



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE PARÁMETROS PARA EL CONTROL DE CALIDAD
DE LA PLANTA MEDICINAL *Bouvardia ternifolia* (Cav.).(Rubiaceae)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**RAFAEL JONATHAN ESPINOZA DE LOS
MONTEROS CASAS**



CIUDAD DE MÉXICO

2020



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: Profesora: MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS
VOCAL: Profesor: JOSÉ FAUSTO RIVERA CRUZ
SECRETARIO: Profesora: MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO
1er. SUPLENTE: Profesor: MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR
2do. SUPLENTE: Profesor: MANUEL EDUARDO RANGEL GRIMALDO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, DIVISIÓN DE
POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. MANUEL EDUARDO RANGEL GRIMALDO

SUSTENTANTE:

RAFAEL JONATHAN ESPINOZA DE LOS MONTEROS CASAS

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA), por el apoyo económico otorgado a través del proyecto IN222619, y al proyecto PAIP 5000-9131, ambos a cargo de la Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

A los miembros del jurado: Dra. María Isabel Aguilar Laurents, Dr. José Fausto Rivero Cruz y Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano por el tiempo invertido en la revisión, corrección, sugerencias y consejos con respecto a este trabajo.

A la Dra. María Isabel Chávez Uribe del Instituto de Química, UNAM por la asesoría espectroscópica sobre algunos compuestos obtenidos en este trabajo.

Al personal técnico de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, por el registro de los espectros para los análisis espectroscópicos y espectrométricos, particularmente a la M. en C. Nayeli López Balbiaux, la Q. Marisela Gutiérrez, la QFB Margarita Guzmán, a la Dra. Minerva Monroy y a la Q. Alejandrina Acosta. A la Q. Georgina Duarte Lisci por el análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas.

A la Dra. Rachel Mata Essayag por el apoyo para la realización del ensayo biológico.

Al M. en C. Manuel Eduardo Rangel Grimaldo por su amabilidad, asesoría y apoyo técnico para la realización de las pruebas biológicas. Por los consejos y el conocimiento compartido como mi supervisor técnico.

Al M. en C. Ramiro Ríos Gómez de la Unidad de Integración en Sistemática Vegetal y Suelo, FES Zaragoza, UNAM, por la aportación del material vegetal y su determinación botánica.

A los I.Q. Ramiro del Carmen y Roberto Díaz por la asistencia técnica informática.

DEDICATORIAS

A mi papá Rafael, a mi mamá Lidia que con su amor, paciencia, trabajo, consejos y apoyo me han dado la mejor de las herencias la cual es una excelente educación, que gracias a ellos soy la persona que soy, que con sus ejemplos me enseñaron a no darme por vencido jamás y que si llegó a caer me levante, y que puedo lograr lo que me proponga muchas gracias por ser los mejores padres y estar siempre a mi lado los quiero mucho acá y allá.

A mi hermano Diego que a pesar que siempre estamos peleando esa es nuestra forma de demostrar que nos llevamos bien, que nos queremos, y que siempre estaremos ayudándonos apoyándonos y aconsejándonos.

A mi novia y mejor amiga Stephanie que ilumina mi vida, que con su amor, cariño y apoyo me motivaron a seguir adelante por más difícil u oscura que sea la situación, por siempre escucharme, aconsejarme y jamás dejarme solo, mamor gracias por siempre estar juntitos pegaditos y ser la mejor novia del universo te amo infinitamente mi principessa.



ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	IV
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Familia Rubiaceae.....	3
2.2 Características del género <i>Bouvardia</i>	3
2.2.1 Género <i>Bouvardia</i>	3
2.2.2 Distribución y hábitat.....	4
2.3 Características de la especie <i>Bouvardia ternifolia</i>	5
2.3.1 Clasificación taxonómica.....	5
2.3.2 Descripción.....	5
2.3.3 Distribución.....	6
2.3.4 Hábitat	6
2.3.5 Nombres comunes	7
2.3.6 Usos.....	7
2.3.7 Estudios farmacológicos.....	7
2.3.8 Estudios fitoquímicos de <i>Bouvardia ternifolia</i>	8
2.4 Composición química.....	8
2.4.1 Ácido ursólico.....	10
2.4.2 Bouvardinas.....	11
2.4.3 Asperulósido.....	11
2.5 Diabetes mellitus (DM)	13
2.5.1 Enzima α -glucosidasa, su inhibición en el tratamiento de la DM2	14
2.6 Métodos analíticos.....	16
2.6.1 Cromatografía	16
2.6.2 Cromatografía en capa fina	17
2.7 Pruebas de pureza	17
2.7.1 Determinación de materia extraña (MGA-FG 0030).....	17
2.7.2 Cenizas totales (MGA-FH 0060).....	17



2.7.3	Material extraíble (MGA-FH 0070)	18
2.7.4	Pérdida de agua y material volátil (MGA-FH 0080)	18
2.7.5	Metales pesados (MGA-FH 0160)	18
3.	JUSTIFICACIÓN	19
4.	OBJETIVOS	19
4.1	Objetivo general	19
4.2	Objetivos particulares	19
5.	PARTE EXPERIMENTAL	21
5.1	Material	21
5.1.1	Instrumental de laboratorio	21
5.1.2	Disolventes, soluciones y reactivos	21
5.1.3	Equipo utilizado	21
5.2	Material vegetal	22
5.3	Ensayos de pureza	22
5.3.1	Determinación de materia extraña	22
5.3.2	Cenizas totales	22
5.3.3	Material extraíble	22
5.3.4	Contenido de agua y material volátil	23
5.3.5	Metales pesados	23
5.4	Ensayo preliminar de composición	23
5.4.1	Obtención del material volátil	23
5.4.2	Obtención del extracto de AcOEt	23
5.4.2.1	Fraccionamiento cromatográfico del extracto de AcOEt	23
5.4.3	Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto de AcOEt	25
5.4.3.1	Aislamiento y purificación del ácido ursólico (compuesto de referencia)	25
5.5	Obtención del extracto de metanol	25
5.5.1	Fraccionamiento y aislamiento de la mezcla de Bouvardinas	25
5.6	Aislamiento y purificación del asperulósido	25
5.7	Determinación de parámetros de eficacia terapéutica preliminares	27
5.7.1	Determinación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa	27



6.	RESULTADOS Y DISCUSION	29
6.1	Ensayos de pureza.....	29
6.1.1	Determinación de materia extraña	29
6.1.2	Cenizas totales.....	29
6.1.3	Material extraíble	29
6.1.4	Contenido de agua y material volátil.....	30
6.1.5	Metales pesados.....	31
6.2	Ensayo de composición.....	31
6.2.1	Obtención del material volátil.....	31
6.2.2	Obtención del compuesto de referencia (ácido ursólico)	34
6.3	Aislamiento de la mezcla de bouvardinas	36
6.4	Aislamiento y purificación del asperulósido.....	38
6.5	Determinación de parámetros de eficacia terapéutica preliminares	45
6.5.1	Determinación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa	45
6.5.1.1	Evaluación del efecto del ácido ursólico sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa	46
6.5.1.2	Evaluación del efecto de la mezcla de bouvardinas sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa.....	47
6.5.1.3	Evaluación del efecto del asperulósido sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa	48
7.	CONCLUSIONES	49
8.	PERSPECTIVA	49
9.	REFERENCIAS.....	50
10.	ANEXO	55



LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
As	Arsénico
Cd	Cadmio
C	Carbono
cm	Centímetro
CHCl ₃	Cloroformo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
Cu	Cobre
CV	Coeficiente de variación
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
CCF	Cromatografía de capa fina
CLAR/HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CG	Cromatografía de gases
δ	Desplazamiento químico
SD	Desviación estándar
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CO ₂	Dióxido de carbono
COSY	Espectro bidimensional de correlación homonuclear
d	Doblete
EM	Espectrometría de masas
ext	Extracto
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
°C	Grado centígrado
g	Gramo
H	Hidrógeno



H	Horas
HMBC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HSQC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple
IR	Infrarrojo
Int. rel.	Intensidad relativa
M⁺	Ion molecular
kg	Kilogramo
MeOH	Metanol
CD₃OD	Metanol deuterado
MGA	Método General de Análisis
Hg	Mercurio
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
nm	Nanómetro
N	Normalidad
NOESY	Espectro bidimensional homonuclear de efecto overhauser
OMS	Organización Mundial de la Salud
O	Oxígeno
ppm	Partes por millón
Pb	Plomo
% m/v	Porcentaje masa/volumen
RA	Reactivo Analítico
R_f	Relación de frentes



LISTA DE ABREVIATURAS

<i>m/z</i>	Relación masa/carga
RMN-¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13
RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
(NH₄)₄Ce(SO₄)₄•2H₂O	Sulfato cérico amoniacal
T.A.	Temperatura ambiente
t_R	Tiempo de retención
UTM	Sistema de coordenadas universal transversal de Mercator
UV	Ultravioleta
Vis	Visible



LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Clasificación botánica de la especie <i>Bouvardia ternifolia</i>	5
Tabla 2.	Principales metabolitos secundarios aislados de <i>B. ternifolia</i>	8
Tabla 3.	Tipos de cromatografía y sus mecanismos de separación	16
Tabla 4	Elución de columna cromatográfica del extracto de AcOEt	24
Tabla 5	Elución de columna cromatográfica de aguas madres	26
Tabla 6.	Porcentaje de cenizas totales	29
Tabla 7.	Porcentaje de material extraíble	30
Tabla 8	Porcentaje de agua y material volátil	30
Tabla 9	Componentes volátiles de <i>B. ternifolia</i>	33
Tabla 10	Datos de HPLC del precipitado de éter isopropílico	37
Tabla 11	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y ¹³ C del asperulósido	39



LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución geográfica del género <i>Bouvardia</i>	4
Figura 2. <i>Bouvardia ternifolia</i> (Cav.).(Rubiaceae)	5
Figura 3. Distribución geográfica de <i>Bouvardia ternifolia</i> en México y Estados Unidos de Norte América	6
Figura 4. Estructura del ácido ursólico (1)	11
Figura 5. Estructura de la Bouvardina (2)	11
Figura 6. Estructura del asperulósido (5)	12
Figura 7. Diabetes Mellitus Tipo 1 y Tipo 2	14
Figura 8. Localización de las enzimas α -glucosidasas.	14
Figura 9. Estructura de la acarbosa, miglitol y voglibosa	16
Figura 10. Determinación de elementos inorgánicos presentes en <i>B. ternifolia</i>	31
Figura 11. Cromatograma de gases de la fracción fresca	32
Figura 12. Cromatograma de gases de la fracción seca	32
Figura 13. Estructura del ácido ursólico (1)	34
Figura 14. Espectro de IR por reflectancia del ácido ursólico	35
Figura 15. Espectro de RMN ^1H del ácido ursólico (400 MHz, CDCl_3).	35
Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C del ácido ursólico (100 MHz, CDCl_3)	36
Figura 17. Cromatograma de líquidos de la mezcla de bouvardinas	37
Figura 18. Estructuras de los hexapéptidos	38
Figura 19. Estructura del asperulósido (5)	38
Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C del asperulósido (100 MHz, CD_3OD)	40
Figura 21. Espectro de RMN ^1H del asperulósido (400 MHz, CD_3OD)	41
Figura 22. Espectro bidimensional COSY del asperulósido (400	42



	MHz, CD ₃ OD)	
Figura 23	Espectro bidimensional HSQC del asperulósido (CD ₃ OD)	43
Figura 24	Correlaciones en HMBC de los carbonos 1 y 1'	43
Figura 25	Espectro bidimensional HMBC del asperulósido (CD ₃ OD)	44
Figura 26	Espectro bidimensional NOESY del asperulósido (400 MHz, CD ₃ OD)	44
Figura 27	Curva de inhibición enzimática de la acarbosa	46
Figura 28	Curva de inhibición enzimática del Ácido ursólico	47
Figura 29	Curva de inhibición enzimática de la acarbosa	48
Figura A1	Espectro en el IR del ácido ursólico (1)	55
Figura A2	Espectro de RMN- ¹ H de ácido ursólico (1) (400 MHz, CDCl ₃)	56
Figura A3	Espectro de RMN- ¹³ C de ácido ursólico (1) (100 MHz, CDCl ₃)	57
Figura A4	Espectro de RMN- ¹³ C de ácido ursólico (1) (100 MHz, CDCl ₃ , expansión)	58
Figura A5	Espectro de RMN- ¹ H de asperulósido (5) (400 MHz, CD ₃ OD)	59
Figura A6	Espectro de RMN- ¹ H de asperulósido (5) (400 MHz, CD ₃ OD, expansión)	60
Figura A7	Espectro de RMN ¹³ C del asperulósido (5) (100 MHz, CD ₃ OD)	61
Figura A8	Espectro bidimensional COSY del asperulósido (5) (400 MHz, CD ₃ OD)	62
Figura A9	Espectro bidimensional HMBC del asperulósido (5) (CD ₃ OD)	63
Figura A10	Espectro bidimensional HMBC del asperulósido (5) (CD ₃ OD, expansión)	64



Figura A11	Espectro bidimensional HSQC del asperulósido (5) (CD ₃ OD)	65
Figura A12	Espectro bidimensional NOESY del asperulósido (5) (400 MHz, CD ₃ OD)	66



1. INTRODUCCIÓN

El uso extenso de plantas medicinales para resolver problemas de salud en las diferentes poblaciones del planeta ha derivado en un impulso por parte de diversas organizaciones nacionales e internacionales para el desarrollo de metodologías y técnicas analíticas que permitan determinar la identidad, pureza y composición de las drogas vegetales. Por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud ha promovido recomendaciones para la regularización de productos terapéuticos con plantas medicinales. Esto se logra mediante la compilación de la información científica con datos sobre seguridad, eficacia y control de calidad de las plantas de mayor uso, en monografías específicas.

El control de calidad de las plantas medicinales permite la posterior regulación de los productos terapéuticos conformados con éstas mediante la estructuración de sus monografías específicas. Son necesarios datos de seguridad, eficacia terapéutica, identidad, pureza y composición de las drogas vegetales los cuales se generan mediante el desarrollo de metodologías y técnicas analíticas apropiadas.

Bouvardia ternifolia (Cav.) (trompetilla, tlacoxóchitl), es una planta medicinal de uso muy antiguo en México principalmente como estimulante. Es una hierba o arbusto de 50 cm hasta 3 m de altura. Las flores crecen en agrupamientos en la parte terminal de la planta, con la corola roja en forma de trompeta y son muy vistosas. Los frutos son unas capsulitas y las semillas son de color café-rojizo (Biblioteca Digital, 2009). Se han descrito usos para esta planta como antipirético, contra el cansancio, antidisentérico, antiespasmódico y para tratar la diabetes, entre otros (Martínez, 1989; Biblioteca Digital, 2009; Andrade-Cetto, 2005). La composición química de la droga cruda (partes aéreas) incluye glucósidos flavonoides, triterpenos y hexapéptidos (Jolad, 1977; García-Morales, 2015).

A la fecha no existen parámetros de calidad tales como pruebas de pureza y exhaustivas de composición de la planta medicinal *Bouvardia ternifolia* lo que justifica estudios pertinentes para establecerlos.



Por lo que en el presente trabajo se realizó parte de las determinaciones necesarias para la estructuración de la monografía de la planta medicinal *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schledtl. (Trompetilla, tlacoxóchitl) las cuales son ensayos de identidad, de pureza, de eficacia terapéutica preliminares, y de composición.



2. ANTECEDENTES

2.1 Familia Rubiaceae

Las rubiáceas son una familia de plantas llamadas normalmente de la “rubia”, “galio blanco” o familia del “café”. Es una gran familia con 10 mil especies distribuidas por toda la tierra, aunque tiene su máxima expresión en los trópicos.

La familia esta subdividida en tres subfamilias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae

Muchas de las especies de la familia Rubiaceae son de gran importancia, por ejemplo: hierba del pájaro (*Borreria verticillata* (L.)) y coralillo (*Hamelia patens* (Jacq.)) las cuales tienen usos medicinales. Con interés apícola existe la golondrina blanca (*Richardia scabra* (L.)) y *Oldenlandia microtheca* (Schtdl. & Cham.) y con interés alimenticio, el café (*Coffea arabica*) (www.tropicos.org).

2.2 Características del género Bouvardia

2.2.1 Género Bouvardia

El género Bouvardia consta de plantas cuyas flores son del orden de las Gentianales, de la familia Rubiaceae; el género está formado por unas 30 especies de arbustos y plantas herbáceas originarias de México, Centroamérica y del sur de EEUU. Algunas especies son *Bouvardia hybrida* (híbrido), *Bouvardia ternifolia*, *Bouvardia longiflora*, *Bouvardia glaberrima*, *Bouvardia triphylla* y *Bouvardia bicolor*.

Son arbustos perennifolios que apenas la planta alcanza 60-150 cm de altura, con hojas opuestas o en conjunto de 3-5, ovadas a lanceoladas con 3-11 cm de longitud. Las flores son terminales, generalmente en racimos. La corola es tubular con cuatro lóbulos. Las flores son de diferentes colores en las especies, son de color blanco, amarillo, rosa y rojo.

Bouvardia es un nombre genérico nombrado en honor de Charles Bouvard (1572-1658), médico de Luis XIII de Francia, y superintendente del “Jardin du Roi” en París (Reid, 2004).



2.2.2 Distribución y hábitat

El hábitat difiere, pero a menudo crecen en un afloramiento rocoso de laderas empinadas o barrancas a elevaciones superiores a 500 msnm, las condiciones ambientales varían de xéricas a muy mésicas (Blackwell, 1968). En la Figura 1 se muestra la distribución geográfica mundial del género *Bouvardia* (CONABIO, 2019).



Figura 1. Distribución geográfica del género *Bouvardia*



2.3 Características de la especie *Bouvardia ternifolia*.

2.3.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de esta planta se obtuvo de la base de datos www.tropicos.org y se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 Clasificación botánica de la especie *Bouvardia ternifolia*

Reino	Plantea
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicoriledoneas)
Orden	Gentianales
Familia	Rubiaceae
Subfamilia	Rubioideae
Género	<i>Bouvardia</i>
Especie	<i>B. ternifolia</i>

2.3.2 Descripción

Bouvardia ternifolia (Cav.) Schtdl. (Rubiaceae) (Figura 2) consta de arbustos que alcanzan un tamaño de hasta 2 m, con ramas con bellos, sus hojas comúnmente están verticales de 3 por nodo, estípulas pequeñas. Con flores tubulares, de color salmón, rojo o naranja.



Figura 2. *Bouvardia ternifolia* (Cav.).(Rubiaceae)



2.3.3 Distribución

Bouvardia ternifolia es nativa de Norte América, crece desde el sureste de Texas y Nuevo México hasta el sureste de Arizona en Estados Unidos de Norteamérica. En México es posible encontrarla en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Sonora, Sinaloa, San Luís Potosí, Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Estado de México y Ciudad de México (Figura 3) (www.tropicos.org, www.naturalista.mx/taxa/147990-Bouvardia-ternifolia).



Figura 3. Distribución geográfica de *Bouvardia ternifolia* en México y Estados Unidos de Norte América

2.3.4 Hábitat

B. ternifolia crece preferentemente en bosques de pino-encino, matorrales y pastizales xerófilos, tanto en hábitats desérticos como en montañosos de los 800 a 3000 msnm, sobre todo en lugares perturbados, a orillas de caminos y carreteras.



2.3.5 Nombres comunes

Bouvardia ternifolia es comúnmente llamada en México como: Contrahierba, contrahierba colorada, trompetilla, tlacoxochitl (náhuatl, Estado de México), hierba del indio, hierba del pasmo (Sinaloa), trompetilla, mirto (Coahuila y Durango), doncellita (Oaxaca), tabaquillo (Michoacán), nucopuetel (otomí, Puebla), candelilla (Hidalgo) y doto (otomí, Querétaro) (Martínez, 1989),

2.3.6 Usos

En la mayor parte de la República Mexicana sus principales aplicaciones en la medicina tradicional son para tratar mordeduras de víbora, picadura de abeja, alacranes, arañas, ciempiés y hormigas así como para aliviar el dolor o apagar la erisipela. También se utiliza para aliviar la disentería, rabia, dolor de estómago, tos ferina, absceso vaginal. Se le atribuyen propiedades analgésicas y sedantes, generalmente es administrada en infusiones provenientes de las partes aéreas de la planta (tallos, hojas y flores) (Jolad et al., 1977; Zalacain et al., 1982; Pérez-Gutiérrez et al., 1998; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Jiménez-Ferrer et al., 2005; García-Morales et al., 2015)

2.3.7 Estudios farmacológicos

De acuerdo a estudios realizados con *B. ternifolia* se ha encontrado que tiene un potente efecto inhibitorio sobre la enzima acetil-colinesterasa, y contribuye de manera importante a disminuir la inflamación. Asimismo, se han comprobado las actividades de esta planta tales como, antioxidante, antitumoral, citotóxica y contra el veneno de *Centruroides limpidus limpidus*, y más recientemente su actividad antidiabética. Estudios científicos con el extracto hidroalcohólico de esta planta han mostrado que favorece la protección del sistema nervioso al tener un potente efecto nootrópico (Jolad et al., 1977; Zalacain et al., 1982; Pérez-Gutiérrez et al., 1998; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Jiménez-Ferrer et al., 2005; García-Morales et al., 2015).



