



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LA RAÍZ DE TEJOCOTE
*CRATAEGUS MEXICANA***

TESIS

QUE PRESENTA

ANA BERENICE ALVAREZ CORTÉS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

**ASESOR TÉCNICO: M. EN C. Q. ROSARIO TAVERA
HERNANDEZ**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

VOCAL: Profesor: MARIA AMANDA GALVEZ MARISCAL

SECRETARIO: Profesor: GUILLERMINA YAZMIN ARELLANO SALAZAR

1er. SUPLENTE: Profesor: ERNESTO SANCHEZ MENDOZA

2° SUPLENTE: Profesor: HIRAM FERNANDO RAMIREZ CAHERO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LAB 2- 10, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

(NOMBRE Y FIRMA)

SUPERVISOR TÉCNICO: M. en C. ROSARIO TAVERA HERNÁNDEZ

(NOMBRE Y FIRMA)

SUSTENTANTE: ANA BERENICE ALVAREZ CORTÉS

(NOMBRE Y FIRMA)

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este proyecto fue financiado por:

Proyecto SEP-CONACyT Investigación científica básica NO° CY-253979:
“Productos naturales como agentes antitumorales”.

Al Sistema Nacional de Investigadores-CONACyT por el apoyo del estímulo económico como Ayudante de Investigador Nacional nivel III (EXP: Ayte. 15657).

A la Universidad Nacional Autónoma de México, ya que desde el momento de mi ingreso al nivel bachillerato ha cambiado mi perspectiva y mi forma de pensar, ha abierto mi mente a un mundo de posibilidades para contribuir a la nación con lo aprendido, además de brindarme las herramientas para mi desarrollo personal en todos los ámbitos.

A la Facultad de Química y el Instituto de Química de la UNAM, instituciones que ofrecen un nivel de enseñanza y oportunidad de crecimiento invaluable. Así mismo, agradezco a los profesionales que dan sentido a la investigación nacional y a la formación de sus alumnos; particularmente al Dr. Manuel Jiménez Estrada, cuyo apoyo, interés, tiempo y dedicación incondicional han sido un pilar en mi desarrollo profesional. De la misma forma, agradezco a la M. en C. Rosario Tavera Hernández todo su apoyo en cada etapa de este proyecto, por sus consejos académicos y la guía que ha sido para el laboratorio 2-10. Al técnico académico M. en C. Antonio Nieto Camacho del Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM, por su invaluable y pronto apoyo en la realización de los análisis biológicos de este proyecto, gracias por su tiempo. Así mismo, agradezco el apoyo experimental y la propuesta del presente proyecto del Dr. Rubén Marroquín Segura, de la unidad multidisciplinaria de investigación experimental de la Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza.

ÍNDICE

ÍNDICE	II
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE GRÁFICOS	V
INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE ANEXOS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	X
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones en la salud humana ...	4
3.2 Acción de productos naturales bioactivos en el tratamiento y prevención de cáncer, diabetes y enfermedades intestinales	6
3.3 Tejocote (<i>Crataegus mexicana</i>).....	10
3.3.1 Generalidades morfológicas.....	10
3.3.2 Etnobotánica y uso tradicional	11
3.3.3 Composición química y farmacología.....	12
4. JUSTIFICACIÓN	18
5. HIPÓTESIS	18
6. OBJETIVOS	19
6.1 Objetivo general.....	19
6.2 Objetivos particulares	19
7. METODOLOGÍA	20
7.1 Resumen gráfico de la metodología.	20
7.2 Preparación del material vegetal	21
7.3 Extracción del material vegetal	21

7.4 Evaluación de extractos mediante cromatografía en capa fina.....	21
7.5 Aislamiento, caracterización y actividad biológica de los compuestos 2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol (Compuesto A) y 2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol (Compuesto B).....	22
7.5.1 Aislamiento.....	22
7.5.2 Caracterización	23
7.5.3 Pruebas biológicas.....	23
7.6 Aislamiento, caracterización y actividad biológica de las fracciones del extracto de acetona activas PG-P 1, PG-P 2 y PG-P 3.	24
7.6.1 Obtención.....	24
7.6.2 Caracterización	25
7.6.3 Pruebas biológicas.....	25
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
8.1 Preparación del material vegetal	27
8.2 Extracción del material vegetal	27
8.3 Evaluación de extractos mediante cromatografía en capa fina.....	28
8.4 Aislamiento, caracterización y actividad biológica de los compuestos 2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol (A) y 2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol (B, propuesta)	31
8.4.1 Aislamiento.....	31
8.4.2 Caracterización del Compuesto A (2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol).....	32
8.4.3 Caracterización del Compuesto B (2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol)	39
8.4.4 Pruebas biológicas del Compuesto A (2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol)	45
8.4.5 Pruebas biológicas del Compuesto B (2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol)	47

8.5 Aislamiento, caracterización y actividad biológica de las fracciones del extracto de acetona PG-P 1, PG-P 2 y PG-P 3.	51
8.5.1 Obtención.....	51
8.5.2 Caracterización	54
8.5.3 Pruebas biológicas.....	56
9. CONCLUSIONES	62
10. BIBLIOGRAFÍA.....	63
11. ANEXOS	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 3.3.1-1 (A) Árbol de tejocote, <i>Crataegus mexicana</i> DC. (B) Flores de tejocote. (C) Fruto de tejocote. (D) Raíz pivotante.	11
Figura 3.3.3-1 Ácidos cítrico (A) y ascórbico (B) , respectivamente.....	13
Figura 3.3.3-2 Ácido ursólico (A) y oleanólico (B)	13
Figura 3.3.3-3 Ácido clorogénico (A) y cafeico (B)	14
Figura 3.3.3-4 Pinoresinol (A) y matairesinol (B)	14
Figura 3.3.3-5 Quercetin-3-O-galactósido.	15
Figura 3.3.3-6 Ejemplos de dibenzofuranos biológicamente activos.	16
Figura 3.3.3-7 Ejemplos de fitoalexinas presentes en diferentes familias vegetales, incluida la Rosaceae.	17
Figura 8.1-1 Raíz de tejocote tras primer corte (A) . Raíz de tejocote, corte transversal (B) . Tamaño final de partícula (C)	27
Figura 8.2-2 Extracto de hexano (A) . Extracto de AcOEt (B) . Extracto de MeOH (C) . Extracto de acetona (D)	28
Figura 8.3-1 Cromatografía en capa fina de: (A) extractos de Hexano (UV $\lambda=365$ nm). Referencia acuosa (R) comparada con extractos de AcEOt (a), MeOH (m) y Acetona (c), empleando dos condiciones: 1) <i>SE-baja polaridad (hexano 7:3 AcOEt)</i> : UV $\lambda=365$ nm (B) , revelado con sulfato cérico (C) y revelado con vainillina (D) ; 2) <i>SE-alta polaridad (AcOEt 7:3 MeOH)</i> : revelado con sulfato Cérico (E) y revelado con vainillina (F)	30

Figura 8.4.1-1 Cromatografía en capa fina de las fracciones 184-192 y 243-252 con un sistema de elución (SE) de baja polaridad; revelado con sulfato cérico (A) y vainillina fosfórica (B)	31
Figura 8.4.1-2 Cristales del Compuesto A observados al microscopio óptico a través de un haz de luz (A) e iluminación superficial (B)	32
Figura 8.4.2-1 Estructura del Compuesto A, 2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol.	32
Figura 8.4.2.1-1 Estructura del compuesto A obtenida por DRX (2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol).	33
Figura 8.4.2.4-1 Correlaciones observadas en análisis COSY, Compuesto A.	38
Figura 8.4.2.4-2 Correlaciones observadas en análisis HSQC, Compuesto A.	38
Figura 8.4.2.4-3 Correlaciones observadas en análisis HMBC, Compuesto A.	38
Figura 8.4.3-1 Estructura del Compuesto B, 2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol.	39
Figura 8.4.3.3-1 Correlaciones observadas en análisis COSY, Compuesto B.	43
Figura 8.4.3.3-2 Correlaciones observadas en análisis HSQC, Compuesto B.	43
Figura 8.4.3.2-3 Correlaciones observadas en análisis HMBC, Compuesto B.	44
Figura 8.5.1-1 Perfil cromatográfico de los extractos de acetona obtenidos del primer (A) y segundo (B) lote de raíz. SE AcOEt 9:1 CH ₂ Cl ₂	51
Figura 8.5.1-2 Perfil cromatográfico del fraccionamiento de los extractos de acetona mediante columna tipo <i>flash</i>	52
Figura 8.5.1-3 Perfil cromatográfico del fraccionamiento de los extractos de acetona mediante placa preparativa. Fracciones PG-P 1 (A) , PG-P 2 (B) y PG-P 3 (C) . SE AcOEt 9:1 CH ₂ Cl ₂	53
Figura 8.5.2.2-1 Ejemplo de la estructura de un tanino, 1,2,3,4,6-pentagaloiil-glucosa, proveniente de granada (<i>Punica granatum</i>) con peso molecular de 940.67 g/mol ³⁶	56

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 8.4.4.1-1 Efecto antioxidante del Compuesto A mediante la reducción de los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y ácido tiobarbitúrico (TBARS), a diferentes concentraciones.	46
Gráfica 8.4.4.2-1 Capacidad de inhibición de la enzima glucosidasa del Compuesto A, a diferentes concentraciones.	47

Gráfica 8.4.5.1-1 Efecto antioxidante del Compuesto B mediante la reducción de los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y ácido tiobarbitúrico (TBARS), a diferentes concentraciones, en tejido de cerebro de ratón.....	48
Gráfica 8.4.5.3-1 Capacidad de inhibición de la enzima glucosidasa del Compuesto B, a diferentes concentraciones.....	49
Gráfica 8.4.5.4-1 Efecto del Compuesto B en el crecimiento de líneas celulares cancerosas a 50 µg/mL. *FGH: Fibroblastos gingivales humanos sanos.....	50
Gráfica 8.5.3.1-1 Efecto antioxidante de las fracciones PG-P 1, 2 y 3 mediante la reducción del radical DPPH, a diferentes concentraciones.	57
Gráfica 8.5.3.1-2 Efecto antioxidante de las fracciones PG-P 1, 2 y 3 mediante la reducción del radical TBARS, a diferentes concentraciones.	58
Gráfica 8.5.3.2-1 Efecto antiinflamatorio de las fracciones PG-P 1, 2 y 3 a una concentración de 17.86 mg/kg.	58
Gráfica 8.5.3.3-1 Capacidad de inhibición de la enzima α-glucosidasa las fracciones PG-P 1, 2 y 3, a diferentes concentraciones.....	59
Gráfica 8.5.3.4-1 Efecto de las fracciones PG-P 1, 2 y 3 en el crecimiento de líneas celulares cancerosas a 50 µg/mL. *FGH: Fibroblastos gingivales humanos sanos.....	60
Gráfica 8.4.3.3-1 Efecto de la administración de las muestras en la motilidad intestinal. TMP: Extracto acetónico crudo.	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 8.4.2.1-1 Datos y parámetros del cristal del Compuesto A.	34
Tabla 8.4.2.4-1 Datos de ¹ H (500 MHz) y ¹³ C (500 MHz) para el Compuesto A (en MeOD).....	37
Tabla 8.4.3.3-1 Datos de ¹ H (500 MHz) y ¹³ C (500 MHz) para el Compuesto B (en MeOD).....	43

INDICE DE ANEXOS

Espectro 1. Espectro de infrarrojo del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC. Preparación de la muestra en película.	68
--	----

Espectro 2. Espectro de masas del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 3. Espectro de RMN- ¹ H (MeoD, 500 MHz) del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.....	69
Espectro 4. Espectro de RMN- ¹³ C (MeOD, 500 MHz) del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.....	69
Espectro 5. Experimento COSY del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 6. Experimento HSQC del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 7. Experimento HMBC del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 8. Espectro de infrarrojo del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC. Preparación de la muestra en película.	69
Espectro 9. Espectro de masas del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 10. Espectro de RMN- ¹ H (MeoD, 500 MHz) del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.....	69
Espectro 11. Espectro de RMN- ¹³ C (MeOD, 500 MHz) del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 12. Experimento COSY del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 13. Experimento HSQC del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 14. Experimento HMBC del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.....	69
Espectro 15. Espectro de infrarrojo de la fracción PG-P 1, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC. Preparación de muestra en película.	69
Espectro 16. Espectro de infrarrojo de la fracción PG-P 2, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC. Preparación de muestra en película.	69

Espectro 17. Espectro de infrarrojo de la fracción PG-P 3, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC. Preparación de muestra en película.	69
Espectro 18. Espectro de masas de la fracción PG-P 1, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 19. Espectro de masas de la fracción PG-P 2, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 20. Espectro de masas de la fracción PG-P 3, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 21. Espectro de RMN- ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz) de la fracción PG-P 1, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 22. Espectro de RMN- ¹³ C (CD ₃ OD, 300 MHz) de la fracción PG-P 1, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 23. Experimento HSQC (CD ₃ OD, 300 MHz) de la fracción PG-P 1, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 24. Espectro de RMN- ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz) de la fracción PG-P 2, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 25. Espectro de RMN- ¹³ C (CD ₃ OD, 300 MHz) de la fracción PG-P 2, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 26. Experimento HSQC (CD ₃ OD, 300 MHz) de la fracción PG-P 2, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 27. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de la fracción PG-P 3, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
Espectro 28. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz) de la fracción PG-P 3, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69

Espectro 29. Experimento HSQC (CDCl ₃ , 300 MHz) de la fracción PG-P 3, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de <i>Crataegus mexicana</i> DC.	69
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2-metil-amidinopropano
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Adenosin-5´-trifosfato
°C	Grados centígrados
CCF	Cromatografía en capa fina
CD1	Carácter dócil tipo 1
CD ₃ OD	Metanol deuterado
cm ⁻¹	Unidades de número de onda
D	Diámetro
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DRX	Espectroscopia de difracción de rayos X
EM	Espectrometría de masas
ENSANUT MC	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino
ENT	Enfermedades no transmisibles
ESI	Impacto electrónico
FGH	Fibroblastos gingivales humanos sanos
FTC	Fracciones de tejocote por cromatografía
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (por sus siglas en inglés)
Hex	Hexano
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IR	Espectroscopía infrarroja
L	Litros
m/z	Relación masa-carga
m ² /g	Unidades de superficie de absorción
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
msnm	Metros sobre el nivel del mar
PG-P 1, 2 y 3	Fracciones del extracto de acetona 1, 2 y 3
R	Referencia
RMN	Resonancia magnética nuclear

ROS	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)
SE	Sistema de elución
TMA-B	Tejocote Macerado lote "A-B" (hexano)
TMC-D- I-J	Tejocote Macerado lote "C, D, I y J" (acetato de etilo)
TME-F-K-L-Ñ-O	Tejocote Macerado lote "E, F, K, L, Ñ y O" (metanol)
TMG-H-M-N-P-Q	Tejocote Macerado lote "G, H, M, N, P y Q" (acetona)
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol
UV	Ultravioleta

1. RESUMEN

La dinámica y la forma de vida de las sociedades actuales están asociadas a un aumento en la incidencia de padecimientos y enfermedades. Los hábitos alimenticios pueden prevenir enfermedades o mejorar la calidad de vida de las personas, por lo que la investigación y el desarrollo de suplementos resultan de interés. En las plantas se puede encontrar una fuente de compuestos bioactivos con múltiples aplicaciones, incluyendo beneficios para la salud.

En el presente trabajo de investigación se estudió la raíz del tejocote (*Crataegus mexicana*), el cual es un árbol perteneciente a la familia Rosaceae que se encuentra distribuida en diversas partes del mundo. Varias de las partes de esta planta han sido ampliamente usadas en la medicina tradicional para tratar diferentes padecimientos como problemas del corazón⁶ y digestivos⁵, entre otros.

Como metodología, se fraccionaron los extractos crudos de acetato de etilo y acetona, se caracterizó a los productos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, y se evaluó su actividad antioxidante, antiproliferativa, antiinflamatoria, antidiabética e intestinal.

Se aislaron e identificaron dos dibenzofuranos naturales, que no han sido reportados con anterioridad, el compuesto 2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol (**A**) que presentó actividad antioxidante destacable; y el compuesto 2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol (**B**) que presentó actividad antioxidante y antidiabética importante. Así mismo, se obtuvieron tres fracciones acetónicas con actividad antioxidante, antidiabética y antiinflamatoria destacables.

Con este estudio se consiguió ampliar el conocimiento de la planta *Crataegus mexicana* CD, lo que justifica su uso etnobotánico, fomenta el cuidado y el conocimiento de los recursos naturales nacionales, y puede contribuir al desarrollo de suplementos.

2. INTRODUCCIÓN

El interés por mejorar la calidad de vida del ser humano se ha mantenido a lo largo de su historia y actualmente la investigación continúa. Hoy en día, la calidad de vida de la población en países emergentes, tales como México, sigue siendo baja. La presencia de enfermedades y padecimientos relacionados con estrés y malos hábitos de salud, como la diabetes, el cáncer y problemas cardiovasculares, van en aumento²¹. Por ello, el desarrollo de opciones saludables, como los suplementos, ha tomado importancia. Estos productos contienen compuestos bioactivos que pueden provenir de fuentes naturales y desempeñar beneficios a la salud, como formar parte de la prevención y tratamiento de enfermedades, al incluirlos en la dieta en sus diferentes presentaciones^{14, 42}.

Una fuente de compuestos o fracciones bioactivas son plantas, como el árbol del tejocote, *Crataegus mexicana*. Esta planta es de importancia farmacéutica y alimentaria debido a su efecto antidiabético, digestivo y cardiovascular² en el cuerpo humano. Actualmente se han identificado 36 flavonoides, 6 diferentes azúcares y 17 ácidos en hojas, frutos y corteza de esta planta⁵ con el objetivo de justificar las propiedades que le han sido atribuidas. Sin embargo, no existen estudios fitoquímicos de la raíz a pesar de que ésta posee efectos antidiabéticos² y gastrointestinales⁵.

Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto es realizar un estudio fitoquímico de la raíz del tejocote mediante la extracción del material vegetal con diferentes disolventes orgánicos, seguida del fraccionamiento de los extractos y la evaluación de su actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa, antidiabética e intestinal, para proponerlos como ingredientes activos en suplementos, de acuerdo con su estabilidad y propiedades químicas y sensoriales.

Como resultado, se obtuvieron tres fracciones acetónicas con actividad antioxidante, antidiabética y antiinflamatoria destacables. Así mismo, se aislaron e identificaron dos nuevos dibenzofuranos naturales, el compuesto 2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol (**A**) con actividad antioxidante destacable; y el compuesto 2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol (**B**), el cual presentó actividad

antioxidante y antidiabética importante. Debido a su polaridad, estos compuestos podrían incluirse en polvos para infusiones acuosas y las fracciones, al ser resinosas, podrían añadirse como extractos herbales en caramelos, por mencionar algunas aplicaciones.

En conclusión, los usos etnobotánicos de la raíz de tejocote están justificados por su composición y actividad biológica *in vitro*, lo que plantea el aprovechamiento, por ejemplo, de sus extractos como ingredientes activos en suplementos, tras ajustar su composición con compuestos patrón y determinar su toxicidad.

3. ANTECEDENTES

3.1 Productos naturales bioactivos y sus aplicaciones en la salud humana

Las enfermedades no transmisibles (ENT) han tomado gran importancia en el sector salud debido al aumento en su incidencia desde el siglo pasado. Dentro de dichas enfermedades, los problemas cardiovasculares, gastrointestinales y el cáncer representaban las principales causas de muerte en 2012¹¹.

De acuerdo con estudios del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportadas en octubre del 2017, las principales causas de muerte en México fueron enfermedades del sistema circulatorio (25.5%), enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas (17.5%), y tumores malignos (13 %) ²⁰, las cuales representan algunas de las ENT.

Las ENT se encuentran relacionadas con el actual estilo de vida y los hábitos que de ello se derivan. Por lo tanto, además de incluir actividad física y realizar revisiones médicas constantes, es importante mantener una dieta saludable. En 2016, se publicó la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT MC 2016), en la cual se establece que los principales factores que la población percibe como barreras a la hora de alimentarse saludablemente fueron (de mayor a menor): falta de dinero para comprar frutas y verduras (50.4%), falta de conocimiento para preparar alimentos saludables (38.4%), falta de tiempo para preparar o consumir alimentos saludables (34.4%) y preferencia por consumir bebidas azucaradas y platillos con alto contenido energético (31.6%)²¹. Es en este punto en que se observa un nicho de oportunidad para los derivados de productos naturales bioactivos, ya que éstos pueden suplir las deficiencias originadas por una alimentación y ritmo de vida inadecuados.

Los *productos naturales bioactivos* son compuestos químicos producidos por organismos vivos que ejercen un efecto biológico en otros organismos. Estos compuestos pueden ser integrales a la existencia cotidiana del organismo, pero tienen una actividad fortuita en sistemas biológicos no relacionados. Este último escenario se ejemplifica mediante la búsqueda de nuevas aplicaciones

bioactivas en el desarrollo de fitofármacos o suplementos¹³, por mencionar algunos.

Los productos naturales bioactivos pueden emplearse como ingredientes activos en el desarrollo de *suplementos*, los cuales son complementos alimenticios con uno o más ingredientes activos, a una concentración inusualmente más alta que en los alimentos comunes, combinados con una matriz de soporte no activo para suplir una deficiencia de nutrientes y microelementos en el cuerpo derivados de una dieta inadecuada o mal funcionamiento del organismo¹⁴, además de ser productos nutricionales que proporcionan beneficios médicos y a la salud del que los consume, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades, debido a la presencia de ingredientes activos específicos en ellos¹².

Para obtener este tipo de productos es necesario considerar que la selección, el análisis y la identificación de un único compuesto bioactivo obtenido por síntesis química, biotransformación o incluso a partir de una matriz natural, son una cuestión compleja en el descubrimiento de suplementos. Los extractos crudos de productos naturales o parcialmente purificados pueden contener hasta miles de componentes. La dificultad radica en el aislamiento de esos componentes traza de la matriz natural, la purificación con una alta recuperación y una técnica analítica altamente sensible y reproducible para hacer posible la elucidación estructural de la entidad química¹⁴.

Como resultado de la caracterización y funcionalidad, el o los compuestos o mezclas activos pueden formar parte de suplementos. Posteriormente, estos compuestos pueden obtenerse mediante síntesis química u otros procedimientos, o desarrollar algún derivado funcional de los compuestos originales¹⁴.

En el caso del tejocote, existen productos como tinturas, tabletas, tés y extractos acuosos de hojas, flores y el fruto⁵, los cuales pueden clasificarse como suplementos.

La importancia de los productos naturales radica en que aproximadamente el 60% de los nuevos medicamentos para el tratamiento del cáncer y el 75% de nuevos medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades infecciosas son de origen natural. Más del 25% de los productos farmacéuticos de venta

con receta se derivan de plantas y el potencial de este rico recurso es inmenso, ya que solo alrededor del 1% de los medicamentos utilizados en las culturas tradicionales se han evaluado científicamente⁵. En Norteamérica los productos naturales para la salud utilizados en el tratamiento de problemas relacionados con el corazón se consideran entre los más importantes y algunos de ellos se elaboran con especies de *Crataegus*⁵. La obtención y síntesis de algunos ingredientes activos provenientes de fuentes naturales se validan con numerosas pruebas de laboratorio y ensayos clínicos que demuestren su eficacia en el tratamiento o la prevención de diferentes enfermedades, como las ENT, al desarrollarse y clasificarse como fármacos.

Sin embargo, los productos naturales no se encuentran bajo ninguna regulación o control que aseguren su uso, por lo que la responsabilidad de la seguridad y calidad de estos productos dependen únicamente de sus fabricantes⁴⁹. Debido a lo anterior, es necesario establecer una normatividad válida y vigente para asegurar el uso de productos naturales y sus derivados, con el objeto de aprovechar sus beneficios para favorecer la prevención y tratamiento de múltiples padecimientos, debido a que su prevalencia aún se mantiene. Por ejemplo, en México, las defunciones por ENT no han disminuido²¹; sus índices de incidencia siguen siendo altos, y a pesar de las políticas gubernamentales, aún no se ha logrado fomentar suficientemente la adopción de modos de vida más saludables y la prestación de servicios de atención de salud equitativos¹¹. Por ello, el desarrollo de productos preventivos para la conservación de la salud es de importancia en este país.

3.2 Acción de productos naturales bioactivos en el tratamiento y prevención de cáncer, diabetes y enfermedades intestinales

Como se mencionó anteriormente, los productos naturales pueden ejercer múltiples efectos en el organismo humano para contrarrestar la incidencia de diferentes enfermedades, estos efectos son atribuidos a sus propiedades antioxidantes²⁶ e inhibidoras de enzimas²⁸.

En términos nutricionales y bioquímicos, un antioxidante sugiere un compuesto capaz de contrarrestar la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que han sido generadas metabólicamente²².

Ya que múltiples estudios han demostrado que las ROS están involucradas en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, degenerativas, de envejecimiento, neurológicas y cáncer²³, la importancia de los antioxidantes radica en su función como factores de prevención ante tales padecimientos. Sin embargo, en concentraciones muy altas, los antioxidantes pueden actuar como pro-oxidantes. Además, se ha establecido que las ROS también participan en múltiples funciones fisiológicas, como el metabolismo normal²². De hecho, es necesario un cierto nivel de ROS para estimular muchos de los procesos relacionados con los beneficios del consumo de antioxidantes, por ello, eliminar por completo a las ROS puede tener implicaciones perjudiciales para el organismo²². Debido a lo anterior, el mantenimiento de la salud requiere de un equilibrio adecuado entre la generación de ROS y los sistemas antioxidantes, lo que se puede lograr mediante el consumo moderado y ajustado a las necesidades de cada individuo de productos con propiedades antioxidantes²³.

En relación con sus propiedades antioxidantes, los productos naturales también han destacado en su actividad antiinflamatoria. La inflamación generalmente se define como una respuesta saludable del huésped a la estimulación generada por la invasión de patógenos y señales endógenas, como las células dañadas²⁴, o señales exógenas, como trauma mecánico, toxinas, minerales, cristales, productos químicos y antígenos²⁵. En ocasiones, este proceso da como resultado la reparación del tejido, sin embargo, cuando la respuesta no se controla, puede generar una patología. Cada tejido muestra características distintivas de la inflamación²⁴. Los procesos inflamatorios no resueltos pueden participar en la progresión de enfermedades inflamatorias, como el asma, la aterosclerosis, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la rinitis y el cáncer, entre otros²⁵. Los factores ambientales y el estilo de vida se encuentran involucrados²⁴.

Actualmente, las estrategias farmacológicas dirigidas a disminuir la inflamación se basan en la inhibición de ciertas enzimas que participan en la fisiología normal de procesos digestivos y función renal⁴³ entre otros y, por lo tanto, pueden desencadenar un desequilibrio de la homeostasis y efectos secundarios indeseables. Debido a lo anterior, se ha buscado dar un enfoque diferente al tratamiento de la inflamación, de ahí que la investigación se ha dirigido al estudio

de procesos bioquímicos y búsqueda de antiinflamatorios más selectivos. De hecho, se ha reportado este tipo de funciones en componentes de algunas plantas⁴⁰.

Así mismo, se han reportado fuertes efectos inmunomoduladores en la dieta, en particular en el contexto de comer en exceso, el ayuno y la composición de los alimentos. La obesidad está vinculada a la inflamación crónica a través de una variedad de mecanismos, que incluyen la inhibición de la autofagia y la aceleración de los procesos asociados con el envejecimiento, mientras que el ayuno tiene considerables efectos antiinflamatorios²⁴.

Adicional a los procesos inflamatorios relacionados con el sistema digestivo, la motilidad intestinal, que es la capacidad de las paredes del intestino delgado y grueso para contraerse y relajarse, permitiendo el movimiento de los contenidos intestinales de un sitio a otro; también se ha reportado relacionada con la administración de extractos provenientes del género *Crataegus*. Estos extractos han sido capaces de modificar los patrones específicos de motilidad de determinados segmentos intestinales. Los fármacos antidiarreicos tienen este efecto como principal objetivo para controlar la cantidad de agua intestinal, la cual se ve afectada durante ciertos padecimientos, por lo que dichos extractos podrían ser empleados como ingredientes activos. Sin embargo, estas propuestas deben ser confirmadas toxicológicamente, ya que pueden desencadenarse trastornos funcionales del intestino debidos a la dismotilidad²⁶.

El tratamiento de los trastornos funcionales del intestino sigue siendo problemático, aunque los tratamientos sintomáticos o los medicamentos destinados a mejorar la motilidad pueden ser efectivos. Sin embargo, ningún tratamiento actual aborda la presunta causa subyacente de la enfermedad²⁶.

Por otro lado, el género *Crataegus* también se encuentra relacionado con un padecimiento de alta incidencia en México, la diabetes mellitus. La diabetes mellitus no es un solo trastorno y su definición depende de la perspectiva que se le otorgue. Desde una perspectiva médica, representa una serie de afecciones metabólicas asociadas con la hiperglucemia y causadas por una insuficiencia parcial o total de insulina. La exposición a la hiperglucemia crónica puede dar

lugar a complicaciones microvasculares (infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, enfermedad arterial periférica, entre otras) ²⁷.

La diabetes es una condición de por vida que requiere atención diaria a la dieta, estilo de vida y autocontrol de la glucosa en sangre, con administración frecuente de medicamentos. Puede asociarse con diversos grados de ansiedad, depresión y visitas múltiples a los proveedores de atención médica²⁷. Por otro lado, la susceptibilidad genética es importante pero no suficiente en la causa de diabetes.

Además, se ha propuesto que, en lugar de examinar a poblaciones enteras para detectar la diabetes, los equipos de salud deben centrar sus esfuerzos en la detección temprana, el asesoramiento sobre el estilo de vida y el tratamiento intensivo de los factores de riesgo entre las personas con alto riesgo de diabetes y enfermedad cardiovascular²⁸, además de incluir en la dieta factores preventivos como los productos naturales bioactivos, entre otros cuidados.

Finalmente, otro padecimiento de importancia mundial que puede ser prevenido mediante el consumo de suplementos o fitofármacos, entre otros cuidados, es el cáncer. El cáncer es un crecimiento anormal de células causado por múltiples cambios en la expresión génica que conducen a un desequilibrio en la proliferación y la muerte celular, lo cual genera tumores, en última instancia, los cuales son una población de células que pueden invadir tejidos y hacer metástasis en sitios distantes, causando morbilidad significativa y, si no es tratado, muerte del enfermo³¹.

Desarrollar cáncer es una situación multifactorial. Se puede clasificar a los factores como externos (por ejemplo, exposición a ciertos compuestos químicos ambientales y radiación) e internos (por ejemplo, defectos del sistema inmunológico y/o predisposición genética). Estos factores causales pueden actuar juntos para iniciar y promover carcinogénesis. A menudo, pueden transcurrir de 10 a 20 años antes de que una célula afectada se convierta en un tumor clínicamente detectable³¹.

Aunque el cáncer puede ocurrir a cualquier edad, por lo general se considera una enfermedad del envejecimiento. La edad promedio mundial en el momento del diagnóstico de cáncer es de 67 años. Parte del aumento en la incidencia de

cáncer con el envejecimiento podría deberse a una acumulación de daños en el ADN durante toda una vida de exposición a factores cancerígenos. Otra posibilidad, quizás más probable, es que el daño celular se acumule con el tiempo y la capacidad del cuerpo para reparar este daño disminuya con la edad³¹.

Los anteriores procesos también se han analizado epidemiológicamente. Actualmente, el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo occidental. En los Estados Unidos y en varios países europeos, es la segunda causa de muerte después de la enfermedad cardiovascular. Las tasas de mortalidad más altas se observan en los cánceres de pulmón, colorrectal, mama y próstata³¹.

No obstante, la morbilidad relacionada con el cáncer ha disminuido en las últimas décadas. Este progreso se debe a mejores técnicas de diagnóstico y tratamiento, muchas de las cuales se han derivado del conocimiento cada vez mayor de la biología de la célula cancerosa³¹.

Finalmente, se reafirma la importancia de la prevención mediante la concientización y toma de acciones para la mejora en la calidad de vida de la población. Para lograr lo anterior, se insiste en la investigación relacionada a los productos naturales bioactivos, como lo es el estudio de plantas tales como el tejocote, como una opción preventiva ante diferentes padecimientos.

3.3 Tejocote (*Crataegus mexicana*)

3.3.1 Generalidades morfológicas

El tejocote (*Crataegus mexicana*) pertenece a la especie *mexicana*, del género *Crataegus*, familia Rosaceae, orden Rosales, reino Plantae. Las especies reportadas se encuentran en diversas partes del mundo, de las cuales, dos terceras partes se encuentran en Norteamérica y el resto en Europa y Asia¹.

En México, la sinonimia popular para esta especie vegetal incluye nombres tales como tejocote, chisté, manzanilla y manzanita, entre otros, siendo el primero el nombre más común y derivado del náhuatl "Texocotl", que significa fruta dura y agria¹.

Como se observa en la Figura 3.3.1-1, el tejocote es un árbol que puede medir desde 4 hasta 10 m de altura. La corteza presenta un color gris rojizo y se desprende en tiras³ (A). Sus hojas son anchas en la parte media, y angostas en los extremos; son de color verde oscuro en el haz y verde pálido en el envés; además, presentan borde dentado² (B). Las flores son blancas y su periodo de floración es corto¹ (B). Su fruto es de color amarillo-anaranjado, semejante a pequeñas manzanas, de 1 a 2 cm de diámetro³ (C). Las semillas son lisas y de color café². Muchas de las especies no producen semilla, aunque exista fruto formado¹. Los frutos se forman en primavera y maduran hasta el invierno³. La raíz consiste en un sistema radical, profundo y sensible, el cual consiste en una raíz principal (pivotante) de la que salen raíces laterales y fibrosas, formando un conjunto⁴ (D). Los especímenes viven de 30 a 40 años³.

Por ser una especie tropical, el clima templado a una altura de 1000 y hasta 3900 msnm es idóneo para el crecimiento de esta planta².

Tiene la capacidad de reforestar en taludes, barrancas y zonas semiáridas debido a la protección que provee al suelo contra la erosión; además de incorporar materia orgánica³.

