeOH/H₂O. Los datos expresados son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar. Las letras mostradas para la columna de IC₅₀ representan los datos que son significativamente diferentes (p<0.05). Se realizó un ANOVA y la prueba de Duncan para el análisis estadístico.

Los extractos DEC-SL1, INF-SL2 y H₂O-SL2 presentaron los valores de IC₅₀ más altos y en consecuencia la actividad antidiabética más baja frente a la α-glucosidasa en comparación con los otros extractos. Tanto el disolvente como el método de extracción influyen sobre la actividad antidiabética ejercida por los extractos.

Los extractos de EtOH-SL1 y EtOH-SL2 de *J. spicigera* presentaron valores de IC₅₀ de 115.72 ± 4.52 y 105.71 ± 3.52 ppm, respectivamente. Estos valores son aproximadamente cinco veces menores a los reportados por Lawag *et al.* (2012), para el extracto de etanol al 80% de hojas de *Averrhoa bilimbi* Linn, 519.86 ± 3.07 ppm, planta utilizada para el tratamiento de la

diabetes en la medicina tradicional de Filipinas. Estos extractos (EtOH-SL1 y EtOH-SL2) a 100 ppm presentan porcentajes de inhibición de 47.3 y 49.5%, respectivamente, los cuales son superiores al 31.3% reportado por Sivashanmugam & Chatterjee (2013), para el extracto macerado de etanol de las hojas de *Polyalthia longifolia*. Esta es una planta nativa de India y se utiliza tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes.

A una concentración de 100 ppm los extractos metanólicos (MeOH-SL1 y MeOH-SL2) de *J. spicigera*, presentan 42.0 y 43.7% de inhibición respectivamente. Alejandro-Espinoza *et al.* (2013), reportaron un 99.6% de inhibición del extracto metanólico de *Oreocallis grandifolia* a esa misma concentración. Esta planta presenta una actividad antidiabética alta *in vitro*. Los extractos de MeOH-SL1 y MeOH-SL2 presentaron valores de IC₅₀ de 155.01 ± 2.19 y 167.20 ± 5.69 ppm, respectivamente. Estos valores son tres veces menores que los reportados por Christudas *et al.* (2013), 480.20 ± 2.37 ppm, para extractos metanólicos de la parte aérea de *Hedyotis biflora*, planta utilizada en la medicina tradicional de China para el tratamiento de la diabetes. También, estos valores son similares a los reportados por Kang *et al.* (2011), 151.47 ± 1.78 ppm, para el extracto metanólico de la parte aérea de *Hypericum ascyron*; estos autores a su vez evaluaron la inhibición de α -glucosidasa frente a compuestos aislados a partir de esta planta entre ellos el kaempferol, el cual presentó una actividad inhibitoria alta de α -glucosidasa, IC₅₀ de 17.69 ± 0.35 ppm. Esta planta crece en China y presenta buena actividad antidiabética.

En general, los extractos de *J. spicigera* presentaron una mejor inhibición de la enzima α -glucosidasa que la α -amilasa. La inhibición *in vitro* de estas enzimas podría ser un indicativo del efecto que tiene esta planta en el consumidor. Al respecto, cabe hacer mención que Kwon *et al.* (2007), evaluaron la actividad antidiabética de extractos acuosos de diferentes muestras de pimientos frente a las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Los resultados obtenidos por estos autores presentan comportamientos similares a los obtenidos en el presente trabajo. Kwon *et al.* (2007) demostraron que extractos de pimienta poseen una actividad inhibitoria alta de la enzima α -glucosidasa y una actividad baja para α -amilasa. Este comportamiento puede resultar beneficioso para controlar la absorción de glucosa en el intestino y con ello disminuir algunos efectos secundarios ocasionados por el almidón que no ha sido hidrolizado; entre ellos, el aumento de la cantidad de gases ocasionado por la fermentación del almidón por bacterias presentes en el colon. Consecuentemente, derivado del presente estudio se determinó que los

extractos de hojas de *J. spicigera* inhiben a las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, con una posible reducción de los efectos secundarios que presenta la acarbosa.

4.5. Relación del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides con la actividad antirradicalar y antidiabética *in vitro*

En la Tabla 14 se muestra la correlación de Pearson del contenido de fenoles y flavonoides totales vs actividad antirradicalar frente al DPPH[•] de los extractos limpios de *J. spicigera*. El signo negativo de la correlación de Pearson indica que a medida que aumenta el contenido de fenoles o flavonoides totales, disminuye el valor del IC₅₀ correspondiente a la actividad antirradicalar; es decir, entre mayor contenido de compuestos fenólicos presentes en un extracto más alta será su actividad antirradicalar. Las correlaciones del contenido de fenoles totales vs actividad antirradicalar de las fracciones H₂O y MeOH/H₂O fueron de $r = -0.57$ y -0.64 respectivamente, Apéndice 2. Esto indica que el contenido de fenoles totales en las fracciones H₂O y MeOH/H₂O presenta una correlación moderada con la actividad antirradicalar. Este comportamiento indica que la naturaleza química de los compuestos fenólicos presentes en los distintos extractos es variable y esto consecuentemente afecta la actividad antirradicalar.

La correlación de Pearson del contenido de flavonoides en equivalentes de quercetina vs actividad antirradicalar para las fracciones de H₂O y MeOH/H₂O, Tabla 14, presentan una correlación moderada a 490 nm, $r = -0.55$ y -0.77 , respectivamente. Así mismo se observó una correlación moderada a 490 nm para el contenido de flavonoides en equivalentes de catequina vs actividad antirradicalar para las fracciones H₂O y MeO/H₂O, $r = -0.53$ y -0.78 respectivamente. Esto se puede atribuir a que durante la reacción de la formación del complejo flavonoide-nitrito-aluminio se propicia un desplazamiento batocrómico, lo cual fue reportado previamente por Pękal & Pyrzynska (2014), quienes observaron que las máximas absorbancias para los complejos de quercetina-nitrito-aluminio y catequina-nitrito-aluminio se encuentran en intervalos de 410-430 y 440-470 nm, respectivamente.

Tabla 14. Correlación de Pearson del contenido de fenoles y flavonoides totales vs actividad antirradicalar.

Ensayo		Lectura de absorbancia λ (nm)	Actividad antirradicalar frente al DPPH'	
			Fracción H ₂ O	Fracción MeOH/H ₂ O
Fenoles totales		750	-0.57	-0.64
Flavonoides totales	Equivalentes de Quercetina	405	-0.29	-0.70
		490	-0.55	-0.77
		515	-0.67	-0.92
	Equivalentes de Catequina	405	-0.25	-0.62
		490	-0.53	-0.78
		515	-0.67	-0.92

En la Tabla 15 se muestra la correlación de Pearson para el contenido de fenoles totales, flavonoides totales, actividad antirradicalar de los extractos limpios de las hojas de *J. spicigera* vs inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Los resultados obtenidos muestran una buena correlación del contenido de fenoles totales vs α -amilasa, $r = -0.79$, para la fracción acuosa de los extractos limpios de *J. spicigera*. Este mismo comportamiento se puede observar para la correlación con la enzima α -glucosidasa, $r = -0.89$. Al realizar la correlación, Tabla 15, del contenido de flavonoides totales calculados a las tres longitudes de onda ($\lambda = 405, 490$ y 515 nm) en equivalentes de quercetina con la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa se observa una buena correlación para la fracción acuosa, cuando se realiza la lectura de absorbancia del complejo flavonoide-nitrito-aluminio a una longitud de onda de 490 nm con valores de $r = -0.77$ y -0.72 , respectivamente. Una tendencia similar se observa cuando el contenido de flavonoides se expresa en equivalentes de catequina. La correlación de la actividad antirradicalar frente al DPPH' vs inhibición de la α -amilasa y α -glucosidasa nos indica sólo una relación parcial entre éstas actividades para la fracción MeOH/H₂O.

Tabla 15. Correlación de Pearson de la actividad antidiabética de los extractos de *J. spicigera*.

Ensayo	Lectura de absorbancia λ (nm)	Inhibición de la α -amilasa		Inhibición de la α -glucosidasa	
		Fracciones		Fracciones	
		H ₂ O	MeOH/H ₂ O	H ₂ O	MeOH/H ₂ O
Fenoles totales	750	-0.79 ^a	-0.64 ^a	-0.89 ^a	-0.59 ^a
Flavonoides totales (EQ*)	405	-0.69 ^b	-0.57 ^b	-0.57 ^b	-0.58 ^a
	490	-0.77 ^c	-0.63 ^{a,c}	-0.72 ^c	-0.55 ^a
	515	-0.46 ^d	-0.20 ^d	-0.57 ^b	-0.31 ^b
Flavonoides totales (EC**)	405	-0.69 ^b	-0.60 ^{b,c}	-0.55 ^b	-0.62 ^c
	490	-0.75 ^{a,c}	-0.61 ^{a,b,c}	-0.71 ^c	-0.55 ^a
	515	-0.79 ^a	-0.67 ^c	-0.71 ^c	-0.56 ^a
Actividad antirradicalar frente al DPPH'	515	0.38 ^e	0.56 ^e	0.38 ^d	0.47 ^d

*Equivalentes de Quercetina. ** Equivalentes de Catequina.

Los datos expresados son el promedio de tres mediciones \pm desviación estándar. Las letras mostradas como superíndice para cada columna representan los datos que son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Se realizó un ANOVA y la prueba de Duncan para el análisis estadístico.

Después de llevar a cabo el análisis de los datos obtenidos a partir de la correlación de Pearson se procedió a realizar un análisis de componentes principales (PCA). El PCA se utilizó debido a que se deseaba conocer la relación que guarda el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y la actividad antirradicalar frente al DPPH' con la inhibición de las enzimas (α -amilasa y α -glucosidasa) de los extractos limpios de *J. spicigera*. A partir de los datos obtenidos por PCA en la Tabla 16, se obtuvieron tres componentes principales, los cuales representan el 90.4% de la variabilidad de los parámetros estudiados. Los componentes 1, 2 y 3 explican el 49.0, 36.0 y 8.4% respectivamente, de dicha variabilidad, Apéndice 10.

Tabla 16. Análisis de varianza para componentes principales.

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de extracción de cargas al cuadrado		
	Total	% Varianza	% Acumulado	Total	% Varianza	% Acumulado
1	9.8	49.0	49.0	9.8	49.0	49.0
2	6.6	33.0	82.0	6.6	33.0	82.0
3	1.7	8.4	90.4	1.7	8.4	90.4
4	1.0	4.8	95.2			
5	0.6	3.0	98.2			
6	0.3	1.5	99.7			
7	0.0	0.2	99.8			
8	0.0	0.1	99.9			
9	0.0	0.1	99.9			
10	0.0	0.0	99.9			
11	0.0	0.0	99.9			
12	0.0	0.0	99.9			
13	0.0	0.0	99.9			
14	0.0	0.0	99.9			
15	0.0	0.0	99.9			
16	0.0	0.0	99.9			
17	0.0	0.0	100.0			
18	7.19x10 ⁻⁵	0.0	100.0			
19	1.99x10 ⁻⁵	9.98x10 ⁻⁵	100.0			
20	4.26x10 ⁻⁶	2.13x10 ⁻⁵	100.0			

La Tabla 17 obtenida a partir del PCA permite conocer los elementos que conforman a cada componente, por lo tanto el componente 1 está asociado a la relación que guardan el contenido de fenoles totales, flavonoides totales (quercetina y catequina) y la actividad antirradicalar de las fracciones de MeOH/H₂O de los distintos extractos limpios con la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. El componente 2 está asociado con el contenido de fenoles totales y flavonoides totales (quercetina y catequina) de las fracciones de H₂O de los extractos limpios con la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. El componente 3 relaciona el contenido de fenoles totales de la fracción H₂O con la actividad antirradicalar frente al DPPH', Apéndice 10.

Tabla 17. Extracción de elementos para el análisis de componentes principales.

Ensayo	Lectura de absorbancia λ (nm)	Fracción	Componente		
			1	2	3
Fenoles totales	750	H ₂ O MeOH/H ₂ O	0.95	0.65	-0.64
Flavonoides totales (EQ*)	405	H ₂ O MeOH/H ₂ O	0.96	0.93	
	490	H ₂ O MeOH/H ₂ O	0.97	0.96	
	515	H ₂ O MeOH/H ₂ O	0.94	0.93	
Flavonoides totales (EC**)	405	H ₂ O MeOH/H ₂ O	0.95	0.92	
	490	H ₂ O MeOH/H ₂ O	0.98	0.96	
	515	H ₂ O MeOH/H ₂ O	0.95	0.92	
Actividad antirradicalar frente al DPPH'	515	H ₂ O MeOH/H ₂ O	-0.78		0.69
Actividad inhibitoria de α -Amilasa (IC ₅₀)	515	H ₂ O MeOH/H ₂ O	-0.69	-0.87	
Actividad inhibitoria de α -Glucosidasa (IC ₅₀)	405	H ₂ O MeOH/H ₂ O	-0.70	-0.78	

*Equivalentes de Quercetina. **Equivalentes de Catequina.

Para conocer los elementos que conformaron a cada componente se tomaron los valores absolutos de cada valor obtenido.

A partir de los resultados obtenidos para el componente 2 se puede afirmar que el contenido de flavonoides en la fracción H₂O tiene una muy buena correlación con la actividad inhibitoria de la α -amilasa y una buena correlación con la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa. Por lo tanto, se puede afirmar que los flavonoides son responsables de la actividad antidiabética expresada como inhibición de la actividad enzimática.

4.6. Caracterización de los compuestos fenólicos aislados de *J. spicigera*

De los extractos obtenidos a partir del polvo de hojas de *J. spicigera* se estableció que el extracto de etanol al 70% fue el más alto en contenido de fenoles y flavonoides totales, así como

también presentó la mejor actividad antirradicalar frente al DPPH' y una de las mejores actividades de inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, por lo tanto se utilizó este extracto para llevar a cabo la purificación y aislamiento de compuestos fenólicos. De la fracción de AcOEt del extracto de etanol al 70% se aislaron e identificaron tres compuestos, M1, un artefacto de nombre di-(2-etilhexil) ftalato, M6 llamado comúnmente kaempferitrina (3,7-diramnósido kaempferol) y M7 se identificó como 3-O- α -L-arabinopiranosido-7-O- α -L-ramnopiranosido kaempferol. Este último compuesto es la primera vez que se aísla a partir del género *Justicia*.

4.6.1. Caracterización del di-(2-etilhexil) ftalato

El compuesto M1, se identificó como el di-(2-etilhexil) ftalato. Este compuesto es un artefacto que está presente en el hexano cuando es expuesto a plásticos. Generalmente se encuentra formando parte de las mangueras. Previamente fue reportado por Fernández-Rojas, 2006.

Del análisis del espectro de RMN de ^1H , Figura 21, se pueden observar dos señales doble de doble (dd) a $\delta = 7.72$ (H-3, H-6) y 7.62 (H-4, H-5) ppm que corresponden a protones en la región de los aromáticos. A $\delta = 4.21$ (H-1' y H-9) se observa una señal doble de doble (dd) que corresponde a los desplazamientos de protón de metilenos unidos a oxígeno. A un $\delta = 1.68$ (H-2' y H-10) se observa una señal múltiple correspondiente a protones de carbonos terciarios. En un $\delta = 1.47$ - 1.28 ppm se observó una señal múltiple que corresponde a protones de metilenos de una cadena alifática. A un $\delta = 1.0$ - 0.86 ppm se observa una señal múltiple que corresponde a desplazamientos de protones de metilos.

El espectro de RMN para ^{13}C , Figura 22, el di-(2-etilhexil) ftalato, presentó una señal en un $\delta = 164.4$ ppm correspondiente a los carbonos carbonílicos, tres señales en la región del anillo aromático en el intervalo de $\delta = 130.0$ - 134.0 ppm, una señal en $\delta = 69.2$ ppm correspondiente a metilenos unidos a oxígeno, una señal de carbonos terciarios a $\delta = 40.3$ ppm, cuatro señales de metilenos en el intervalo de $\delta = 24.0$ - 30.0 ppm y dos señales de metilos a $\delta = 11.0$ - 15.0 ppm.

