



Universidad Tecnológica de la Mixteca

Labor et Sapientia Libertas

Actividad antioxidante e identificación de metabolitos secundarios de hojas de
Exostema caribaeum (Jacq.) Roem & Schult y *Cecropia obtusifolia* Bertol

TESIS

Para obtener el grado de
INGENIERO EN ALIMENTOS

Presenta

Diana Alexia Acevedo Hernández

Director de tesis

Dr. Carlos Vázquez Cid de León

Co-Directora de tesis

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

Huajuapán de León, Oaxaca, México. Octubre de 2021

La parte experimental del presente trabajo se realizó en el laboratorio de Tecnología Agroalimentaria, del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Oaxaca, bajo la dirección de la Dra. Lilia L. Méndez Lagunas y Mtra. Marlene Cruz Gracida.

Diana Alexia Acevedo Hernández contó con la “Beca para iniciar la titulación”, que otorga la Secretaría de Educación Pública (SEP), a través de la Coordinación Nacional de Becas para el Bienestar Benito Juárez (CNBBBJ), Becas México 2021.

ACTIVIDADES ACADÉMICAS E INVESTIGACIÓN

Participación como co-autora en la ponencia magistral “Indicadores de gestión de calidad del sistema hortofrutícola en México”. Guzmán-Pantoja, L.E., Villalobos-Delgado, L.H., Guadarrama-Mendoza, P.C., Valadez-Blanco, R., Santiago-Gómez, M.P., Bowater, R.J., **Acevedo-Hernández, D.A.**, presentada en el III Simposio internacional de Agroindustrias en Latinoamérica, realizado del 15 y 16 de octubre del 2020.

Participación como autora en el cartel científico y presentación oral del trabajo “Desarrollo de una bebida funcional tipo cerveza a base de residuos de bolillo”. **Acevedo-Hernández, D.**, Manuel-Gómez, A., Terán-Velásquez, M., Vera-Mendoza, M., Santiago-Gómez, P., Cruz-Sánchez, M., González-Mondragón, E., en el marco del 4º Congreso Internacional Digital en Alimentos Funcionales y Nutraceuticos: 2020 Rumbo al 2021, realizado del 10 al 12 de junio del 2020.

Participación como autora con el producto “Moritaya”, **Acevedo-Hernández, D.A.**, Guzmán-Pantoja, L.E., Villalobos-Delgado, L.H., obteniendo el 2º lugar en el 9º Concurso de Innovación en Alimentos procesados: Innovación y Desarrollo en la Industria Alimentaria, realizado el 31 de mayo de 2019.

Participación como autora con el cartel científico “Moritaya”, **Acevedo-Hernández, D.A.**, Guzmán-Pantoja, L.E., Villalobos-Delgado, L.H., en el 9º Concurso de Innovación en Alimentos procesados: Innovación y Desarrollo en la Industria Alimentaria, realizado el 31 de mayo de 2019.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca, mi alma mater, por mi formación profesional. Estaré eternamente agradecida.

A la Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas por su apoyo incondicional, su orientación, sus enseñanzas que me regaló sin conocerme y dándome la oportunidad de realizar este proyecto, pero sobre todo por creer en mi.

A la Dra. Ludmila Elisa Guzmán Pantoja, por su tiempo, confianza, apoyo incondicional, su dedicación en el desarrollo de este proyecto.

A los doctores, Carlos Vázquez Cid de León, Luz Hermila Villalobos Delgado, Paula Cecilia Guadarrama Mendoza, por su apoyo, comentarios, revisiones y observaciones que contribuyeron al desarrollo del proyecto.

A la Mtra. Marlen Cruz Gracida, por apoyarme y orientarme desde el día uno en el laboratorio para poder realizar este proyecto, mil gracias.

A la Bióloga Emma Cisneros Palacios, por ser una gran maestra de vida. ¡Gracias!

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, una gran institución educativa, gracias por abrirme sus puertas.

DEDICATORIAS

A mi mamá Norma Acevedo, por ser madre y padre, gracias por estar a mi lado y por el entusiasmo que me has brindado para seguir adelante en mis propósitos. Y, sobre todo, por haberme forjado como persona, por tu apoyo incondicional en todo momento, tus consejos y regaños, que sin ellos no hubiera logrado una meta más en mi vida.

A mi abuelita Ricarda Hernández, que con la sabiduría de Dios me enseñó a ser quien soy hoy. Gracias por estar siempre en los momentos importantes de mi vida, por tratarme como una hija y ser como una segunda madre. Siempre te llevo en mi corazón.

A mis tíos, Verónica Cristina, Mario de Jesús y José Juan, por apoyarme en cada decisión y proyectos, por brindarme aportes invaluable que servirán para toda mi vida, pero sobre todo por su amor... mi gratitud eterna.

Agradezco también a Rosa Elena Andrade Díaz, por estar siempre a mi lado en momentos tristes y felices, además de ser un ejemplo para salir adelante, por tus consejos que han sido de gran ayuda en mi vida y crecimiento, pero sobre todo por ser una madre para mi, esta tesis es el resultado de lo que me has enseñado en la vida y parte de lo que soy te lo debo a ti.

A Georgina Díaz Ayala, por todo su amor y sabiduría, por tratarme como parte de su familia y tenerme dentro de sus oraciones.

Para Ignacio por su compañía, por creer en cada uno de los proyectos de vida y profesionales que nos han hecho crecer, por sus palabras de aliento en los momentos difíciles, y por sobre todo por todo el cariño que me brinda día a día.

Gracias a Ulises Iván y Alexia Itzel Herrera Andrade, quienes sin que estemos unidos por lazos consanguíneos siempre los he considerado como mis hermanos.

A mis mejores amigos Demetrio Villalobos, Edwin Pinacho y Miriam Jiménez, por estar siempre presentes, por su valiosa amistad, ha sido un privilegio tener la coincidencia de compartir un largo camino con ustedes y seguir aquí, todavía formando historia.

A mis amigos de formación profesional (Ariadna Abigail, Marcos Efren, Magda, Kevin Bogart, Martha Monserrat, Mauricio Palacios, Omar Pérez y Renato), por todos los buenos momentos que hemos compartido, por su apoyo y cariño.

A mi perrihijo Zacky, con todo el cariño y amor que nos tenemos.

RESUMEN

La diabetes ha tenido un fuerte impacto en la calidad de vida económica de la población mundial, siendo México uno de los principales países afectados por esta enfermedad. Las plantas kina (*Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem & Schult) y guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol), son fuentes de compuestos hipoglucemiantes, mismos que están relacionados a mecanismos de acción antioxidante. Al respecto, el presente proyecto de investigación tuvo por objetivo evaluar la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales, así como detectar familias de compuestos químicos de extractos orgánicos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*. Para lograr lo anterior, se evaluó la actividad antioxidante (AA), el contenido de polifenoles totales (CPT) y la detección de las familias de compuestos hipoglucemiantes, mediante la prueba DPPH, método de Folin-Ciocalteu y pruebas químicas de detección como la reacciones de oxido reducción y cromatografía de capa fina (CCF), respectivamente. En la evaluación de la bioactividad y la detección de compuestos antioxidantes, la extracción asistida por ultrasonido no afectó la presencia de compuestos polifenólicos, así como la AA. Los extractos metanólicos acidificados de hojas de kina mostraron mayor CPT con respecto a guarumbo. En contraste, se obtuvo mayor AA en extractos hidrometanólicos de hojas de guarumbo, que en kina. Mediante las pruebas de óxido reducción de detección de compuestos, se observó la presencia de metabolitos secundarios como los alcaloides, ácidos fenólicos, lactonas insaturadas y saponinas en los diferentes extractos hidroetanólicos acidificados fraccionados con hexano, acetato de etilo y diclorometano de hojas de kina y guarumbo, sin embargo, no se observó la presencia de triterpenos y esteroides. Los resultados de CCF de los extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de kina y guarumbo mostraron la presencia de metabolitos secundarios como el ácido clorogénico, ácido fenólico abundante en especies de la familia Rubiaceae, que junto con otros compuestos explica los efectos antioxidantes de estas plantas. Finalmente, el amplio intervalo de familias de compuestos identificados, sugiere que hubo una efectiva interacción de los constituyentes químicos presentes en los extractos de las plantas y los solventes de extracción. El presente estudio, mostró que, mediante pruebas de AA, CPT y tamizaje químico, es posible establecer las bases para la detección de compuestos antioxidantes en forma rápida, y relativamente económica, mismos que podrían analizarse en ensayos de compuestos hipoglucemiantes y emplearse como ingredientes funcionales para el desarrollo de alimentos o medicamentos, alternativos para el tratamiento de la diabetes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y FÓRMULAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Definición de la diabetes.....	3
2.2 Situación de la diabetes en México.....	3
2.3 Tratamiento de la diabetes.....	4
2.3.1 Medicina alternativa.....	4
2.3.2 Plantas medicinales.....	5
2.3.3 Plantas hipoglucemiantes en México.....	6
2.4 Potencial antioxidante de fitocompuestos.....	8
2.4.1 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	9
2.5 Contenido de polifenoles en extractos de plantas.....	11
2.5.1 Método de Folin Ciocalteu.....	12
2.6 Caracterización botánica y química de la kina (<i>Exostema caribaeum</i>).....	13
2.7 Caracterización botánica y química del guarumbo (<i>Cecropia obtusifolia</i>).....	15
2.8 Métodos de extracción de compuestos bioactivos.....	16
2.9 Métodos analíticos para la identificación de compuestos bioactivos.....	18
2.9.1 Cromatografía.....	19
2.9.1.1 Cromatografía de capa fina.....	19
3. ESTADO DEL ARTE	23
4. JUSTIFICACIÓN	28
5. HIPÓTESIS	30
6. OBJETIVO GENERAL	31
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
8. MATERIALES Y MÉTODOS	32
8.1 Colecta e identificación de muestra.....	34
8.2 Preparación de las muestras.....	34
8.3 Determinación de la humedad de hojas de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i>	34
8.4 Obtención de extractos.....	34
8.4.1 Preparación de extractos hidrometanólicos.....	34
8.4.2 Preparación de extractos metanólicos acidificados.....	35
8.4.3 Preparación de extractos hidroetanólicos acidificados.....	35

8.4.4 Obtención de las fracciones enriquecidas	35
8.4.5 Acondicionamiento de las fracciones enriquecidas	36
8.5 Preparación de reactivos	36
8.5.1 Preparación de solución DPPH	36
8.5.2 Preparación de la curva standard de actividad antioxidante.....	37
8.5.3 Preparación de reactivo de Folin-Ciocalteu	37
8.5.4 Preparación de la curva standard de Contenido de Polifenoles Totales.....	37
8.5.5 Preparación de reactivo de Dragendorff	37
8.5.6 Preparación de reactivo de Mayer	37
8.5.7 Preparación de reactivo de Legal.....	37
8.5.8 Preparación de fase móvil para la detección de flavonoides.....	37
8.5.9 Preparación de fase móvil para la detección de ácidos fenólicos.....	38
8.6 Determinación de la actividad antioxidante	38
8.7 Contenido de polifenoles totales	39
8.8 Detección de familias de compuestos químicos	39
8.8.1 Detección de alcaloides mediante la Prueba de Dragendorff.....	40
8.8.2 Detección de alcaloides mediante la Prueba de Mayer.....	40
8.8.3 Detección de ácidos fenólicos	40
8.8.4 Detección de saponinas.....	41
8.8.5 Detección de lactonas insaturadas	41
8.8.6 Detección de esteroides/triterpenoides	41
8.9 Detección cromatográfica de compuestos fenólicos.....	41
8.9.1 Cromatografía en capa fina para flavonoides.....	41
8.9.2 Cromatografía en capa fina para ácidos fenólicos.....	41
8.10 Análisis estadístico	42
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
9.1 Determinación del contenido de humedad.....	43
9.2 Actividad antioxidante y detección de metabolitos secundarios de hojas de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i>	43
9.2.1 Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante.....	43
9.2.2 Análisis Fitoquímico de las fases orgánicas y acuosas de los extractos de hojas de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i>	46
9.2.3 Análisis cromatográfico de flavonoides y ácidos fenólicos	50
9.2.3.1 Detección de flavonoides	51
9.2.3.2 Detección de ácidos fenólicos	53
10. CONCLUSIONES	56
11. PERSPECTIVAS	57
ANEXOS.....	74
Anexo 1. Plantas nativas de México con potencial hipoglucemiante.....	74
Anexo 2. Reveladores utilizados en CCF.....	77
Anexo 3. Curva de calibración para la cuantificación de CPT de extractos de hojas de <i>E. caribaeum</i> ..	78

Anexo 4. Curva de calibración para la cuantificación de extractos de hojas de CPT de <i>C. obtusifolia</i> ..	79
Anexo 5. Curva de calibración para la cuantificación de AA de extractos de hojas de <i>E. caribaeum</i>	80
Anexo 6. Curva de calibración para la cuantificación de AA de extractos de hojas de <i>C. obtusifolia</i>	81
Anexo 7. Análisis fitoquímico para la fase orgánica y acuosa de los extractos fraccionados de hojas de <i>E. caribaeum</i>	82
Anexo 8. Análisis fitoquímico para la fase orgánica y acuosa de los extractos fraccionados de hojas de para <i>C. obtusifolia</i>	88
Anexo 9. CCF para la detección de flavonoides en muestras de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i>	94
Anexo 10. CCF para la detección de ácidos fenólicos en muestras de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i> ..	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ratones con síndrome espontáneo.....	8
Figura 2. Ratones con diabetes experimentalmente inducidos.....	8
Figura 3. Reacción del DPPH	10
Figura 4. Estructuras molecular de compuestos fenólicos	11
Figura 5. Reacción de reducción del agente Folin-Ciocalteu.....	13
Figura 6. Árbol de kina (<i>Exostema caribaeum</i>)	14
Figura 7. Hojas de kina	14
Figura 8. Árbol de guarumbo (<i>Cecropia obtusifolia</i>).....	15
Figura 9. Hojas de guarumbo.....	15
Figura 10. Cromatografía capa fina.....	19
Figura 11. CCF ascendente.....	21
Figura 12. CCF horizontal.	21
Figura 13. Diagrama de flujo general para el análisis de compuestos orgánicos de hojas de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i>	33
Figura 14. Extractos hidrometanólicos de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i>	35
Figura 15. Extracción líquido-líquido del extracto hidroetanólico acidificado	36
Figura 16. Fracciones orgánicas (A) y acuosas (B) de las fracciones enriquecidas de extractos hidroetanolicos de hojas de <i>E. caribaeum</i>	40
Figura 17. CCF estándares para Flavonoides.....	94
Figura 18. CCF para flavonoides de extractos hidroetanólicos.....	94
Figura 19. CCF para flavonoides de de extractos hidroetanólicos	95
Figura 20. CCF estándares para ácidos fenólicos.....	96
Figura 21. CCF para ácidos fenólicos de extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de <i>E. caribaeum</i>	96
Figura 22. CCF para ácidos fenólicos de extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de <i>C. obtusifolia</i>	97
Figura 23. CCF extractos hidroetanólicos de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i>	97
Figura 24. CCF para ácidos fenólicos de extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de <i>E. caribaeum</i> (365nm).....	98
Figura 25. CCF para ácidos fenólicos de extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de <i>C. obtusifolia</i>	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de compuestos fenólicos.....	11
Tabla 2. Investigaciones previas sobre la bioactividad de extractos de <i>Exostema caribaeum</i>	23
Tabla 3. Investigaciones previa sobre la bioactividad de extractos de <i>Cecropia obtusifolia</i>	24
Tabla 4. Investigaciones previas sobre principales compuestos con potencial antioxidante e hipoglucemiante presente en las plantas medicinales.....	25
Tabla 5. Investigaciones previas sobre las herramientas analíticas relativamente rápida utilizadas para la determinación de principios activos.	26
Tabla 6. Contenido de humedad, de hojas secas de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i>	43
Tabla 7. Contenido de polifenoles totales (CPT) y actividad antioxidante (AA) de extractos de hojas de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i>	44
Tabla 8. Pruebas de óxido reducción para extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i>	47
Tabla 9. Detección de flavonoides y relación de frente (R_f) de las fracciones enriquecidas del extracto hidroetanólico acidificado de las hojas de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i> para flavonoides.....	51
Tabla 10. Detección de ácidos fenólicos y relación de frente (R_f) de los extractos hidroetanólicos acidificados de las hojas de <i>E. caribaeum</i> y <i>C. obtusifolia</i>	54

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y FÓRMULAS

AA	Actividad Antioxidante
AcOEt	Acetato de Etilo
BUS	Baño ultrasónico
CCF	Cromatografía de Capa Fina
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ O ₂	Ácido fórmico
CH ₃ COOH	Ácido acético
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CPT	Contenido de Polifenoles Totales
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EAA	Equivalentes de Ácido Ascórbico
EtOH	Etanol
F. A	Fase acuosa
F. O	Fase orgánica
g	Gramos
GAE	Equivalentes de Ácido Gálico
gss	Gramos de sólido secos
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ O	Agua
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IR	Infrarrojo
L	Litros
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mL	Mililitros
UHPLC-PDA	Cromatografía líquida de ultra alta resolución con matriz de fotodiodos
UV-vis	Ultravioleta-visible
V	Volumen
X	Concentración

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una de las enfermedades con mayor prevalencia en el mundo, que afecta al 5.1% de la población de 20 a 79 años de edad (Cañarte-Baque et al., 2018; Franco et al., 2018). En México, es una de las principales causas de muerte, la cual está asociada al aumento de casos de obesidad (Escobedo-de la Peña et al., 2011; Dávila-Torres et al., 2014; Pérez-Díaz, 2016).

El tratamiento farmacológico de la diabetes, se ha basado en la administración de insulina e hipoglucemiantes orales como sulfonilureas, biguanidas, tiazolidindiona e inhibidores de las glucosidasas (Vintimilla et al., 2019), sin embargo, parte de la población mexicana recurre a la automedicación, haciendo uso de infusiones o extractos de plantas (Paniagua et al., 2018), los cuales presentan diversas propiedades bioactivas por su contenido de compuestos antioxidantes, como los ácidos fenólicos y los flavonoides (Andrade-Cetto et al., 2005). Al respecto, se ha reportado que el consumo de alimentos ricos en compuestos antioxidantes, es uno de los factores que disminuye el riesgo de padecer diabetes mellitus (Barreira et al., 2008).

Entre los compuestos con actividad antioxidante, los compuestos fenólicos parecen estar relacionados con la actividad hipoglucemiante al inhibir a las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa (Ramírez-Ortiz et al., 2016), quelar metales e inhibir la lipoxigenasa (Rojas, 2019).

Las plantas kina (*Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem & Schult) y guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol), poseen compuestos antioxidantes y han sido estudiados por su actividad hipoglucemiante (Pérez-Vásquez et al., 2013; Rivera-Mondragón et al., 2019). Ambas especies son utilizadas en la preparación de tés (Ordoñez et al., 2020), se distribuyen ampliamente en climas tropicales y subtropicales (Borhidi et al., 2002; Steinmann, 2009; IBUNAM, 2021), siendo abundantes en la Costa de Oaxaca (Steinmann, 2009; Librado, 2016).

Hasta el momento, para guarumbo no se han reportado estudios de composición química de extractos elaborados a partir de métodos asistidos por ultrasonido, así mismo, no se han utilizado solventes como acetato de etilo y diclorometano, para la extracción de compuestos antioxidantes.

La extracción asistida por ultrasonido, es un método que ofrece alta reproducibilidad, aumento de rendimiento, ahorro de energía, tiempos de extracción relativamente cortos y facilita la penetración de los disolventes (Lavilla et al., 2017; Ojha et al., 2020).

Los métodos analíticos y los solventes de extracción de compuestos bioactivos de plantas, influyen en capacidad para determinar la abundancia de dichos constituyentes, como son los antioxidantes (Soto-

García et al., 2016). Por otro lado, se sabe que los solventes tienen distinta capacidad de extracción por sus características fisicoquímicas, como polaridad, presión de vapor, grado de pureza, estabilidad, grado de recuperabilidad, densidad, etc. (Moldoveanu et al., 2015).

Por otro lado, se conoce que los extractos metanólicos de tallos de *E. caribaeum* (Jacq.) Roem & Schult, poseen actividad antiplasmodial (Pérez-Vásquez et al., 2013). De acuerdo con Guerrero-Analco et al., (2007), los extractos metanólicos de corteza de *Hintonia* (*H. Standleyana*) y kina poseen actividad hipoglucemiante en ratones con diabetes inducida con estreptozotocina (SZT). Sin embargo, se desconoce la actividad antioxidante, el contenido de polifenoles totales, composición de flavonoides y otros antioxidantes de extractos orgánicos de las hojas de kina.

Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue evaluar la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales, así como detectar familias de compuestos de extractos orgánicos de hojas de *E. caribaeum* (Jacq.) Roem & Schult y *C. obtusifolia* Bertol.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Definición de la diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica causada por elevados niveles de glucosa en sangre (Antonio, 2006), inicia cuando el páncreas no produce suficiente insulina o deja de utilizarla eficazmente (World Health Organization, 2020). Se caracteriza por tener alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas (Kahn et al., 2005).

Puede ser clasificada en 2 categorías: diabetes tipo 1 que resulta de la destrucción progresiva de las células β productoras de insulina en los islotes de Langerhans, que conducen generalmente a una deficiencia absoluta de insulina y diabetes tipo 2 resultado de una pérdida progresiva de la secreción de insulina de células β , por lo que se necesita más insulina para controlar las concentraciones de azúcar en la sangre (Zazworsky et al., 2006; American Diabetes Association, 2019).

Asimismo, en esta clasificación se contempla la diabetes gestacional, otro tipo de diabetes en donde los niveles de glucosa se elevan durante el embarazo, en una mujer que previamente no había sido diagnosticada con diabetes, pero estos síntomas pueden desaparecer después del parto (Flores et al., 2006).

2.2 Situación de la diabetes en México

La diabetes es considerada una de las enfermedades con mayor impacto en la calidad de vida de la población mundial y constituye un problema serio de salud (Reyes, et al., 2016; Sun et al., 2018).

La prevalencia mundial de diabetes se ha ido duplicando desde 1980, aumentando de 4.7% a 8.5% en la población adulta de los países con bajos y medianos ingresos (WHO, 2016). En 2014, se estimó que a nivel mundial 422 millones de adultos vivían con diabetes (WHO, 2016).

Para el 2019, de acuerdo con el International Diabetes Federation, el país con mayor número de personas con diabetes fue China con 116.4 millones, mientras que México se encontró en el sexto lugar con 12.8 millones. Esta enfermedad ha llegado a ser uno de los principales problemas de salud más graves, asociándole la causa de muerte y los costos económicos elevados de atención, (ISSSTE, 2019; Bello-Chavolla et al., 2017), que son de aproximadamente 7.7 mil millones de dólares, por lo cual se ha declarado una emergencia epidemiológica (Basto-Abreu et al., 2020).

Se estima que para el año 2045 México se encontrará en el 5° lugar con mayor número de personas con diabetes (IDF, 2019), este aumento puede deberse al envejecimiento de la población, incremento en la prevalencia de la obesidad relacionada con cambios en los estilos de vida (como el aumento en la densidad calórica de la dieta y el sedentarismo), así como otros factores (Rojas-Martínez et al., 2017).

Para reducir el impacto degenerativo de la diabetes, son necesarios diversos factores como la correcta alimentación, la ejercitación física, así como el empleo de tratamientos que tienen como objetivo reducir el riesgo de aparición de complicaciones micro y macro vasculares, disminuir la sintomatología, reducir la mortalidad y aumentar los años de la vida del paciente (Antonio, 2006).

2.3 Tratamiento de la diabetes

Para controlar la diabetes se hace uso de medicamentos tradicionales o farmacológicos, pero uno de los problemas que enfrenta este último medicamento es su costo y hace que el paciente abandone el tratamiento y la enfermedad se complique.