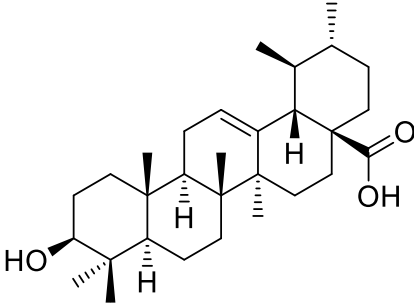
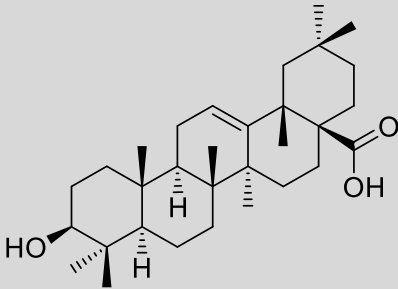
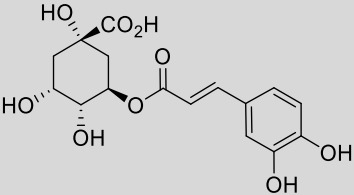
2.3.8 Estudios fitoquímicos de *Bouvardia ternifolia*

De las partes aéreas de esta planta se han aislado componentes peptídicos como la bouvardina (Jolad et al., 1977). De igual manera, se han reportado algunos compuestos derivados de ésta como la desoxibouvardina, así como algunos derivados metilados (Bates et al., 1983). Por otro lado, otros estudios científicos realizados han encontrado al ácido ursólico, ácido oleanólico y diversos flavonoides como: rutina, quercetina y kaemferol como metabolitos secundarios de la especie vegetal (García-Morales, 2015; Herrera-Ruiz et al., 2012).

2.4 Composición química

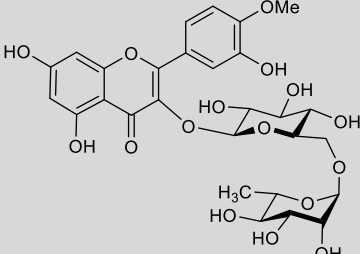
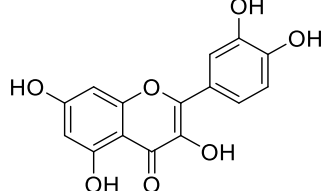
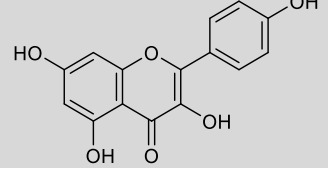
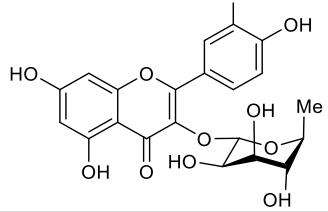
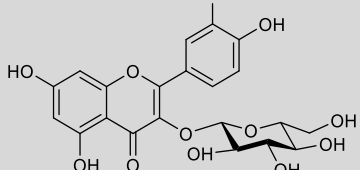
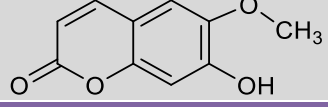
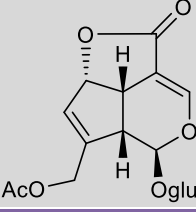
Se han aislado de las partes aéreas de *B. ternifolia* componentes como los que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales metabolitos secundarios aislados de *B. ternifolia*

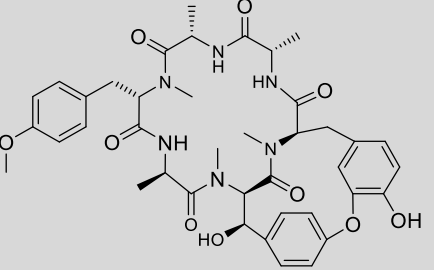
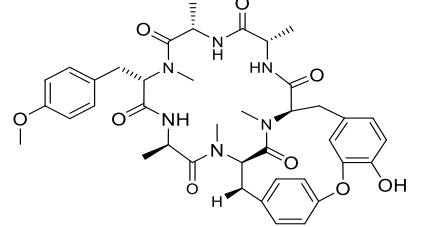
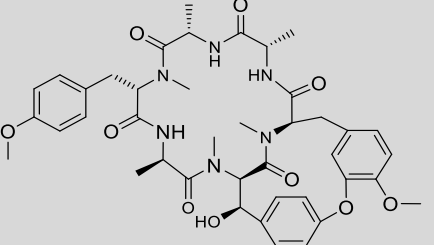
Triterpenoides		
Nombre	Estructura	Referencia
Ácido ursólico		Herrera-Ruiz et al., 2012; García-Morales et al., 2015
Ácido oleanólico		
Ester de polifenol		
Ácido clorogénico		García-Morales et al., 2015
Flavonoides		



ANTECEDENTES

Rutina		Herrera-Ruiz et al., 2012; García-Morales et al., 2015
Quercetina		
Kaempferol		Herrera-Ruiz et al., 2012
3-O-ramnopiranosido de quercetina		García-Morales et al., 2015
3-O-glucopiranosido de quercetina		
Cumarina		
Escopoletina		García-Morales et al., 2015
Iridoide monotérmico		
Asperulósido		Cruz, 2017
Péptidos		



Bouvardina		
Desoxibouvardina		Jolad et al., 1977; Zalacain et al., Bates et al., 1983
6-O-Metilbouvardina		Bates et al., 1983

2.4.1 Ácido ursólico

El ácido ursólico (Figura 4) es un compuesto triterpenoide penta cíclico frecuentemente usado en la medicina herbolaria china. Muestra efectos antitumorales, antiangiogénicos, protectores del hígado e hipolipemiantes; inhibe formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y tiene pocos efectos secundarios tóxicos.

Estudios recientes han reportado que el ácido ursólico funciona como anti oxidante, inhibe la peroxidación lipídica, inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis mediante la inhibición de miRNA-21. Por otra parte, presenta efectos de protección renal, antiinflamatorio, antioxidante, anti proliferativo, anti cáncer, antitumoral, antimutagénico, anti-aterosclerótico, antihipertensivo, anti leucémico y propiedades antivirales (Lu et al., 2015).

En los efectos anti proliferativo, anti tumor y anti leucémico actúa mediante la vía de la supresión del factor NF-kB e inhibición de la expresión de genes reguladores de NF-kB como lipoxigenasa, COX-2, MMP-9 e iNOS (Checker et al., 2012).

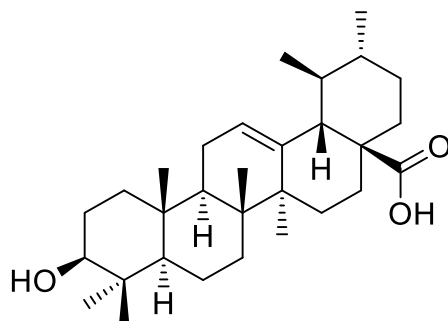


Figura 4. Estructura del ácido ursólico (1)

2.4.2 Bouvardinas

Son ciclo hexapéptidos integrados por dos moléculas de L-alanina, una D-alanina y tres de N-metil-L-tirosina modificadas y contiene un anillo de 14 miembros formado por acoplamiento oxidativo del oxígeno fenólico de una tirosina al carbono *orto* al grupo hidroxilo fenólico de una tirosina adyacente.

La bouvardina (Figura 5) es un compuesto antitumoral que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas, actúa a nivel del ribosoma 80 S en un sitio involucrado de alguna manera con la interacción de EF1 y EF2. Inhibe la unión dependiente de EF1 del aminoacil-ARNt y la translocación dependiente de EF2 del peptidil-ARNt (Zalacain et al., 1982). Se ha encontrado que la bouvardina inhibe la transcripción del ARNm y por lo tanto inhibe la expresión de la proteína (Tobey et al., 1979).

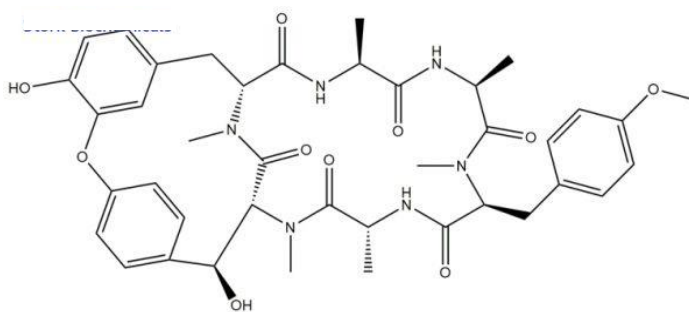


Figura 5. Estructura de la Bouvardina (2)

2.4.3 Asperulósido

El asperulósido (Figura 6) es un metabolito secundario de tipo iridoide en forma de glucósido (Lopes et al., 2004). Los iridoideos en general son una clase importante de productos naturales con esqueleto de monoterpeneo que pueden presentar



diversas actividades biológicas como antiviral, antitumoral, antiinflamatoria, antinociceptiva y antimicrobiana (Wu et al., 2013); contienen en su estructura un anillo de ciclopentano, generalmente fusionado a un anillo heterocíclico oxigenado de seis miembros. El asperulósido se ha aislado a partir de diversas fuentes vegetales como *Paederia scandens* (Wu et al., 2013), *Phychotria leiocarpa* (Lopes et al., 2004), *Morinda officinalis* (Zhang et al., 2018), *Herba paederiae* (Qiu et al., 2016), entre otras.

En experimentos efectuados en modelo animal de ratas con síndrome metabólico, la administración de extracto acuoso de hojas de *Eucommia ulmoides* y de asperulósido, estimularon la actividad antiobesidad y anti síndrome metabólico (Fujikawa, 2012). Por otra parte, en experimentos llevados a cabo por Qiu et al. en 2016, se demostró que el asperulósido tiene un efecto protector en casos de daño agudo en el pulmón inducido por lipopolisacáridos a través de mediadores que regulan la inflamación, y los mecanismos por los cuales ejerce su efecto antiinflamatorio están correlacionados con la inhibición de la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 vía inactivación del NF- κ B y rutas de señalización MAPK.

Estudios efectuados en ratas con glucósidos iridoides como el éster metílico de ácido paederosídico, paederosído, asperulósido, éster metílico del ácido desacetil asperulosídico y ácido asperulósido de *Paederia scandens* (Lour.) Merr.var. tomentosa (Rubiaceae) demostraron que posee notables efectos hepatoprotectores al disminuir el estrés oxidativo en el tejido de hígado mediante la disminución de los niveles de aspartato transaminasa y alanino transaminasa (Peng, et al., 2015)

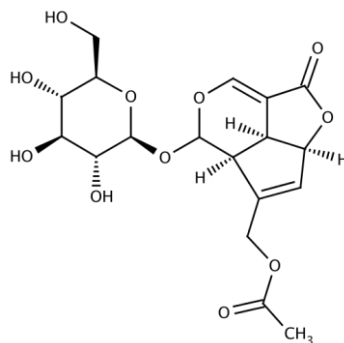


Figura 6. Estructura del asperulósido (5)



2.5 Diabetes mellitus (DM)

La diabetes es una enfermedad sistémica que provoca trastornos crónicos degenerativos, asociados a efecto de hiperglucemia crónica. El desorden metabólico es de carácter heterogéneo, con grado variable de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales.

La hiperglucemia crónica se debe a la diferencia en la producción o acción de la insulina, afectando directamente el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos, que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, específicamente los nerviosos y los vasos sanguíneos (NOM-015-SSA2-2010).

Existe la diabetes Tipo 1 (DM1) y la Tipo 2 (DM2) (Figura 7), siendo la Tipo 2 la más prevalente en el mundo, sin embargo la DM1 denominada anteriormente como diabetes insulino dependiente o juvenil, se caracteriza por hipoglucemia causada por la destrucción de las células beta del páncreas (Figura 7), resultando en la ausencia de síntesis de la hormona insulina (NOM-015-SSA2-2010).

La DM2 es la más común en el mundo, se estima que alrededor del 90% de las personas que padecen diabetes mellitus poseen esta variante la cual cursa con un defecto en la secreción de insulina, generalmente acompañada con resistencia a la misma, provocando hiperglucemia.

La DM2 es el problema más importante de salud pública en el mundo, ya que provoca complicaciones en el organismo tales como ataques cardíacos, accidentes cerebro vasculares, insuficiencia renal, amputaciones de miembros inferiores y daño neurológico, lo que incrementa el riesgo de muerte prematura. (OMS 2019, IDF).

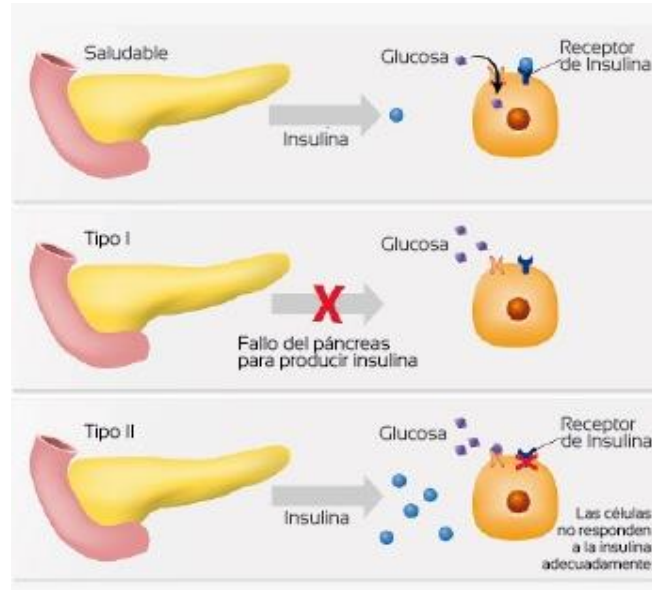


Figura 7. Diabetes mellitus Tipo 1 y Tipo 2 (www.medtip.lat, 2019)

2.5.1 Enzima α -glucosidasa, su inhibición en el tratamiento de la DM2

Las α -glucosidasas son enzimas que se encuentran en la luz del intestino delgado sobre la membrana de los enterocitos (Figura 8), lugar donde se realiza el último paso de la digestión de los carbohidratos; forman parte de la familia de enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico de carbohidratos complejos como oligosacáridos, trisacáridos y disacáridos, liberando monosacáridos como la glucosa en el borde del cepillo del intestino delgado. Este tipo de enzimas también pueden romper enlaces O-, N- y S-glucosilados (Borges de Melo et al; 2006; Israili, 2011; Aoki et al., 2019).

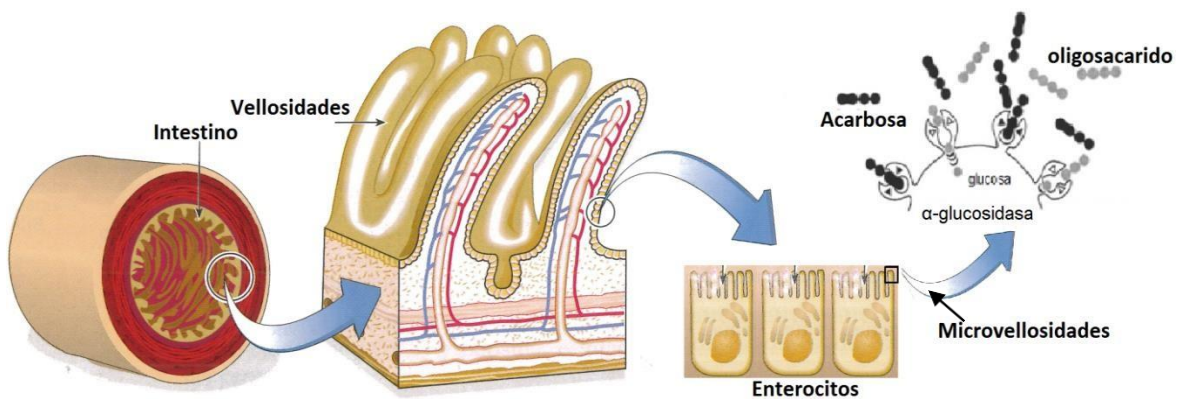


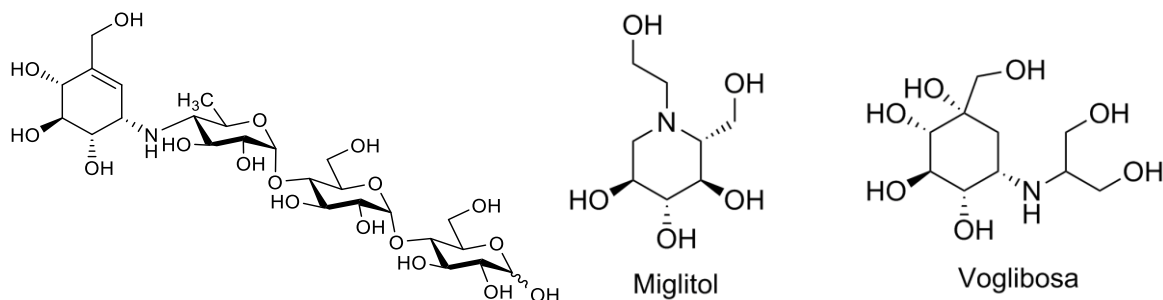
Figura 8. Localización de las enzimas α -glucosidasas (Rangel, 2015).



La inhibición de estas enzimas reduce la tasa de digestión de carbohidratos, bloqueando así el aumento repentino de glucosa, lo que resulta en una disminución de la hiperglucemia postprandial. Por lo anterior, sus inhibidores son usados ampliamente como fármacos de primera línea para el tratamiento de la DM2 recién diagnosticada y que no puede ser tratada de manera adecuada con solo dieta y ejercicio, debido a su modo de acción único al controlar la liberación de glucosa proveniente de carbohidratos complejos y disacáridos de la alimentación. El tratamiento con α -glucosidasas también puede ser usado en combinación con sulfonilurea, insulina o metformina (Borges de Melo et al., 2006; Derosa y Maffioli, 2012; Aoki et al., 2019).

Los inhibidores de α -glucosidasas mejor conocidos y que se han utilizado ampliamente para el tratamiento de DM2 son: la acarbosa, el miglitol y la voglibosa. Estos agentes son más efectivos para disminuir la hiperglucemia postprandial y deben evitarse en pacientes con insuficiencia renal significativa (Olokoba et al., 2012; Wu et al., 2013).

La acarbosa (Figura 9) disminuye la incidencia de eventos cardiovasculares y previene la progresión de la diabetes en individuos con tolerancia a la glucosa (IGT), puede reducir el peso corporal, mejorar la presión arterial y atenuar la hipertrigliceridemia en ayunas y postprandial. Estas acciones la convierten en una opción útil para el manejo del síndrome metabólico y la pre-diabetes. El miglitol (Figura 9) reduce los niveles séricos de insulina, se recomienda en monoterapias o terapia combinada con una sulfonilurea, metformina o insulina. La voglibosa (Figura 9) también reduce el desarrollo de la DM2 en individuos con ITG. Tanto el miglitol como la voglibosa son notablemente efectivos para la hiperglucemia posprandial (Kalra, 2014; Aoki et al., 2019).



2.6 Métodos analíticos

2.6.1 Cromatografía

Es una técnica que permite la separación de compuestos que se encuentran en mezcla. Es un proceso en el cual los compuestos de la mezcla son separados selectivamente por una fase móvil ya sea un gas o un líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria la cual puede ser sólida o líquida. Dependiendo de las fases estacionarias y los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en: Cromatografía de gases y Cromatografía de líquidos (Tabla 3).

Tabla 3. Tipos de cromatografía y sus mecanismos de separación

Cromatografía de Gases	Cromatografía Gas-Líquido (partición)	
	Cromatografía Gas-Sólido (adsorción)	
Cromatografía de Líquidos	Cromatografía plana	Cromatografía en capa delgada (adsorción) Cromatografía en papel (partición)
	Cromatografía en columna	Cromatografía Líquido-Sólido (adsorción) Cromatografía Líquido-Sólido (partición)
		Cromatografía de intercambio iónico Cromatografía de exclusión



2.6.2 Cromatografía en capa fina

Es una cromatografía de adsorción que consiste en un adsorbente sólido (fase estacionaria), distribuido en una placa plana la cual permite que la fase móvil pase entre el adsorbente. La separación ocurre cuando uno de los componentes es retenido por la fase estacionaria más que los otros compuestos.

El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema es particular y es un dato importante en su identificación. Esta característica se conoce con el nombre de Relación de Frentes (Rf) la cual representa la distancia recorrida por la fase móvil con relación a la distancia recorrida por un soluto. El cálculo del RF es:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por un componente desde su origen}}{\text{Distancia recorrida por el frente de la fase móvil}}$$

2.7 Pruebas de pureza

Estas pruebas proporcionan información sobre las impurezas presentes en la droga cruda de una planta medicinal.

2.7.1 Determinación de materia extraña (MGA-FG 0030)

Este método fue diseñado para determinar la cantidad de contaminantes, ya sea, cualquier organismo, parte o producto del mismo, diferentes a los nombrados en la definición y en la descripción de la droga vegetal. Es una determinación primordial para elaboración de la monografía de una planta medicinal ya que, para su procesamiento, es importante constatar que una planta no contenga material extraño que pueda ser dañino para su consumo. El límite de materia extraña es específico para cada material vegetal.

2.7.2 Cenizas totales (MGA-FH 0060)

Este método está diseñado para medir la cantidad de material que queda después de la ignición de un material vegetal. Esto incluye tanto a las cenizas fisiológicas que proceden del tejido mismo de las plantas, como a las cenizas no fisiológicas



que son el residuo de la materia extraña (arena y tierra) adherida a las partes aéreas de la planta y componentes inorgánicos de la misma.

2.7.3 Material extraíble (MGA-FH 0070)

Este método determina la cantidad de constituyentes extraídos con disolventes a partir de una cantidad dada de material de planta medicinal.

2.7.4 Pérdida de agua y material volátil (MGA-FH 0080)

Un exceso de agua en materiales de plantas medicinales fomentará el crecimiento microbiano, la presencia de hongos o insectos y el deterioro seguido de hidrólisis. El límite para el contenido de agua es específico para cada material vegetal.

La determinación de la cantidad de agua y material volátil es especialmente importante para un material vegetal que absorbe fácilmente humedad o que se deteriora rápidamente al propiciar un crecimiento de hongos y el deterioro de la misma planta. El límite de contenido de agua y material volátil es específico para cada material vegetal el cual en el presente trabajo, se determinó para tanto el material vegetal fresco como seco.