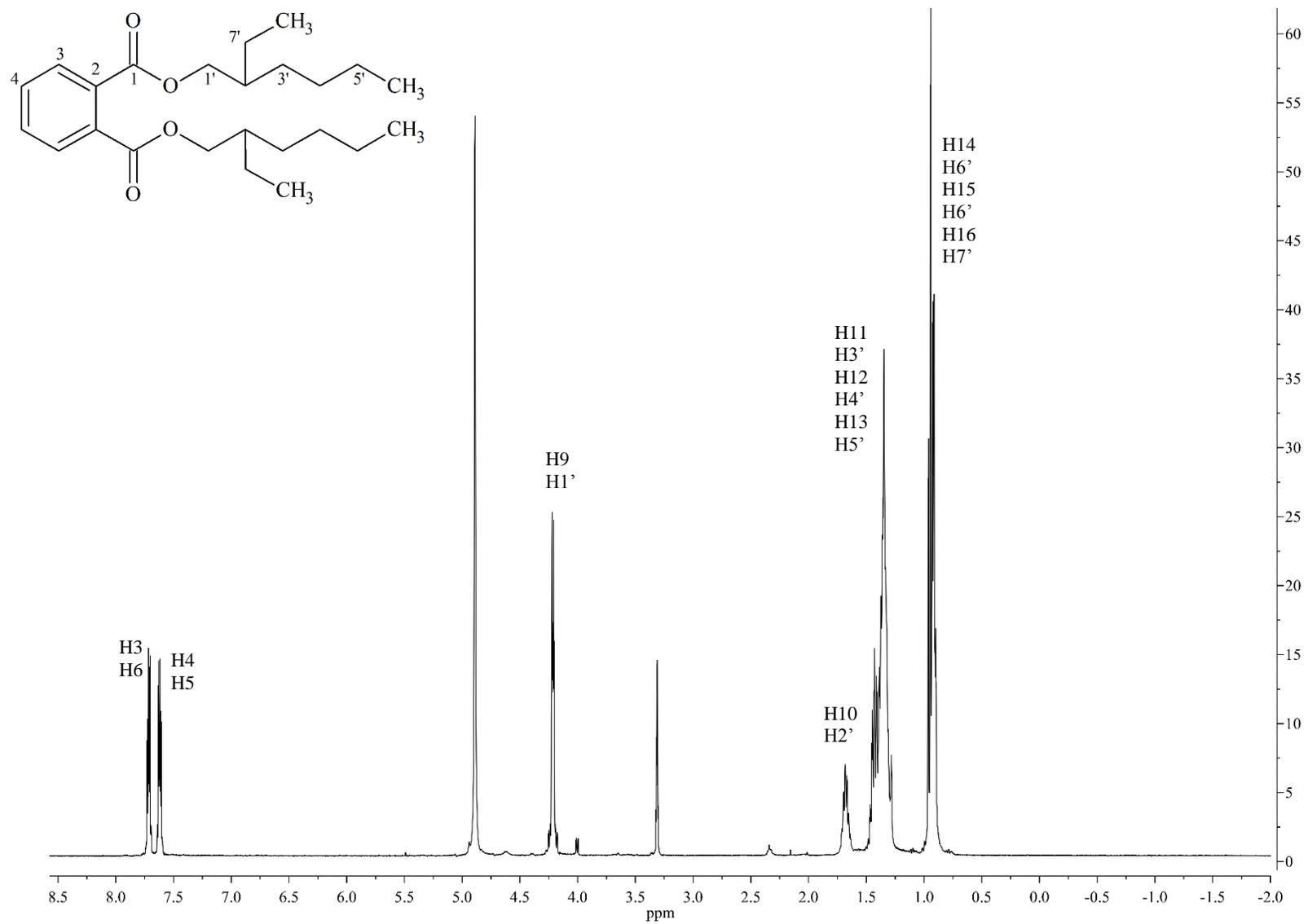


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H en CD_3OD del ftalato.

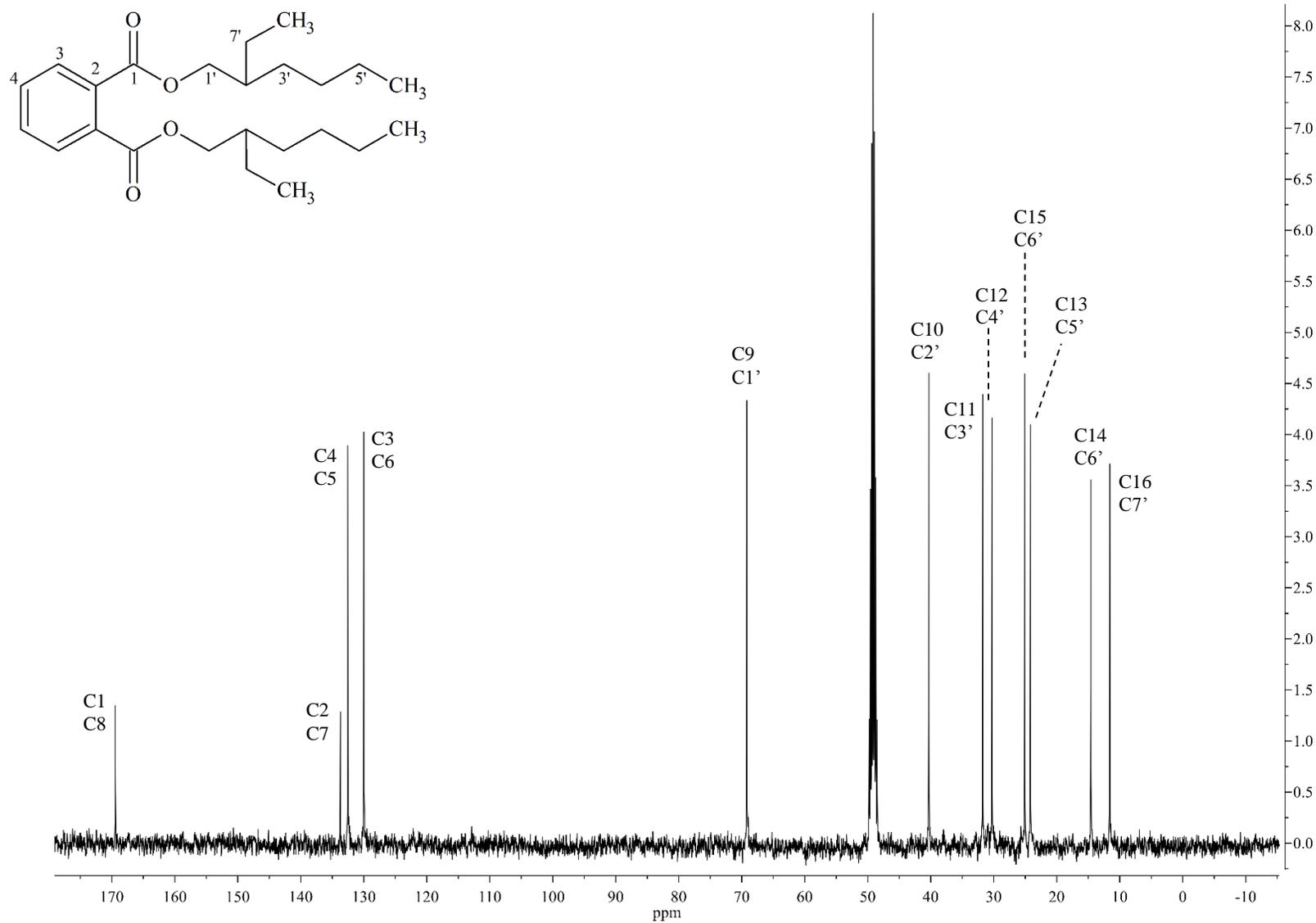


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C en CD_3OD del ftalato.

4.6.2. Caracterización de la kaempferitrina

Los cristales en forma de aguja correspondientes a la kaempferitrina la cual se obtuvo de la fracción de AcOEt, presentaron un punto de fusión de 235-239 °C.

El espectro de IR de la kaempferitrina, Figura 23, presenta una banda a 3337.20 cm^{-1} la cual es característica a los grupos hidroxilo (R-OH) presentes en la molécula. A 1657.06 cm^{-1} presenta una banda correspondiente al grupo carbonilo (R-C=O) del anillo C del kaempferol, en 1492.69 cm^{-1} se encuentra la banda correspondiente a C=C de aromáticos, la banda de 1203.48 cm^{-1} corresponde a vibraciones de deformación -C-OH. La huella dactilar corresponde aproximadamente a la región que comprende de 1300 a 500 cm^{-1} .

A partir del análisis de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , Figura 24 y Figura 25, y su comparación con los datos reportados por Valente *et al.* (2009) se determinó que el compuesto M6 era la kaempferitrina. Cabe hacer mención que este es el flavonoide más abundante presente en las hojas de *J. spicigera* y ya anteriormente fue aislado en esta planta por Euler & Alam (1982).

En el análisis de RMN de ^1H , Figura 24 y Tabla 18, se identificaron un conjunto de señales características de un anillo A de la estructura base de un flavonol, dos señales dobles (d) a $\delta = 6.46$ (H-6) y 6.70 (H-8) ppm, para el anillo B se identificaron dos señales doble de doble (dd), $\delta = 7.78$ (H-2', H-6') y 6.94 (H-3', H-5') ppm. Los δ de 5.56 (H-1''') y 5.41 (H-1'') ppm corresponden a ramnosas con señales dobles (d). También se observan cinco señales dobles de doble (dd) a $\delta = 4.22$ (H-2''), 3.72 (H-3''), 3.35 (H-5''), 4.03 (H-2''') y 3.83 (H-3''') ppm correspondientes a protones de las ramnosas. Adicionalmente están presente en el espectro una señal triple (t) a $\delta = 3.48$ (H-4''') ppm y dos señales doble de cuádruple a $\delta = 3.62$ (H-4''), 3.37 (H-5''') ppm. Estas dos últimas señales son representativas de hidrógenos unidos a carbonos base de metilos. Los δ de protones de los metilos presentaron un δ de 1.26 (d) y 0.95 (d) ppm.

Del espectro de RMN de ^{13}C para la kaempferitrina, Figura 25 y Tabla 18, se observan señales que son características para compuestos que tienen como estructura base al kaempferol, esto ayudó a la asignación apropiada de la estructura del compuesto, Valente *et al.* (2009). Las

señales para los átomos de carbono de las ramnosas están en un intervalo de 71 a 74 ppm. Las señales que corresponden a los metilos de las ramnosas se encuentran a $\delta = 17.78$ y 18.16 ppm.

Cabe hacer mención que en la literatura existen reportes de estudios *in vivo* e *in vitro* de la evaluación de la actividad antidiabética de la kaempferitrina. De Sousa *et al.* (2004) evaluaron el efecto hipoglucemiante de la kaempferitrina mediante la administración de este compuesto a ratas con diabetes inducida con aloxan y encontraron que este compuesto ejerce un efecto hipoglucemiante significativo a concentraciones de 100 y 200 mg/kg. Por otra parte, Pereira *et al.* (2011) evaluaron la inhibición de la maltasa *in vitro* de este compuesto y observaron que la kaempferitrina a concentraciones de 3.12, 6.25, 12.5 y 25 μM ejerce un efecto inhibitorio significativo (23%) en comparación con la acarbosa que a una concentración de 700 μM inhibe un 50% de esa enzima. Por otra parte Alonso-Castro *et al.* (2013) demostraron que la kaempferitrina ejerce un efecto citotóxico alto en células HeLa (células que derivan de una muestra de cáncer cérvico-uterino), así como también este compuesto ejerce efectos quimioprotectores y antitumorales.

Tabla 18. Comparativo de ^1H y ^{13}C de la kaempferitrina con datos reportados.

	δ de ^1H , ppm (J)		δ de ^{13}C , ppm	
	Referencia	<i>J. spicigera</i>	Referencia	<i>J. spicigera</i>
Kaempferol				
C2			157.8	160.0
C3			134.5	136.7
C4			178.0	179.9
C5			160.9	163.1
C6	6.46 (d, $J = 2.4$ Hz)	6.46 (d, $J = 2.4$ Hz)	99.4	100.8
C7			161.7	163.8
C8	6.79 (d, $J = 2.0$ Hz)	6.70 (d, $J = 2.0$ Hz)	94.6	95.9
C9			156.1	158.3
C10			105.8	107.8
C1'			120.7	122.7
C2', C6'	7.8 (d, $J = 8.8$ Hz)	7.78 (dd, $J = 6.8, 2.0$ Hz)	130.7	132.1
C3', C5'	6.93 (d, $J = 8.8$ Hz)	6.94 (dd, $J = 6.8, 2.0$ Hz)	115.4	116.8
C4'			160.1	161.8
Ramnosa				
C1''	5.30 (d, $J = 1.6$ Hz)	5.41 (d, $J = 1.6$ Hz)	101.9	103.7
C2''	3.99 (dd, $J = 3.2, 1.6$ Hz)	4.22 (dd, $J = 3.2, 1.2$ Hz)	70.0	72.2
C3''	3.47 (dd, $J = 8.8, 3.2$ Hz)	3.72 (dd, $J = 9.2, 3.6$ Hz)	70.3	72.5
C4''	3.15 (t, $J = 8.8$ Hz)	3.37 (dq, $J = 6.0, 2.4$ Hz)	71.1	73.5
C5''	3.13 (m)	3.35 (dd, $J = 6.0, 2.8$ Hz)	70.7	71.9
CH ₃	0.81 (d, $J = 5.6$ Hz)	0.95 (d, $J = 5.2$ Hz)	17.5	17.8
Ramnosa				
C1'''	5.56 (d, $J = 1.6$ Hz)	5.56 (d, $J = 1.6$ Hz)	98.4	100.2
C2'''	3.84 (dd, $J = 1.6, 3.4$ Hz)	4.03 (dd, $J = 3.2, 1.6$ Hz)	69.8	72.1
C3'''	3.64 (dd, $J = 3.4, 9.2$ Hz)	3.83 (dd, $J = 9.2, 3.6$ Hz)	70.2	72.4
C4'''	3.31 (t, $J = 9.2$ Hz)	3.48 (t, $J = 9.4$ Hz)	71.6	73.9
C5'''	3.43 (m)	3.62 (dq, $J = 5.6, 3.6$ Hz)	70.0	71.5
CH ₃	1.13 (d, $J = 6.4$ Hz)	1.26 (d, $J = 5.6$ Hz)	17.9	18.2

Los datos obtenidos se compararon con los reportados por Valente *et al.*, (2009)

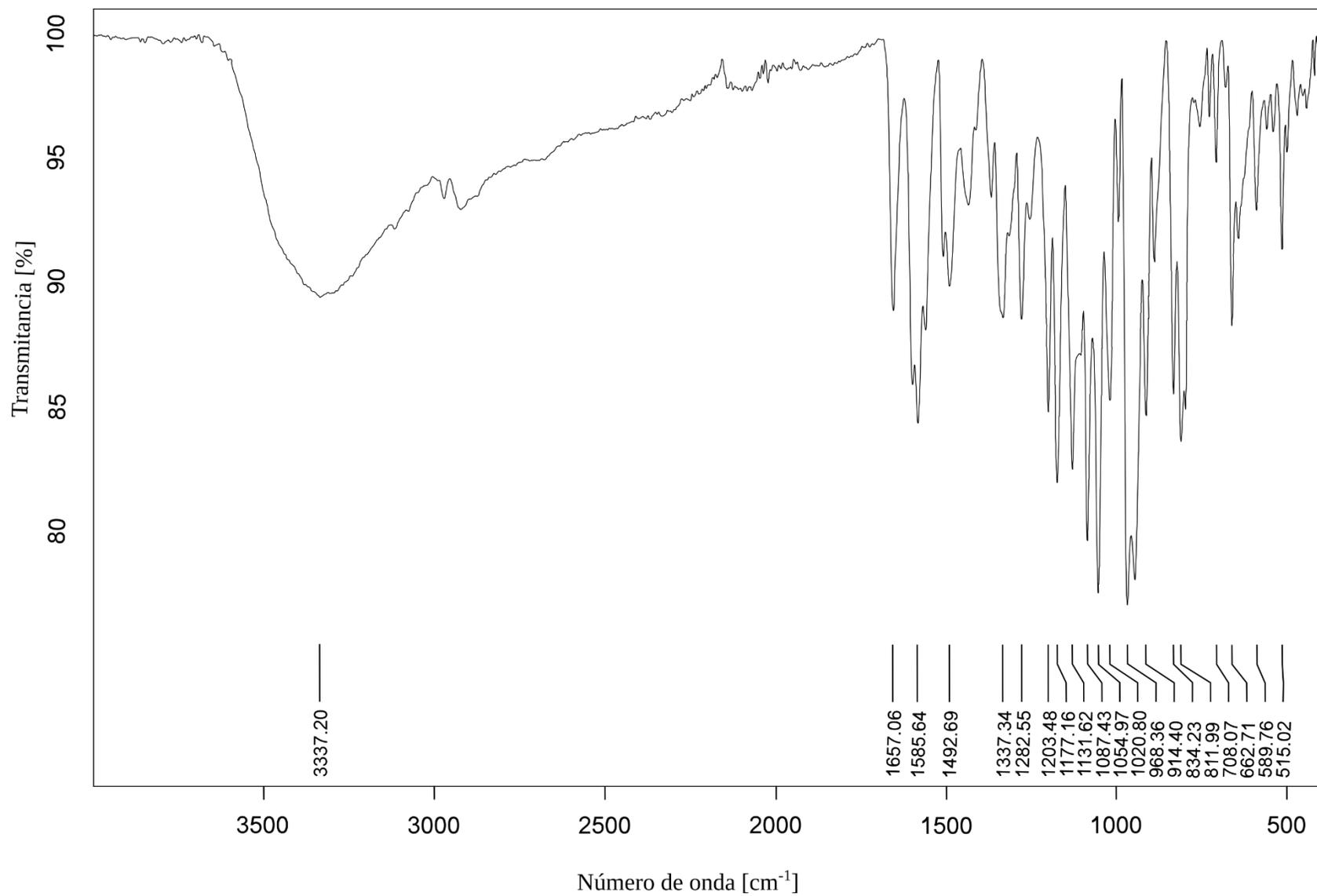


Figura 23. Espectro de IR de la kaempferitrina

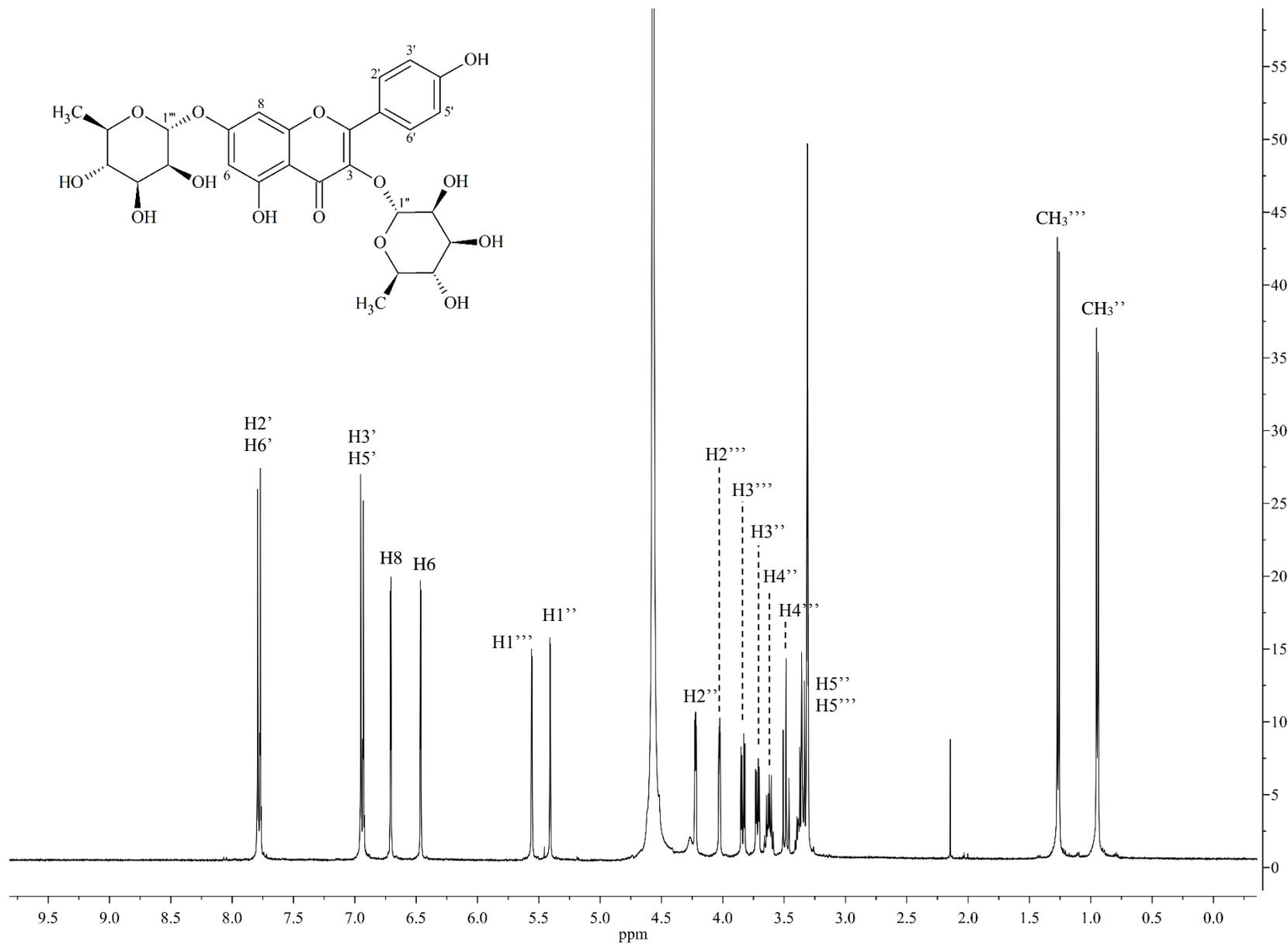


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H en CD_3OD de la kaempferitrina.