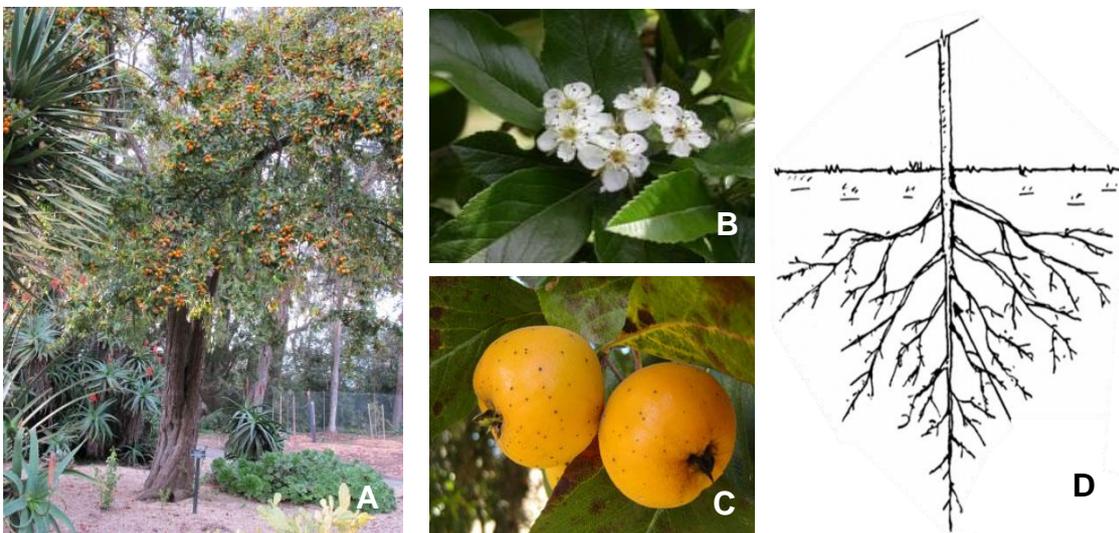


Figura 3.3.1-1 (A) Árbol de tejocote, *Crataegus mexicana* DC. **(B)** Flores de tejocote. **(C)** Fruto de tejocote. **(D)** Raíz pivotante.

3.3.2 Etnobotánica y uso tradicional

El tejocote es ampliamente usado en la medicinal tradicional de numerosos grupos étnicos y originarios en Europa, Asia y Norteamérica.

En Norteamérica, el fruto y la decocción de la raíz y la corteza del tejocote se emplean en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Las decocciones de la corteza y las flores también se han empleado como tratamiento a problemas en el corazón, por sus efectos antiespasmódicos, cardiotónicos, hipotensos y antiateroescleróticos⁵, además de mejorar la función y rendimiento del corazón y disminuir el riesgo de arritmias⁶.

En la medicina tradicional de China, el fruto se usa para mejorar la circulación, eliminar la estasis sanguínea y tratar la indigestión, la diarrea, el dolor abdominal, la hiperlipidemia y la hipertensión⁵.

En México, el fruto y las hojas son comúnmente empleadas para tratar enfermedades respiratorias y digestivas, respectivamente, a partir de la decocción del material vegetal y su posterior administración por vía oral. De igual forma, se sabe que la raíz se cuece y machaca para preparar infusiones con fines antidiabéticos².

Se ha reportado un efecto hipoglucémico específicamente en la raíz^{8, 10} y hojas¹⁰ de las especies mexicanas del género *Crataegus*. Sin embargo, de acuerdo con Olvera-García M., administrando una dosis de 50 mg/kg de extracto etanólico de la raíz de tejocote se observó el mejor efecto hipoglucemiante, sin embargo, se desarrolló íleo paralítico temporal, el cual, a concentraciones mayores (100 mg/kg) generó la muerte de los ratones de prueba por el mismo padecimiento⁹.

Por otro lado, el fruto es consumido en diversas preparaciones culinarias como dulce, conserva y vino⁵, por mencionar algunos.

3.3.3 Composición química y farmacología

Múltiples estudios se han realizado sobre diferentes partes vegetales del árbol del tejocote con el fin de elucidar la causa del efecto farmacológico observado mediante la identificación de los compuestos, o grupos de éstos, que se encuentran involucrados.

Actualmente, se conoce la presencia de azúcares que son producidos en las hojas y son transportados al fruto durante su desarrollo. Ejemplos de ellos son fructosa, glucosa, sorbitol, entre otros⁵.

En el fruto se han identificado ácidos orgánicos y fenólicos, como el ácido cítrico y el ascórbico (Figura 3.3.3-1), los cuales han mostrado ciertas funciones independientes de su rol en el metabolismo primario de la planta, como su actividad antioxidante⁵ y como nutrientes esenciales para los humanos. El ácido ascórbico también ayuda a la prevención del cáncer y desordenes cardiovasculares⁵.

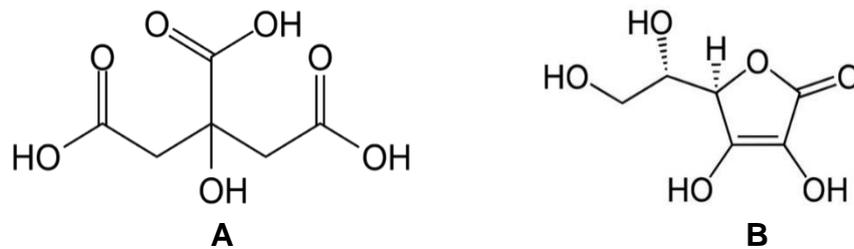


Figura 3.3.3-1 Ácidos cítrico (A) y ascórbico (B), respectivamente.

Como en la mayoría de las plantas, existen terpenos en múltiples partes del tejocote, tales como el ácido oleanólico y el ursólico (Figura 3.3.3-2), los cuales muestran actividad antiinflamatoria, gastroprotectora e hipoglicémica⁵, al ser suministrados a humanos.

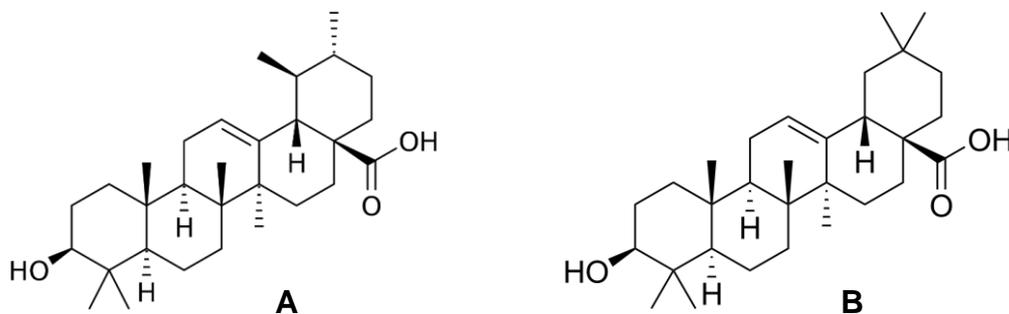


Figura 3.3.3-2 Ácido ursólico (A) y oleanólico (B).

Así mismo, en el reino vegetal se puede observar la presencia de ácidos cinámicos; estos se encuentran en pequeñas cantidades en el género *Crataegus*. El ácido cafeico y el clorogénico son ejemplos de ellos, y tras su administración actúan como antioxidantes e inhibidores para la formación de compuestos mutagénicos; específicamente el ácido clorogénico muestra inhibición al daño en el ADN⁵.

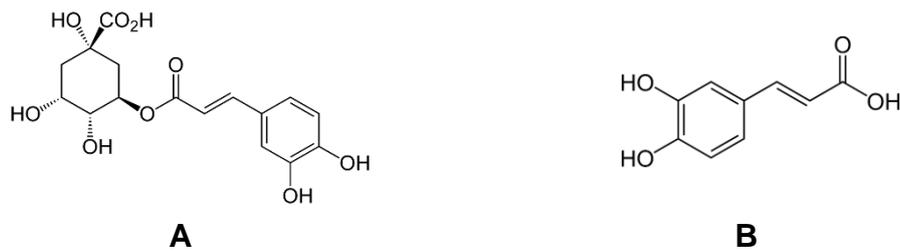


Figura 3.3.3-3 Ácido clorogénico (A) y cafeico (B).

Otro componente común en las plantas, particularmente en las hojas, son los lignanos, encargados de la regulación de algunos procesos fisiológicos. Los precursores de los lignanos, tales como el pinoresinol y matairesinol (Figura 3.3.3-4), han sido denominados como fitoestrógenos, ya que exhiben una actividad estrogénica débil y previenen enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y ciertos cánceres asociados con hormonas⁵.

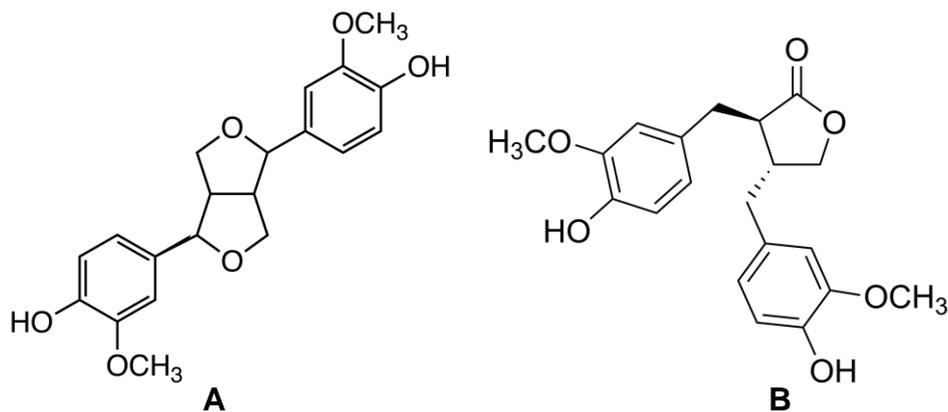


Figura 3.3.3-4 Pinoresinol (A) y matairesinol (B).

Por otro lado, existen mezclas constituidas principalmente por terpenos y fenilpropanoides, llamadas aceites esenciales, las cuales son sintetizadas en el tejido vegetal. El tipo y cantidad de compuestos en estos aceites puede variar por factores ambientales, tales como la época del año, la temperatura, entre otros. El efecto que tienen en las plantas puede ser antifúngico, antiviral y antibacterial⁵.

Dentro de los compuestos presentes en el reino vegetal, son los flavonoides uno de los grupos mayormente involucrados en los beneficios a la salud observados en las diversas especies. Los flavonoides no son esenciales para la supervivencia de la planta, sin embargo, proveen de color y protección frente a

especies reactivas de oxígeno, entre otras funciones fisiológicas. En el género *Crataegus* se encuentra a estos compuestos en hojas, flores y fruto. En mamíferos, los flavonoides actúan como antimicrobianos estimulando la producción de anticuerpos y han demostrado tener efectos hipotensores y anticancerígenos debido a sus propiedades antioxidantes. Un ejemplo es el compuesto quercetin-3-O-galactósido (Figura 3.3.3-5)⁵.

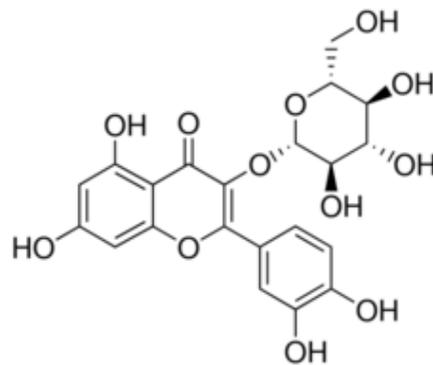


Figura 3.3.3-5 Quercetin-3-O-galactósido.

Así mismo, la producción de los compuestos anteriormente mencionados en las diferentes partes del tejocote puede cambiar dependiendo del estado de desarrollo del árbol. Se ha denotado que la concentración de algunos flavonoides disminuye en la progresión de la fruta verde a la fruta roja.

En conjunto, tras analizar hojas, flores y fruto de 27 diferentes especies del género *Crataegus*, se han cuantificado 36 flavonoides, 6 diferentes azúcares y 17 ácidos⁵.

En el género *Crataegus* también se ha reportado a un grupo de dibenzofuranos como agentes constitutivos clasificados de acuerdo con su estructura y la variedad de sustituyentes que presentan. Por ejemplo, la especie *Crataegus monogyna* contiene dos dibenzofuranos principalmente en la corteza y en la parte más inmadura de la madera. Además, este tipo de compuestos se encuentra en otros géneros que se mencionarán como referencia de sus efectos biológicos¹⁵.

Los dibenzofuranos pueden presentar metoxilos e hidroxilos como sustituyentes. Estos compuestos se han encontrado en raíz¹⁸, tallos^{15, 19}, corteza¹⁵ y albura¹⁵ de la especie *Cotoneaster acutifolius* y se han obtenido mediante extracciones

con metanol y acetato de etilo, con su posterior aislamiento con cromatografía en columna, obteniendo compuestos con actividad biológica empleando gradientes de polaridad^{18,19}.

Los dibenzofuranos se han evaluado en líneas celulares animales y humanas^{18,19}. Tras diferentes bioensayos, se ha encontrado que algunos dibenzofuranos presentan actividad antiinflamatoria^{18, 19}, antibacteriana¹⁷ y antifúngica^{15, 16, 17}, por lo que pueden ejercer efectos tras su administración en humanos⁴⁰. Además, partiendo de compuestos obtenidos directamente de las fuentes naturales, se han sintetizado variantes con el fin de potenciar o cambiar las propiedades originales.

En la Figura 3.3.3-6, se muestran dibenzofuranos como kehokorina A (**A**) y dibenzofuranquinona popolohuanona E (**B**), aislados de *Trichia favoginea* y *Dysidea sponge*, respectivamente; dimetoxifenoles (**C**) y derivados clorados (**D**), entre otros, que presentan actividad anticancerígena relacionada con la presencia de grupos fenólicos libres y adyacentes a carbonilos. Además, estos compuestos pueden intercalarse entre pares de bases del ADN inhibiendo el crecimiento de las células cancerosas⁴⁰.

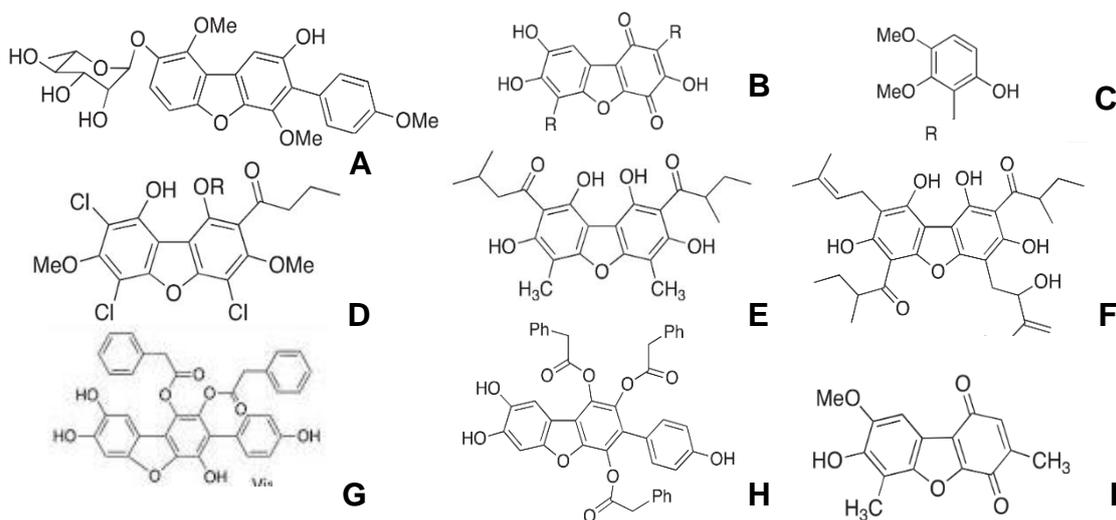


Figura 3.3.3-6 Ejemplos de dibenzofuranos biológicamente activos.

Así mismo, el dibenzofurano achirofuran (**E**), aislado de *Achyrocline satureioides*, rhodomirtoxina C, y derivados de éstos (**F**), han demostrado actividad antibacteriana⁴⁰. Por otro lado, se ha reportado que dibenzofuranos como la

yalininas B (**G**), ganbajunina B (**H**) y xylariquinona (**I**) muestran actividad antialergias, antioxidante, antiinflamatoria y antimalaria, respectivamente.

Los diferentes efectos biológicos existentes entre estos compuestos radican en la variedad de sustituyentes que puede tener el dibenzofurano⁴⁰.

Algunos dibenzofuranos han sido clasificados como fitoalexinas, debido a que son relativamente raros como metabolitos secundarios, son de bajo peso molecular y actúan como defensa frente a patógenos¹⁵. Son inducidos por el estrés y son una parte importante del repertorio de defensa de la planta. Estos compuestos muestran actividad biológica hacia una variedad de patógenos y se consideran marcadores moleculares de resistencia a enfermedades¹⁶. Algunos ejemplos pueden observarse en la Figura 3.3.3-7.

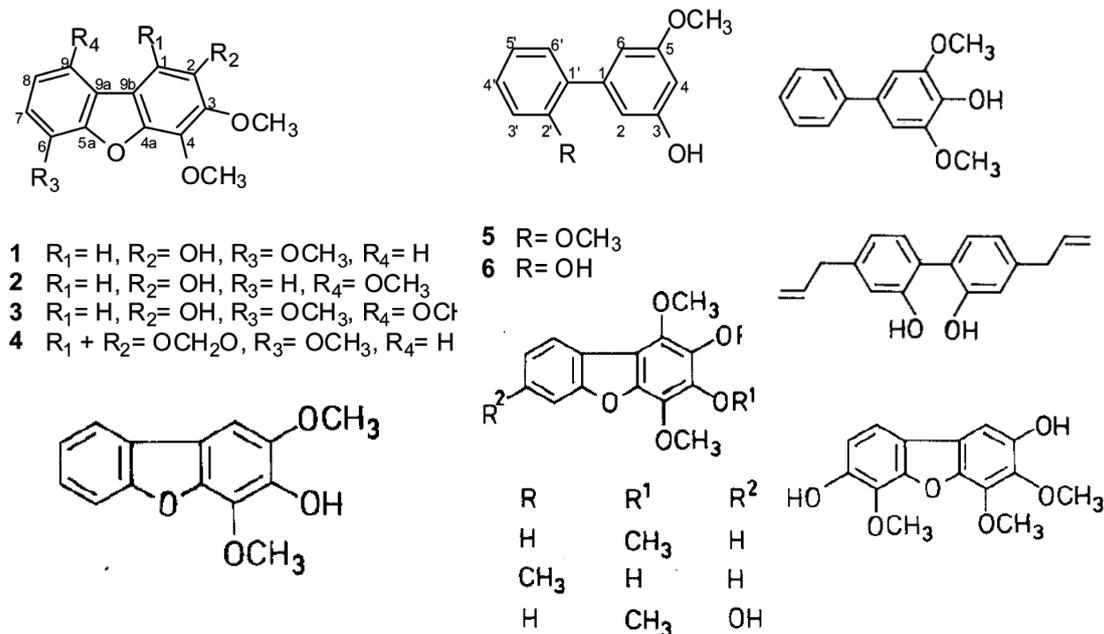


Figura 3.3.3-7 Ejemplos de fitoalexinas presentes en diferentes familias vegetales, incluida la Rosaceae.

Debido a la actividad biológica de los dibenzofuranos se han estudiado múltiples variaciones estructurales para potenciar la actividad biológica observada en los compuestos encontrados en fuentes naturales y así ofrecer más opciones para los tratamientos médicos actuales o como parte del desarrollo de suplementos.

4. JUSTIFICACIÓN

En México, la contención de enfermedades no transmisibles (ENT) debe ser una prioridad para el sector salud, dado el impacto creciente en la población en edad laboral. La prevención y tratamiento de estos padecimientos permite una mejora en la calidad de vida, es por esto que se continúa con el estudio de extractos o compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales encaminados para la posible formulación de suplementos que coadyuven al tratamiento de las ENT.

Una de las fuentes naturales de interés es la raíz del tejocote, de la cual no se han reportado estudios fitoquímicos, sin embargo, estudios etnobotánicos indican su uso (como infusiones) para padecimientos diabéticos y digestivos, lo cual motiva su estudio y permite aumentar el conocimiento de esta especie nacional.

5. HIPÓTESIS

Estudios etnobotánicos y fitoquímicos de las partes aéreas y del fruto del tejocote han aislado e identificado diferentes compuestos bioactivos que justifican el uso de infusiones para el tratamiento de diversos padecimientos debido a sus efectos farmacológicos. Si la medicina tradicional utiliza a la raíz de tejocote por sus efectos antidiabético y gastrointestinal, es posible aislar diferentes compuestos, o mezclas de éstos, responsables de las propiedades que se le atribuyen a esta planta, debido a su bioactividad.

Por lo tanto, el estudio fitoquímico de la raíz podría evidenciar compuestos o fracciones con actividad antiinflamatoria, antioxidante, intestinal, antiproliferativa y/o antidiabética. Tales compuestos pueden ser identificados y evaluados para determinar la actividad que presentan en sistemas vivos, lo que puede contribuir al desarrollo de suplementos, como una aportación a las medidas existentes de prevención y mejoría de la salud de la población mexicana.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

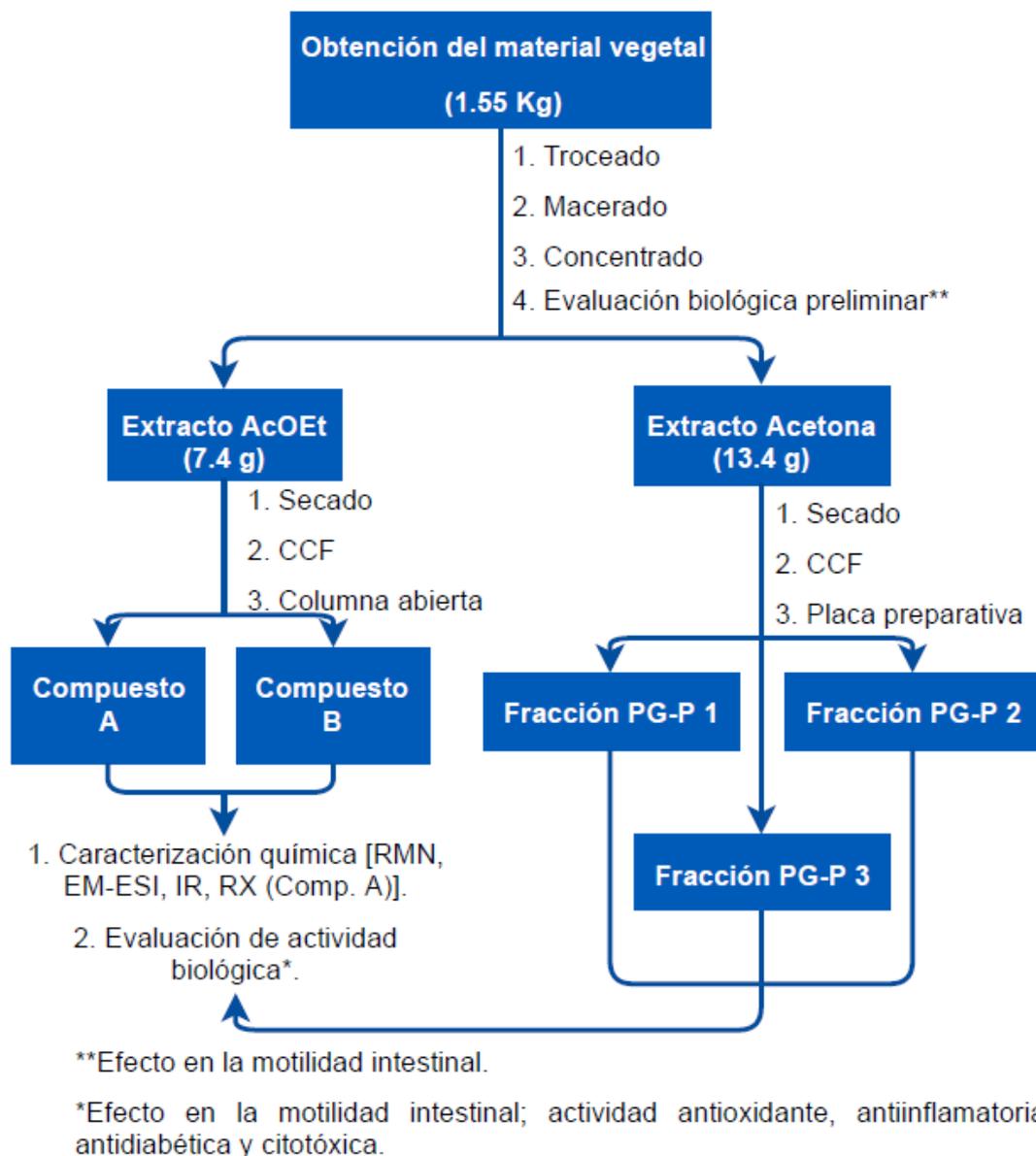
Aislar, y de ser posible, caracterizar a los componentes de los extractos obtenidos de las raíces de tejocote, *Crataegus mexicana*, con actividad biológica de interés para proponer aplicaciones en el desarrollo de suplementos y ampliar el conocimiento de esta planta.

6.2 Objetivos particulares

- Con diferentes disolventes, obtener distintos extractos de la raíz de tejocote seca.
- Identificar a los componentes de los extractos crudos separándolos con técnicas cromatográficas, como cromatografía en capa fina, en columna y placa preparativa.
- Evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, citotóxica y de motilidad intestinal de las fracciones obtenidas de la separación de los extractos.
- Caracterizar a los compuestos, o mezclas de éstos, que presenten actividad biológica significativa, mediante técnicas espectroscópicas, para proponer posibles aplicaciones de los compuestos obtenidos como suplementos.

7. METODOLOGÍA

7.1 Resumen gráfico de la metodología.



La raíz del árbol de tejocote, *Crataegus mexicana*, fue recolectada en Hueyotlipan, Tlaxcala, México, en noviembre del año 2017. Se extrajo únicamente una sección periférica de la raíz, sin afectar a la integridad del árbol en cuestión. La identificación de la planta fue realizada en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Centro Médico Nacional Siglo XXI por la Mtra. Abigail Aguilar Contreras; quien le asignó el número de registro IMSSM 15880. Fue identificada como *Crataegus mexicana*.

7.2 Preparación del material vegetal

El material vegetal fue troceado en cubos de 2 × 2 cm de forma manual. Posteriormente, la raíz fue pesada. Se contaron con 1.55 kg de raíz.

7.3 Extracción del material vegetal

Se realizaron extracciones sucesivas de la raíz troceada con los siguientes disolventes: hexano (TMA y TMB), acetato de etilo (TMC, TMD y TMI), metanol (TME y TMF) y acetona (TMG y TMH) a temperatura ambiente, durante 24-72 h a cada lote de macerado. Se eliminó el disolvente mediante evaporación a presión reducida (rotavapor modelo R-215, *Equipar*[®]; acoplado a controlador de vacío modelo V-850 semiautomático, *Equipar*). Se recuperaron y pesaron los extractos tras eliminar el disolvente.

7.4 Evaluación de extractos mediante cromatografía en capa fina

Se evaluó el perfil cromatográfico de todos los extractos obtenidos mediante cromatografía en capa fina, para lo cual se emplearon placas de aluminio con medidas de 20 × 20 cm y 0.20 mm de espesor, recubiertas con gel de sílice 60 (*Alugram*[®] SIL G/UV254 MACHEREY-NAGEL) como fase estacionaria. Las fases móviles empleadas fueron: 80:20 Hex:AcOEt para el extracto de hexano, 70:30 Hex:AcOEt y 70:30 AcOEt :MeOH para los extractos de acetato de etilo, acetona y metanol.

Las placas cromatográficas se observaron bajo luz ultravioleta (UV) (*Spectroline*, Modelo CM-10) a longitud de onda de 254 nm y 365 nm; posteriormente se revelaron con disoluciones de vainillina fosfórica al 10 % con ácido sulfúrico, y sulfato cérico, aplicando calor durante pocos segundos. Se eligieron estos reveladores ya que resaltan la presencia de fenoles, terpenos y glucósidos⁴⁸, entre otros, grupos de compuestos que se han reportado en diferentes partes del tejocote.

Para contar con otro punto de comparación entre los extractos obtenidos se decidió realizar una prueba preliminar relacionada con el efecto en la motilidad intestinal de ratones tras la administración oral de las muestras de interés. La metodología se describe en el apartado 7.6.3.1.

7.5 Aislamiento, caracterización y actividad biológica de los compuestos 2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol (Compuesto A) y 2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol (Compuesto B)

7.5.1 Aislamiento

Se purificó al extracto TMC (AcOEt) por cromatografía en columna abierta.

Como fase estacionaria, se pesaron 120 g de gel de sílice (SiO_2 , superficie de absorción 230-400 m^2/g) que fueron solvatados en hexano. Se vertió la mezcla en una columna vertical de vidrio ($D=4.1$ cm, $h=70$ cm) con disco poroso. Se dejó asentar el gel de sílice de forma homogénea y compacta.

Se pesaron 3.47 g del extracto a separar y se disolvieron en el mínimo volumen posible de metanol. Se adicionaron 4 g de gel de sílice al extracto disuelto y se mezclaron. Se eliminó el disolvente al vacío con el fin de obtener un polvo, el cual fue depositado en la columna.

Se procedió a separar el extracto usando una fase móvil inicial compuesta únicamente por hexano. Se aumentó gradualmente la polaridad adicionando AcOEt en un porcentaje de 0.5 cada 35 fracciones hasta alcanzar 75% de hexano. Posteriormente, se aumentó la cantidad de AcOEt en 5% cada 20 fracciones hasta completar 100% de AcOEt. Finalmente se aumentó la polaridad adicionando MeOH en 5% cada 20 fracciones hasta terminar la separación con 95% MeOH. Todas las fracciones fueron concentradas mediante evaporación del disolvente a presión reducida a 40°C.

Se tomó registro del perfil cromatográfico de cada fracción con cromatografía en capa fina y el posterior revelado con luz UV a 365 nm, sulfato cérico y calor. Aquellas fracciones que presentaron perfiles idénticos fueron agrupadas.

Se obtuvieron 650 fracciones. Entre las fracciones 173 a 252 (90 % hexano) se obtuvo un sólido (FTC 173-252); del cual, entre las fracciones 184 a 192 el sólido se organizó en forma cristalina (Compuesto A). El sólido que no cristalizó fue denominado Compuesto B.

7.5.2 Caracterización

Se analizaron a los compuestos A y B mediante las siguientes técnicas espectrofotométricas y espectroscópicas:

- Difracción de rayos X de monocristal (DRX). Equipo: Difractómetro *Bruker*[®], Smart Apex equipado con radiación de Mo ($\lambda=0.71073$ Å), detector bidimensional CCD y dispositivo de baja temperatura.
- Espectroscopía infrarroja (IR). Equipo: Espectrofotómetro FT-IR *Brucker*[®] Tensor 27. Preparación de muestra en película con metanol.
- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón (RMN-¹H) y carbono 13 (RMN-¹³C), así como los experimentos en dos dimensiones: DEPT, COSY, HCQC y HMBC. Equipo: *Bruker*[®], Avance 300 MHz. Se empleó como disolvente metanol deuterado (MeOD).
- Espectrometría de Masas (EM) mediante impacto electrónico (+). Equipo: *Bruker Daltonics*[®], Squire6000 entre 200-2500 m/z.

7.5.3 Pruebas biológicas

Estas pruebas fueron realizadas por personal del Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, U. N. A. M. Todas las pruebas fueron preliminares, por lo que únicamente se hizo una medición, exceptuando la prueba relacionada con la actividad antiinflamatoria:

7.5.3.1 Actividad antioxidante

Se evaluó mediante la cuantificación de la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y la inhibición de la peroxidación de lípidos inducida con FeSO₄ o 2-metil-amidinopropano (AAPH) en homogeneizado de cerebro de ratón y cuantificado con ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se evaluó la actividad a concentraciones de 1, 10, y 100 µg/mL.

7.5.3.2 Actividad antiinflamatoria

Se aplicó 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA) en oreja de ratón macho CD1 por vía tópica con el objetivo de inducir inflamación. Para observar la actividad antiinflamatoria se aplicó 17.86 mg/kg del compuesto a evaluar. Se empleó celecoxilo como control.

7.5.3.3 Actividad antidiabética

Consistió en la inhibición del enzima α -glucosidasa de levadura aplicando concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de la muestra a evaluar. Se utilizó Ascarbosa como control positivo.

7.5.3.4 Actividad citotóxica

Se evaluó la actividad citotóxica en las siguientes líneas celulares cancerosas humanas: glía de sistema nervioso central (U251), próstata (PC-3), leucemia (K562), colon (HTC-15), mama (MCF-7), pulmón (SKLU), cultivo primario de fibroplastos gingivales humanos sanos (FGH) siguiendo el protocolo de Sulforrodamina B descrito por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica. Se administraron 50 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto a evaluar. Se utilizó como control primario mitoxantrona.

7.6 Aislamiento, caracterización y actividad biológica de las fracciones del extracto de acetona activas PG-P 1, PG-P 2 y PG-P 3.

7.6.1 Obtención

Para aumentar la cantidad de cada extracto se trabajó con 950 g más de raíz, del mismo lote que el primer análisis obtenida en noviembre del año 2017 en la misma zona (Hueyotlipan, Tlaxcala, México). La raíz fue secada y almacenada hasta su análisis. Fue extraída con acetato de etilo (TMI y TMJ), metanol (TMK, TML, TMÑ y TMO) y acetona (TMM, TMN, TMP y TMQ) bajo las mismas condiciones.

Los extractos acetónicos del primer lote de raíz fueron mezclados para obtener una cantidad suficiente de muestras y se separaron sus componentes mediante placa preparativa. Para ello se usaron placas de vidrio de 10 x 20 cm recubiertas de gel de sílice 200 (*Alugram*[®] SIL G-200/UV254 MACHEREY-NAGEL) de 2.0 mm de espesor.

Se pesaron 800 mg del extracto TMG y 1200 mg del TMP en 10 lotes de 200 mg cada uno. Cada lote se disolvió en el mínimo volumen posible de metanol y se aplicó 2 cm por encima del borde inferior de cada cromatoplaque de forma continua. La fase móvil de todas las placas estuvo compuesta por 95 % AcOEt y

5 % metanol. Se reveló una pequeña franja de cada placa con vainillina fosfórica para delimitar cada fracción separada.

Se obtuvieron 9 fracciones de la placa preparativa, las cuales fueron recolectadas por separado y se extrajeron con una disolución constituida por 33.3% metanol y 66.6% AcOEt, para las primeras 5 fracciones, y 100% AcOEt para las 4 fracciones restantes. Se filtró el gel de sílice de cada fracción y les fue evaporado el disolvente a presión reducida a 40 °C y 180 mbar.

Tras definir el perfil cromatográfico de cada fracción mediante CCF se agruparon las fracciones con perfiles similares de acuerdo a su polaridad y se dividieron en 3 lotes: PG-P 1 (Fracciones 1 a 5), PG-P 2 (Fracciones 6 y 7) y PG-P 3 (Fracciones 8 y 9).

7.6.2 Caracterización

Los tres lotes de fracciones fueron analizados mediante las siguientes técnicas espectrofotométricas y espectrométricas:

- Espectroscopía infrarroja (IR). Equipo: Espectrofotómetro FT-IR *Brucker*[®] Tensor 27. Preparación de muestra en película en metanol (PG-P 1 y PG-P 2) y cloroformo (PG-P 3).
- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón (RMN-¹H) y carbono 13 (RMN-¹³C), así como los experimentos en dos dimensiones: DEPT, COSY, HCQC y HMBC. Equipo: *Bruker*[®], Avance 300 MHz. Se empleó como disolvente metanol deuterado (CD₃OD) (PG-P 1 y PG-P 2) y cloroformo deuterado (CDCl₃) (PG-P 3).
- Espectrometría de Masas (EM) mediante impacto electrónico (PG-P 2 y PG-P 3) y FAB⁺ (PG-P 1). Equipo: *Bruker Daltonics*[®], Squire6000 entre 200-2500 m/z.

7.6.3 Pruebas biológicas

Se realizaron las pruebas de actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética y citotóxica de acuerdo con lo mencionado en el apartado 7.5.3.