2.7.5 Metales pesados (MGA-FH 0160)

La contaminación de material de plantas medicinales con arsénico y metales pesados puede ser atribuida a muchas causas, incluyendo presencia de los mismos en el ambiente y trazas de plaguicidas (FHEUM, 2013). Existen límites permitidos para cada uno de los siguientes: cadmio=0.3 ppm, plomo= 10 ppm, mercurio=0.16 ppm, cobre= 150 ppm y arsénico=10 ppm.



3. JUSTIFICACIÓN

Bouvardia ternifolia (Cav.) (Rubiaceae) es una planta con propiedades terapéuticas dentro de la Medicina Tradicional mexicana, para el tratamiento entre otras, de la diabetes así como antipirético, contra el cansancio, antidisentérico y antiespasmódico. Estudios químicos y farmacológicos de *B. ternifolia* derivarán en la compilación de información técnica y científica necesaria para integrar una monografía útil en el control de calidad de sus eventuales productos herbolarios

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Establecer pruebas de identidad química, de pureza, de composición y preliminares de eficacia terapéutica de la droga cruda de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltld. colectada en el centro de México con el fin de generar parte de la información científica necesaria para estructurar la monografía de la droga cruda.

4.2 Objetivos particulares.

- ❖ **Colecta e identificación botánica del material vegetal (partes aéreas de *B. ternifolia*).**
- ❖ **Determinación de parámetros de identidad:**
 - A. Cromatografía en capa fina.
- ❖ **Determinación de parámetros de pureza:**
 - A. material extraño.
 - B. material extraíble.
 - C. cenizas totales.
 - D. pérdida de agua y material volátil.
 - E. metales pesados.



- ❖ **Determinación de parámetros de eficacia terapéutica preliminares**
 - A. Efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa

- ❖ **Pruebas preliminares de composición.**



5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material

5.1.1 Instrumental de laboratorio

- Matraz bola de 50 mL
- Matraz bola de 5 L
- Pipetas graduadas (1 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL)
- Pipeta volumétrica (2.0 mL y 5.0 mL)
- Matraz volumétrico (1.0 mL, 10.0 y 1.0 L)
- Tubos Falcon de 15 mL
- Mortero con pistilo
- Crisoles
- Cápsulas de porcelana
- Desecador

5.1.2 Disolventes, soluciones y reactivos

- Acetona grado RA
- Acetato de etilo grado RA
- Diclorometano grado RA
- Cloroformo grado RA
- Hexano grado RA
- Metanol grado RA
- Solución reveladora de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ al 1% en H_2SO_4 2N

5.1.3 Equipo utilizado

- Balanza analítica OHAUS Pioneer
- Parrilla de calentamiento
- Baño de ultrasonido marca Sonicor
- Centrífuga marca Labnet modelo HERMLE Z200 A
- Rotaevaporador Büchi RE 111



- Lámpara de luz UV UVMS-38 EL Series 3UV Lamp UVP visualizando a longitudes de onda de 254 y 365 nm
- Mufla

5.2 Material vegetal

Las partes aéreas (tallos, hojas y semillas) de la especie vegetal *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltl. fueron colectadas en Atotonilco el grande, Hidalgo, ubicación geográfica que corresponde a las coordenadas 29°17.594 N, 98°40.339 O coordenadas en UTM. La planta fue determinada botánicamente por el M. en C. R. Ríos-Gómez.

El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente por un mes y parte de él fue fragmentado en una licuadora doméstica.

5.3 Ensayos de pureza

5.3.1 Determinación de materia extraña

En una hoja de papel blanca se colocó una capa delgada de 20 g de hojas, se inspeccionó, se separaron las porciones de material extraño y se calculó el porcentaje de material extraño en el material vegetal.

5.3.2 Cenizas totales

En crisoles previamente puestos a peso constante, se colocaron 2 g de materia prima e incineraron entre 500 - 600 °C durante 4 h en una mufla. Se enfrió en desecador y pesó. Este ensayo se realizó por triplicado.

5.3.3 Material extraíble

En un matraz Erlenmeyer de 50 mL se colocaron 4 g de material vegetal y se agregaron 100 mL del disolvente (etanol ó etanol-agua); se agitó durante 6 h y se dejó reposar 18 h. Se filtró y 25 mL del filtrado se colocaron en una cápsula de porcelana previamente puesta a peso constante. Se evaporó a sequedad en baño de agua. Se secó a 105°C x 6 h, enfrió en desecador y pesó. Este ensayo se realizó por triplicado para cada disolvente.



5.3.4 Contenido de agua y material volátil

Se colocaron 2 g de material vegetal en un crisol de porcelana previamente puesto a peso constante. Se secó en horno a 100 - 105°C. Se secó hasta que dos pesadas consecutivas no difirieron en más de 5 mg. Este ensayo se realizó por triplicado.

5.3.5 Metales pesados

Se tomaron 30 mg de cenizas del ensayo de cenizas totales y se realizó un análisis por Microscopia Electrónica de Barrido.

5.4 Ensayo preliminar de composición

5.4.1 Obtención del material volátil

50 g del material vegetal se sometieron a un proceso de hidrodestilación con 500 mL de agua destilada. El hidrodestilado se sometió a un proceso de extracción por reparto con éter. Se concentró a presión reducida con el rotaevaporador. El aceite esencial obtenido se analizó mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM).

5.4.2 Obtención del extracto de AcOEt

Un kg de material vegetal fue desgrasado con hexano y se extrajo exhaustivamente con AcOEt (3 x 2 L). El extracto resultante fue concentrado a sequedad en un rotaevaporador.

5.4.2.1 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de AcOEt

14 g del extracto de AcOEt se adsorbieron en 80 g de gel de sílice. La muestra se aplicó en una columna abierta de vidrio que contenía 280 g de gel de sílice. La elución se realizó con mezclas de disolventes de polaridad creciente de hexano-AcOEt. Se recolectaron fracciones de 250 mL cada una, reuniendo un total de 105 fracciones primarias. La composición de los eluatos se detectó por medio de cromatografía en capa delgada, en placas de aluminio (3 x 10 cm) recubiertas de



gel de sílice y se agruparon finalmente en 12 fracciones (Tabla 4). Los compuestos se visualizaron con revelador de sulfato cérico amoniacal.

Tabla 4: Elución de columna cromatográfica del extracto de AcOEt

SISTEMA DE ELUCIÓN	FRACCIONES RECOLECTADAS	CLAVE
Hexano(100)	1-4	
Hexano: Acetato de etilo (90:10)	5-6	
Hexano: Acetato de etilo (80:20)	7-10	9(9-11)
Hexano: Acetato de etilo (70:30)	11-15	12(12-17)
Hexano: Acetato de etilo (60:40)	16-20	18(18-23)
Hexano: Acetato de etilo (50:50)	21-25	24(24-29)
Hexano: Acetato de etilo (40:60)	26-29	
Hexano: Acetato de etilo (30:70)	30-42	39(39-45)
Hexano: Acetato de etilo (20:80)	43-52	46(46-48)
Hexano: Acetato de etilo (10:90)	53-58	50(50-59)
Acetato de etilo (100)	59-105	60(60-69) 70(70-79) 80(80-89) 90(90-99) 100(100-105)



5.4.3 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto de AcOEt

5.4.3.1 Aislamiento y purificación del ácido ursólico (compuesto de referencia)

En la fracción F-46 de la columna cromatográfica de gel sílice, precipitó un sólido amarillo, el cual se separó de otros componentes minoritarios por medio de una placa preparativa de gel de sílice. El sólido se identificó por espectroscopía de IR y por RMN-¹H.

5.5 Obtención del extracto de metanol

Un kg de material vegetal fue desgrasado con hexano y se extrajo exhaustivamente con metanol (3 x 2 L). El extracto resultante fue concentrado a sequedad en un rotaevaporador.

5.5.1 Fraccionamiento y aislamiento de la mezcla de Bouvardinas

El extracto de metanol se resuspendió con 500 mL de una mezcla de agua-metanol (95:5), se filtró por gravedad; posteriormente se realizaron repartos con hexano (3 x 500 mL), acetonitrilo (3 x 500 mL), diclorometano (3 x 500 mL); las fracciones se filtraron y evaporaron en rota evaporador y la fracción de CH₂Cl₂ se resuspendió en metanol y se le adicionaron unas gotas de éter isopropílico para precipitar la mezcla de Bouvardinas. El precipitado color café oscuro se analizó por HPLC-EM.

5.6 Aislamiento y purificación del asperulósido

Las aguas madres del precipitado de éter isopropílico fueron tratadas con acetona y precipitó un sólido color naranja. Las aguas madre concentradas fueron sometidas en una columna de gel de sílice empleando el sistema de disolventes que se muestra en la Tabla 5. La composición de los eluatos se detectó por medio de cromatografía en capa delgada, en placas de aluminio (3 x 10 cm) recubiertas de gel de sílice. Los compuestos se visualizaron con revelador de sulfato cérico amoniacal, resultando en 112 fracciones. El análisis de la fracción 12 mostró un



compuesto mayoritario el cual se purificó a través de una columna de sephadex empleando metanol como eluyente; el compuesto se aisló de las fracciones 4-5 de la columna y fue analizado por RMN-¹H y de ¹³-C uni y bi-dimensionales.

Tabla 5. Elución de columna cromatográfica de aguas madres

SISTEMA DE ELUCION	FRACCIONES RECOLECTADAS	CLAVE
Hexano (100)	1-2	
Hexano: Acetato de etilo (50:50)	3-5	
Acetato de etilo (100)	6-8	
Acetato de etilo: Acetona (50:50)	9-10	
Acetona (100)	11-36	12(12-16) 19(19-24) 25(25-28) 29(29-34)
Acetona: Metanol (90:10)	37-45	37(37-40) 42(42-48)
Acetona: Metanol (80:20)	46-51	49(49-52)
Acetona: Metanol (70:30)	52-54	53(53-54)
Acetona: Metanol (60:40)	55-66	55(55-60) 61(61-64)
Acetona: Metanol (50:50)	67-77	65(65-68) 69(69-72)
Acetona: Metanol (40:60)	78-83	74(74-88)
Acetona: Metanol (30:70)	84-90	
Acetona: Metanol (20:80)	91-95	89(89-112)
Metanol (100)	95-112	



5.7 Determinación de parámetros de eficacia terapéutica preliminares

5.7.1 Determinación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa

La evaluación de la actividad inhibitoria de las fracciones y de los compuestos aislados sobre la enzima α -glucosidasa se realizó utilizando la metodología descrita por Rangel en 2015.

Preparación de la solución stock de la enzima: se resuspendió 1 mg de liofilizado de la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae* en 500 μ L de solución amortiguadora de fosfatos ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 100 mM, pH=7) y se dejó rehidratar por 4 horas. Posteriormente, se realizó una dilución para obtener una concentración final de 1 U/mL.

Preparación de la solución de p -nitrofenol- α -D-glucopiránosido: se pesaron 3 mg de p -nitrofenol- α -D-glucopiránosido y se disolvieron en 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, para obtener una concentración de 5 mM.

Todas las evaluaciones se realizaron en placas de Elisa de 96 pozos (250 μ L de capacidad), y se leyeron las absorbancias utilizando un lector de placas marca BioRad® modelo iMark a 415 nm.

Cada extracto, fracción o compuesto aislado se evaluó como inhibidor de la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae* preparando soluciones stock de cada muestra a concentraciones de 10000 ppm para los extractos y/o fracciones y de 30 mM para compuestos puros.

Posteriormente, se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para cada muestra. Para esto, se evaluaron cinco diferentes concentraciones de cada inhibidor que estuvieran en el intervalo del 10 al 100% de inhibición.

Procedimiento: se colocan en cada pozo de una placa de Elisa, 20 μ L de la solución de la enzima y el volumen de inhibidor correspondiente a la concentración a evaluar y se completa el volumen a 90 μ L con amortiguador de fosfatos (100 mM, pH=7). Posteriormente, la placa se incubó durante 10 min a 37°C y seguidamente se adicionaron a cada pozo 10 μ L del sustrato p -nitrofenol- α -D-glucopiránosido (p -NPG; 5 mM); se determinaron las absorbancias de las muestras a tiempo cero (T_0). Después, se incubó por segunda vez la placa a 37°C



durante 20 minutos para obtener la lectura a T_{20} . El ensayo se basa en la cuantificación de la cantidad de p -nitrofenol liberado al medio, el cual es directamente proporcional a la cantidad de sustrato hidrolizado por la enzima. Como control positivo se utilizó acarbosa partiendo de una solución stock $30 \mu\text{M}$, disuelta en solución amortiguadora de fosfatos (9.7 mg de acarbosa en $500 \mu\text{L}$ de solución amortiguadora de fosfatos).

Los resultados representan el promedio de tres réplicas. El porcentaje de inhibición de las muestras se determinó utilizando la siguiente expresión matemática:

$$\left(1 - \frac{A_{T20} - A_{T0}}{A_{BT20} - A_{BT0}}\right) 100 = \% \text{ de inhibición}$$

Donde:

A_{T20} es la absorbancia de la muestra registrada a los 20 minutos de reacción;

A_{T0} es la absorbancia de la muestra registrada al tiempo cero de reacción;

A_{BT20} es la absorbancia del blanco registrada a los 20 minutos de reacción y

A_{BT0} es la absorbancia del blanco registrada al tiempo cero de reacción.

Los valores de CI_{50} (concentración requerida para inhibir en un 50% la actividad de la enzima) se calcularon a partir del ajuste de las curvas obtenidas al graficar el porcentaje de inhibición contra la concentración, utilizando un análisis de regresión no lineal con la ecuación de Hill en el programa Origin 8.0.



6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Ensayos de pureza.

Los siguientes ensayos establecen valores preliminares para algunas pruebas de pureza. No obstante es necesario realizar el análisis con un mayor número de muestras (provenientes de diferentes colectas) que permitan establecer límites estrechos para cada parámetro de calidad.

6.1.1 Determinación de materia extraña

Se obtuvo un 3.18% de materia extraña que consistió solamente en trazas de tierra.

6.1.2 Cenizas totales

Se obtuvo un valor de 0.5%. (Tabla 6)

Tabla 6. Porcentaje de cenizas totales

Muestra	% Cenizas totales
1	0.4141
2	0.4748
3	0.6205
Promedio	0.50313333
DE	0.10607697
CV	0.21083272

6.1.3 Material extraíble

Se obtuvo 0.19 y 0.09% con etanol absoluto y con mezcla etanol-agua (70:30%), lo que indica que la planta contiene una mayor cantidad de compuestos medianamente polares (Tabla 7).



Tabla 7. Porcentaje de material extraíble

Muestra	% Material extraíble con etanol	% Material extraíble con etanol- agua
1	0.198	0.0893
2	0.186	0.0835
3	0.186	0.08996
Promedio	0.19	0.08758667
DE	0.0069282	0.00355451
CV	0.03646423	0.04058276

6.1.4 Contenido de agua y material volátil

Se analizaron muestras fresca y seca de planta obteniéndose valores de 79.8 y 6.7% respectivamente, lo cual indica un alto contenido de humedad en la muestra fresca (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de agua y material volátil

Muestra	% agua y material volátil (muestra fresca)	% agua y material volátil muestra (previamente seca a 25°C)
1	79.6076	6.9197
2	70.5533	6.5749
3	79.969	6.5146
Promedio	79.7883	6.6697
DE	0.25554839	0.21856698
CV	0.00320283	0.03276997



6.1.5 Metales pesados

No se detectaron metales pesados indeseables (Pb, Cd, Hg As), lo que determina que la planta no se encuentra en un entorno que contenga dichos metales. (Figura 10)

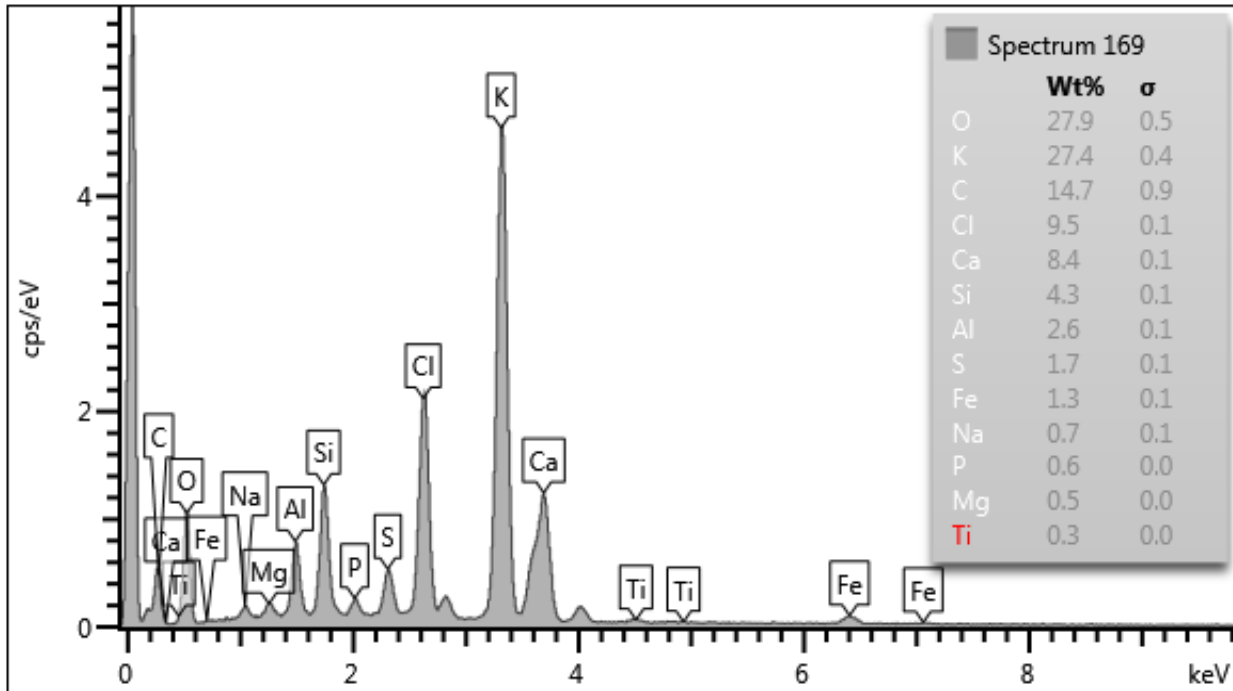


Figura 10. Determinación de elementos inorgánicos presentes en *B. ternifolia*

6.2 Ensayo de composición

6.2.1 Obtención del material volátil

Se realizó un análisis mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) en el cual se observaron escasos componentes en el aceite esencial de la planta, en su mayoría de naturaleza terpenoide (Tabla 9), siendo mayoritario en las muestras fresca y seca el (*Z*)-3-hexen-1-ol en primera instancia y el linalool en segunda.



ISABEL AGUILAR

, 14-may-2019 + 12:19:55

BTXFRX30-2

Scan E1+
TIC
1.84e9

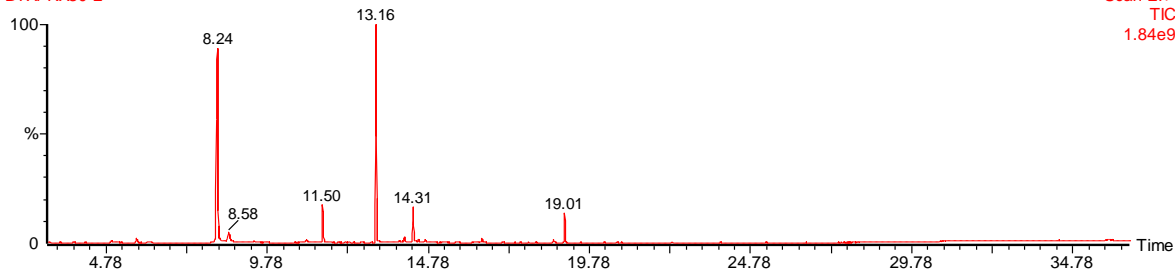


Figura 11. Cromatograma de gases de la fracción fresca

ISABEL AGUILAR

, 14-may-2019 + 11:32:52

BTX1X30-1

Scan E1+
TIC
1.37e9

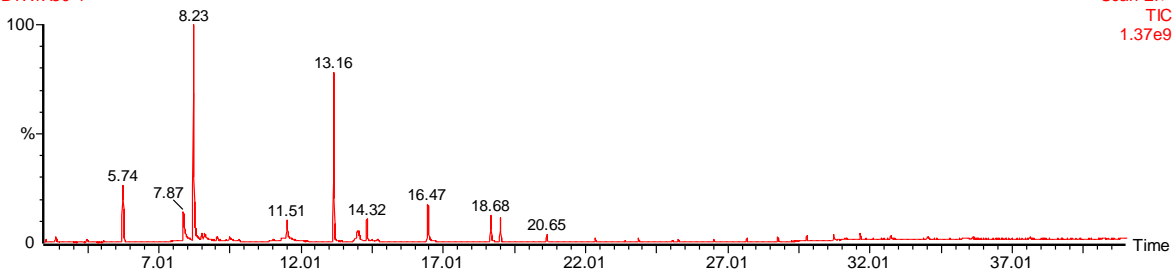
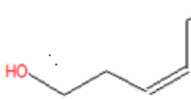
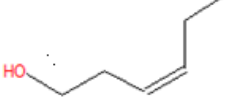
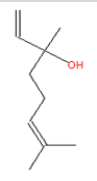
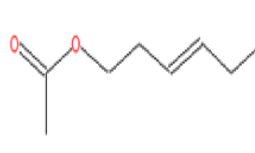
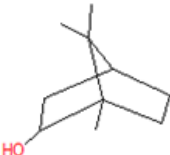
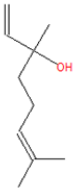
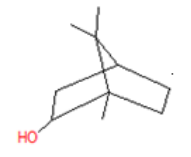


Figura 12. Cromatograma de gases de la fracción seca

Tabla 9. Componentes volátiles de *B. ternifolia*

# de compuesto	Muestra seca					Muestra fresca				
	Nombre	Similitud	PM	Tiempo de retención	Molécula	Nombre	Similitud	PM	Tiempo de retención	Molécula
1	(Z)-3-hexen-1-ol	943	100	8.228		(Z)-3-hexen-1-ol	947	100	8.228	
2	Linalool	960	154	13.157		acetato de (E)-3-hexen-1-ol	932	142	11.499	
3	Endo-Borneol	921	154	14.320		Linalool	938	154	13.157	
4						Endo-Borneol	934	154	14.305	



6.2.2 Obtención del compuesto de referencia (ácido ursólico)

El compuesto mayoritario del extracto de AcOEt fue identificado como el ácido ursólico (1) (Figura 13) por el análisis de RMN-¹H, espectroscopía de IR y comparación con datos de la literatura (Seebacher, 2003) como se describe a continuación.