Los medicamentos farmacológicos entre los que se encuentran la insulina, sulfonilurias, biguanidas, inhibidores de la alfa-glucosidasa y glinidas, han ido en aumento y han hecho posible que los proveedores de la salud no solo elijan terapias basadas en la fisiopatología subyacente de la diabetes, sino también el uso de medicamentos que funcionan sinérgicamente al abordar diferentes anormalidades fisiopatológicas. Los beneficios de estos medicamentos son que permite el uso de dosis submáximas de diferentes agentes, con un mejor control glucémico y una reducción de los efectos adversos (Kahn, et al., 2005; Antonio, 2006). Sin embargo, el consumo de estos medicamentos representa un gasto económico elevado para los pacientes con diabetes (WHO, 2016; Pinto, 2017), debido a que hay ocasiones en que la enfermedad puede tener complicaciones (WHO, 2016) y también a la modificación genérica de los medicamentos (McEwen et al., 2017), se buscan opciones terapéuticas efectivas y seguras, como es el uso de derivados de plantas medicinales (Pinto, 2017).

El uso de plantas medicinales, como materia prima para la elaboración de extractos medicinales o para el aislamiento de sustancias puras, ha aumentado y se han realizado estudios que evidencian su seguridad y eficacia (Chikezie et al., 2015; Cruz, 2016). Por otro lado, los pacientes muestran una preferencia por los productos a base de plantas medicinales principalmente, ya que generalmente son más baratos, disponibles y culturalmente aceptable (Chikezie et al., 2015).

2.3.1 Medicina alternativa

La medicina alternativa y complementaria conocida como etnomedicina o tradicional (Wagner, 2020), es aquella que incluye terapia para la conexión de mente y cuerpo (Edge et al., 2001; Barrett, 2003; Sakagami, 2012;), así como atención fisiológica de las enfermedades mediante derivados de plantas (Wieland et al., 2011; Flores et al., 2014).

Debido al escaso acceso de la medicina farmacológica, la OMS ha buscado implementar las terapias de medicina alternativa y complementaria en los sistemas de salud de diversos países. Algunas de estas terapias, han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades como la diabetes (Zevallos-Morales et al., 2016).

La OMS, ha estimado que un 80% de la población mundial hace uso de la medicina tradicional para atenciones de salud no graves y algunos de los tratamientos hace uso de extractos de plantas o sus principios activos (Bermúdez et al., 2005). En México, el 69 % de la población decide utilizar la medicina alternativa, siendo sus creencias la principal razón por la cual acuden a ella con la intención de mejorar su calidad de vida, mientras que solo para el 8% de los casos el tratamiento fue recomendado por personal de la salud (Argáez-López et al., 2003).

Por otra parte, otros de los factores que interviene en la decisión de acudir a la medicina tradicional, es buscar alternativas seguras, que eviten los efectos secundarios de los medicamentos alópatas, su costo, fácil acceso y la dificultad para manejar una dieta saludable (Saucedo, 2006).

2.3.2 Plantas medicinales

Existen plantas medicinales con propiedades antioxidantes e hipoglucemiantes (Gallegos et al., 2017), de las cuales, se conoce que poseen principios activos, que se encuentran principalmente en sus raíces, hojas y corteza (López, 2002; Martínez, 2003), los cuales varían en su proporción y concentración dependiendo de la especie vegetal, de la parte vegetal utilizada y de la época del año en que se cultiva y se cosecha (García et al., 2009), lo que ha permitido que tenga varias aplicaciones (Bermúdez et al, 2005; Rasool, 2012; Kumar, 2016).

Para poder usar estos principios activos es necesario extraerlos, Eichele (2010), menciona que diferentes partes de las plantas medicinales se preparan mediante maceración, precolación o destilación (Horák et al., 2015). Se sabe que muchas de las propiedades de estas plantas son aprovechadas en el sector alimentario funcionales y condimentos, entre otros (López, 2002).

Los metabolitos presentes en las plantas medicinales, son compuestos que se pueden clasificar en metabolitos primarios como glucosa, almidón, polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que son benéficos para la salud y en metabolitos secundarios, como alcaloides, flavonoides, saponinas, terpenoides, esteroides, glucósidos, taninos, aceites volátiles (Kumar, 2016).

En América, las plantas medicinales han sido ampliamente utilizadas por varios grupos étnicos de México, Honduras, Nicaragua, El Salvador, Costa Rica y Panamá (Hota, 2007). Govea-Salas et al. (2017),

mencionan que México cuenta con una amplia variedad de plantas medicinales, en diversas condiciones de clima y suelo. Su uso con diferentes propósitos ha sido registrado desde tiempos prehispánicos (Alonso-Castro et al., 2017). Por otro lado, Muñetón reportó en 2009 que México ocupa el segundo lugar en las plantas registradas a nivel mundial con 4500.

El uso de plantas medicinales en nuestro país es una práctica que se mantiene en tiempos recientes para el tratamiento de enfermedades como la diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia e incluso tipos de cáncer (López, 2008).

Se sabe que, los productos naturales de plantas son fuente de fármacos hipoglucemiantes de los cuales muchos se distinguen por sus propiedades antioxidantes, sin embargo, no todos los constituyentes químicos se han evaluado a nivel de laboratorio o clínico, por lo que se necesita seguir haciendo estudios para determinar sus efectos y mecanismos de acción hipoglicémica (Xu et al., 2018).

Con respecto a las propiedades medicinales de las plantas se han realizado investigaciones por su eficacia terapéutica, así como por la viabilidad económica y su posible bajo riesgo de efectos secundarios (Kumar, 2016).

2.3.3 Plantas hipoglucemiantes en México

Las plantas medicinales han sido utilizadas como fuentes de principios activos utilizados en la producción de diversos fármacos alópatas, disponibles para el tratamiento de la diabetes, muchos de los cuales se caracterizan por su potencial antioxidante (Patel et al., 2012). Las plantas más comunes con potencial antioxidante e hipoglucémico son el nopal, noni, anona, caiapo, arándano, agrimonia, sábila, alpiste, ajo, cebolla, higo y fresa, entre otras (López, 2006; García et al., 2009; Kooti et al., 2016).

La flora de México tiene más de 20,000 plantas registradas (Soumyanath, 2006; Villaseñor & Ortiz, 2014), de las cuales 1,000 son plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la diabetes debido a sus efectos hipoglucémicos (Coman et al., 2012).

Aunque es necesario realizar un mayor número de ensayos clínicos controlados sobre el potencial de especies vegetales con actividad hipoglucémica, los resultados en los últimos años son positivos, por la eficacia y la escasa toxicidad a las dosis recomendadas, por lo que podrían utilizarse durante un período determinado (López, 2006; Jiménez-Corona et al., 2019).

La actividad hipoglucémica depende de los mecanismos de acción de los compuestos que constituye a cada planta, como puede ser la capacidad de restaurar la función de los tejidos pancreáticos al estimular un aumento en la producción de insulina, inhibición de la absorción intestinal de glucosa, protección de

células β mediante mecanismos de acción antioxidante, disponibilidad de metabolitos en los procesos que dependen de la insulina, estimulación de la secreción de insulina de las células beta de los islotes, reducción de la resistencia a la insulina, proporcionar elementos necesarios como calcio, zinc, magnesio, manganeso y cobre para células beta, así como aumento de tamaños y células en los islotes de Langerhans (Malviya et al., 2010; Kaushal et al, 2019). Por otro lado, de algunas especies de plantas hipoglucemiantes en México, se han extraído sus compuestos bioactivos responsables del efecto terapéutico (Saad et al., 2017). Las principalmente familias de compuestos bioactivos que se han extraído de estas plantas son polisacáridos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, carotenoides, taninos, esteroides, entre otros (Malviya et al, 2010; Saad et al, 2017).

En la actualidad, la investigación de las plantas y productos de origen biológico, para el control y tratamiento de la enfermedad, es justificado debido al costo de medicinas y sus posibles efectos secundarios (Gushiken et al., 2015). En el Anexo 1, se consignan algunas plantas de México con potencial hipoglucemiante.

Varios productos naturales provenientes de plantas hipoglucemiantes imitan, los efectos de concentraciones muy bajas de insulina endógena o aumentan los efectos de insulina endógena, pero ninguno ha causado la ausencia total de la insulina. Entre los productos naturales con actividad hipoglucemiante, se pueden encontrar compuestos derivados de fuentes microbianas, como los inhibidores enzimáticos acarbose, miglitol y voglibos y compuestos fitoquímicos como α -pineno, sitosterol, estigmasterol y ácido clorogénico, entre otros (Castro et al., 2014; Ríos et al., 2016).

Los modelos animales insulino dependientes, utilizados para la evaluación de diabetes, proporcionan información sobre la eficacia de los posibles complementos de la terapia con insulina en estados severamente hipoinsulínicos (Soumyanath, 2006).

Los principales modelos dependientes de insulina en los que se hacen pruebas de los principios activos, son ratones con síndrome espontáneo (ratón BioBreeding, ratón Non Obese Diabetic, ratón LEW-1-AR1/Ztm-iddm) (Figura 1) y con diabetes inducido experimentalmente con aloxano, estreptozocina (STZ) o quirúrgicamente por pancreatectomía (Figura 2) (Soumyanath, 2006; Mortady, 2018). Los ratones, pasan por una pérdida extensa o completa de células β pancreáticas, y la consiguiente falta de insulina, causa hiperglucemia con glucosuria, poliuria, polidipsia, hiperfagia y pérdida de peso.



Figura 1. Ratones con síndrome espontáneo. Fuente: Trent, 2012.

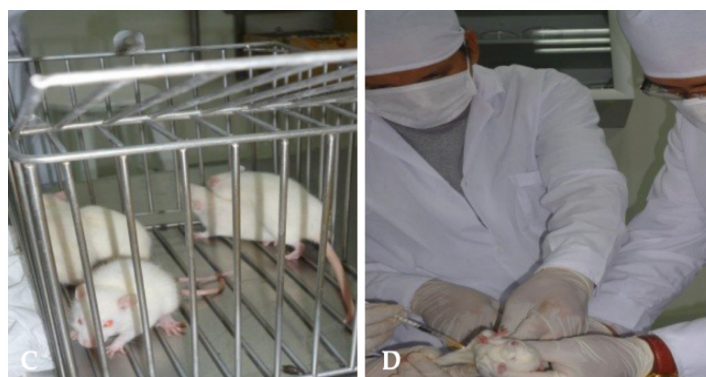


Figura 2. Ratones con diabetes experimentalmente inducidos. Fuente: Vilchez et al., 2018.

Cabe destacar, que los compuestos de origen vegetal podrían ser evaluados en diferentes niveles clínicos de diabetes con la posibilidad de que sean empleados en combinación con la medicina alópata (López, 2006).

2.4 Potencial antioxidante de fitocompuestos

Los antioxidantes tienen un papel muy importante como factor protector de la salud, ya que reducen el riesgo de enfermedades crónicas, como el cáncer y la diabetes. Se ha reconocido que los antioxidantes de origen vegetal como la vitamina C, vitamina E, ácidos fenólicos tienen potencial de reducir el riesgo de enfermedades (Shekhar et al., 2014). La mayoría de los antioxidantes con potencial hipoglucemiante son de origen vegetal (Rivas et al., 2015).

Las fuentes primarias de antioxidantes naturales son cereales integrales, frutas y verduras, siendo los taninos, lignanos, estilbenos, ácidos fenólicos, catequinas, antocianinas algunos de los compuestos con potencial quimiopreventivo en bioensayos con modelos de animales, mismos a los que se les ha asociado la actividad antioxidante (Franco-Quino et al., 2016).

La actividad antioxidante es propia de las sustancias que previenen la oxidación dañina causada por sustancias químicas reactivas en reacciones metabólicas o factores exógenos, dicho mecanismo ha permitido el uso de antioxidantes como parte importante del tratamiento de enfermedades degenerativas provocadas por la acción de radicales libres (Cajas & Merchán, 2021). La mayoría de los antioxidantes con potencial hipoglucemiante son de origen vegetal (Rivas et al., 2015).

De acuerdo con Cui et al. (citado por Kedare et al., 2011), los antioxidantes intervienen en cualquiera de los tres pasos principales, iniciación, propagación y terminación, del proceso oxidativo mediado por radicales libres.

Se ha publicado que los fitocompuestos antioxidantes pueden inhibir a la enzima alfa-glucosidasa, que degrada al glucógeno en la síntesis de la glucosa, y a la vez estimula la secreción de la insulina por el páncreas con el fin de controlar el nivel de azúcar en sangre, igualmente inhibe la gluconeogénesis y/o aumenta la captación de insulina por sus receptores (Gonzales-Llontop et al., 2020).

De acuerdo con Carrillo (2019), existen métodos que permiten determinar el estrés oxidativo para la estimación del potencial de fármacos antioxidantes, entre los que se encuentran los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los métodos *in vitro* más utilizados son el ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), FRAP (por sus siglas en inglés, Ferric Reducing Antioxidant Power), TBARS el cual analiza los niveles de lipoperoxidación y TAC (por sus siglas en inglés, Total Antioxidant Capacity). Entre los métodos *in vivo* se encuentra, el método para evaluar la carbonilación de proteínas (3-nitrotiosina) o la oxidación de ADN (8-hidroxideoxiguanosina) (Castañeda et al., 2008).

Por otro lado, cabe señalar que, para el caso de bioensayos con productos naturales, se está buscando fraccionar y purificar compuestos de extractos vegetales y analizar su actividad farmacológica en sistemas *in vitro*, ya que los resultados de estas pruebas se obtienen en forma rápida y económica (Castañeda et al., 2008).

2.4.1 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Para evaluar la actividad antioxidante se acude al método de DPPH, el cual determina la actividad de captura de material radicalario, en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso, además, es un método rápido, simple, económico y ampliamente utilizado (Kedare et al., 2011; Jiménez et al., 2012).

La actividad antioxidante puede, entre otros factores, depender del tipo (posición y número de hidroxilos en la molécula) y concentración de compuestos fenólicos, y de la presencia de metales de transición.

De acuerdo con Yang et al. (citado por Jiménez et al., 2012), el uso de baño ultrasónico mejora la homogenización de la muestra, provocando que los compuestos antioxidantes puedan estar accesibles al radical libre.

El método de ensayo de DPPH se basa en la reducción de DPPH (radical libre estable). El radical DPPH con un electrón impar, se detecta a una absorción máxima a 517 nm (color púrpura), cuando los antioxidantes reaccionan con el DPPH para evaluar la actividad antioxidante, este se empareja en presencia de un donante de hidrógeno, se reduce al DPPH-H (Difenilpicrilhidrazina) y como consecuencia la absorbancia del DPPH disminuye (Figura 3), perdiendo el color púrpura.

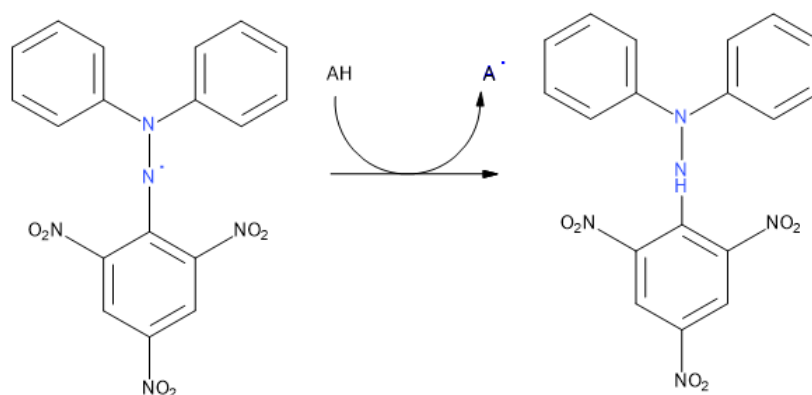


Figura 3. Reacción del DPPH

El radical DPPH-H, resulta en decoloración (color amarillo) con respecto al número de electrones capturados. Si hay más decoloración, mayor será la capacidad reductora (Shekhar et al., 2014).

Este método es único en llevar a cabo la reacción de la muestra con DPPH en metanol/agua, lo que facilita la extracción de compuestos antioxidantes de la muestra (Kedare et al., 2011).

El análisis de antioxidantes por otros métodos puede limitarse a aquellos compuestos solubles en los disolventes seleccionados. La ventaja de este método es que se permite que el DPPH reaccione con toda la muestra y el tiempo suficiente en el método permite que reaccione lentamente incluso con antioxidantes débiles (Prakash, 2001). El método DPPH se puede utilizar en disolventes orgánicos acuosos y apolares y se puede utilizar para examinar antioxidantes hidrófilos y lipófilos.

2.5 Contenido de polifenoles en extractos de plantas

Los compuestos fenólicos tienen una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos (Ruíz et al., 2018) (Figura 4).

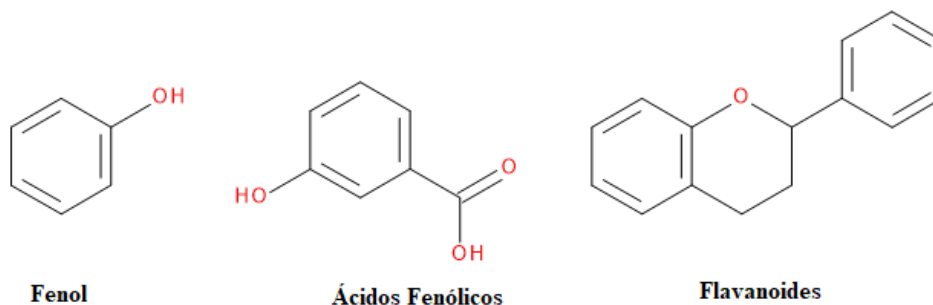


Figura 4. Estructuras molecular de compuestos fenólicos

Generalmente estos compuestos se encuentran como ésteres o glucósidos más que como compuestos libres (Vermerris et al., 2008). Se pueden clasificar en fenoles no carboxílicos y ácidos fenólicos y flavonoides (antocianos, flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles, taninos condensados y lignanos), así como en grupos basados en el número de carbonos en la molécula (Harbone & Simmonds, 1964; Gimeno, 2004) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de compuestos fenólicos

Estructura	Clase de compuesto fenólico
C ₆	Fenoles simples
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos y compuestos relacionados
C ₆ -C ₂	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos
C ₆ -C ₃	Ácidos cinámicos, aldehídos cinamílicos, alcoholes cinamílicos
C ₆ -C ₃	Cumarinas, isocumarinas y cromonas.
C ₁₅	Chalcones, aurones, dihidrochalcones
C ₁₅	Flavanos
C ₁₅	Flavonas
C ₁₅	Flavonones
C ₁₅	Flavanonoles
C ₁₅	Antocianidinas
C ₁₅	Antocianinas
C ₃₀	Biflavonilos
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₂ -C ₆	Benzofenonas, xantonas, estilbenos
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Quinonas
C ₁₈	Betacianinas
Lignanos, neolignanos	Dímeros u oligómeros
Lignina	Polímeros
Taninos	Oligómeros o polímeros
Flobafeno	Polímeros

C: Número de carbonos característicos del compuesto fenólico

Los compuestos fenólicos son unos de los responsables de las actividades antioxidantes, ya que tienen la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo y por lo tanto, limitan la acción de las enzimas que biodisponen a la glucosa en sangre y el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por radicales libres, asimismo, presentan propiedades fisiológicas tales como hipoglucemiantes, anticancerígenas, antialérgicos, antiinflamatorio, antimicrobiano y cardioprotector (Gutiérrez et al., 2008; Gallego, 2016; Phuyal et al., 2020).

Se han generado diferentes métodos para detectar a los compuestos fenólicos, siendo el método de Folin-Ciocalteu, el más utilizado para cuantificar el contenido de polifenoles totales (Naspud, 2018; Cosme et al., 2020).

2.5.1 Método de Folin Ciocalteu

Si bien, la cromatografía en sus diferentes pruebas analíticas, se considera la herramienta más importante para la determinación cuantitativa de compuestos fenólicos, pero con mayor frecuencia se emplea métodos que son de fácil disponibilidad (Cicco et al., 2011).

Para cuantificar el contenido de polifenoles en extractos de plantas, comúnmente se utiliza el Método Oficial AOAC (Folin-Ciocalteu), que es un método colorimétrico basado en una reacción de oxidación de los fenoles (considerado también como un método de medida de la actividad antioxidante), previamente extraídos en agua/alcohol y luego se hacen reaccionar con el reactivo Folin-Ciocalteu (una mezcla compleja de wolframato sódico y molibdato de sodio en ácido fósfórico) en presencia de álcali (carbonato de sodio), se produce una concentración apreciable de iones fenolato (Espinosa-Leal et al., 2015; Kupina et al., 2018).

El carbonato de sodio juega un papel muy importante, ya que previene la formación de precipitados, así como también ayuda a obtener un alto contenido de iones fenolatos (Cicco et al., 2011). Los fenolatos reducen al reactivo de F-C (amarillo) transformándolo en un cromóforo de color azul, constituido por un complejo fosfotúngstico-fosfomolibdeno, donde la absorción máxima de los cromóforos depende de la solución alcalina y de la concentración de compuestos fenólicos (Cicco et al., 2011; Blainski et al., 2013; García et al., 2015) (Figura 5).

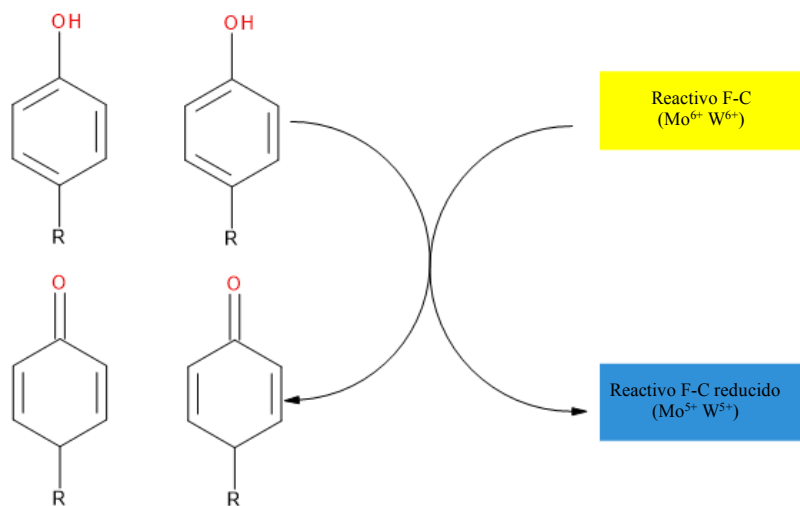


Figura 5. Reacción de reducción del agente Folin-Ciocalteu

La intensidad del color azul es proporcional a la cantidad de compuestos fenólicos reactivos en la muestra, que es medida espectrofotométrica (UV/VIS) a 765 nm, donde la cuantificación de los polifenoles se obtiene interpolando las absorbancias obtenidas, en la curva de calibración de las absorbancias de las diluciones del ácido gálico utilizado como un compuesto estándar a concentración conocida. Los resultados son expresados en equivalentes de ácido gálico por gramos de muestra seca (Naspud, 2018). El método también dará resultados positivos para extractos que contengan ácido ascórbico, aminoácidos o azúcar (Kupina et al., 2018).

Este método es fácil de realizar, rápido y aplicable en el uso rutinario de laboratorio, y de bajo costo, pero se deben considerar algunos factores que pueden afectar el resultado final del método, entre los que se encuentran la sustancia de referencia elegida, volumen de un extracto y el reactivo para el procedimiento analítico, el tiempo de reacción óptimo, la longitud de onda para las mediciones, la temperatura para el desarrollo de color, etc. (Hudz et al., 2019).

2.6 Caracterización botánica y química de la kina (*Exostema caribaeum*)

Exostema caribaeum (Jacquin) Roemer y Schultes (Rubiaceae), comúnmente conocida como copalchi, copalche, kina, melena de león, entre otros, son un género neotropical de 25 especies de árboles y arbustos (Figura 6 y 7), pertenecientes de las familias Rubiaceae y algunas Euphorbiaceae (McDowell et al., 2003; IBUNAM, 2021). Una de las características principales de la familia Rubiaceae, es que muchas de sus plantas no se producen alcaloides (Froelich et al., 2006).