7.6.3.1 Motilidad intestinal

Esta prueba fue realizada por el Dr. Rubén Marroquín Segura en el Bioterio adscrito a la unidad multidisciplinaria de investigación experimental de la Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza.

Se evaluó el efecto de la administración de las fracciones en la motilidad intestinal de ratones macho CD1. Como control positivo se usó loperamida. Como control negativo se empleó un vehículo conformado con goma ghatti al 1%, para contrastar con el compuesto administrado de interés. Se prepararon disoluciones de las muestras con una concentración de 100 mg/kg. Para definir el recorrido del compuesto se utilizó carbón activado al 5% como marcador.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Preparación del material vegetal

La raíz del árbol de tejocote sirve como conducto para transportar agua, los nutrientes absorbidos y diferentes metabolitos hacia el tallo y el resto de la planta³⁰, además de reafirmar su capacidad para crecer en suelos áridos³ gracias a su resistencia.



Figura 8.1-1 Raíz de tejocote tras primer corte **(A)**. Raíz de tejocote, corte transversal **(B)**. Tamaño final de partícula **(C)**.

8.2 Extracción del material vegetal

Los disolventes utilizados para las extracciones se aplicaron comenzando con el menos polar, hexano, hasta los más polares, acetona y metanol. La extracción obtenida con hexano fue escasa y los extractos presentaron un color amarillo muy tenue. Al aumentar la polaridad la coloración de los extractos fue naranja intenso (AcOEt) y rojo intenso (MeOH). Finalmente, los extractos de acetona tomaron un color amarillo, como se puede observar en la Figura 8.2-2. El rendimiento de extracción del extracto de hexano fue 0.03 %, 0.48 % para AcOEt, 2.82 % para metanol y 0.87 % para acetona. Por lo anterior, se puede decir que la raíz contiene una gran cantidad de compuestos polares.



Figura 8.2-2 Extracto de hexano (A). Extracto de AcOEt (B). Extracto de MeOH (C). Extracto de acetona (D).

8.3 Evaluación de extractos mediante cromatografía en capa fina

Como ya se ha mencionado, diferentes investigaciones reportaron un efecto en la motilidad intestinal³¹, hipoglucémico⁷ y en la inhibición de la enzima α -glucosidasa¹⁰ tras administrar infusiones de la raíz de tejocote en ratones; además, se ha reportado la presencia de compuestos bioactivos en diferentes partes de este árbol, tales como el fruto⁴⁴, las hojas y ramas⁷ y en la raíz de otros géneros vegetales³⁵ con propiedades antioxidantes^{35, 44, 40} y antiinflamatorias^{18, 40}.

Debido a lo anterior, se compararon todos los extractos con una referencia biológicamente activa conformada por un extracto acuoso liofilizado de raíz de

tejocote obtenido por el Dr. Rubén Marroquín Segura en el Bioterio adscrito a la unidad multidisciplinaria de investigación experimental de la Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza, el cual reportó un efecto en la motilidad intestinal³¹, con el objetivo de definir aquellos extractos que serían fraccionados y evaluados, a partir de la elucidación de sus perfiles cromatográficos.

Anteriormente se han reportado los perfiles cromatográficos en capa fina de diferentes partes vegetales de algunas especies de género *Crataegus*⁴⁵; en estos estudios se empleó una disolución de vainillina fosfórica como revelador de los compuestos mayoritarios, por lo que se usó la misma preparación en el presente proyecto, además de aplicar sistemas de elución (SE) de alta y baja polaridad para separar los diferentes compuestos presentes en cada extracto. Gracias al uso de los reveladores empleados fue posible decir que los extractos contienen compuestos orgánicos³², sin embargo, esto se confirmaría mediante las pruebas de caracterización química.

Como se observa en la Figura 8.3-1, cada extracto presenta un perfil cromatográfico complejo, ya que se observa la elución de diferentes compuestos, y/o mezclas de éstos, con diferente recorrido y coloración, e incluso una gran cantidad de todos los extractos se mantuvo en el punto de aplicación. Tras realizar una comparación de los extractos con la referencia acuosa bioactiva (R) se observó un perfil cromatográfico similar en todas las muestras. Al emplear un sistema de elución poco polar hubo mayor similitud entre la referencia y el extracto de AcOEt. Por otro lado, al aumentar la polaridad, fueron los extractos de metanol y acetona quienes ahora compartían un perfil similar al de la referencia.

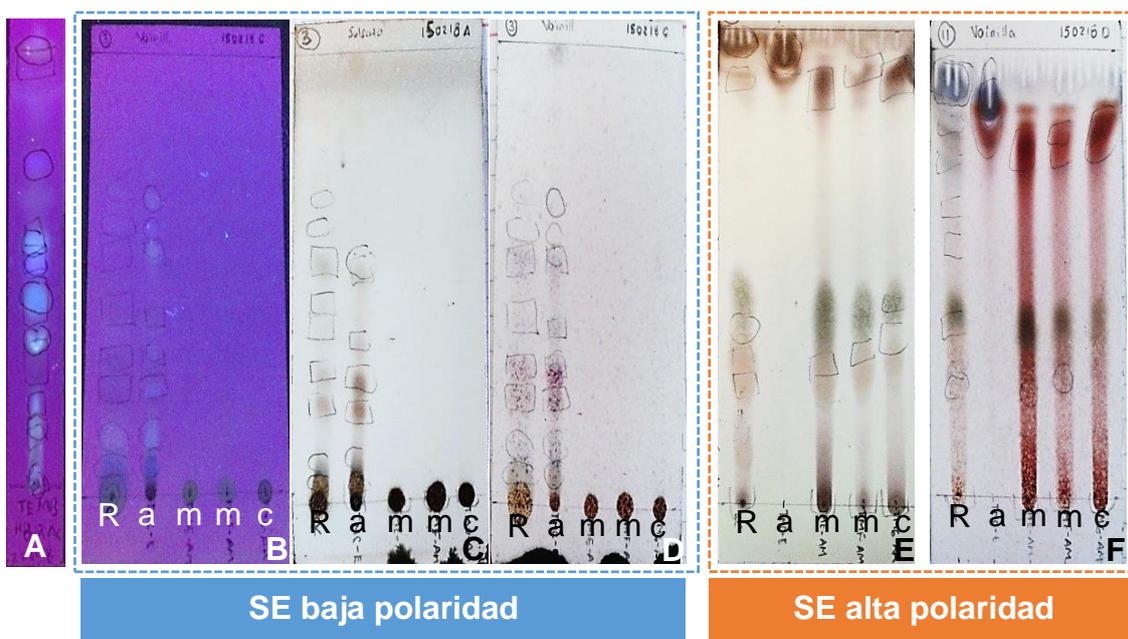


Figura 8.3-1 Cromatografía en capa fina de: **(A)** extractos de Hexano (UV $\lambda=365$ nm). Referencia acuosa (R) comparada con extractos de AcEOt (a), MeOH (m) y Acetona (c), empleando dos condiciones: 1) *SE-baja polaridad* (hexano 7:3 AcOEt): UV $\lambda=365$ nm **(B)**, revelado con sulfato cérico **(C)** y revelado con vainillina **(D)**; 2) *SE-alta polaridad* (AcOEt 7:3 MeOH): revelado con sulfato Cérico **(E)** y revelado con vainillina **(F)**.

Debido a lo anterior, y ya que los perfiles cromatográficos se asemejaban, se evaluó el efecto en la motilidad intestinal de todos los extractos como punto de comparación. Los extractos de metanol y acetona resultaron positivos a esta prueba, por lo que fueron propuestos como candidatos para evaluar su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antidiabética.

Aunque el extracto de AcOEt no fue activo intestinalmente fue el único extracto con un perfil de compuestos poco polares similar al de la referencia, por lo que se decidió fraccionarlo mediante la técnica de cromatografía de columna abierta con gel de sílice, con el objetivo de aislar sus componentes mayoritarios y evaluar su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antidiabética.

8.4 Aislamiento, caracterización y actividad biológica de los compuestos 2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol (A) y 2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol (B, propuesta)

8.4.1 Aislamiento

Tras fraccionar el extracto de AcOEt (3.47 g) de las raíces en estudio mediante cromatografía de columna abierta en SiO₂ (120g) se recolectaron 650 fracciones. Entre las fracciones 173 y 252, se observó la precipitación de un sólido de color blanco (FTC 173-252) el cual formó pequeñas agrupaciones al evaporarse el disolvente en el cual se encontraba disuelto. Este sólido mostró un R_f de 0.32 entre las fracciones 184-292, y un R_f de 0.41 entre las fracciones 200 a 252. Por lo anterior se puede decir que el sólido estaba conformado por una mezcla de compuestos.

De acuerdo con el perfil cromatográfico del sólido, se puede apreciar un compuesto mayoritario y abundante en cada grupo de fracciones, o una mezcla de compuestos con el mismo o similar R_f, como puede observarse en la Imagen 8.4.1-1.

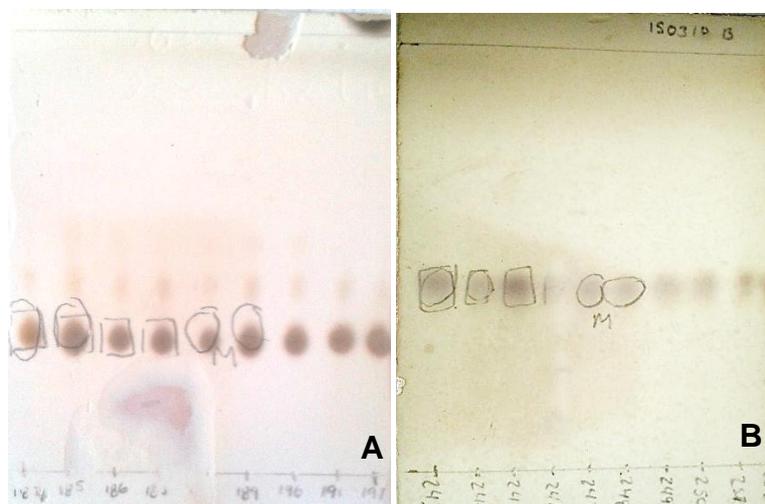


Figura 8.4.1-1 Cromatografía en capa fina de las fracciones 184-192 y 243-252 con un sistema de elución (SE) de baja polaridad; revelado con sulfato cérico (A) y vainillina fosfórica (B).

Al reunir las fracciones 184 a 192, las cuales presentaban el mismo perfil, y dejarlas con una mínima cantidad de disolvente durante 14 a 16 h, la cantidad del sólido ya mencionado fue suficiente para organizarse en forma cristalina. A

este compuesto se le denominó Compuesto A (Figura 8.4.1-2). El restante sólido que no cristalizó fue denominado Compuesto B. La diferencia que se observó entre los perfiles cromatográficos de la Figura 8.4.1-1 fue debida a que el compuesto mayoritario entre las fracciones 173 a 192 fue el Compuesto A y entre las fracciones 200 a 252 fue el Compuesto B, habiendo mezclas de ellos entre las fracciones 192 a 200, aproximadamente. Ya que, como se discutirá más adelante, el Compuesto A es menos polar que el B, fue precisamente el Compuesto A el primero en bajar de la columna cromatográfica y al evaluar su perfil, el compuesto menos polar fue el que presentó un menor recorrido.



Figura 8.4.1-2 Cristales del Compuesto A observados al microscopio óptico a través de un haz de luz **(A)** e iluminación superficial **(B)**.

Se obtuvieron, aproximadamente, 30 mg del Compuesto **A** cristalino y 70 mg del sólido obtenido de las fracciones 193 a 252, Compuesto **B**; 100 mg en total. El rendimiento de estas fracciones fue de 0.013 % con respecto a la raíz.

8.4.2 Caracterización del Compuesto A (2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol)

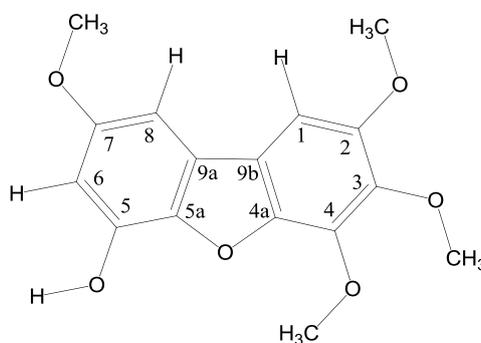


Figura 8.4.2-1 Estructura del Compuesto A, 2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol.

Se analizó al Compuesto A mediante experimentos de diferentes técnicas espectroscópicas, espectrométricas y de cristalografía, tales como IR, RMN uni y bidimensional, EM (ESI) y difracción de rayos X de monocristal. Los resultados se analizan a continuación.

8.4.2.1 Difracción de rayos X

Por medio de esta técnica se determinó la estructura del Compuesto A, como se observa en la Figura 8.4.2.1-1, de nombre 2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol. Al obtenerse mediante cromatografía en columna abierta, el compuesto estuvo disuelto en la fase móvil formada por 90% hexano y 10 % AcOEt, esta disolución se evaporó al mínimo volumen bajo presión reducida y una temperatura de 40°C. La disolución saturada con el compuesto permaneció de 14 a 20 horas a una temperatura de entre 20 y 25 °C, a presión atmosférica propia de la Ciudad de México (586 mmHg), presencia de luz y oxígeno. Tras la evaporación total de los disolventes se encontró al compuesto organizado mediante un sistema cristalino monoclinico (Tabla 8.4.2.1-1).

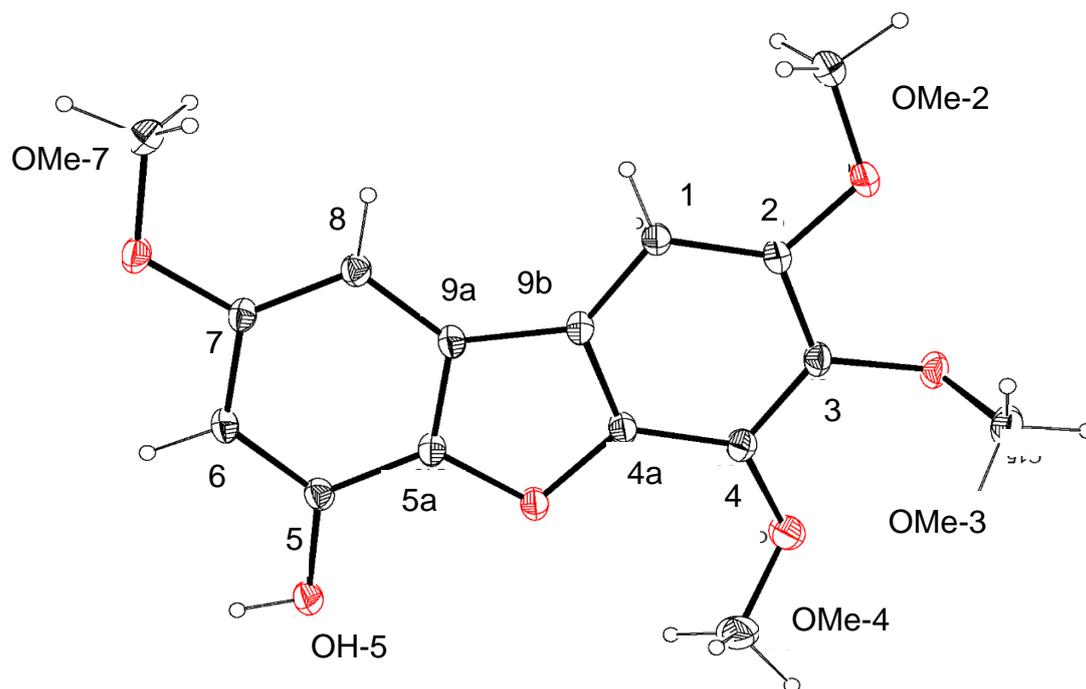


Figura 8.4.2.1-1 Estructura del compuesto A obtenida por DRX (2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol).

Parámetro	Valor	
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	
Peso molecular	304.29 g/mol	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Dimensiones de celda unitaria	a=21.67 (4) Å	α=90°
	b=4.66 (9) Å	β=105.13(6)°
	c=14.71 (3) Å	γ=90°

Tabla 8.4.2.1-1 Datos y parámetros del cristal del Compuesto A.

Tras investigar en múltiples bases de datos, se determinó que el Compuesto A, de fórmula estructural 2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol, no ha sido descrito en la literatura con anterioridad.

8.4.2.2 Espectroscopía infrarroja

El espectro de infrarrojo del Compuesto A se encuentra en la sección anexa como *Espectro 1*.

A 3353.61 cm⁻¹ se observa una banda ancha en la zona de estiramiento del enlace entre oxígeno e hidrógeno del grupo alcohol fenólico, lo cual se ve respaldado por bandas confirmatorias de estructuras aromáticas a 1191.632 cm⁻¹.

Se confirma una estructura aromática por la presencia de bandas en 1606.19 y 1362.93 cm⁻¹, estas bandas están asociadas al estiramiento entre el enlace C-H del anillo, además, la banda en 1606.19 cm⁻¹ indica el estiramiento de las insaturaciones C=C en un ciclo aromático.

Finalmente, se observa una banda relacionada con grupos metoxilo aromáticos a 2836.80 cm⁻¹, además se observan bandas confirmatorias en 1030 cm⁻¹ y la presencia de bandas atribuidas a los metilos del grupo éter en 2940.91 cm⁻¹.

8.4.2.3 Espectrometría de masas

El espectro de masas del Compuesto A obtenido mediante la técnica de impacto electrónico (ESI) en modo positivo se puede encontrar en la sección anexa como *Espectro 2*. Se puede observar que tanto el ion molecular como el pico base son la señal observada a m/z 304, lo que concuerda con la fórmula condensada de

$C_{16}H_{16}O_6$ obtenida gracias al análisis de DRX. Se confirma que el peso molecular del Compuesto A es 304 g/mol.

Ya que el pico base y el ion molecular son la misma señal, se puede decir que la estructura completa es más estable que cualquiera de sus estructuras de fragmentación.

De acuerdo con las señales observadas, probablemente los primeros grupos en salir fueron los metilos de los sustituyentes e incluso los grupos metoxilo completos, hasta la ruptura del heterociclo.

Esta prueba confirmó el peso molecular del dibenzofurano observado en DRX y la presencia de los grupos metoxilo como sustituyentes.

8.4.2.4 Resonancia magnética nuclear

Los espectros se encuentran en la sección anexa.

- Resonancia magnética nuclear de protón (1H). *Espectro 3*.

1H -RMN (MeOD, 500 MHz): δ 7.23 ppm (1H, s, H-1), δ 6.93 ppm (1H, d, $J=2.33$ Hz, H-8), δ 6.49 ppm (1H, d, $J=2.28$ Hz, H-6), δ 4.18 ppm (3H, s, OMe-3), δ 3.92 ppm (3H, s, OMe-2), δ 3.88 ppm (3H, s, OMe-4) y δ 3.83 ppm (3H, s, OMe-7).

A campo alto se pueden observar cuatro señales que integran para 3 protones cada una, debido a su desplazamiento químico se puede decir que pertenecen a grupos alifáticos. Una de estas señales tiene un desplazamiento diferente a las restantes tres, probablemente debido a su ambiente químico. Se atribuyó esta señal a los protones del metoxilo en posición 3 (OMe-3), ya que este grupo se encuentra unido a un átomo de carbono cuya densidad electrónica probablemente se encuentra desplazada por la suma del efecto inductivo de los átomos de oxígeno de los grupos metoxilo presentes en las posiciones 2, 3 y 4.

En la zona de protones aromáticos podemos ver tres señales que integran para un protón cada una, por su desplazamiento estos átomos se encuentran directamente unidos al anillo aromático. Las señales en δ 6.95 y 6.51 ppm son dobletes que se encuentran acoplados, ya que sus constantes de acoplamiento son $J= 2.33$ y 2.28 Hz respectivamente. Estas constantes también indican que estos protones se encuentran en posición *meta* uno con respecto al otro.

Finalmente, la señal encontrada a δ 7.21 no se encuentra acoplada con las dos anteriores, por lo que puede encontrarse enlazado a una estructura aromática diferente.

A pesar de que en los análisis de IR y DRX se observa la presencia de un grupo alcohol en posición 5, el protón de éste no se observa en ^1H -RMN, probablemente debido a un traslape con el disolvente empleado (MeOD), sin embargo, se desconoce la razón.

- Resonancia magnética nuclear de carbono (^{13}C). *Espectro 4*.

^{13}C -RMN (MeOD, 500 MHz): δ 158.29 ppm (C-7), δ 151.71 ppm (C-2), δ 144.37 ppm (C-3), δ 144.20 ppm (C-5), δ 142.14 ppm (C-4a), δ 141.58 ppm (C-5a), δ 140.51 ppm (C-4), δ 127.14 ppm (C-9b), δ 122.24 ppm (C-9a), δ 102.90 ppm (C-6), δ 98.32 ppm (C-1), δ 94.92 ppm (C-8), δ 61.92 ppm (OMe-4), δ 61.57 ppm (OMe-3), δ 57.05 ppm (OMe-2) y δ 56.28 ppm (OMe-7).

En la zona de carbonos alifáticos unidos a átomos de oxígeno se pueden observar cuatro señales. Estas señales pueden provenir de sustituyentes del anillo aromático. Las señales en δ 56.28 y 57.05 ppm tienen desplazamientos muy similares, por lo que su ambiente químico lo es también. Se asignaron estas señales a los carbonos C-7 y C-2 respectivamente, ya que son los más alejados de los átomos de oxígeno electroattractores en la molécula, además, se encuentran en la parte simétrica de ésta. Las siguientes dos señales corresponden a dos sustituyentes que se encuentran en la zona asimétrica de la molécula, siendo la señal más desplazada el grupo que se encuentra más cercano a los átomos electroattractores.

A campo más bajo se observan tres señales entre δ 94 y 103 ppm, por su desplazamiento, estas señales corresponden a carbonos aromáticos unidos a un protón, por lo que les fueron asignadas las posiciones C-8, C-1 y C-6 respectivamente.

Las siguientes dos señales corresponden con átomos de carbono que conforman la estructura aromática y que no tienen sustituyentes. El desplazamiento de los carbonos 9a y 9b es menor al de los carbonos 4a y 5a debido a que estos últimos se encuentran enlazados a un átomo de oxígeno.

A campo bajo, se observan seis señales entre δ 140.00 y 159.00 ppm, lo cual indica que estos átomos de carbono son aromáticos y además se encuentran enlazados a átomos de oxígeno, por lo que los sustituyentes observados a campo alto se encontrarán unidos a estos átomos de carbono.

- Experimentos bidimensionales.

Finalmente, los experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HMBC (*Espectros 5 a 7*) muestran las correlaciones ^1H - ^1H y ^{13}C - ^1H entre los diferentes sustituyentes de la molécula, lo que permitió la ubicación de cada grupo en la estructura. En las Figuras 8.4.2.4-1 a 8.4.2.4-3 se muestran gráficamente las correlaciones de los experimentos COSY, HSQC y HMBC. En la Tabla 8.4.2.4-1 se hace recopilación de los datos resultantes de los experimentos de resonancia magnética nuclear uni y bidimensional del Compuesto A.

Posición	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	HMBC
1	7.21 s	98.32	
2		151.71	H-1, OMe-2
3		144.37	H-1
4		140.51	OMe-4, OMe-3
4a		142.14	H-1, H-8, H-6, OMe-4
5a		141.58	H-8
5		144.20	H-1, H-6
6	6.49 d (2.28)	102.90	H-8
7		158.29	H-8, H-6, OMe-7
8	6.93 d (2.33)	94.92	H-6
9a		122.24	H-8
9b		127.14	H-1
OMe-2	3.92 s	57.05	
OMe-3	4.18 s	61.57	
OMe-4	3.88 s	3.88	
OMe-7	3.83 s	56.28	

Tabla 8.4.2.4-1 Datos de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (500 MHz) para el Compuesto A (en MeOD).

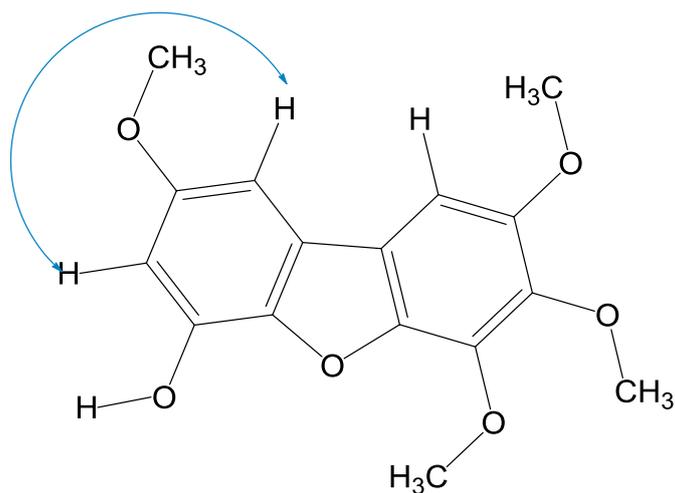


Figura 8.4.2.4-1 Correlaciones observadas en análisis COSY, Compuesto A.

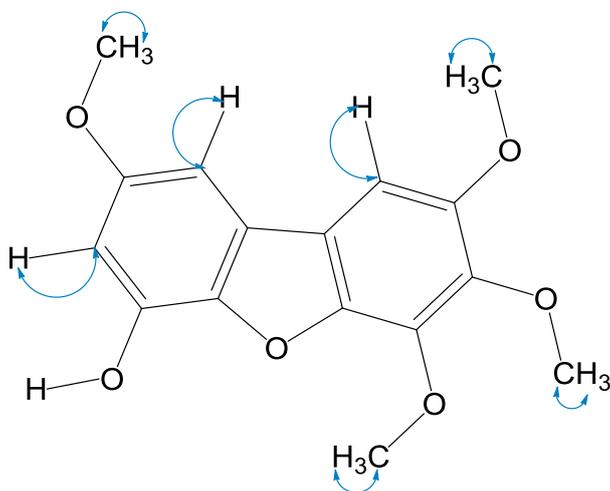


Figura 8.4.2.4-2 Correlaciones observadas en análisis HSQC, Compuesto A.

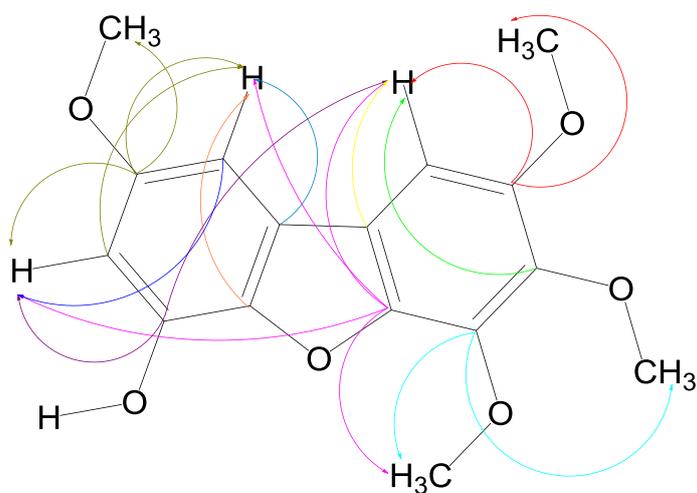


Figura 8.4.2.4-3 Correlaciones observadas en análisis HMBC, Compuesto A.

Por el estudio y análisis de los datos anteriores de IR, EM, ^1H y ^{13}C RMN se confirmó la estructura del Compuesto A observada en la Figura 8.4.2-1.

8.4.3 Caracterización del Compuesto B (2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol)

El Compuesto B, sólido no cristalino, fue analizado mediante los experimentos de IR, EM (ESI) y RMN uni y bidimensional. Los resultados se discuten a continuación.

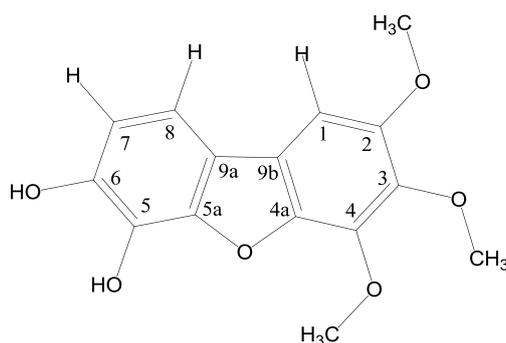


Figura 8.4.3-1 Estructura del Compuesto B, 2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol.

8.4.3.1 Espectroscopía infrarroja

El espectro de infrarrojo del Compuesto B se puede encontrar en la sección anexa como *Espectro 8*. Se observa la presencia de una señal ancha a una frecuencia de 3406.33 cm^{-1} , característica en el estiramiento del enlace entre oxígeno e hidrógeno en un grupo alcohol fenólico, que, por su forma, indica que se encuentra unido a un anillo aromático; lo anterior se confirma por la presencia de bandas confirmatorias a 1268.57 y 1187.75 cm^{-1} .

Adicionalmente, se aprecia una banda que indica la presencia de ciclos aromáticos en 1597.52 cm^{-1} , estas señales indican el estiramiento entre el enlace C-H del anillo y el estiramiento de las insaturaciones C=C en un ciclo aromático.

La banda observada a 2838.11 cm^{-1} indica la presencia de éteres, específicamente metoxilos, los cuales muestran bandas confirmatorias ubicadas en 1459.47 , 1369.24 , y 1054.34 cm^{-1} para metoxilos aromáticos.

8.4.3.2 Espectrometría de masas

El espectro de masas del Compuesto B obtenido mediante la técnica ESI en modo positivo se puede encontrar en la sección anexa como *Espectro 9*. Se puede observar un pico a m/z 290 para el ion molecular. Se observan picos a mayor m/z , sin embargo, el Compuesto B se obtuvo a partir de una serie de fracciones que contenían al Compuesto A, únicamente separado gracias a su cristalización, y probablemente otros compuestos minoritarios, todos ellos en menor concentración en relación con el Compuesto B, por lo que las últimas señales se pueden atribuir a estos compuestos.

Por lo anterior es posible decir que el compuesto analizado presentó un peso molecular de 290 g/mol con una fórmula molecular condensada igual a $C_{15}H_{14}O_6$. Por otro lado, también se aprecia el pico base a m/z 275.

La primera y segunda pérdida pudieron deberse a la salida de grupos metilo seguida de la salida del resto de los sustituyentes del/los anillo(s) aromático(s), previamente observados en el espectro de IR. Además, estos sustituyentes pueden ser grupos metoxilos, ya que la pérdida de 30 unidades concuerda con el peso molecular de éste último.

Tras analizar los picos posteriores, se puede decir que se siguieron perdiendo grupos metoxilo y/o hidroxilo hasta llegar al pico m/z 169; después de este pico, los demás pueden ser diferentes patrones de fraccionamiento relativos a alcanos. En resumen, se confirma la presencia de anillos aromáticos sustituidos con grupos unidos a oxígeno.

8.4.3.3 Resonancia magnética nuclear

Los espectros se encuentran en la sección anexa.

- Resonancia magnética nuclear de protón (1H). *Espectro 10*.

1H -RMN (MeOD, 500 MHz): δ 7.24 ppm (1H, s, H-1), δ 6.82 ppm (1H, d, $J=8.56$ Hz, H-7), δ 6.64 ppm (1H, d, $J=8.59$ Hz, H-8), δ 4.21 ppm (3H, s, OMe-3), δ 3.95 ppm (3H, s, OMe-2) y δ 3.91 ppm (3H, s, OMe-4).

Partiendo de campo alto, en la zona correspondiente a los enlaces entre C y O, se observan tres singuletes entre δ 3.8 y 5.0 ppm. La integración de estas señales es 3, por lo que puede hablarse de la presencia de metilos unidos a

oxígeno, en otras palabras, tres grupos metoxilo. A pesar de que las tres señales hacen referencia al mismo grupo, presentan desplazamientos diferentes, por lo que cada uno se encuentra en un ambiente químico diferente.

En la zona de los anillos aromáticos, se aprecian tres señales entre δ 6.0 y 7.3 ppm que integran para 1 protón cada una; dos de ellas son dobletes. Las constantes de acoplamiento de los protones H-7 y H-8 son 8.56 y 8.59 Hz respectivamente, lo que indica que se encuentran en posición orto uno con respecto al otro.

Así mismo, a δ 7.24 ppm, se encuentra un singulete que integra para 1 protón, el cual debe encontrarse en un ambiente diferente a los dos protones mencionados anteriormente, por lo que puede encontrarse en el anillo restante. Debido a su desplazamiento, este protón se ve afectado por algún sustituyente mayormente electroattractor, lo que destina su señal a campo más bajo.

A pesar de que el espectro de IR hace notar la presencia de grupos alcohol, éstos no fueron observados en el espectro de ^1H -RMN, como se mencionó anteriormente, no se sabe la razón.

- Resonancia magnética nuclear de carbono (^{13}C). *Espectro 11.*

^{13}C -RMN (MeOD, 500 MHz): δ 149.99 ppm (C-2), δ 148.24 ppm (C-5a), δ 147.01 ppm (C-5), δ 142.44 ppm (C-4a), δ 140.30 ppm (C-4), δ 139.75 ppm (C-3), δ 137.66 ppm (C-6), δ 121.60 ppm (C-9b), δ 116.08 ppm (C-9a), δ 114.20 ppm (C-7), δ 104.93 ppm (C-8), δ 103.42 ppm (C-1), δ 61.88 ppm (OMe-4), δ 61.52 ppm (OMe-3), δ 56.33 ppm (OMe-2).

Con el espectro de ^{13}C -RMN se confirma la teoría de la presencia de anillos aromáticos sustituidos con grupos metoxilo e hidroxilo.

Se observan tres señales (δ 56.33, 61.52 y 61.88 ppm) a campo alto en la zona de enlace entre átomos de carbono alifáticos y oxígeno. Debido a las estructuras aromáticas previamente propuestas, los únicos átomos de carbono que pueden ser alifáticos deberían ser parte de los sustituyentes de estos anillos. Por ello, estas señales se pueden atribuir a la presencia de tres grupos metoxilo.

Se pueden observar dos señales a δ 13.42 y 104.93 ppm, debido a su desplazamiento, estos átomos de carbono no presentan sustituyentes con presencia de oxígeno, además, su ambiente químico es similar, por lo que pueden ser simétricos con respecto a la estructura de la molécula.

En la zona ubicada entre δ 100.00 y 149.99.00 ppm se encuentran doce señales cuyo desplazamiento confirma la presencia de una estructura aromática, además, al menos dos de ellas (δ 116.08 y 121.60 ppm) no presentan sustituyentes.

Por lo anterior, y sumado a la información obtenida de los análisis ya mencionados, se sabe que hay tres metoxilos y grupos alcohol como sustituyentes, además de la posible presencia de un heterociclo cuya estructura coincida con el peso molecular previamente mencionado.

- Experimentos bidimensionales.

Finalmente, los experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HMBC (*Espectros 12 a 14*) muestran las correlaciones ^1H - ^1H y ^{13}C - ^1H entre los diferentes sustituyentes de la molécula, lo que permitió la ubicación de cada grupo en la estructura. En las Figuras 8.4.3.3-1 a 8.4.3.3-3 se muestran gráficamente las correlaciones de los experimentos antes mencionados.

En la Tabla 8.4.3.3-1 se hace recopilación de los datos resultantes de los experimentos de resonancia magnética nuclear uni y bidimensional del Compuesto B.