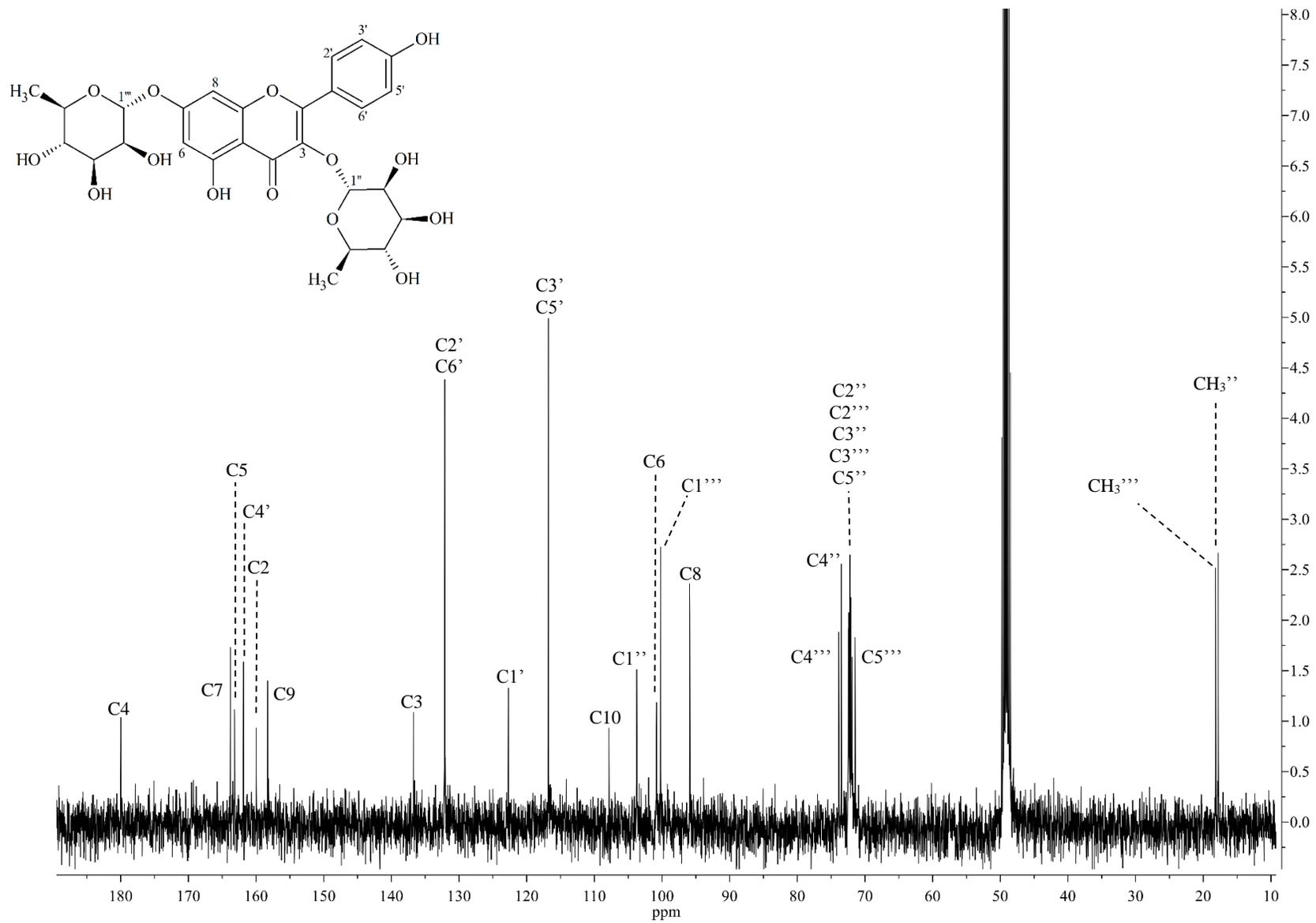


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C en CD_3OD de la kaempferitrina.

4.6.3. Caracterización del 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol

Los cristales del compuesto M7 se identificaron como el 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol, los cuales presentaron un punto de fusión de 239-242 °C.

Los datos de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto M7, 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol, se compararon con los datos reportados para la kaempferitina por Valente *et al.* (2009) y con los datos reportados por Fraisee *et al.* (2000) para el 3-*O*- α -L-arabinopiranosido quercetina, Tabla 20.

El espectro de RMN de ^1H , Figura 26, se observan cuatro señales dobles (d) correspondientes a la estructura base del kaempferol, $\delta = 8.2$ (H-2', H-6'), 6.89 (H-3', H-5'), 6.83 (H-8) y 6.45 (H-6) ppm. Los carbonos de los azúcares unidos al kaempferol presentan señales dobles (d) a 5.55 (H-1''') y 5.35 (H-1'') ppm. El δ de protón a 1.12 (CH₃'') ppm es característico de la ramnosa y presentó una señal doble (d). Para la asignación del fragmento arabinopiranosido se identificaron un par de δ de protón a 3.57 y 3.20 ppm que corresponden a un metileno (H-5_A'' y H-5_B''). H-5_A'' es una señal múltiple y H-5_B'' una señal doble de doble (dd). Estos desplazamientos son típicos de un fragmento del arabinopiranosido. El análisis del espectro de gHMBC, Figura 28 y Figura 29, permitió observar que en la Zona 1 del espectro el H-1''' correlaciona con de C3''', H-1'' correlaciona con C5'', Tabla 21. En la Zona 2 de esa misma figura se observa que H-2'' correlaciona con C2'' y C1'', H-3'' correlaciona con C4'', C3'' y con C1'', H-4''' correlaciona con C2''', Tabla 21. En la Zona 3 se observa que H-1''' correlaciona con C7, y que H1'' correlaciona con C3. La demás correlaciones se muestran en la Tabla 21. Con estas correlaciones se verifica que la asignación de la estructura es inequívoca.

En la Figura 30 y en la Figura 31 se muestran los valores de gHSQC para la asignación de protones del compuesto M7, los protones correspondientes a la base de los azúcares se muestran de la Zona 1, en la cual se pudo observar que a $\delta = 5.55$ ppm corresponde a la ramnosa y $\delta = 5.35$ ppm al arabinopiranosido. En la Zona 2 se muestra la asignación de los protones del arabinopiranosido y de la ramnosa. En la Tabla 19 se muestra la asignación para cada protón de

la molécula. Las asignaciones obtenidas por gHSQC ayudaron a confirmar las correlaciones obtenidas por gHMBC.

Cabe mencionar que solo se han reportado datos para ^1H del 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol, Yonekura-Sakakibara *et al.* (2008). Los valores reportados por estos autores coinciden con los δ y las *J* obtenidos para este compuesto a partir de la fracción de AcOEt de las hojas de *J. spicigera*.

El 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol, se ha aislado a partir del hehecho *Asplenium trichomanes* por Imperato (1979), también fue aislado de las flores de *Indigofera hebeptala* por Hasan *et al.* (1996), así como también se aisló a partir de las hojas de *J. spicigera* en este trabajo. A la fecha no existen estudios de la actividad biológica de éste compuesto.

Tabla 19. gHSQC de 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol.

δ de ^1H (ppm)	δ de ^{13}C (ppm)
8.2 (H-2' y H-6')	131.2 (C2' y C6')
6.89 (H-3' y H-5')	115.3 (C3' y C5')
6.83 (H-8)	99.3 (C8)
6.45 (H-6)	94.4 (C6)
5.55 (H-1''')	98.3 (C1''')
5.35 (H-1'')	101.2 (C1'')
3.84 (H-2''')	69.8 (C2''')
3.75 (H-2'')	70.7 (C2'')
3.66 (H-4'')	66.1 (C4'')
3.62 (H-3''')	70.3 (C3''')
3.52 (H-3'')	71.6 (C3'')
3.57, 3.20 (H-5'')	64.3 (C5'')
3.42 (H-5''')	70.1 (C5''')
3.3 (H-4''')	71.6 (C4''')
1.12 (CH ₃ '')	17.9 (CH ₃ '')

Tabla 20. Comparativo de ^1H y ^{13}C del 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol con datos reportados.

	δ de ^1H , ppm (<i>J</i>)		δ de ^{13}C , ppm	
	Referencia	<i>J. spicigera</i>	Referencia	<i>J. spicigera</i>
Kaempferol				
C2			157.8	156.8
C3			134.5	133.8
C4			178.0	177.7
C5			160.9	160.9
C6	6.46 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz)	6.45 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	99.4	99.4
C7			161.7	161.6
C8	6.79 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	6.83 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	94.6	94.3
C9			156.1	155.9
C10			105.8	105.6
C1'			120.7	120.5
C2', C6'	7.8 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	8.2 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz)	130.7	131.2
C3', C5'	6.93 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.89 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz)	115.4	115.3
C4'			160.1	160.3
Arabinopiranosido				
C1''	5.27 (d, <i>J</i> = 5.1 Hz)	5.35 (d, <i>J</i> = 4.8 Hz)	101.4	101.2
C2''	3.76 (dd, <i>J</i> = 7.1, 5.1 Hz)	3.75 (dt, <i>J</i> = 6.7, 4.7 Hz)	70.7	70.8
C3''	3.52 (dd, <i>J</i> = 7.1, 3.2 Hz)	3.52 (m)	71.6	71.6
C4''	3.66 (ddd, <i>J</i> = 3.2, 5.2, 2.0 Hz)	3.66 (m)	66.0	66.1
C5''	3.22 (dd, <i>J</i> = 2.0, 11.2 Hz), 3.60 (dd, <i>J</i> = 5.1, 11.2 Hz)	3.57 (m), 3.20 (dd, <i>J</i> = 11.1, 2.4 Hz)	64.2	64.3
Ramnosa				
C1'''	5.56 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz)	5.55 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz)	98.4	98.3
C2'''	3.84 (dd, <i>J</i> = 1.6, 3.4 Hz)	3.84 (ddd, <i>J</i> = 1.8 Hz)	69.8	69.8
C3'''	3.64 (dd, <i>J</i> = 3.4, 9.2 Hz)	3.62 (m)	70.2	70.3
C4'''	3.31 (t, <i>J</i> = 9.2 Hz)	3.30 (dt, <i>J</i> = 9.4 Hz)	71.6	71.6
C5'''	3.43 (m)	3.42 (dq, <i>J</i> = 9.2, 6.3 Hz)	70.0	70.1
CH ₃	1.13 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz)	1.12 (d, <i>J</i> = 6.2 Hz)	17.9	17.9

La porción del kaempferol y de la ramnosa se compararon con los datos de Valente *et al.*, (2009) y la porción del arabinopiranosido se comparó con los datos reportados por Fraisee *et al.*, (2000).

Tabla 21. gHMBC para 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol.

	δ de ^1H (ppm) y J	δ de ^{13}C (ppm)	gHMBC
C2		156.8	
C3		133.8	
C4		177.7	
C5		160.9	
C6	6.45 (d, $J = 2.1$ Hz)	99.4	C10 (105.6) C7 (161.6) C8 (94.3) C5 (160.9)
C7		161.6	
C8	6.83 (d, $J = 2.1$ Hz)	94.3	C6 (99.4) C9 (155.9) C7 (161.6) C10 (105.6)
C9		155.9	
C10		105.6	
C1'		120.5	
C2', C6'	8.20 (d, $J = 8.9$ Hz)	131.2	C2 (156.8) C4' (160.3) C6' (131.2)
C3', C5'	6.89 (d, $J = 8.9$ Hz)	115.3	C1' (120.5) C5' (115.3)
C4'		160.3	
Arabinopiranosido			
C1''	5.35 (d, $J = 4.8$ Hz)	101.2	C3 (133.8) C3'' (71.6) C5'' (64.3)
C2''	3.75 (dt, $J = 4.7, 6.7$ Hz)	70.7	C1'' (101.2) C2'' (70.7)
C3''	3.52 (m)	71.6	C1'' (101.2) C3'' (71.6) C4'' (66.1)
C4''	3.66 (m)	66.1	C4'' (66.1) C1'' (101.2)
C5''	3.57 (m), 3.20 (dd, $J = 2.4, 11.1$ Hz)	64.3	C1'' (101.2)
Ramnosa			
C1'''	5.55 (d, $J = 1.8$ Hz)	98.3	C3''' (70.3) C7 (161.6)
C2'''	3.84 (ddd, $J = 1.8$ Hz)	69.8	
C3'''	3.62 (m)	70.3	
C4'''	3.30 (dt, $J = 9.4$ Hz)	71.6	C2''' (69.8)
C5'''	3.42 (dq, $J = 9.2, 6.3$ Hz)	70.1	
CH3	1.12 (d, $J = 6.2$ Hz)	17.9	C3'' (70.3) C4''' (71.6) C5''' (70.1)

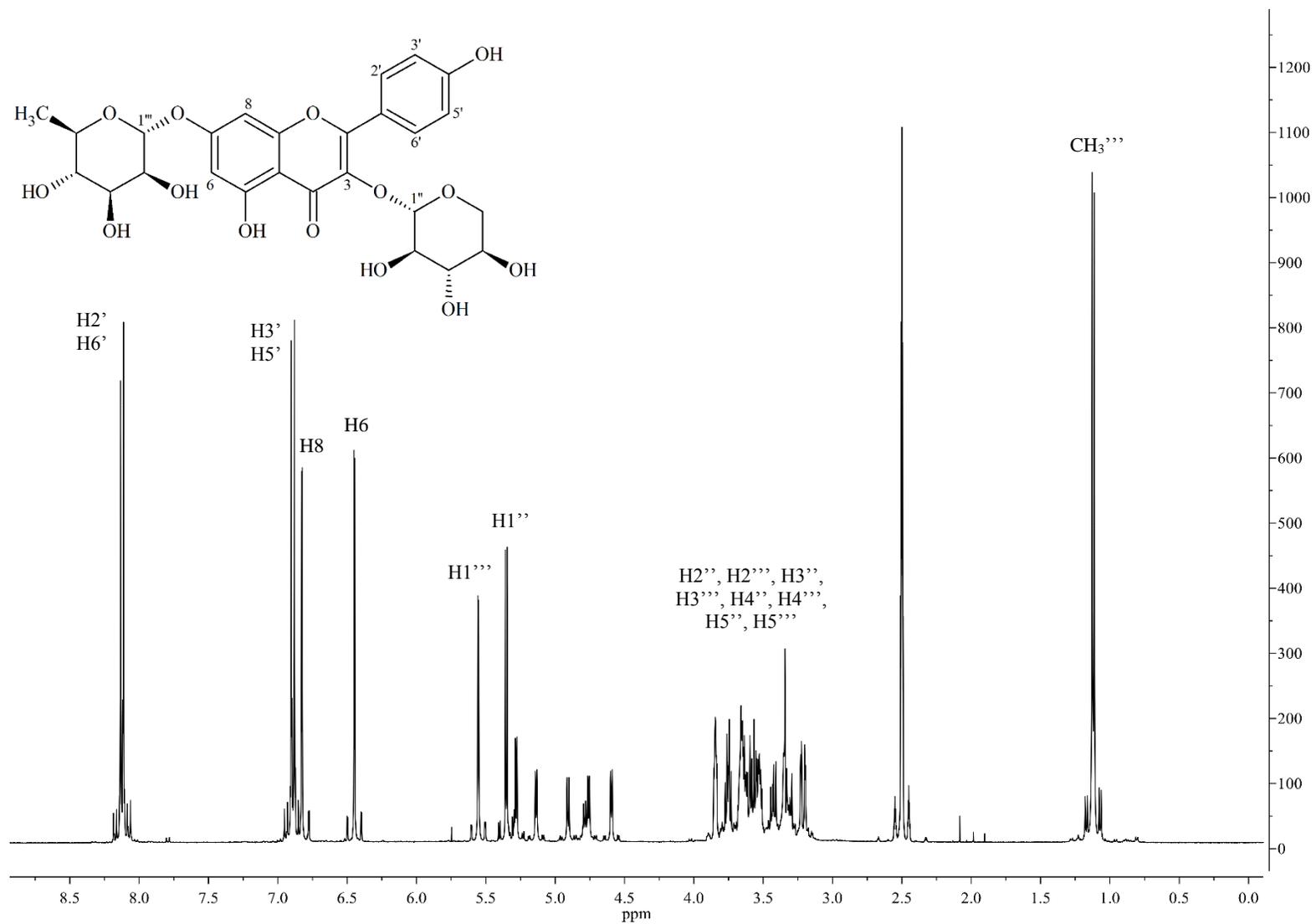


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H en DMSO-d_6 del 3-O- α -L-arabinopiranosido-7-O- α -L-ramnopiranosido kaempferol.