El espectro en el IR (Figura 14) muestra una banda en 3419 cm⁻¹ que corresponde a grupos hidroxilo. En 2926 y 2871 cm⁻¹ aparecen bandas muy intensas que dan evidencia de gran cantidad de grupos carbono-hidrógeno alifáticos; en 1687 cm⁻¹ la señal intensa corresponde a un grupo carboxilo de ácido, correlacionando con la señal ancha de 2300 a 2600 cm⁻¹ del grupo hidroxilo del ácido. El espectro de RMN-¹³C (Figura 16) muestra 30 señales las cuales muestran la presencia de un doble enlace en δ_c 122.7 y 143.6 (C-13 y 12), de un grupo carboxilo en δ_c 183.0, de un carbono base de oxígeno (C-3) en δ_H 79.1 y 26 señales alifáticas de δ_c 15.4 a 55.2. En el espectro de RMN ¹H (Figura 15) se observan 8 señales singulete, características de triterpenos, en δ_H 0.686, 0.705, 0.834, 0.845, 0.859, 0.917, 1.064 y 1.184. Es muy probable que dos señales estén sobrelapadas, pues para el ácido ursólico se espera observar dos pares de dobletes en δ_H 0.93 y 1.06. En δ_H 3.14 se observa un doble de dobles asignado a H-3 y en δ_H 5.21 un singulete ancho asignado al hidrógeno vinílico H-12; en δ_H 2.75 una señal doble de dobles asignada al hidrógeno alílico H-18; en δ_H 2.12 un triplete asignado a los hidrógenos del metileno H-16. La presencia de este compuesto ha sido reportada con anterioridad en *B. ternifolia* (García-Morales, 2015). La identidad del compuesto se confirmó por la comparación de sus señales en RMN-¹H con las reportadas en la literatura (Seebacher, 2003).

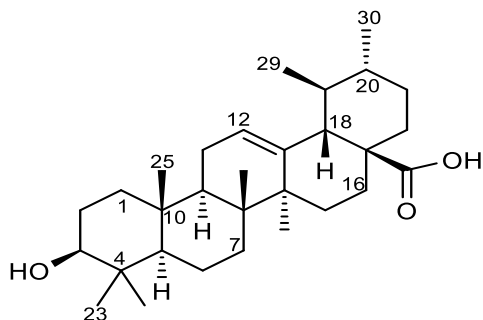


Figura 13. Estructura del ácido ursólico (1)



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

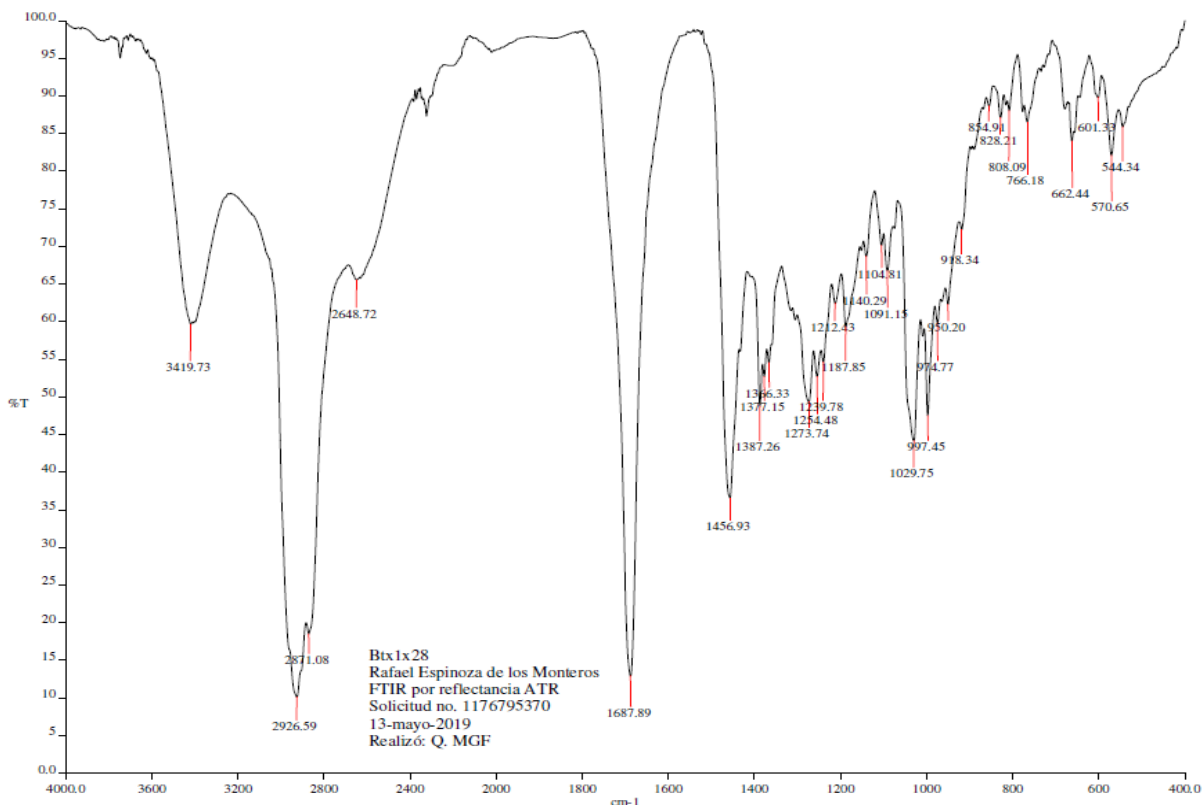


Figura 14. Espectro de IR del ácido ursólico

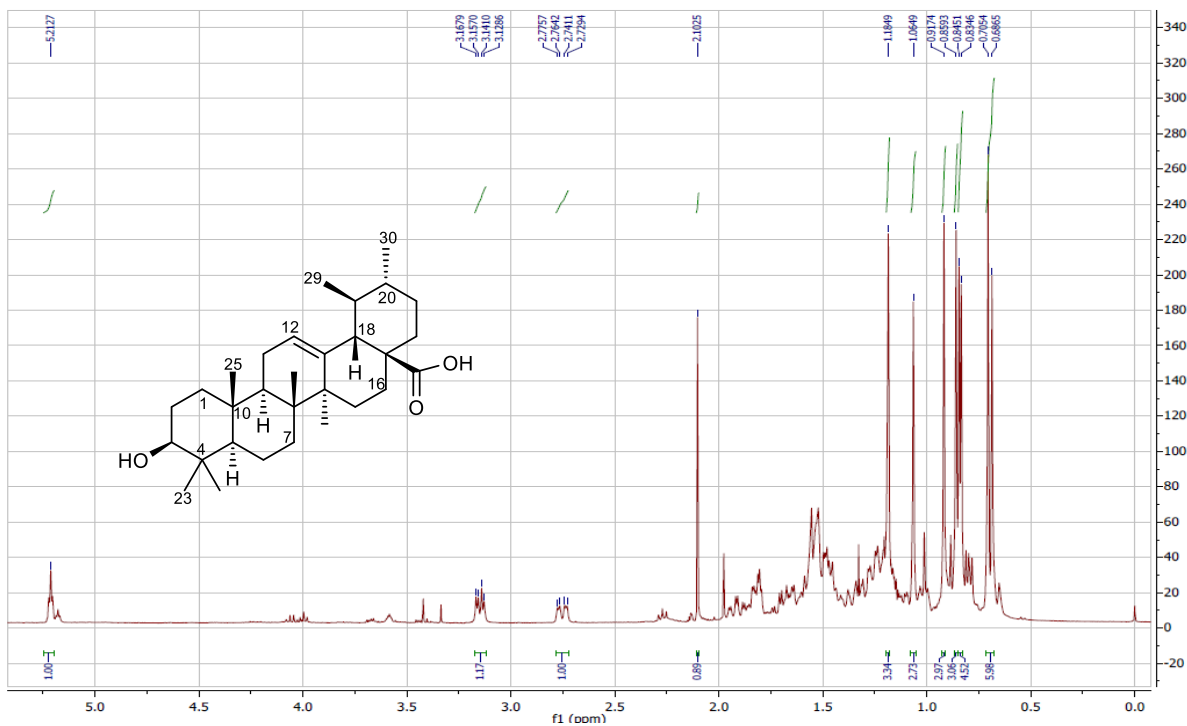


Figura 15. Espectro de RMN ¹H del ácido ursólico (400 MHz, CDCl₃).

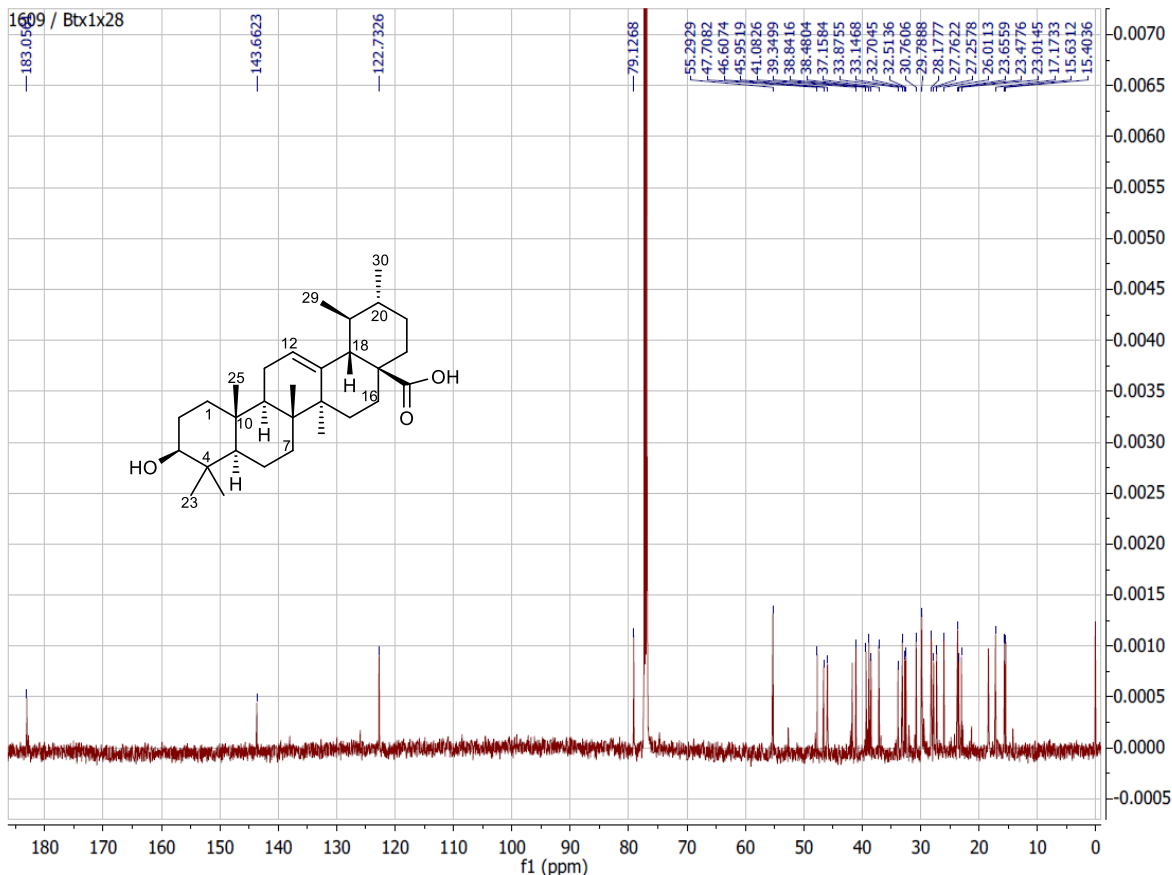


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C del ácido ursólico (100 MHz, CDCl_3).

El ácido ursólico siendo mayoritariamente obtenido del extracto de diclorometano se considera el compuesto de referencia para futuras determinaciones analíticas y de identidad cromatográfica.

6.3 Aislamiento de la mezcla de bouvardinas

De la fracción de CH_2Cl_2 obtenida por reparto del extracto de metanol precipitó un sólido con éter isopropílico el cual al ser analizado por HPLC-EM (Figuras 17 y Tabla 10) mostró una serie de componentes. El compuesto con tiempo de retención (t. r.) de 19.7 min mostró en el espectro de masas un ión molecular de 771 [M^+-1], el compuesto con t. r. 20.5 min con un ión molecular de 755 [M^+-1] y el compuesto con t. r. 21.4 min con un ión molecular de 785 [M^+-1]. Estos datos concuerdan con pesos moleculares esperados para los hexapéptidos bouvardina (2), la desoxibouvardina (3) y la 6-O-metilbouvardina (Figura 18). Estos



compuestos de tipo hexa péptido han sido aislados anteriormente de *B. ternifolia* (Jolad et al., 1977; Zalacain et al., Bates et al., 1983) y están implicados en la inhibición de la síntesis de proteínas, lo cual está asociado a su actividad antitumoral. En este trabajo, la mezcla de bouvardinas se analizó en el ensayo de inhibición de α -glucosidasas.

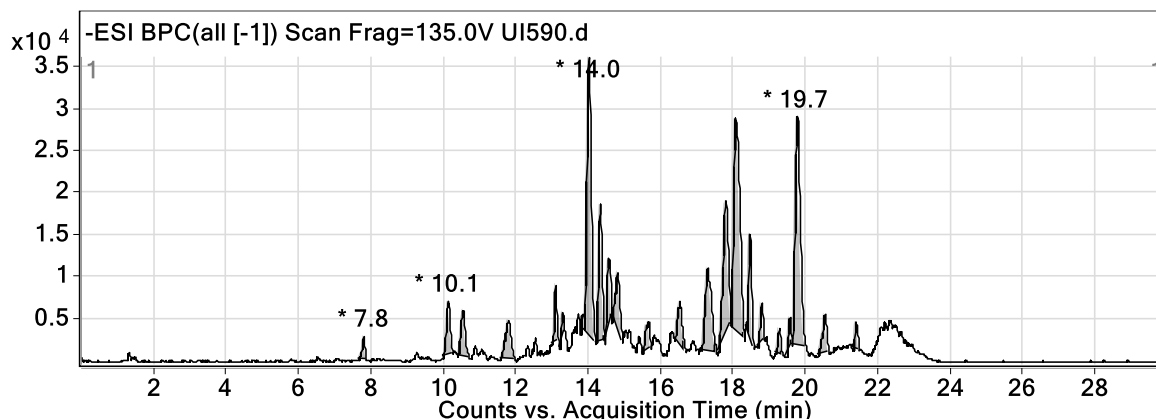


Figura 17. Cromatograma de líquidos de la mezcla de bouvardinas.

Tabla 10. Datos de HPLC del precipitado de éter isopropílico

Integration Peak List							
Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %	
1	7.6	7.8	7.9	2759	15722	5.33	
2	10	10.1	10.2	6485	47834	16.2	
3	10.4	10.5	10.7	5619	47968	16.25	
4	11.6	11.8	12	4668	51251	17.36	
5	13	13.1	13.1	6911	31564	10.69	
6	13.2	13.3	13.3	3248	14695	4.98	
7	13.9	14	14.2	32981	274894	93.12	
8	14.2	14.3	14.4	16392	113251	38.36	
9	14.4	14.5	14.6	8564	57125	19.35	
10	14.7	14.8	14.9	6542	50666	17.16	
11	15.5	15.6	15.7	3340	28287	9.58	
12	16.4	16.5	16.6	5020	42215	14.3	
13	17.1	17.3	17.5	10033	119027	40.32	
14	17.6	17.8	17.9	16064	163085	55.25	
15	17.9	18	18.3	25154	295198	100	
16	18.4	18.4	18.5	12185	64043	21.69	
17	18.7	18.8	18.8	4842	26673	9.04	
18	19.2	19.3	19.3	3073	15928	5.4	
19	19.4	19.5	19.6	3779	20023	6.78	
20	19.6	19.7	20	27285	256690	86.96	Bouvardina (2)
21	20.3	20.5	20.6	4732	37962	12.86	Desoxibouvardina (3)
22	21.3	21.4	21.5	3216	16386	5.55	6-O-Metilbouvardina (4)

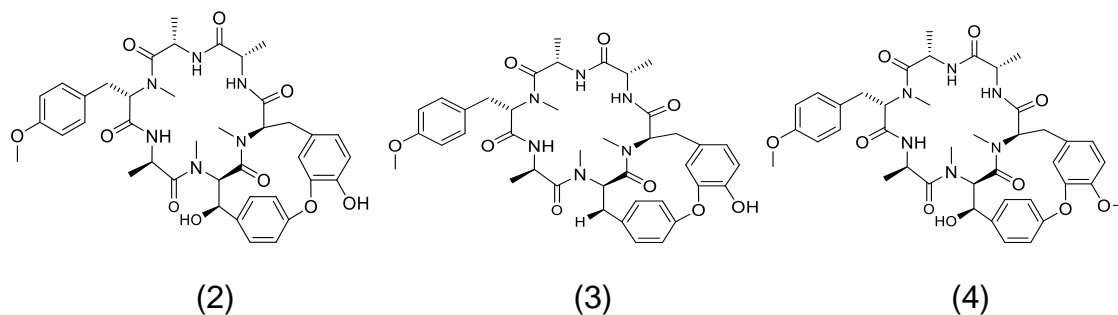


Figura 18. Estructuras de los hexapéptidos

6.4 Aislamiento y purificación del asperulósido

El compuesto obtenido en la sección 5.6 (150 mg) de la columna de Sephadex fue analizado por RMN-¹H y de ¹³C (Figuras 20 y 21), e identificado como el iridoide asperulósido (Figura 19).

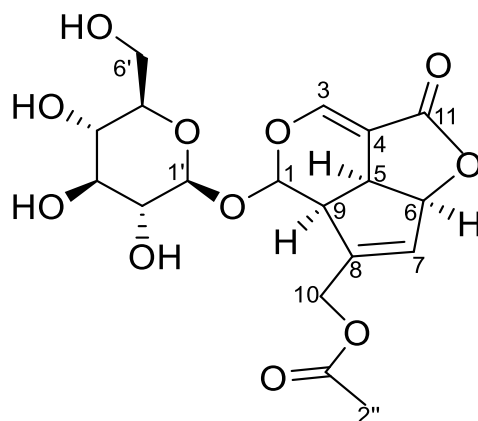


Figura 19. Estructura del asperulósido (5)

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y ¹³C del asperulósido.

Posición	Literatura*		Experimental**	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	5.75 (d, <i>J</i> 2.2 Hz)	99.1	5.99 (1H, <i>J</i> 1.5 Hz)	93.3
2				
3	7.37 (d, <i>J</i> 2.2 Hz)	150.1	7.30 (d, <i>J</i> 2.2 Hz)	150.3
4		105.2		106.1
5	3.60-3.10 (m)	36.4	3.68 (d, <i>J</i> 6.4 Hz)	37.4
6	5.68 (br d, <i>J</i> 7 Hz)	86.5	5.57 (d, <i>J</i> 6.7 Hz)	86.4
7	5.90 (br s)	128.5	5.73 (s)	128.9
8		142.9		144.2
9	3.60-3.10 (m)	44.1	3.38 (m)	45.2
10	4.85 (br s)	61.5	4.76 (1H, c, <i>J</i> 1.2 Hz H-10 _a); 4.68 (1H, c, <i>J</i> 1.2 Hz H-10 _b)	61.9
11		173.5		172.7
1'	4.70 (d, <i>J</i> 9.0 Hz)	93.3	4.72 (d, <i>J</i> 7.8 Hz)	100.0
2'	4.20-3.15 (m)	76.9	3.20 (1H, dd, <i>J</i> 7.9, 7.9 Hz)	74.6
3'	4.20-3.15 (m)	76.3	3.30 (m)	77.9
4'	4.20-3.15 (m)	70.2	3.28 (m)	71.6
5'	4.20-3.15 (m)	76.3	3.4 (m)	78.4
6'	3.90-3.68 (m)	61.5	3.95 (1H, dd, <i>J</i> 13.0, 2.2 Hz, H6' _b), 3.68 (m)	62.8
1'' (CO, AcO-)		173.7		172.4
2'' (CH ₃ , AcO)	2.10 (s)		2.07 (s)	20.6

*Experimento en D₂O 400 MHz** Experimento en CD₃OD 400MHz



Las características espectroscópicas del compuesto **5** son las siguientes: El espectro de RMN-¹³C (Figura 20) presentó 18 señales de las cuales, dos correspondieron a grupos carbonilo de éster, cuatro carbonos con hibridación sp², dos hidrogenados y dos cuaternarios; también se observaron 12 señales de carbonos alifáticos, nueve base de oxígeno, dos de tipo alílico y un metilo de acetilo. Entre 90 y 100 ppm se observaron dos señales de carbonos acetálicos. Considerando la presencia de siete carbonos base de oxígeno, se identificaron seis como parte de un azúcar y el resto, descontando el grupo acetilo, suman 10 carbonos dando evidencia de la presencia de un monoterpenoide.