Posición	δ_{H} (J en Hz)	δ_{C}	HMBC
1	7.24 s	103.42	
2		149.99	OMe-2
3		139.75	OMe-3
4		140.30	OMe-4
4a		142.44	H-1
5a		148.24	H-7, H-8, H-1
5		147.01	
6		137.66	H-7, H-8

7	6.82 d (8.56)	114.20	H-8
8	6.64 d (8.59)	104.93	H-7
9a		116.08	H-8, H-1, H-7
9b		121.60	H-8, H-1
OMe-2	3.95 s	56.33	
OMe-3	4.21 s	61.52	
OMe-4	3.91 s	61.88	

Tabla 8.4.3.3-1 Datos de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (500 MHz) para el Compuesto B (en MeOD).

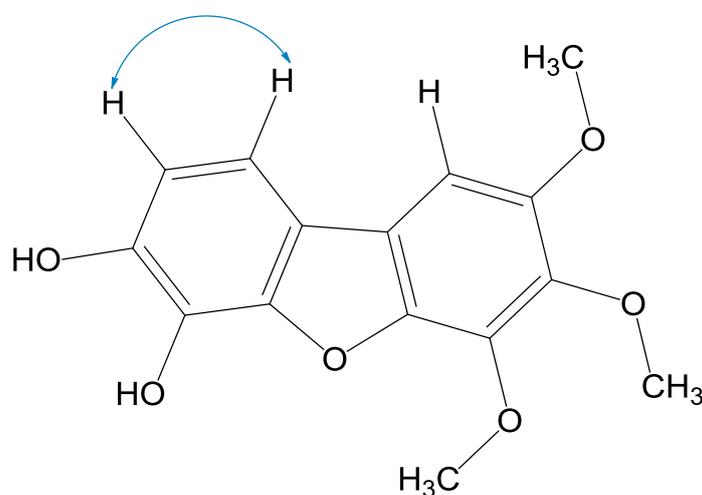


Figura 8.4.3.3-1 Correlaciones observadas en análisis COSY, Compuesto B.

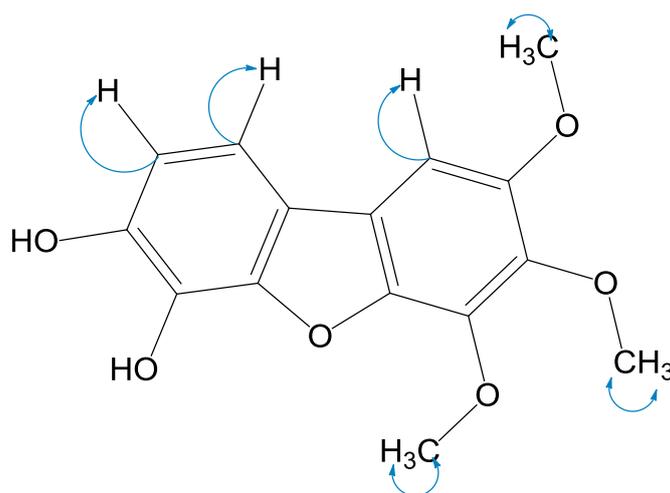


Figura 8.4.3.3-2 Correlaciones observadas en análisis HSQC, Compuesto B.

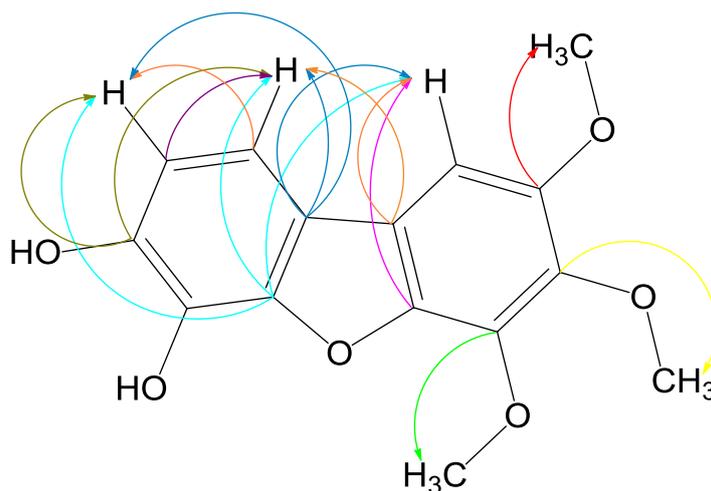


Figura 8.4.3.2-3 Correlaciones observadas en análisis HMBC, Compuesto B.

Del análisis de los datos de IR, EM y de RMN ^1H y ^{13}C se asignó al compuesto B la fórmula estructural observada en la Figura 8.4.3-1.

En resumen, se aislaron dos dibenzofuranos provenientes de la separación por cromatografía de columna abierta del extracto de AcOEt de la raíz de tejocote. Ambos compuestos se encontraban de forma mayoritaria en las fracciones 143 a 252, probablemente formando parte de una mezcla de compuestos con estructuras similares, sin embargo, gracias a la cristalización del Compuesto A fue posible separarlo del Compuesto B para la posterior caracterización de cada uno. La estructura del Compuesto A, (2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol) fue completamente definida gracias a la prueba de difracción de rayos X y a su confirmación mediante las pruebas espectroscópicas y espectrométricas realizadas. Se presenta la estructura del Compuesto B (2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol) como una propuesta basada en los análisis espectroscópicos y espectrométricos empleados. Ninguno de estos compuestos ha sido reportado con anterioridad.

8.4.4 Pruebas biológicas del Compuesto A (2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol)

Debido a la limitada cantidad del Compuesto A únicamente se evaluó su actividad antioxidante y antidiabética.

8.4.4.1 Actividad antioxidante

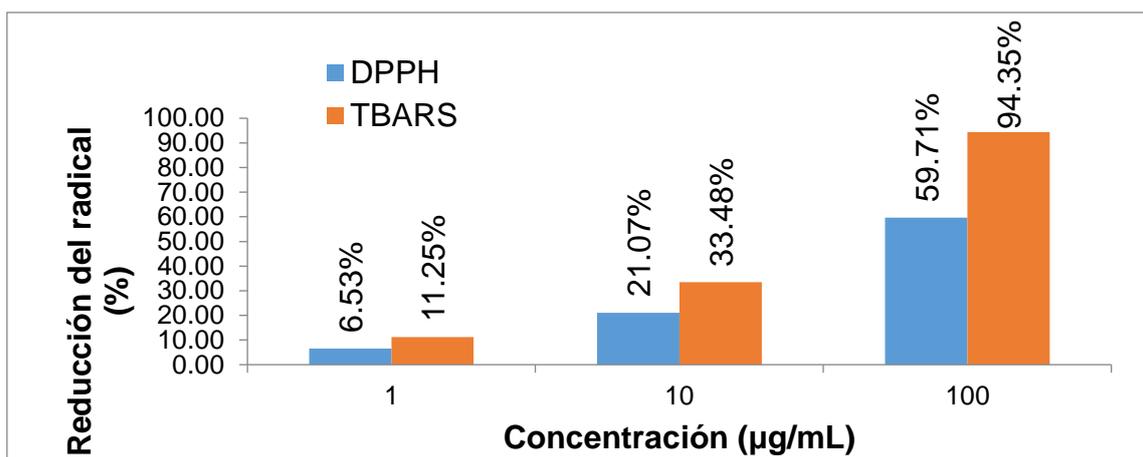
- Ensayo de actividad secuestradora sobre el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

El Compuesto A presenta una estructura aromática, la cual es responsable de la estabilización del radical DPPH, gracias a la resonancia de sus anillos aromáticos. Gracias a esto disminuye la reactividad del radical DPPH, pues ha sido estabilizado.

Como se observa en la gráfica 8.4.4.1-1 el Compuesto A inhibe un poco más de la mitad de la concentración total del radical DPPH únicamente a 100 µg/mL, lo cual indica que su capacidad como antioxidante no es suficientemente efectiva para proponerlo como suplemento o como parte de sus ingredientes activos.

- Ensayo de inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata en términos de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Los lípidos tienen un papel indispensable en el mantenimiento de la integridad estructural de las células. A pesar de ser un proceso necesario²², la oxidación excesiva de los lípidos altera las propiedades físicas de las membranas celulares y puede causar la modificación covalente de proteínas y ácidos nucleicos³⁷. En estas reacciones se ven implicadas especies reactivas de oxígeno, generadas por el estrés oxidativo, las cuales reaccionan con ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana celular provocando la muerte celular. A manera de protección celular, la presencia de antioxidantes puede disminuir la cantidad de radicales.



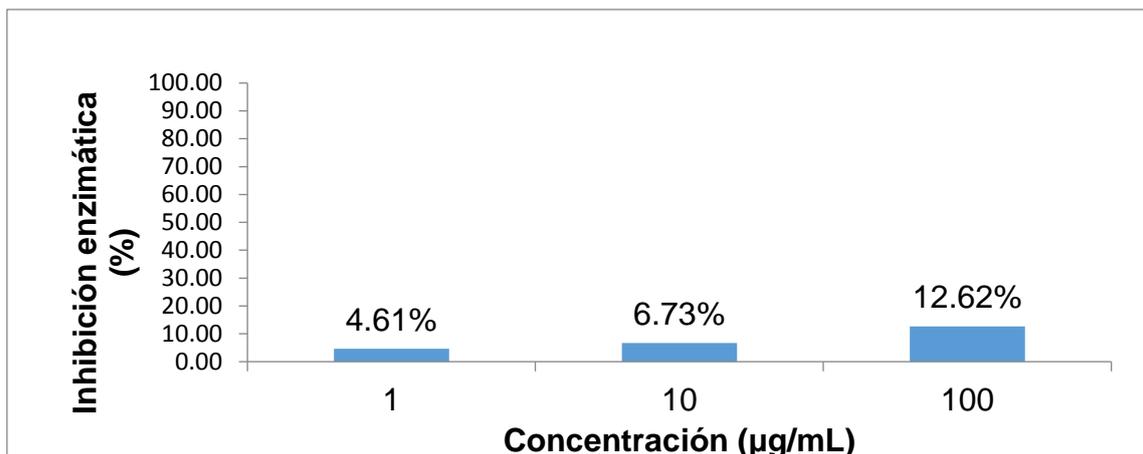
Gráfica 8.4.4.1-1 Efecto antioxidante del Compuesto A mediante la reducción de los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y ácido tiobarbitúrico (TBARS), a diferentes concentraciones.

En la gráfica 8.4.4.1-1 se puede observar que a 100 µg/mL se da la mejor respuesta con una inhibición cercana al 100 %. El efecto inhibitor es mayor con los productos de peroxidación lipídica comparando con el radical DPPH, por ello se puede decir que el Compuesto A es más efectivo como antioxidante en reacciones relacionadas con el estrés oxidativo celular, por lo que puede proponerse como ingrediente activo en suplementos tras analizar su toxicidad.

8.4.4.2 Actividad antidiabética

La diabetes es un padecimiento crónico cuya incidencia ha ido en aumento en las últimas décadas²⁸. Actualmente, el uso de sensibilizadores de insulina constituye la línea terapéutica principal, sin embargo, el uso de inhibidores de enzimas digestivas de carbohidratos para reducir la absorción de glucosa también es vital para no interferir con el metabolismo de estos nutrientes y ayudar al control de la hiperglucemia de una forma no invasiva³⁸.

Se han aislado dibenzofuranos con la capacidad de inhibir a enzimas glucosidasas en extractos de acetato de etilo³⁸ y diclorometano³⁹, en algunas regiones de Nigeria³⁸ y el sur de América³⁹. Se ha propuesto que el mecanismo de acción que presentan los dibenzofuranos es a través de la hidrólisis de las enzimas involucradas y la estimulación de las secreciones de insulina³⁸.



Gráfica 8.4.4.2-1 Capacidad de inhibición de la enzima glucosidasa del Compuesto A, a diferentes concentraciones.

Como se observa en la gráfica 8.4.4.2-1 el Compuesto A no tiene un efecto inhibitorio significativo, probablemente debido al tipo de sustituyentes que tiene la molécula, particularmente la cantidad de grupos hidroxilo y carbonilo, los cuales pueden marcar una diferencia entre éste y los dibenzofuranos ya reportados. El efecto de los sustituyentes puede estar relacionado con las interacciones adecuadas para lograr la inhibición enzimática.

8.4.5 Pruebas biológicas del Compuesto B (2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol)

8.4.5.1 Actividad antioxidante

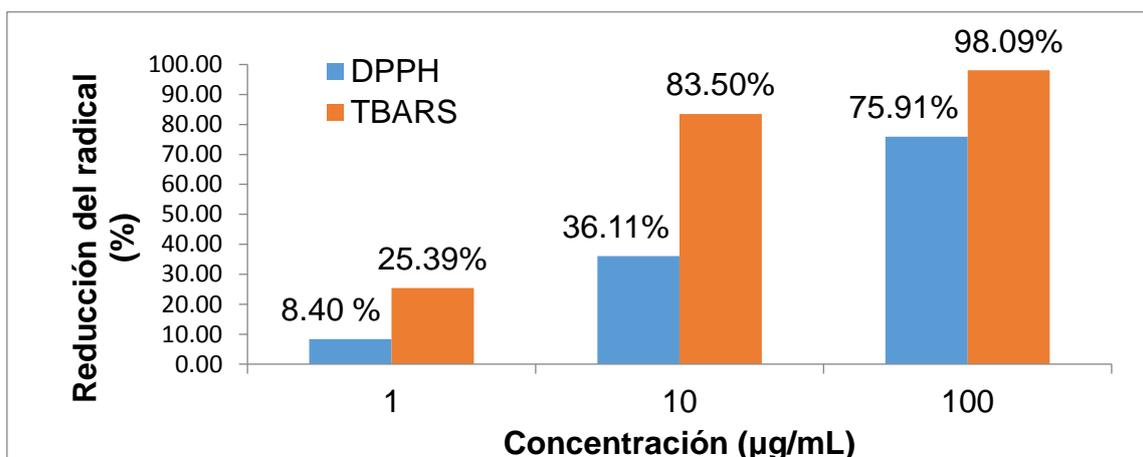
- Ensayo de actividad secuestradora sobre el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

En la gráfica 8.4.5.1-1 se puede observar el efecto antioxidante del Compuesto B frente al radical DPPH bajo tres concentraciones diferentes. Como se observa, fue necesaria la concentración más alta analizada para obtener una reducción significativa del radical, por ello y para definir si el Compuesto B puede emplearse como un suplemento antioxidante es necesario realizar pruebas de toxicidad.

De la misma forma que el Compuesto A, la actividad observada se da gracias a la estructura aromática del Compuesto B, ya que puede estabilizarse como un radical menos reactivo que el DPPH.

- Ensayo de inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata en términos de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

En la gráfica 8.4.5.1-1 se observa un mayor efecto antioxidante en la prueba TBARS por parte del Compuesto B, comparado con el radical DPPH. En ambos ensayos sigue el mismo comportamiento al aumentar la actividad conforme aumenta la concentración indicando la capacidad de este compuesto para reducir radicales centrados en nitrógeno o en carbono, y aquellos producidos tras una reacción de peroxidación lipídica.



Gráfica 8.4.5.1-1 Efecto antioxidante del Compuesto B mediante la reducción de los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y ácido tiobarbitúrico (TBARS), a diferentes concentraciones, en tejido de cerebro de ratón.

En estudios anteriores^{18, 19} se ha demostrado que los difenilos provenientes de la raíz y/o tallo de algunas plantas presentan actividad inhibitoria en la formación de superóxidos, que se sabe están íntimamente relacionados con procesos inflamatorios¹⁹.

8.4.5.2 Actividad antiinflamatoria

Se ha reportado el aislamiento de dibenzofuranos de fuentes naturales con actividad antiinflamatoria fundamentada en la inhibición de la generación del anión superóxido debida a los neutrófilos, células humanas que desempeñan un papel importante en la defensa del huésped contra los microorganismos y en la patogénesis de diversas enfermedades¹⁹.

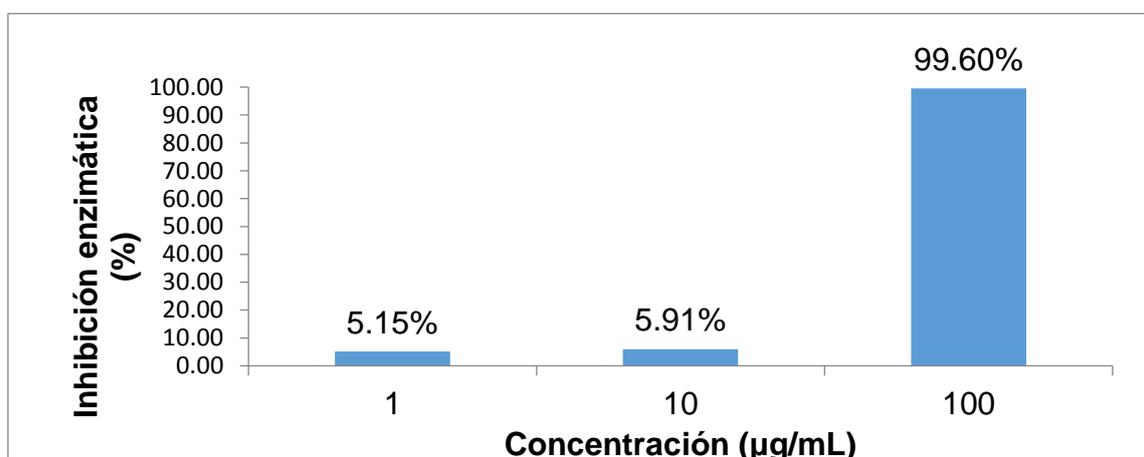
En este proyecto, tras la inducción de edema en orejas de ratón macho CD1 y la aplicación del Compuesto B bajo una concentración de 17.86 mg/kg se observó

una inhibición de la inflamación de 56.27 ± 19.23 %. Este valor es apenas representativo comparado con otros fármacos, como la indometacina, la cual presenta una inhibición de 48.23 % a una concentración de 5 mg/kg⁴⁶, tres veces menos la concentración evaluada del Compuesto B; sin embargo, puede compararse con otros medicamentos como el ibuprofeno, el cual requiere de 30.13 mg/kg para observar un 50 % de inhibición (DE₅₀)⁴⁷.

Sin embargo, en un estudio sobre de raíz de *Rhaphiolepis indica*¹⁸, perteneciente a la misma familia que el tejocote (Rosaceae), se reportaron difenilos y debenzofuranos provenientes de extractos metanólicos con una mejor relación dosis-respuesta (IC₅₀) que algunos fármacos como el ibuprofeno, lo que motiva a profundizar en el estudio del tejocote.

8.4.5.3 Actividad antidiabética

Como se observa en la gráfica 8.4.5.3-1, el Compuesto B tiene muy alta capacidad para inhibir a la enzima α -glucosidasa a altas concentraciones.



Gráfica 8.4.5.3-1 Capacidad de inhibición de la enzima glucosidasa del Compuesto B, a diferentes concentraciones.

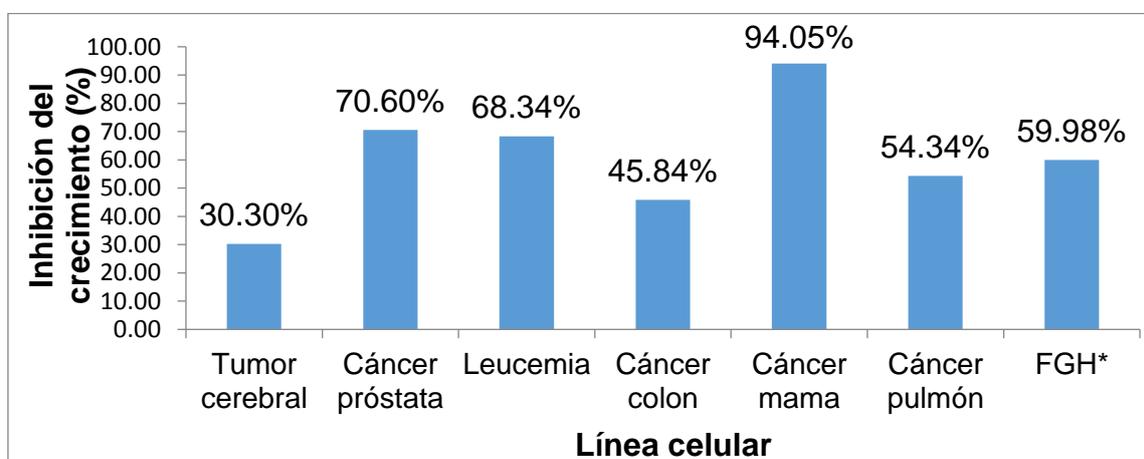
La diferencia observada entre este compuesto y el Compuesto A puede deberse al tipo de sustituyentes que presentan, ya que ambos comparten una estructura casi idéntica, excepto por dos sustituyentes, los cuales pueden influir en la actividad inhibitoria observada. Además, como se mencionó anteriormente, es necesario determinar su IC₅₀ y realizar un análisis toxicológico para proponer su uso.

8.4.5.4 Actividad citotóxica

Múltiples dibenzofuranos han sido reportados por su actividad biológica. Dentro de sus estructuras generalmente se encuentran grupos hidroxilo, carbonilo, cloruro y glucósidos, entre otros. Se ha propuesto que precisamente la presencia de grupos fenólicos libres y adyacentes a carbonilos es esencial para su actividad. Además, estos compuestos pueden intercalarse entre pares de bases del ADN inhibiendo el crecimiento de las células cancerosas⁴⁰.

A una concentración de 50 µg/mL, el Compuesto B presentó los porcentajes de inhibición del crecimiento de células cancerosas que se observan en la gráfica 8.4.5.4-1.

Dentro de estos resultados destacan la inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama, próstata y leucemia, lo cual resulta interesante ya que son estos algunos de los tipos de cáncer con mayor incidencia en la población mundial²⁹. También se observa la inhibición de crecimiento de células sanas (FGH) a más de la mitad, por lo que este compuesto no puede ser utilizado para prevenir o tratar al cáncer.



Gráfica 8.4.5.4-1 Efecto del Compuesto B en el crecimiento de líneas celulares cancerosas a 50 µg/mL. *FGH: Fibroblastos gingivales humanos sanos.

En conjunto, tanto el Compuesto A como el B podrían proponerse para ser utilizados como ingredientes activos en diferentes productos, tales como suplementos; siempre y cuando se repitan las pruebas preliminares para definir la desviación de los resultados, además de asegurar su toxicidad y definir su

estabilidad en diferentes condiciones para establecer el tipo de producto adecuado.

Se continuó este estudio con los extractos de acetona y se obtuvieron los siguientes resultados:

8.5 Aislamiento, caracterización y actividad biológica de las fracciones del extracto de acetona PG-P 1, PG-P 2 y PG-P 3.

Debido a que dentro del desarrollo de suplementos se pueden utilizar extractos completos, se continuó con el análisis de las fracciones acetónicas con el fin de determinar su actividad biológica.

8.5.1 Obtención

Para el fraccionamiento de los extractos de acetona se trabajó con una nueva cantidad del mismo lote de raíz que asegurara una cantidad suficiente para lograr su identificación. Se compararon los perfiles cromatográficos de ambos lotes para confirmar la homogeneidad del análisis mediante CCF, como se muestra en la Figura 8.5.1-1.

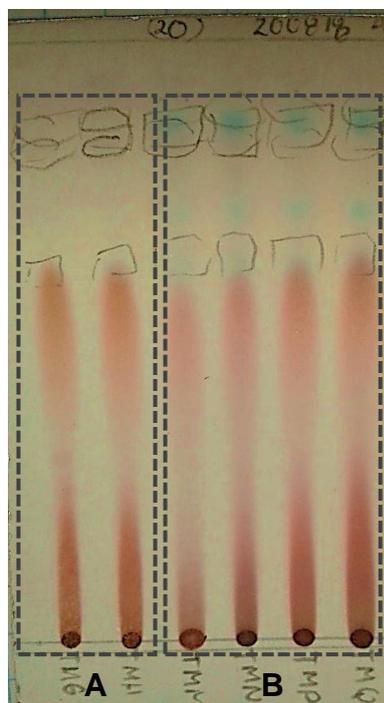


Figura 8.5.1-1 Perfil cromatográfico de los extractos de acetona obtenidos del primer (A) y segundo (B) lote de raíz. SE AcOEt 9:1 CH₂Cl₂.

Una vez confirmados los perfiles se procedió a la separación de los componentes de los extractos. En un primer intento de separación se empleó una columna bajo presión tipo *flash*, usando un gradiente de polaridad en la fase móvil. Sin embargo, no hubo una separación apreciable de los componentes, como se muestra en la Figura 8.5.1-2.

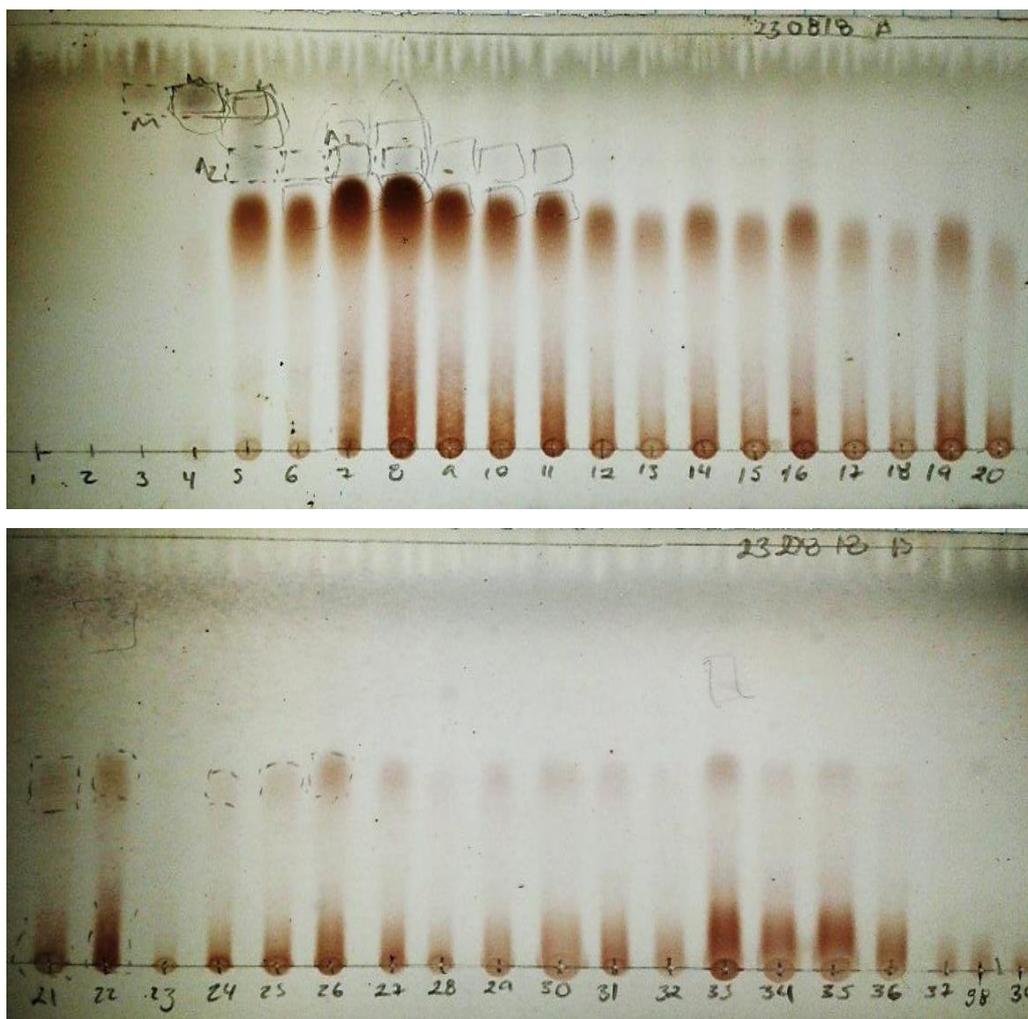


Figura 8.5.1-2 Perfil cromatográfico del fraccionamiento de los extractos de acetona mediante columna tipo *flash*.

Por lo anterior, se eligió la técnica de cromatografía en placa preparativa. Se obtuvieron 9 fracciones, todas ellas polares, lo que dificultó su separación. Estas fracciones fueron agrupadas como: PG-P 1 (Fracciones 1 a 5), PG-P 2

Fracciones 6 y 7) y PG-P 3 (Fracciones 8 y 9); de mayor a menor polaridad respectivamente. Se puede observar su perfil en CCF en la Figura 8.5.1-3.

Debido a la polaridad de las fracciones obtenidas no fue posible la separación de algún compuesto en particular. Sin embargo, se realizaron diferentes pruebas espectroscópicas para elucidar la posible composición general de cada fracción.

Así mismo, debido a que dentro del desarrollo de suplementos se pueden utilizar extractos completos, se continuó con el análisis de estas fracciones con el fin de determinar su actividad biológica.

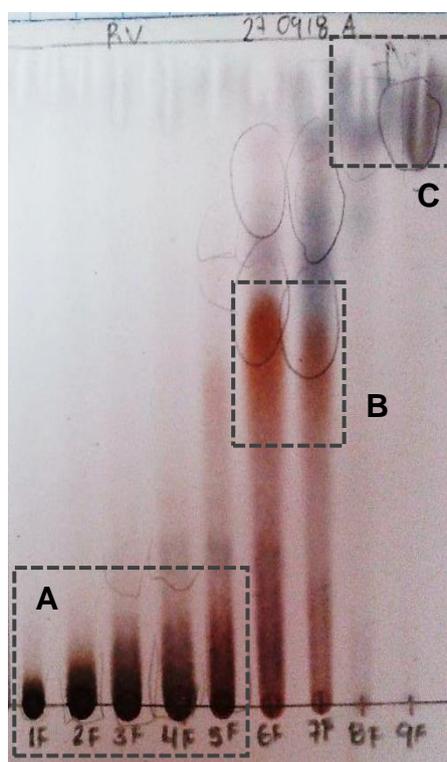


Figura 8.5.1-3 Perfil cromatográfico del fraccionamiento de los extractos de acetona mediante placa preparativa. Fracciones PG-P 1 (**A**), PG-P 2 (**B**) y PG-P 3 (**C**). SE AcOEt 9:1 CH₂Cl₂.

Se obtuvieron aproximadamente 1200 mg de la fracción PG-P 1, 240 mg de la fracción PG-P 2 y 150 mg de la fracción PG-P 3. Se partió de 2.95 g del extracto completo de acetona. Por tanto, el rendimiento para cada fracción fue de 40.7 %, 8.13 % y 5.1 %, respectivamente. Como se puede observar hubo pérdidas que se pueden atribuir a la técnica de separación empleada.

8.5.2 Caracterización

Se emplearon las técnicas espectroscópicas y espectrométricas de IR, RMN y EM (ESI). Debido a que se analizaron mezclas, los siguientes análisis son sólo aproximaciones de un perfil general de compuestos.

Se ha reportado la presencia de proteínas, lípidos, polisacáridos³³, alcoholes, terpenos, aldehídos, flavonoides, ácidos^{34, 35}, taninos³⁶, entre otros, en la raíz de diferentes familias de árboles; por ello, se espera encontrar señales de este tipo de compuestos en las fracciones analizadas.

8.5.2.1 Espectroscopía infrarroja

Los espectros se encuentran anexos.

- Fracción PG-P 1 (*Espectro 15*)

Se aprecia una banda característica del estiramiento del enlace entre oxígeno e hidrógeno en un grupo funcional alcohol en 3286.52 cm^{-1} . Así mismo, se observa una serie de bandas entre 1400 y 1650 cm^{-1} que indican la posible presencia de compuestos con el grupo alcohol, que sumado a la banda en 1219.14 cm^{-1} , puede tratarse de un grupo aromático. Además, a 1035.30 cm^{-1} se encuentra una banda relativa a éteres aromáticos. Lo anterior tiene sentido si se considera que esta fracción contiene a los compuestos más polares del extracto de acetona.

- Fracción PG-P 2 (*Espectro 16*)

En esta fracción se observa una serie de bandas alusivas al grupo alcohol, sin embargo, estas se encuentran deformadas, por lo que deben encontrarse en baja concentración, además de verse afectadas por los demás componentes de la muestra analizada. Se observa una serie de bandas entre 1400 y 1600 cm^{-1} y otra a 1237.38 cm^{-1} que pueden indicar la presencia del grupo fenol. A 1276.98 cm^{-1} se encuentra una banda que puede estar asociada a la presencia de éteres aromáticos. Estas señales indican la posible presencia de átomos de carbono, oxígeno y nitrógeno.

- Fracción PG-P 3 (*Espectro 17*)

Esta fracción también presenta una banda en la zona de estiramiento del grupo funcional alcohol en 3351.65 cm^{-1} . A pesar de ser poco definida puede indicar la presencia de este grupo. Se observan dos bandas intensas a 2924.37 y 2853.88 cm^{-1} , lo que indica la presencia de cadenas alifáticas. Esta misma señal se aprecia disminuida en las anteriores fracciones. Entre 1200 y 1600 cm^{-1} hay señales que pueden atribuirse a los grupos fenol y éter aromático. Adicionalmente, las bandas menores a 1700.00 cm^{-1} se encuentran muy distorsionadas, por lo que es difícil determinar más grupos.

Finalmente, se puede observar que la ligera diferencia de polaridad entre las tres fracciones concuerda con los grupos mayoritarios observados en esta técnica. Además, varios de estos grupos van de acuerdo con lo ya reportado⁵.

8.5.2.2 Espectrometría de masas

Los espectros se encuentran anexos (*Espectro 18, 19 y 20*).

En todas las fracciones se observan señales mayores a m/z 600, sobre todo la Fracción PG-P 1, la cual presenta un pico a m/z 964; además, se observan más señales a mucho menor m/z , lo que puede indicar que estas fracciones contienen mezclas complejas de diferentes compuestos.

Debido a que las fracciones son mezclas, las señales pueden provenir de varios grupos de isómeros o compuestos con estructuras muy similares entre sí. Estas señales se encuentran de acuerdo con lo esperado, ya que corresponden con compuestos como los sesquiterpenos y los taninos, como ejemplo, los cuales pueden tener pesos moleculares mayores a 500 g/mol ³⁶. Sobre todo, los taninos son polímeros de gran peso molecular. Se puede observar un ejemplo de éstos en la Figura 8.5.2.2-1.

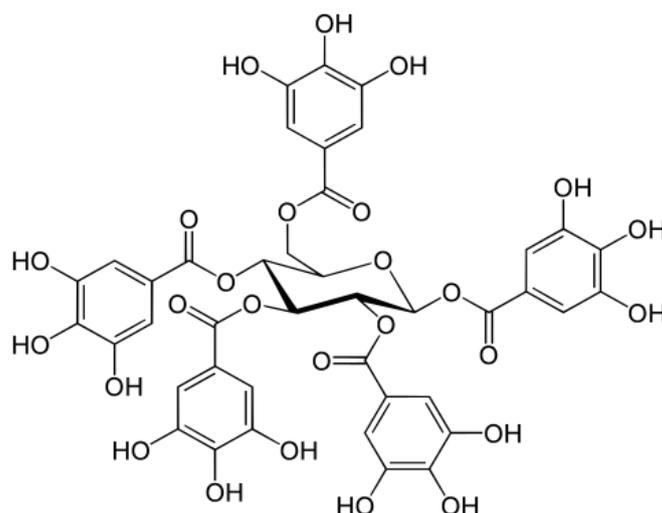


Figura 8.5.2.2-1 Ejemplo de la estructura de un tanino, 1,2,3,4,6-pentagaloilglucosa, proveniente de granada (*Punica granatum*) con peso molecular de 940.67 g/mol³⁶.