Figura 6. Árbol de kina (*Exostema caribaeum*)



Figura 7. Hojas de kina

Esta planta está en riesgo de saqueo, y es además una de las 50 especies medicinales silvestres comercializadas (Cristians et al., 2018). Se distribuye del centro de México a Costa Rica y en las Antillas (McDowell et al., 2003).

Las cortezas de su tallo son extremadamente amargas, se utilizan en el tratamiento de la diabetes, paludismo, malaria, dolencias gastrointestinales y fiebre ocasionada por dengue, así como sustituto de la quinina (Froelich et al., 2006; Guerrero-Analco et al., 2007; Pérez-Vásquez et al., 2013).

Se han realizado ensayos clínicos del efecto hipoglucemiante de los extractos metanólicos de corteza de hintonia (*H. standleyana*) y kina, evaluados en ratones con diabetes inducida con STZ, demostrando una disminución de los niveles de glucosa en sangre, por la presencia de principios activos como las 4-fenilcumarinas (neoflavonoides), cucurbitacina y ácido clorogénico (Guerrero-Analco et al., 2007; Pérez - Vásquez et al., 2013).

Pérez-Vásquez et al. (citado por Noster y Kraus, 1990), publicaron que diferentes extractos metanólicos de corteza de tallo de *E. Caribaeum*, posee actividad *in vitro* anti parasitaria sobre *Plasmodium falciparum*.

2.7 Caracterización botánica y química del guarumbo (*Cecropia obtusifolia*)

El género *Cecropia* pertenece a la familia Urticaceae y consta de 61 especies de árboles de rápido crecimiento, ampliamente distribuidos en la selva tropical y subtropical, desde México hasta América Central y del Sur (Tenorio-Galindo et al., 2008; Rivera-Mondragón et al., 2019), entre estas especies se destaca la *C. obtusifolia* Bertol, conocida comúnmente como guarumbo (IBUNAM, 2021).

El guarumbo, es un árbol de 20 a 25 m de altura, con un tronco recto y hueco con inflorescencias dispuestos en racimos digitados, hojas de color verde intenso en el haz y gris en el envés (IBUNAM, 2021) (Figura 8 y 9), es utilizada principalmente para el control de la diabetes mellitus (Pérez-Guerrero et al., 2001; Nicasio-Torres et al., 2009).



Figura 8. Árbol de guarumbo (*Cecropia obtusifolia*)



Figura 9. Hojas de guarumbo

En la etnomedicina de México, se utilizan las hojas de esta planta mediante infusiones acuosas como agente antiglicémico, antiinflamatorio, gripa, asma, bronquitis y fiebre (Rivera-Mondragón et al., 2017; Fortis-Barrera et al., 2019; Rivera-Mondragón et al., 2019).

Así mismo, se han realizado diversos estudios farmacológicos con extracto etanólico de las hojas y corteza de *C. obtusifolia* aislando compuestos fenólicos, como el ácido clorogénico y la isoorientina, dos flavonolignanos, ácido tormentoso, β -sitosterol, alcaloides, glucósidos, cardiotónicos, taninos, triterpenoides y glucósidos de saponina los cuales han mostrado propiedades medicinales como

antipalúdicos, antihipertensivos, hipoglucémicos, hipolipidémicas, antioxidantes y diuréticos (Pérez-Guerrero et al., 2001; Revilla-Monsalve et al., 2007; Nicasio-Torres et al., 2009; Rivera-Mondragón et al., 2019).

En contraste, aún no se evalúan todos los compuestos bioactivos, por lo que en la actualidad ha surgido la necesidad de identificar todos los compuestos presentes de la hoja de *C. obtusifolia* para producir extractos que permitan el desarrollo de fármacos para resolver algunos problemas de salud (Revilla-Monsalve et al., 2007; Nicasio-Torres et al., 2009).

Por otra parte, se ha mencionado que la *C. obtusifolia* tiene un efecto hipoglucémico similar a la glibenclamida sin hepatotoxicidad ni efectos desfavorables en ratas normales, hiperglucémicas y diabéticas inducidas por estreptozotocina inhibiendo la acción de la α -glucosidasa, mientras que para humanos se encontró que se puede disminuir la hiperglucemia, colesterol y triglicéridos (Andrade-Cetto et al., 2001; Revilla-Monsalve et al., 2007; Nicasio-Torres et al., 2009; Fortis-Barrera et al., 2019)

Los extractos acuosos de *C. obtusifolia* induce la secreción de insulina a través de la inhibición de los canales de K^+ sensibles al ATP, que despolarizan las células para abrir posteriormente los canales de Ca^{2+} que inducen la secreción de insulina, por lo que también es importante identificar a los compuestos responsables de la acción inhibitoria (Fortis-Barrera et al., 2019).

2.8 Métodos de extracción de compuestos bioactivos

La extracción es una técnica utilizada para la identificación y separación de compuestos bioactivos de plantas medicinales y depende del tipo de planta que se va a utilizar, así como de la naturaleza química de los compuestos bioactivos y las propiedades farmacológicas (Guerra, 2005).

Para elegir el método de extracción, se debe tomar en cuenta la naturaleza del material biológico de origen y de los compuestos a aislar, así como los objetivos como compuestos bioactivos desconocidos, estudio biodirigido de compuestos, grupo de compuestos relacionados estructuralmente, todos los metabolitos secundarios e identificación de los compuestos (Sarker et al., 2006).

Asimismo, Sarker et al. (2006) mencionan que las extracciones pueden ser selectivas o totales. Si una extracción es selectiva, el material vegetal se extraerá usando un solvente de polaridad apropiado, por ejemplo, no polar (*n*-hexano, éter, cloroformo), polaridad media (acetato de etilo, diclorometano) y polar (agua, etanol, metanol). El uso de estos solventes va a permitir que se tenga una separación preliminar de los metabolitos presentes en el material. Mientras que, si una extracción es total, se empleará un solvente orgánico polar (etanol, metanol o una mezcla alcohólica acuosa), en un intento de extraer todos los

compuestos posibles, esto se basa en la capacidad de los disolventes alcohólicos para aumentar la permeabilidad de la pared celular, facilitando la extracción eficiente de grandes cantidades de compuestos de polaridad media baja.

Entre los métodos más comunes de extracción se encuentran la extracción sólido-líquido, la maceración, extracción soxhlet, extracción líquido-líquido extracción por fluidos supercríticos y ultrasonido, entre otros (Thangaraj, 2016). La extracción sólido-líquido, se define como un proceso de separación en el que ciertas sustancias se disuelven de una matriz sólida mediante un solvente líquido. El disolvente utilizado debe ser capaz de disolver las sustancias presentes en el sólido; por tanto, su selección es importante para la eliminación cuantitativa de ellos y el rendimiento del proceso

La maceración es un método fácil y económico realizado a pequeña escala para obtener compuestos bioactivos. Su procedimiento se basa en la molienda de la planta en partículas pequeñas, para aumentar el área superficial y así obtener un mejor contacto con el agente extractor, enseguida se mezcla con el disolvente elegido, se da un tiempo de reposo y se separa el extracto mediante filtración al vacío. Para que la maceración se lleve a cabo, es necesario hacer uso del proceso de agitación, con el propósito de aumentar la difusión del solvente entre las partículas vegetales y eliminar la solución concentrada de la superficie de la muestra y obtener un mayor rendimiento de extracción (Azmir et al., 2013).

Cabe mencionar que los aceites comestibles, provienen de extracciones con solventes (Casado, 2018). La extracción más utilizada es la lixiviación, requiriendo además de un proceso de eliminación de los solventes (Pilco, 2015). Asimismo, es importante mencionar que varios aceites comestibles al final de su producción quedan con pequeños residuos de solventes, a nivel de lo que disponen las Normas Oficiales (González & Aramburo, 2011).

La extracción Soxhlet es utilizada para la comparación de varias alternativas de extracción. Se basa en colocar una pequeña cantidad de muestra seca en un cartucho, el cual se coloca junto con el disolvente dentro de un matraz de destilación hasta llevar a ebullición del solvente, finalmente se evapora hasta un condensador a reflujo y es recuperado. El proceso se repite la cantidad de veces que sea necesario hasta que la muestra quede agotada (Azmir et al., 2013; Nuñez, 2008).

Otro método de extracción es el líquido-líquido y se define como la separación selectiva de sustancias de una mezcla líquida utilizando combinaciones de solventes no miscibles o casi no miscibles, tiene como ventaja el alto rendimiento, mientras que el consumo de energía es mínimo, además de que la temperatura del proceso es más baja y se tiene un control directo de la selectividad (Othmer, 2018).

Por otra parte, la extracción de fluidos supercríticos tiene como objetivo principal la recuperación del 100% del analito para fines de cuantificación. El principal disolvente de esta técnica es el dióxido de carbono por sus características físicas de calidad alimentaria (Azmir et al., 2013).

Finalmente, el ultrasonido es un método basado en el fenómeno de la cavitación (producción, crecimiento y colapso de burbujas) utilizado de manera efectiva para la extracción de compuestos bioactivos de plantas facilitando la lixiviación (Azmir et al., 2013). El ultrasonido involucra dos principales fenómenos físicos que son la difusión a través de la pared celular y el contenido final de los compuestos en la célula después del rompimiento de las paredes (Azmir et al., 2013). Las ventajas de utilizar ultrasonido como método de extracción es la reducción del tiempo, la energía y uso óptimo del solvente.

Para obtener una buena y eficiente extracción es necesario cumplir con los factores contenido de humedad de la muestra, grado de molienda, tamaño de partícula y solvente a utilizar (Azmir et al., 2013).

2.9 Métodos analíticos para la identificación de compuestos bioactivos

Los fitocompuestos bioactivos de los grupos alcaloides, flavonoides, taninos, fenoles, entre otros son caracterizados mediante diferentes métodos analíticos, destacando las reacciones de coloración u oxido/reducción.

Los alcaloides son solubles en solventes orgánicos poco polares como cloroformo, mezclas derivadas de éste como son el éter o HCl al 5 %. De acuerdo con Sierra-Sarmiento et al. (2018), citado por (Codina et al., 1993), el método de extracción y fraccionamiento de los alcaloides consta de una eliminación de los pigmentos más lipófilos del extracto metanólico y acidificado de las partículas de las partes de la planta en estudio, hasta obtener diversos extractos enriquecidos de diferentes alcaloides.

Por otro lado, los flavonoides son compuestos polares y solubles en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible espectro son características a tomar en cuenta. Para realizar su estudio son importantes sus propiedades de solubilidad y comportamiento ante reacciones de color, así como las técnicas de cromatografía (Muñoz, Alvarado-Ortíz et al., 2014; Sierra-Sarmiento et al., 2018).

Los taninos son compuestos químicos de carácter fenólico, forman con el agua soluciones coloidales de reacción ácida y sabor astringente. Su estudio se basa en un ensayo con cloruro férrico que permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos o taninos (Sierra-Sarmiento et al., 2018).

2.9.1 Cromatografía

Otros de los métodos más utilizados para la identificación de compuestos bioactivos presentes en las plantas es la cromatografía (García, 2016).

La cromatografía se basa en la elución de los componentes de una muestra mediante una fase móvil a partir de una fase estacionaria, proporcionando la información necesaria sobre los componentes que se han separado, así como también el tiempo de retención característico de la estructura del compuesto y la señal de intensidad que esta relacionada con la cantidad del compuesto (García, 2016).

Los métodos cromatográficos más empleados son la cromatografía de capa delgada, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución (Waksmundzka-Hajnos et al., 2008). La cromatografía de gas es la más utilizada para análisis de compuestos volátiles y no polares, en la actualidad es acoplada con la espectrometría de masas, permitiendo la facilidad de medición del peso molecular y la identificación de cualquier compuesto (García, 2016; Waksmundzka-Hajnos et al., 2008).

Por otro lado, la cromatografía de líquidos de alta resolución es un método utilizado para el aislamiento de productos naturales y es combinada con el detector UV proporcionando separaciones altas y rápidas. La fase estacionaria más utilizada es la columna C18 empleando agua, acetonitrilo o mezclas de metanol.

2.9.1.1 Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (CCF), es un método utilizado para el análisis cualitativo de compuestos orgánicos simples o mezclas de éstos, siendo la fase estacionaria una capa delgada. El fundamento de esta cromatografía se basa en la distancia de migración de los componentes de la muestra durante un tiempo (Reich & Schibli, 2006) (Figura 10).

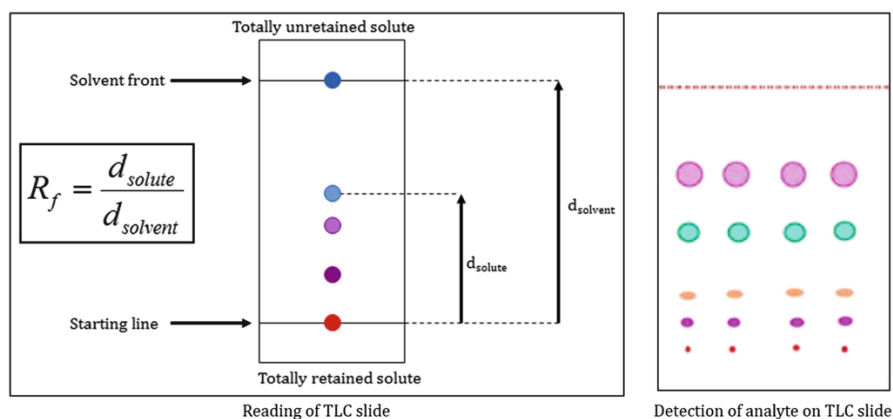


Figura 10. Cromatografía capa fina. Fuente: Sajid et al., 2018.

Es el tipo de cromatografía más simple y económico, ya que no requiere mucha instrumentación y se pueden separar varias muestras (Lundanes et al., 2014).

La separación de los compuestos se puede lograr utilizando diferentes tipos de fases estacionarias, la más utilizada es la de sílica gel (F₂₅₄), la F significará que estas placas tienen propiedades fluorescentes cuando se irradian una lámpara UV a 254 nm (Reich et al., 2006). Su actividad está relacionada con el contenido de agua en la placa, cuanto menor es el contenido de agua, mayor será la actividad (Lundanes et al., 2014).

Asimismo, es importante mencionar que la fase móvil, debe ser miscible y volátil de modo que puedan retirarse fácilmente de la placa de CCF, antes de la detección. De acuerdo con Cai (2014), se consideran tres criterios para elegir una fase móvil: solubilidad, afinidad y resolución. La fase móvil debe proporcionar la mayor solubilidad mientras equilibra la afinidad de la muestra por el disolvente, y la fase estacionaria para lograr la separación. La resolución se mejora optimizando la afinidad entre la muestra, el disolvente y la fase estacionaria. La mayoría de los sistemas de solventes de CCF contienen un solvente polar y un solvente cromatográficamente menos polar.

En la actualidad, se han desarrollado una variedad de sistemas de elusión en CCF para la separación de ácidos fenólicos. Los componentes más polares que se adsorben fuertemente en la superficie de sílice son el ácido clorogénico, elálgico o rosmarínico, haciendo uso de solventes que consisten en acetato de etilo: ácido fórmico: agua en diferentes proporciones (8:1:1, 65:15:10, 88:6:6). El ácido fórmico puede ser reemplazado por metanol, 1-propanol o 1-butanol. También se ha investigado la posibilidad de utilizar placas HPTLC de sílice de aminopropilo, debido a la fuerte adsorción de este tipo de adsorbente y a la obtención de resultados satisfactorios (Waksmundzka-Hajnos et al., 2008).

Por otro lado, para llevar a cabo la separación de cumarinas por CCF, se utilizan solventes polares débiles como éter de petróleo: dietiléter, tolueno:acetato de etilo y hexano:acetato de etilo, los cuales han demostrado un mejor desplazamiento de adsorción (Waksmundzka-Hajnos et al., 2008).

Finalmente, para flavonoides se recomienda que el extracto a utilizar se encuentre concentrado a 25 o 30% y los solventes a utilizar sean mezclas de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua en una composición de 100:11:11:26 (Wagner et al., 1984).

De acuerdo con Lundanes et al. (2014), las separaciones de CCF, se pueden realizar de dos formas, desarrollo vertical o ascendente y horizontal.

Desarrollo vertical o ascendente, es la forma más común de realizar la CCF, en este tipo de desarrollo se aplican muestras y patrones en la parte inferior de la placa, que posteriormente se coloca en una cámara

cerrada que contiene cierta cantidad de fase móvil. Las fuerzas capilares permiten que la fase móvil se eleve hacia la parte superior de la placa. Por otra parte, es importante mencionar que la evaporación de la fase móvil en la superficie juega un papel importante ya que tiene efecto sobre la separación (Figura 11).

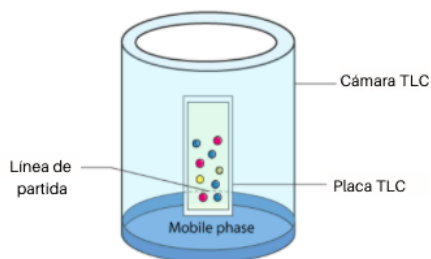


Figura 11. CCF ascendente. Fuente: Lundanes et al., 2014.

En el desarrollo horizontal, la placa cromatográfica con las muestras aplicadas se coloca mirando hacia abajo sobre espaciadores. Las fuerzas capilares mueven la fase móvil hacia el centro de la placa (Figura 12). La ventaja más importante es que la placa se puede utilizar para varias muestras.

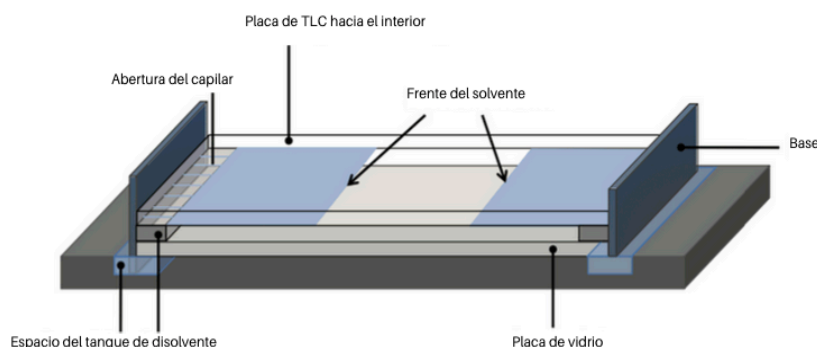


Figura 12. CCF horizontal. Fuente: Lundanes et al., 2014.

Para calcular el movimiento de un compuesto se utiliza el factor de retención (R_f). El R_f de un compuesto se describe como la distancia a la que eluye un compuesto dividido por la distancia desde la línea de aplicación hasta el frente de una fase móvil. Cuanto mayor sea el R_f , menor será la interacción entre el compuesto y la fase estacionaria (Sherma et al., 2003).

Una vez revelada la placa, la fase móvil debe eliminarse por vapor. Los compuestos separados pueden ser detectados a simple vista por su color (natural) o por fluorescencia (después de la irradiación con UV). Si se compara el tamaño y la intensidad de las manchas de la muestra con el tamaño y la intensidad de las

manchas de los estándares, se puede hacer una buena estimación de la concentración. Cuando los compuestos tienen propiedades absorbentes de rayos UV, las placas pueden ser impregnadas con reveladores fluorescentes, los cuales favorecen a la detección (ver Anexo 2).

3. ESTADO DEL ARTE

De acuerdo con estudios realizados por Andrade-Cetto, en el 2001, se reportan para México algunas plantas con efecto hipoglucémico, entre las que se encuentran el guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y la kina (*Exostema Caribaeum* (Jacq.) Roem & Schult). Por lo anterior, se realizó una búsqueda de información acerca de estas plantas, con el objetivo de emplearlas para este proyecto.

A continuación, se muestra los estudios más recientes para cada planta (Tabla 2 y Tabla 3).

Tabla 2. Investigaciones previas sobre la bioactividad de extractos de *Exostema caribaeum*

Planta	Tipo de preparación	Bioactividad	Referencia
<i>E. caribaeum</i>	Infusiones acuosas de corteza	<ul style="list-style-type: none"> Se hizo uso de cromatografía líquida de ultra alta resolución - matriz de fotodiodos (UHPLC-PDA). Los principales principios activos son 4-fenilcumarinas (2-8) y ácido clorogénico. La estructura del nuevo compuesto obtenido fue: 5-O-[β-D-xilopiranososa-(1→6)-β-D-glucopiranososa]-7,3',4'-trihidroxil-4-fenilcumarina Tiene un efecto hipoglucemiante. 	Pérez-Vásquez et al., 2013.
	Extractos metanólicos de corteza	<ul style="list-style-type: none"> Estos extractos poseen actividad <i>in vitro</i> anti parasitario (controla: <i>Plasmodium falciparum</i>) 	Guerrero-Analco et al., 2007
	Extractos metanólicos de tallos y corteza de una mezcla con Hintonia	<ul style="list-style-type: none"> Reducción de glucosa en sangre Demostrado en ratas estreptozotocina. Principios activos son: 4-fenilcumarinas 	

Tabla 3. Investigaciones previa sobre la bioactividad de extractos de *Cecropia obtusifolia*

Planta	Tipo de preparación	Bioactividad	Referencia
<i>C. obtusifolia</i>	Extractos etanólicos de hojas	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación de compuestos mediante HPLC. • Principios activos antimaláricos: dos flavonolignanós (1-2), ácido tormético y el β-sitosterol. • Actividad antiparasitaria sobre <i>Plasmodium falciparum</i>. 	Rivera-Mondragón et al., 2019
	Extractos acuosos de hojas	<ul style="list-style-type: none"> • Efectos analgésicos, antiinflamatorios, depresores del sistema nervioso central, baja toxicidad. 	Pérez-Guerrero et al., 2001
	Extracto acuoso de hojas	<ul style="list-style-type: none"> • Cuantificación de ácido clorogénico mediante HPLC. • Efecto hepatoprotector. • Se hicieron pruebas sobre la secreción de insulina en células RINm5F y sobre el metabolismo de carbohidratos en ratones (STZ) 	Fortis-Barrera et al., 2019
	Extractos metanólicos de callos de meristemos de yema apical.	<ul style="list-style-type: none"> • Se indujeron en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con reguladores de crecimientos. • Se observó que los cultivos in vitro mantuvieron la producción de compuestos bioactivos hipoglucemiantes (isoorientina y ácido clorogénico). • Se corroboró la actividad hipoglucémica en ratones. • Representa una alternativa para la multiplicación de plantas con potencial bioactivo. 	Nicasio-Torres et al., 2009
	Extractos metanólicos de hojas	<ul style="list-style-type: none"> • Mediante HPLC se cuantificó la isoorientina y ácido clorogénico. • Ambos son compuestos hipoglucemiantes, hipolipidémicos y antioxidantes 	
	Extractos acuosos de hojas	<ul style="list-style-type: none"> • Se determinaron constituyentes químicos por HPLC. • Los extractos fueron administrados diariamente a pacientes con diabetes tipo 2. • Hubo reducción de glucosa a partir de la cuarta semana. 	Revilla-Monsalve et al., 2007

Uno de los métodos más utilizados para conocer el potencial hipoglucemiante de las plantas es la evaluación de la actividad antioxidante, promovida por diversos constituyentes químicos como son los compuestos fenólicos, entre los que destacan la isoorientina, una isoflavona de la que se desconoce su mecanismo de acción hipoglucemiante, y el ácido clorogénico que posee actividad antiviral y hepatoprotectora (Gómez, 2013; Chaves-Ulate et al., 2019).

Las principales investigaciones de los compuestos polifenólicos y otros con potencial antioxidante presentes en plantas, se consignan en la Tabla 4.