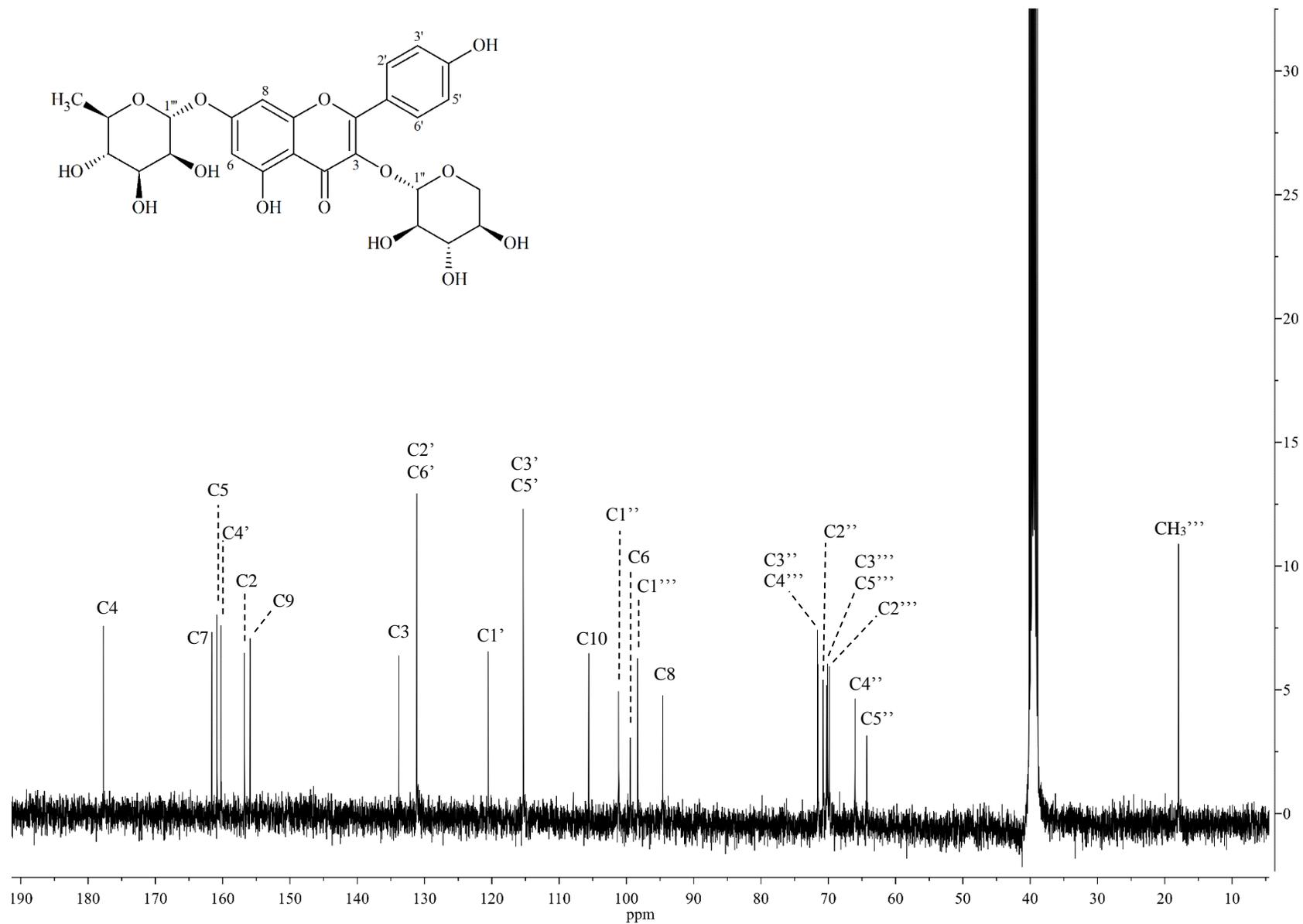


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C en DMSO- d_6 del 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol.

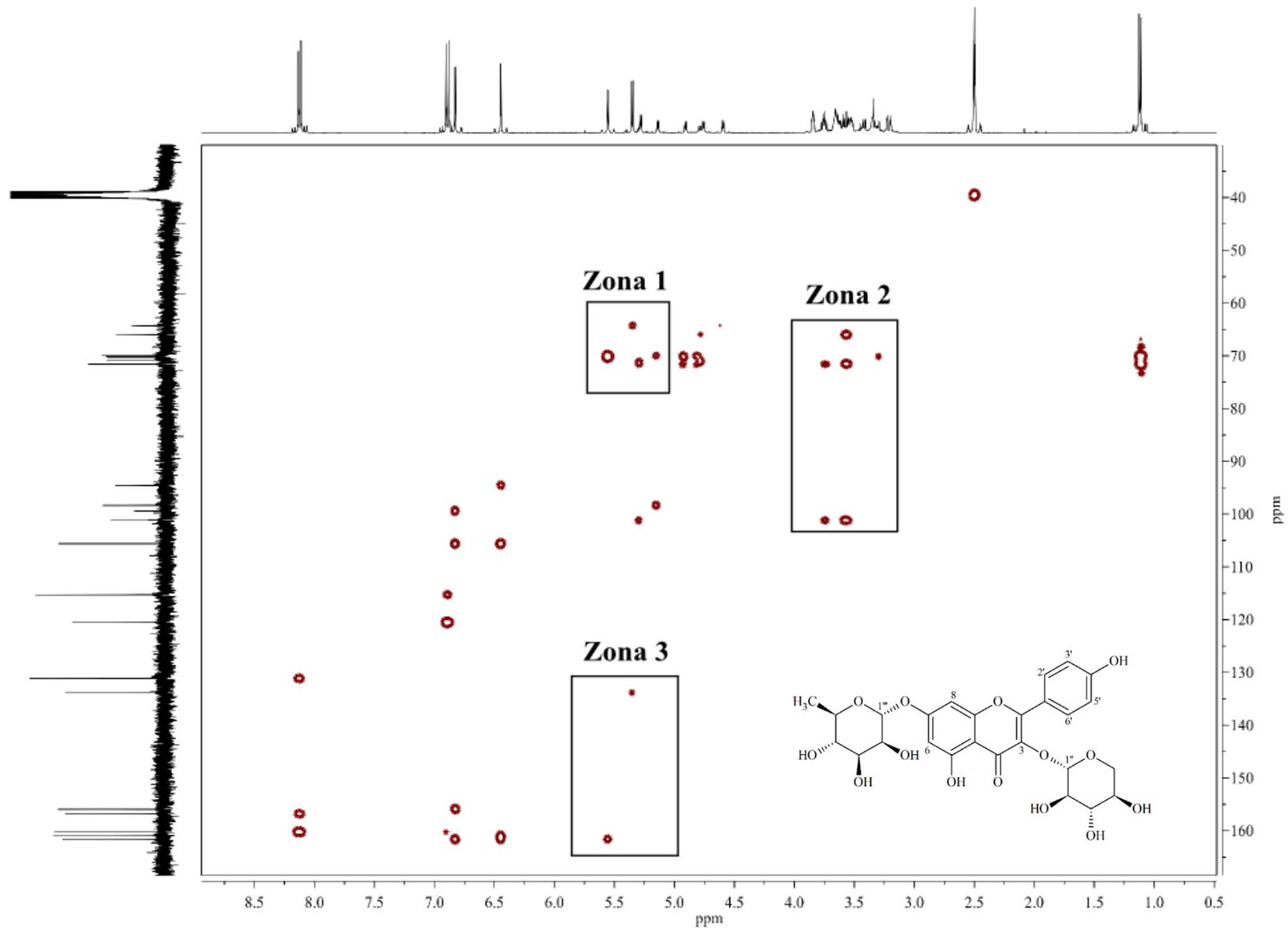


Figura 28. Espectro de RMN gHMBC del 3-O- α -L-arabinopiranosido-7-O- α -L-ramnopiranosido kaempferol.

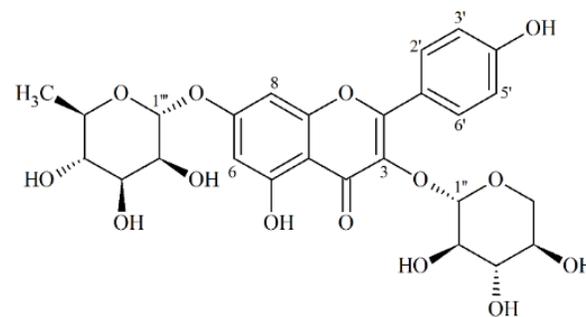
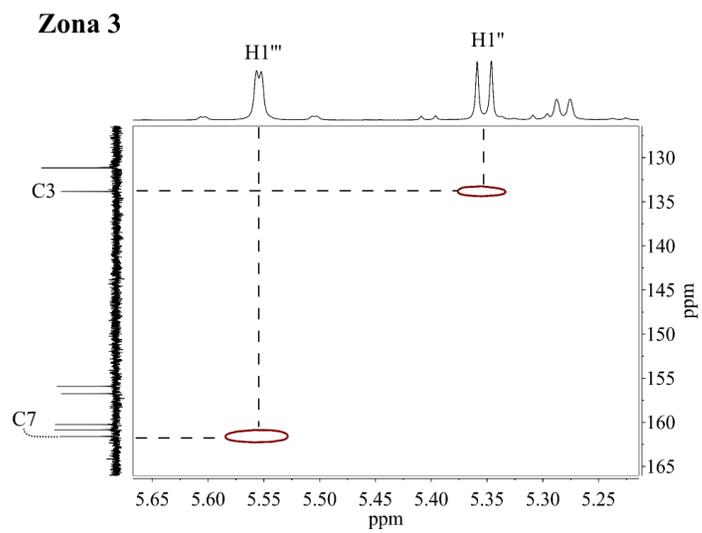
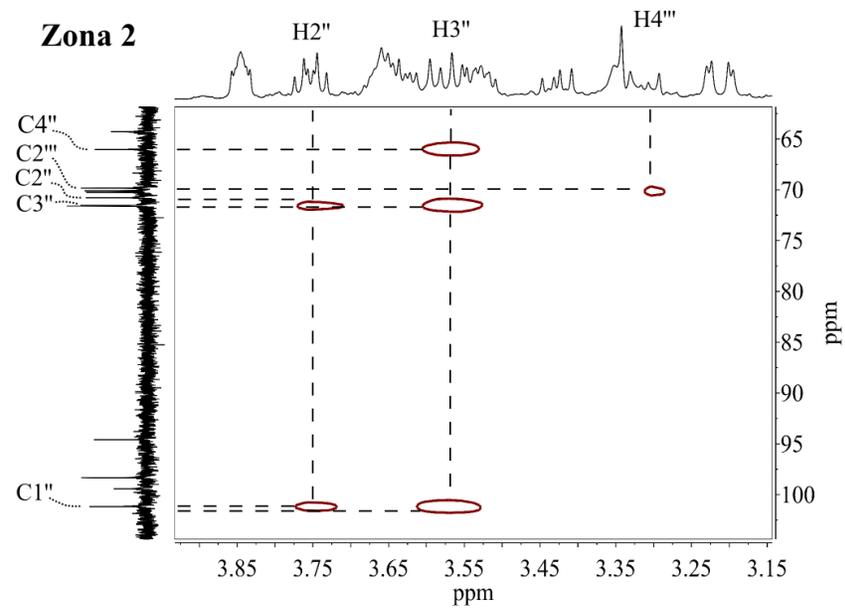
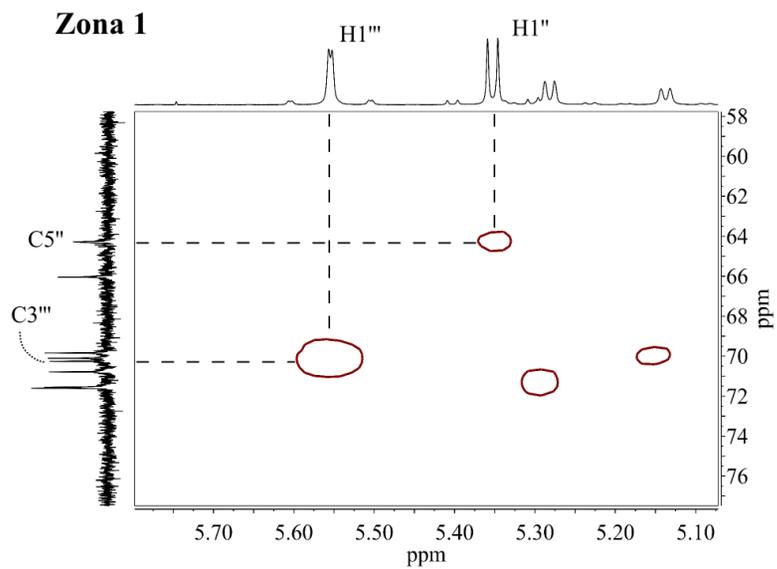


Figura 29. Espectro de RMN gHMBC del 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ranpironosido kaempferol.

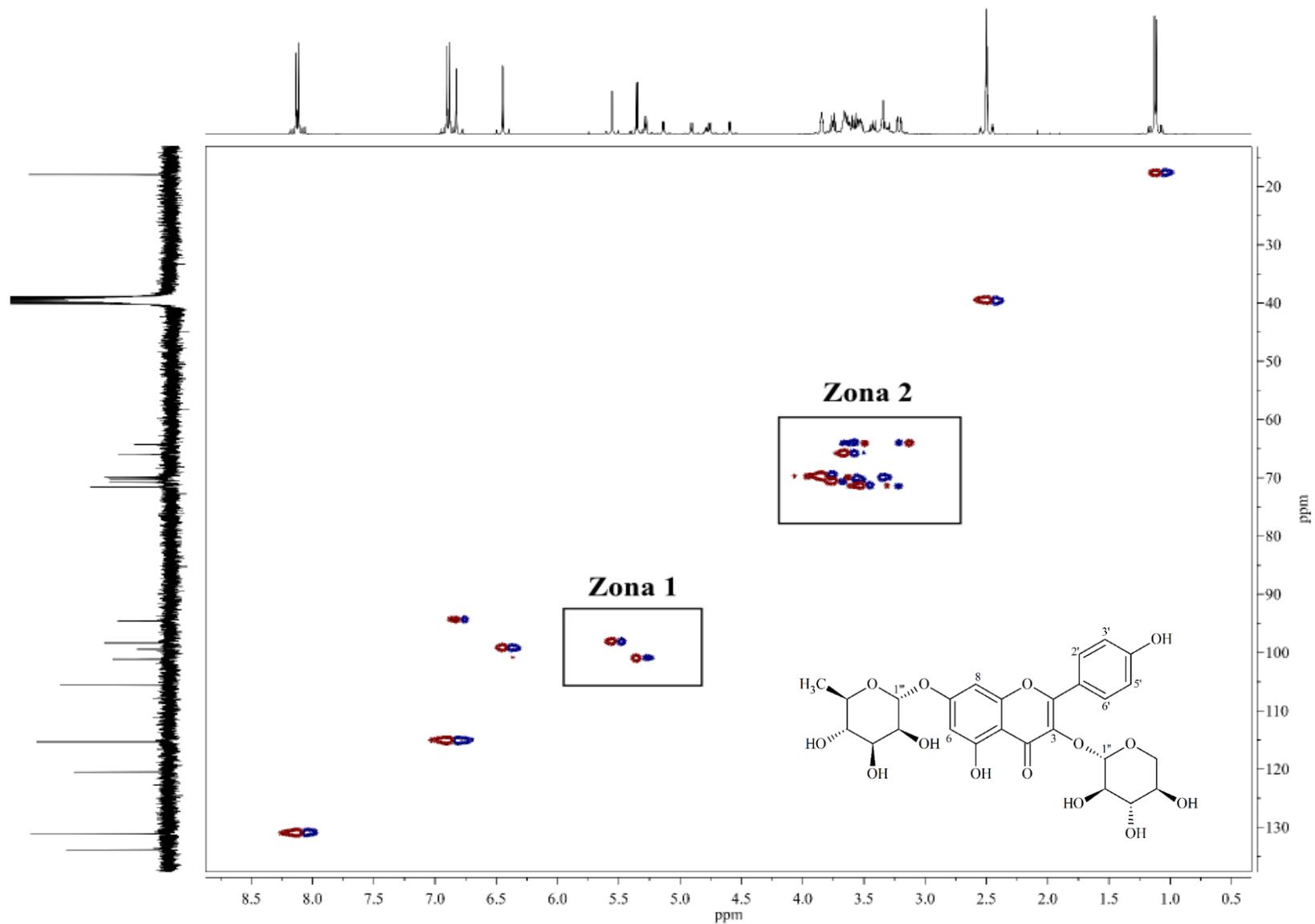


Figura 30. Espectro de RMN gHSQC del 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ramnopiranosido kaempferol.