8.5.2.3 Resonancia magnética nuclear de protón

Los espectros se encuentran anexos (*Espectro 21 a 30*).

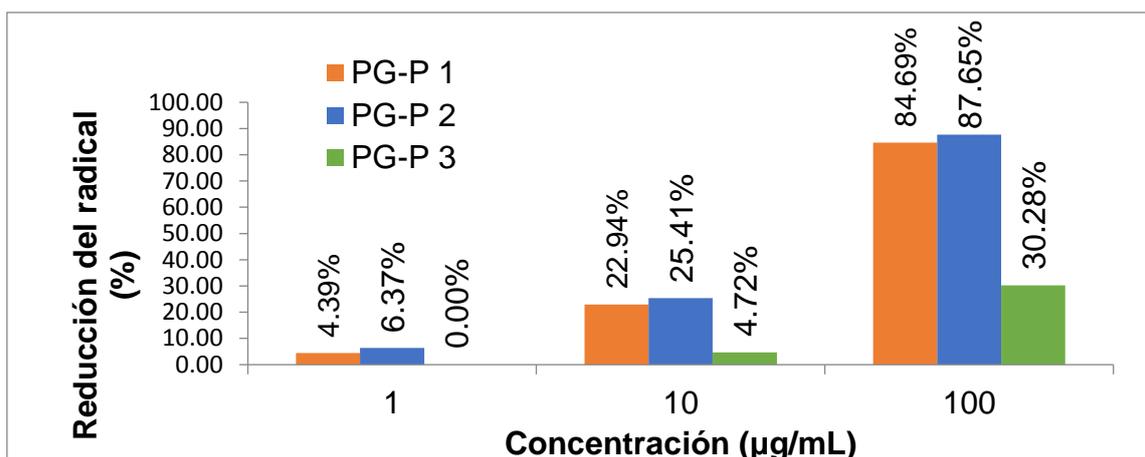
En ninguno de los experimentos se observa alguna señal claramente definida, sin embargo, en las tres fracciones se observan señales en la zona de aromáticos, enlaces con oxígeno y nitrógeno. Hay señales a campo alto, las cuales pueden deberse a cadenas alifáticas. De la misma forma, las señales coinciden con lo esperado.

8.5.3 Pruebas biológicas

8.5.3.1 Actividad antioxidante

- Ensayo de actividad secuestradora sobre el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Se puede observar en la Gráfica 8.5.3.1-1 que las fracciones con mayor actividad antioxidante son la PG-P 1 y 2, esto probablemente debido a estructuras aromáticas que permitan estabilizar al radical resultante de la reacción con los radicales DPPH y los producidos por peroxidación lipídica.



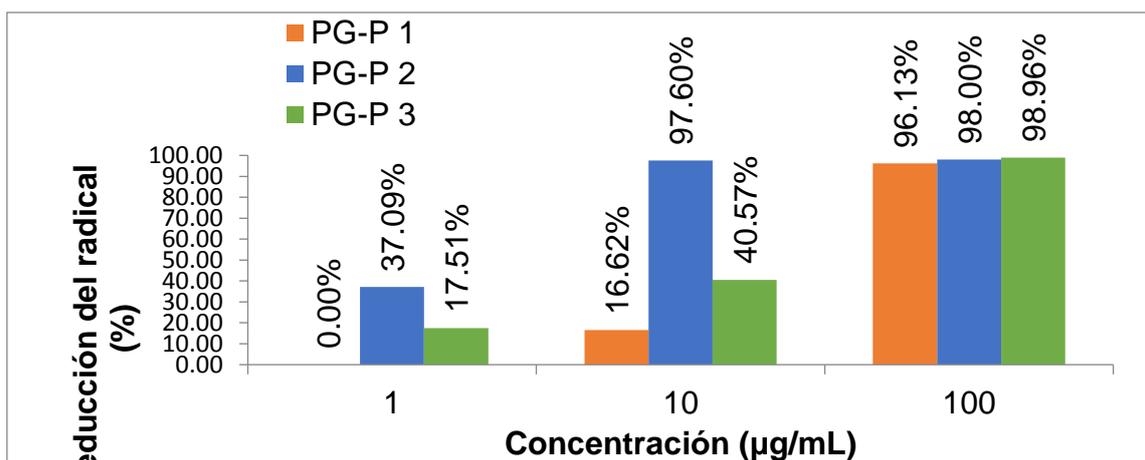
Gráfica 8.5.3.1-1 Efecto antioxidante de las fracciones PG-P 1, 2 y 3 mediante la reducción del radical DPPH, a diferentes concentraciones.

Como se mencionó anteriormente, es probable la presencia de anillos aromáticos unidos a oxígeno, dependiendo de la estructura, estos compuestos pueden formar radicales estables capaces de disminuir la cantidad de especies reactivas de oxígeno.

- Ensayo de inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata en términos de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

En el caso de la Gráfica 8.5.3.1-2 se puede observar que son las fracciones PG-P 2 y 3, especialmente la 2, las que presentan mayor actividad antioxidante. Dado que en esta prueba se hace llegar a la reacción de oxidación hasta la formación de aldehídos, el efecto que observamos es debido a la estabilización de los radicales producidos y a la eliminación de los peróxidos y sus productos por acción de algunos de los componentes de las fracciones activas al donar electrones a los intermediarios de los radicales peróxido⁴¹.

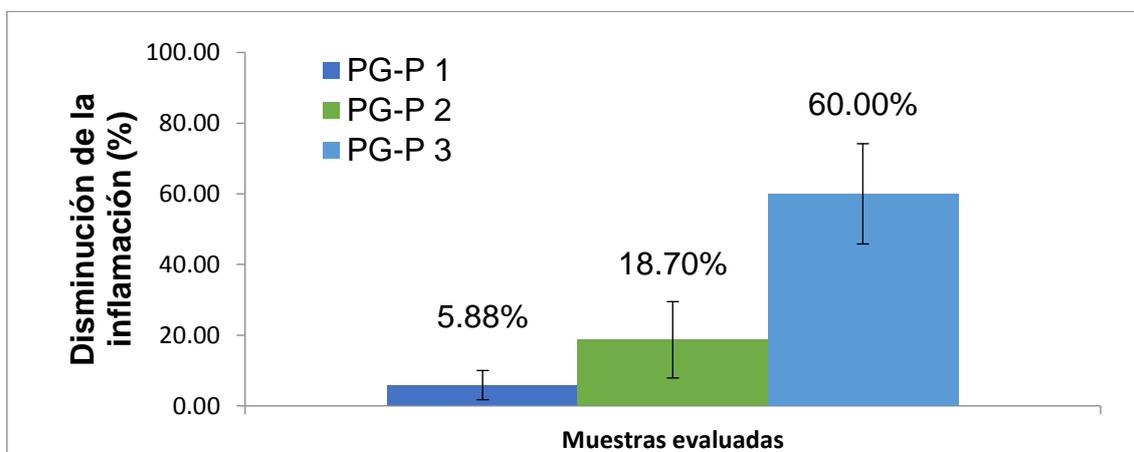
Cabe destacar que la fracción PG-P 2 resultó efectiva desde bajas concentraciones, por lo que puede proponerse como un agente antioxidante de protección de membrana celular, tras realizar las pruebas toxicológicas necesarias.



Gráfica 8.5.3.1-2 Efecto antioxidante de las fracciones PG-P 1, 2 y 3 mediante la reducción del radical TBARS, a diferentes concentraciones.

8.5.3.2 Actividad antiinflamatoria

Del extracto de acetona completo, la fracción menos polar, PG-P 3, resultó ser aquella con mayor actividad antiinflamatoria.

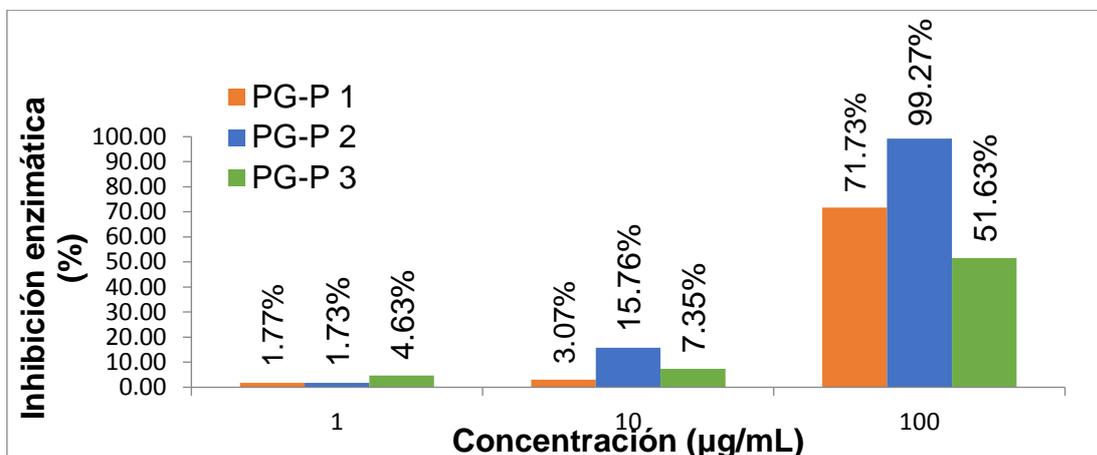


Gráfica 8.5.3.2-1 Efecto antiinflamatorio de las fracciones PG-P 1, 2 y 3 a una concentración de 17.86 mg/kg.

Dentro de su composición podrían encontrarse compuestos cuya estructura favorezca la inhibición del anión superóxido que generan los neutrófilos como respuesta a agentes exógenos.

8.5.3.3 Actividad antidiabética

Como se observa en la Gráfica 8.5.3.3-1, la fracción PG-P 2 presentó la mayor inhibición de la enzima α -glucosidasa.

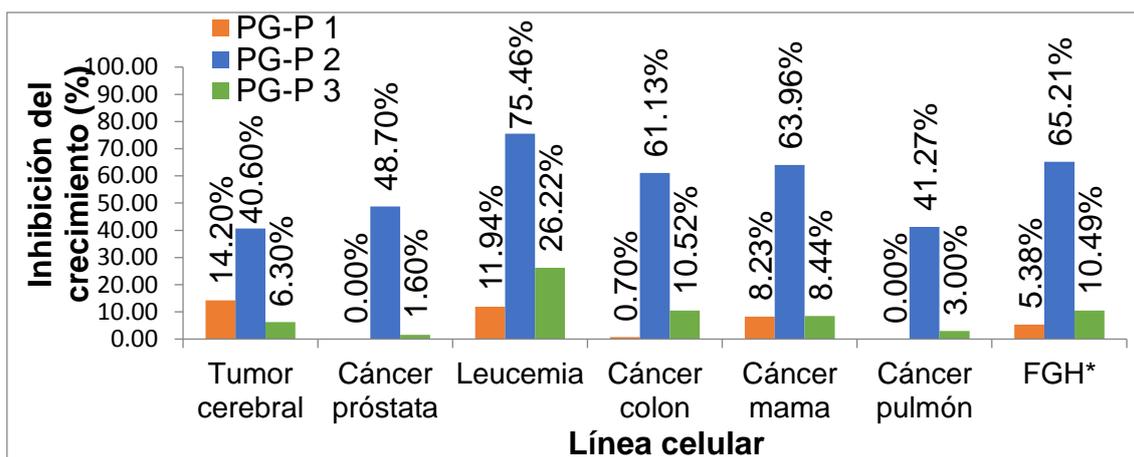


Gráfica 8.5.3.3-1 Capacidad de inhibición de la enzima α -glucosidasa las fracciones PG-P 1, 2 y 3, a diferentes concentraciones.

A pesar de que fue necesaria la concentración más alta para ver este efecto, sugiere que los compuestos que conforman a esta fracción, e incluso a la PG-P 1, son capaces de intervenir en la acción de las enzimas glucosidasas, ya sea mediante una modificación estructural en la enzima o un impedimento estérico en su sitio activo.

8.5.3.4 Actividad citotóxica

De las tres fracciones analizadas, fue la PG-P 2 la que presentó la mayor inhibición del crecimiento de las líneas celulares cancerosas evaluadas. Destacan las líneas de leucemia, cáncer de mama y de colon, sin embargo, también tuvo actividad de inhibición de crecimiento de fibroblastos gingivales humanos sanos (FGH) lo cual indica poca selectividad a células cancerosas.



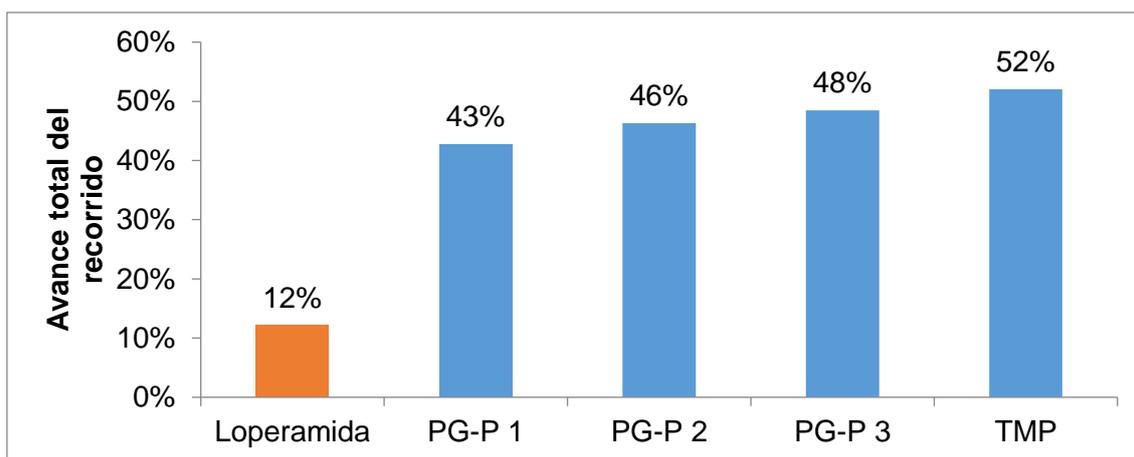
Gráfica 8.5.3.4-1 Efecto de las fracciones PG-P 1, 2 y 3 en el crecimiento de líneas celulares cancerosas a 50 µg/mL. *FGH: Fibroblastos gingivales humanos sanos.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que algunos compuestos anticancerígenos aislados de diferentes partes vegetales de especies del género *Crataegus* inducen la apoptosis celular. La actividad de estos compuestos depende de su estructura y reactividad. Por ello, puede que la composición de esta fracción sea similar a la de los compuestos ya reportados.

8.5.3.5 Efecto en la motilidad intestinal

En este análisis se evaluó el efecto de la administración de las fracciones PG-P 1 a 3 (100 mg/kg) y el extracto de acetona completo del que se obtuvieron (TMP), comparando con un control positivo (loperamida). Se observa en la Gráfica 8.5.3.5-1 que no hubo un efecto significativo en la motilidad relacionado con la retención del contenido intestinal debido a una disminución en el movimiento peristáltico, ya que, en comparación con el control, ninguna muestra tuvo un efecto significativo, pues el recorrido del contenido intestinal afectado por las muestras fue casi cuatro veces mayor. El extracto completo mostró un recorrido similar al de las fracciones.

Se indicó que probablemente sea necesaria una concentración mayor de estas muestras para alcanzar un efecto más representativo, no obstante, es necesario confirmar su efecto toxicológico para asegurar su uso.



Gráfica 8.4.3.3-1 Efecto de la administración de las muestras en la motilidad intestinal. TMP: Extracto acetónico crudo.

Debido a que existen pocos estudios referentes a la composición y actividad biológica de la raíz del árbol de tejocote, aquí describimos los resultados obtenidos siguiendo las técnicas de laboratorio disponibles.

Así mismo, se puede complementar el presente estudio con el fin de obtener las bases para el desarrollo de algún suplemento mediante la determinación de la estabilidad, biodisponibilidad, toxicidad y perfil sensorial de los Compuestos A y B, y las fracciones acetónicas

Podemos proponer que el uso de las fracciones acetónicas, en especial la PG-P 2, en el desarrollo de suplementos sólo sería viable tras la identificación y aislamiento selectivo de los compuestos con actividad antiproliferativa, antioxidante y antidiabética, debido a su citotoxicidad.

El Compuesto A podría incluirse en suplementos como ingrediente antioxidante, mientras que el Compuesto B podría emplearse como antioxidante y antidiabético. Así mismo, debido a su polaridad, podrían incluirse como extractos herbales en caramelos o preparados para infusiones libres de azúcar como parte del tratamiento y/o prevención de diabetes y cáncer. Dicha complementación aportaría opciones naturales y preventivas para la población mexicana, lo que fomentaría una mejora en la calidad de vida y una valoración de los recursos propios del territorio nacional, que a su vez permitiría la preservación de toda esta flora y vegetación de nuestro País, al conocer la importancia de los mismos.

9. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló una metodología reproducible para obtener a los Compuestos A y B, partiendo de la raíz del árbol de tejocote, *Crataegus mexicana*, mediante el uso de técnicas cromatográficas.
2. Se aisló e identificó al Compuesto A como 2, 3, 4, 7-tetrametoxidibenzofuran-5-ol y al Compuesto B como 2, 3, 4-trimetoxidibenzofuran-5, 6-diol (propuesta) a partir del extracto de AcOEt de la raíz del árbol de tejocote.
3. Los Compuestos A y B son dibenzofuranos naturales descritos por primera vez.
4. El Compuesto A mostró actividad antioxidante (94.4 %, 100 µg/mL) relacionada con su estructura y reactividad.
5. El Compuesto B mostró actividad antioxidante (98.1 %, 100 µg/mL) y antidiabética (99.6 %, 100 µg/mL) relacionada con su estructura y reactividad.
6. Se determinó que el extracto de acetona, que fue fraccionado en PG-P 1, 2 y 3, posee actividad antioxidante (PG-P 2, 97.6 %, 10 µg/mL), antiinflamatoria (PG-P 3, 60.0 %, 17.86 mg/kg) y antidiabética (PG-P 2, 99.3 %, 100 µg/mL).
7. De acuerdo con la actividad biológica evaluada, el Compuesto A puede ser propuesto como ingrediente activo antioxidante y el Compuesto B puede ser propuesto como ingrediente activo antioxidante y antidiabético en el desarrollo de suplementos.
8. El presente estudio implica una contribución al conocimiento fitoquímico de esta planta mexicana para fundamentar y asegurar los usos etnobotánicos que le han sido atribuidos, además de fomentar la valoración de los recursos naturales nacionales.

10. BIBLIOGRAFÍA

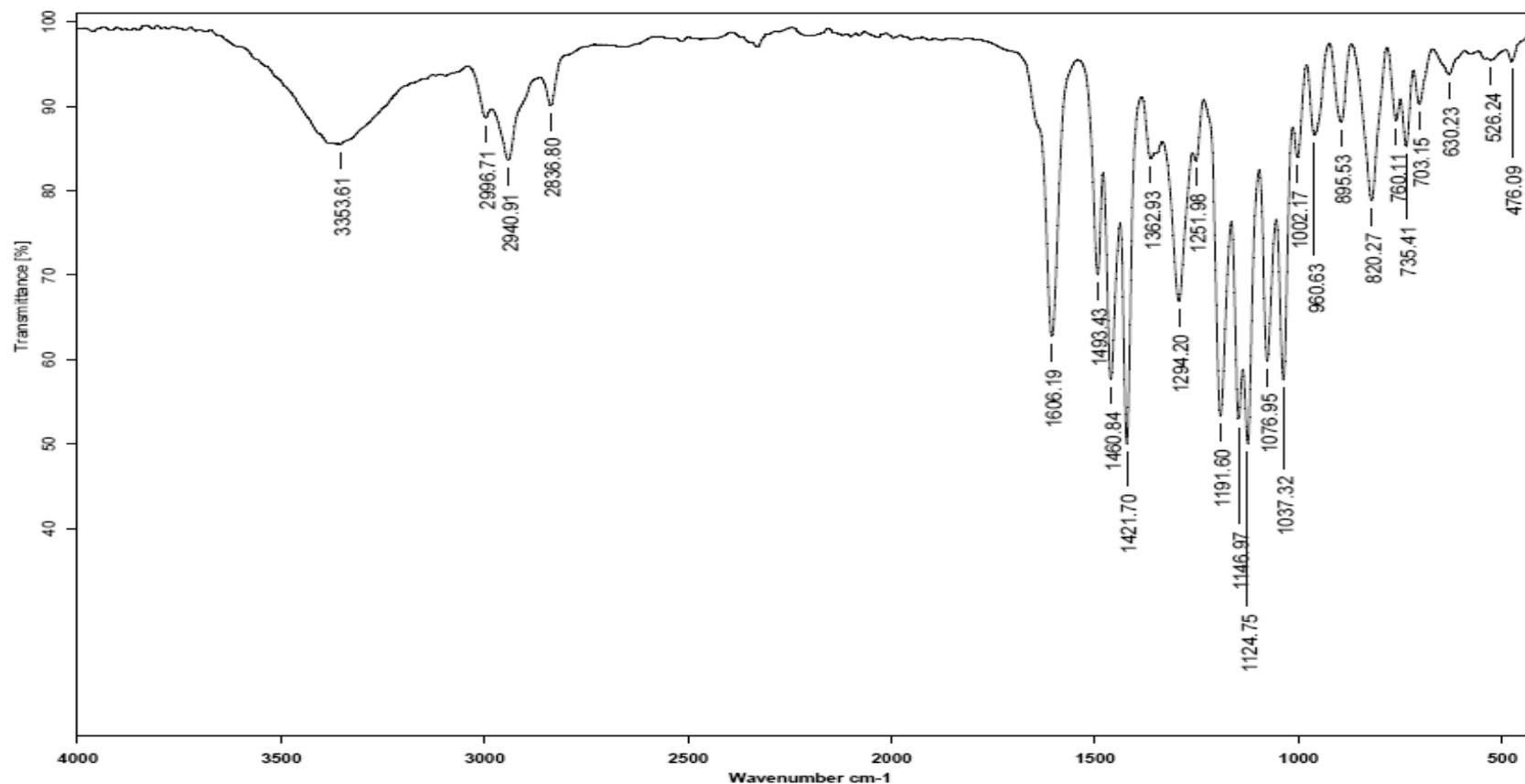
1. Núñez CCA, Hernández MMA. (2011). La problemática de los recursos genéticos de tejocote (*Crataegus* spp) en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. (2), 141-153.
2. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. Consultado el 9 de octubre de 2018 en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7778>.
3. *Crataegus pubescens* (Kunth) Steud. (1841). *Nomenclator Botanicus*. (2), 224-226. Consultado el 11 de octubre de 2018 en http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/59-rosac1m.pdf
4. León, J. (2000). Botánica de los cultivos tropicales. San José, Costa Rica. *Editorial Agroamericana*.
5. Edwards, J. E., et. al. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*. (79), 5-26.
6. Rohrn, E. G., et. al. (2000). Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part I. Diode array and electrochemical detection. *Phytochemical analysis*. (11), 106-112.
7. Kovaleva, A.M., Goncharov, N.F., Komissarenko, A.N., Sidora, N.V., Kovalev, S.V., (2009). GC/MS study of essential oil components from flowers of *Crataegus jackii*, *C. robesoniana*, and *C. flabellata*. *Chem. Nat. Compd.* (45), 582–584.
8. Andrade-Cetto, A., Heinrich, M. (2005) Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. (99), 325–348.
9. Olvera-García, M. (2014). *Evaluación efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de la raíz de tejocote* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México, CDMX.

10. Mata, R., Cristians, S., Escandon-Rivera, S., Juárez-Reyes, K. and Rivero-Cruz, I: (2013). Mexican Antidiabetic Herbs: Valuable Sources of Inhibitors of α -Glucosidases. *Journal of natural products*. (76), 468–483.
11. Organización Mundial de la Salud. (2014). Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles. WHO/NMH/NVI/15.1. Consultada el 16 de octubre de 2018 en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/149296/WHO_NMH_NVI_15.1_spa.pdf;jsessionid=0AC51C135A13F1E959A7852011F8D095?sequence=1
12. da Costa, J. (2017). A current look at nutraceuticals – Key concepts and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*. (62), 68-78.
13. Colegate, S.; Molyneux, R. (2008). *BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS. Detection, Isolation, and Structural Determination* (Second edition) Boca Raton: Editorial CRC Press. Pp. 1-2.
14. Núñez, A.J. (2011). Natural Health Products (NHPs). *Elsevier*.
15. Kokubun, T., Harborne, J., Eagles, J. and Waterman, P. (1995). Dibenzofuran phytoalexins from the sapwood of *Cotoneaster acutifolius* and five related species. *Phytochemistry*. (38), 57-60.
16. Dieter Gottstein and Dieter Gross. (1992). Review. Phytoalexins of woody plants. *Trees*. (6), 55-68.
17. Chizzali C., Khalil M., Beuerle T., Schuehly W., Richter K., Flachowsky H., Peil A., Hanke M., Liu B., Beerhues L. (2012). Formation of biphenyl and dibenzofuran phytoalexins in the transition zones of fire blight-infected stems of *Malus domestica* cv. ‘Holsteiner Cox’ and *Pyrus communis* cv. ‘Conference’. *Phytochemistry*. (77), 179-185.
18. Lin C., Chang H., Liao C., Ou T., Chen I. and Tsai I. (2010). Anti-inflammatory Biphenyls and Dibenzofurans from *Rhaphiolepis indica*. *Journal of natural products*. (73), 1628-1631.
19. Chen J., Luo Y., Liao C., Chen I., and Liawd C. (2009). A New Dibenzofuran and Further Constituents from the Stems of *Pourthiaea lucida* with Inhibitory Activity on Superoxide Generation by Neutrophils. *Chemistry and biodiversity*. (6), 774-778.
20. “Estadísticas a propósito del día de muertos” (2 de noviembre) datos nacionales. (2017). *Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI)*.

- Consultada el 14 de noviembre de 2018 en http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdf
21. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. (2016). *Secretaría de Salud*. Consultada el 14 de noviembre de 2018 en <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>
 22. Finley, J.; Kong, A.; Hintze, K. J.; Jeffery, E. H.; Ji L. L.; and Gen Lei, X. (2011) Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry. *Journal of agricultural and food chemistry*. (59), 6837-6846.
 23. Yang, C. S.; Ho, C.; Zhang, J.; Wan, X.; Zhang, K.; and Lim, J. (2018). Antioxidants: Differing Meanings in Food Science and Health Science. *Journal of agricultural and food chemistry*. (66), 3063-3068.
 24. (2017). A current view on inflammation. *Nature Immunology*. (18). 825.
 25. Alessandri A. L.; Sousa L. P.; Lucas C. D.; Rossi A. G.; Pinho V.; Teixeira M. M. (2013). Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*. (139), 189–212.
 26. Barrett, K. E. (2014). *Gastrointestinal Physiology* (2nd edition) New York, NY. McGraw-Hill. Pp. 182-205.
 27. Egan A. M.; Dinneen S. F. (2018). What is diabetes? *DIABETES: BASIC FACTS*. (47), 1-4.
 28. Frouhi N. G.; Wareham N. J. (2018). Epidemiology of diabetes. *DIABETES: BASIC FACTS*. (47), 22-27.
 29. Ruddon, R. W. (2007). *Cancer biology* (4th. Ed.) New York, NY: Oxford. Pp. 3-12.
 30. Raíces y pelos radiculares. Información de cultivo. (2019). *CNNA*. Consultada el 19 de febrero de 2019 en http://www.canna.es/raices_y_pelos_radiculares
 31. Carmona Hernández K. D. (2018). Evaluación del efecto de la administración de *Crataegus mexicana* en el peristaltismo intestinal y DL50 utilizando un modelo de ratones CD1. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
 32. Cazes J. (2001). *Encyclopedia of Chromatography* (3rd. edition) New York: CRC Press. Pp. 1778, 1825

33. Wang, S.; Zhu F. (2019). Chemical composition and health effects of maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*. (288), 422-433.
34. Aati H., El-Gamal A., Kayser O. (2019). Chemical composition and biological activity of the essential oil from the root of *Jatropha pelargonifolia* Courb. native to Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal*. (27), 88-95.
35. S. Uysal, G. Zengina, M.F. Mahomoodally, M.A. Yilmaz, A. Aktumsek. (2019). Chemical profile, antioxidant properties and enzyme inhibitory effects of the root extracts of selected *Potentilla* species. *South African Journal of Botany*. (120), 124-128.
36. Olivas-Aguirre F, Wall-Medrano A, González-Aguilar G, López-Díaz J, Álvarez-Parrilla E, de la Rosa A y Ramos-Jimenez A. (2015). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición hospitalaria*. (31), 55-66.
37. Gaschler M., Stockwell B. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (482). 419-425.
38. Auwal Ibrahim M., Shahidul Islam M. (2014). Anti-diabetic effects of the acetone fraction of *Senna singueana* stem bark in a type 2 diabetes rat model. *Journal of Ethnopharmacology*. (153), 392-399.
39. Carney J. R., Krenisky J. M., Williamson R. T. and Luo J. (2002). Achyrofuran, a New Antihyperglycemic Dibenzofuran from the South American Medicinal Plant *Achyrocline satureioides*. *Journal of natural products*. (66), 203-205.
40. Love B. E. (2015). Isolation and synthesis of polyoxygenated dibenzofurans possessing biological activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. (97), 377-387.
41. Gaschler M., Stockwell B. Lipid peroxidation in cell death. (2017). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (482). 419-425.
42. Dudeja P., Gupta R. K. (2017). *Food safety in the 21st century. Public health perspective*. Academic Press.
43. J. Rosas Gómez de Salazar, G. Santos Soler, R. Martín Doménech, R. Cortés Verdú, A. Álvarez Cienfuegos. *Antiinflamatorios no esteroideos*.

- Consultada el 21 de marzo de 2019 en: <https://svreumatologia.com/wp-content/uploads/2008/04/Cap-26-Antiinflamatorios-no-esteroides.pdf>.
44. García R., Ibarra E., Nieto R. (2013). Antioxidant compounds in hawthorn fruits (*Crataegus* spp.) of Mexico. *Revista Mexicana de biodiversidad*. (84), 1298-1304.
45. H. Wagner, S. Bladt. (2001). *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*. (Second edition) Germany. Ed. Springer. Pp. 36.37.
46. Nuñez W., Quisp R., Ramos N., Castro A., Gordillo G. (2016). Activities anti-enzymatic and antioxidant in vitro and anti-inflammatory in vivo of hydroalcoholic extract from *Caesalpinia spinosa* "tara". *Ciencia e investigación*. (19), 35-42.
47. Riquelme Olmedo, P. (2012). Sinergismo de tramadol con ibuprofeno en dolor orofacial experimental. Consultada el 9 de junio de 2019 en: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/113980>
48. Wall, P. E. (2005). *Thin-layer chromatography. A modern practical approach*. (1st. Ed.) Cambridge, UK: The royal society of chemistry. Pp. 145-146.
49. Długaszewska J, Ratajczak M, Kamin´ska D, Gajecka M. (2019). Are dietary supplements containing plant-derived ingredients safe microbiologically? *Saudi Pharmaceutical Journal*. (27). 240-245.

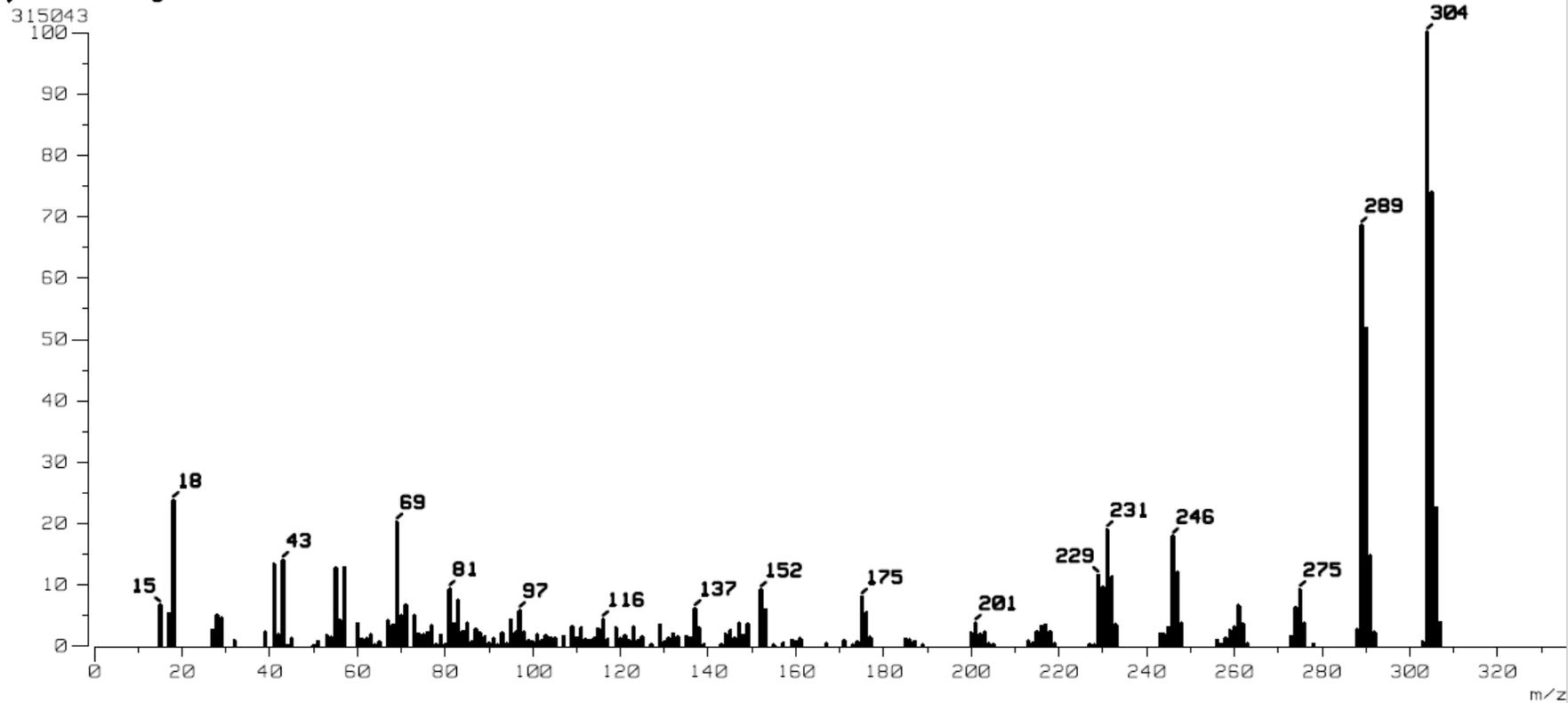


C:\Infrarrojo\AIR-LEP-IQUI-007_19\DrMJimenez\573.0 Dr.M.Jimenez MJE/ABAC-CompA Pelicula RPM 01/05/2019

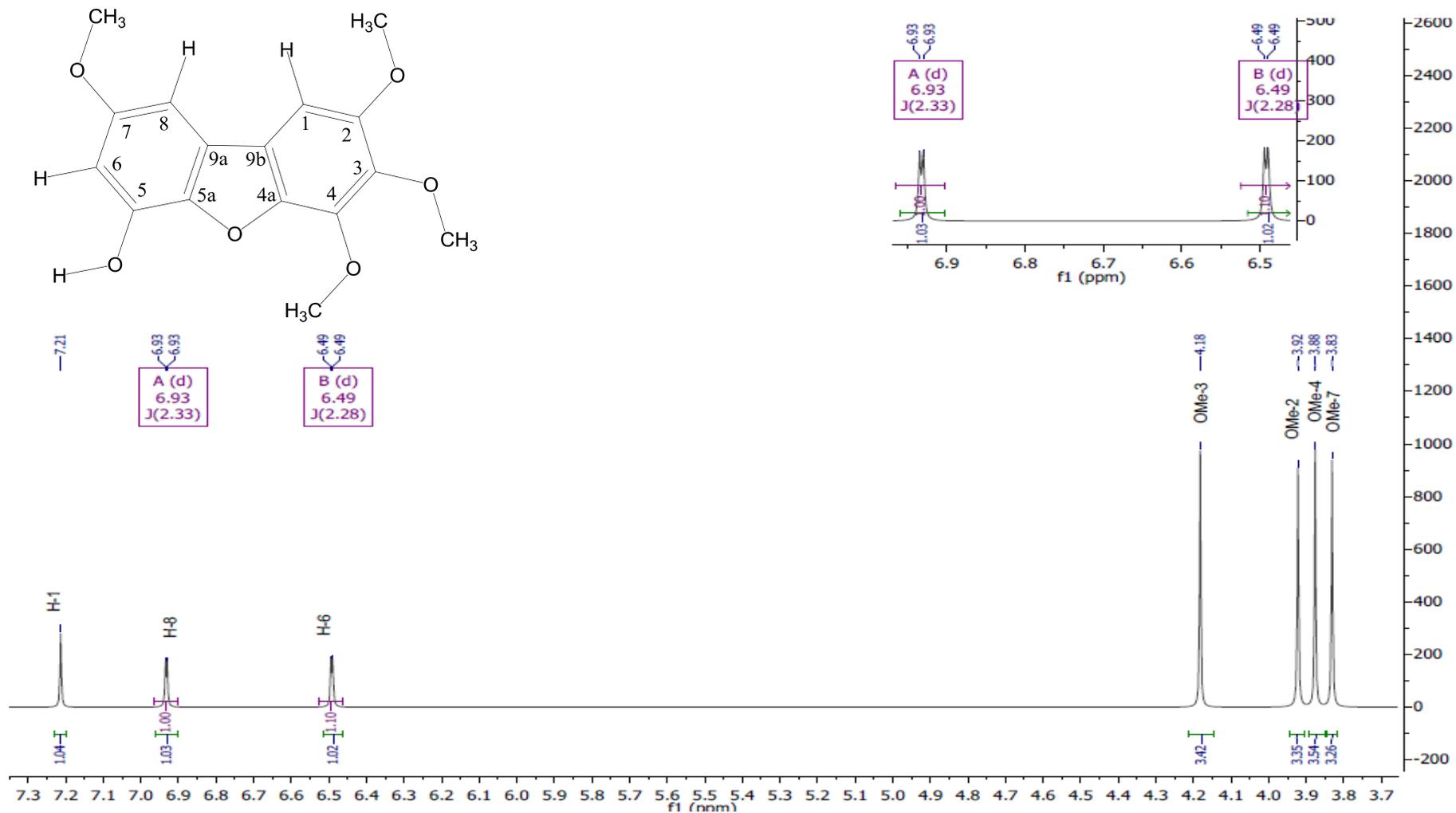
Espectro 1. Espectro de infrarrojo del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC. Preparación de la muestra en película.