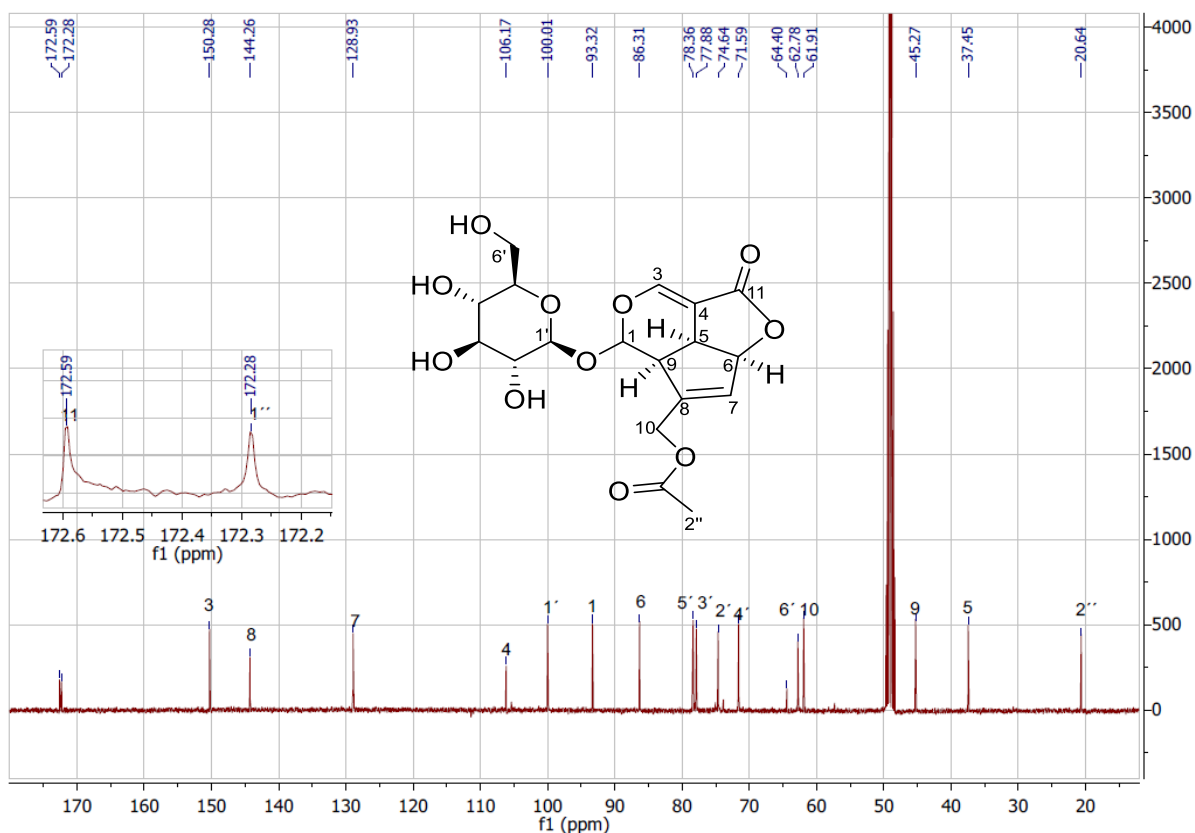


Figura 20. Espectro de RMN ¹³C del asperulósido (100 MHz, CD₃OD)

El espectro de RMN-¹H (Figura 21) muestra numerosas señales entre 3.2 y 4.8 ppm corroborando la presencia de hidrógenos en carbonos base de oxígeno. En esta misma región es evidente un doblete de un protón de tipo anomérico (*J*: 7.8 Hz). También se aprecian cuatro señales, una de ellas muy desplazada a campo



bajo en la región entre 5.6 y 7.3 ppm y por último, en 2.0 ppm se observó una señal singlete intensa de un metilo de acetilo.

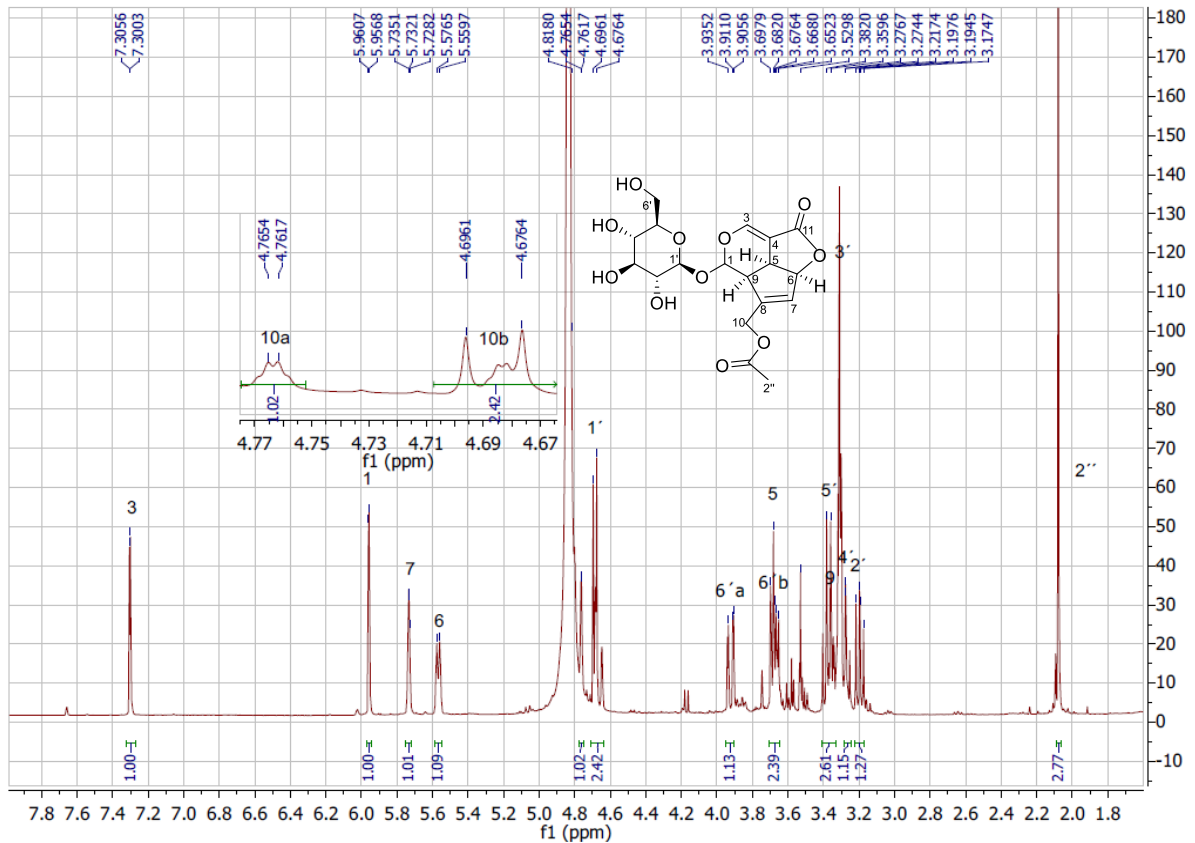


Figura 21. Espectro de RMN ¹H del asperulósido (400 MHz, CD₃OD)

El análisis del espectro modalidad COSY (Figura 22) mostró interacciones vecinales entre diversos hidrógenos de la molécula, siendo evidentes las de un azúcar en la molécula entre 3.2 y 4.8 ppm.

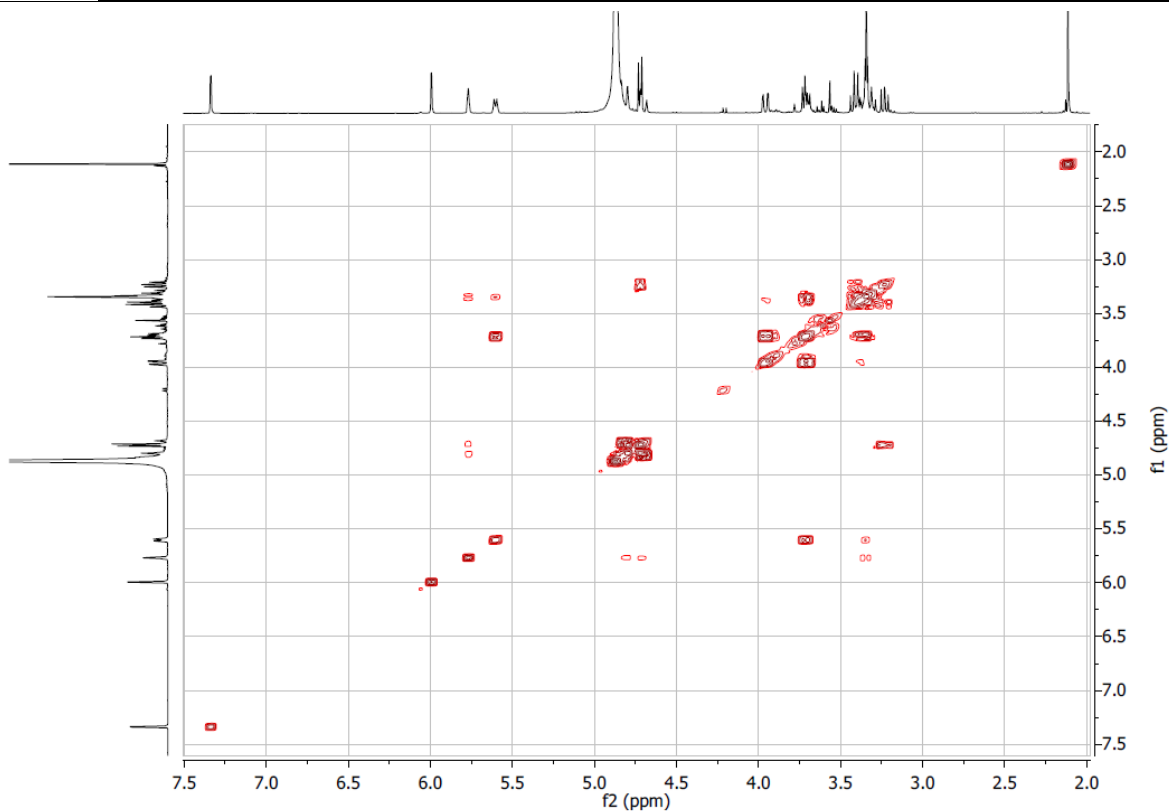


Figura 22. Espectro bidimensional COSY del asperulósido (400 MHz, CD₃OD)

El espectro HSQC (Figura 23) permitió la asignación de los hidrógenos correspondientes a cada carbono en la molécula, mostrando la presencia de un grupo metilo, once metinos, dos grupos metileno (uno perteneciente al azúcar y otro a la aglicona) y dos grupos carbonilo

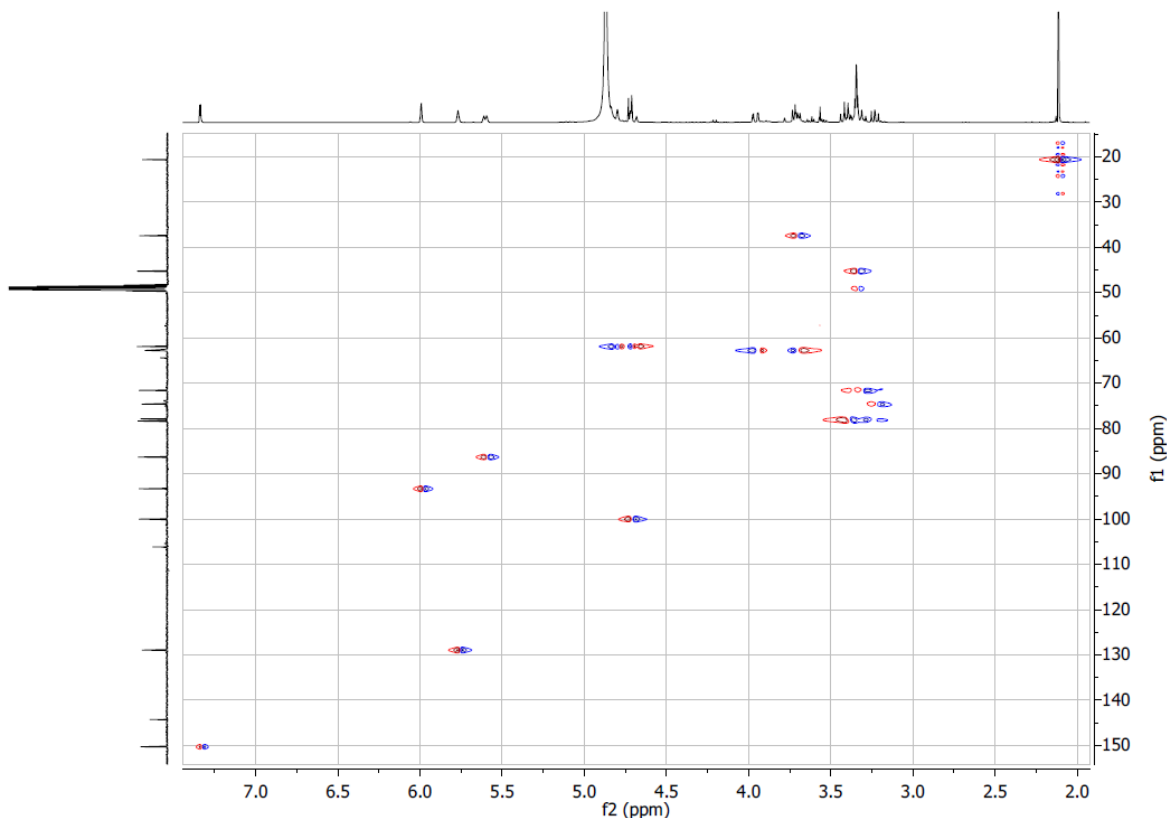


Figura 23. Espectro bidimensional HSQC del asperulósido (CD_3OD)

Un dato importante para la elucidación estructural se obtuvo al analizar el espectro HMBC (Figura 25), en donde se encontraron dos correlaciones entre los dos metinos de acetales (Figura 24), por lo que éstos deben compartir un átomo de oxígeno (5.99 y 100 ppm; 4.92 y 93.3 ppm), así, sumando la cantidad de carbonos, hidrógenos y oxígenos de los grupos funcionales identificados, da como resultado una fórmula de $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. Por medio del cálculo del IDH se determinaron 8 insaturaciones en la molécula, las cuales están presentes en la estructura del asperulósido (5).

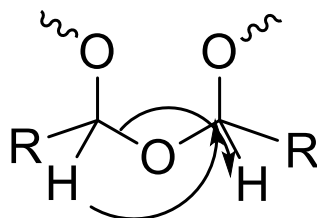


Figura 24. Correlaciones en HMBC de los carbonos 1 y 1'

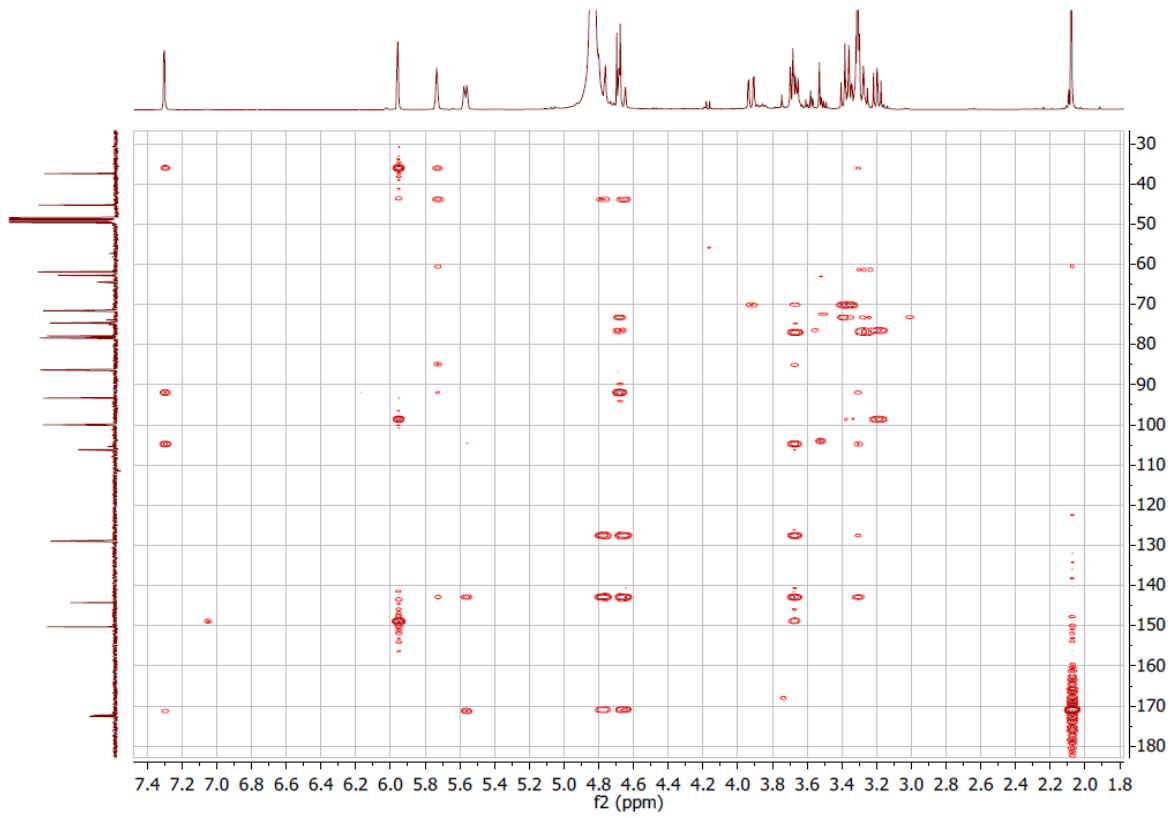


Figura 25. Espectro bidimensional HMBC del asperulósido (CD₃OD)

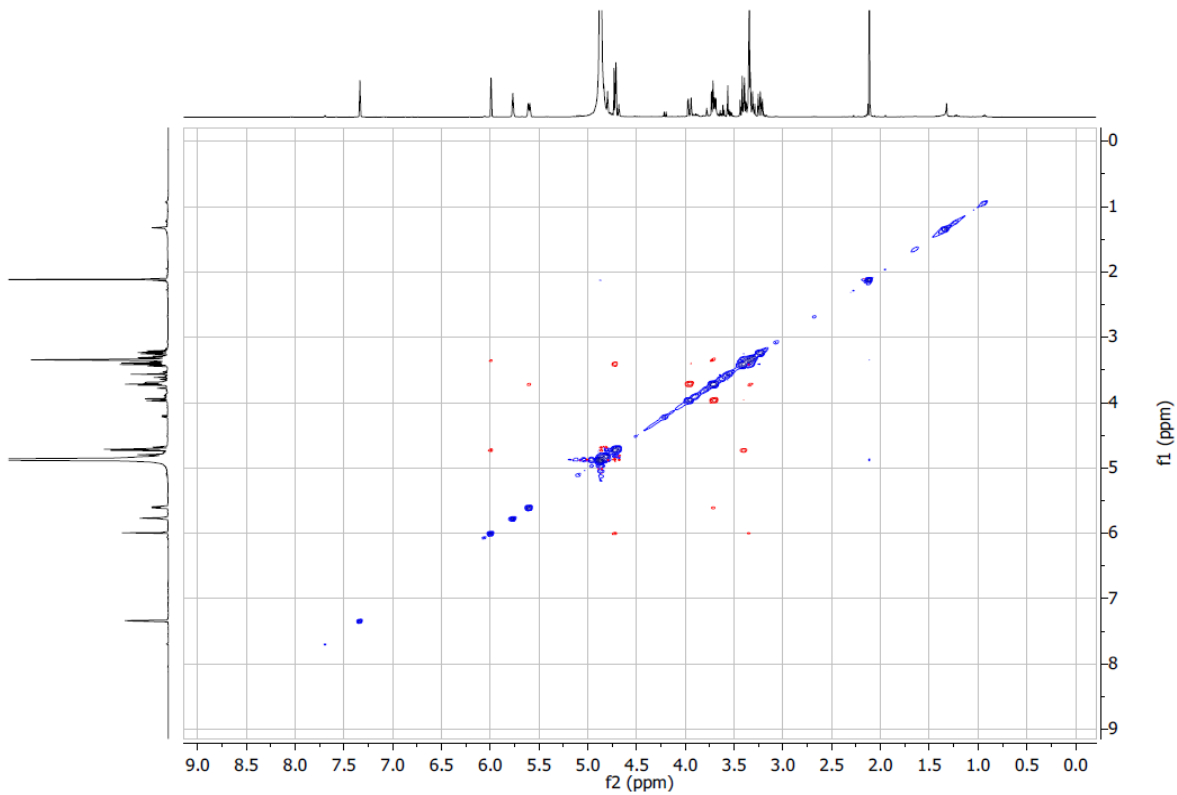


Figura 26. Espectro bidimensional NOESY del asperulósido (400 MHz, CD₃OD)



Así, se asignaron dos señales del espectro de RMN-¹H a hidrógenos vinílicos en carbonos independientes (H-3 y H-7), tres señales de metinos alílicos (H-5, 6 y 9), un metino en un carbono anomérico (H-1') y otro metino acetálico (H-1); un metilo en posición alfa a un carboxilo (H-2'') y metinos y un metileno en carbonos base de oxígeno (azúcar: H-2'-H6') y por último, un metileno alílico y vecino a un éster (H-10).

El espectro modalidad NOESY (Figura 26) muestra algunas correlaciones espaciales entre los hidrógenos H-1 y H-1'; H-1 y H-9; H-6 y H-5 y H-1' y H-5'. En el espectro no se observan correlaciones entre H-6 y H-5 con H-9 ni con H-1, lo que sugiere que esos grupos están espacialmente opuestos. La asignación de la estereoquímica de la molécula está descrita en la literatura (Lev, 2017). Este constituye el segundo reporte de la presencia de este iridoide en la especie *B. ternifolia* (Cruz, 2017).

Este compuesto monoterpenoide está descrito en la literatura (Wu *et al.*, 2013), aunque algunos de los valores de desplazamiento químico en RMN de hidrógeno y de carbono no fueron coincidentes con los valores de este trabajo. Por otra parte, el asperulósido fue identificado en las especies *Psychotria rubra*, *P. serpens*, *P. manillensis*, *P. mariana* y *P. leiocarpia*, todas de la familia Rubiaceae, por lo que se considera compuesto marcador de la misma.