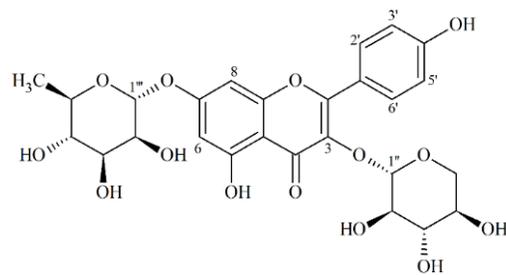
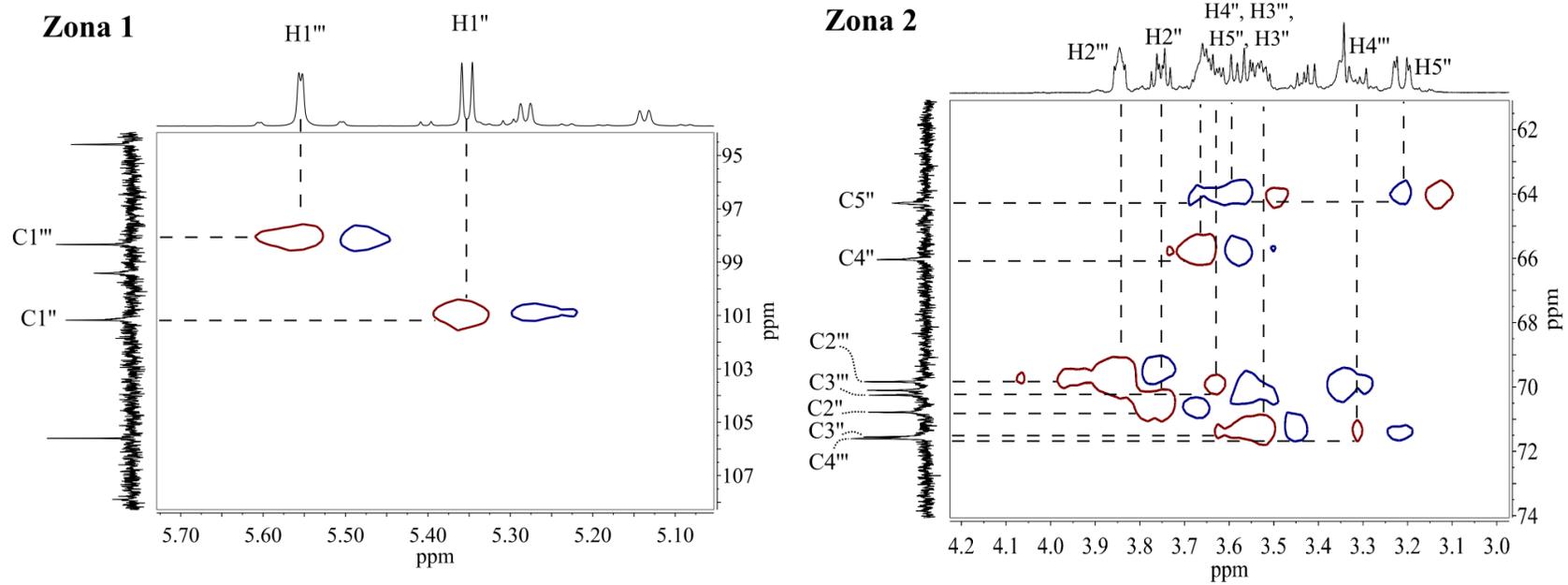


Figura 31. Espectro de RMN gHSQC del 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-ranopiranosido kaempferol.

Capítulo 5. Conclusiones

En este capítulo se dan a conocer las conclusiones a las que se llegaron a partir del análisis de los resultados obtenidos en el presente proyecto.

1. El método de extracción por ultrasonido así como el disolvente influyen en el contenido de fenoles y flavonoides totales, la actividad antirradicalar y antidiabética de los extractos.
2. Los extractos de decocción de la hoja fresca (DEC-HC) y ultrasonido con etanol al 70% (EtOH-SC), presentaron el mayor contenido de fenoles y flavonoides totales, al igual que sus correspondientes extractos limpios (DEC-HL y EtOH-SL). A partir del análisis de correlación de Pearson para flavonoides totales, se determinó que a 490 nm es idóneo reportarlos para su cuantificación en *J. spicigera*, independientemente del estándar utilizado.
3. El extracto de etanol al 70%, fracción H₂O (EtOH-SL1) presentó la mejor actividad antirradicalar frente al DPPH[•] y la mejor actividad inhibitoria frente a la α -amilasa y la α -glucosidasa.
4. A partir del análisis de la correlación de Pearson y del análisis por PCA, se puede concluir que los flavonoides presentes en la fracción H₂O de los extractos obtenidos por SPE, son los responsables de la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.
5. A partir de la fracción de AcOEt del extracto de EtOH al 70% de las hojas de *J. spicigera* se aislaron dos flavonoles, la kaempferitrina y el 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-rhamnopiranosido kaempferol.

Capítulo 6. Perspectivas

En esta sección se dan a conocer las perspectivas a desarrollar para continuar con la investigación de las hojas de *J. spicigera*.

1. Evaluar la actividad antirradicalar y antidiabética *in vitro* de la kaempferitrina y del 3-*O*- α -L-arabinopiranosido-7-*O*- α -L-rhamnopiranosido kaempferol, obtenidos a partir de extractos de las hojas de *J. spicigera*.
2. Las fracciones acuosas de los extractos de etanol al 70% (EtOH-SL1) y de acetona al 70% (ACT-SL1) de *J. spicigera* presentaron una coloración rojiza característica de antocianinas, por lo tanto se podría llevar a cabo su aislamiento e identificación de antocianinas a partir de estos extractos. Además de continuar con el aislamiento de los compuestos restantes de la fracción de AcOEt.
3. Debido a que existen diferentes tipos de inhibición de enzimas agrupadas en competitiva, no competitiva y mixta, es importante llevar a cabo un estudio de las cinéticas de reacción de inhibición enzimática de los extractos obtenidos de las hojas de *J. spicigera*.

Capítulo 7. Referencias

- Alejandro-Espinoza, M.; Jaramillo-Fierro, X.; Ojeda-Riascos, S.; Malagón-Aviles, O.; Ramírez-Robles, J. **2013**. Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur de Ecuador. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12 (1), 59-68.
- Alonso-Castro, A. J.; Ortiz-Sánchez, E.; García-Regalado, A.; Ruiz, G.; Núñez-Martínez, J. M.; González-Sánchez, I.; Quintanar-Jurado, V.; Morales-Sánchez, E.; Dominguez, F.; López-Toledo, G.; Cerbón, M. A.; García-Carrancá, A. **2013**. Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells and exerts antitumor effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 145 (2), 476-489.
- Ali, H.; Houghton, P. J.; Soumyanath, A. **2006**. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107 (3), 449-455.
- Andrade-Cetto, A. & Heinrich, M. **2005**. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99 (3), 325-348.
- Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, M. M.; Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; Omar, A. K. M. **2013**. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 426-436.
- Basar, M. H.; Hossain, S. J.; Sadhu, S. K.; Rahman, M. H. **2013**. A comparative study of antioxidant potential of commonly used antidiabetic plants in Bangladesh. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 13 (1), 21-18.
- Basha, S. K. & Kumari, V. S. **2012**. *In vitro* antidiabetic activity of *Psidium guajava* leaves extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2 (1), 98-100.

- Breitmaier, E. **2002**. Structure elucidation by NMR in organic chemistry: A practical guide. *John Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra*. pp. 272.
- Brusotti, G.; Cesari, I.; Dentamaro, A.; Caccialanza, G.; Massolini, G. **2014**. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 218-228.
- Bhushan, M. S.; Rao, Ch. V.; Ojha, S. K.; Vijayakumar, M.; Verma, A. **2010**. An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituent & mechanism of action. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Research*, 1(1), 29-46.
- Cáceres-Cortés, J. R.; Cantú-Garza, F. A.; Mendoza-Mata, M. T.; Chavez-González, M. A.; Ramos-Mandujano, G.; Zambrano-Ramírez, I. R. **2001**. Cytotoxic activity of *Justicia spicigera* is inhibited by bcl-2 proto-oncogene and induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion. *Phytotherapy Research*, 15 (8), 691-697.
- Chandrashekar, K. R. & Bhagya, N. **2013**. Evaluation of plant and callus extracts of *Justicia gendarussa* Burm. F. for phytochemicals and antioxidant activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (2), 82-85.
- Chatterjee, K.; Monjur, A. K.; Debasis De; Kumar, P. D.; Ghosh, D. **2012**. Antidiabetic and antioxidative activity of ethyl acetate fraction of hydromethanolic extract of seed of *Eugenia jambolana* Linn through *in vivo* and *in vitro* study and its chromatographic purification. *Free Radicals and Antioxidants*, 2 (1), 21-30.
- Christudas, N. I. V.; Kumar, P. P.; Sunil, C.; Vajravijayan, S.; Sundaram, R. L.; Siril, S. J.; Agastian, P. **2013**. *In vitro* studies on α -glucosidase inhibition, antioxidant and free radical scavenging activities of *Hedyotis biflora* L. *Food Chemistry*, 138 (2-3), 1689-1695.
- Corrêa, G. M. & Alcântara, A. F. C. **2012**. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* - a review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22 (1), 220-238.
- Cruz-Gallegos, J. A. **2012**. Relación flavonoides totales-actividad antidiabética (*in vitro* por difusión de glucosa) en extractos de *Colubrina elliptica*. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Ingeniero en Alimentos, Universidad Tecnológica de la Mixteca.

- De Sousa, E.; Zanatta, L.; Seifriz, I.; Creczynski-Pasa, T. B.; Pizzolatti, M. G.; Szpoganicz, B.; Silva, F. R. **2004**. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(alpha)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *Journal of Natural Products*, 67 (5), 829-832.
- Dong, H. Q.; Li, M.; Zhu, F.; Liu, F. L.; Huang, J. B. **2012**. Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chemistry*, 130 (2), 261-266.
- Eom, S. H.; Lee, S. H.; Yoon, N. Y.; Jung, W. K.; Jeon, Y. J.; Kim, S. K.; Lee, M. S.; Kim, Y. M. **2012**. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of phlorotannins from *Eisenia bicyclis*. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 92 (10), 2084-2090.
- Euler, K. L. & Alam, M. **1982**. Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*, 45 (2), 220-221.
- Fernández-Rojas, B. **2006**. Aislamiento y caracterización del tilirósido a partir de las semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus* (cuetla). Tesis de Licenciatura para obtener el título de Ingeniero en Alimentos, Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- Fraisse, D.; Heitz, A.; Carnat, A.; Carnat, A. P.; Lamaison, J. L. **2000**. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. *Fitoterapia*, 71 (4), 463-464.
- García-Márquez, E.; Román-Guerrero, A.; Pérez-Alonso, C.; Cruz-Sosa, F.; Jiménez-Alvarado, R.; Vernon-Carter, E. J. **2012**. Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muitle extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11 (1), 1-10.
- Ghasemzadeh, A. & Ghasemzadeh, N. **2011**. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (31), 6697-6703.
- Gramza, A.; Pawlak-Lemańska, K.; Korczak, J.; Wąsowicz, E.; Rudzinska, M. **2005**. Tea extracts as free radical scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14 (6), 861-867.

- Gupta, R. K.; Kumar, D.; Chaudhary, A. K.; Maithani, M.; Singh, R. **2012**. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 139 (3), 801-806.
- Harris, D. C. **2007**. Análisis químico cuantitativo. Tercera Edición. Reverté. España. pp. 744.
- Hasan, A.; Ahmad, I.; Khan, M. A.; Chudhary, M. I. **1996**. Two flavonol triglycosides from flowers of *Indigofera hebeptala*. *Phytochemistry*, 43 (5), 1115-1118.
- He, C.; Long, Y.; Pan, J.; Li, K.; Liu, F. **2007**. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (2), 133-150.
- Hemalatha, S.; Patel, D. K.; Kumar, R.; Laloo, D. **2012**. Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (5), 411-420.
- Heneczowski, M.; Kopacz, M.; Nowak, D.; Kuźniar, A. **2001**. Infrared spectrum analysis of some flavonoids. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 58 (6), 415-420.
- Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. **2011**. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126 (4), 1821-1835.
- Imperato, F. **1979**. Two new kaempferol 3,7-diglycosides and kaempferitrin in the fern *Asplenium trichomanes*. *Experientia*, 35 (9), 1134-1135.
- Julián-Loaeza, A. P.; Santos-Sánchez, N. F.; Valadez-Blanco, R.; Sánchez-Guzmán, B. S.; Salas-Coronado, R. **2011**. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*, 34 (2), 1262-1268.
- Kadir, M. F.; Bin Sayeed, M. S.; Shams, T.; Mia, M. M. **2012**. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by Bangladeshi traditional health practitioners in the management of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 144 (3), 605-611.
- Kang, W. Y.; Song, Y. L.; Zhang, L. **2011**. α -glucosidase inhibitory and antioxidant properties and antidiabetic activity of *Hypericum ascyron* L. *Medicinal Chemistry Research*, 20 (7), 809-816.

- Khalil, N. M.; Pepato, M. T.; Brunetti, I. L. **2008**. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. *Biological Research*, 41 (2), 165-171.
- Konan, Y.; Witabouna, K. M.; Bassirou, B.; Kagoyire, K. **2014**. Antioxidant activity and total phenolic content of nine plants from Côte d'Ivoire (West Africa). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4 (8), 36-41.
- Krishna, K. L.; Mruthunjaya, K.; Patel, J. A. **2009**. Antioxidant and hepatoprotective activity of leaf extract of *Justicia gendarussa* Burm. *International Journal of Biological Chemistry*, 3, 99-110.
- Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. **2011**. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89 (3), 217-233.
- Kumar, A. B. S.; Lakshman, K.; Jayaveea, K. N.; Shekar, S. D.; Khan, S.; Thippeswamy, B. S.; Veerapur, V. P. **2012**. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of methanolic extract of *Amaranthus viridis* Linn in alloxan induced diabetic rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64 (1-2), 75-79.
- Kumar, J. D.; Panda, L.; Ramaiah, S.; Anbarasu, A. **2014**. Evaluation and comparison of radical scavenging properties of solvent extracts from *Justicia adhatoda* leaf using DPPH assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174 (7), 2413-2425.
- Kwon, Y. I.; Apostolidis, E.; Shetty, K. **2007**. Evaluation of pepper (*Capsicum annuum*) for management of diabetes and hypertension. *Journal of Food Biochemistry*, 31, 370-385.
- Lawag, I. L.; Aguinaldo, A. M.; Naheed, S.; Mosihuzzaman, M. **2012**. α -glucosidase inhibitory activity of selected Philippine plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 144 (1), 217-219.
- Li, H.; Chen, B.; Yao, S. **2005**. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (E. ulmoides). *Ultrasonics Sonochemistry*, 12 (4), 295-300.
- Li, J. J.; Limberakis, C.; Pflum, D. A. **2007**. Modern Organic Synthesis in the Laboratory. *Oxford University Press*, pp. 224.

- Li, Y.; Li, C.; Xu, Q.; Kang, W. **2011**. Antioxidant, α -glucosidase inhibitory activities *in vitro* and alloxan-induced diabetic rats' protective effect of *Indigofera stachyodes* Lindl. root. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (14), 3321-3328.
- Liu, L.; Deseo, M. A.; Morris, C.; Winter, K. M.; Leach, D. N. **2011**. Investigation of α -glucosidase inhibitory activity of wheat bran and germ. *Food Chemistry*, 126 (2), 553-561.
- Lizcano, L. J.; Bakkali, F.; Ruiz-Larrea, M. B.; Ruiz-Sanz, J. I. **2010**. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chemistry*, 119 (4), 1566-1570.
- Lordan, S.; Smyth, T. J.; Soler-Vila, A.; Stanton, C.; Ross, R.P. **2013**. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*, 141 (3), 2170-2176.
- Marathakam, A.; Kannappan, N.; Jasemine, S.; Santhiagu, A.; Sreejith, M.; Ajith, M. P. **2012**. Studies on phytochemical and *in vitro* antioxidant potential of *Justicia beddomei* (Clarke) Bennett. *Free Radicals and Antioxidants*, 2 (4), 26-31.
- Nickavar, B. & Yousefian, N. **2011**. Evaluation of α -amylase inhibitory activities of selected antidiabetic medicinal plants. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6 (2), 191-195.
- Orhan, N.; Aslan, M.; Süküroğlu, M.; Orhan, D. D. **2013**. *In vivo* and *in vitro* antidiabetic effect of *Cistus laurifolius* L. and detection of major phenolic compounds by UPLC-TOF-MS analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 146 (3), 859-865.
- Ortiz-Andrade, R.; Cabañas-Wuan, A.; Arana-Argáez, V. E.; Alonso-Castro, A. J.; Zapata-Bustos, R.; Salazar-Olivo, L. A.; Domínguez, F.; Chávez, M.; Carranza-Álvarez, C.; García-Carrancá, A. **2012**. Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltld (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 143 (2), 455-462.
- Patel, D. K.; Prasad, S. K.; Kumar, R.; Hemalatha, S. **2012**. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*, 2 (4), 320-330.