[Mass Spectrum]

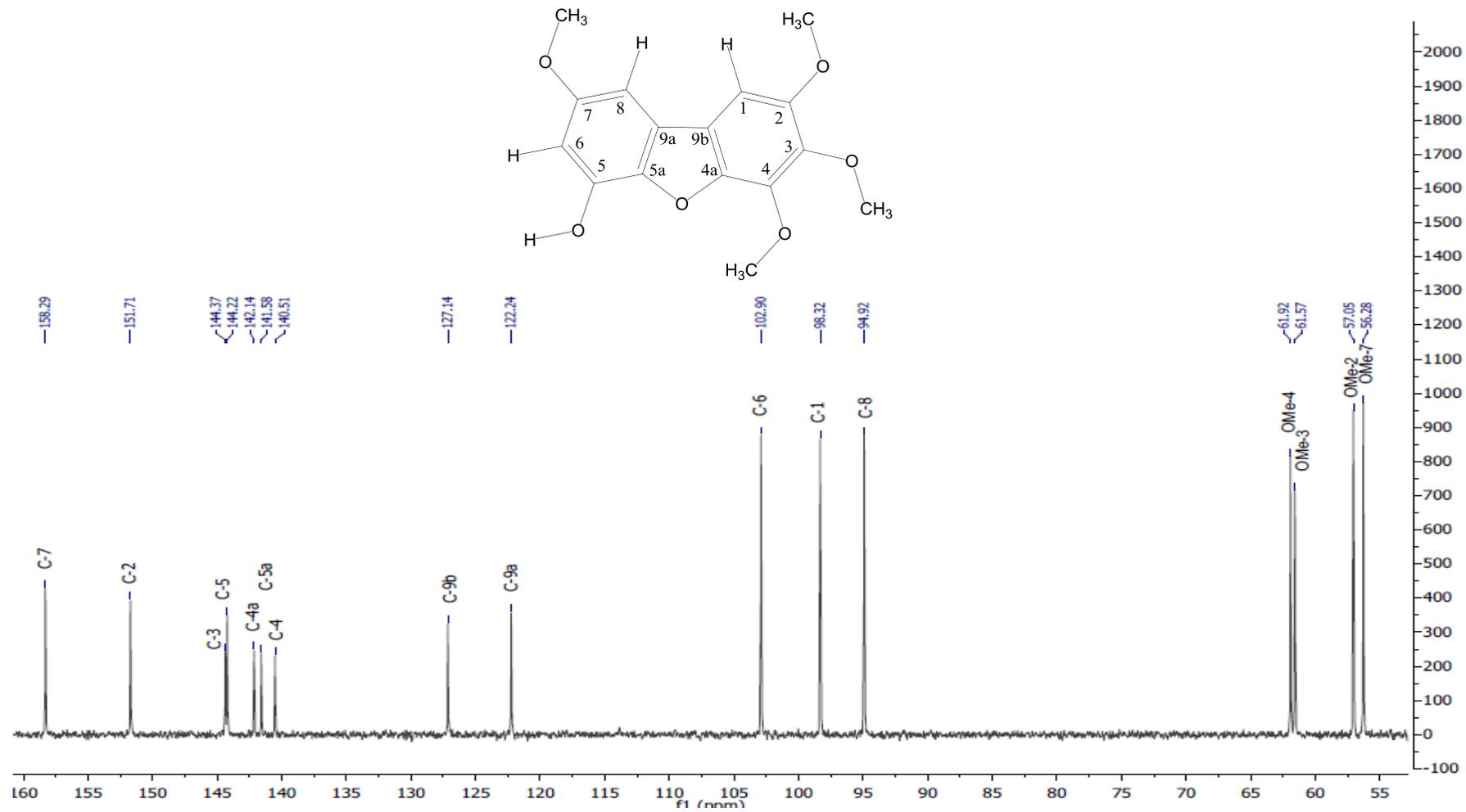
Data : Dr-Jimenez-Manuel-035 Date : 23-Apr-2019 12:37
Sample: 758 MJE-ABAC-Comp-A JeolSX102A
Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.58 min Scan# : (13,24)
BP : m/z 304.0000 Int. : 30.04
Output m/z range : 0.0000 to 335.9050 Cut Level : 0.00 %



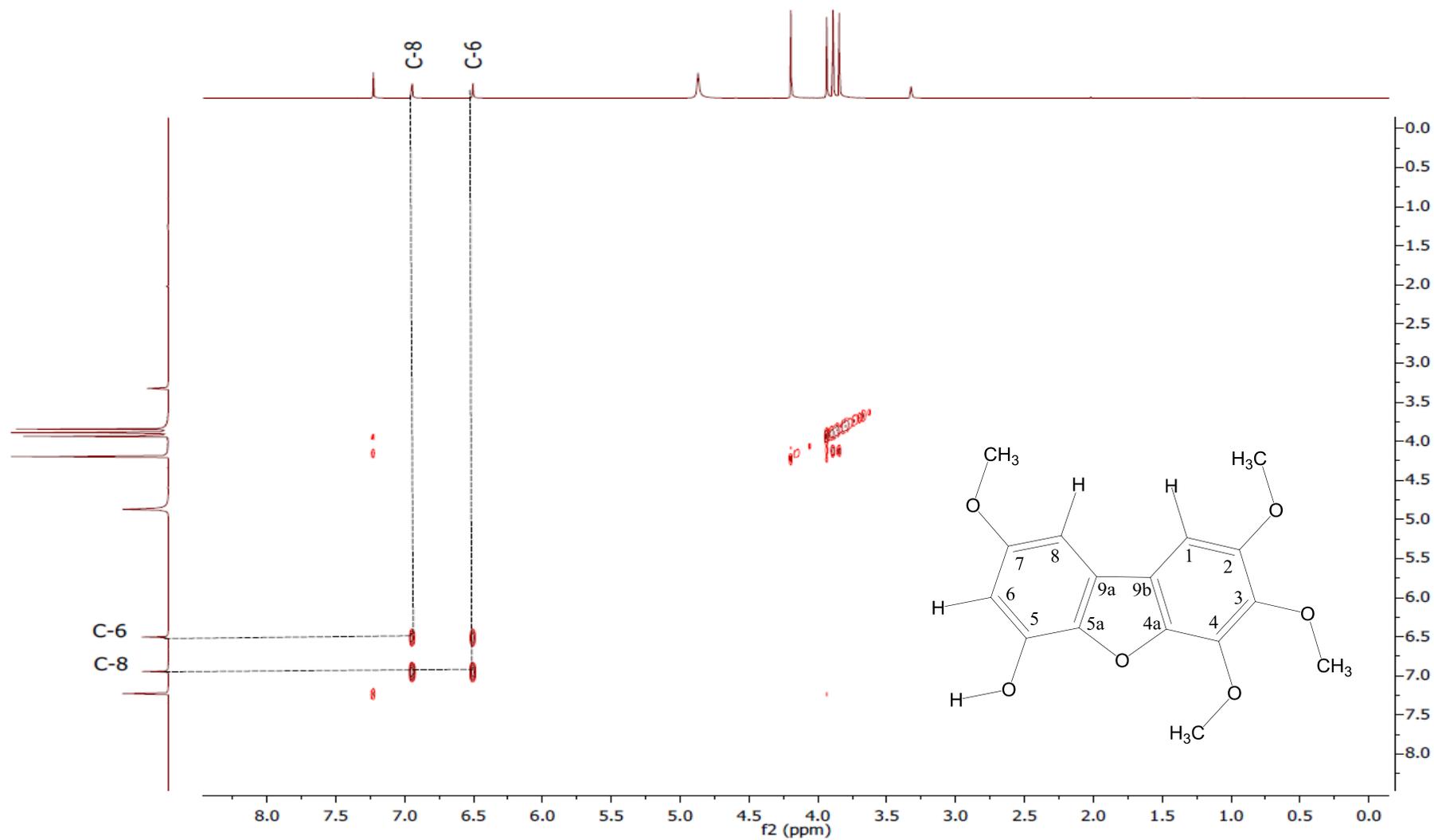
Espectro 2. Espectro de masas del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.



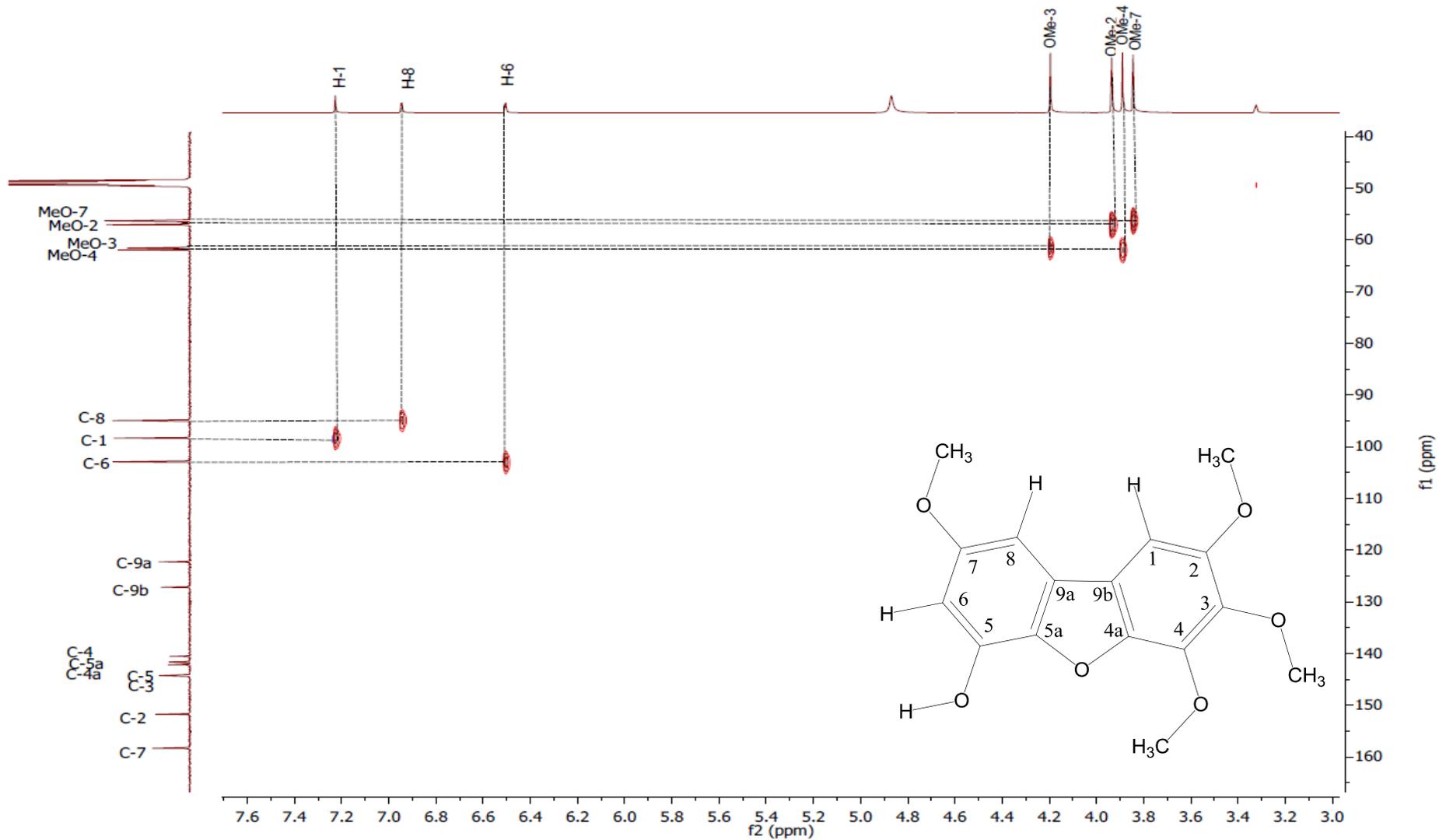
Espectro 3. Espectro de RMN-¹H (MeoD, 500 MHz) del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.



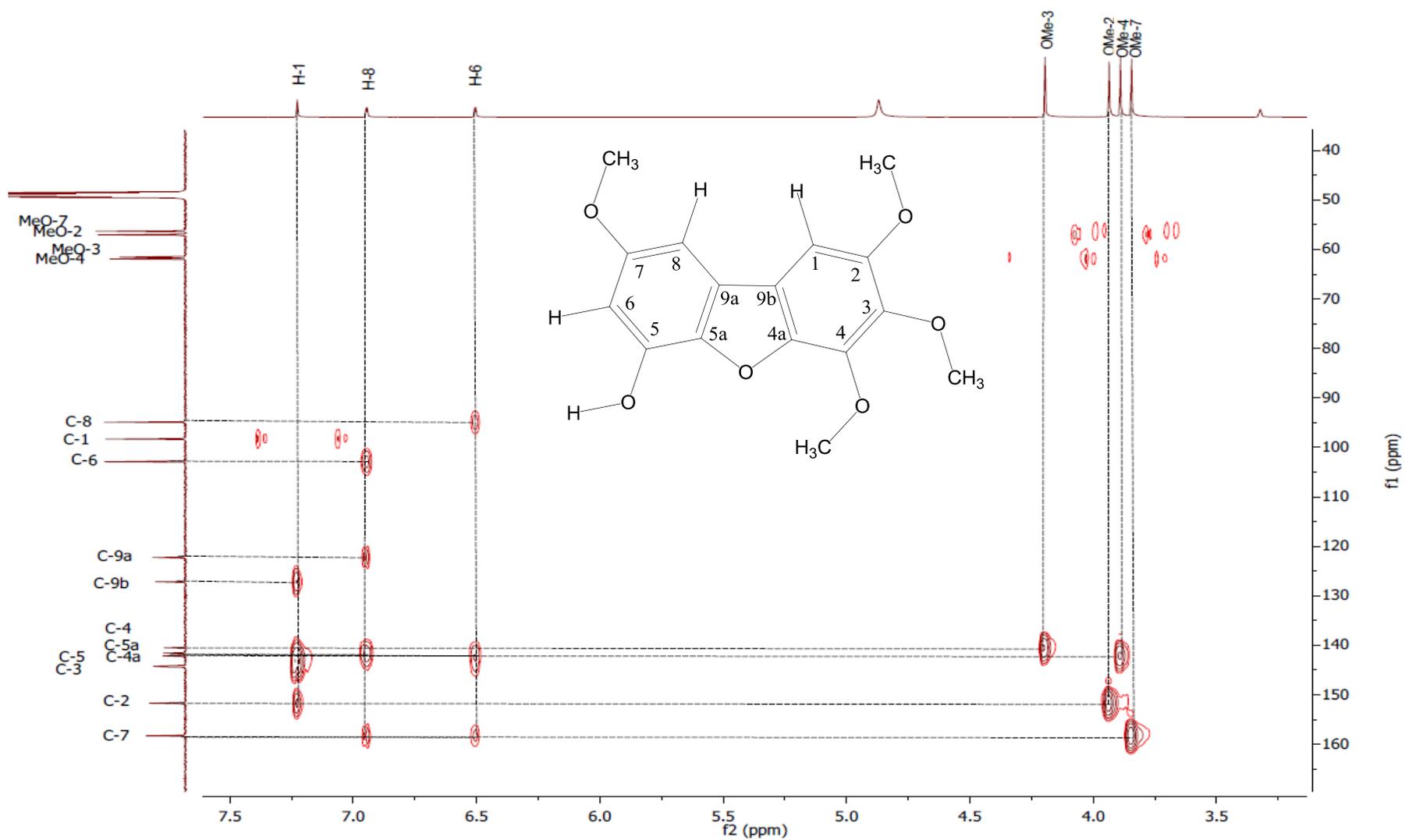
Espectro 4. Espectro de RMN-¹³C (MeOD, 500 MHz) del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.



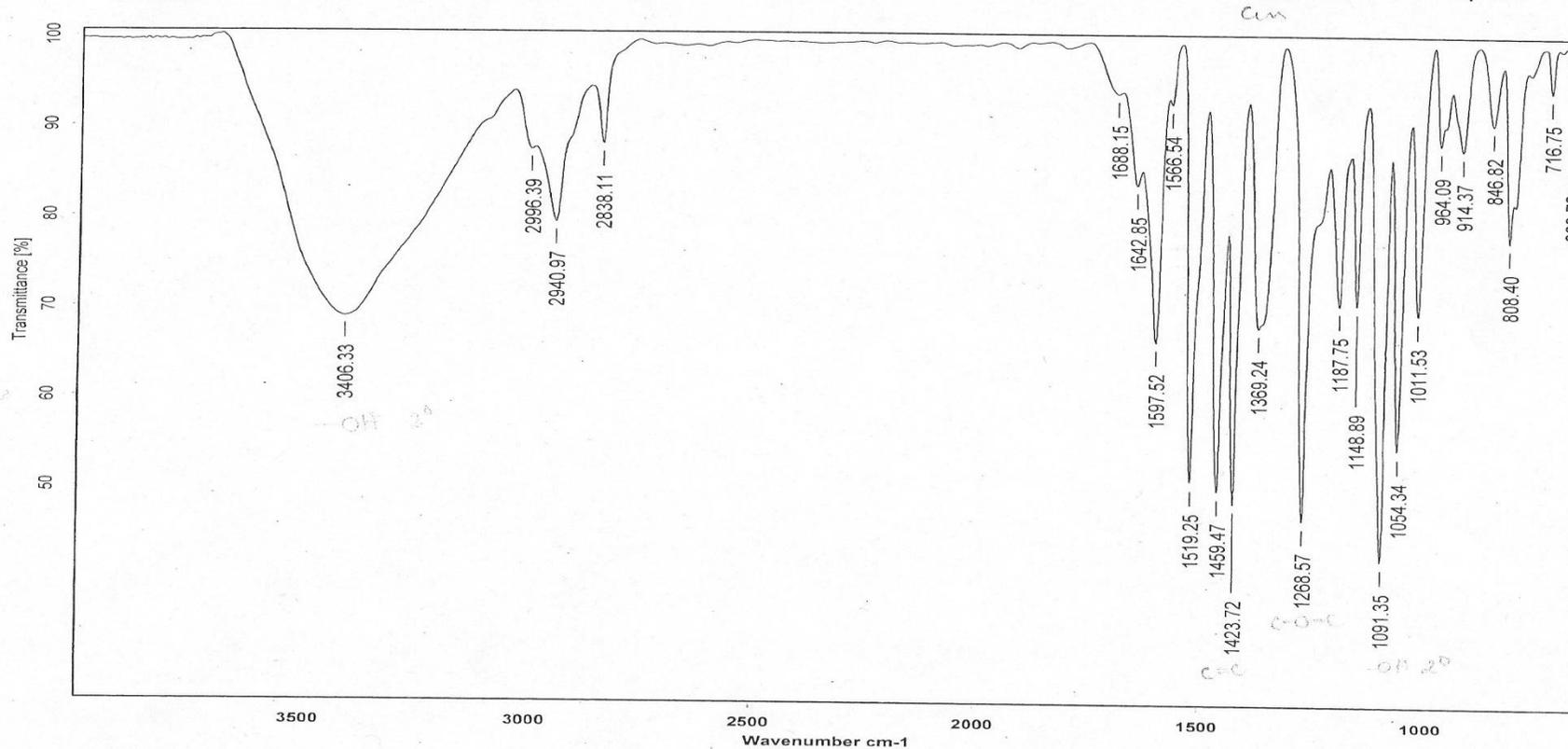
Espectro 5. Experimento COSY del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.



Espectro 6. Experimento HSQC del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.



Espectro 7. Experimento HMBC del Compuesto A, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.



C:\INFRARROJOVAIR-LEP-IQUI-007_18\DrMJimenez\620.3

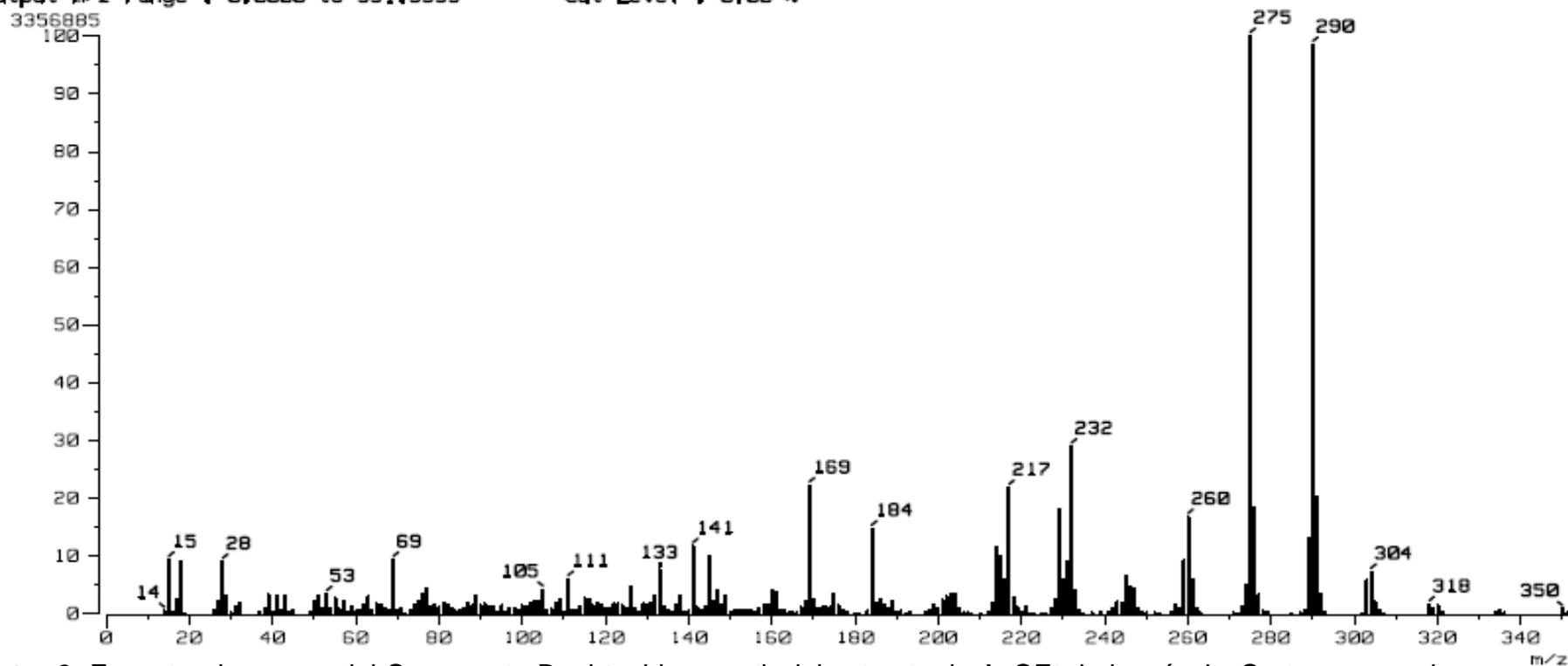
Dr. M. Jiménez MJE/ABAC-Rtej-233-252

Película

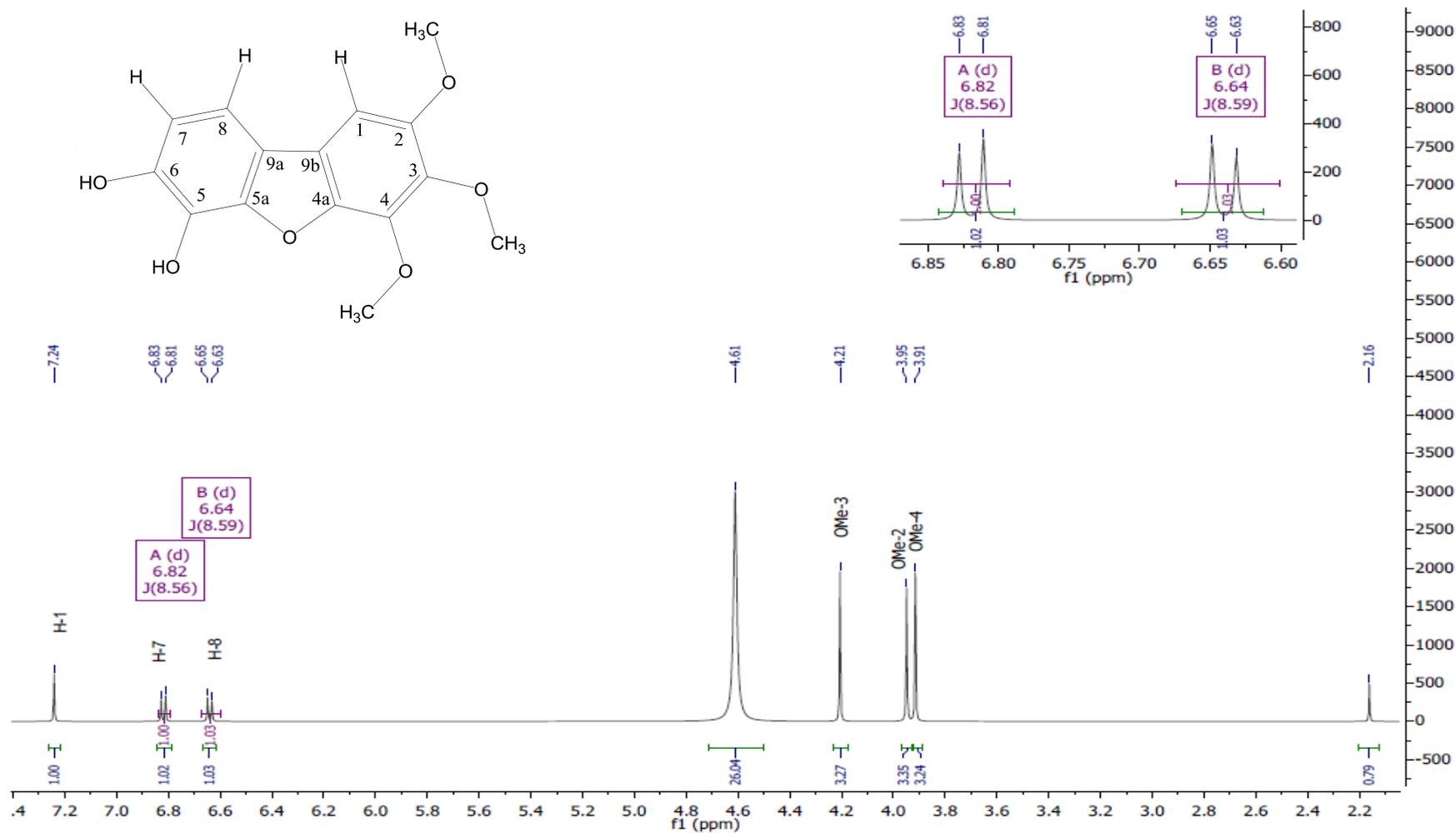
14/05/2018

Espectro 8. Espectro de infrarrojo del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC. Preparación de la muestra en película.

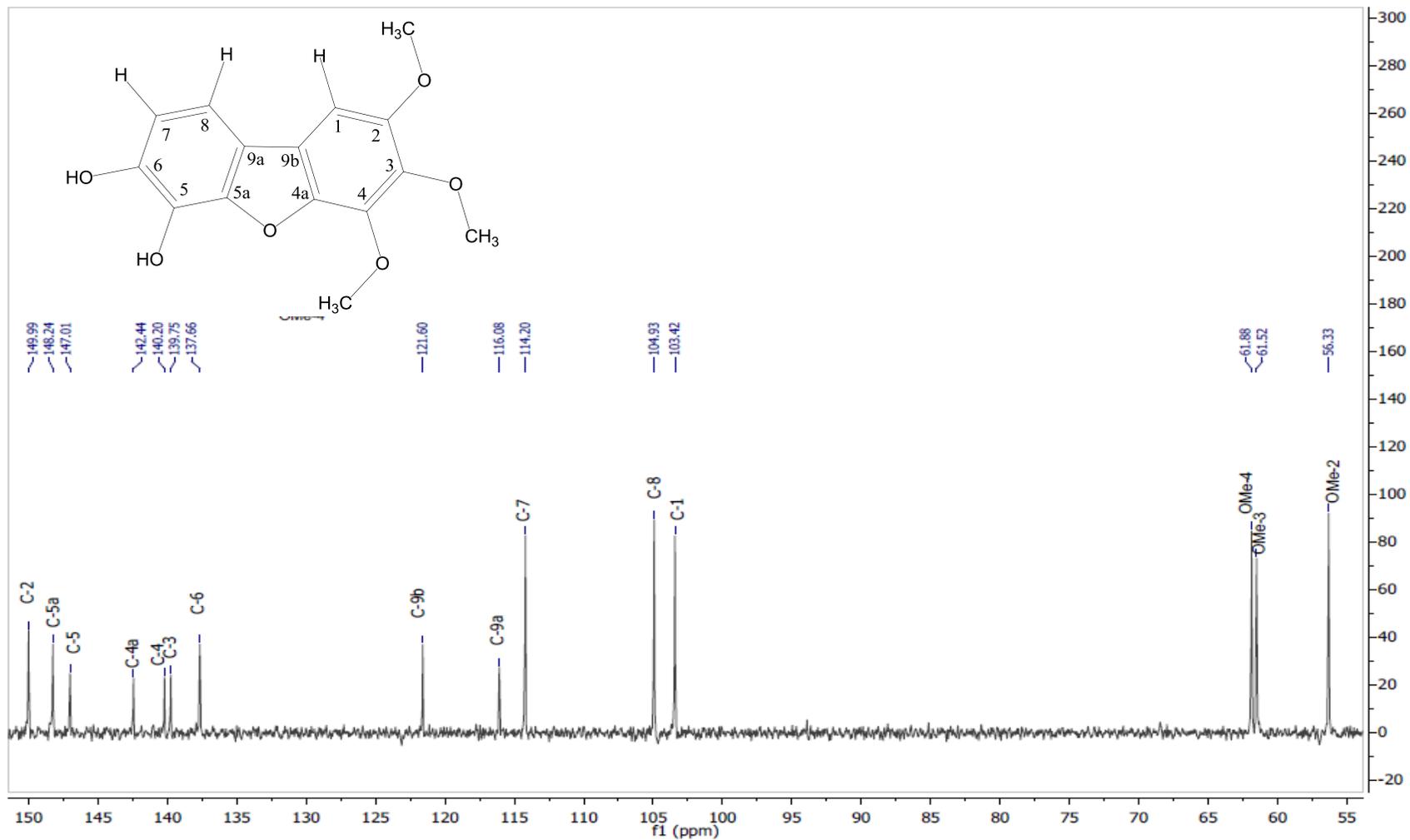
: Mass Spectrum]
 Data : Dr-Jimenez-Manuel-027 Date : 24-Apr-2018 12:17
 Sample: 803 MJE-ABCo-Pite-233-252 Jeol SX102A
 Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.34 min Scan# : (10,12)
 SP : m/z 275.0000 Int. : 320.14
 Output m/z range : 0.0000 to 351.3353 Cut Level : 0.00 %



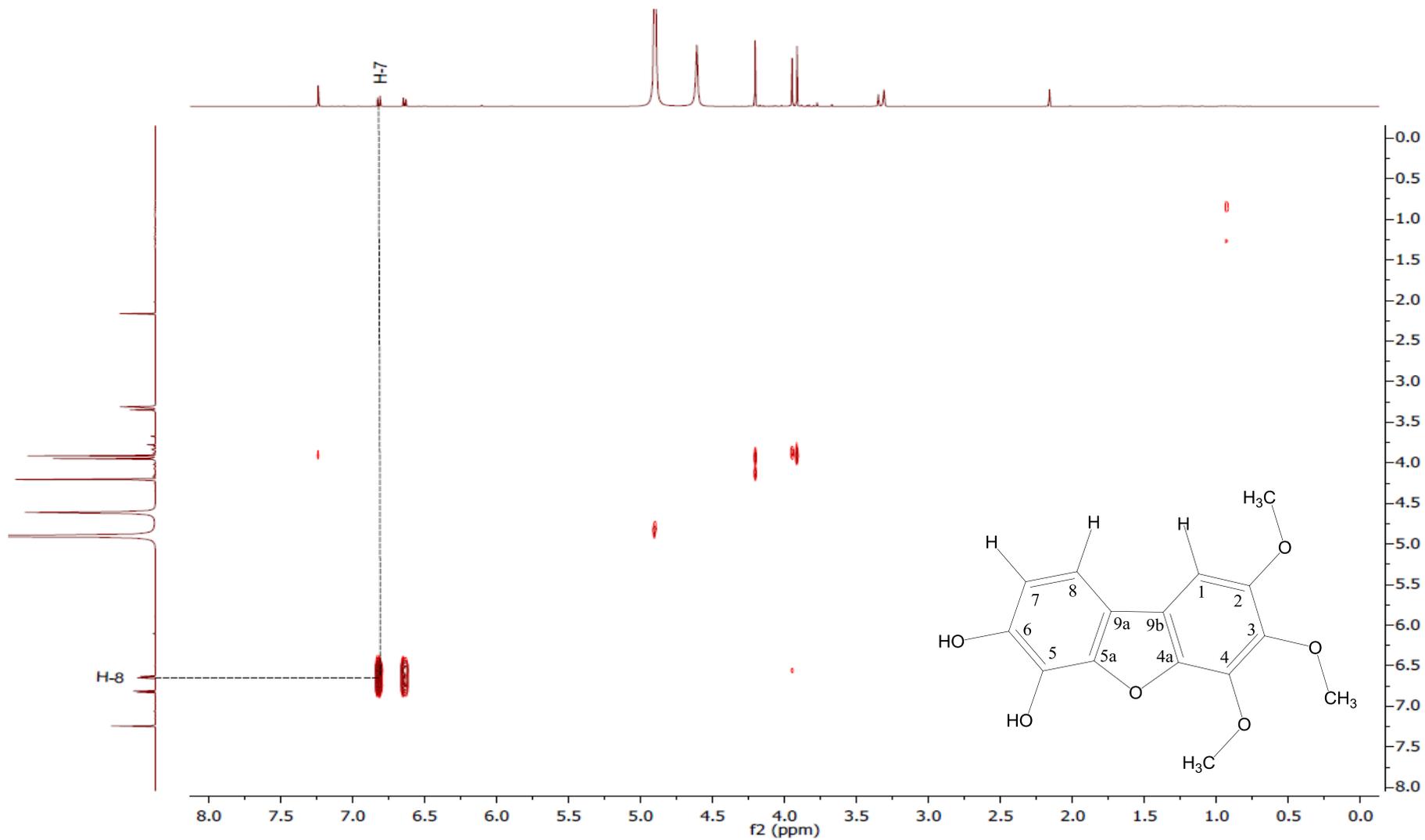
Espectro 9. Espectro de masas del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.