6.5 Determinación de parámetros de eficacia terapéutica preliminares

6.5.1 Determinación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa

Se determinó el efecto inhibitorio de los compuestos mediante un ensayo espectrofotométrico. La reacción se basa en la cuantificación de *p*-nitrofenol generado por la hidrólisis enzimática del α -D-glucopiránosido de *p*-nitrofenol- α -D-glucopiránosido empleado como sustrato, por la enzima α -glucosidasa que no ha sido inhibida por los compuestos de prueba. Así, la actividad inhibitoria de los compuestos de prueba hacia la enzima α -glucosidasa es inversamente



proporcional a la cantidad del *p*-nitrofenol libre generado durante la reacción (Oki et al, 1999)

6.5.1.1 Evaluación del efecto del ácido ursólico sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa

El ácido ursólico aislado a partir del extracto de AcOEt fue evaluado mediante el ensayo del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa, comparando su inhibición con la de la acarbosa (Figura 27). El ácido ursólico mostró una $CI_{50} = 45.11 \pm 1.64 \mu\text{M}$ (Figura 28).

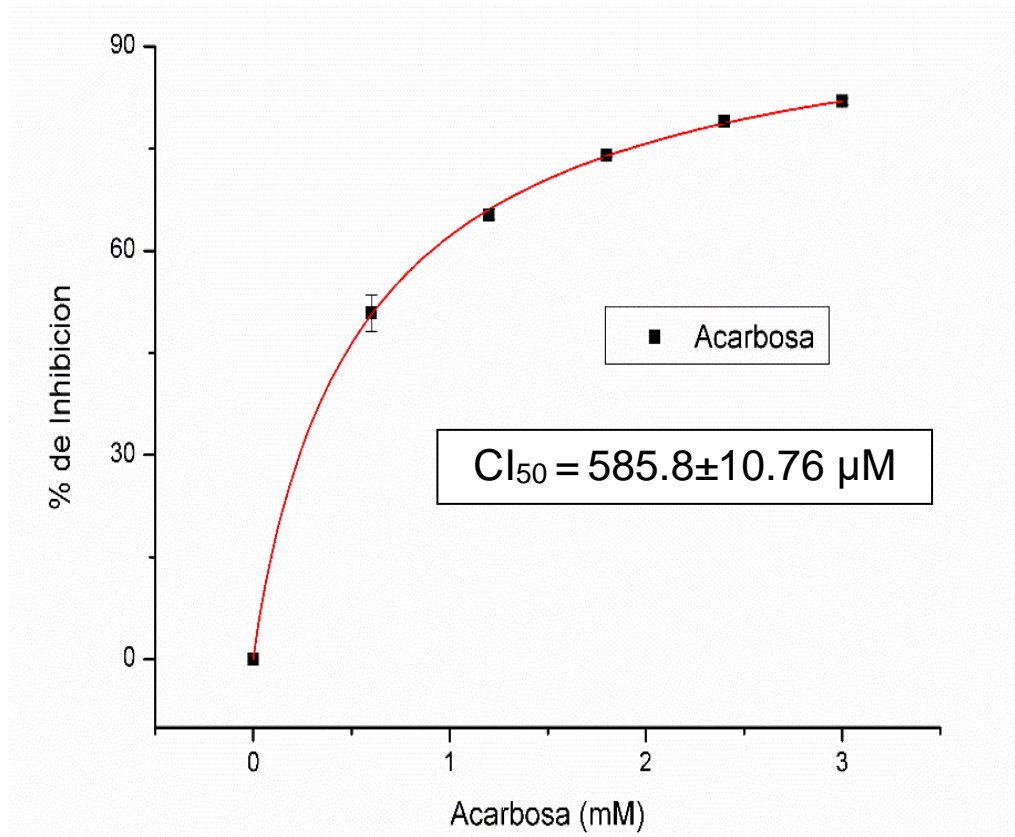


Figura 27. Curva de inhibición enzimática de la acarbosa

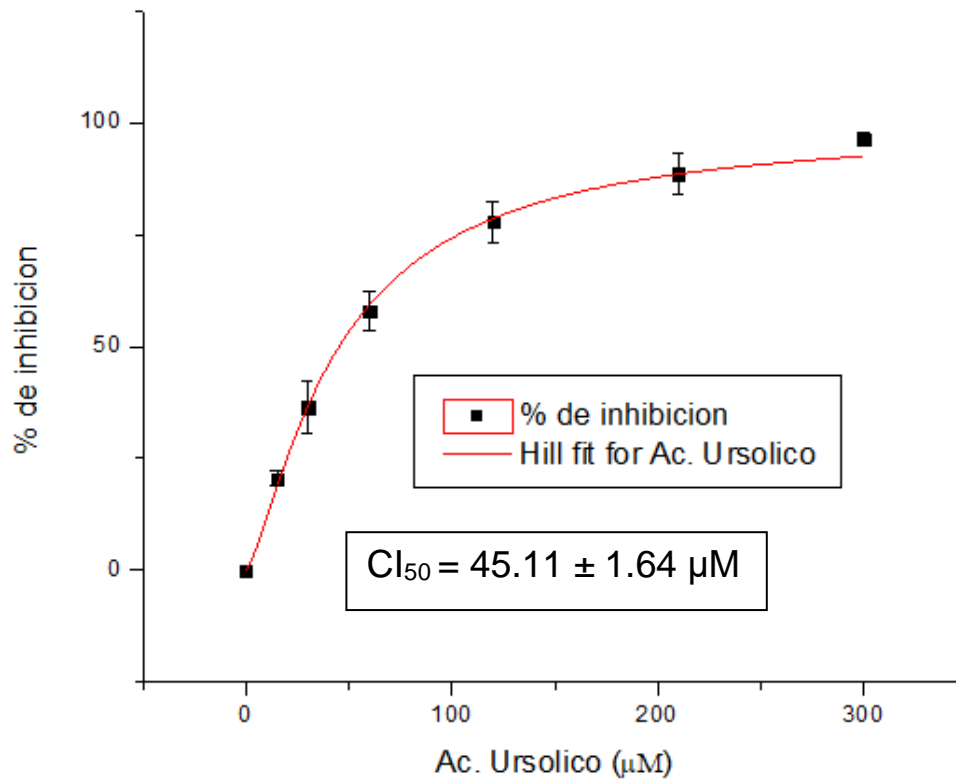


Figura 28. Curva de inhibición enzimática del ácido ursólico

6.5.1.2 Evaluación del efecto de la mezcla de bouvardinas sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa

La mezcla de bouvardinas obtenidas a partir del extracto de metanol fue evaluada mediante el mismo ensayo del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa, comparando su inhibición con la de la acarbosa (Figura 29). La mezcla de bouvardinas mostró una nula actividad inhibitoria hacia la enzima α -glucosidasa.

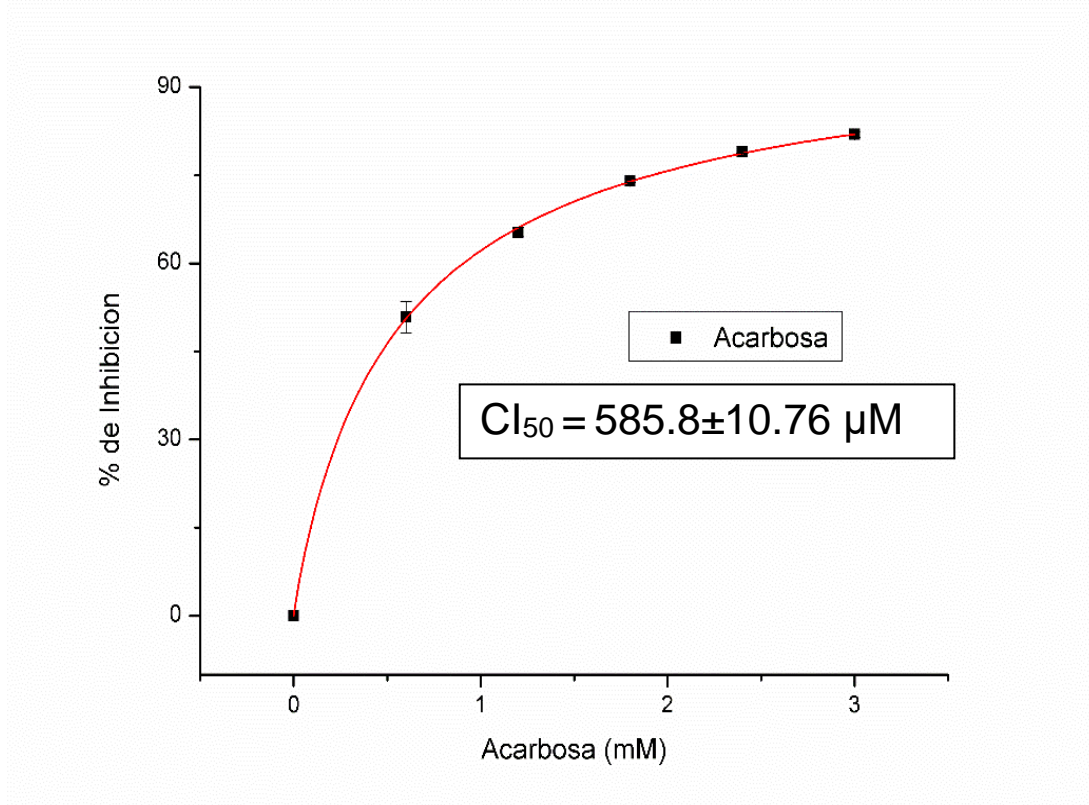


Figura 29. Curva de inhibición enzimática de la acarbosa

6.5.1.3 Evaluación del efecto del asperulósido sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa

El asperulósido obtenido a partir de las aguas madres del precipitado de acetona fue evaluado mediante el mismo ensayo del efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa, comparando su inhibición con la de la acarbosa. El asperulósido mostró una nula actividad inhibitoria hacia la enzima α -glucosidasa.



7. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se llevaron a cabo exitosamente pruebas de identidad, de pureza, de composición y preliminares de actividad biológica sobre la especie vegetal *Bouvardia ternifolia* (trompetilla).
2. De la especie vegetal *B. ternifolia* fue posible aislar e identificar ácido ursólico (1) como componente mayoritario en el extracto de AcOEt. Otros compuestos fueron una mezcla de bouvardina (2), desoxibouvardina (3), 6-O-metilbouvardina (4) y el glucósido iridoide asperulósido (5).
3. De acuerdo a los resultados preliminares de actividad biológica obtenidos se puede decir que los triterpenoides son los que podrían influir en la actividad antidiabética de los extractos de la planta.
4. Los resultados obtenidos serán de utilidad para conformar parte de la monografía de la planta medicinal *B. ternifolia*.

8. PERSPECTIVA

Continuar llevando a cabo pruebas de eficacia terapéutica con compuestos que eventualmente se aislen de la planta medicinal *B. ternifolia*



9. REFERENCIAS

- Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. (2005). *Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes*. Journal of Ethnopharmacology, 99(3), 325–348.
- Aoki, K., Sato, H., Terauchi, Y. (2019). *Usefulness of antidiabetic alpha-glucosidase inhibitors: a review on the timing of administration and effects on gut hormones*. Endocrine Journal, 66(5), 395-401.
- Bates, R. B., Cole, J. R., Hoffmann, J. J., Kriek, R. G., Linz, S. G., Torrance, J. S. (1983). *Solution forms of Bouvardin and relatives from NMR studies. 6-O-methylbouvardin*. Journal of the American Chemical Society. 105(5), 1343-1347.
- Blackwell, W. H. Jr. (1968) Annals of the Missouri Botanical Garden. 55, 1-30.
- *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009) UNAM, México*
- Borges de Melo, E., Silveira, G. A., Carvalho, I. (2006). *α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity*. Tetrahedron, 62(44), 10277-10302.
- CONABIO, 2019, www.naturalista.mx/taxa/147990-Bouvardia-ternifolia
- Checker, R., Sandur, S. K., Sharma, D., Patwardhan, R. S., Jayakumar, S., Kohli, V., Sethi, G., Aggarwal, B. B., Sainis, K. B. (2012) *Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT*. PLoS ONE 7(2): e31318. doi.org/10.1371/journal.pone.0031318.
- Chithambo B., Noundou X. S., Krause, R. W. (2017) *Anti-malarial synergy of secondary metabolites from Morinda lucida Benth*. Journal of Ethnopharmacology, 199, 91-96.
- Cruz Fausto, V. (2017). *Fraccionamiento de la planta Bouvardia ternifolia Schldl en la búsqueda de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM



- Derosa, G., Maffioli, P. (2012). *α-Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice*. Archives of Medical Science, 5, 899-906.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2013). México D.F.: Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
- Fujikawa, T., Hirata, T., Hosoo, S., Nakajima, K., Wada, A., Yurugi, Y., Soya, H., Matsui, T., Yamaguchi, A., Ogata, M., and Nishibe, S. (2012) Asperuloside stimulates metabolic function in rats across several organs under high-fat diet conditions, acting like the major ingredient of *Eucommia ulmoides* Oliver leaves with anti-obesity activity. Journal of Nutritional Science 1, 1-11.
- García-Morales, G., Huerta-Reyes, M., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., Jiménez-Ferrer, E., Silva-García, R., Román-Ramos, R., Aguilar-Rojas, A. (2015). *Anti-inflammatory, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of Bouvardia ternifolia: potential implications in Alzheimer's disease*. Archives of Pharmacal Research, 38(7), 1369-1379.
- Herrera-Ruíz, M., García-Morales, G., Zamilpa, A., González-Cortazar, M., Tortoriello, J., Ventura-Zapata, E., Jiménez-Ferrer, E. (2012). *Inhibition of acetylcholinesterase activity by hidroalcoholic extract and their fractions of Bouvardia ternifolia (Cav.) Schldl (Rubiaceae)*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 11(6), 526-541.
- Israili, H. Z. (2011). *Advances in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus*. American Journal of Therapeutics, 18, 117–152.
- Jiménez-Ferrer, E., Reynosa-Zapata, I. Pérez-Torres, E., Tortoriello, J. (2005). *The secretagogue effect of the poison from Centruroides limpidus limpidus on the pancreas of mice and the antagonistic action of the Bouvardia ternifolia extract*. Phytomedicine, 12(1-2), 65-71.
- Jolad, S. D., Hoffmann, J. J., Torrance, S. J., Wiedhopf, R. M., Cole, J. R., Arora, S. K., Kriek, G. R. (1977). *Bouvardin and deoxybouvardin, antitumor cyclic hexapeptides from Bouvardia ternifolia (Rubiaceae)*. Journal of the American Chemical Society, 99(24), 8040-8044.



- Kalra, S. (2014). *Alpha glucosidase inhibitors*. Journal of Pakistan Medical Association. 64(4), 474-476.
- Lév, H., Trana, P. H., Lea, D. V., Doa, T. H., Nguyen, T. L., Nguyenc, P. T., Nguyene, T. T., and Nguyend, T. D. (2017) Anti-inflammatory constituents from *Psychotria prainii*, Natural Product Research, 695-700
- Lopes S., Poser G. L., Kerber V. A., Farias F. M., Konrath E. L., Moreno P., Sobral M. E., Zuanazzi J. A. S., Henriques A. T. 2004. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). Biochemical Systematics and Ecology. 32, 1187-1195.
- Lu X, Fan Q, Xu L, Li L, Yue Y, Xu Y, et al. (2015) El ácido ursólico atenúa la lesión de células mesangiales diabéticas a través de la regulación positiva de la autofagia a través de la supresión de miRNA-21 / PTEN / Akt / mTOR. PLoS ONE 10 (2): e0117400. doi.org/10.1371/journal.pone.0117400
- Martínez, M. (1989). *Las Plantas Medicinales de México*. 6° ed. Editorial Botas. México. 499.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., Olokoba, L. B. (2012). *Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends*. Oman Medical Journal, 27(4), 269-273.
- Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y. (1999). *Inhibitory Effect of α -Glucosidase Inhibitors Varies According to Its Origin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(2), 550-553.
- Organización Mundial de la Salud, 2019. Accesible en línea: https://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/. Recuperado 14 de Mayo del 2019.
- Peng W., Qiu X.-Q., Shu Z.-H., Liu Q.-C., Hu M.-B., Han T., Rahman K., Qin L.-P., Zheng C.-J., (2015) Hepatoprotective activity of total iridoid glycosides isolated from *Paederia scandens* (our.) Merr.var. tomentosa. Journal of Ethnopharmacology 174,317–321.
- Pérez-Gutiérrez, R. M., Pérez-González, C., Zavala-Sánchez, M. A., Pérez-Gutiérrez, S. (1998). *Actividad hipoglucemiante de Bouvardia terniflora*,



- Brickellia veronicaefolia*, y *Parmentiera edulis*. Salud Pública México, 40, 354-358.
- Qiu J., Chi G., Wu Q., Ren Y., Chen C., Feng H., (2016) Pretreatment with the compound asperuloside decreases acute lung injury via inhibiting MAPK and NF- κ B signaling in a murine model. International Immunopharmacology 31, 109–115.
 - Rangel, G. M. E. (2015). *Inhibidores de α -glucosidasas de la especie fúngica Sporomiella minimoides*. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
 - Reid, M. S. (2004) Bouvardia. Produce Facts. University of California, Davis Postharvest Technology Research & Information Center.
 - Seebacher W., Simic N., Weis R., Sat R., Kunert O. (2003), Complete assignments of RMN- ^1H and RMN- ^{13}C resonances of oleanolic acid, 18α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. Magnetic Resonance in Chemistry, 41, 636-638.
 - Tobey, R., Orlicky, D., Deaven, L., Rall, L. Kissane, R. (1979) Effects of Bouvardin (NSC 259968), a Cyclic Hexapeptide from *Bouvardia ternifolia*, on the Progression Capacity of Cultured Chinese Hamster Cells. Cancer research 38, 4415-21.
 - Wu Z. J., Wang J. H., Fang D. M., Zhang G. L. 2013. Analysis of iridoid, glucosides from *Paederia scandens* using HPLC-ESI-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. Pp 54-64.
 - Zalacaín, M., Zaera, E., Vázquez, D., Jiménez, A. (1982). The mode of action of the antitumor drug bouvardin, an inhibitor of protein synthesis in eukaryotic cells. FEBS Letters, 148(1), 95-97.
 - Zhang, J. H., Xin, H. L., Xu, Y. M., Shen, Y., He, Y. Q., Hsien-Yeh, Lin, B., Song, H. T., Juan-Liu, Yang H. Y., Qin, L. P., Zhang, Q. Y., Du, J. (2018) *Morinda officinalis* How. - A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology J Ethnopharmacol, 213: 230-25.
 - <https://www.meditip.lat/salud-de-la-a-z/diabetes/diferencias-entre-diabetes-tipo-1-y-diabetes-tipo-2/2019>.



- <https://www.naturalista.mx/taxa/147991-Bouvardia> 2019.
- Tropicos.org, Missouri Botanical Garden. Accesible en línea:
<https://www.tropicos.org/>. Recuperado el 18 de Marzo del 2019.