Tabla 4. Investigaciones previas sobre principales compuestos con potencial antioxidante e hipoglucemiante presente en las plantas medicinales

Familia de compuesto	Constituyentes químicos	Vía metabólica de acción	Referencias
Alcaloides	Catarantinas, vindolina, vindolina vinblastina, vincristina.	Acción captadora de radicales libres	Singh et al., 2003. Al masri et al., 2009.
	Aegelin, marmesin, marmelosin	Regeneración de células β pancreáticas y secreción de insulina. Secreción de insulina y regeneración de células β	Kamalakkannan & Prince, 2005. Ponnachan et al., 1993
	Harmine, pinoline		Cooper et al., 2003. Kirtikar & Basu, 1993.
Flavonoides	Crisina, isoquercitrina Flavanoles, flavonas, flavanonas Quercetina, quercetina, apigenina, rutina, apigenina-7-O-glucósido Naringenina	Secreción de insulina	Roman-Ramos et al., 1995. Liu et al., 2004 Vuksan et al., 2000. Hussain et al., 2004. Jellin et al., 1994 Waltner-Law et al., 2002. Lemus et al., 1999.
	Kaempferitrina	Glucolisis	Jorge et al., 2004 Grover & Vats, 2000.
	(+) Catequina, (-) epicatequina, ácido clorogénico, liquiritigenina, isoliquiritigenina	Actividad insulinomemática	Kar et al., 2003. Wadood & Shah, 1989. Van de Venter et al., 2008.
	Kaempferol, isorhamnetina	Actividad captadora de radicales libres	Jellin et al., 1999.
Polifenoles y derivados	Taninos, ácido galotánico	Regeneración de células β pancreáticas y secreción de insulina.	Hannan et al., 2006.
	Ácido elágico, ácido corosólico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 3-O-	Digestión y absorción de carbohidratos,	Naisheng et al., 2008.

	metil protocatecuico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, kaempferol	secreción de insulina.	
	Mangiferin	Actividad inhibidora de la α -glucosidasa	Yoshikawa et al., 2001.
Saponinas	Estigmasterol, quercitol, ácido gimnémico IV 3-O- β -D-glucopiranosido 3-heptadecanoato, ácido 8-hexadecenoico, ácido hexadecenoico.	Regeneración de células β pancreáticas y secreción de insulina.	Sugihara et al., 2000. Preuss et al., 2004. Alipour et al., 2014. Mathews et al., 2006.

Durante los últimos 40 años, se cuentan con avances en la investigación de la extracción, detección, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos, como constituyentes medicinales y alimentarios (Soler, 2009). Para detectar la presencia de polifenoles totales y otros compuestos antioxidantes de extractos de plantas, se utilizan pruebas de detección por óxido-reducción principalmente, que, aunque su uso suele remplazarse por técnicas de HPLC, siguen siendo pruebas rápidas, eficaces, reproducibles y relativamente económicas, además se pueden optar por una amplia gama de disolventes ajustados a las necesidades de las muestras de interés (Khoddami et al., 2013; Thangaraj, 2016). En la Tabla 5, se pueden encontrar las herramientas rápidas de análisis utilizadas para la determinación de principios activos.

Tabla 5. Investigaciones previas sobre las herramientas analíticas relativamente rápida utilizadas para la determinación de principios activos

Muestra	Herramienta de análisis	Principio	Referencia
Extractos de flores, tallos de <i>silybum marianum</i>	IR	Flavonoides	Lozada-Ramírez et al., 2021.
Extractos etanólicos de <i>Spinacia oleracea</i>	Voltamperometría	Actividad antioxidante	Pérez-Cabeza et al., 2017
Extractos etanólicos de <i>Cimicifugae rhizoma</i>	Electroforesis capilar	Ácidos fenólicos	Mao et al., 2019
Extractos acuosos de cascarilla de arroz	IR	Compuestos fenólicos	Sánchez-Molina et al., 2018
Extractos metanólicos de hojas de distintas especies de cúrcuma	CCF	Compuestos fenólicos (ácido cafeico, ácido ferúlico)	Burman et al., 2019,

IR: Espectroscopia infrarroja, CCF: cromatografía capa fina

Debido a que se tiene el interés de incrementar la investigación sobre la composición química de guarumbo (*Cecropia obtusifolia* Bertol) y kina (*Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem & Schult), se propone realizar la determinación de sus compuestos, mediante métodos analíticos de detección por reacciones de oxidoreducción y cromatografía de capa fina, lo cual podría ser una estrategia efectiva, rápida y económica, para conocer cuáles son los compuestos antioxidantes.

4. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la Federación Internacional de la Diabetes y la OMS en 2019, México se encontró en el sexto lugar en prevalencia mundial de diabetes (WHO, 2020). La prevalencia promedio de diabetes en adultos es del 14%. Desde el 2015 hasta el 2019, se ha ido incrementando en regiones con bajos ingresos económicos, lo que dificulta el acceso a los medicamentos farmacológicos para su tratamiento (WHO, 2016).

Muchos compuestos antioxidantes, son utilizados en tratamientos de control de la diabetes basados en la inhibición de la α -glucosidasa y la α -amilasa.

En la actualidad, se han elaborado productos para el tratamiento de la diabetes a base de plantas medicinales con actividad hipoglucemiante y antioxidante, como fármacos, alimentos funcionales, nutracéuticos, condimentos y saborizantes para bebidas (Puentes, 2016).

Entre las más de 5000 plantas medicinales empleadas en México, se encuentran la kina (*E. caribaeum*) y el guarumbo (*C. obtusifolia*), las cuales poseen actividad hipoglucemiante (Juárez-Rosete et al., 2013; Castro et al., 2014; Aguirre, et al., 2016). A pesar de que se conocen algunas características botánicas y etnomédicas de estas plantas, se desconoce la diversidad de compuestos químicos con potencial antioxidante una propiedad que se aprovecha para el control del índice glucémico.

Es por esto, que ante las estadísticas de la diabetes en México y la disponibilidad de estas dos plantas con actividad hipoglucemiante, se pretende identificar los principales compuestos antioxidantes presentes en las plantas kina y guarumbo mediante pruebas analíticas rápidas de detección.

Se conoce que la abundancia y tipos de compuestos antioxidantes, relacionados con el potencial hipoglucemiante, varían de acuerdo a los métodos y solventes de extracción utilizados, por ejemplo, la extracción asistida por ultrasonido, es un método que ofrece selectividad, alta reproducibilidad, aumento de rendimiento, ahorro de energía, tiempos de extracción relativamente cortos, facilidad de penetración de disolventes, entre otros (Lavilla et al., 2017; Ojha et al., 2020).

Por su parte, los disolventes poseen características fisicoquímicas particularmente importantes en la extracción efectiva de compuestos bioactivos (Soto-García et al, 2016; Van Ngo et al., 2017).

Ante la disponibilidad de kina y guarumbo en México, específicamente en la Costa de Oaxaca, y ante la propuesta de métodos de extracción no convencionales (baño ultrasónico, extracción sólido-líquido y líquido-líquido) en combinación con solventes de extracción de polaridad media (acetato de etilo y dicloruro de metilo), y pruebas rápidas de detección de principios químicos, este proyecto

pretende sentar las bases para la extracción de compuestos antioxidantes, como una alternativa relativamente económica, considerando que dichos compuestos podrían ser útiles como ingredientes funcionales para el desarrollo de nuevos alimentos y/o medicamentos con potencial para el control de la diabetes.

5. HIPÓTESIS

Los extractos orgánicos de polaridad media de hojas de *E. caribaeum* (Jacq.) Roem & Schult y *C. obtusifolia* Bertol, poseen familias de compuestos antioxidantes.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antioxidante y contenido de fenoles totales, así como determinar familias de compuestos de extractos orgánicos de hojas de *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem & Schult y *Cecropia obtusifolia* Bertol.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad antioxidante de extractos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*, mediante el método 2,2,-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH).
2. Evaluar el contenido de polifenoles totales (CPT) de extractos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*, mediante el método Folin-Ciocalteu.
3. Detectar familias de compuestos químicos de las fases orgánicas y acuosas de los extractos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*, mediante reacciones químicas y cromatografía de capa fina.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Como se describe en la Figura 13, en este proyecto las hojas secas de kina y guarumbo se sometieron a diferentes procesos de extracción sólida-líquida y líquida-líquida, asistida por ultrasonido y solventes polares (agua, metanol y etanol acidificado). Posteriormente se determinó la actividad antioxidante (AA) y el contenido de polifenoles totales (CPT). Finalmente, para la determinación de la presencia de alcaloides, ácidos fenólicos, lactonas insaturadas, saponinas, esteroides y triterpenos se utilizaron pruebas de oxidación-reducción, y se utilizó CCF para la detección de compuestos flavonoides y ácidos fenólicos.

A continuación, se presenta el diagrama general de flujo de la metodología utilizada para la realización de este proyecto (Figura 13).

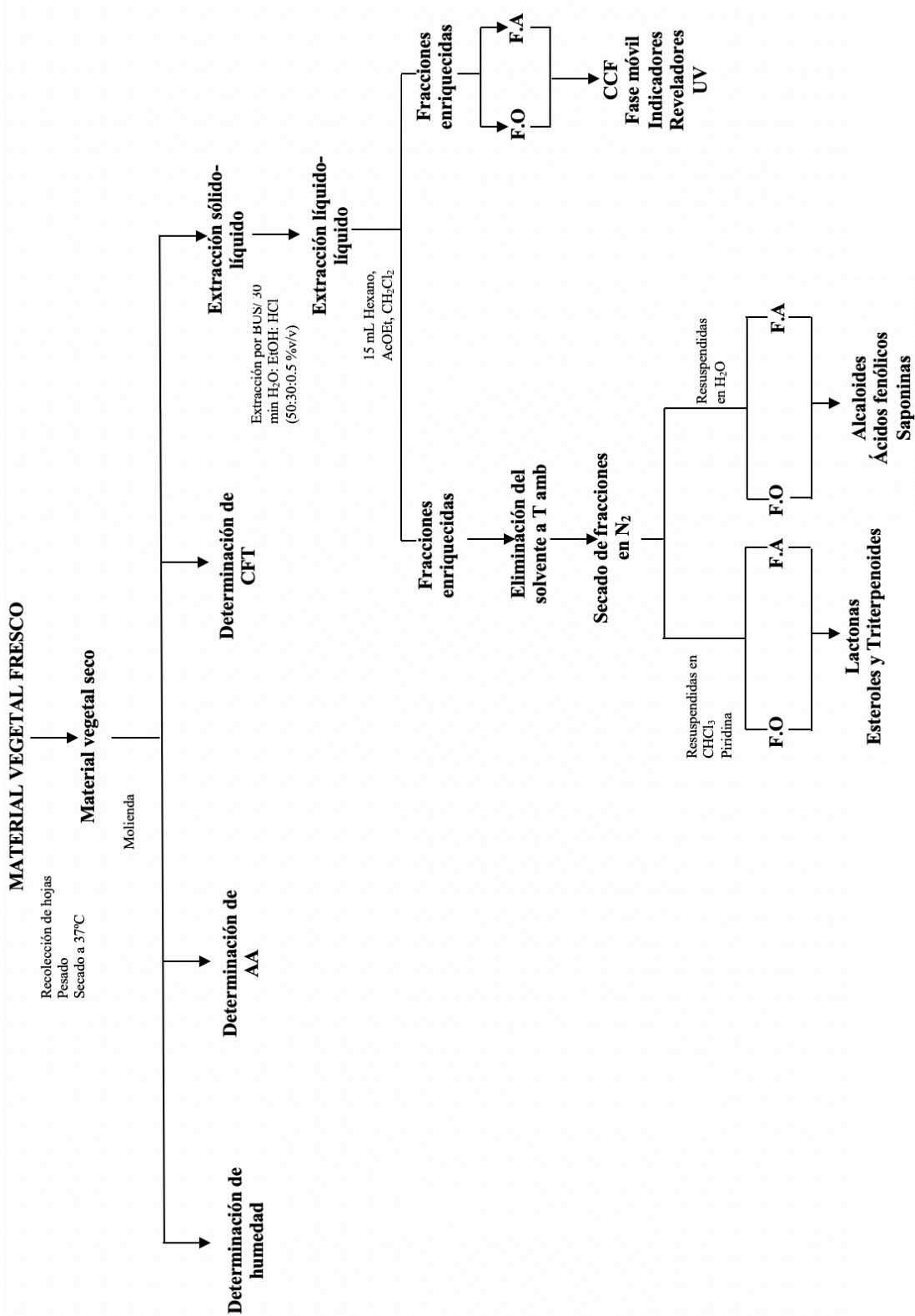


Figura 13. Diagrama de flujo general para el análisis de compuestos orgánicos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*.

AA: Actividad antioxidante, DPPH: 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl, BUSI: Baño Ultrasonico CPT: Contenido de polifenoles totales, EtOH: Etanol, H₂O: Agua, HCl: Ácido clorhídrico, AcOEt: Acetato de etilo, CH₂Cl₂: Diclorometano, F.A : Fase acuosa, F.O : Fase orgánica, T amb: Temperatura ambiente, N₂: Nitrogeno, CHCl₃: Cloroforno, CCF: Cromatografía en capa fina, UV: Espectrofotometría Ultravioleta-Visible.

8.1 Colecta e identificación de muestra

Las plantas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia* se recolectaron en el municipio de San Isidro Apango (Longitud 15.820678; Latitud -96.353739) y San Pedro Pochutla (Longitud 15.821080; Latitud -96.353977) Oaxaca. El material biológico fue recolectado en la mañana y fue transportado al laboratorio, siguiendo las buenas prácticas de manejo de muestras. Se preparó un ejemplar de cada planta para su envío al herbario y su respectiva identificación botánica.

El ejemplar fue preparado de acuerdo a lo indicado por Pérez et al. (2021), en donde hojas maduras y flores de las plantas fueron colocadas en una hoja de periódico doblada a la mitad (45 x 30 cm), cuidando que todas las partes de la planta quedaran extendidas. Posteriormente, se prosiguió a colocar las hojas de papel entre dos cartones corrugados de las mismas dimensiones. Finalmente, se prensaron los ejemplares con una rejilla de madera y se ataron para ejercer la presión. Los datos de campo, se registraron en una libreta, los cuales incluyeron nombre común, estado, punto de referencia, coordenadas geográficas de latitud y altitud, hora y fecha de recolección.

8.2 Preparación de las muestras

Se separaron las hojas de las plantas, posteriormente, se pesaron y se secaron en una estufa de vacío (JP Selecta, Vaciotem-T) convencional a temperatura de 37 °C durante 2 horas, se trituraron hasta un tamaño aproximado de partícula de 0.25 µm utilizando un molino pulverizador Krups®.

8.3 Determinación de la humedad de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*

Para la determinación de la humedad de las hojas de cada una de las plantas, se pesaron por triplicado 3 g de hojas recolectadas en una balanza digital electrónica (Denver Instrument), utilizando cápsulas de porcelana puestas previamente a peso constante.

8.4 Obtención de extractos

8.4.1 Preparación de extractos hidrometanólicos

Para la extracción hidrometanólica de compuestos se pesaron por triplicado 0.1 g de muestra seca y adicionaron 5 mL de MeOH (PanReac AppliChem) al 80%, sonicando en baño ultrasónico (Marca Fisher Scientific, modelo FS36H) por 30 min. En seguida, las muestras se centrifugaron a 1820 rpm por 10 min para recuperar el sobrenadante y se volvió a extraer con 5 mL de MeOH al 80% (Figura 14) y se continuó con la centrifugación y la recuperación del sobrenadante. Posteriormente, se filtró el extracto orgánico total

a través de una pipeta Pasteur empacada con fibra de papel (Whatman). El extracto hidrometanólico se guardó en un vial ámbar hasta su análisis.



Figura 14. Extractos hidrometanólicos de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*

8.4.2 Preparación de extractos metanólicos acidificados

Se realizó una extracción de compuestos fenólicos a partir de 0.5 g de hojas seca, a los cuales se le adicionaron con 5 mL de MeOH acidificado con HCl al 1%, posteriormente se sonicó en baño ultrasónico por 30 min. Se prosiguió a centrifugar a 1820 rpm por 10 min, recuperando el sobrenadante. Se extrajo nuevamente con 5 mL de MeOH acidificado con HCl al 1%, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se filtró el extracto orgánico total a través de una pipeta Pasteur empacada con fibra de papel. El extracto metanólico acidificado obtenido se guardó en un vial ámbar hasta su análisis.

8.4.3 Preparación de extractos hidroetanólicos acidificados

1 g hojas secas se sometieron a dos extracciones, en baño ultrasónico por 30 minutos, con una solución hidroetanólica acidificada H₂O: EtOH: HCl (70:30:0.5% v/v). Después de la extracción, el sobrenadante fue decantado y filtrado a través de tela y papel filtro mediante vacío en un embudo Büchner y matraz kitasato.

8.4.4 Obtención de las fracciones enriquecidas

Se realizó una extracción líquido-líquido mediante separación de fases. En un embudo de separación se adicionaron 15 mL del extracto hidroetanólico acidificado junto con 15 mL de hexano. Lo mismo se realizó

utilizando acetato de etilo (AcOEt) y diclorometano (CH_2Cl_2) por separado. En seguida, se agitó, se expulsaron los gases contenidos y cada embudo de separación se dejó reposar por 15 min, separando las fases orgánicas y fases acuosas (Figura 15).

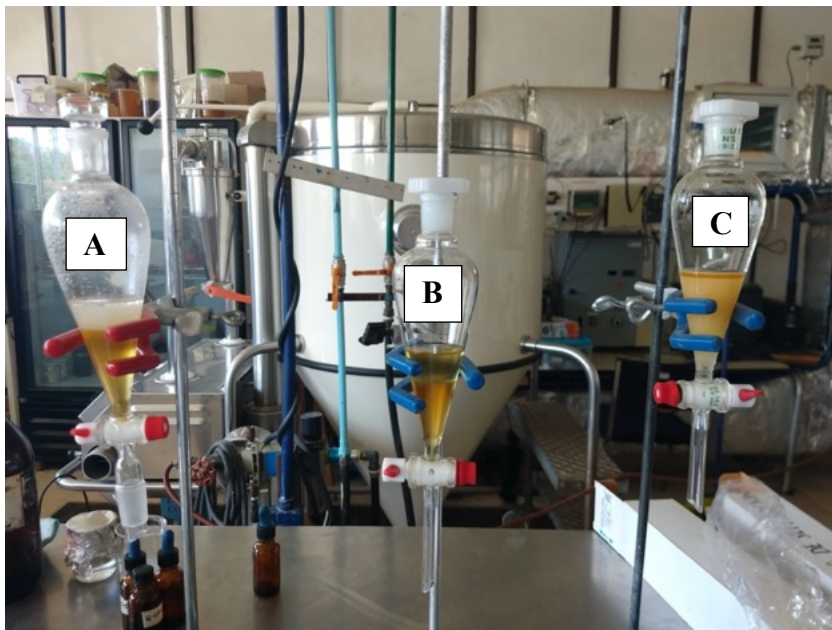


Figura 15. Extracción líquido-líquido del extracto hidroetanólico acidificado . A: Hexano, B: AcOEt, C: CH_2Cl_2

8.4.5 Acondicionamiento de las fracciones enriquecidas

Las fases orgánicas y acuosas, fueron llevadas a sequedad mediante su exposición al ambiente fresco y oscuridad, para eliminar los solventes por evaporación.

8.4.6 Preparación de las fases orgánicas y acuosas de las fracciones enriquecidas

4 mL de las fases orgánicas y acuosas de los extractos fraccionados adicionados en frascos color ámbar, se concentraron utilizando N_2 . Las muestras concentradas se guardaron en refrigeración hasta su uso para las pruebas de detección por reacciones de óxido reducción.

8.5 Preparación de reactivos

8.5.1 Preparación de solución DPPH

Para la solución de DPPH se pesaron 3.9 mg de DPPH y se aforó a 100 mL con MeOH al 80%, sonicando en baño ultrasónico por 20 min.

8.5.2 Preparación de la curva standard de actividad antioxidante

Se pesaron 25 mg de ácido ascórbico (grado ACS) y se aforó a 100 mL con metanol al 80%. De esta solución estándar, se prepararon diluciones a distintas concentraciones (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 mg/mL), utilizando tubos de ensayo de 10 mL, previamente forrados con papel aluminio.

8.5.3 Preparación de reactivo de Folin-Ciocalteu

El reactivo de Folin-Ciocalteu (Hycel) 2M se preparó a una relación 1:1 con agua destilada.

8.5.4 Preparación de la curva standard de Contenido de Polifenoles Totales

Para la preparación de la curva standard se pesaron 26 mg de ácido gálico (Sigma) (grado ACS) y se aforó a 100 mL con agua destilada. A partir de la solución estándar (36 mg /100 mL) se prepararon diluciones a distintas concentraciones (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 mg/100 mL), utilizando tubos de ensayo de 10 mL, previamente forrados con papel aluminio.

8.5.5 Preparación de reactivo de Dragendorff

El reactivo de Dragendorff se preparó con 1.7 g de nitrato básico de bismuto en 20 g de ácido tartátrico en 80 mL y 16 g de yoduro de potasio en 40 mL de agua.

8.5.6 Preparación de reactivo de Mayer

El reactivo de Mayer fue preparado con 13.5 g de cloruro de mercurio (II), 49.8 g yoduro de potasio disueltos cada uno en 20 mL de agua y agregando 15 mL de ácido clorhídrico.

8.5.7 Preparación de reactivo de Legal

La solución legal se preparó por 2 a 3 gotas de piridina, 1 gota de solución de nitroprusiato de sodio al 0.5% y 4 gotas de hidróxido de potasio 2N.

8.5.8 Preparación de fase móvil para la detección de flavonoides

Para la detección de flavonoides, se prepararon las fases móviles acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-H₂O (100: 11:11:26), n-hexano-acetato de etilo-ácido acético glacial (10.3:4.6:1.6) y cloroformo-metanol-ácido fórmico (5:4:1), mientras que las sustancias de referencia (estándares), fueron el ácido gálico, naringenina, kaempferol, quercetina e hidrato de morina.

8.5.9 Preparación de fase móvil para la detección de ácidos fenólicos

Se prepararon las fases móviles butanol-ácido acético-H₂O (5:1:2.6), benceno-metanol (95:5), cloroformo-acetato de etilo-acetona-ácido fórmico (40:30:20:10) y cloroformo-metanol-ácido acético (90:10:1); como sustancias de referencias al ácido ferúlico, ácido-p-cumárico, ácido siríngico, ácido sinápico, ácido de vainilla, ácido-trans-ferúlico, ácido clorogénico, ácido valérico y ácido ferúlico.

8.6 Determinación de la actividad antioxidante

Se utilizó el método de 2,2,-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) para la determinación de AA. Primero se preparó la curva estándar (ver sección 8.5.2), seguido para realizar la reacción de óxido reducción, y posteriormente cuantificar a AA, 100 µL de cada una de las diluciones del estándar (ácido ascórbico) se agregaron a una celda espectrofotométrica y se adicionó 2.9 mL de solución de DPPH dejando reposar por 30 min, también se preparó un control utilizando una muestra de metanol al 80% tratada de la misma forma con DPPH. Para calibrar el equipo se utilizó como blanco una alícuota de agua destilada, midiendo la absorbancia a 517 nm. Para evaluar la AA de la muestra, se adicionaron 100 µL de extracto hidrometanólico (ver sección 8.4.1) a una celda de cuarzo seguido de 2.9 mL de solución de DPPH, se dejó reposar 30min y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 201, Thermo Scientific) a 517 nm. Una vez obtenidas las concentraciones de ácido ascórbico (mg/100mL), se prosiguió a realizar la siguiente ecuación.

$$\text{mg} \frac{\text{EAA}}{\text{gss}} = \left[\frac{\left(\frac{x}{100 \text{ mL}} \right)}{\left(\frac{(w \text{ muestra})(1 - b. h)}{V} \right)} \right] (\text{F. D})$$

Dónde:

X= Concentración de ácido ascórbico (mg / 100 mL)

W= Peso de la muestra (g)

b.h= Humedad de la muestra

V= Volumen de muestra (mL)

F.D = Factor de dilución

Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido ascórbico por g de sólido seco (mg EAA/gss).

8.7 Contenido de polifenoles totales

El método de Folin-Ciocalteu fue utilizado para la determinación del contenido de polifenoles totales (Kupina et al., 2018). En un tubo de ensaye de 10 mL se agregó 2.6 mL de agua destilada y 2 mL de Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich) al 7 %. Se agitó con vortex por 1 min y se adiciono 200 μL de cada concentración de ácido gálico (ver sección 8.5.4), 200 μL de muestra (ver sección 8.4.2) y 200 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N (ver sección 8.5.3). Finalmente se dejo reposar por 1 h y después se midió la absorbancia a 750 nm. Para la calibración del equipo se utilizó agua destilada, como solución blanco, y como control se utilizó MeOH acidificado con HCl al 1%, sometido a la misma mezcla de reacción con Na_2CO_3 al 7 % y Folin-Ciocalteu 1N.