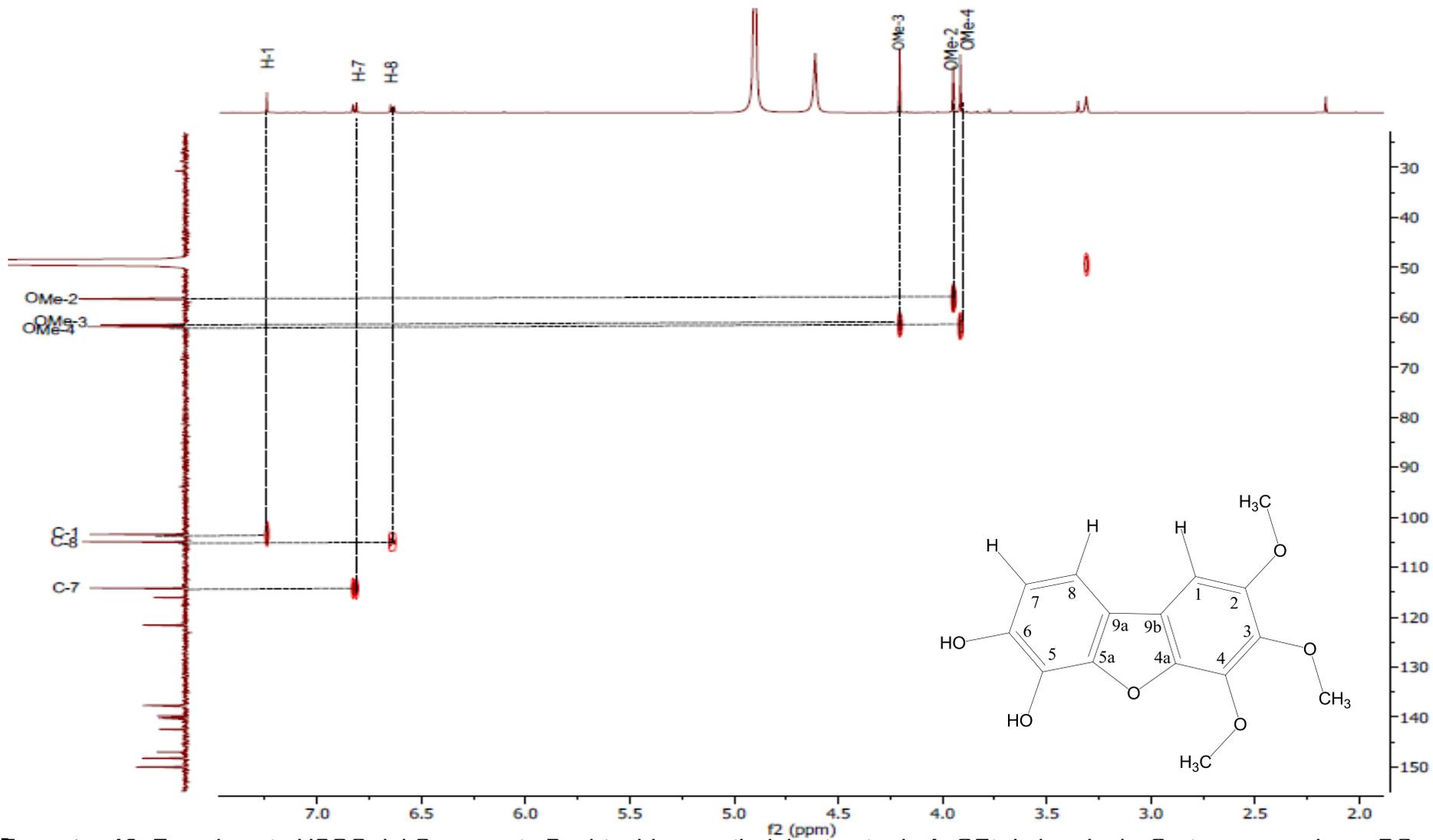
Espectro 10. Espectro de RMN-¹H (MeoD, 500 MHz) del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.



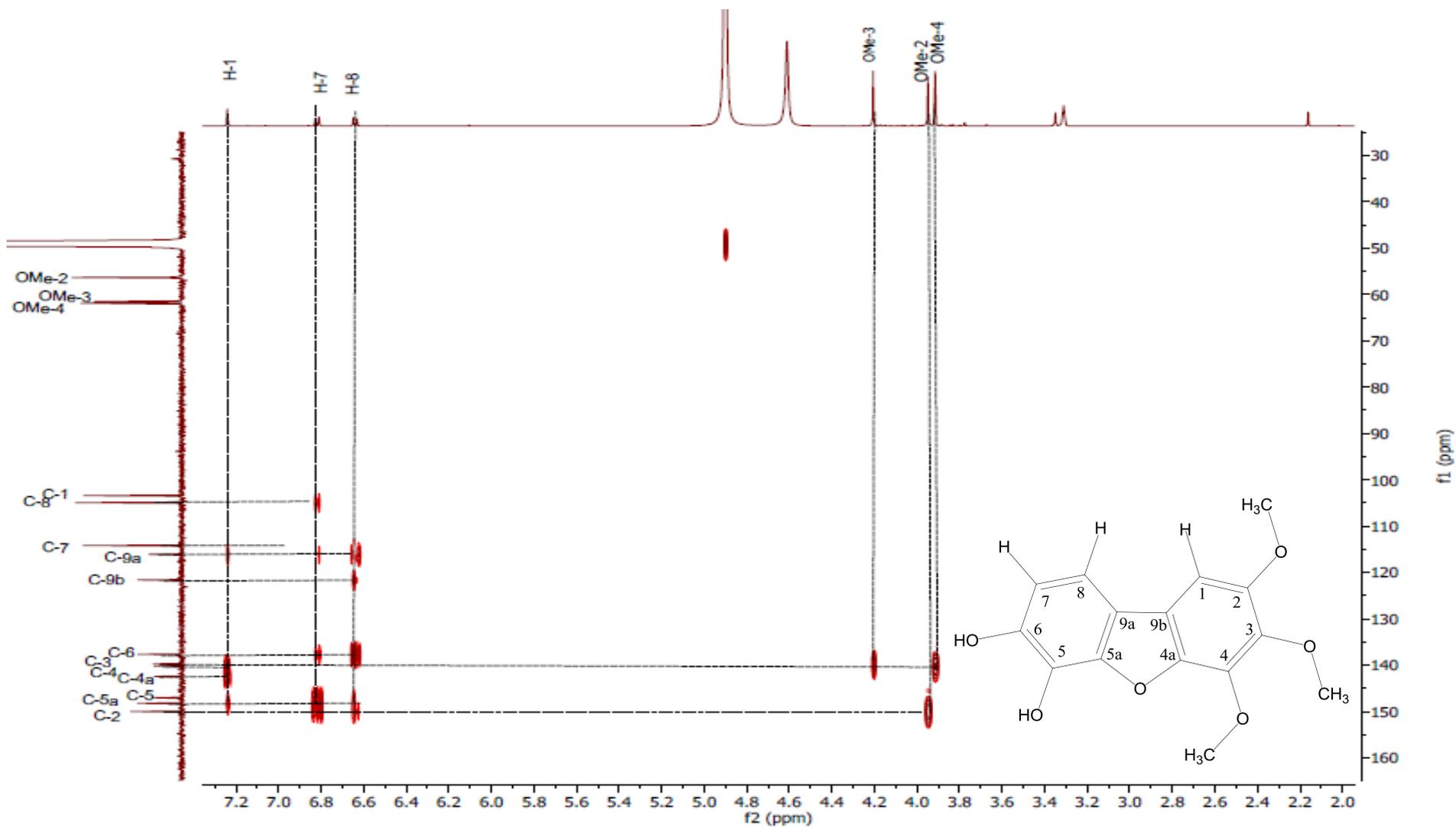
Espectro 11. Espectro de RMN-¹³C (MeOD, 500 MHz) del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.



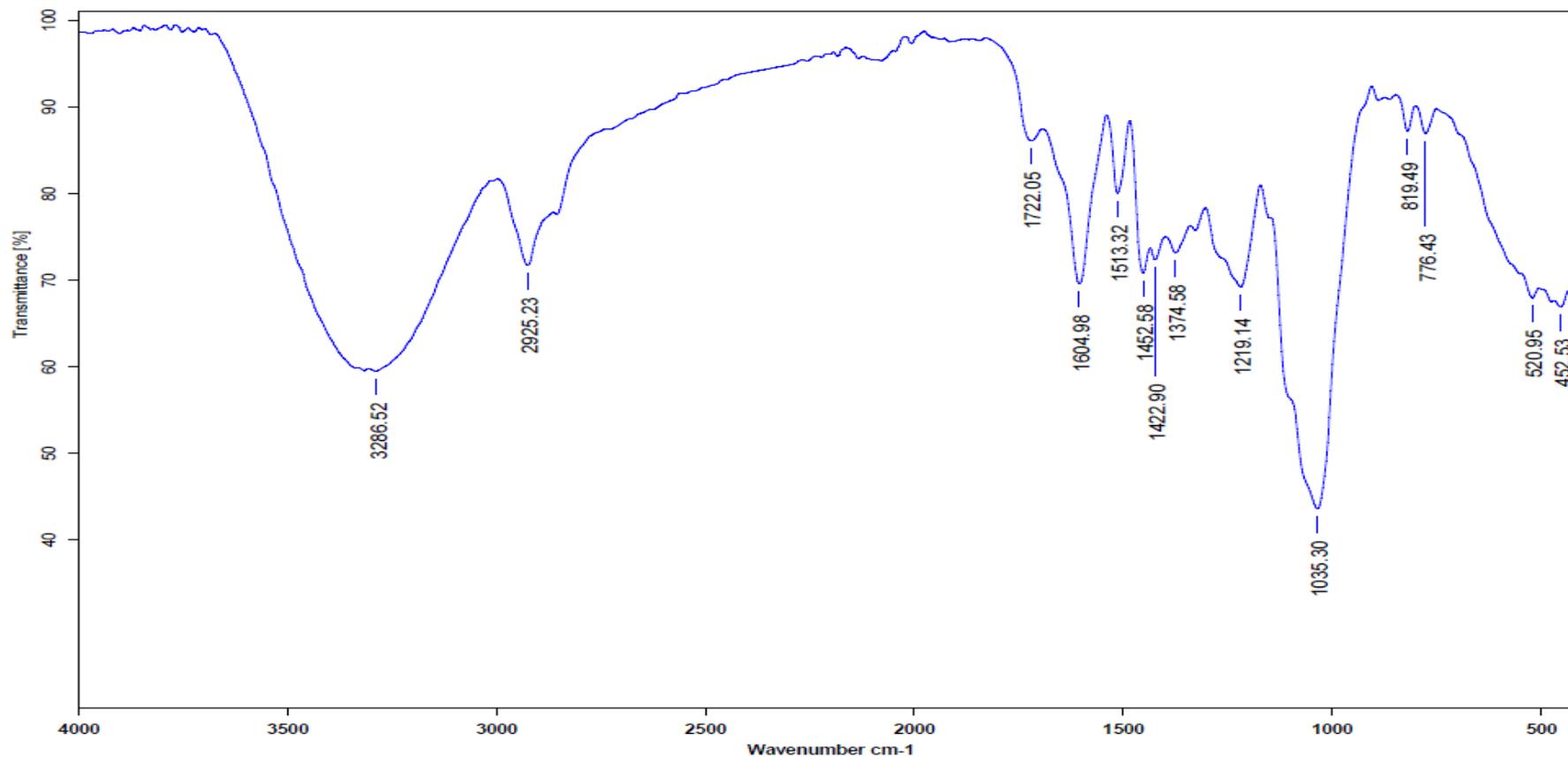
Espectro 12. Experimento COSY del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.



Espectro 13. Experimento HSQC del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

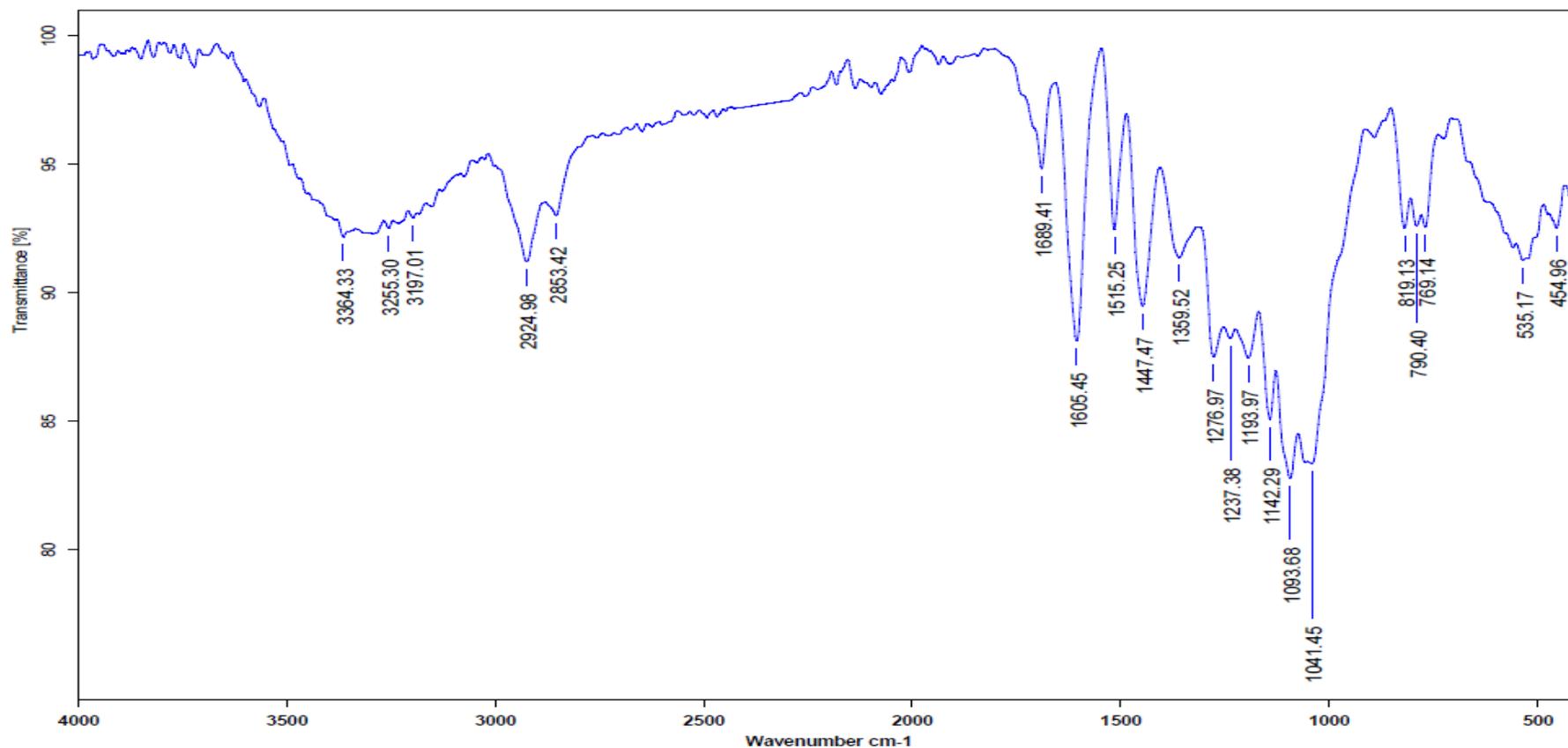


Espectro 14. Experimento HMBC del Compuesto B, obtenido a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.



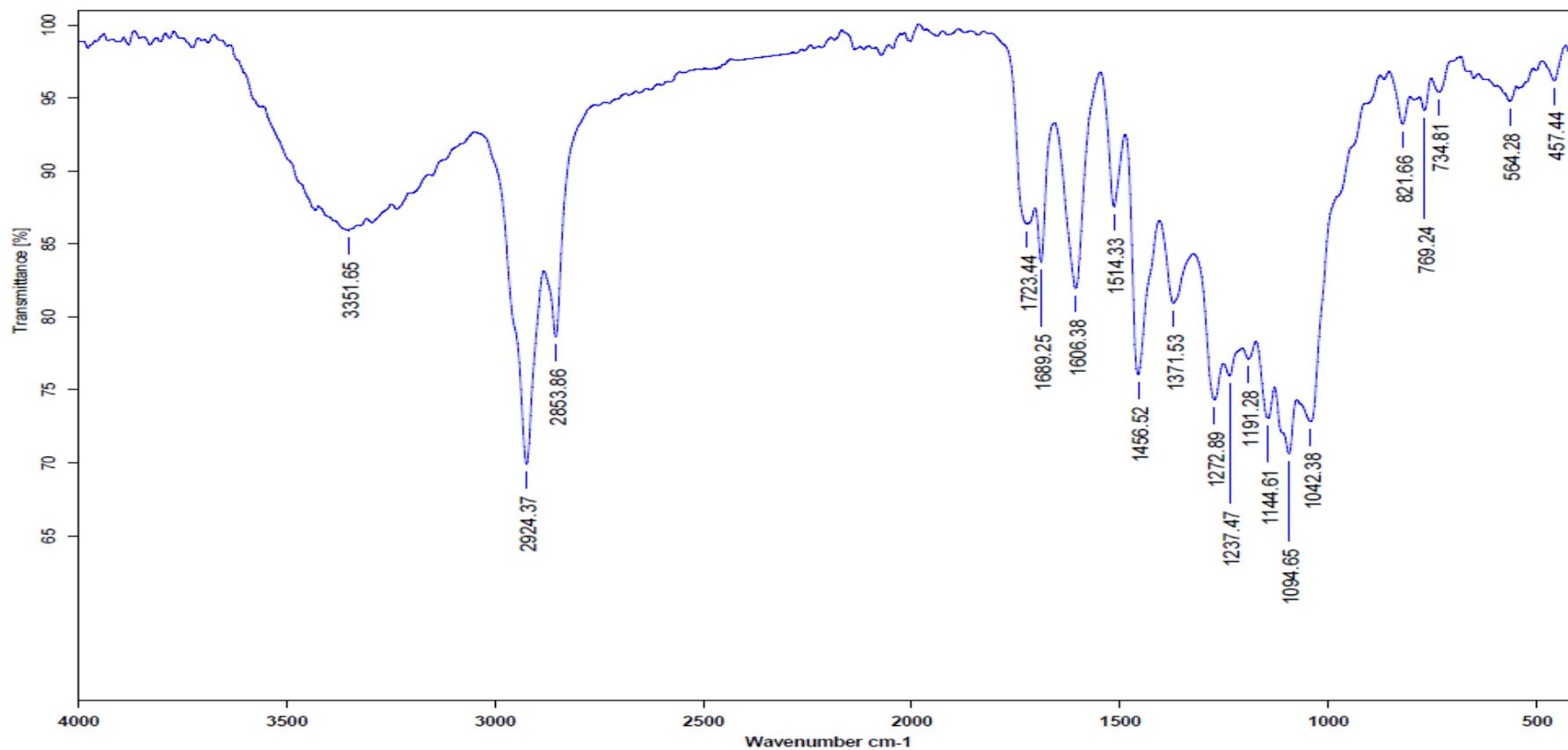
C:\Infrarrojo\AIR-LEP-IQUI-007_18\Rocio\1446.0 Dr.M.Jimenez MJE/ABAC-PP-1GJ Pelicula RPM 23/11/2018

Espectro 15. Espectro de infrarrojo de la fracción PG-P 1, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC. Preparación de muestra en película.



C:\Infrarrojo\AIR-LEP-IQUI-007_18\Rocio\1447.0 Dr.M.Jimenez MJE/ABAC-PP-2Gil Pelicula RPM 23/11/2018

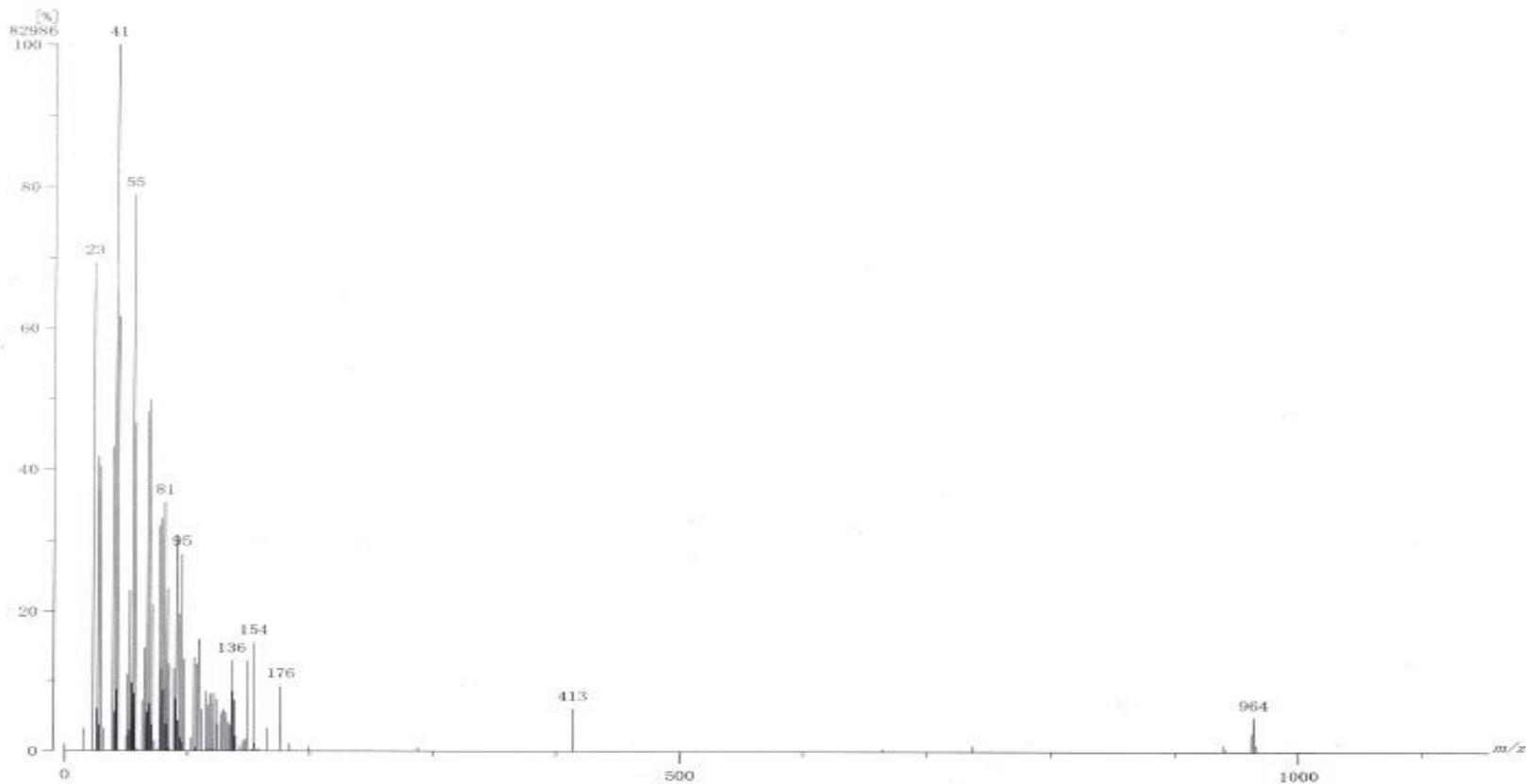
Espectro 16. Espectro de infrarrojo de la fracción PG-P 2, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC. Preparación de muestra en película.



C:\Infrarrojo\AIR-LEP-IQUI-007_18\Rocio\1448.0 Dr.M.Jimenez MJE/ABAC-PP-3Gil Pelicula RPM 23/11/2018

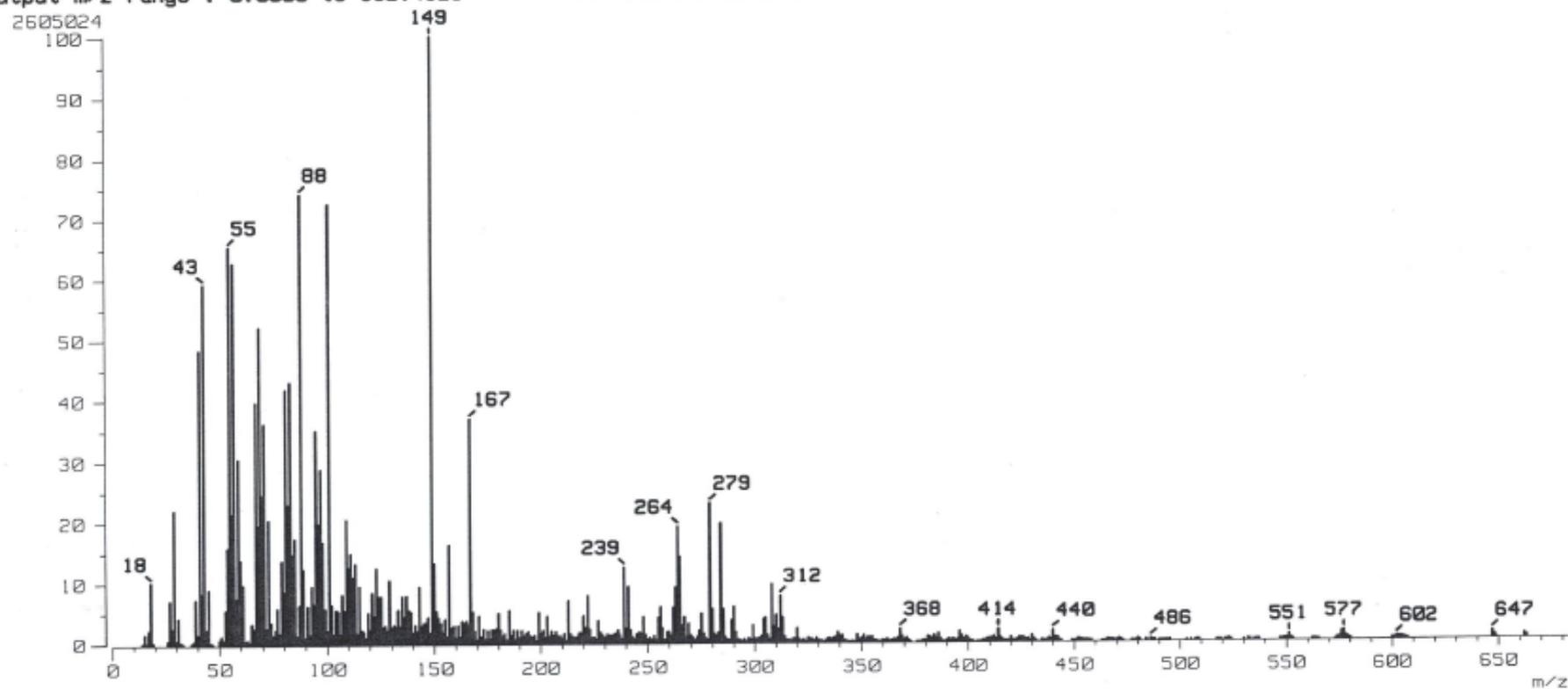
Espectro 17. Espectro de infrarrojo de la fracción PG-P 3, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC. Preparación de muestra en película.