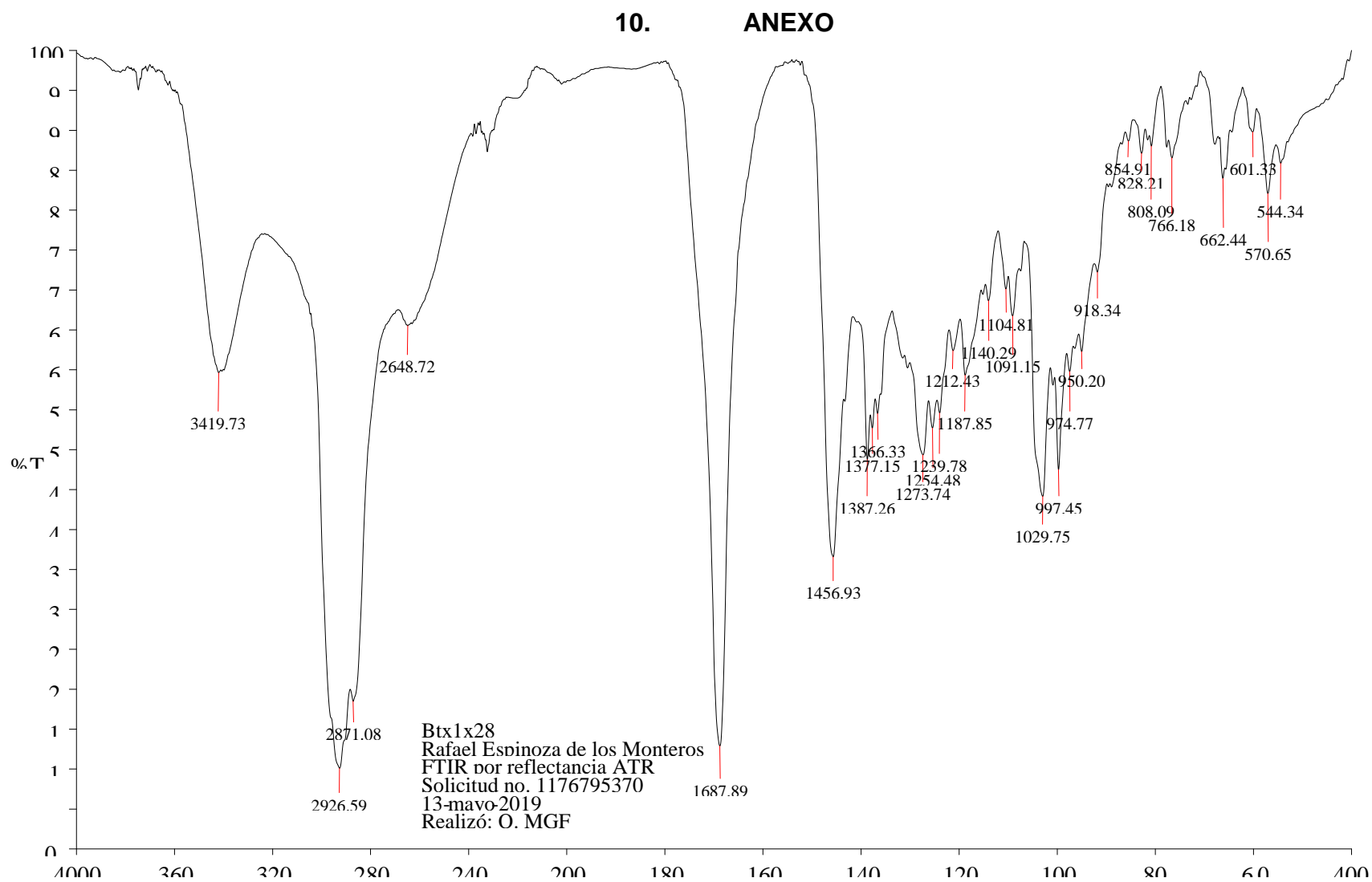
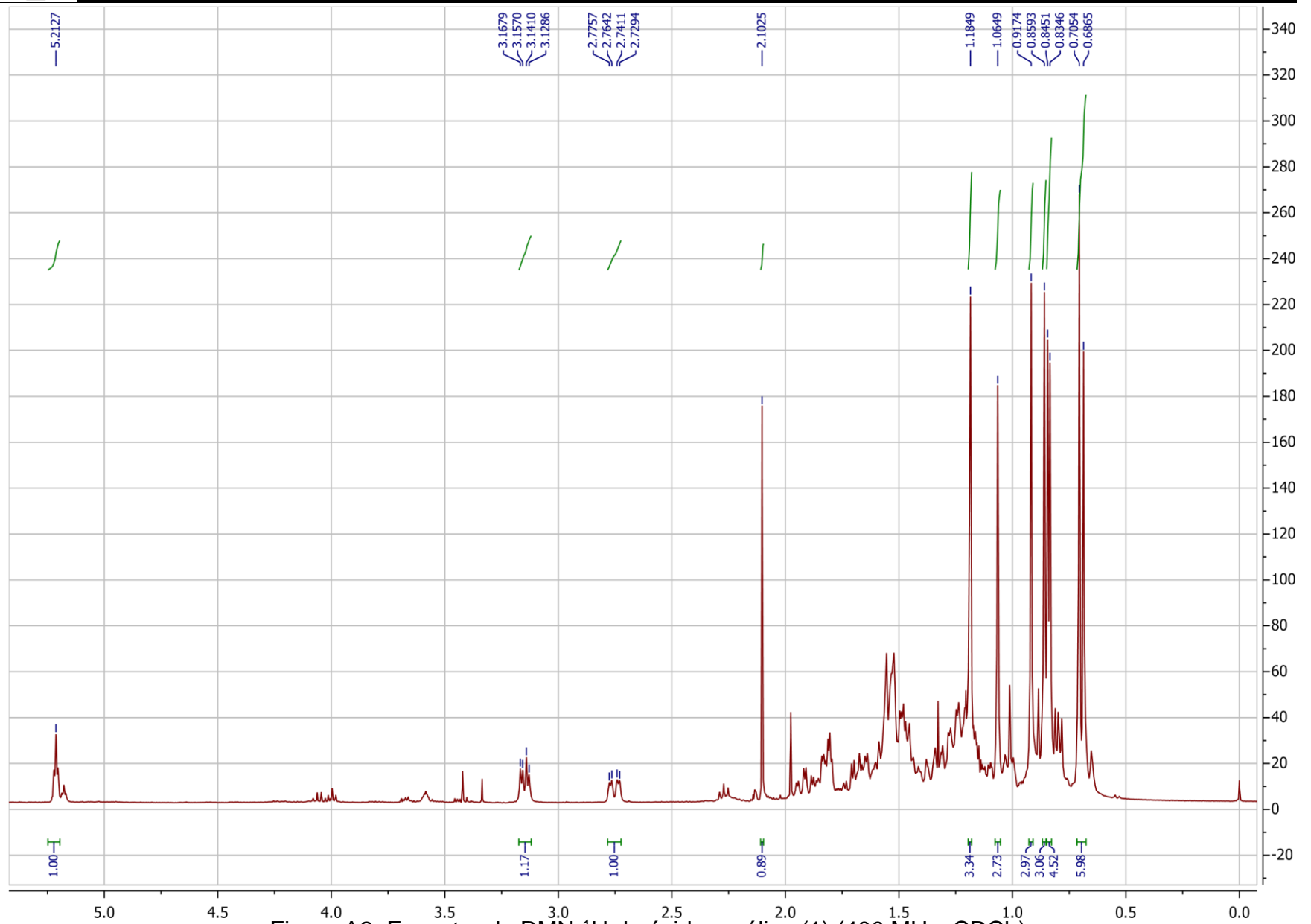


Figura A1. Espectro en el IR del ácido úrsólico (1)

Figura A2. Espectro de RMN- ^1H de ácido ursólico (1) (400 MHz, CDCl_3)

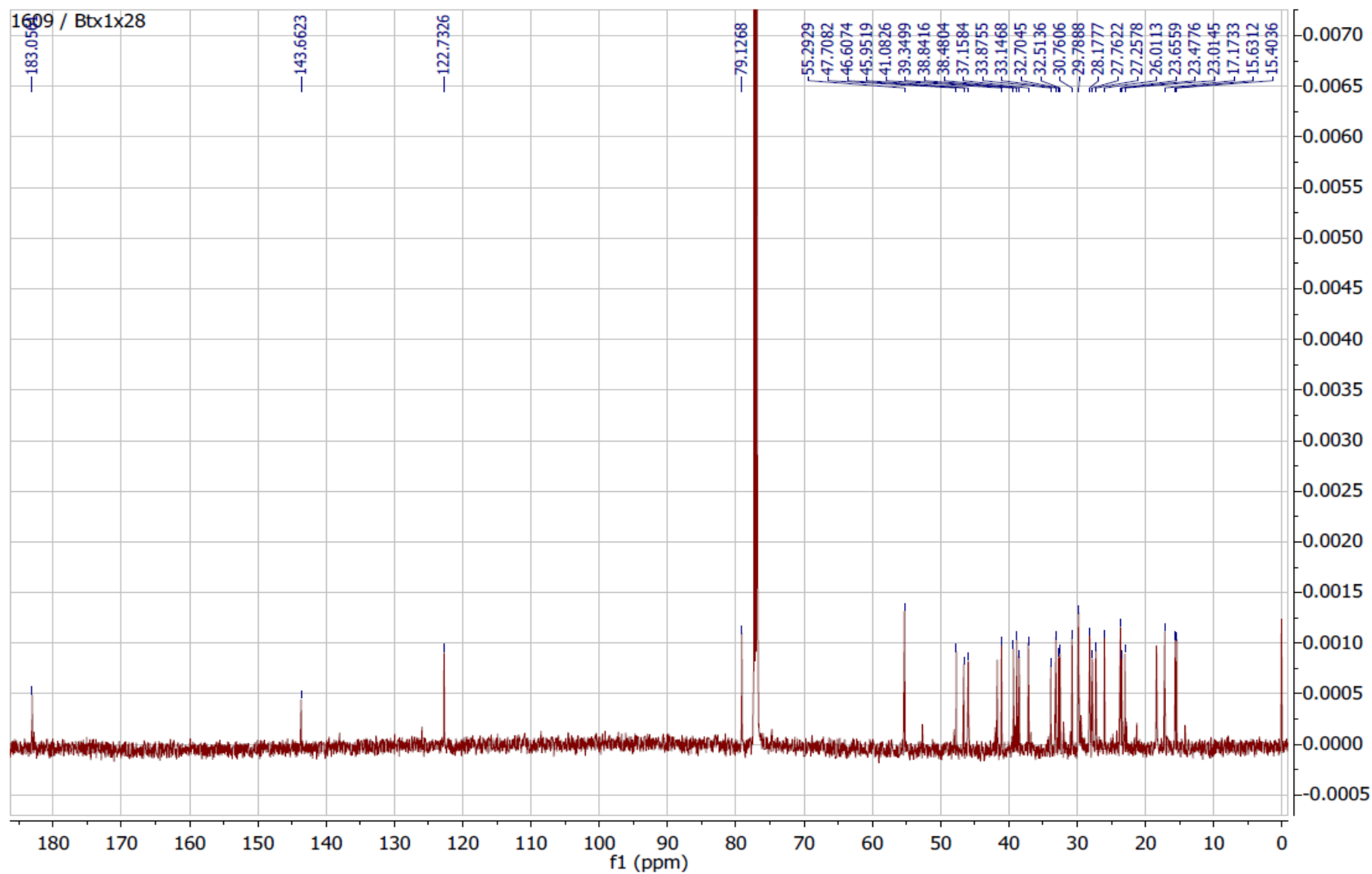


Figura A3. Espectro de RMN-¹³C de ácido ursólico (1) (100 MHz, CDCl₃)

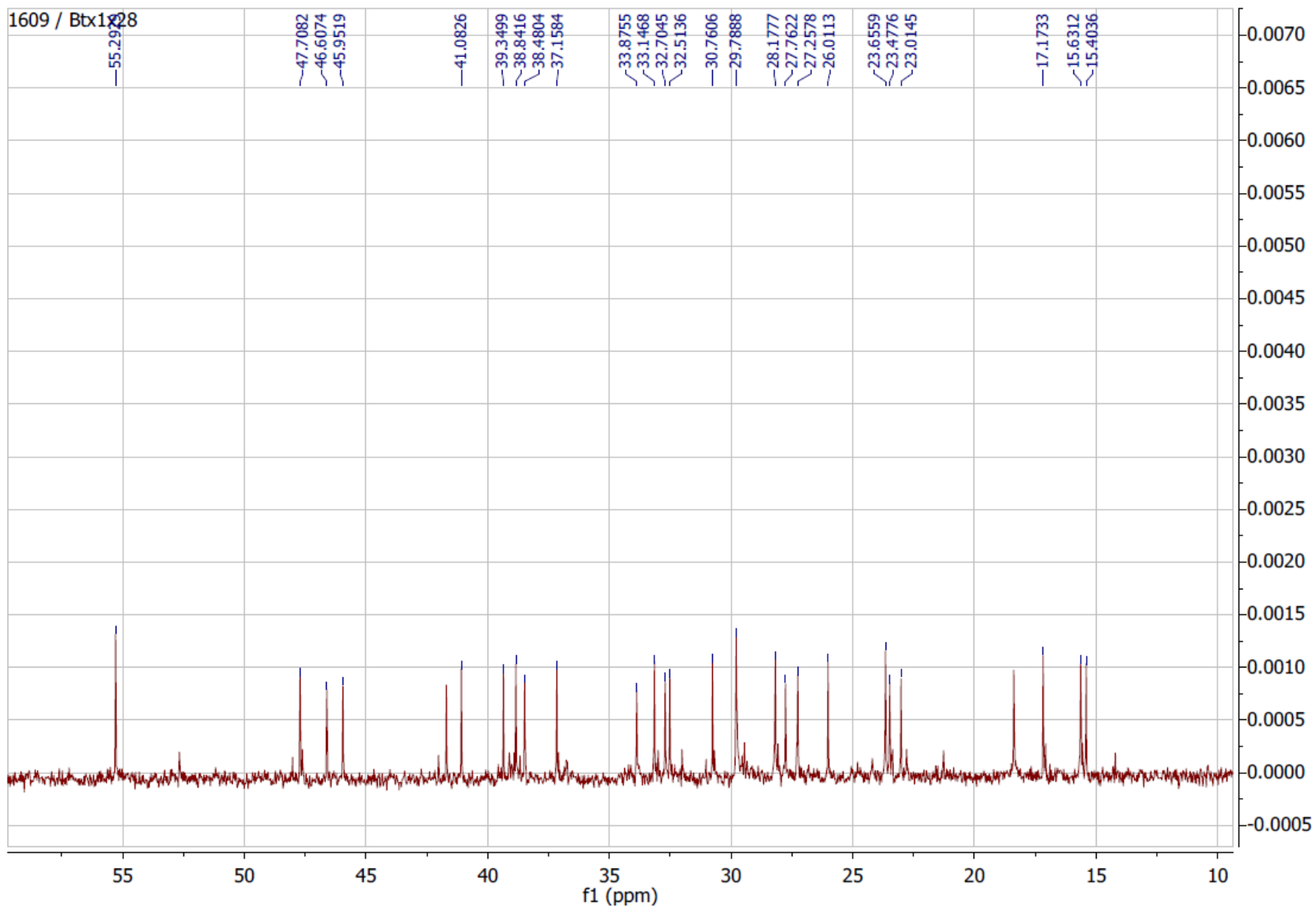
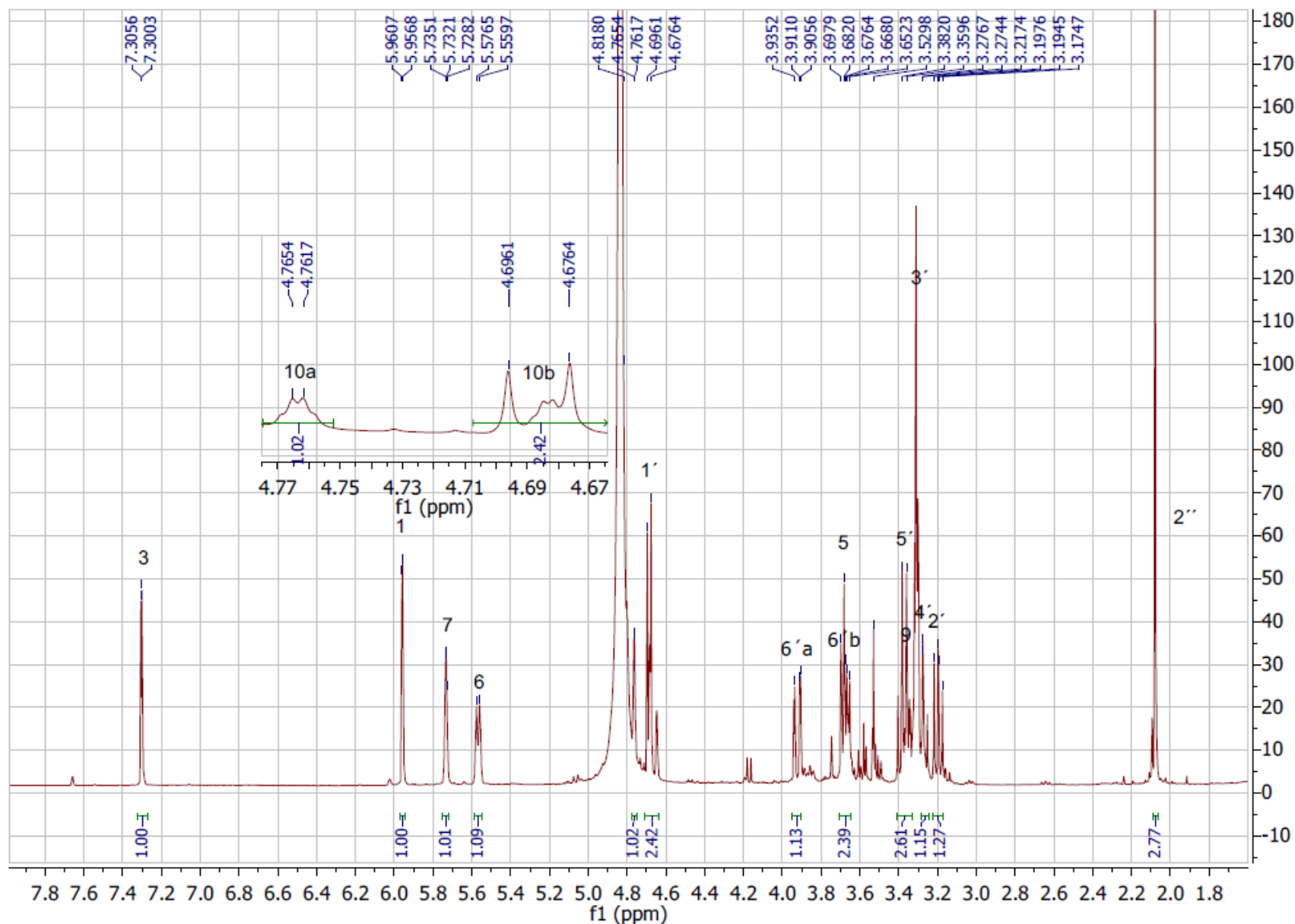


Figura A4. Espectro de RMN-¹³C de ácido ursólico (1) (100 MHz, CDCl₃, expansión)

Figura A5. Espectro de RMN- ^1H de asperulósido (5) (400 MHz, CD_3OD)

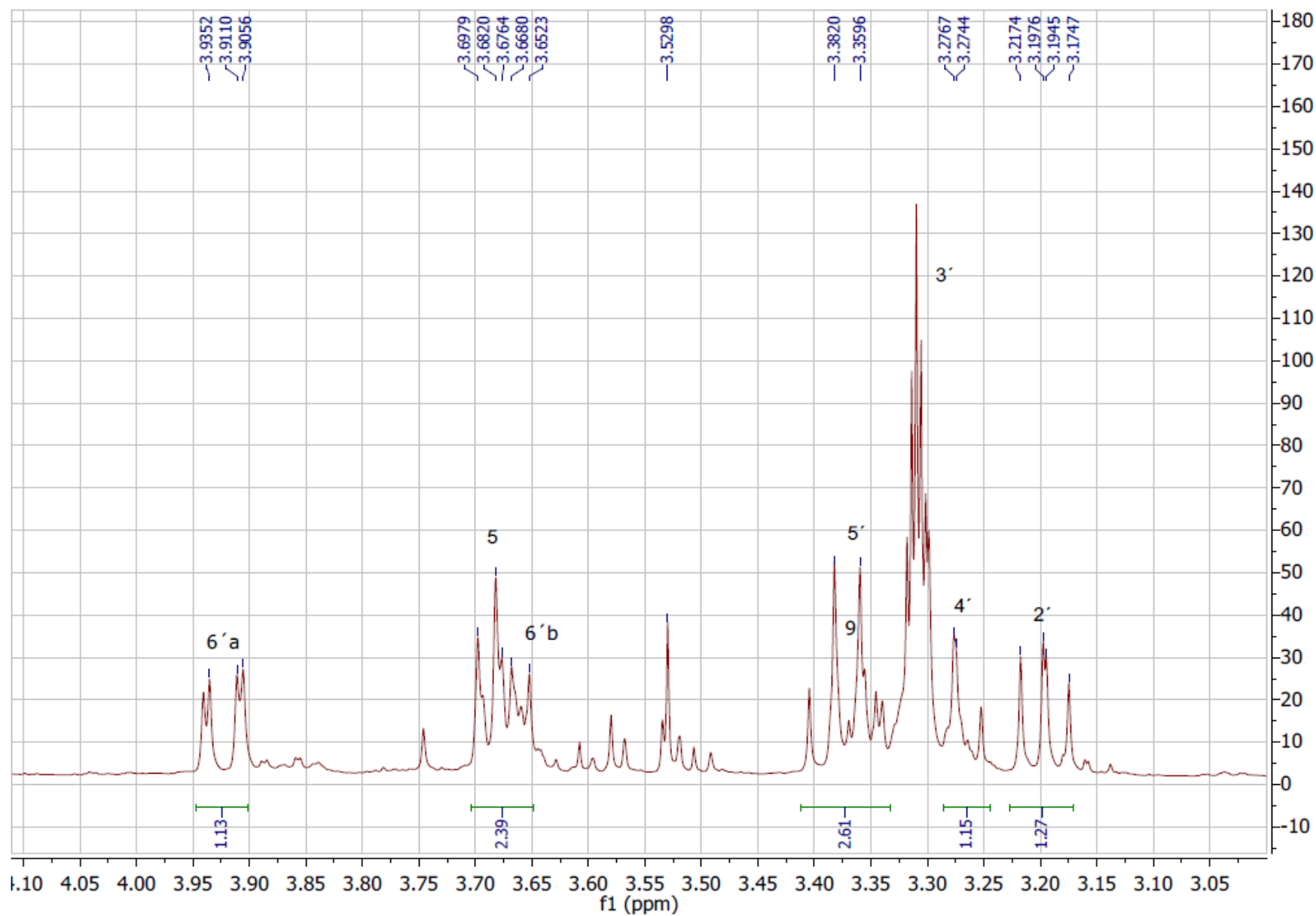
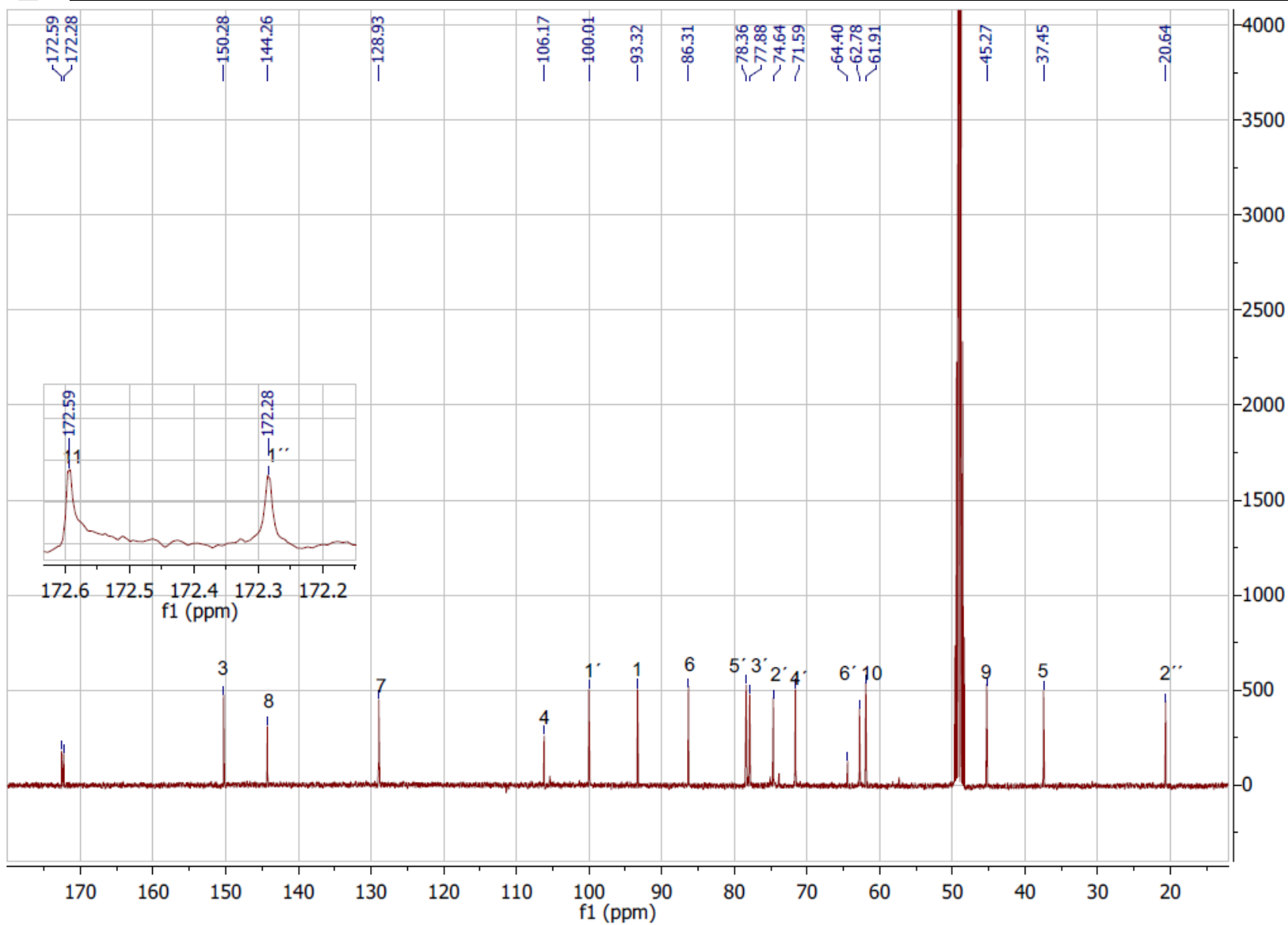