Una vez obtenidas las concentraciones de ácido gálico (mg/100mL), se prosigió a realizar la siguiente ecuación.

$$\text{mg} \frac{\text{GAE}}{\text{gss}} = \left[\frac{\frac{(x)}{100 \text{ mL}}}{\frac{(\text{w muestra})(1 - \text{b. h})}{V}} \right] (\text{F. D})$$

X= Concentración de ácido gálico (mg / 100 mL)

W= Peso de la muestra (g)

b.h= Humedad de muestra

V= Volumen de muestra (mL)

F.D = Factor de dilución

Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por g de sólido seco (mg GAE /gss).

8.8 Detección de familias de compuestos químicos

Para las pruebas de Liebermann-Burchard y Legal, los residuos sólidos fueron resuspendidos en cloroformo (CHCl_3) y piridina respectivamente, mientras que para las pruebas restantes estas muestras se resuspendieron en 3 mL de agua destilada (Figura 16).

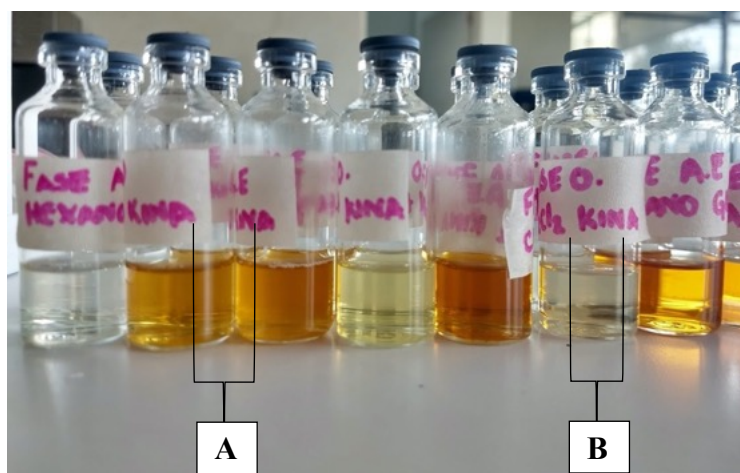


Figura 16. Fracciones orgánicas (A) y acuosas (B) de las fracciones enriquecidas de extractos hidroetanolicos de hojas de *E. caribaeum*

En las fracciones resuspendidas se realizó un tamizaje fitoquímico de alcaloides, ácidos fenólicos, saponinas, lactonas insaturadas, esteroides y triterpenoides mediante pruebas específicas de óxido reducción. Por cada especie química se realizaron 3 repeticiones.

8.8.1 Detección de alcaloides mediante la Prueba de Dragendorff

Se tomó 200 μL de las fracciones resuspendidas, se le adicionó 200 μL de ácido clorhídrico 8.76 M y se agitó. La muestra se filtró mediante papel filtro. A la solución filtrada se le adicionó de 1 a 2 mL del reactivo de Dragendorff (ver sección 8.5.5). Finalmente, el precipitado amarillo sobresaliente indicó que la prueba resultó positiva, indicando la presencia de alcaloides (Thangaraj, 2016).

8.8.2 Detección de alcaloides mediante la Prueba de Mayer

200 μL de las fracciones resuspendidas, se les adicionó 200 μL de ácido clorhídrico 8.76 M + 20 μL del reactivo de Mayer (ver sección 8.5.6). La formación de un precipitado blanco lechoso es una prueba positiva (Lock, 1988).

8.8.3 Detección de ácidos fenólicos

A 200 μL de muestra resuspendida se le adicionó 20 μL de la solución de FeCl_3 al 5%. Un cambio a color verde oscuro, azul, negro o violeta indicó a presencia de ácidos fenólicos. Si el cambio fue a verde oscuro indicó la presencia de fenoles (Robles-García et al, 2016).

8.8.4 Detección de saponinas

En un matraz tubo de ensayo, se tomaron 1.5 mL de las fracciones resuspendidas, con 1.5 mL agua destilada. Después, se agitó la suspensión durante 30 segundos. Finalmente, si la muestra presentaba una capa de espuma de 2 cm indicaba la presencia de saponinas (Thangaraj, 2016).

8.8.5 Detección de lactonas insaturadas

En 4 μL de las fracciones resuspendidas se adicionaron 100 μL de la solución legal (ver sección 8.5.7). Las coloraciones rojo, azul, rosa o violeta, indicaron la presencia de lactonas (Marcano & Hasegawa, 2002).

8.8.6 Detección de esteroides/triterpenoides

Se disolvió 500 μL de las fracciones resuspendidas del extracto en 1 gota (compuesta por 1 mL de ácido acético anhidro y una a dos gotas de ácido sulfúrico concentrado) lentamente a lo largo del tubo de ensayo. Si hubo cambios de color indicaba la presencia de esteroides y triterpenoides (Thangaraj, 2016).

8.9 Detección cromatográfica de compuestos fenólicos

La detección de flavonoides y ácidos fenólicos, se realizó en las fases orgánicas y acuosas, tanto las hidratadas como las concentradas con N_2 , mediante CCF, en placas de sílica gel 60F₂₅₄ (Marca Merck, FG254 de 3 x 10 cm).

8.9.1 Cromatografía en capa fina para flavonoides

En una placa de sílica gel 60F₂₅₄, se trazó dos marcas de aproximadamente 1 cm con un lápiz fino en los bordes superior e inferior, para no perder el punto de aplicación. Se colocaron en la placa de sílica 10 μL de muestra y 5 μL del estándar con capilares, los cuales previamente deben ser estirados en la flama del mechero, con el fin de que tengan el diámetro adecuado. Posteriormente, la placa se colocó de forma inclinada en una cámara de vidrio haciendo contacto con la fase móvil (ver sección 8.5.8). Terminada la elución, la placa se secó con una secadora y se analizó en luz UV-254nm (Wagner et al., 1984; Waksmundzka-Hajnos et al., 2008)

8.9.2 Cromatografía en capa fina para ácidos fenólicos

Se realizó el mismo procedimiento mencionado en la sección 9.1 La placa se colocó de forma inclinada en una cámara de vidrio haciendo contacto con la fase móvil (ver sección 8.5.9). Terminada la elución, la placa se seco y se le roció el revelador vainillina. Finalmente, la placa se observó en luz UV-254 o UV-366 nm, para la detección de fenoles (Lorenzo et al., 2006).

8.10 Análisis estadístico

Se realizó un muestreo al azar de las dos plantas, para la extracción se realizó una repetición por especie vegetal. El tamizaje fitoquímico se realizó por triplicado. Asimismo, se realizaron 3 repeticiones para la determinación del contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante, los valores promedio obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y una comparación de medias mediante una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la experimentación se presentan en tres apartados. En el primero, se muestran los resultados obtenidos de la determinación del contenido de humedad. Para el segundo apartado, se presentan los resultados de actividad antioxidante (AA), contenido de polifenoles totales (CPT) y detección de compuestos de los extractos orgánicos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia* mediante reacciones de óxido-reducción. Finalmente, se presenta la cromatografía de capa fina (CCF)

9.1 Determinación del contenido de humedad.

La Tabla 6, presenta el porcentaje promedio de contenido de humedad de las muestras de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*.

De acuerdo con Elzaawely et al. (2011), el contenido de humedad en muestras biológicas que son llevadas a sequedad es importante para evitar el crecimiento de bacterias y para que la composición de las muestras se mantenga estable.

Tabla 6. Contenido de humedad, de hojas secas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*

Muestra	Contenido de humedad (%)
<i>E. caribaeum</i>	4.3±0.01
<i>C. obtusifolia</i>	6.8±0.02

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

Para conservar las muestras, éstas deben ser almacenadas en condiciones secas (con humedad relativa menor a 45%, preferentemente) hasta su uso (Banchero, 2008).

9.2 Actividad antioxidante y detección de metabolitos secundarios de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*.

9.2.1 Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante

En la Tabla 7, se consignaron los resultados de la cuantificación de CPT Y AA de los extractos de las hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia* (ver Anexo 3, 4, 5 y 6).

Tabla 7. Contenido de polifenoles totales (CPT) y actividad antioxidante (AA) de extractos de hojas de *E.caribaeum* y *C. obtusifolia*

Muestra	CPT (mg GAE/gss)	AA (mg EAA/gss)
	Extracto metanólico acidificado	Extracto hidrometanólico
<i>E. caribaeum</i>	110.8± 25.6 ^a	12.9± 0.2 ^b
<i>C. obtusifolia</i>	41.8 ± 11.6 ^b	57.7 ± 26.3 ^a

GAE: equivalentes de ácido gálico estándar, EAA: equivalentes de ácido ascórbico, gss: gramos de sólidos secos.

Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

^{a,b} : medias en la misma columna con diferente letras, son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$)

Se observaron diferencias significativas entre el CPT de los extractos hidrometanólicos acidificados de hojas de kina y guarumbo (Tabla 7), registrándose un mayor valor para kina, probablemente porque su extracto contiene mayor cantidad de compuestos antioxidantes, entre ellos los flavonoides y los ácidos fenólicos (Castro et al., 2014), en comparación con el extracto de hojas de guarumbo, lo cual se confirmará con la abundancia cualitativa que sugiera la intensidad de color y la forma de los spots que se observen en la CCF para flavonoides y ácidos fenólicos (apartado 10.3.2).

Como se mencionó anteriormente, no hay investigaciones previas sobre el contenido de polifenoles totales en extractos metanólicos acidificados de hojas de kina y guarumbo.

El CPT observado en muestras de kina y guarumbo, también se podría explicar considerando que la extracción de compuestos polifenólicos a partir del material vegetal, puede depender del disolvente empleado (Muñoz et al., 2015).

Los solventes de polaridad media, como el metanol acidificado utilizado en este proyecto, extraen compuestos polares como los flavonoides y las saponinas, mismos que presentan mayor captación por el DPPH (Bohorquez, 2016). En general, los compuestos antioxidantes, pueden ser extraídos con solventes orgánicos sin perder sus propiedades funcionales (Ramírez, 2020).

De acuerdo con Giraldo (2011), los compuestos fenólicos son abundantes en diferentes especies de la familia Rubiaceae, familia a la que pertenece la kina, por lo que probablemente estos compuestos pudieron ser detectados en el extracto metanólico acidificados de hojas de kina.

Por su parte, al guarumbo se le ha atribuido propiedades antimicrobianas y antioxidantes, relacionadas con compuestos fenólicos (Garro et al, 2015). De acuerdo con Gutiérrez (2020), mediante el método de Folin-Ciocalteu fue posible detectar una concentración de 12.21 mg/mL de polifenoles, en extractos acuosos de hojas de *Urera baccifera* una especie perteneciente a la familia Urticaceae, familia a la que pertenece el guarumbo.

Para extractos acuosos de hojas de las plantas *Taraxacum officinale* y *Cynara scolymus*, plantas de la familia Urticaceae, se ha reportado un contenido de polifenoles de 22.3 y 0.9 mg de GAE/gss, respectivamente, de acuerdo a lo reportado por Jaramillo (2014), mientras que para los extractos hidroalcohólicos de *Uncaria tomentosa* se obtuvo 6.47 mg de GAE/gss (Romero et al., 2014).

Cabe destacar, que los compuestos fenólicos por su importante potencial como reductores del estrés oxidativo, podrían ayudar al control de la diabetes (Muritala et al., 2017).

No hay investigaciones previas que reporten la AA de extractos hidrometanólicos de hojas de kina y guarumbo.

Con respecto a la AA de los extractos hidroetanólicos de hojas (Tabla 7), se obtuvo casi cinco veces más actividad para guarumbo que para kina. Se esperaba que en los extractos de hojas de kina se hubiese registrado mayor AA, por haber obtenido el mayor contenido de polifenoles.

Los compuestos fenólicos son, por lo general, las sustancias más abundante presentes en fuentes de origen vegetal (Quiñones et al., 2012), por lo que, en muchas ocasiones su presencia correlaciona con los valores de actividad antioxidante (Giraldo, 2011; Garro et al., 2015).

Aquí cabe señalar, que es posible que la extracción asistida por baño ultrasónico fue uno de los factores que afectó a la concentración de los compuestos fenólicos principalmente de los extractos de hojas de kina, aunque para concluir esto será necesario realizar las pruebas enalíticas pertinentes.

Se sabe que las características estructurales de los compuestos fenólicos marcan un importante efecto en la actividad antioxidante de muchos extractos de plantas (Katalinic et al., 2006), sin embargo, como lo reportaron Muñoz et al. (2007), la capacidad antioxidante de una especie vegetal no depende únicamente de la suma de las capacidades antioxidantes de cada metabolito que posee, también dependerá del sinergismo o antagonismo químico que se genere entre dichos constituyentes químicos.

Existen otros tipos de fitoquímicos a los que también se les puede atribuir parte de la actividad antioxidante como los terpenoides, saponinas y alcaloides (Hatami et al., 2014).

Diversas investigaciones han reportado que la AA de extractos de hojas y otras partes de plantas de la familia Urticaceae y Rubiaceae, está relacionada con la presencia de flavonoides y taninos (Nicasio-Torres et al., 2009; Pérez-Vásquez et al., 2013; Rivera-Mondragón et al., 2019). En particular, la presencia del ácido clorogénico, un ácido fenólico, y el flavonoide C-Glicósido explican la AA de extractos acuosos de hojas de guarumbo según Fortis-Barrera et al. (2019).

De acuerdo a Andersen et al., (2006), los extractos etanólicos de la planta completa de *Cecropia glaziovii* planta de la familia Urticaceae, contienen el flavonoide isovitexina, el cual posee un eficiente potencial antioxidante y efectos positivos en el control de la presión arterial. Por su parte, el flavonoide isorientina es el principal C-glicosil flavonoide de *Cecropia pachystachya* (Della et al., 1988), en cual es uno de los compuestos responsables de la AA. Lo anterior sugiere que estos compuestos podrían ser algunos de los responsables de la AA de plantas del género *Cecropia*.

Finalmente, para los resultados obtenidos en la determinación de CPT y AA, se observó que tanto la extracción asistida por baño ultrasónico, como la extracción realizada mediante la mezcla metanol/agua, resultaron eficientes, ya que fue posible detectar a los polifenoles y evaluar la actividad antioxidante. De acuerdo con Biesaga (2011), los flavonoides extraídos de tejidos de maíz son compuestos más solubles en metanol que en agua, estos resultados se podrían deber a que el agua al ser polar causa una hidratación interna del material vegetal con el que tiene contacto, lo que aumenta el área superficial y la eficiencia de contacto con un segundo disolvente, por consiguiente, en este estudio la solubilidad de los flavonoides, y otros compuestos fenólicos, probablemente sucedió mayormente en el metanol que en el agua (Pérez-Najera et al., 2013; Biesaga, 2011).

Cabe destacar además, que muchos compuestos antioxidantes promueven un buen funcionamiento de las células β de mamíferos, lo que representa un mecanismo de acción que podría ayudar al control de la diabetes (Peng et al., 2016).

9.2.2 Análisis Fitoquímico de las fases orgánicas y acuosas de los extractos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*.

El análisis fitoquímico mediante pruebas de óxido-reducción, indicaron la ausencia (-), la presencia moderada (+) y la intensa presencia (++) de la familia de compuestos alcaloides, saponinas, ácidos fenólicos, lactonas insaturadas, esteroides y triterpenoides (Anexo 7 y 8). En la Tabla 8, se reportan los metabolitos secundarios detectados en dos fases de las fracciones enriquecidas de hexano, acetato de etilo y diclorometano de los extractos hidrietanólicos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*.

A continuación, se discuten los resultados con respecto a cada una de las pruebas de óxido-reducción.

Para la prueba con el reactivo Dragendorff (solución concentrada de yoduro de potasio en solución de subnitrito de bismuto acidificado), los resultados indicaron la ausencia de alcaloides en el extracto hidroetanólico acidificado de hojas tanto de kina como de guarumbo (Tabla 8). Al respecto, Froelich et al. (2006), reportaron que muchas de las especies de la familia Rubiaceae, familia a la que pertenece la kina, no produce alcaloides.

Por el contrario, para la prueba con el reactivo de Mayer (solución de bicloruro de mercurio y yoduro de potasio), únicamente las fases acuosas de las fracciones obtenidas con hexano, acetato de etilo y diclorometano del extracto hidroetanólico de hojas de kina y guarumbo, mostraron la presencia de alcaloides (Tabla 8). Esto puede deberse al uso de disolventes con polaridad media a alta (como el acetato de etilo y el diclorometano), los cuales presentan mayor sensibilidad de extracción de los alcaloides (Sarker et al., 2006).

Tabla 8. Pruebas de óxido reducción para extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*

<i>Exostema caribaeum</i>								
Fracción enriquecida	Fase	Familia de compuestos						
		Alcaloides		Ácidos fenólicos	Saponinas	Lactonas insaturadas	Esteroles	Triterpenoides
		Dragendorff	Mayer	FeCl ₃	Espuma	Legal	Liebermann – Burchard	
Hexano	F. O	-	-	++	-	++	-	-
	F. A	-	++	++	-	++	-	-
AcOEt	F. O	-	-	++	-	++	-	-
	F. A	-	++	++	++	++	-	-
CH ₂ Cl ₂	F. O	-	-	-	++	++	-	-
	F. A	-	++	-	+	++	-	-
<i>Cecropia obtusifolia</i>								
Hexano	F. O	-	-	-	-	++	-	-
	F. A	++	++	++	++	++	-	-
AcOEt	F. O	++	++	++	-	++	-	-
	F. A	-	++	++	++	++	-	-
CH ₂ Cl ₂	F. O	-	-	-	++	++	-	-
	F. A	++	-	++	++	++	-	-

F.O: Fase orgánica, F. A: Fase acuosa, AcOEt: Acetato de etilo, CH₂Cl₂: Diclorometano, (-): ausencia del metabolito, (++): intensa presencia del metabolito, (+): moderada presencia del metabolito.

La prueba de alcaloides con el reactivo de Dragendorff en los extractos de hojas de guarumbo, mostraron resultados positivos en las fases acuosas de las fracciones obtenidas con hexano y diclorometano, así como en la fase orgánica de las fracciones obtenidas con acetato de etilo. Por su parte, en la prueba de Mayer se observó la intensa presencia de alcaloides en la fase acuosa de las fracciones obtenidas con hexano y en ambas fases (F.O y F.A) de acetato de etilo (Tabla 8). Esto concuerda con lo publicado por

Espinoza (2014), que ha cuantificado alcaloides para *C. obtusifolia*, haciendo uso de solventes no polares, como el hexano, y de polaridad intermedia y carácter básico, como el acetato de etilo.

Compuestos alcaloides como la catarantina, vindolina y vincristina, poseen potencial antioxidante, en contraste, estudios demuestran que poseen un débil efecto hipoglucemiante en ratones modelo (Martínez & Cano, 2009). Los alcaloides son poco estables a las condiciones reactivas de las células de mamíferos, por lo que se necesitan dosis elevadas para obtener una respuesta terapéutica, lo que aumenta el riesgo de alcanzar concentraciones que llegan a ser tóxicas (Torres et al., 2013).

Los resultados de la prueba de ácidos fenólicos para los extractos de hojas de kina, fueron positivos para las fases orgánicas y acuosas de las fracciones obtenidas con hexano y acetato de etilo, no así para ambas fases de las fracciones obtenidas con diclorometano (Tabla 8). De acuerdo con Rivero-Cruz et al. (2019), haciendo uso de HPLC, es posible detectar a los compuestos fenólicos 4-fenilcumarina y ácido clorogénico en extractos metanólicos de corteza de *E. caribaeum*, lo anterior sugiere que en los extractos de hojas de kina probablemente se detectaron principalmente éstos compuestos fenólicos.

Por el contrario, para los extractos de hojas de guarumbo, los resultados mostraron que las dos fases orgánicas y acuosas de las fracciones enriquecidas obtenidas con diclorometano y hexano, no contienen fenoles, aunque sí fueron detectados en las fases acuosas y orgánicas de las fracciones obtenidas con hexano y diclorometano (Tabla 8).

En lo anterior, se observa que probablemente el solvente utilizado (diclorometano) no fue lo suficientemente polar para la extracción de dichos compuestos, a pesar de que se esperaba la detección de algunos constituyentes, sin embargo como mencionan Sarker et al., (2006), uno de los solventes más utilizados para la extracción de los ácidos fenólicos son los solventes polares (como el etanol y el acetato de etilo), mismos que aumentan la permeabilidad de la pared celular de los tejidos, facilitando la extracción eficiente de constituyentes de polaridad media a baja.

Estudios previos muestran que los extractos orgánicos de hojas de diferentes plantas de la familia *Rubiaceae*, familia a la que pertenece *E. caribaeum*, contienen 40-dihidroxi-4-fenil-cumarina, un ácido fenólico con potencial antioxidante e hipoglucemiante (De Sousa et al., 2004) y 4-fenilcumarina, el cual incrementa la secreción de insulina en ratones con diabetes inducida (Guerrero-Analco et al., 2007).

Además de la actividad antioxidante reportada en especie de la familia *Rubiaceae*, según Cristians et al. (2014), los extractos orgánicos de hojas de *H. latiflora*, poseen ácido clorogénico, un ácido fenólico, que posee actividad α -glucosidasa, como mecanismo de acción hipoglucemiante.

Para el caso del guarumbo, se obtuvieron resultados positivos para ácidos fenólicos en las fases acuosas de hexano, acetato de etilo y diclorometano, así como también en la fase orgánica de acetato de etilo (Tabla 8), esto concuerda con lo publicado por Ortíz-Ardila et al. (2017), quienes cuantificaron e identificaron el contenido de polifenoles en especies de Cecropiaceae en extractos de acetato de etilo y diclorometano.

Fortis-Barrera et al. (2019), Nicasio-Torres et al. (2009) y Rivera-Mondragón et al. (2019), señalan a su vez, que mediante HPLC se ha aislado compuestos fenólicos de especies de la familia Cecropiaceae, como el ácido clorogénico, la isoorientina, flavonolignanos y ácido tormético, lo que sugiere que en las fases orgánicas y acuosas de los extractos de hojas de guarumbo podrían estar presentes estos compuestos fenólicos.

Respecto a las saponinas, éstas se observaron en la fase acuosa de acetato de etilo y diclorometano de los extractos de hojas de kina. Hamerski et al. (2005), mencionan que las saponinas triterpénicas se pueden encontrar en especies de la familia Rubiaceae.

Por otro lado, las pruebas para saponinas en extractos de hojas de guarumbo resultaron positivas en las fases acuosas de las fracciones obtenidas con hexano, acetato de etilo y diclorometano y en las fases orgánicas de las fracciones obtenidas con diclorometano (Tabla 8). Estos resultados, pueden compararse con estudios realizados para especies de Cecropiaceae, los cuales han reportado una baja presencia de saponinas (Pardo et al., 2000).

Hernández et al. (2013), mencionan que las saponinas pueden generar falsos positivos por la presencia de proteínas en el tejido vegetal, por lo que se sugiere realizar la prueba de hemólisis para confirmar o descartar la presencia de estos compuestos. Si bien, las saponinas son importantes para este estudio, ya que se conoce que poseen propiedades antioxidantes e hipoglucemiantes, permitiendo la regeneración de las células β pancreáticas y secreción de insulina, siendo el ácido gimnémico IV, quercitol o estigmasterol los más comúnmente identificados.

Las pruebas de lactonas insaturadas, mediante el reactivo legal (solución de nitroprusiato de sodio, hidróxido de sodio y ácido fórmico), en extractos de hojas de kina, fueron positivas para todas las fases de las fracciones enriquecidas (Tabla 8). Al respecto, no existe información en la literatura que indique qué tipo de lactonas insaturadas podrían estar presentes en especies del género *Exostema* o de la familia Rubiaceae.