- Pękal, A. & Pyrzynska, K. **2014**. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7 (9), 1776-1782.
- Pereira, D. F.; Cazarolli, H. L.; Lavado, C.; Mengatto, V.; Figueiredo, M. S.; Guedes, A.; Pizzolatti, M. G.; Silva, F. R. **2011**. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*, 27 (11-12), 1161-1167.
- Ramachandran, S. & Rajasekaran, A. **2014**. Blood glucose-lowering effect of *Tectona grandis* flowers in type 2 diabetic rats: A study on identification of active constituents and mechanisms for antidiabetic action. *Journal of Diabetes*, 6 (5), 427-437.
- Ramírez, G.; Zavala, M.; Pérez, J.; Zamilpa, A. **2012**. *In vitro* screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 6.
- Ramkumar, K. M.; Thayumanavan, B.; Palvannan, T.; Rajaguru, P. **2010**. Inhibitory effect of *Gymnema montanum* leaves on α -glucosidase activity and α -amylase activity and their relationship with polyphenolic content. *Medicinal Chemistry Research*, 19 (8), 948-961.
- Reddy, S. N. V. L.; Anarthe, S. J.; Raghavendra, N. M. **2010**. *In vitro* antioxidant and antidiabetic activity of *Asystasia gangetica* (Chinese Violet) Linn. (Acanthaceae). *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 1 (2), 72-75.
- Sadiki, M. & Martin, N. **2013**. Solid-phase extraction and procedure for determination of phenolic compounds in maple syrup. *Food Analytical Methods*, 6 (3), 737-744.
- Sepúlveda-Jiménez, G.; Reyna-Aquino, C.; Chaires-Martínez, L.; Bermúdez-Torres, K.; Rodríguez-Monroy, M. **2009**. Antioxidant activity and content of phenolic compounds and flavonoids from *Justicia spicigera*. *Journal of Biological Sciences*, 9 (6), 629-632.
- Sherma, J. & Fried, B. **2003**. Handbook of Thin-Layer Chromatography. *Vol. 89 of Chromatographic science series*, pp. 1048.
- Sivashanmugam, A. T. & Chatterjee, T. K. **2013**. *In vitro* and *in vivo* antidiabetic activity of *Polyalthia longifolia* (Sonner). Thw. leaves. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 13 (4), 289-300.

- Spigno, G. & De Faveri, D. M. **2007**. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure of yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78 (3), 793-801.
- Sulaiman, C. T.; John, B.; Reddy, V. R. K. **2013**. Total phenolics and flavonoids in selected *Justicia* species. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (4), 72-73.
- Sulaiman, S. F.; Sajak, A. A. B.; Ooi, K. L.; Supriatno; Seow, E. M. **2011**. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (4-5), 506-515.
- Smeds, I. A.; Eklund, P. C.; Willför, S. M. **2012**. Content, composition, and stereochemical characterisation of lignans in berries and seeds. *Food Chemistry*, 134 (4), 1991-1998.
- Stuart, B. H. **2005**. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, pp. 242.
- Thorat, K.; Patil, L.; Limaye, D.; Kadam, V. **2012**. *In vitro* models for antidiabetic activity assessment. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3 (2), 730-733.
- Valente, L. M. M.; Bizarri, C. H. B.; Liechocki, S.; Barboza, R. S.; Paixão, D.; Almeida, M. B. S.; Benevides, P. J. C.; Magalhães, A.; Siani, A. C. **2009**. Kaempferitrin from *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) and its potential as a chemical marker for the species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20 (6), 1041-1045.
- Walpole, R. E.; Myers, R. H.; Myers, S. L. **1999**. Probabilidad y estadística para ingenieros. Prentice-Hall. México. pp. 752.
- Wang, Y.; Huang, S.; Shao, S.; Qian, L.; Xu, P. **2012**. Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against α -glucosidase and α -amylase *in vitro*. *Industrial Crops and Products*, 37 (1), 520-526.
- Wang, L. & Weller, C. L. **2006**. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (6), 300-312.
- Wojdyło, A.; Oszmiański, J.; Czemerys, R. **2007**. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105 (3), 940-949.

Yonekura-Sakakibara, K.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Nakabayashi, R.; Takayama, H.; Niida, R.; Watanabe-Takahashi, A.; Inoue, E.; Saito, K. **2008**. Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene-metabolite correlations in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20 (8), 2160-2176.

Capítulo 8. Apéndices

Apéndice 1. Relación entre el mecanismo de acción de fármacos y plantas.

Fármaco	Mecanismo de acción	Planta (Referencia)
Metformina	Disminuyen la gluconeogénesis y glicogénesis.	<i>Psidium guajava</i> (Basha <i>et al.</i> , 2012)
Glipizida	Reducen los niveles de glucosa en sangre por regeneración de células β .	<i>Passiflora incarnata</i> (Gupta <i>et al.</i> , 2012)
Glibenclamida	Estimulan la secreción de insulina de células β .	
Glyvurida	Reducen los niveles de glucosa en sangre por regeneración de células β .	<i>Passiflora incarnata</i> (Gupta <i>et al.</i> , 2012)
Prandin	Estimulan la secreción de insulina de células β .	
Starlix		<i>G. sylvestre</i> , <i>G. inodorum</i> , <i>G. yunnanense</i> (Ramkumar <i>et al.</i> , 2010) <i>Camellia sinensis</i> (Wang <i>et al.</i> , 2012)
Precose	Reducen la absorción de glucosa intestinal.	<i>Asystasia gangetica</i> (Reddy <i>et al.</i> , 2010) <i>Amaranthus viridis</i> (Kumar <i>et al.</i> , 2012) <i>Indigofera stachyodes</i> (Li <i>et al.</i> , 2011)
Glyset	Inhiben a la α -amilasa y α -glucosidasa.	
Januvia	Inician la liberación de insulina. Estimulan la síntesis y/o liberación de insulina. Mimetizan a la insulina.	<i>Passiflora incarnata</i> (Gupta <i>et al.</i> , 2012)
Actos	Disminuyen los niveles de glucosa en sangre.	<i>Passiflora incarnata</i> (Gupta <i>et al.</i> , 2012)
Avandia	Incrementan la utilización de la glucosa periférica.	

Apéndice 2. Fenoles totales en extractos crudos y limpios de las hojas de *J. spicigera*.

mg EAG/100g				
	Extractos limpios			Extractos Crudos
	Fracción H₂O	Fracción MeOH/H₂O	Suma de fracciones	
DEC-HC	114.20 ± 1.82 ^a	573.00 ± 4.84 ^a	687.20 ± 5.17 ^a	767.04 ± 7.95 ^a
DEC-SC	83.70 ± 1.39 ^b	108.60 ± 5.36 ^b	192.30 ± 5.54 ^b	509.91 ± 6.22 ^b
INF-SC	192.09 ± 9.10 ^c	39.97 ± 1.77 ^c	232.06 ± 9.27 ^c	422.74 ± 5.22 ^c
H₂O-SC	132.40 ± 2.27 ^d	45.65 ± 1.56 ^d	178.05 ± 2.75 ^b	220.72 ± 8.98 ^d
MeOH-SC	93.50 ± 4.54 ^c	142.55 ± 5.88 ^c	236.05 ± 7.43 ^c	492.41 ± 6.27 ^b
EtOH-SC	308.00 ± 4.27 ^f	178.05 ± 7.87 ^f	486.05 ± 8.95 ^d	618.62 ± 4.82 ^e
ACT-SC	153.05 ± 6.12 ^g	219.60 ± 4.25 ^g	372.65 ± 7.45 ^e	610.81 ± 8.32 ^e

DEC-HC, DEC-SC, Extracto por decocción de muestra húmeda y seca respectivamente. INF-SC, Extracto por infusión de muestra seca. H₂O-SC, MeOH-SC, EtOH-SC, ACT-SC, Extracto acuoso, metanol, etanol 70%, acetona 70% respectivamente, por ultrasonido. Los datos expresados son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar. Las letras mostradas como superíndice indican si existe diferencia significativa entre los datos por columna (p<0.05). Se usó un ANOVA y la prueba de Duncan para el análisis estadístico.

Apéndice 3. Flavonoides totales en equivalentes de (+)-catequina

Extracto	$\lambda = 405 \text{ nm}$			$\lambda = 490 \text{ nm}$			$\lambda = 515 \text{ nm}$		
	Fracción H ₂ O	Fracción MeOH/H ₂ O	Suma de Fracciones	Fracción H ₂ O	Fracción MeOH/H ₂ O	Suma de Fracciones	Fracción H ₂ O	Fracción MeOH/H ₂ O	Suma de Fracciones
DEC-HL	141.35 ± 2.83 ^a	234.00 ± 9.32 ^a	375.35 ± 9.74 ^a	66.45 ± 2.23 ^a	184.70 ± 7.73 ^a	251.15 ± 8.05 ^a	35.70 ± 1.38 ^a	93.70 ± 2.75 ^a	129.40 ± 3.07 ^a
DEC-SL	109.54 ± 4.42 ^b	50.00 ± 1.65 ^b	159.54 ± 4.72 ^b	64.67 ± 2.09 ^a	36.70 ± 0.91 ^b	101.37 ± 2.28 ^b	29.27 ± 1.18 ^b	17.23 ± 0.68 ^b	46.50 ± 1.36 ^b
INF-SL	315.45 ± 4.76 ^c	31.13 ± 1.36 ^c	346.58 ± 4.95 ^c	125.29 ± 4.03 ^b	26.91 ± 0.41 ^c	152.20 ± 4.05 ^c	74.12 ± 3.12 ^c	12.63 ± 0.57 ^c	86.75 ± 3.17 ^c
H₂O-SL	74.20 ± 3.34 ^d	99.40 ± 3.25 ^d	173.60 ± 4.66 ^d	26.38 ± 0.83 ^c	80.56 ± 1.39 ^d	106.94 ± 1.62 ^b	15.66 ± 0.79 ^d	42.35 ± 1.21 ^d	58.01 ± 1.45 ^d
MeOH-SL	88.25 ± 3.74 ^e	59.55 ± 2.33 ^e	147.80 ± 4.41 ^b	64.10 ± 2.01 ^a	67.36 ± 0.69 ^e	131.46 ± 2.12 ^d	49.45 ± 1.65 ^e	43.90 ± 0.92 ^d	93.35 ± 1.89 ^e
EtOH-SL	159.55 ± 6.83 ^f	101.85 ± 3.34 ^d	261.40 ± 7.95 ^e	100.45 ± 4.01 ^d	79.86 ± 1.39 ^d	180.31 ± 4.24 ^e	62.70 ± 2.75 ^f	55.30 ± 2.42 ^e	118.00 ± 3.67 ^f
ACT-SL	104.65 ± 4.24 ^b	79.30 ± 2.83 ^f	183.95 ± 5.10 ^d	63.20 ± 1.39 ^a	102.01 ± 4.17 ^f	165.21 ± 4.39 ^f	38.60 ± 1.21 ^a	70.65 ± 3.46 ^f	109.25 ± 3.67 ^g

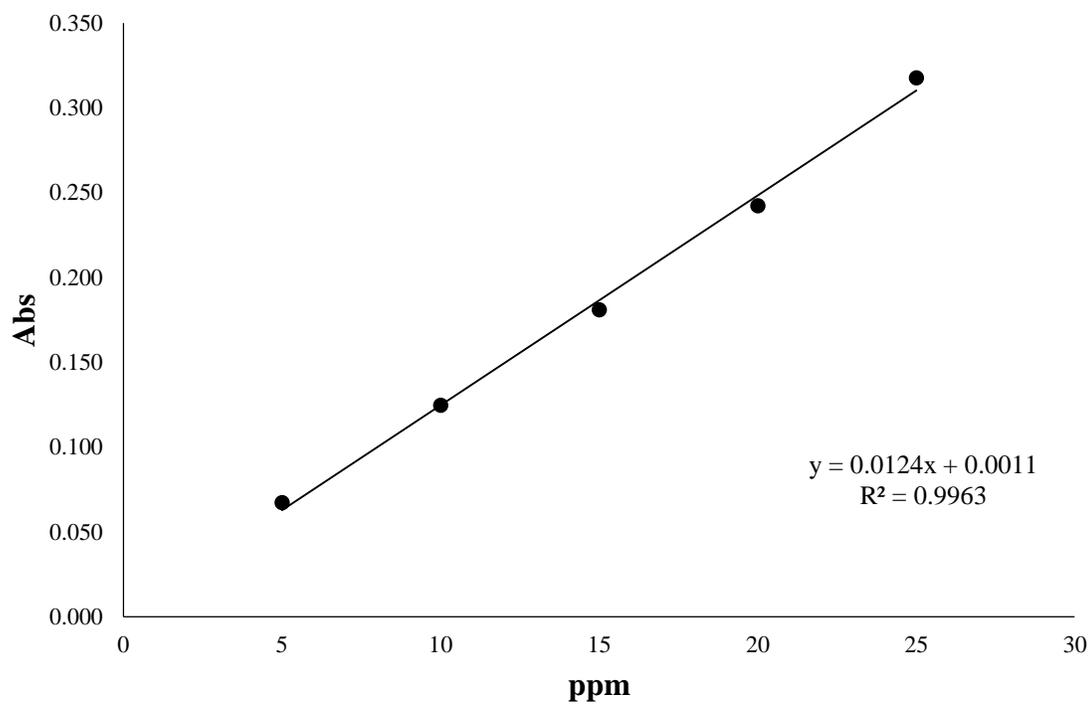
DEC-HL, DEC-SL, Extracto por decocción de muestra húmeda y seca respectivamente. INF-SL, Extracto por infusión a partir de muestra seca. H₂O-SL, MeOH-SL, EtOH-SL, ACT-SL, Extracto acuoso, metanol, etanol 70%, acetona 70% respectivamente, por ultrasonido. Los datos expresados son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar. Las letras mostradas como superíndice para cada columna representan los datos que son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Se usó un ANOVA y la prueba de Duncan para el análisis estadístico.

Apéndice 4. Flavonoides totales en equivalentes de quercetina.

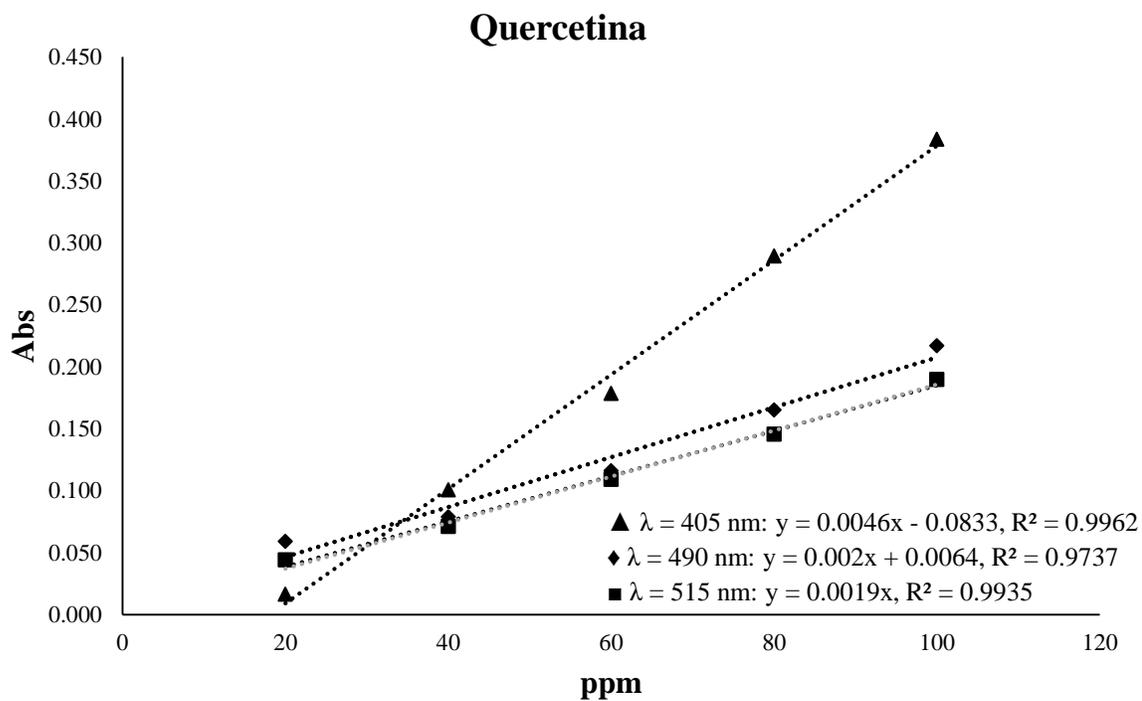
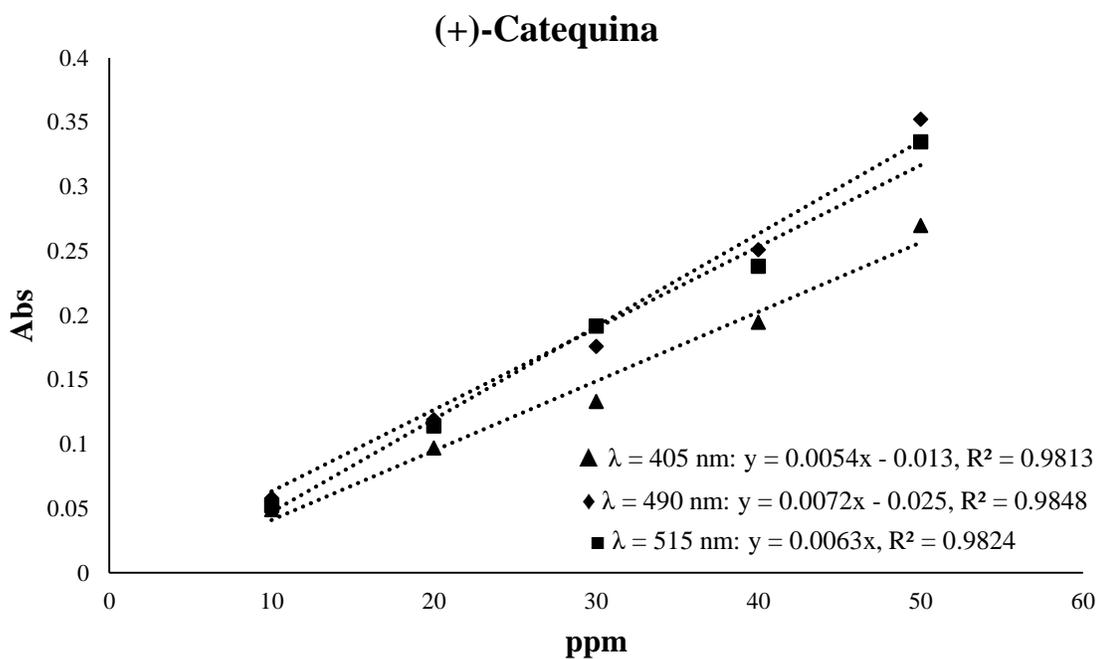
Extracto	$\lambda = 405 \text{ nm}$			$\lambda = 490 \text{ nm}$			$\lambda = 515 \text{ nm}$		
	Fracción H ₂ O	Fracción MeOH/H ₂ O	Suma de Fracciones	Fracción H ₂ O	Fracción MeOH/H ₂ O	Suma de Fracciones	Fracción H ₂ O	Fracción MeOH/H ₂ O	Suma de Fracciones
DEC-HL	242.35 ± 3.32 ^a	427.50 ± 7.64 ^a	669.85 ± 8.33 ^a	160.65 ± 5.20 ^a	508.00 ± 7.64 ^a	668.65 ± 9.24 ^a	118.40 ± 4.56 ^a	310.50 ± 8.04 ^a	428.90 ± 9.24 ^a
DEC-SL	194.06 ± 5.19 ^b	80.53 ± 1.94 ^b	274.59 ± 5.54 ^b	165.56 ± 7.53 ^a	109.71 ± 3.27 ^b	275.27 ± 8.21 ^b	96.98 ± 3.91 ^b	57.14 ± 2.26 ^b	154.12 ± 4.51 ^b
INF-SL	468.58 ± 5.64 ^c	58.37 ± 1.60 ^c	526.95 ± 5.87 ^c	350.16 ± 8.09 ^b	74.47 ± 1.49 ^c	424.63 ± 8.22 ^c	245.89 ± 6.77 ^c	41.86 ± 1.90 ^c	287.75 ± 7.03 ^c
H₂O-SL	117.66 ± 3.92 ^d	193.10 ± 3.82 ^d	310.76 ± 5.47 ^d	63.60 ± 3.00 ^c	211.50 ± 5.00 ^d	275.10 ± 5.83 ^b	51.92 ± 2.65 ^d	140.35 ± 4.02 ^d	192.27 ± 4.81 ^d
MeOH-SL	180.05 ± 4.40 ^e	146.35 ± 2.74 ^e	326.40 ± 5.17 ^d	152.35 ± 7.22 ^d	164.00 ± 2.50 ^e	316.35 ± 7.64 ^d	164.05 ± 5.48 ^e	145.60 ± 3.04 ^d	309.65 ± 6.26 ^e
EtOH-SL	263.75 ± 8.01 ^f	196.00 ± 3.92 ^d	459.75 ± 8.92 ^e	283.15 ± 2.89 ^e	209.00 ± 5.00 ^d	492.15 ± 5.77 ^e	207.90 ± 4.02 ^f	183.35 ± 5.48 ^e	391.25 ± 6.80 ^f
ACT-SL	199.25 ± 4.98 ^b	169.55 ± 3.32 ^f	368.80 ± 5.99 ^f	149.00 ± 5.00 ^d	289.00 ± 7.64 ^f	438.00 ± 9.13 ^c	128.05 ± 4.02 ^a	234.20 ± 6.96 ^f	362.25 ± 8.04 ^g