Figura A6. Espectro de RMN-¹H de asperulósido (5) (400 MHz, CD₃OD, expansión)

Figura A7 Espectro de RMN ^{13}C del asperulósido (5) (100 MHz, CD_3OD)

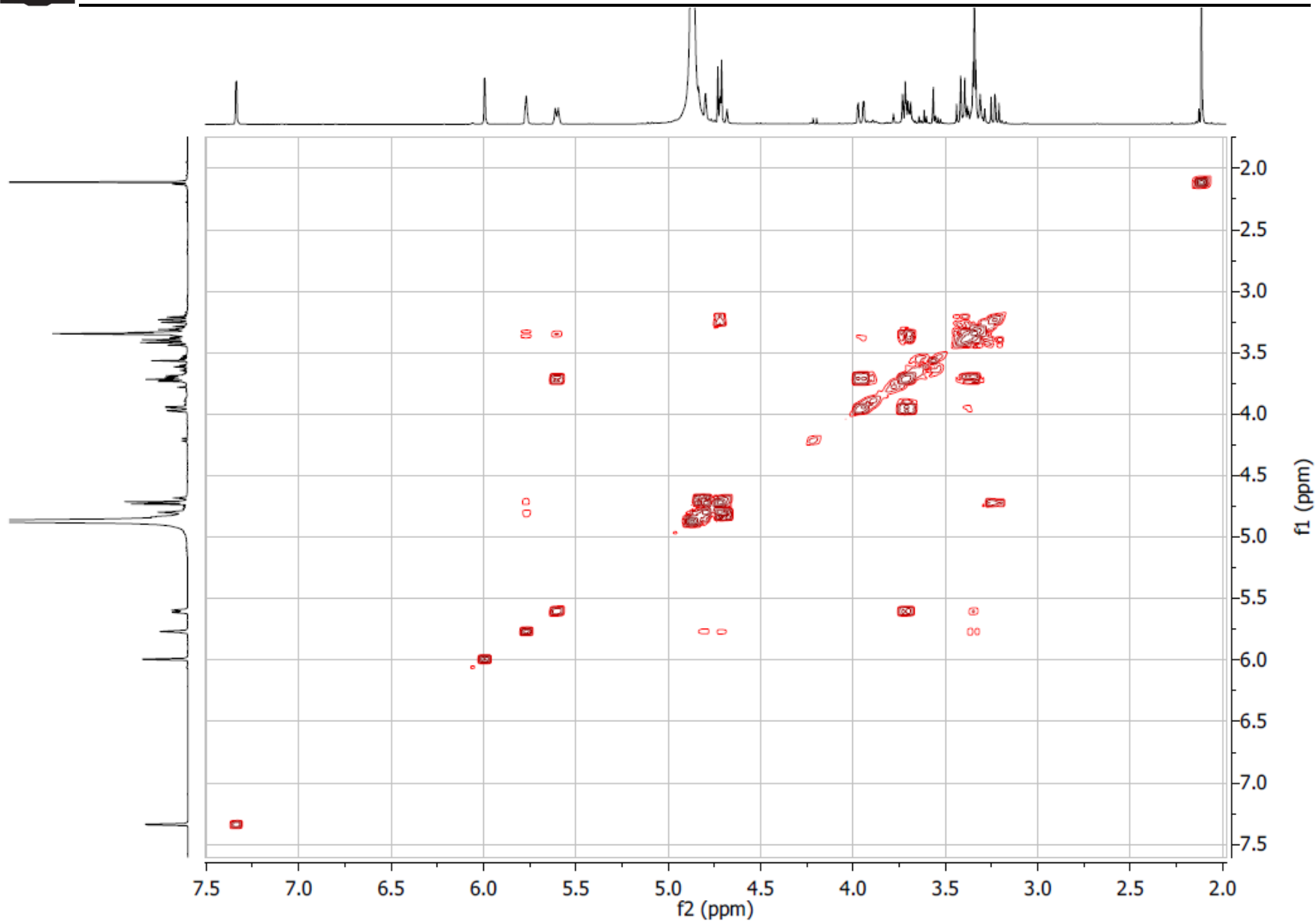
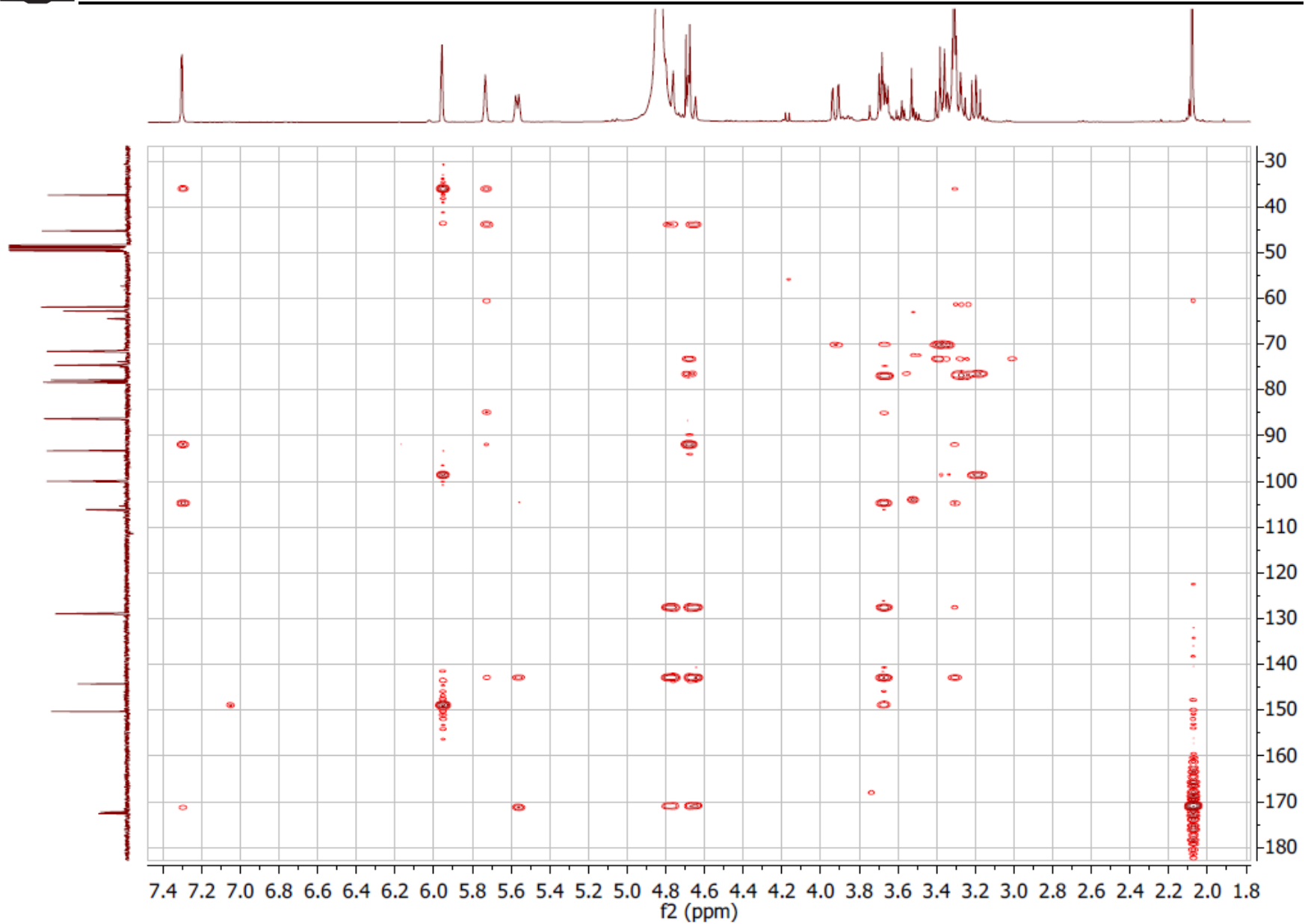


Figura A8 Espectro bidimensional COSY del asperulósido (5) (400 MHz, CD₃OD)

Figura A9 Espectro bidimensional HMBC del asperulósido (5) (CD₃OD)

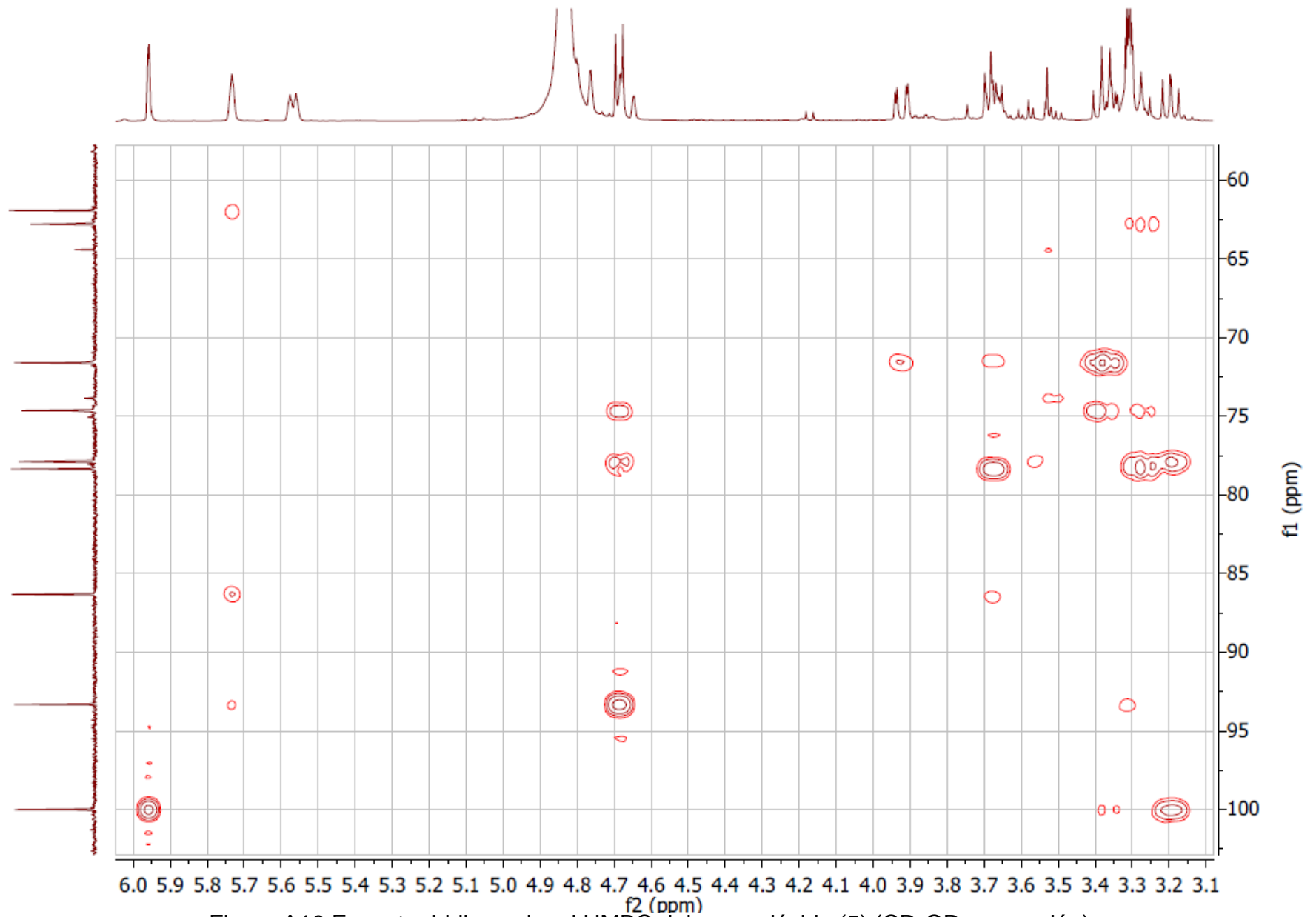
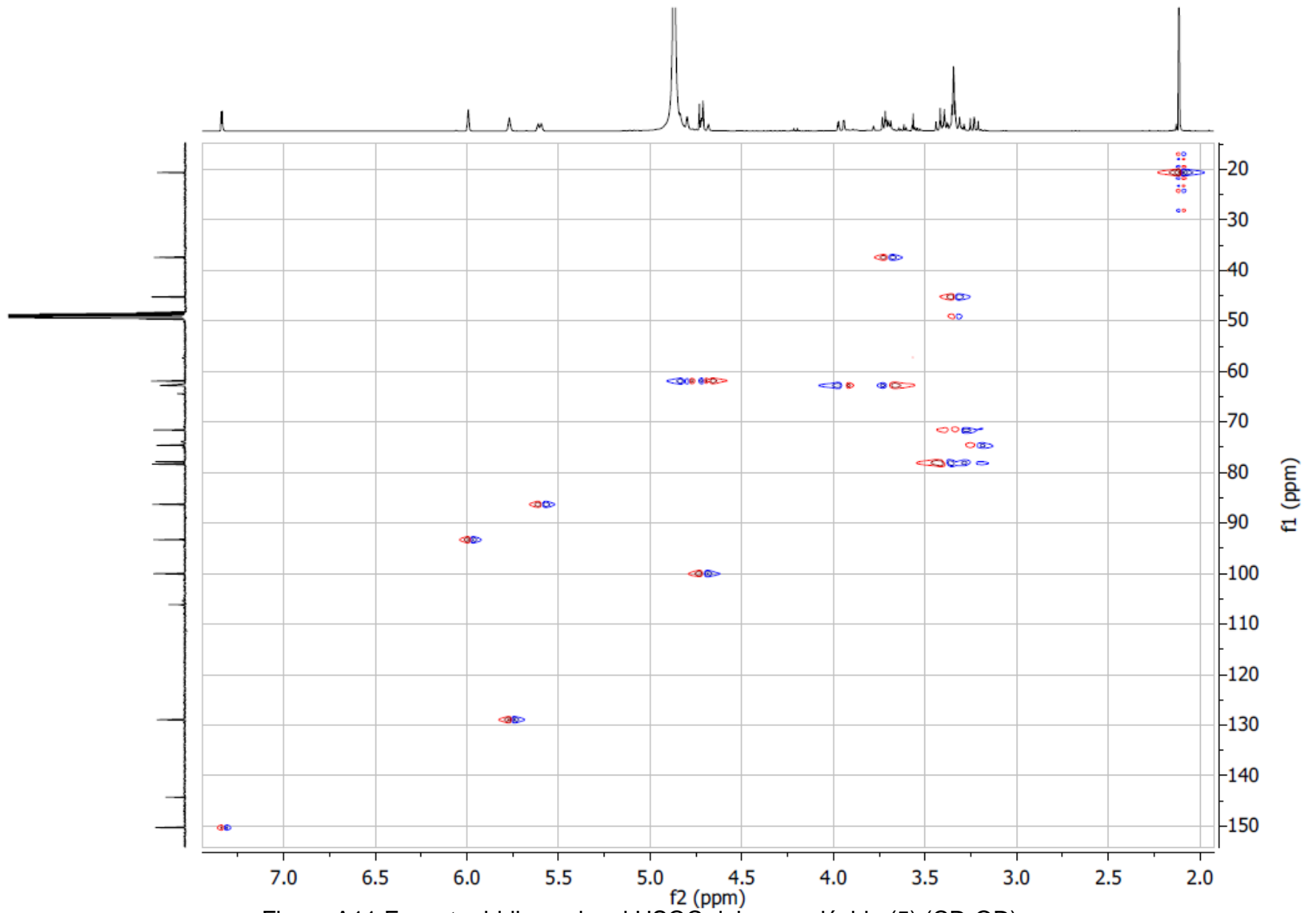


Figura A10 Espectro bidimensional HMBC del asperulósido (5) (CD_3OD , expansión)

Figura A11 Espectro bidimensional HSQC del asperulósido (5) (CD_3OD)

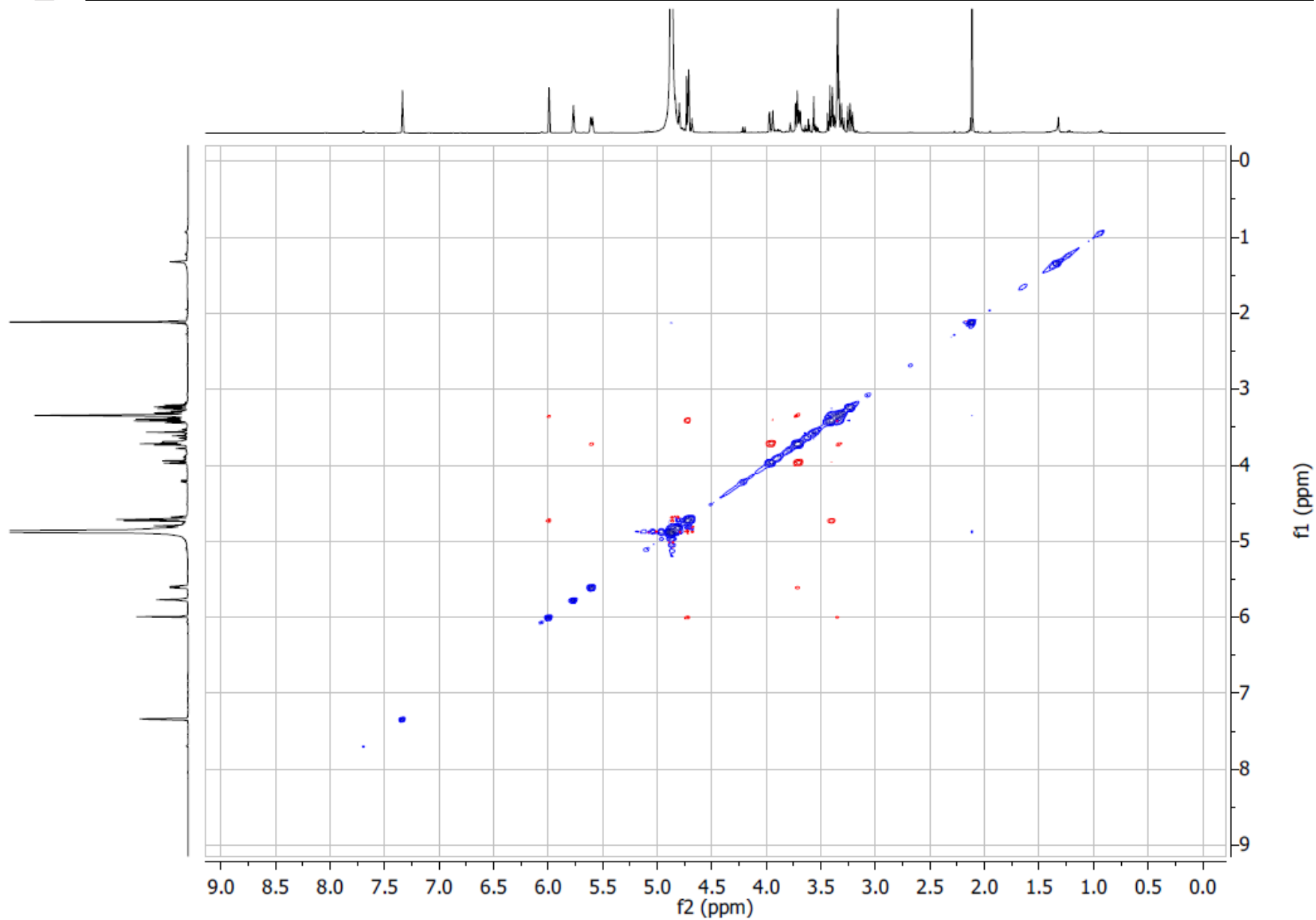


Figura A12 Espectro bidimensional NOESY del asperulósido (5) (400 MHz, CD₃OD)