En cuanto a la presencia de lactonas insaturadas en extractos de guarumbo, se obtuvo pruebas positivas en todas las fases de las fracciones enriquecidas (Tabla 8). Estudios realizados por Ortíz-Ardila et al. (2017), en extractos de acetato de etilo y diclorometano hojas de especies de la familia Cecropiaceae, confirman la

presencia de lactonas sequiterpenicas como el ácido maslínico, 2 α -acetoxi-3 β -19 α -dihidroxi-11 α -12 α -epoxi-ursan-28-13 β -olido, lo cual sirve de referencia para la prueba realizada en este estudio.

Finalmente, para la detección de esteroides y triterpenoides en las fases orgánicas y acuosas de los extractos fraccionados en hexano, acetato de etilo y diclorometano, de hojas de kina y guarumbo, los resultados fueron negativos (Tabla 8). Ríos et al. (2006), reportaron la presencia de triterpenoides en plantas de la familia Rubiaceae, familia que pertenece kina, lo que sugiere realizar otras pruebas para comprobar la presencia triterpenoides, utilizando cloroformo, anhídrido acético y ácido clorhídrico concentrado, de acuerdo a lo indicado por Kumar et al, (2016).

Cabe destacar que, los esteroides y triterpenoides son compuestos que poseen antioxidantes (Kozłowska et al., 2016).

En general, se pudo observar que en el extracto hidroetanólico acidificados de hojas de kina, hay presencia de lactonas insaturadas, saponinas, alcaloides y ácidos fenólicos, los cuales probablemente pudieron haber contribuido a la actividad antioxidante.

Asimismo, se pudo observar que el extracto hidroetanólico acidificado de hojas de guarumbo, además de la presencia de ácidos fenólicos, se identificaron otros compuestos como los alcaloides, saponinas y lactonas insaturadas, los cuales quizá actúan sinérgicamente para contribuir en la actividad antioxidante de estos extractos.

Además de la composición química de los extractos, otros factores que también influyen en la capacidad de la actividad antioxidante, son el día y el año de recolección del material biológico, las condiciones climáticas del tiempo de recolección, así como la presión que ejercen los insectos en el entorno de la planta (Rivera-Mondragón et al., 2017).

9.2.3 Análisis cromatográfico de flavonoides y ácidos fenólicos

La detección cromatográfica de flavonoides y ácidos fenólicos de las fases orgánicas y acuosas de las fracciones enriquecidas (obtenidas con hexano, acetato de etilo y diclorometano) de los extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de kina y guarumbo, así como de los estándares para flavonoides y ácidos fenólicos se muestran en las Figuras 17, 18, 19, 20, 21 y 22, en fluorescencia 252 nm y Figura 23, 24, 25, en 365 nm (Anexo 9 y 10).

9.2.3.1 Detección de flavonoides

Se eligió la fase móvil cloroformo-metanol-ácido fórmico (5:4:1), con la cual se observó mayor separación de constituyentes químicos de los extractos. En la Tabla 9, se puede observar las relaciones de elución (R_f) respecto al frente del eluyente, para la detección de los flavonoides.

Tabla 9. Detección de flavonoides y relación de frente (R_f) de las fracciones enriquecidas del extracto hidroetanólico acidificado de las hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia* para flavonoides

Flavonoides estándar		R_f					
Ác. gálico		0.06					
Hidrato de morina		0.08					
Quercetina		0.19					
Kaempferol		0.32					
Naringenina		0.36					
Muestra		Fracciones enriquecidas					
Vista a 254 nm (Fluorescencia verde)		R_f					
EHA (R_f)		F. O			F. A		
		Hexano	AcOEt	CH ₂ Cl ₂	Hexano	AcOEt	CH ₂ Cl ₂
<i>E. caribaeum</i>		0.12	0.12	0.12	0.11	0.12	0.12
		0.09	ND	0.08	0.08	0.08	0.08
		0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
<i>C. obtusifolia</i>		ND	ND	0.07	ND	ND	ND

Fase móvil: cloroformo-metanol-ácido fórmico (5:4:1), EHA: Extractos hidroetanólicos acidificados no fraccionados, F.O: Fase orgánica, F.A: Fase acuosa, AcOEt: Acetato de etilo, CH₂Cl₂: Diclorometano, R_f : Relación de frente detectado a fluorescencia de 254 nm, ND: No detectado

La CCF aplicada a los extractos hidroetanólicos acidificados (fraccionados y no fraccionados) de hojas de kina y guarumbo (Tabla 9), mostró muy probablemente que el ultrasonido no interfirió en la detección de familias de compuestos antioxidantes, como los flavonoides (Phuyal et al., 2020).

De acuerdo a Lavilla et al. (2017), una de las ventajas del ultrasonido es la apertura de poros de los materiales vegetales secos, lo que facilita la hidratación del tejido e incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles en el solvente de extracción en contacto.

El extracto hidroetanólico acidificado no fraccionado de hojas de kina mostró valores de R_f entre 0.05 y 0.12, a la fluorescencia 254 nm (Figura 18), observándose que hubo una limitada separación de constituyentes químicos en comparación con un mayor número de constituyentes separados en las cromatoplasmas de los extractos fraccionados con los solventes no polares y de polaridad media.

En comparación con el R_f de los estándares ácido gálico e hidrato de morina (Figura 17), existe la posibilidad de que en los extractos de hojas de kina están presentes estos flavonoides.

La CCF de los extractos de las fases orgánicas y acuosa de los extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de kina fraccionados con hexano, acetato de etilo y diclorometano, mostró valores de R_f entre 0.04 y 0.12 (Figura 18).

En comparación con los valores R_f de los estándares, se sugiere la probable presencia de hidrato de morina y ácido gálico (Figura 17), en los extractos de hojas de kina.

Lo observado en la CCF de los extractos de las fracciones enriquecidas de acetato de etilo, hexano y diclorometano de hojas de kina, confirma lo reportado por Pereira et al., (2018), quienes aislaron flavonoides (quercetina-3-O-robinósido, kaempferol-3-O-robinósido e isorhamnetina-3-O-robinósido) mediante CCF, de extractos de acetato de etilo, cloroformo y éter de petróleo de plantas de la familia Rubiaceae.

Morales (2011), reportó que utilizando una fase móvil n-butanol: ácido acético glacial: agua (40:10:50 ó 20:5:25), y observando las cromatoplasmas a una fluorescencias de 254 nm, se pueden hallar flavonoides, antocianinas y cumarinas a R_f 0.15, 0.14 y 0.31 respectivamente, para el caso de extractos de kina, utilizando una fase móvil cloroformo-metanol-ácido fórmico (5:4:1), se puede apreciar que por los valores de R_f existe la posibilidad de que también estén presente los flavonoides flavonoides.

Respecto a la abundancia de flavonoides (Figura 18) y ácidos fenólicos (Figura 21) presentes en los extractos hidroetanólicos acidificados fraccionados en hexano, acetato de etilo y diclorometano, de hojas de kina, hubo un color intensamente oscuro de los spots de los constituyentes químicos separados de dichos extractos.

Respecto a la abundancia de flavonoides (Figura 18), presentes en los extractos hidroetanólicos acidificados fraccionados en hexano, acetato de etilo y diclorometano, de hojas de kina, hubo un color intensamente oscuro de los spots de los constituyentes químicos separados de dichos extractos.

El extracto hidroetanólico acidificado no fraccionado de hojas de guarumbo no mostró valores de R_f , a la fluorescencia 254 nm (Figura 19).

En contraste, la CCF de la fase orgánica de la fracción diclorometano del extracto hidroetanólico acidificado de hojas de guarumbo, fue la única que mostró separación de constituyentes (R_f de 0.07).

En comparación con la CCF de los estándares (Figura 19), es probable que los flavonoides ácido gálico e hidrato de morina, estén presentes en extractos de hojas de guarumbo.

Gutiérrez (2013), encontró que los extractos diclorometánólicos de diferentes especies de la familia Urticaceae, contienen flavonoides.

De acuerdo con Martínez et al., (2005) (citado por Bravo & Acuña, 2015), la solubilidad de los flavonoides depende de su estructura y clase de sustituyentes presentes en las estructuras químicas. Los solventes de extracción hexano, diclorometano y acetato de etilo han mostrado en estudios previos, ser efectivo para la extracción de flavonoides (Sarker et al., 2006). Gracia (2007), sugiere que la extracción de flavonoides debe iniciar con la selección de los solventes no polares o poco polares, para separar primero a las clorofilas, gomas y agliconas de los flavonoides.

En relación a las propiedades bioactivas de los extractos de plantas, según Villarreal et al., (2019) y Sarker et al., (2006), la actividad antioxidante está relacionada con la presencia de compuestos de diversa polaridad, entre los que destacan por su abundancia los flavonoides.

Los resultados sugieren que los flavonoides son una de las familias de compuestos detectados en la CCF de los extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de kina y guarumbo (Tabla 9 y Figura 18 y 19).

Mata-Torres et al., (2020), reportó que entre los compuestos antioxidante e hipoglucemiantes, están los flavonoides, fenilpropanoides, algunos esteroides como el β -Sitosterol, asimismo las ftálicas, 4-fenilcoumarinas, benzopiranos, lactonas sesquiterpénicas (Escandón-Rivera et al., 2020), y el ácido clorogénico, el cual ha sido identificado en extractos de corteza de *E. caribaeum* (Pérez-Vázquez et al., 2013).

9.2.3.2 Detección de ácidos fenólicos

Se eligió la fase móvil cloroformo-metanol-ácido acético (90:10:1), con la cual se observó mayor separación de constituyentes químicos de los extractos. En la Tabla 10, se muestran las relaciones de frente (R_f) detectadas a las fluorescencias 254 y 365 nm.

El extracto hidroetanólico acidificado no fraccionado de hojas de kina mostró en la CCF valores de R_f entre 0.07 y 0.59 (Figura 21, 23 y 24), a las fluorescencias 254 y 365 nm, lo anterior mostró menor separación de constituyentes químicos en comparación con los R_f (0.07 a 0.76) de los constituyentes separados de las F.A de los extractos fraccionados con hexano, acetato de etilo y diclorometano, solventes no polares y de polaridad media (Figura 21) y con los R_f (0.57) de la F.O de los extractos fraccionados con acetato de etilo y diclorometano (Figura 21).

Tabla 10. Detección de ácidos fenólicos y relación de frente (R_f) de las fracciones enriquecidas de los extractos hidroetanólicos acidificados de las hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*

Ácido fenólico estándar		R_f					
Ácido valérico		0.57					
Ác. sinápico		0.63					
Ác. siríngico		0.63					
Ác. p-cumárico		0.65					
Ác. de vainilla		0.69					
Ácido ferúlico		0.70					
Ác. trans-ferúlico		0.71					
Ácido clorogénico		-					

Muestra Vista a 254 nm (Fluorescencia verde)	EHA R_f	Fracciones enriquecidas					
		R_f			R_f		
		F. O			F. A		
		Hexano	AcOEt	CH ₂ Cl ₂	Hexano	AcOEt	CH ₂ Cl ₂
<i>E. caribaeum</i>	0.07	ND	0.57	0.57	0.13	0.13	0.13
	0.04				0.07	0.07	0.07
<i>C. obtusifolia</i>	0.05	ND	0.02	ND	0.15	0.03	0.18

Muestra Vista a 365 nm (Fluorescencia Azul)	EHA R_f	Fracciones enriquecidas					
		R_f			R_f		
		F. O			F. A		
		Hexano	AcOEt	CH ₂ Cl ₂	Hexano	AcOEt	CH ₂ Cl ₂
<i>E. caribaeum</i>	0.59						
	0.13	ND	ND	ND	0.76	ND	0.40
<i>C. obtusifolia</i>	0.07						
	0.05	0.11	0.02	ND	0.13	ND	0.19

Fase móvil: cloroformo-metano-ácido acético (90:10:1), EHA: Extractos hidroetanólicos acidificados no fraccionados, F.O: Fase orgánica, F.A: Fase acuosa, AcOEt: Acetato de etilo, CH₂Cl₂: Diclorometano, R_f : Relación de frente detectado a fluorescencias de 254 y 365 nm, ND: No detectado.

En comparación con el R_f (0.57) del estándar ácido valérico (Figura 20), hay la posibilidad de que en los extractos de hojas de kina existe este ácido fenólico.

No se se ha reportado la presencia del ácido valérico en especies de la familia Rubiaceae, sin embargo, se sabe que el ácido dimetilguanidino valérico, se ha utilizado como marcador de grasa, para pronosticar químicamente los riesgos de la diabetes.

En los extractos hidroetanólicos acidificado fraccionados en acetato de etilo y diclorometano de hojas de kina, en particular las fases orgánicas quizá también contienen los ácidos fenólicos ác. ferúlico y el ác. trans-ferúlico, los cuales mostraron R_f 0.7 y 0.71, respectivamente (Tabla 10 y Figura 20).

Hurtado et al. (2015), mencionan que los constituyentes de extractos, eluidos en CCF con solventes polares y analizados a 365 nm, se puede detectar ácidos fenólicos a un R_f 0.78 como el tánico.

Respecto a la abundancia de ácidos fenólicos (Figura 21) presentes en los extractos hidroetanólicos acidificados fraccionados en hexano, acetato de etilo y diclorometano, de hojas de kina, hubo un color intensamente oscuro de los spots de los constituyentes químicos separados de dichos extractos.

En la CCF del extracto hidroetanólico acidificado no fraccionado de hojas de guarumbo se observó un R_f 0.05 (Tabla 10 y Figura 23), a las fluorescencias 254 y 365 nm.

En la CCF, a las fluorescencias 254 y 365 nm, de las F.O del extracto hidroetanólico fraccionado con hexano y acetato de etilo, de hojas de guarumbo, se reportó el R_f 0.02 y 0.11, respectivamente, así como en la F.A del extracto fraccionado con hexano, acetato de etilo y diclorometano se observaron R_f entre 0.03 y 0.19.

Los constituyentes separados de los extractos fraccionados y no fraccionados de muestras de gurumbo no migraron a valores de R_f de los ácidos fenólicos estándares evaluados en este estudio, por lo que se debe continuar el estudio utilizando otras fases móviles que favorezcan a la separación de ácidos fenólicos que podrían estar presentes en guarumbo.

El estándar de ácido clorogénico (Tabla 10 y Figura 20), no eluyó con la fase móvil cloroformo:acetato de etilo:ácido fórmico (5:4:1) v/v, por lo que es muy probable que el ác. clorogénico, posiblemente presente en los extractos de hojas de kina y guarumbo, igualmente no se haya separado de dichas muestra.

Nicasio-Torres et al. (2009), refirieron que el ác. clorogénico es un abundante constituyente de los extractos metanólicos de guarumbo y de extractos de diversa polaridad de plantas de la familia Rubiaceae (Pérez-Vásquez et al., 2013); lo anterior sugiere que para poder observar la presencia del ácido clorogénico, se deben probar otras fases móviles mayormente polar, por ejemplo Waksmundzka-Hajnos et al. (2008), recomiendan la mezcla de acetato de etilo:ácido fórmico:agua en diferentes proporciones (8:1:1, 65:15:10 o 88:6:6 v/v).

Otro de los ácidos fenólicos abundantes en extractos etanólicos, acetato de etilo y hexano de plantas de Rubiaceae y Cecropiaceae es la quercetina (Herrera-Ruíz et al., 2012; Betu et al., 2015). La quercetina ha demostrado ser un antioxidante más potente que el ácido ascórbico, asimismo inhiben a la enzima α -glucosidasa (Cerdeira, 2011).

Respecto a la abundancia de los constituyentes químicos de hojas de guarumbo separados de las fases orgánicas fraccionadas con hexano y acetato de etilo y en las fases acuosas fraccionadas con hexano y diclorometano, se observó una baja intensidad de color de los spots de dichos componentes separados y observados a una fluorescencia de 254 nm (Figura 22).

10. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos del presente proyecto de investigación, se observó lo siguiente:

1. La extracción asistida por ultrasonido no afectó la determinación de la actividad antioxidante y los compuestos polifenólicos de los extractos polares y medianamente polares de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*.
2. El extracto metanólico acidificado de hojas de *E. caribaeum* mostró mayor contenido de polifenoles, con respecto a los extractos de *C. obtusifolia*, mientras que para actividad antioxidante está fue mayor en extractos hidrometanólicos de hojas de *C. obtusifolia* en comparación con los extractos de *E. caribaeum*.
3. Mediante las pruebas óxido reducción, se observó la presencia de alcaloides, ácidos fenólicos, lactonas insaturadas y saponinas, en la fase acuosa de las fracciones acetato de etilo y hexano de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*, respectivamente.
4. Tomando en cuenta la separación cromatográfica de los constituyentes químicos contenidos en los extractos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*, la extracción de la fase orgánica con acetato de etilo y diclorometano, fue más efectiva que la extracción realizada con hexano.
5. El análisis cromatográfico de capa fina de los extractos fraccionados y no fraccionados de hojas de *E. caribaeum*, mostraron la presencia de hidrato de morina y ácido gálico.
6. El análisis cromatográfico de los extractos fraccionados con diclorometano y no fraccionados de hojas de *C. obtusifolia*, mostraron la presencia de hidrato de morina y ácido gálico.
7. En las cromatoplasmas de los extractos de hojas de *E. caribaeum*, se observó la posible presencia del ác. valérico.
8. Debido a que se identificó un amplio rango de familias de compuestos en los diferentes extractos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*, se sugiere que hubo una efectiva interacción de los solventes hidrometanol, metanol acidificado, hidroetanol acidificado, hexano, acetato de etilo y diclorometano, con los constituyentes de las plantas.

11. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente proyecto, se proponen las siguientes recomendaciones.

Debido a que la capacidad antioxidante de una especie vegetal no se debe únicamente por la suma de las bioactividades de los constituyentes químicos, se recomienda hacer estudios de sinergismo y antagonismo entre los principales compuestos de los extractos de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*.

Se podrían aplicar otras pruebas rápidas y relativamente económicas como la espectrofotometría, para cuantificar flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y el β -Sitosterol principalmente, de este modo se continuaría con el análisis del potencial anioxidante de extractos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*.

Debido al posible potencial hipoglucemiante de las lactonas insaturadas y a la poca información que hay de estos compuestos en los extractos de hojas de *E. caribaeum*, se recomienda cuantificarlos y aislarlos mediante pruebas como la UHPLC.

En los extractos de hojas de *E. caribaeum*, no se detectó la presencia de esteroides y triterpenoides, por lo que sugiere utilizar otros solventes para la detección, como puede ser el cloroformo, anhídrido acético y ácido clorhídrico concentrado.

Ya que el ácido clorogénico es un constituyente químico con propiedades antioxidantes e hipoglucemiantes, se recomienda utilizar fases móviles de mayor polaridad, para detectar a estos compuestos mediante las CCF de los extractos de hojas de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*. Waksmundzka-Hajnos et al. (2008), recomiendan la mezcla de solventes acetato de etilo: ácido fórmico: agua en diferentes proporciones (8:1:1, 65:15:10 y 88:6:6).

Se recomienda realizar la extracción cromatográfica de la 4-fenilcumarina de extractos de *E. caribaeum*, así como del ácido clorogénico, la isovitexina e isorientina de extractos de *C. obtusifolia*; por otro lado, realizar bioensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar si éstos constituyentes antioxidantes también poseen actividad hipoglucemiante, asimismo evaluar su aplicación como ingredientes funcionales en el desarrollo de alimentos o medicamentos, que sirvan para el tratamiento de la diabetes

12. REFERENCIAS

- Aguirre, L., Pereyra-Aguilar, P., Silva-Arrieta-Ontaneda, I., Alarcón-Urbina, M., Palacios-Quintana, M., Medina-Salazar, H., Luján-Carpio, E., Mayor-Vega, A., Medrano-Canchari, K., Mazuelos-Rivas, M., Lizárraga-Castañeda, Z., Zarzosa-Norabuena, E., Ortega-Aldave, A., Parodi, J.F. & Salazar-Granara, A. (2016). Consumo de plantas medicinales en usuario del “Centro Integral del adulto mayor” de la Punta-Callao (Perú). *Revista de Fitoterapia*, 16(2), 165-175.
- Alonso-Castro, A. J., Domínguez, F., Maldonado-Miranda, J. J., Castillo-Pérez, L. J., Carranza-Álvarez, C., Solano, E., Isiordia-Espinoza, M. A., Juárez-Vásquez, M. C., Zapata-Morales, J. R., Argueta-Fuertes, M. A., Ruíz-Padilla, A. J., Solorio-Alvarado, C. R., Rangel-Velázquez, J. E., Ortiz-Andrade, R., González-Sánchez, I., Cruz-Jiménez, G. & Orozco-Castellos, M. (2017). Use of medicinal plants by health professionals in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 81-86.
- American Diabetes Association. (2019). Classification and Diagnostic of Diabetes: Standars of Medical care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*, 42(1), 14-31.
- Andersen, O.M. & Markham, K.M. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton, Florida, United States of America: CRC Press, 2006.
- Andrade-Cetto, A & Wiedenfeld, H. (2001). Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 78, 145-149.
- Andrade-Cetto, A. & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of ethno-pharmacology*, 99, 325-348.
- Antonio, J. (2006). Diabetes Mellitus: tipos, autocontrol, alimentación y tratamiento. *OFFRAM*, 25(10), 66-78.
- Argáez-López, N., Wachter, N., Kumate-Rodríguez, J., Cruz, M., Talavera, J., Rivera-Arce, E. & Loyoza, X. (2003). The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in Mexico. *Diabetes Care*, 26(8), 2469-2486.
- Azmir, J.M., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. & Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436.
- Banchero, L., Carballo, S. & Telesca, J. (2008). *Manual de secado solar de especies medicinales y aromáticas para predios solares*. Montevideo, Uruguay: INIA.
- Barreira, J.C.M., Ferreira, I.C.F.R., Oliveira, M.B.P.P & Pereira, J.A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food chemistry*, 107, 1106 -113.

- Barret, B. (2003). Alternative, Complementary and Convencional Medicine: Is Integration Upon Us?. *The journal of alternative and complementary medicine*, 9(3), 417-427.
- Basto-Abreu, A., Barrientos-Gutiérrez, T., Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C.A., López-Olmedo, N., De la Cruz-Góngora, V., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Romero-Martínez, M., Barquera, S., López-Ridaura, R., Hernández-Ávila, M. & Villalpando, S. (2019). Prevalencia de diabetes y descontrol glucémico en México: Resultados de Ensanut 2016. *Salud pública de México*, 62(1), 50-59.
- Bello-Chavolla, O.Y., Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C.A. & Hernández-Avila, M. (2017). Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutrition Reviews*, 75(1), 4-12.
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A. & Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30(8), 453-459.
- Betu, P., Selim, P. & Stevanovic, T. (2015). Study of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Myruanthus Arboreus (Cecropiaceae). *Antioxidants*, 4, 410-426.
- Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of chromatography A*, 1218, 2505-2512.
- Blainski, A., Lopes, G. & Palazo de Mello, J.C. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu Method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 18, 6852-6865.
- Bohorquez, R. (2016). *Determinación de actividad antioxidante de extractos de hojas de Diplostegium phyllicoides (Kunth) Wedd.* (Tesis de grado). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.: Bogotá, Colombia.
- Borhidi, A. & Diego-Pérez, N. (2002). Introducción a la taxonomía de la familia Rubiaceae en la flora de México. *Acta botanica Hungarica*, 43(3-4), 237-280.
- Bravo, A.V. & Acuña, W.D. (2015). Evaluación fitoquímica y determinación de flavonoides en hojas de Ficus benjamina L. *Xilema*, 28, 61-67.
- Burman, V., Kanaujia, H., Lehari, K., Aastha, Pratap, N. & Vaishali. (2019). Characterization of phenolic compounds of turmeric using TLC. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, (2), 994-998.
- Cai, L. (2014). Thin Layer Chromatography. En Gallagher, S. & Wiley, E. (Ed), *Essential Laboratory Techniques* (6.3.1-6.3.18). United States of America: John Wiley & Sons, Inc.