DEC-HL, Extracto por decocción de muestra húmeda. DEC-SL, Extracto por decocción de muestra seca. INF-SL, Extracto por infusión de muestra seca. H₂O-SL, MeOH-SL, EtOH-SL, ACT-SL, Extracto acuoso, metanol, etanol 70%, acetona 70%, respectivamente por ultrasonido. Los datos expresados son el promedio de tres mediciones ± desviación estándar. Las letras mostradas como superíndice para cada columna representan los datos que son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Se usó un ANOVA y la prueba de Duncan para el análisis estadístico.

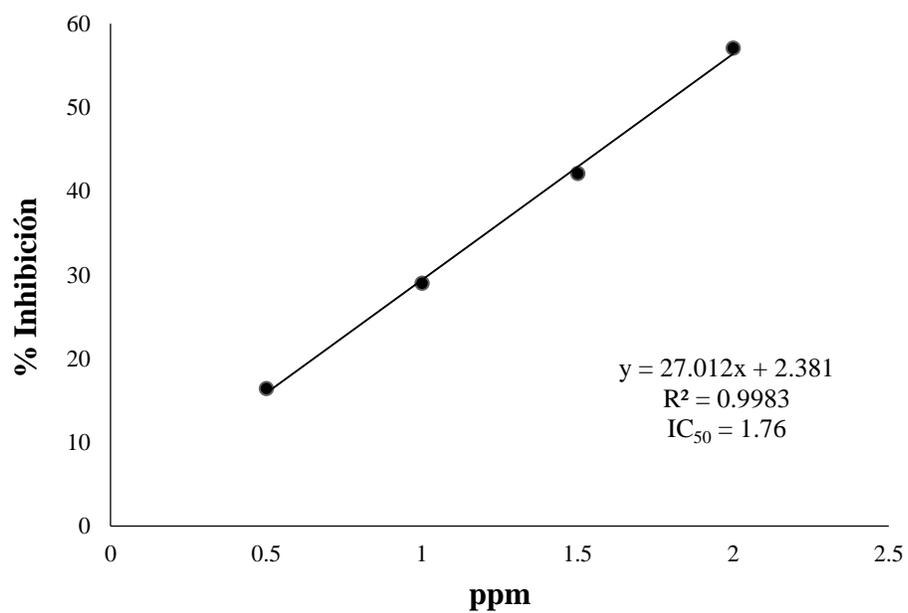
Apéndice 5. Curva de calibración en equivalentes de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.



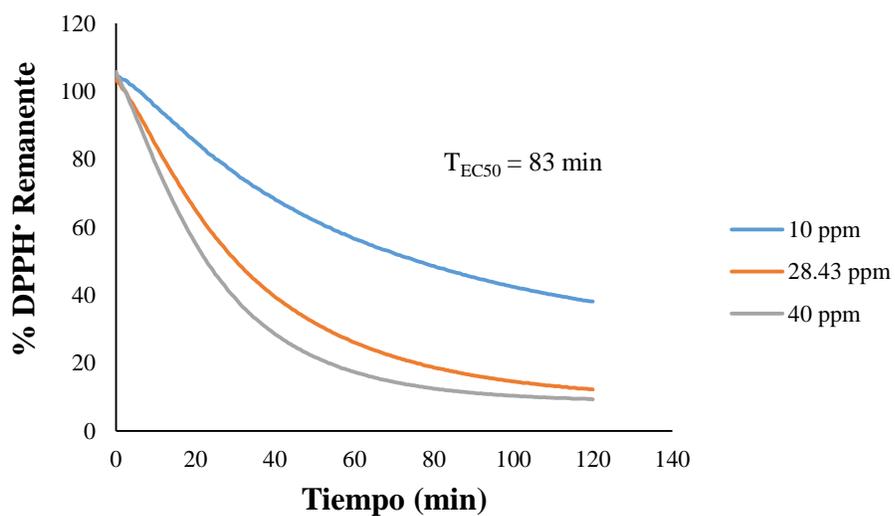
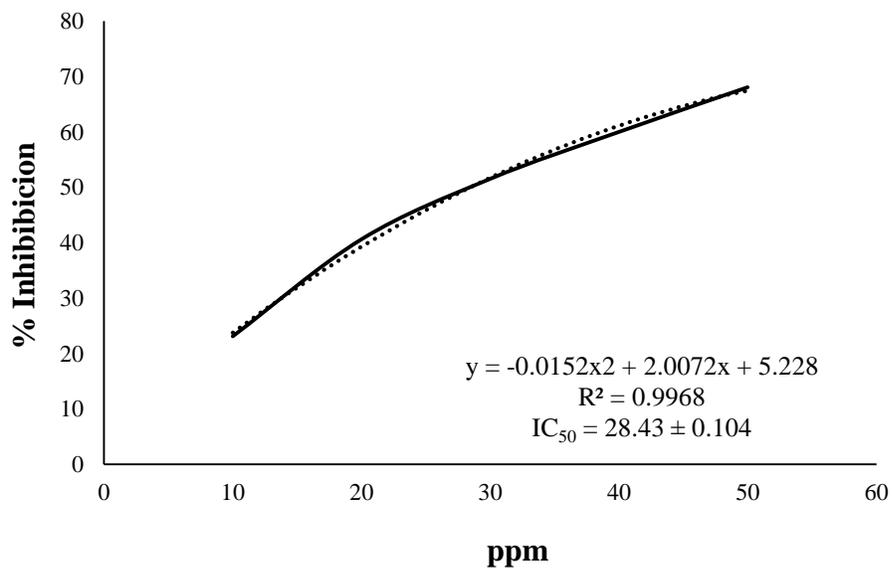
Apéndice 6. Curvas de calibración para la cuantificación de flavonoides totales en equivalentes de (+)-catequina y quercetina.



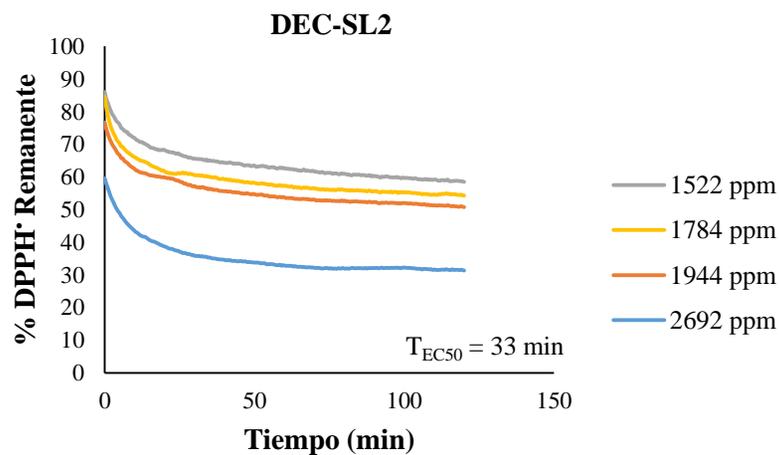
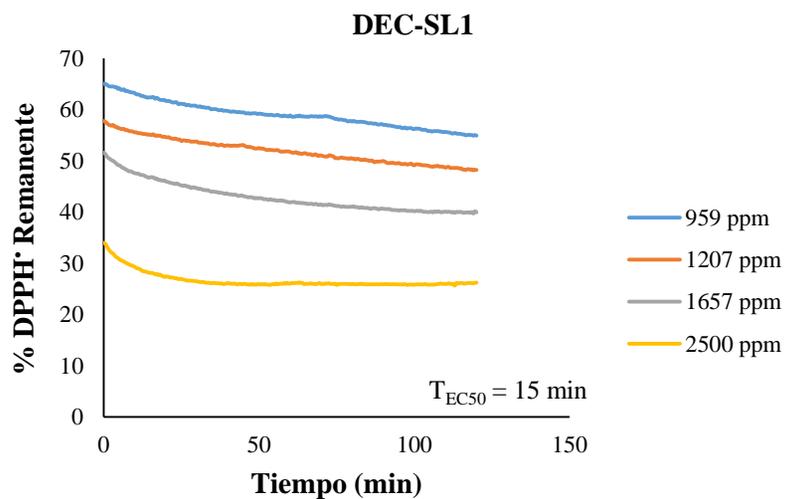
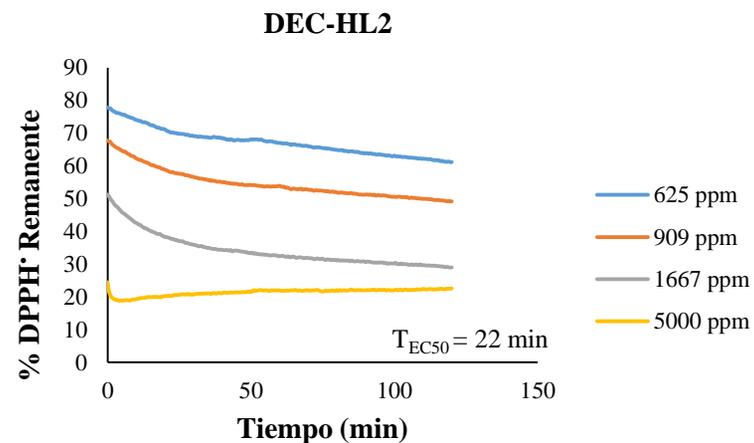
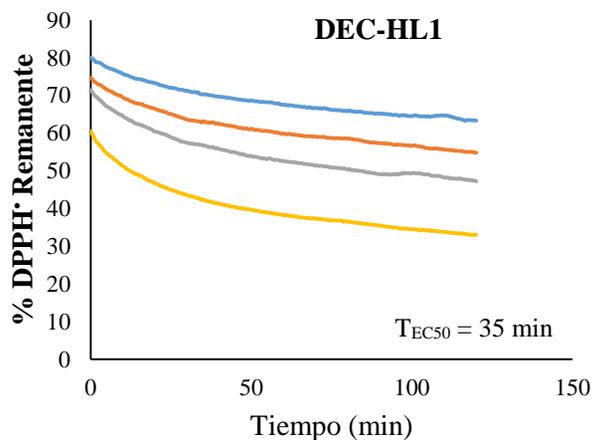
Apéndice 7. Curva de calibración en equivalentes de ácido gálico para la evaluación de la actividad antirradicalar frente al DPPH[•].

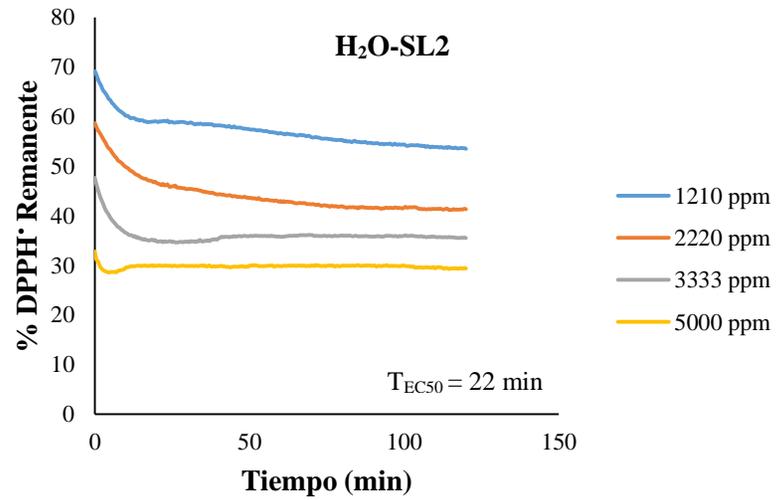
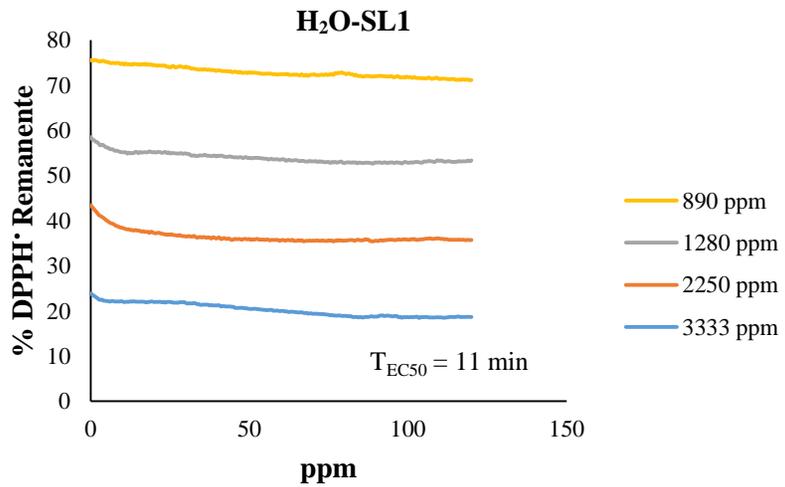
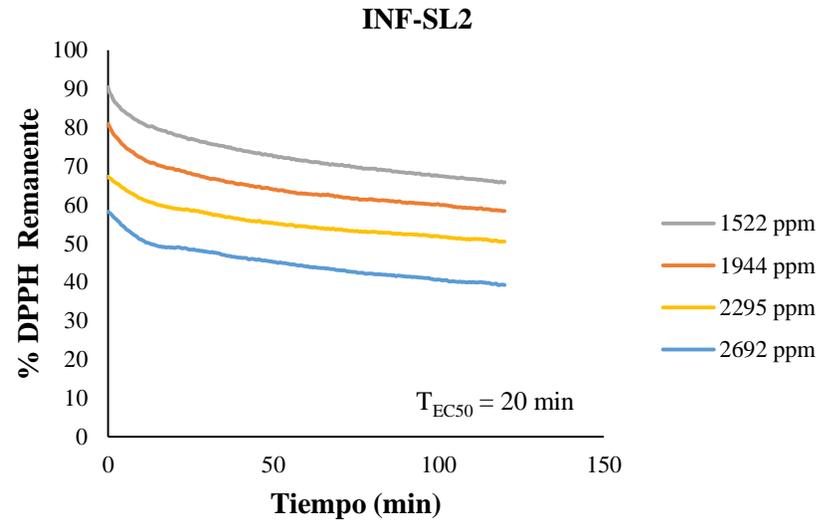
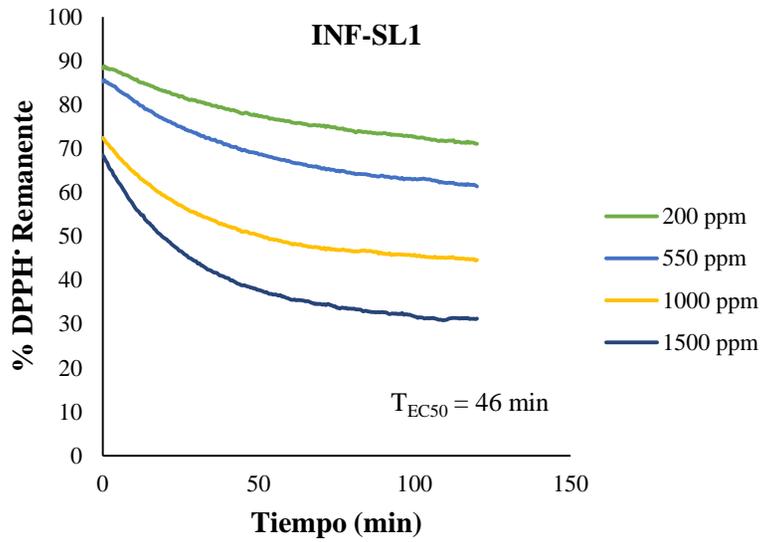