[Mass Spectrum]
Data : Dr Manuel Jimenez071 Date : 30-Nov-2018 12:04
Instrument : MStation
Sample : 2573 MJE/ABAC-PP-1GJ
Note :
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.15 min Scan# : (2.17) Temp : 3276.7 deg.C
BP : m/z 41 Int. : 7.91 (82986)
Output m/z range : 0 to 1154 Cut Level : 0.00 %



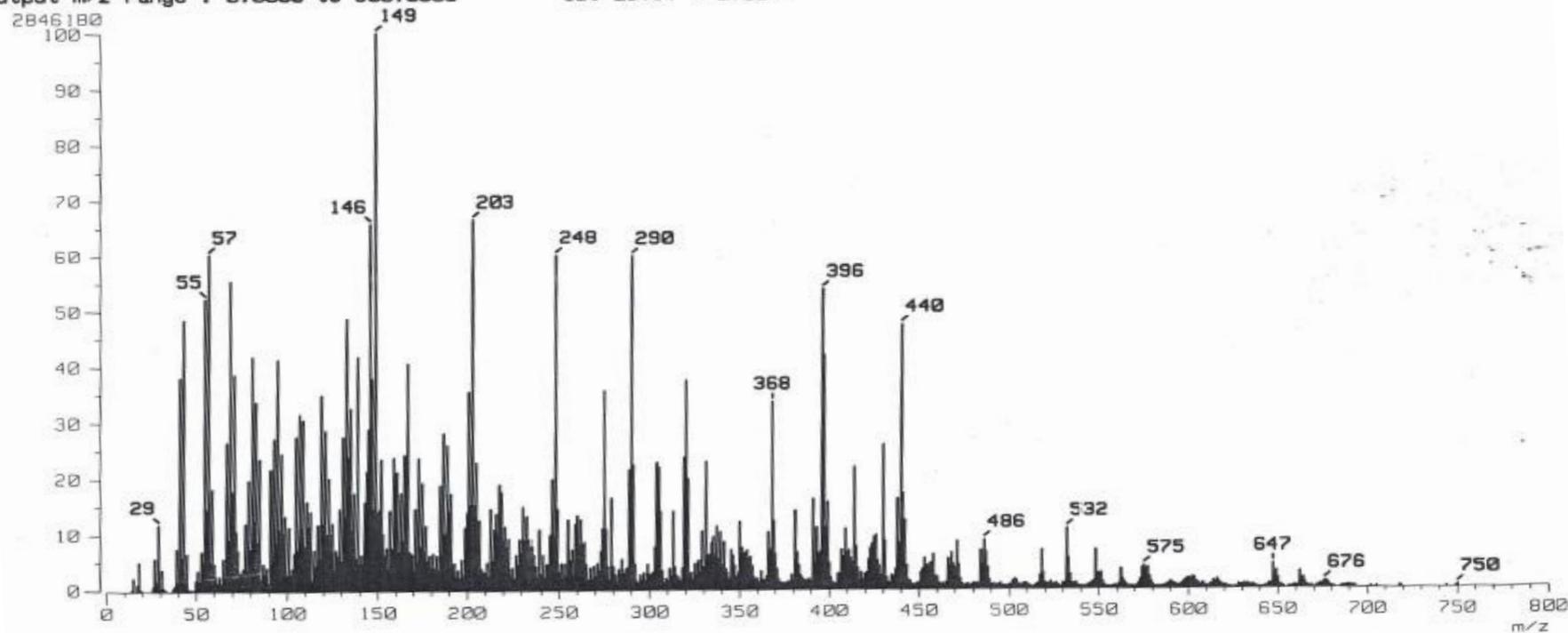
Espectro 18. Espectro de masas de la fracción PG-P 1, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Jimenez-Manuel-068 Date : 21-Nov-2018 12:15
Sample: 2506 MJE-ABAC-PP-2GJ Jeol SX102A
Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.55 min Scan# : (10,25)
BP : m/z 149.0000 Int. : 247.72
Output m/z range : 0.0000 to 682.4926 Cut Level : 0.00 %



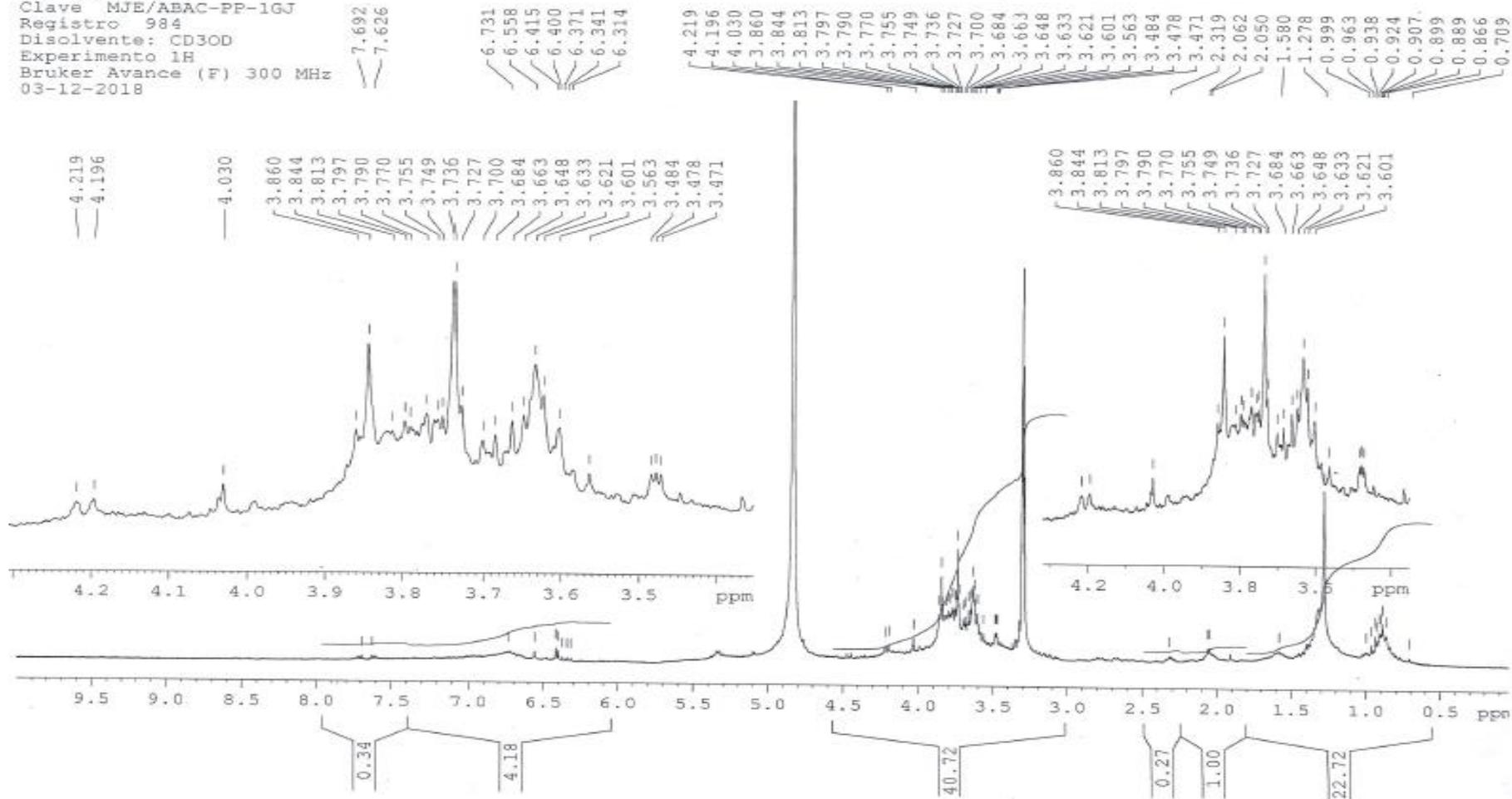
Espectro 19. Espectro de masas de la fracción PG-P 2, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Jimenez-Manuel-069 Date : 21-Nov-2018 12:19
Sample: 2507 MJE-ABAC-PP-3GJ Jeol SX102R
Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.82 min Scan# : (22,28)
BP : m/z 149.0000 Int. : 271.43
Output m/z range : 0.0000 to 800.0000 Cut Level : 0.00 %



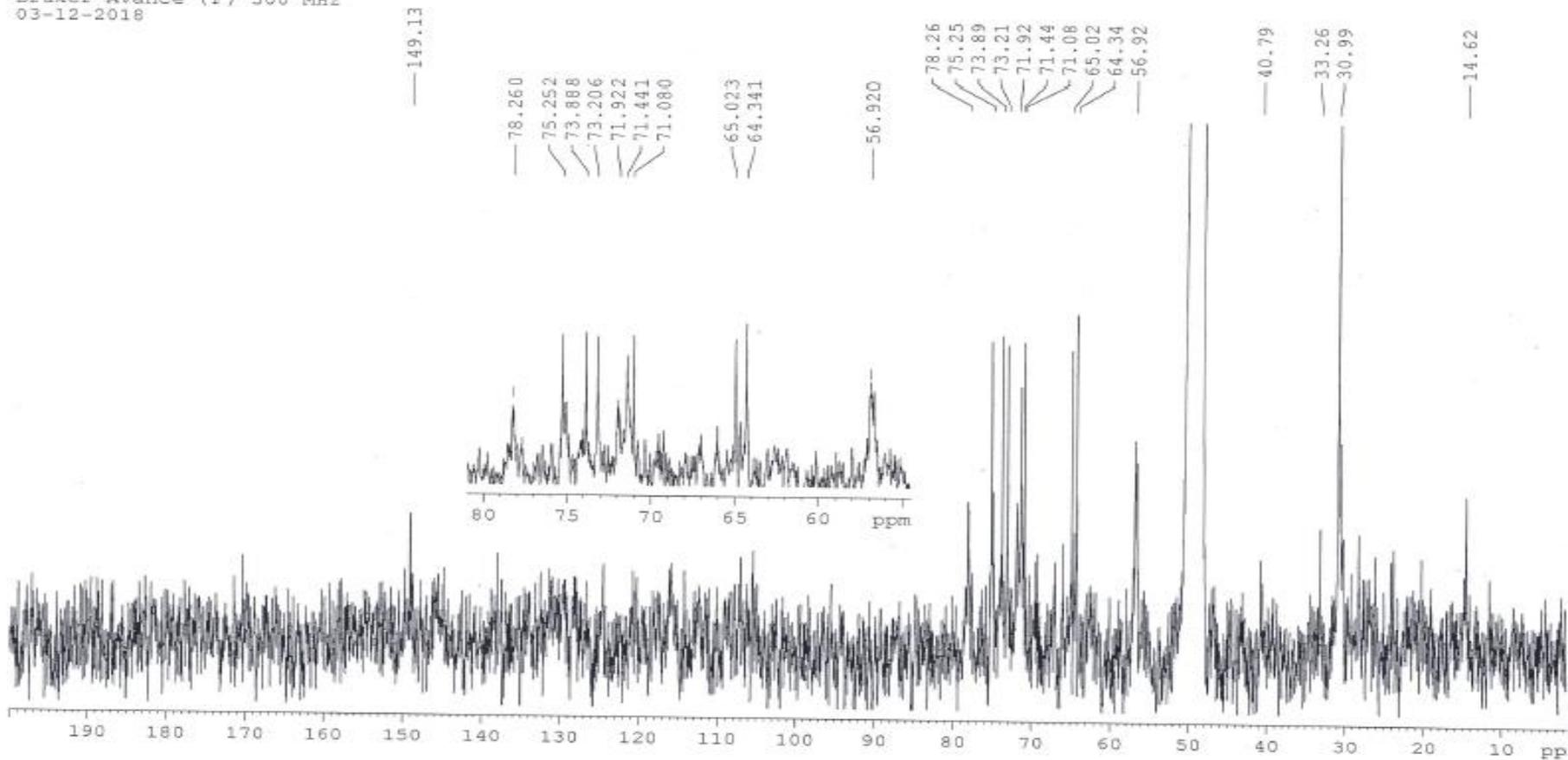
Espectro 20. Espectro de masas de la fracción PG-P 3, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

Instituto de Química UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave MJE/ABAC-PP-1GJ
 Registro 984
 Disolvente: CD3OD
 Experimento 1H
 Bruker Avance (F) 300 MHz
 03-12-2018



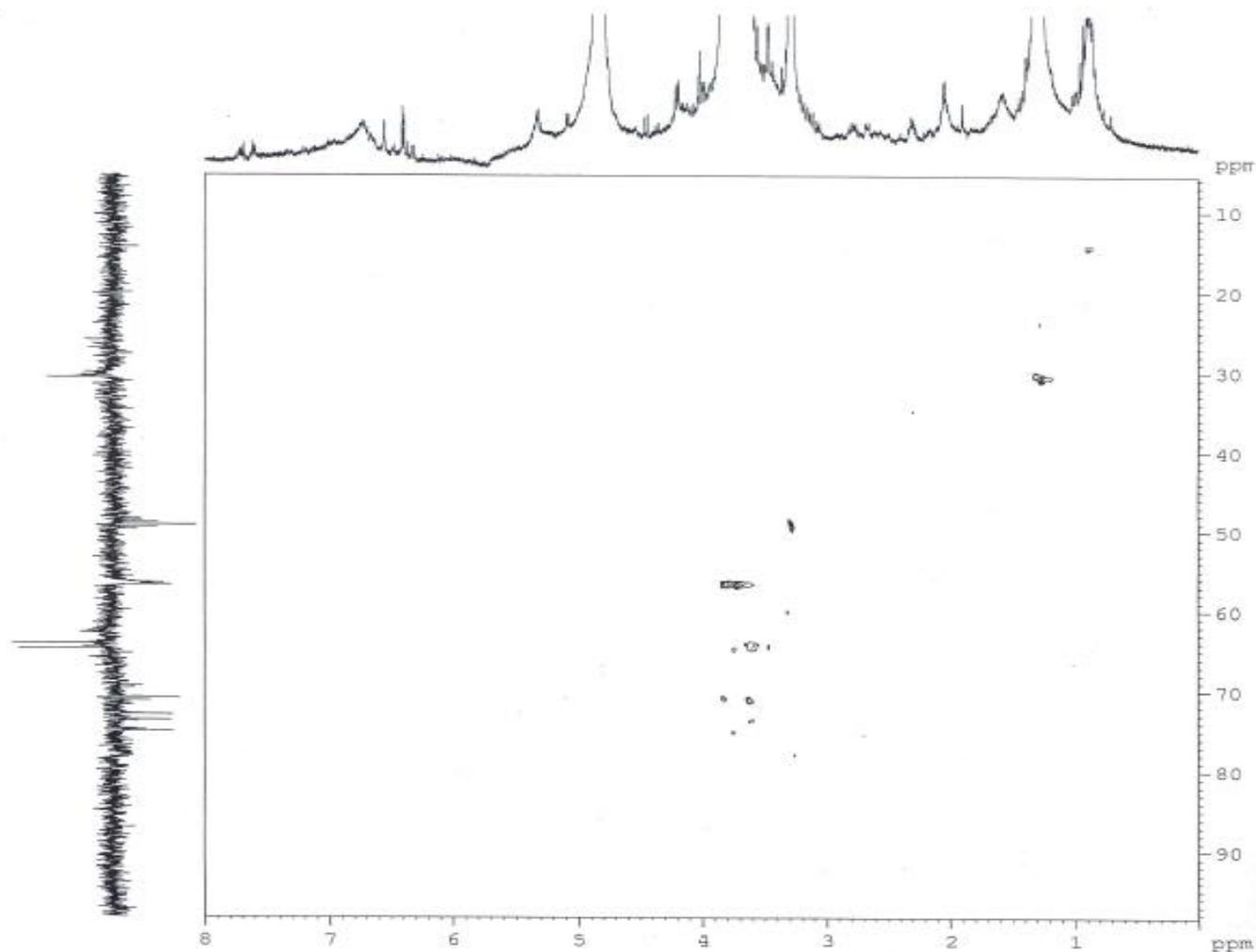
Espectro 21. Espectro de RMN-¹H (CD₃OD, 300 MHz) de la fracción PG-P 1, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

Instituto de Quimica UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave MJE/ABAC-PP-1GJ
Registro 984
Disolvente: CD3OD
Experimento 13C
Bruker Avance (F) 300 MHz
03-12-2018



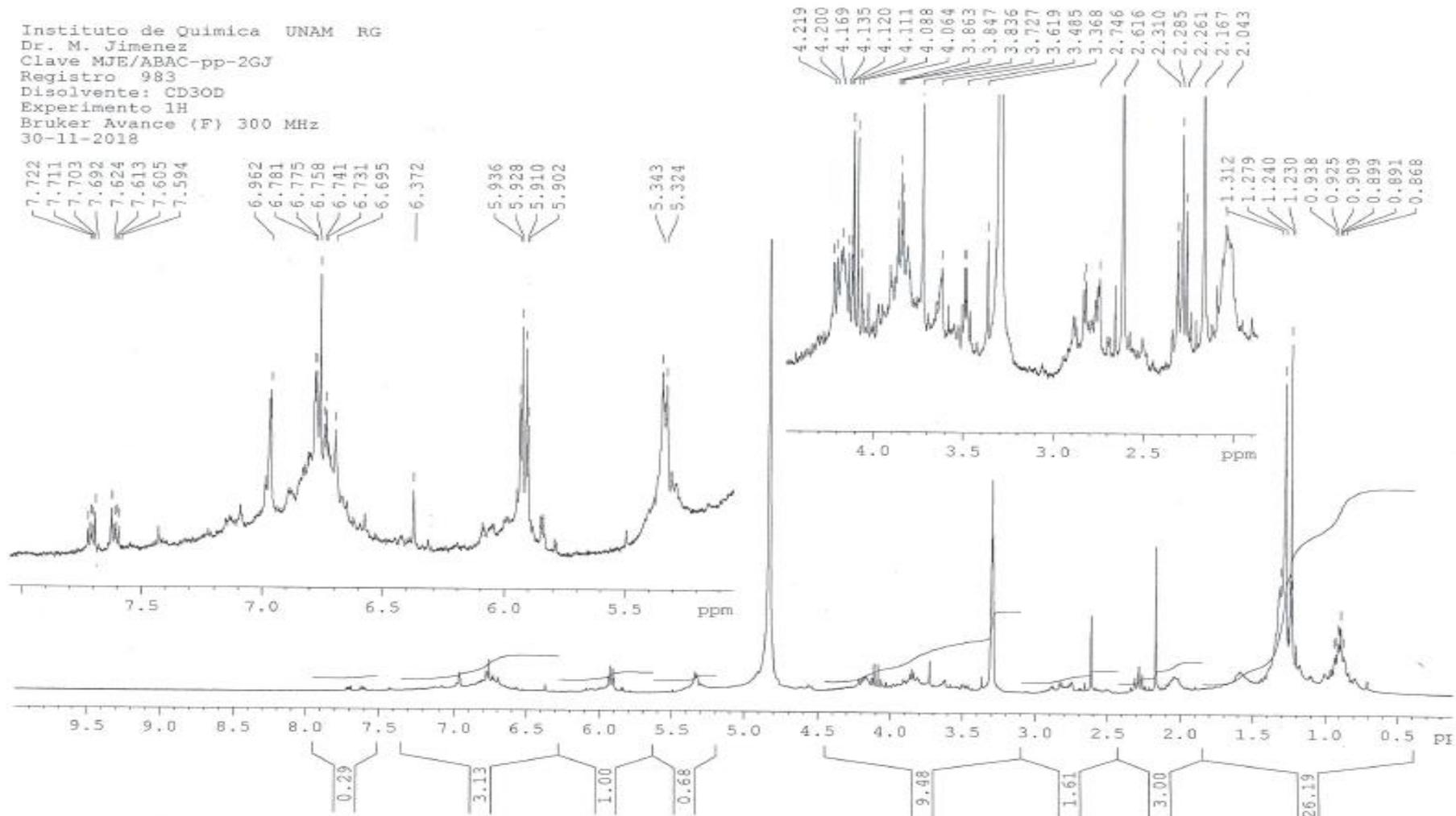
Espectro 22. Espectro de RMN-¹³C (CD₃OD, 300 MHz) de la fracción PG-P 1, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

Instituto de Química UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave MJE/ABAC-PP-1GJ
Registro 984
Disolvente: CD3OD
Experimento HSQC
Bruker Avance (F) 300 MHz
03-12-2018



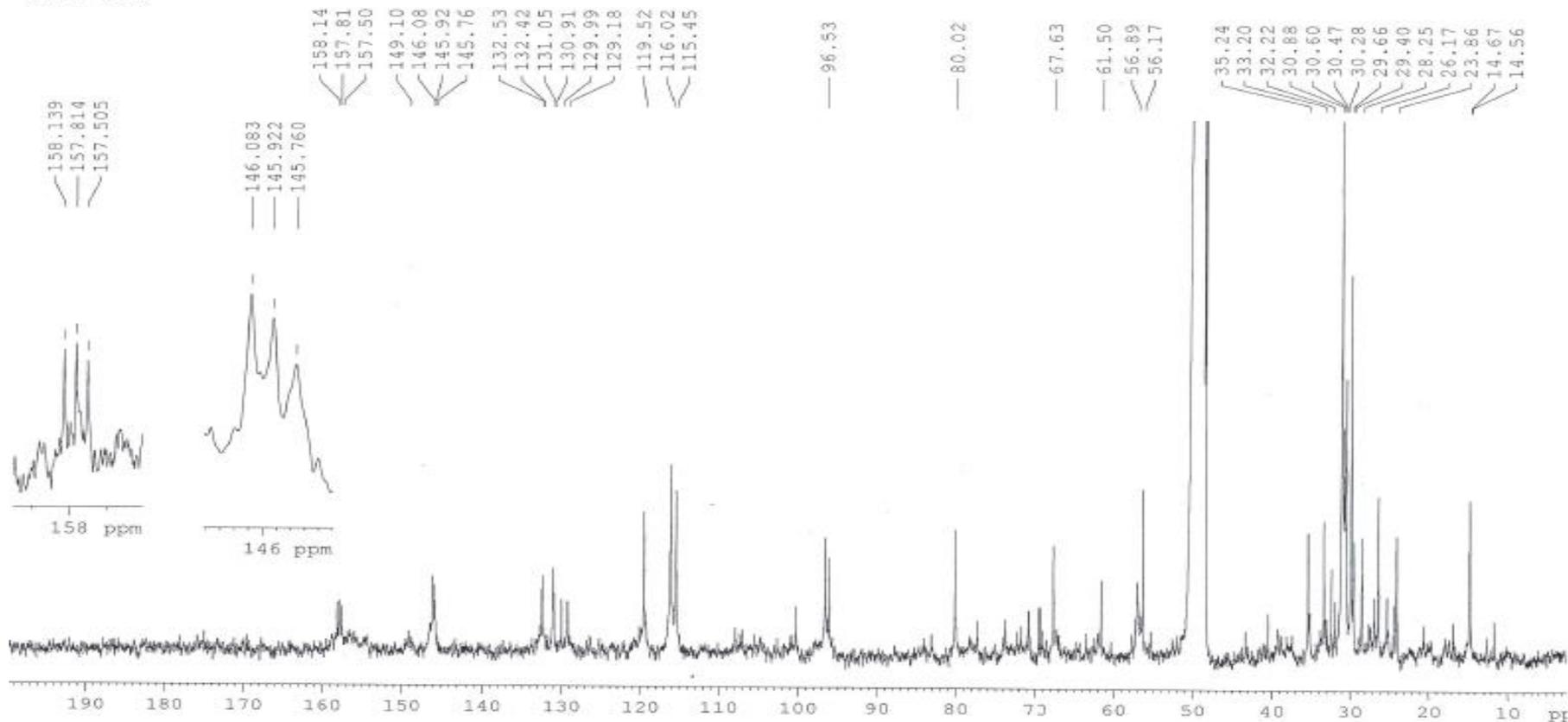
Espectro 23. Experimento HSQC (CD_3OD , 300 MHz) de la fracción PG-P 1, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

Instituto de Quimica UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave MJE/ABAC-pp-2GJ
 Registro 983
 Disolvente: CD3OD
 Experimento 1H
 Bruker Avance (F) 300 MHz
 30-11-2018



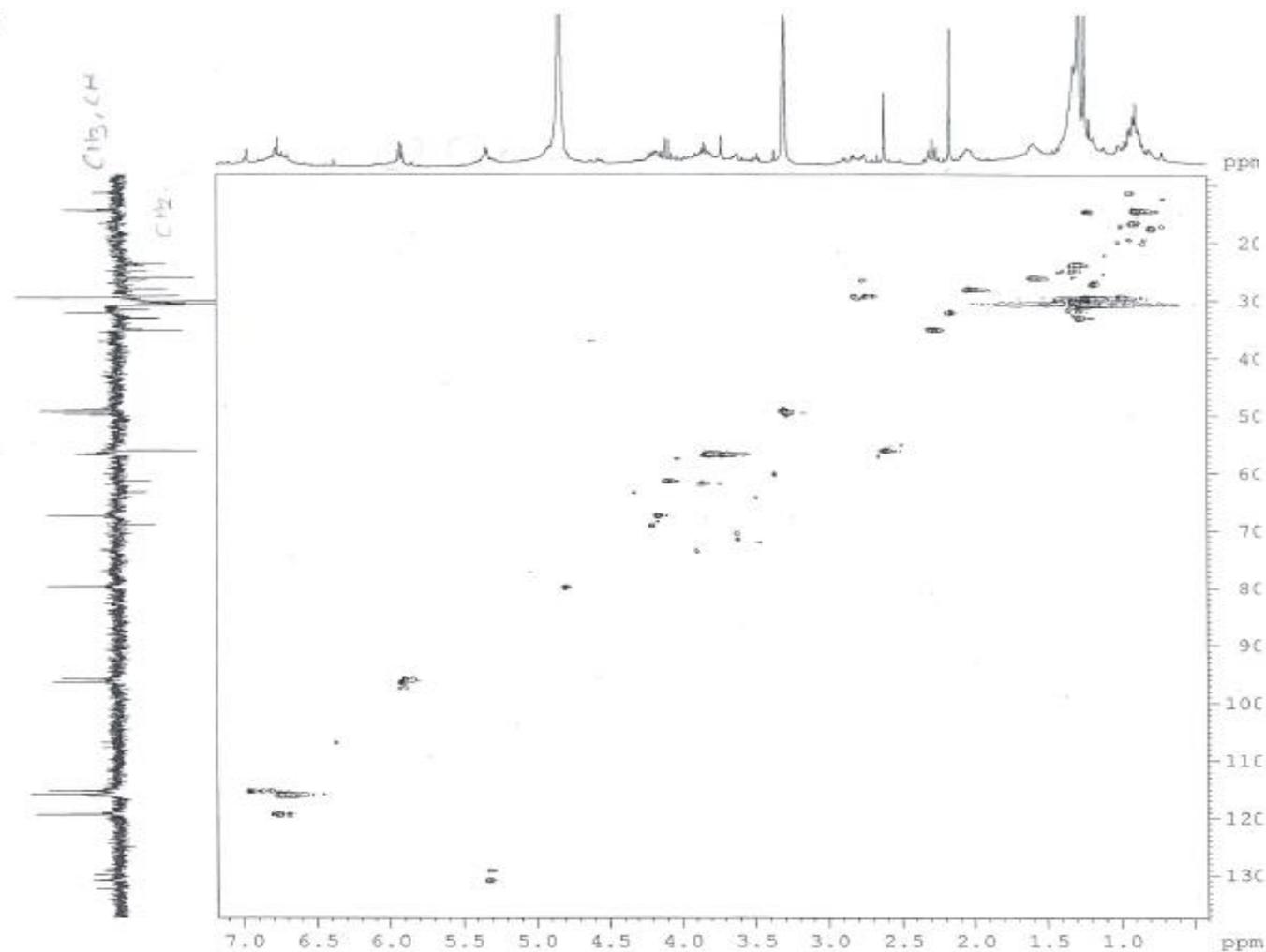
Espectro 24. Espectro de RMN-¹H (CD₃OD, 300 MHz) de la fracción PG-P 2, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

Instituto de Quimica UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave MJE/ABAC-pp-2GJ
 Registro 983
 Disolvente: CD3OD
 Experimento 13C
 Bruker Avance (F) 300 MHz
 30-11-2018



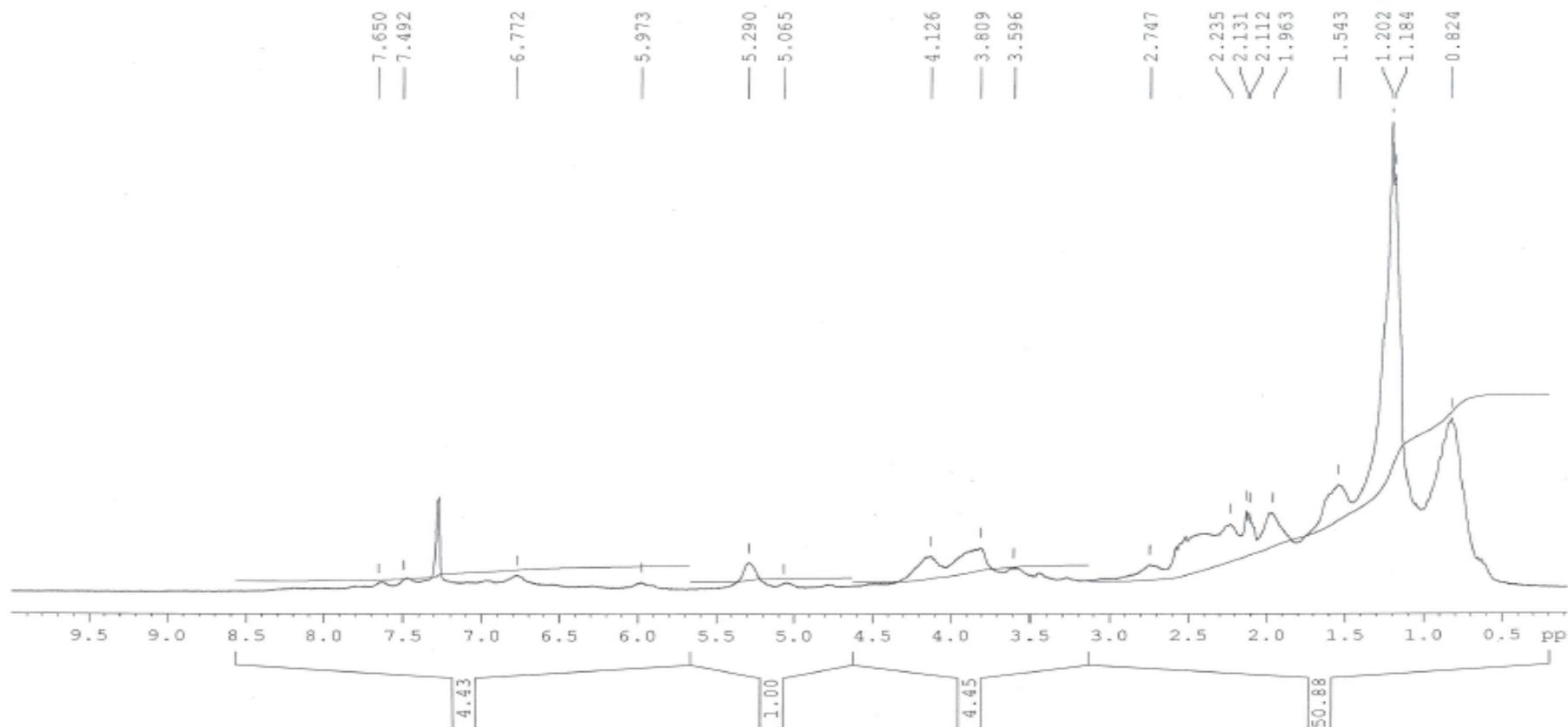
Espectro 25. Espectro de RMN-¹³C (CD₃OD, 300 MHz) de la fracción PG-P 2, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

Instituto de Química UNAM RG
Dr. M. Jiménez
Clave MJE/ABAC-pp-2GJ
Registro 983
Disolvente: CD₃OD
Experimento HSQC
Bruker Avance (F) 300 MHz
30-11-2018



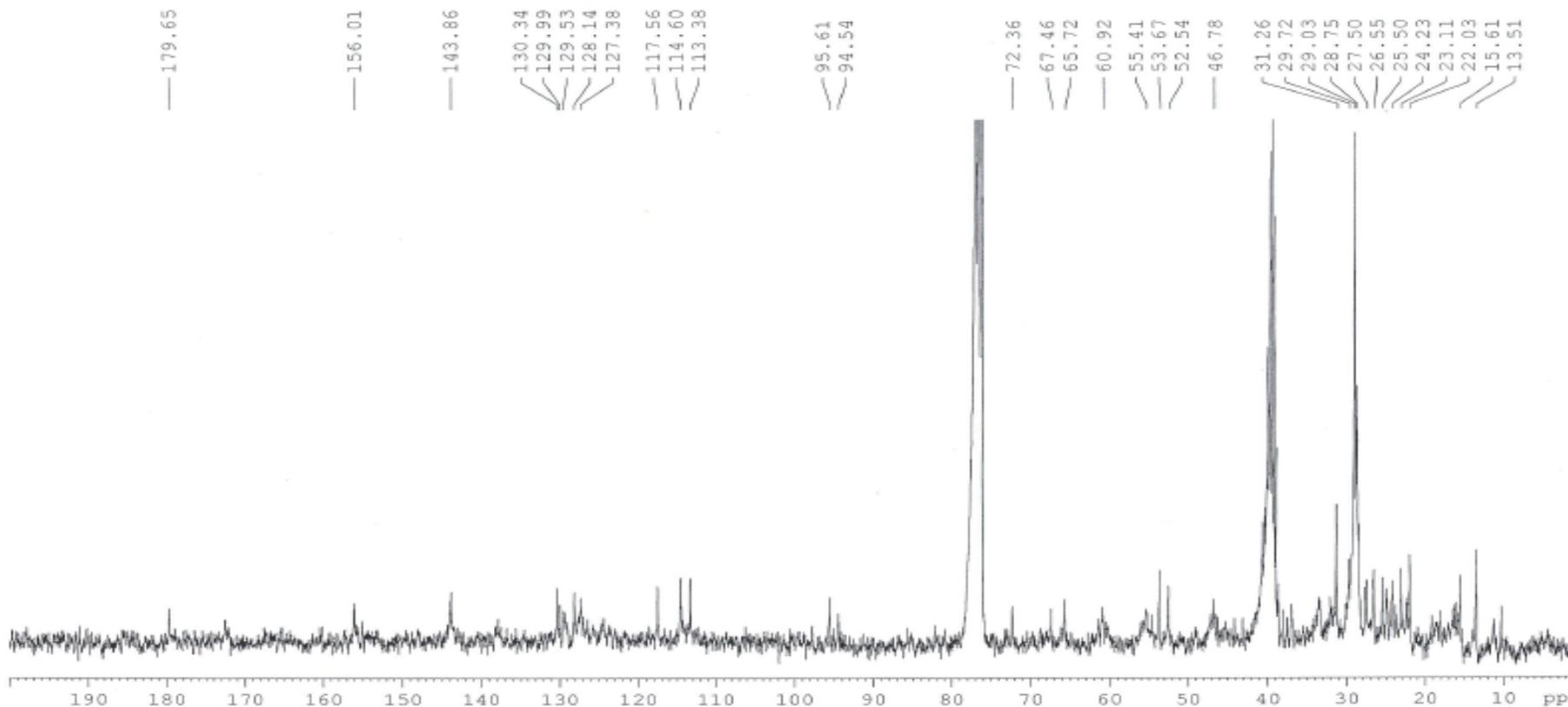
Espectro 26. Experimento HSQC (CD₃OD, 300 MHz) de la fracción PG-P 2, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

Instituto de Quimica UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave MJE/ABAC-PP-3GJ
Registro 982
Disolvente: CDCl₃ + gotas de DMSO
Experimento 13C
Bruker Avance (F) 300 MHz
23-11-2018



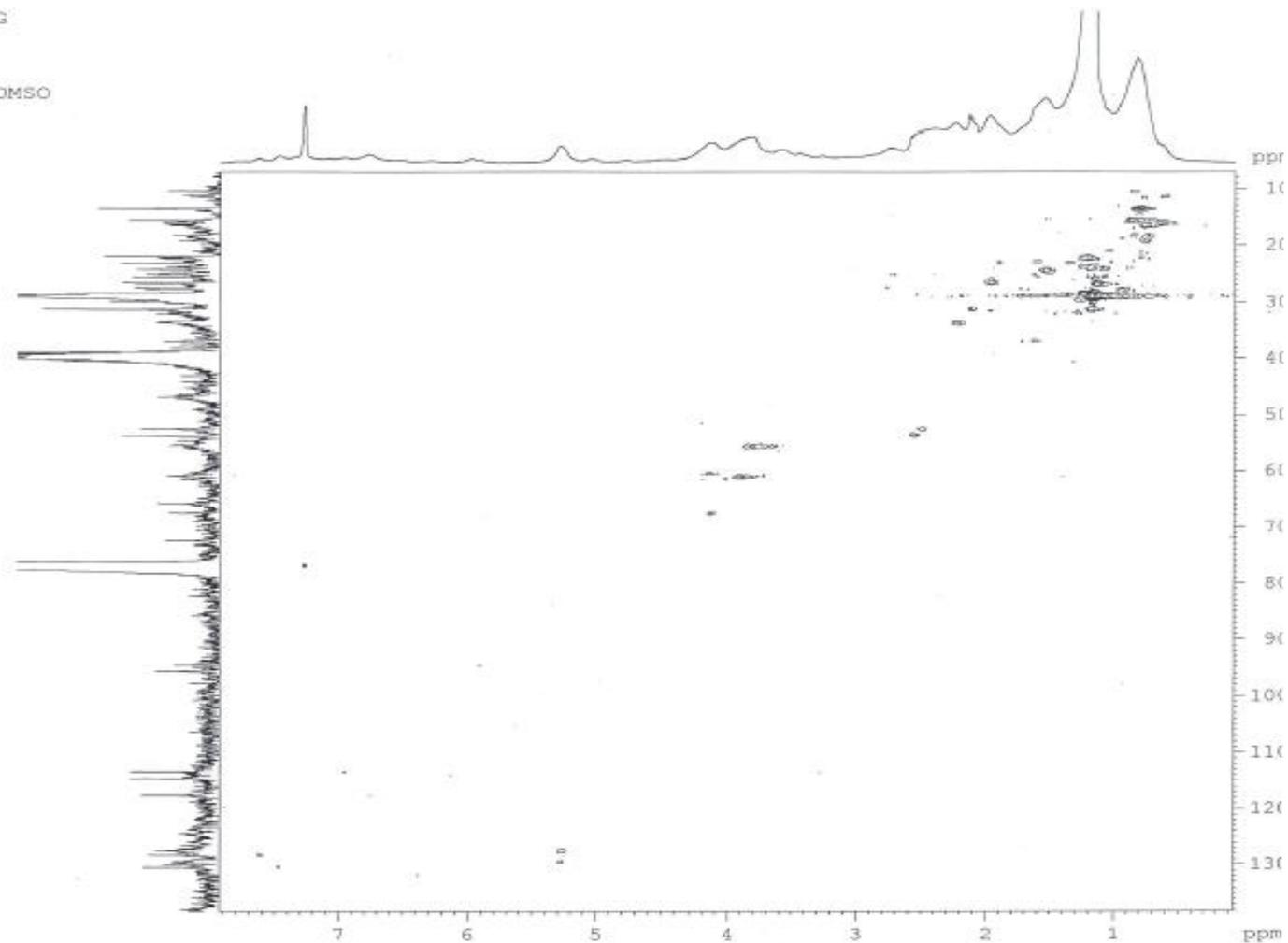
Espectro 27. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) de la fracción PG-P 3, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

Instituto de Quimica UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave MJE/ABAC-PP-3GJ
Registro 982
Disolvente: CDCl₃ + gotas de DMSO
Experimento 13C
Bruker Avance (F) 300 MHz
23-11-2018



Espectro 28. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 300 MHz) de la fracción PG-P 3, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.

Instituto de Química UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave MJE/ABAC-PP-3GJ
Registro 982
Disolvente: CDCl₃ + gotas de DMSO
Experimento HSQC
23-11-2018



Espectro 29. Experimento HSQC (CDCl₃, 300 MHz) de la fracción PG-P 3, obtenida a partir del extracto de acetona de la raíz de *Crataegus mexicana* DC.