- Cajas, J.O. & Merchán, J.P. (2021). *Estudio bibliográfico comparativo de la actividad antioxidante por diferentes ensayos in vitro en extracto de Smilax china.*(Tesis de Licenciatura). Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Carrillo, A. (2019). *Influencia del genotipo y etapas de maduración de los frutos de chile perón (Capsicum pubescens Ruiz et Pavón) sobre la actividad antioxidante e hipolucémica en ratas diabéticas.* (Tesis de maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Cañarte-Baque, G.C., Neira-Escobar, L.C., Gárate-Campoverde, M.B., Samaniego-León, L.D., TupacYupanqui-Mera, J.C. & Andrade-Ponce, S.S. (2018). La diabetes como afectación grave se presenta con complicaciones típicas. *Dominio de las Ciencias*, 5(1), 160-198.
- Casado, I. (2018). *Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor.* (Tesis de Grado). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.
- Castañeda, C.B., Ramos, L.E. & Ibañez, V.L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*, 8(1), 56-72.
- Castro, C. J., Villa, N., Ramírez, S. A. & Mosso, C. (2014). Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 101-120.
- Cerda, K.L. (2011). *Evaluación del contenido de fenólicos, actividad antioxidante y efectos antidiabéticos de extractos de jarabes de agave (A. atrovirens Karw).* (Tesis de posgrado). Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey, Nuevo León.
- Chaves-Ulate, E.C. & Esquivel-Rodríguez, P. (2019). Ácidos clorogénicos presentes en el café: capacidad antimicrobiana y antioxidante. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 299-311.
- Chikezie, P., Ibegbulem, O & Mbagwu, F. (2015). Bioactive principles from medicinal plants. *Journal of Phytochemistry*, 9(3), 88-115.
- Cicco, N. & Lattanzio, V. (2011). The influence of initial carbonate concentration on the Folin-Ciocalteu micro-method for the determination of phenolics with low concentration in the presence of methanol: A comparative study of real-time monitored reactions. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2, 840-848.
- Coman, C., Rujan, O.D & Socaciu, C. (2012). Plants and natural compounds with antidiabetic action. *Not bot horti agrobo*, 40(1), 314-325.
- Cosme, P., Rodríguez, A.B., Espino, J. & Garrido, M. (2020). Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Antioxidants*, 9(1263), 1-20.

- Cristians, S., Mata, R. & Bye, R. (2014). Phenological and geographical influence in the concentration of selected bioactive 4-phenylcoumarins and chlorogenic acid in *Hintonia latiflora* leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 152(2), 308-313.
- Cristians, S., Bye, R. & Nieto-Sotelo, J. (2018). Molecular markers associated with chemical analysis: A powerful tool for quality control assessment of copalchi medicinal plant complex. *Frontiers in pharmacology*, 9(666), 1-12.
- Cruz, S. (2016). Medicina tradicional y fitoterapia una alternativa para el mejoramiento de la salud en Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*. 3(1), 81-90.
- Dávila-Torres, J., González-Izquierdo, J.J. & Barrera-Cruz, A. (2014). Panorama de la obesidad en México. *Revista Medicina Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2), 240-249.
- Della, F., Giacomozzi, C.A., Calixto, J.B. & Yunes, R.A. *Isolamento e identificação da isovitexina obtida de frações farmacologicamente ativas de Cecropia glaziovii*. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 10, São Paulo. Resumos, p.5/6-9, 1988.
- De Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T., Pizzolatti, M., Szpoganicz, B. & Barreto, R. (2004). Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-O-(r)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. *Journal Natural Products*, 67, 829-832.
- Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Cecropia obtusifolia* Bertol., ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:532556>.
- Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Exostema caribaeum* (Jacq.) Schult., ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:110796>.
- Edge, L., Ye, X., Zheng, D. & Silverstein, M. (2002). The prevalence and pattern of complementary and alternative medicine use in individuals with diabetes. *Diabetes Care*, 25(2), 324-329.
- Elzaawely, A.A. & Tawata, S. (2011). Effect of extraction and drying methods on the contents of Kava Pyrones and Phenolic Compounds in *Alpinia zerumbet* Leaves. *Asian Journal of Plant Sciences*, 10, 414-418.
- Escandón-Rivera, S., Mata, R. & Andrade-Cetto, A. (2020). Molecules isolated from Mexican hypoglycemic plants: A review. *Molecules*, 25(4145), 1-33.

- Escobedo-de la Peña, J., Buitrón-Granados, L.V., Ramírez-Martínez, J.C., Chavira-Mejía, R., Schargrodsky, H. & Marcet. (2011). Diabetes en México. Estudio Carmela. *Cirugía y Cirujanos*, 79(5), 424-431.
- Espinosa-Leal, C., Treviño-Neávez, J.F., Garza-Padrón, R.A., Verde-Star, M.J., Rivas-Morales, C., Morales-Rubio, M.E. (2015). Contenido de fenoles totales y actividad anti-radical de extractos metanólicos de la planta silvestre y cultivada *in vitro* de *Leucophyllum frutescens*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(3), 52-56.
- Espinoza, J.K. (2014). *Determinación cuantitativa de alcaloides en doce plantas medicinales y su actividad expectorante*.(Tesis de Licenciatura). Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.
- Flores, J. & Aguilar, F. (2006). Diabetes mellitus y sus complicaciones. La epidemiología, las manifestaciones clínicas de la diabetes tipo 1 y 2. Diabetes gestacional. Parte I. *Plasticidad y Restauración Neurológica*, 5(2), 139-151.
- Flores, A., Arias, L., Azolas, X., Bravo, J.C., Gajardo, C., Poblete, E., Quitral, I., Rodríguez, X., Tokareva, E., Undurraga, M., Loon, Y., Ortega, M., Torrejón, P., Maggiolo, G. & Fong-Jhen, E. (2014). Dolor y medicina complementaria y acupuntura. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(4), 626-640.
- Fortis-Barrera, M.A., Alarcón-Aguilar, F.J., Becerril-García, A., Flores-Sáenz, J.L.E., Almanza-Pérez, J.C., García-Lorenzana, M., Lazzarini-Lechuga, R.C., Román-Ramos, R. & Blancas-Flores, G. (2019). Mechanism of the hypoglycemic activity and hepatoprotective effect of the aqueous extract of *Cecropia obtusifolia* Bertol. *Journal of medicinal food*, 0(0), 1-10.
- Franco, C., Lucas, E.N., Lino, W. & Pinales, I. (2018). Prevalencia y factores de riesgo de diabetes tipo II. *Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento*, 2(1), 530-549.
- Franco-Quino, C., Muñoz-Espinosa, D., Gómez-Herreros, C., Chau-Miranda, G., Cueva-Piña, L., Guardia-Ortiz, E., Saavedra-Yucra, S., Arroyo-Acevedo, J. & Herrera-Calderón, O. (2016). Características fitoquímicas y actividad antioxidante *in vitro* de *Aloe Vera*, *Plukenetia volubilis*, *Caiophora carduifolia*, *Cecropia membranacea*. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77(1), 9-13.
- Froelich, S., Siems, K., Hernández, M.A., Ibarra, R. A., Berendsohn, W.G. & Jenett-Siems, K. (2006). Phenolic glycosides from *Exostema mexicanum* leaves. *Pharmazie*, 61, 641-644.
- Guerrero-Analco, J., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A. & Mata, R. (2007). Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry*, 68, 2087-2095.

- Gallego, M.G. (2016). *Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles*. (Tesis doctoral). Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España.
- Gallegos-Zurita, M. y Gallegos-Z, D. (2017). Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades de la piel en comunidades rurales de la provincia de Los Ríos-Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 78(3), 315-321.
- García, C., Pérez, B.E., Martínez, A. & Castro, F. (2009). Use of medicinal plants and dietary supplements for glycemic control of diabetes. *Chapingo serie zonas áridas*, 8, 229-239.
- García, E., Fernández, I. & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *Universitat Politècnica de València*, 1-9.
- García, P. (2016). *Técnicas analíticas avanzadas para la determinación de compuestos bioactivos en muestras vegetales*. (Tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada, España.
- Garro, A., Cardona, W., Rojano, B., Robledo, S. & Alzate, F. (2015). Actividad antioxidante y citotóxica de extractos de *Pilea dauciodora* Wedd (Urticaceae). *Revista Cubana de Plantas*, 20(1), 1-12.
- Jimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *Nutrición*, 23(6), 80-84.
- Giraldo, L.M. (2011). *Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de Palocourea guianensis (Rubiaceae)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Gómez, M.G. (2013). *Mecanismos moleculares de la modulación del metabolismo y la diferenciación adiposa por isoorientina*. (Tesis doctoral). Instituto Potosino de investigación científica y tecnológica, A.C., San Luis Potosí, México.
- González, J.A. & Aramburo, K.G. (2011). *Extracción de aceite de germen de maíz (Zea Mays L.) usando CO₂ supercrítico*. Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia.
- Gonzales-Llontop, L.F., Chóton, M.R. & Chico, J. (2020). Efecto historeperador de un extracto proteico y vitamínico en *Allium cepa* L. con daño cromosómico. *Revista de Investigación Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 3(2), 47-53.
- Govea-Salas, M., Morlett-Chávez, Rodríguez-Herrera, R & Ascacio-Váldez, J. (2017). Some mexican plants used in traditional medicine. En El-Shemy, H. (2017), *Aromatic and Medicinal Plants-Back to Nature* (191-200). Rijeka, Croatia: InTech.
- Gracia, M.A. (2007). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Memorias del Programa Verano de la Ciencia 2007. 4p
- Guerra, A.E. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físico-químicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala*

- (*phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. (Tesis de grado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Gutiérrez, D.M., Ortiz, C.A. & Mendoza, A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Simposio de Metrología*, 1-5.
- Gutiérrez, M.P. (2013). *Control de calidad y evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos de Xanthium sponosum L. Y Urtica urens L. En modelo murino*. (Tesis de posgrado). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.
- Gutiérrez, Y.I., Scul, R., González, A., Fuentes, M.D., Casanova, R.M. & Machín, L. (2020). Caracterización fisico-química y actividad diurética preliminar de extractos acuosos de Urea baccifera (L.). *Revista Cubana en Farmacia*, 53(3), 1-17.
- Gushiken, L.F., Beserra, F.P., Rozza, A.L., Bérnago, P.L., Bérnago, D.A. & Pellizzon, C. H. (2015). Chemical and biological aspects of extracts from medicinal plants with antidiabetic effects. *The review of diabetic studies*. 13(2), 96-112.
- Hamerski, L., Carbonezi, C.A., Cavalherio, A.J., Bolzani, V. & Marx, M.C. (2005). Triterpenoid saponins from Tocoyena brasiliensis Mart. (Rubiaceae). *Química Nova*, 28(4), 601-604.
- Harbone, J.B. & Simmonds, N.W. (1964). *Biochemistry of Phenolic Compounds*. London, United Kingdom: Academic Press.
- Hatami, T., Ahmad, S., Shahram, S. & Mojarrab, M. (2014). Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Different Extracts and Fractions from the Aerial Parts of Artemisia biennis Willd. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(2), 551-558.
- 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.) Sheldtl (Rubiaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(6), 526-541.
- Hernández, J.E. & Luengas, P. (2013). Estudio fitoquímico preliminar de Cecropia membranacea Trécul. And Cecropia metensis Cuatrec. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 586-595.
- Horák, M., Somerlíková, K., Kavenská, V., Granda, L., Škrabásková, L., Tournon, J., Chuspe, M. E., Rosero, M. G., Forero, L. E., Rosero, A., Castro, N. A., Beltrán, G. D., Halbich, M., Minero, F., Rosas, I. & Mateos, E. (2015). *Etnobotánica y fitoterapia en América*. Brno, República Checa: Mendel University in Brno.
- Hota, D. (2007). *Bioactive Medicinal Plants*. Delhi, India: Gene-Tech Books.
- International Diabetes Federation. (2019). *Atlas de la Diabetes de la FID*. Recuperado de: <https://www.diabetesatlas.org>

- Hudz, N., Yezerska, O., Shanaida, M., Horčinová, V. & Wieczorek, P. (2019). Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of *Salvia sclarea* extracts. *Pharmacia*, 66(4), 209-215.
- Hurtado, P., Jurado, B., Ramos, E. & Calixto, M. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *Jiglans neotropica* (Nogal Peruano). *Revista Sociedad Química Perú*, 81(3), 284-291.
- ISSSTE. (2019). *Diabetes, uno de los principales problemas de salud en México*. México: Gobierno de México. Recuperado de <https://www.gob.mx/issste/articulos/diabetes-uno-de-los-principales-problemas-de-salud-en-mexico>.
- Jaramillo, A. E. (2014). *Evaluación de la relación del contenido de fenoles determinados por dos técnicas analíticas con su capacidad citotóxica en doce especies vegetales de Ecuador*. (Tesis de licenciatura). Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.
- Jiménez-Corona, A. E. & Mateo-Rivera, I. A. (2019). Plantas medicinales usadas en la terapéutica de pacientes con hipertensión y diabetes mellitus tipo II, de la región indígena Tepehuana. *Ciencia Huasteca*, 13, 30-36.
- Jiménez, A.M., Sánchez, M. & Martínez, M. (2012). Optimización del método captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café. *Anales de veterinaria de Murcia*, 28, 67-78.
- Juárez-Rosete, C., Aguilar-Castillo, J., Juárez-Rosete, M., Bugarín-Montoya, R., Juárez-López, P & Cruz-Crespo, E. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México. *Bio Ciencias*. 2(3), 119-129.
- Kahn, C., Weir, G., King, G., Moses, A., Smith, R. & Jacobson, A. (2005). *Joslin's Diabetes Mellitus*. Boston, United States of America: Lippincott Williams & Wilkins.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plants extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550-557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>
- Kaushal, S., Dhruv, D., Prasad, D.N., Sharma, R & Hira, S. (2019). Antidiabetic potential of herbal plants. *Journal of drug delivery and therapeutics*.
- Kedare, S. & Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal Food Science Technology*, 48(4), 412-422.
- Khoddami, A., Wilkes, M. & Roberts, T. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.
- Kooti, W., Farokhipour, M., Asadzadeh, Z, Ashtary-Larky, D. & Asadi-Samani, M. (2016). The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. *Electronic Physician*, 8(1), 1832-1842. 9(3), 1085-1093.

- Kozłowska, M., Gruczyńska, E., Scibisz, I. & Rudzińska, M. (2016). Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. *Food chemistry*, 213,450-456.
- Kumar, A. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicinal*, 4(4), 59-64.
- Kupina, S., Fields, C. & Roman, M. (2018). Determination of total phenolic content using the Folin-C assay: Single-laboratory validation, first action 2017.3. *Journal of AOAC International*, 101(5), 1466-1472.
- Lavilla, I. & Bendicho, C (2017). Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. En *Water Extraction of Bioactive Compounds* (291-316), Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Librado, G. (2016). Planas nectaríferas y poliníferas en la Costa chica de Guerrero y alrededores de Oaxaca. *Revista Tlamati Sabiduría*, 7(2), 1-14.
- Lock, O. (1988). *Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales*. Lima, Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- López, T. (2002). Formas de administración más habituales de plantas medicinales. *OFFARM*, 21(2), 122-125.
- López, T. (2008). Plantas medicinales. *OFFARM*, 27(4), 82-86.
- López, M. (2006). Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante: características, administración y efectos adversos. *OFFARM*, 25(5), 82-88.
- Lorenzo, M., Frías, A., Villa, P. & Del Valle, M. (2006). Detección por cromatografía de capa fina (CCF) de metabolitos antifúngicos producidos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS. *Revista Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 40(1), 27-30.
- Lozada-Ramírez, J.D., Ortega-Regules, A.E., Hernández, L. & Anaya, C. (2021). Spectroscopic and spectrometric applications for the identification of bioactive compounds from vegetal extracts. *Applied sciences*, 11(3039), 1-24.
- Lundanes, E., Reubsæet, L. & Greibrokk, T. (2014). *Chromatography: basic principles, sample preparations and related methods*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Malviya, N., Jain, S & Malviya, S. (2010). Antidiabetic potential of medicinal plants. *Acta poloniae pharmaceutica-drug research*. 67(2), 113-118.
- Mao, H., Zhang, Y. & Chen, G. (2019). Determination of three phenolic acids in *Cimicifugae rhizome* by capillary electrophoresis with a graphene-phenolic resin composite electrode. *Analytical methods*, 11, 303-308.
- Marcano, D. & Hasewaga, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.

- Martínez, N. (2003). Las plantas medicinales. *Boletín de Nutrición Infantil CANIA*, 4(8).
- Martínez, M.C. & Cano, A. (2006). Plantas medicinales con alcaloides en la provincia de Jaén. *Boletín. Instituto de estudios giennenses*, 200, 125-163.
- Mata-Torres, G., Andrade-Cetto, A., Espinoza-Hernández, F. & Cárdenas-Vásquez, R. (2020). Hepatic glucose output inhibition by Mexican plants used in the treatment of type 2 Diabetes. *Frontiers in pharmacology*, 11(215), 1-9.
- McDowell, T., Volovsek, M. & Manos, P. (2003). Biogeography of Exostema (Rubiaceae) in the Caribbean region in light of molecular phylogenetic analyses, *Systematic botany*, 28(2), 431-441.
- McEwen, L., Casagrande, S., Kuo, S. & Herman, W. (2017). Why are diabetes medications so expensive and what can be done to control their cost?. *Economics and Policy in Diabetes*, 17 (71), 1-7.
- Moldoveanu, S. & David, V. (2015). *Modern Sample Preparation for Chromatographic*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Morales, C.D. (2011). *Caracterización fitoquímica y evaluación biológica de Solamun hartwegii*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Mortady, M. (2018). Antidiabetic activity of medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutic*, 51(1), 151-165.
- Muñetón, P. (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo. *Revista Digital Universitaria*, 10(9), 2-9.
- Muñoz, A.M., Ramos-Escudero, F., Alvarado-Ortíz, C. & Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la sociedad química del Perú*, 73(3), 142-149.
- Muñoz, A.M., Alvarado-Ortíz, C., Blanco, T., Castañeda, B., Ruíz, J. & Alvarado, A. (2014). Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. *Revista de la sociedad química del Perú*, 80(4), 287-297.
- Muñoz, W., Chavez, W., Pabón, L., Rendón, M., Patricia-Chaparro, M., & Otlávaro-Álvarez, A.M. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Revista CENIC*, 46, 28-46.
- Muritala, A., Oluwasegun, A., Bunyaminu, A. & Ogochukwu, U. (2017). Comparative studies on *In-vitro* radical scavenging potencial of methanol extracts of *Garcinia kola* heck (Clusiaceae) seeds, *Conyza sumatrensis* retz (Asteraceae) and *Mitracarpus scaber* zucc (Rubiaceae) leaves. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*.

- Naspud, M.E. (2018). *Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos alcohólicos del fruto de mora (Rubus glaucus Benth) obtenidos con tres pretratamientos térmicos*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador.
- Nicasio-Torres, M.P., Erazo-Gómez, J.C. & Cruz-Sosa, F. (2009). In vitro propagation of two antidiabetic species known as guarumbo: *Cecropia obtusifolia* and *Cecropia peltata*. *Acta physiol plant*, 31, 905-914.
- Nuñez, C.E (2008). Extracciones con equipo soxhlet. *Cemuez*, 1-5.
- Ojha, S., Aznar, R., O'Donnell, C. & Tiwari, B.K. (2020). Ultrasound Technology for the Extraction of Biologically Active Molecules from Plant, Animal and Marine Sources. *Trends in Analytical Chemistry*, 122(115663), 1-10.
- Ordoñez, E., López, A., Reátegui, D. (2020). Infusiones de plantas medicinales: Actividad antioxidante y fenoles totales. *Agroindustrial Science*, 10(3), 259-266.
- Ortiz-Ardila, A.E., Correa-Cuadros, J.P., Celiz-Zambrano, C.A., Rodríguez-Bocanegra, M.X., Robles-Carmargo, J. & Sequeda-Castañeda, L. G. (2017). Antioxidant and antimicrobial capacity *Cecropia mutisiana* Mildbr. (Cecropiaceae) leave extracts. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(1), 25-35.
- Othmer, K. (2018). *Encyclopedia of Chemical Technology*. Florida, Unites States of America: John Wiley & Son's, Inc.
- Paniagua, L.E., Ruíz, A.J., Alfaro, E.R., Ruiz, N.Y., Zapata, J.R. & Alonso, A.J. (2018). Uso de plantas medicinales en pacientes con diabetes mellitus II. *Verano de la investigación científica*, 4(1), 1014-1018.
- Patel, D.K., Prasad, S.K., Kumar, R. & Hemalatha, S. (2012). An overview on diabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 2(4), 320-330.
- Peng, Y., Zhang, H., Liu, R., Mine, Y., McCallum, J., Kirby, C. & Rong, T. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory activities of pyranoanthocyanins and other polyphenols from staghorn sumac (*Rhus hirta* L) in Caco-2 cell models. *Journal of Functional Foods*, 20(1), 139-147.
- Pereira, L.M., Ferreira, J., Da Silva, E.M., De Souza, M.A., Silva, L., Fachine, J., Lopes, D., De Santis, L., Pecoraro, D., Peoporine, N., Soares, C. & Maria, S. (2018). Isolation and identification of the five novel flavonoids from *Genipa Americana* Leaves. *Molecules*, 23(2521), 1-13.
- Pérez-Cabeza, S., Morón, N., Cervantes, M. & Barón-Rodríguez, M.A. (2017). Evaluación del potencial antioxidante en extracto de espinaca por voltamperometría cíclica. *Bucaramanga*, 30(2), 99-105.
- Pérez-Díaz, I. (2016). Diabetes mellitus. *Gaceta Médica de México*, 152, 50-55.

- Pérez-Guerrero, C., Herrera, M., Ortiz, R., Alvarez de Sotomayor, M. & Fernández, M.A. (2001). A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *Journal of ethnopharmacology*, 76, 279-284.
- Pérez-Najera, V.C., Lugo-Cervantes, E.C., Gutiérrez-Lomelí, M & Del-Toro-Sánchez, C.L. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Biotecnia*, 15(3), 18-22.
- Pérez-Vásquez, A., Castillejos-Ramírez, E., Cristians, S. & Mata, R. (2013). Development of a UHPLC-PDA Method for the simultaneous quantification of 4-Phenylcoumarins and Chlorogenic acid in *Exostema Caribaeum* stem bark. *Journal of natural products*, 77(3), 516-520.
- Phuyal, N., Kumar, P., Prasad, P & Rajbhandary, S. (2020). Total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activities of fruit, seed, and bark extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. *The Scientific World Journal*, 2020, 1-7.
- Pilco, G. (2015). *Optimización del proceso de extracción de aceite de ungurahua (Oenocarpus bataua) en función del rendimiento*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Pinto, C. (2017). Influencia de la medicina tradicional frente al tratamiento de la diabetes mellitus. *SALUTA*, 74-81.
- Prakash, A. (2001). Antioxidant activity. *Medicinal Laboratory Analytical Progress*, 19(2), 1-6.
- Puentes, J. (2016). Plantas medicinales y productos derivados comercializados como antidiabéticos en la conurbación Buenos Aires-La Plata, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y aromáticas*, 15(6), 373-397.
- Quiñones, M., Miguel, M & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efecto sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Ramírez, C.J. (2020). *Evaluación de la extracción de flavonoides a partir de la cáscara de naranja*. (Tesis de licenciatura). Fundación Universidad de America, Bogotá, Colombia.
- Ramírez-Ortíz, M.E., Rodríguez-Carmona, O.Y., Hernández-Rodríguez, O.S., Chel-Guerrero, L. & Aguilar-Méndez, M.A. (2016). Estudio de la actividad hipoglucemiante y antioxidante de tronadora, raíz de wereque y raíz de nopal. En Ramírez, M.E. (Ed). *Alimentos funcionales de hoy*. Barcelona, España: OmniaScience, 143-180.
- Rasool, B. A. (2012). Medicinal plants (importance and uses). *Pharmaceutica Analytica Acta*, 3(10), 1.
- Reich, E. & Schibli, A. (2006). *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. New York, United States of America: Thieme.