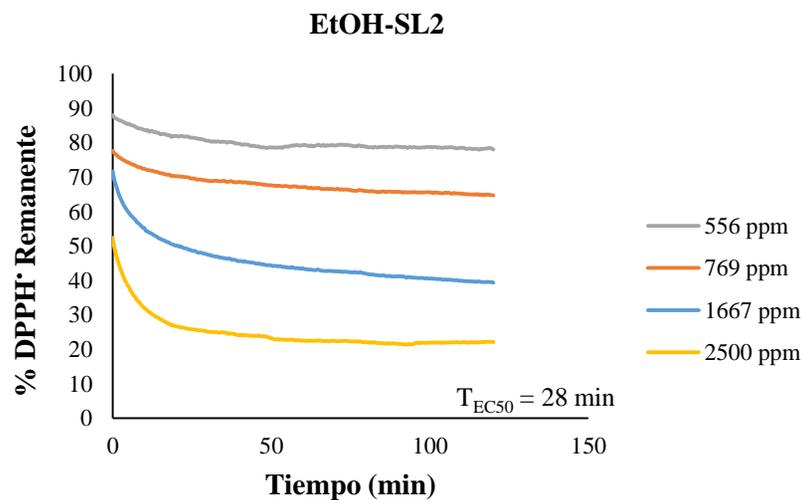
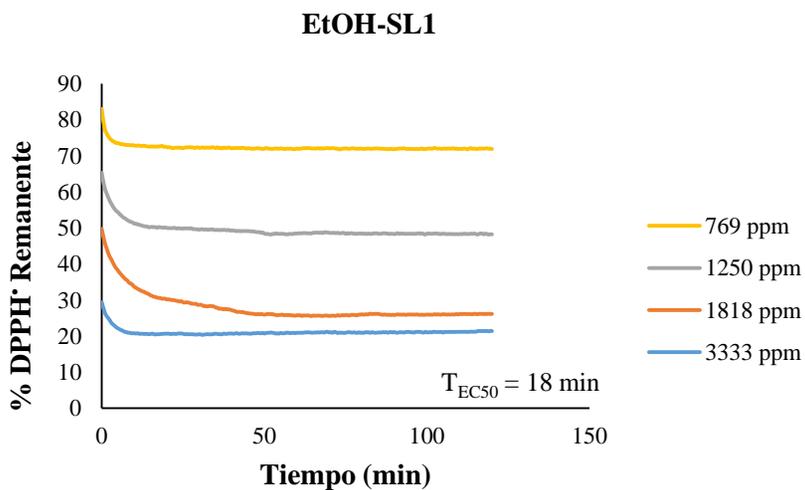
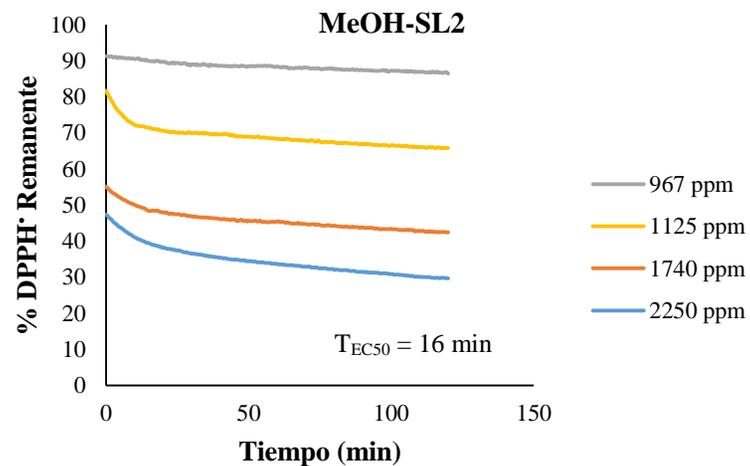
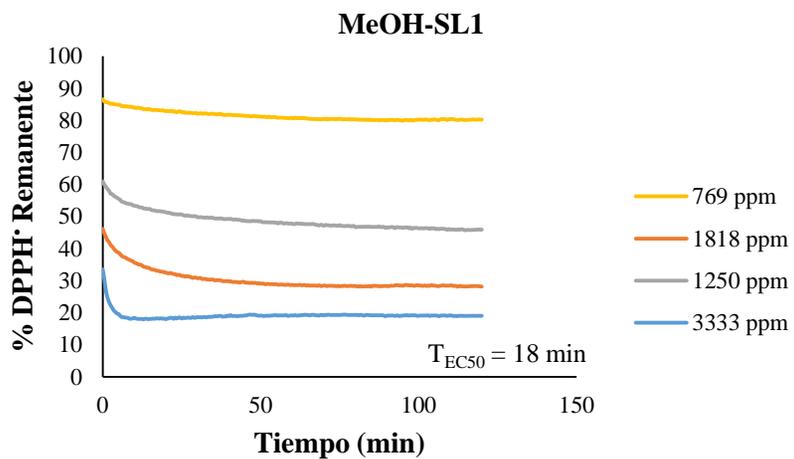
Apéndice 8. IC₅₀ del BHT para la evaluación de la actividad antirradicalar frente al DPPH'.

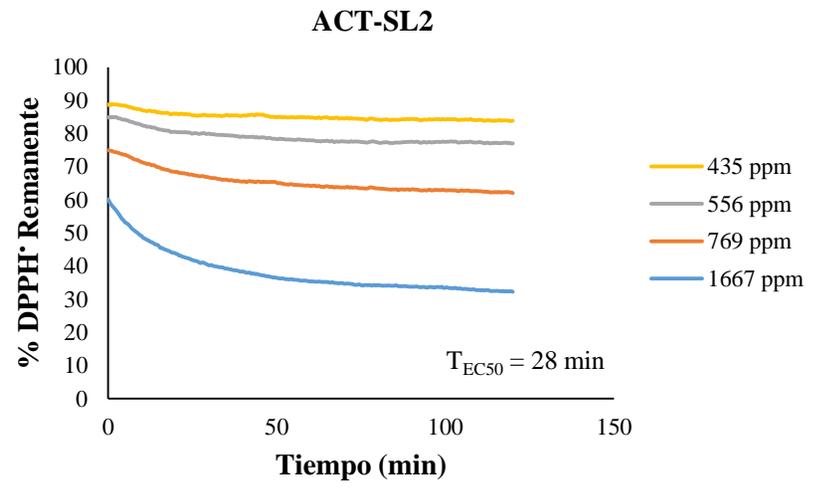
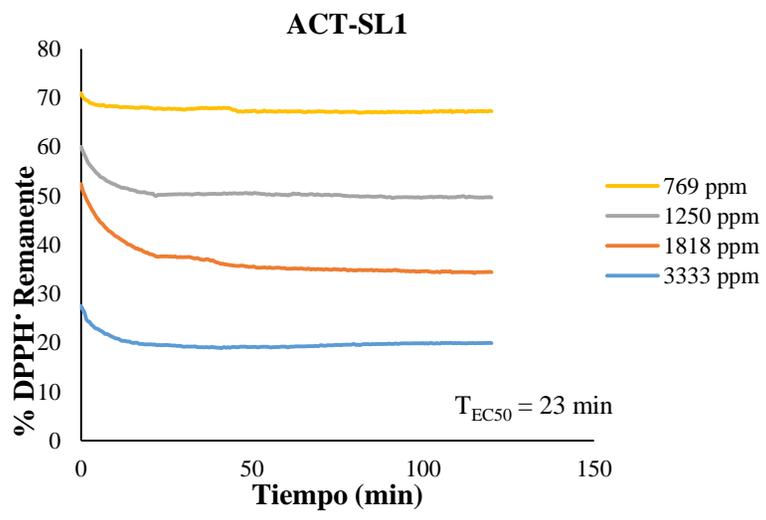


Apéndice 9. T_{EC50} de los extractos limpios de las hojas de *J. spicigera* frente al DPPH'.

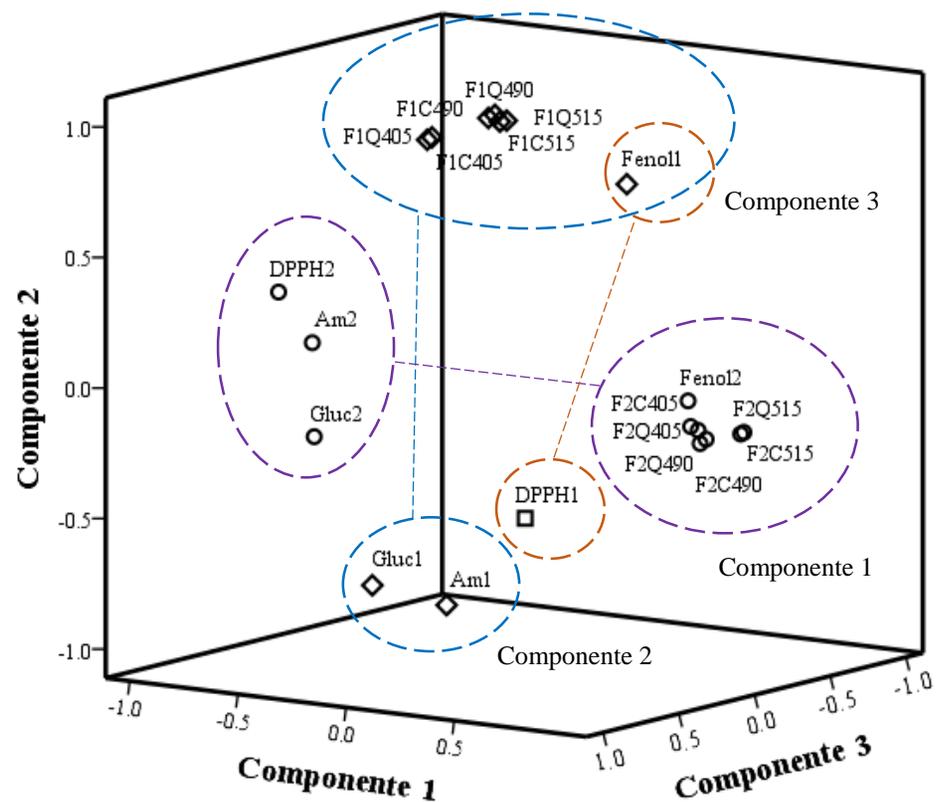
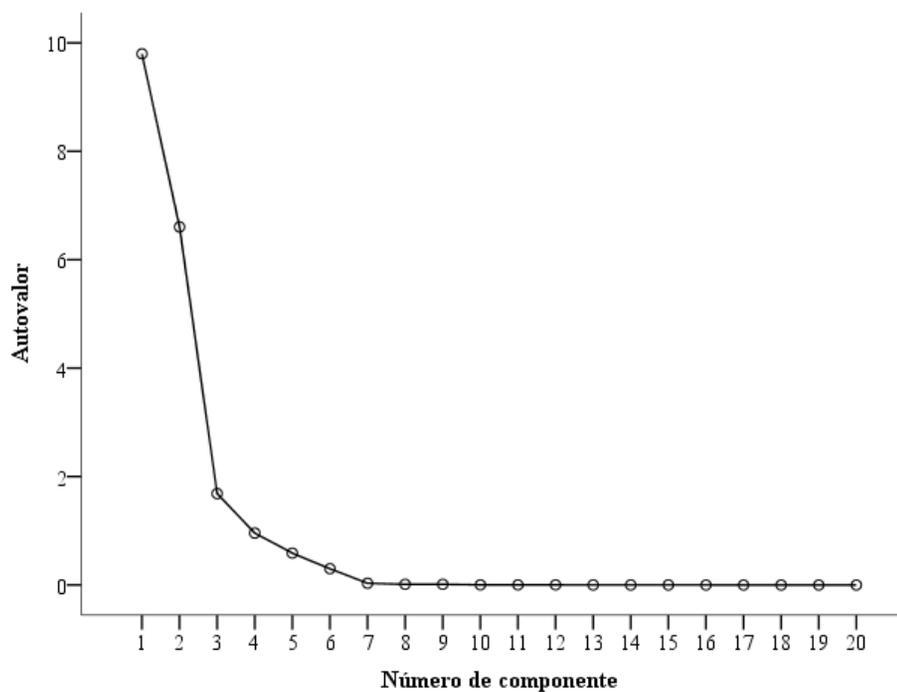








Apéndice 10. Gráficos de extracción de componentes principales.



○ Componente 1, ◇ Componente 2 y □ Componente 3. Fenol1 y Fenol2 corresponde a las correlaciones del contenido de fenoles totales fracción H₂O y MeOH/H₂O respectivamente. El contenido de flavonoides en equivalentes de quercetina para la fracción H₂O y MeOH/H₂O a 405 nm se representó como F1Q405 y F2Q405, F1Q490 y F2Q490 para la fracción H₂O y H₂O/MeOH respectivamente a 490 nm, F1Q515 y F2Q515 para la fracción H₂O y H₂O/MeOH respectivamente a 515 nm. El contenido de flavonoides en equivalentes de catequina para la fracción H₂O y H₂O/MeOH a 405 nm se representó como F1C405 y F2C405 respectivamente, F1C490 y F2C490 para la fracción H₂O y H₂O/MeOH respectivamente a 490 nm, F1C515 y F2C515 para la fracción H₂O y H₂O/MeOH respectivamente a 515 nm.

Capítulo 9. Anexos

Anexo 1. Medicamentos orales para el tratamiento de la diabetes Tipo 2.

Clase	Medicamentos orales	Efecto	Ventajas	Desventajas
Biguanidas	Metformina	Funciona impidiendo que el páncreas produzca glucosa y ayudando a que más glucosa entre en la célula.	Bajo riesgo de hipoglucemia. No causa aumento de peso. No eleva la presión arterial. Podría disminuir el colesterol LDL. Podría disminuir triglicéridos. Bajo costo.	Alto riesgo de náusea y diarrea. No pueden tomarlo personas que tienen enfermedad renal o insuficiencia cardíaca. Debe tomarse 2 ó 3 veces al día.
Sulfonilureas	Glipizida Glibenclamida Gliburida	Ayuda al páncreas a producir más insulina.	Actúa con rapidez. No eleva la presión arterial. No eleva el colesterol LDL. Bajo costo. Debe tomarse 1 ó 2 veces al día.	Aumento de peso promedio aprox. 2 a 5 kg. Alto riesgo de hipoglucemia, especialmente con la gliburida.
Meglitinidas	Prandin Starlix	Ayuda al páncreas a producir más insulina.	Actúa con rapidez. No eleva el colesterol LDL. Prandin (repaglinida) podría disminuir los triglicéridos.	Prandin (repaglinida) tiene alto riesgo de hipoglucemia y aumento de peso. Starlix (nateglinida) no disminuye los niveles de glucosa con tanta eficacia como otros medicamentos. Debe tomarse 3 veces al día. Mayor costo.
Inhibidores de la α -glucosidasa	Precose Glyset	Funciona disminuyendo la rapidez de absorción de glucosa por los intestinos.	Bajo riesgo de hipoglucemia en comparación con otros fármacos. No causa aumento de peso. Disminuye los triglicéridos.	No disminuye los niveles de glucosa con tanta eficacia como la mayoría de los otros fármacos.

Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4	Januvia	Funciona ayudando al páncreas a liberar insulina.	<p>No eleva el colesterol LDL.</p> <p>Bajo riesgo de hipoglucemia. No causa aumento de peso. Pocos efectos secundarios conocidos. Debe tomarse 2 veces al día.</p>	<p>Alto riesgo de náuseas y diarrea, aunque no tanto como la metformina. Debe tomarse 3 veces al día. Mayor costo. No baja el azúcar sanguíneo con tanta eficacia como otros fármacos. Es nuevo se sabe poco sobre los posibles efectos secundarios. Es posible que funcione sólo como un segundo medicamento. Mayor costo. Mayor riesgo de insuficiencia cardíaca. Aumento de peso promedio aprox. 2 a 5 kg. Mayor riesgo de edema (retención de líquidos).</p>
	Actos Avandia	Funciona ayudando a las células a utilizar la glucosa.	<p>Bajo riesgo de hipoglucemia. Puede elevar ligeramente el colesterol HDL. Actos (pioglitazona) podría disminuir los triglicéridos. Debe tomarse 1 ó 2 veces al día.</p>	<p>Mayor riesgo de anemia. Eleva el colesterol LDL. Avandia aumenta los triglicéridos y podría aumentar el riesgo de un ataque al corazón. Raro riesgo de causar problemas del hígado. No actúa con rapidez. Mayor costo.</p>

El Anexo 1 se tomó parcialmente de Consumer Reports (Best Buy Drugs), <http://www.consumerreports.org/health/resources/pdf/best-buy-drugs/DbtesSp5Jan112008final.pdf> (Accesado Febrero 2013).