- Revilla-Monsalve, M.C., Andrade-Cetto, A., Palomino-Garibay, M.A., Wiedenfeld, H. & Islas-Andrade, S. (2007). Hypoglycemic effect of *Cecropia Obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. *Journal of ethnopharmacology*, 111, 636-640.
- Reyes, F.A., Pérez, M.L., Alfonso, E., Ramírez, M. & Jiménez, Y. (2016). Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. *Correo Científico Médico de Holguín*, 20(1), 98-121.
- Rios, M.Y. & Aguilar-Guadarrama, B. (2006). Alcaloides indólicos, terpenos, esteroides y flavonoides de las hojas de *Hamelia patens* Jacquin (Rubiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11(1), 1-5.
- Ríos, J.L., Francini, F. & Schinella, G. (2016). Productos naturales para el tratamiento de la diabetes (I): Mecanismos de acción. *Revista de Fisioterapia*, 16(1), 17-31.
- Rivas, K.E., Muñoz, D.L., Pino, C.N. & Balcázar, N. (2015). Actividad antioxidante, contenido fenólico total y citotoxicidad de extractos polares obtenidos de plantas antidiabéticas colombianas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(3), 277-289.
- Rivera-Mondragón, A., Ortíz, O., Bijttebier, S., Vlietinck, A., Apers, S., Pieters, L. & Caballero-George, C. (2017). Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1500-1512.
- Rivera-Mondragón, A., Tuenter, E., Bijttebier, S., Cos, P., Apers, S., Caballero-George, C., Foubert, K. & Pieters, L. (2019). Two new antiplasmodial flavonolignans from leaves of *Cecropia Obtusifolia*. *Phytochemistry letters*, 31, 118-120.
- Rivero-Cruz, I., Cristians, S., Ovalle-Magallanes, B & Mata, R. (2019). Mexican copalchis of the Rubiaceae family: more than a century of pharmacological and chemical investigations. *Phytochem Reviews*, 18(6), 1435-1455.
- Robles-García, M.A., Aguilar, J., Gutiérrez-Lomeli, M., Rofriguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J.A., Guerrero-Medina, P.J., Madrigal-Pulido, J.A. & Del-Toro-Sánchez C.L. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de Tempisque (*Sideroxylum capiri* Pittier). *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 18(3), 3-8.
- Rojas, M. (2019). *Evaluación de la actividad antioxidante y polifenoles totales en extractos de las hojas de tres especies de plantas medicinales de Campo Verde, Ucayali-2018*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía, Yarinacocha, Perú.
- Rojas-Martínez, R., Basto-Abreu, A., Aguilar-Salinas, C.A., Zárate-Rojas, E., Villalpando, M. & Barrientos-Gutiérrez, T. (2017). Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *Salud pública de México*, 6(3), 224-232.

- Romero, R., Domínguez, G. & Guzmán, K. (2014). Cuantificación de polifenoles en hojas de un clon de *Uncaria tomentosa* (Willd. Ex Schult) D.C., proveniente de tres localidades de la región Ucayali. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(3), 174-182.
- Ruiz, S., Venegas, E., Valdiviezo, J.E. & Plasencia, J.L. (2018). Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante *in vitro* del zumo de “pur pur” *Passiflora tripartita* var. *Molissima* (Passifloraceae). *Arnaldoa*, 25(3), 1003-1014.
- Saad, B., Zaid, H., Shanak, S. & Kadan, S. (2017). *Anti-diabetes and Anti-obesity Medicinal Plants and Phytochemicals*. Cham, Switzerland: Springer.
- Sakagami, H. (2012). *Alternative Medicine*. Rijeka, Croatia. InTech.
- Sánchez-Molina, D., Vargas-Porras, M., Ortega-Toro, R. & Piñeros-Castro, Y. (2018). Extracción y encapsulación de compuestos fenólicos provenientes de cascarilla de arroz. *Revista colombiana de ciencias químico farmacéuticas*, 47(3), 410-423.
- Sarker, S., Latif, Z. & Gray, A. (2006). *Natural products isolation*. Totowa, New Jersey, United States of America: Humana Press Inc.
- Saucedo, TMS., Bañuelos, F, Cabrera, R & Ballesteros, M. (2006). La práctica de la medicina alternativa una realidad en el paciente diabético en Hermosillo, Sonora., México. *Salud Pública y Nutrición*, 7(4), 1-12.
- Shekhar, T. & Anju, G. (2014). Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine*, 1(4), 244-249.
- Sherma, J. & Fried, B. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography*. New York, United States of America: Marcel Dekker, Inc.
- Sierra-Sarmiento, M.A., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A. & Suarez, D. (2018). *Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Bogotá, Colombia: UNIAGRARIA.
- Soler, A. (2009). *Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional*. (Tesis doctoral). Universitat de Lleida, Lérida, España.
- Soumyanath, A. (2006). *Traditional medicine for modern times. Antidiabetic plants*. Florida, Unites States of America: Taylor & Francis group.
- Soto-García, M. & Rosales-Castro, M. (2016). Efectos del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 18(4), 701-714.
- Steinmann, V.W. (2009). *Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Pátzcuaro, Michoacán, México: Instituto de Biología UNAM.

- Sun, R., Korytkowski, M., Sereika, S., Saul, M., Li, D & Burke, L. (2018). Patient portal use in diabetes management: Literature Review. *JMIR Diabetes*, 3(4), 1-14.
- Tenorio-Galindo, G., Rodríguez-Trejo., D.A. & López-Ríos, G. (2008). Efecto del tamaño y color de la semilla en la germinación de *Cecropia Obtusifolia* Bertol (*Cecropiaceae*). *Agrociencia*, 42(5), 585-593.
- Thangaraj, P. (2016). *Pharmacological Assay of Plant-Based Natural Products*. Coimbatore, Tamil Nadu, India: Springer International Publishing.
- Torres, F., Paz, G. & Zapata, M. (2013). Las plantas pueden ser fuente de compuestos antidiabéticos que aún no han sido científicamente validados. *Ciencia & Salud*, 1(3), 11-18.
- Van Ngo, T., James, C., Bowyer, M.C., Duc Ngo, P. & Van Vuong, Q. (2017). Impact of Different Extraction Solvents on Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity from the Root of *Salacia chinensis* L. *Journal of Food Quality*, 1-8.
- Vermerris, W. & Nicholson, R. (2008). *Phenolic Compound Biochemistry*. United States of America: Springer.
- Vintimilla, P.F., Gilder, Y.O., Motoche, K.E. & Ortega, J.J. (2019). Diabetes Mellitus Tipo 2: Indincidencias, complicaciones y tratamientos actuales. *Revista científica mundo de la investigación y el conocimiento*, 3(1), 26-37.
- Villarreal, V. E., Gamarra, C., Silva, C., Cruzado, J. & Ruíz, G. (2019). Antioxidant activity in vitro and phenolic compounds of leaves of *Beautempsia avicenniifolia* (Kunth) Gaudich (*Capparaceae*). *Arnaldoa*, 16(1), 409-420.
- Villaseñor, J.L. & Ortiz, E. (2014). Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 134-142.
- Wagner, H., Bladt, S. & Zgainski, E.M. (1984). *Plant Drug Analysis*. New York, United States of America: Springer.
- Wagner, C. (2020). Complementary and Alternative Medicine. En *The United States Healthcare system: Overview, Driving Forces and Outlook for the Future* (229-421), North Carolina, United States of America: Health Administration Press.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. & Kowalska, T. (2008). *Thin layer chromatography in phytochemistry*. Boca Raton, Florida, United States of America: CRC Press.
- WHO. (2016). *Informe mundial sobre la diabetes*. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services.
- WHO.(2020). *Diabetes*. Recuperado de http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es.

- Wieland, S., Manheimer, E. & Berman, B. (2011). Development and classification of an operational definition of complementary and alternative medicine for the Cochrane collaboration. *Altern Ther Health Med*, 17(2), 50-59.
- Xu, L., Li, Y., Dai, Y. & Peng, J. (2018). Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. *Pharmacological Research*, 130, 451-465.
- Zazworsky, D., Bolin, J. & Gaubeca, V. (2006). *Handbook of Diabetes Management*. New York, United States Of America: Springer.
- Zevallos-Morales, A., Málaga, M. & Taype-Rondan, A. (2016). Tendencias de las búsquedas en Google sobre terapias de medicina alternativa y complementaria. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 55(2), 161-169.

ANEXOS

Anexo 1. Plantas nativas de México con potencial hipoglucemiante

Familia botánica	Nombre científico	Nombre común	Parte utilizada	Forma de preparación	Referencia
Acanthaceae	<i>Justicia spicigera</i> Schlecht.	Muicle	Corteza, hojas	Infusión	Soumyanath, 2006.
Agavaceae	<i>Agave potatorum</i> Zucc.	Magüey del pasmo (potatorum)	Hojas, tallos	Hervida	Padilla-Gómez, 2007
Aloaceae	<i>Aloe vera</i> L.	Sábila	Hoja	Decocción	Pérez-García V, 2009; UNAM, 2013; CONABIO, 2013.
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> L.	Mango criollo	Hojas, tallos	Cocción	Soumyanath, 2006.
Apocynaceae	<i>Plumeria rubra</i> L.	Cacaloxochitl (Ahaipuih en mixe)	Flores	Desconocido	Aguilar et al., 2003.
Bignoniaceae	<i>Tecoma stans</i> (L.) Kunth.	Trovador	Hojas	Cocida	Cervantes-Servín et al., 1990.
Bignoniaceae	<i>Parmentiera edulis</i> DC.	Cuajilote	Raíces, fruto, rama	Cocción infusión, jugo.	Soumyanath, 2006.
Bombacaceae	<i>Pachira aquatica</i> Aubl.	Apompo	Raíces	Infusión	Hernández-Galicia, et al., 2002.
Brassicaceae	<i>Lepidium virginicum</i> L.	Semilla de lenteja	Ramas	Infusión	Pérez-García, 2009; UNAM, 2013; CONABIO, 2013.
Burseraceae	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg.	Palo mulato	Corteza	Decocción	Hernández-Galicia, et al., 2002.

Cataceae	<i>Ferocactus latispinus</i> Britton & Rose	Biznaga	Toda	Hervida en té	Padilla, 2007.
Cactaceae	<i>Opuntia streptacantha</i> Lem.	Nopal	Penca	Extracto	Aguilar et al., 2013.
Cecropiaceae	<i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol.	Guarumbo, chancarro, hormiguillo, chiflón y koochlé.	Hojas secas	Infusión	Andrade-Cetto, 2010.
Cecropiaceae	<i>C. peralta</i> T.	Huarumbo, Quina y Guarumbo	Hojas, raíz, tallo	Infusión	Hernández-Galicia, et al., 2002.
Equisetaceae	<i>Equisetum hyemale</i> L.	Cola de caballo, carricillo y cañuela	Desconocido	Desconocido	Andrade-Cetto et al., 2005; CONABIO, 2013; Gallardo-Pérez, et al., 2006.
Euphorbiaceae	<i>Cnidoscolus chayamansa</i> Mc Vaugh	Chaya	Hojas	Infusión	Bautista-Cruz, et al., 2006.
Flacourtiaceae	<i>Samyda yucatanensis</i> Standl.	Naranja ché	Raíces	Decocción	Soumyanath, 2006.
Gramineae	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Caña de cuchi	Toda la planta	Decocción	Soumyanath, 2006.
Julianaceae	<i>Amphypterygium adstringens</i> (Schltdl.) Schiede. Syn.	Cuachalalate	Corteza	Infusion	Soumyanath, 2006.
Labiataea	<i>Mentha piperita</i> L.	Hierbabuena	Ramas, toda la planta	Infusión, decocción	Soumyanath, 2006.
Lamiaceae	<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.	Salvia	Hojas, tallo	Infusión	Hernández-Galicia, et al., 2002.
Lamiaceae	<i>Salvia amarissima</i> Ort.	Bretonica	Hojas	Cocida	Cervantes-Servín et al., 1990.
Leguminosae	<i>Sweetia panamensis</i> Benth.	Huayacán, Guayacan,	Corteza	Decocción	Hernández-Galicia, et al.,

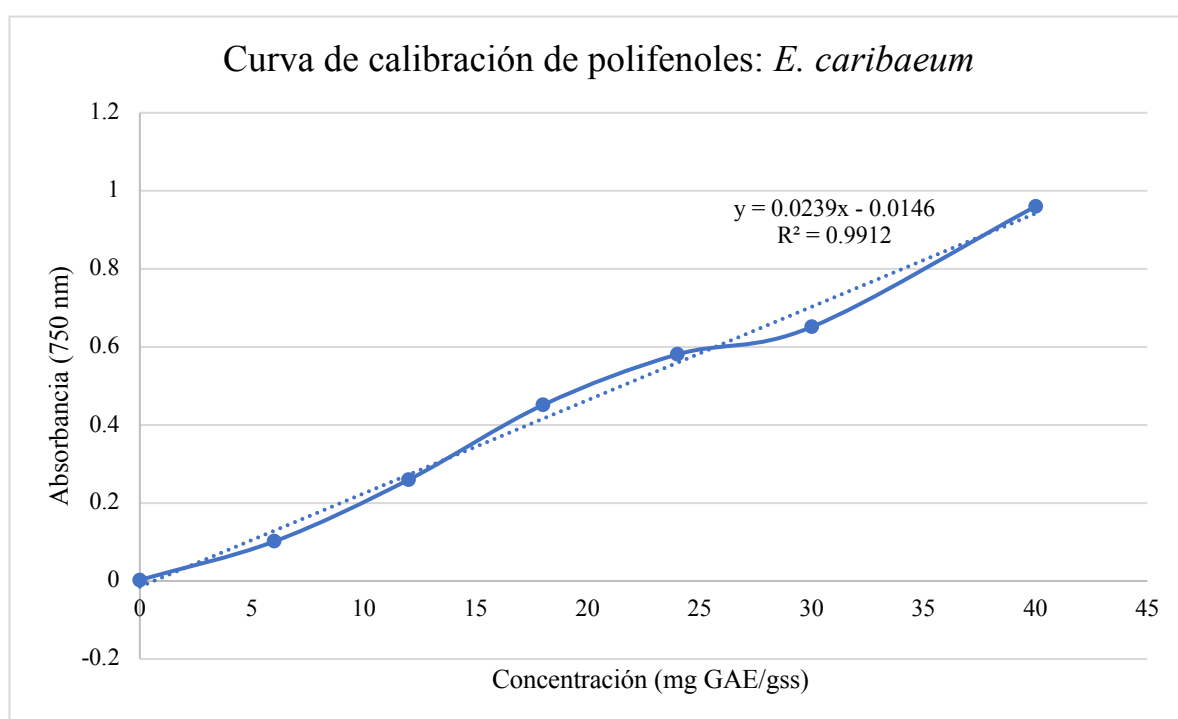
		bálsamo			2002.
Musaceae	<i>Musa sapientum</i> L.	Flor de plátano	Raíz, flores	Infusión, decocción	Hernández-Galicia, et al., 2002.
Musaceae	<i>Musa paradisiaca</i> L.	Flor de plátano	Raíz, flores	Infusión, decocción	Hernández-Galicia, et al., 2002.
Nyctaginaceae	<i>Salpianthus macrodonthus</i> Stand.	Catarinita, catarinilla	Hojas, flores, raíz	Decocción	Hernández-Galicia, et al., 2002.
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca</i> L.	Sangre de toro o perla china	Fruto	Desconocido	Padilla, 2007.
Rosaceae	<i>Eriobotrya japónica</i> (Thub.) Lindl.	Níspero	Hojas, flores	La infusión, decocción	Hernández-Galicia, et al., 2002.
Rubiaceae	<i>Hamelia patents</i> Jacq.	Coral	Flor	Infusión	Pérez-García, 2009; UNAM, 2013; CONABIO, 2013.
Rubiaceae	<i>E. Caribaeum</i> (Jacq.) Roem. & Schult-	Quina	Hojas, corteza	Infusión	Guerrero-Analco et al., 2007.
Verbenaceae	<i>Lantana cámara</i> L.	Orozuz (toots-kumod en mixe)	Hojas, ramas	Desconocido	Aguilar et al., 2013.

Anexo 2. Reveladores utilizados en CCF

Revelador	Aplicación
Yodo (I ₂)	Mancha temporal. Se debe insertar la placa de CCF en la cámara y retirarla después de que desarrolle un color marrón claro en toda la placa.
<i>p</i> -Anisaldehído	Carbohidratos, se requiere calentamiento para teñir la placa dando como resultado varios colores.
Verde de bromocresol	Los ácidos carboxílicos producen manchas de color amarillo verdoso sobre fondo azul; no requiere calefacción.
CAM	Revelador universal se requiere calentamiento para teñir la placa, produce manchas azul oscuro sobre fondo claro.
Sulfato de Cerio (IV)	Es un revelador general, muy eficaz para alcaloides; debe rociarse sobre la placa (no sumergir) y luego calentarse para que la mancha aparezca como manchas negras sobre un fondo amarillo-blanco
Ácido crómico	A diferencia de otros reveladores, este produce manchas negras.
2,4-DNP	Reveladores utilizados para aldehídos y cetonas, produciendo manchas de color naranja y no se requiere calor.
Reactivo de Dragendorff	Utilizado para aminas no reactivas, alcaloides, produciendo manchas color naranja y no requiere calor.
Reactivo de Ehrlich	Aminas, derivados de indol, antibióticos, esteroides; se hace uso de calentamiento suave (temperatura más baja y tiempo de calentamiento más corto; retirando la fuente de calor antes de que el color de fondo oscurezca las manchas) necesario para teñir la placa.
Spray de cloruro férrico	Utilizado para fenoles
Yodoplatinato (PIP)	Utilizado para alcaloides
Hidrato de morina	Revelador general fluorescentemente activo.
Ninhidrina	Excelente revelador para aminas, aminoácidos y aminoazúcares.
Permanganato de potasio	Principalmente para compuestos insaturados y alcoholes; los alquenos / alquinos / aromáticos generalmente se tiñen sin calentar mientras que otros grupos oxidables requieren calentamiento; produce manchas amarillas sobre fondo morado
Ácido fosfomolibdico (PMA)	Es un buen revelador, requiere calentamiento para teñir la placa, produciendo manchas azul-verde oscuro.
Ácido sulfúrico	Para este revelador es importante utilizar calor en la placa, ya que produce manchas carbonizadas permanentes.
Vainillina	Para este revelador es importante utilizar calor en la placa, produce manchas de una gama de colores.

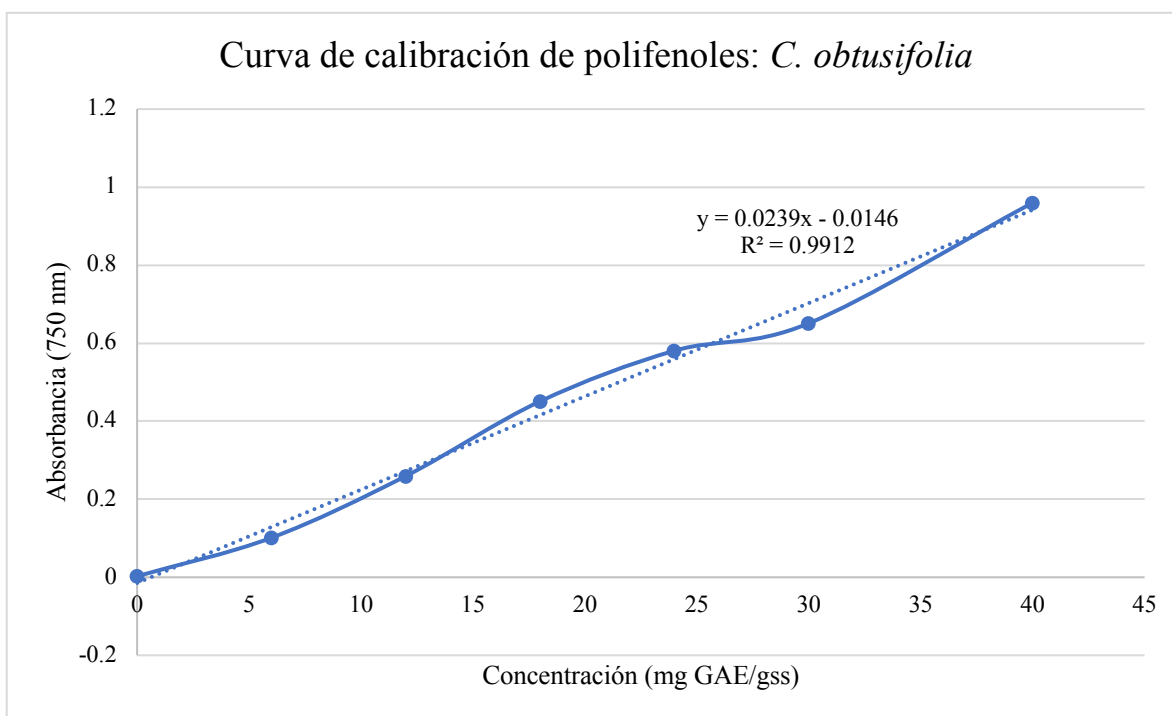
Anexo 3. Curva de calibración para la cuantificación de CPT de extractos de hojas de *E. caribaeum*

Concentración (mg GAE /gss)	Absorbancia 750 nm
40	0.959934
30	0.650938
24	0.580682
18	0.45099
12	0.259458
6	0.10138
0	0.002784



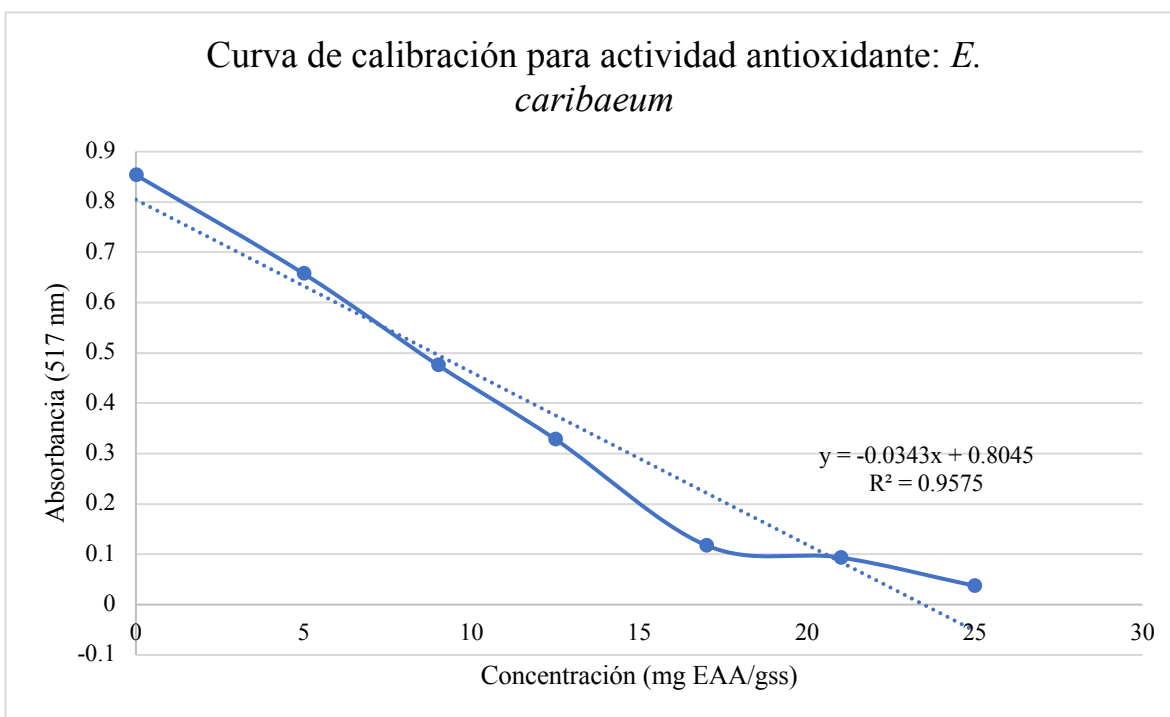
Anexo 4. Curva de calibración para la cuantificación de extractos de hojas de CPT de *C. obtusifolia*

Concentración (mg GAE /gss)	Absorbancia (750nm)
40	0.959934
30	0.650938
24	0.580682
18	0.45099
12	0.259458
6	0.10138
0	0.002784



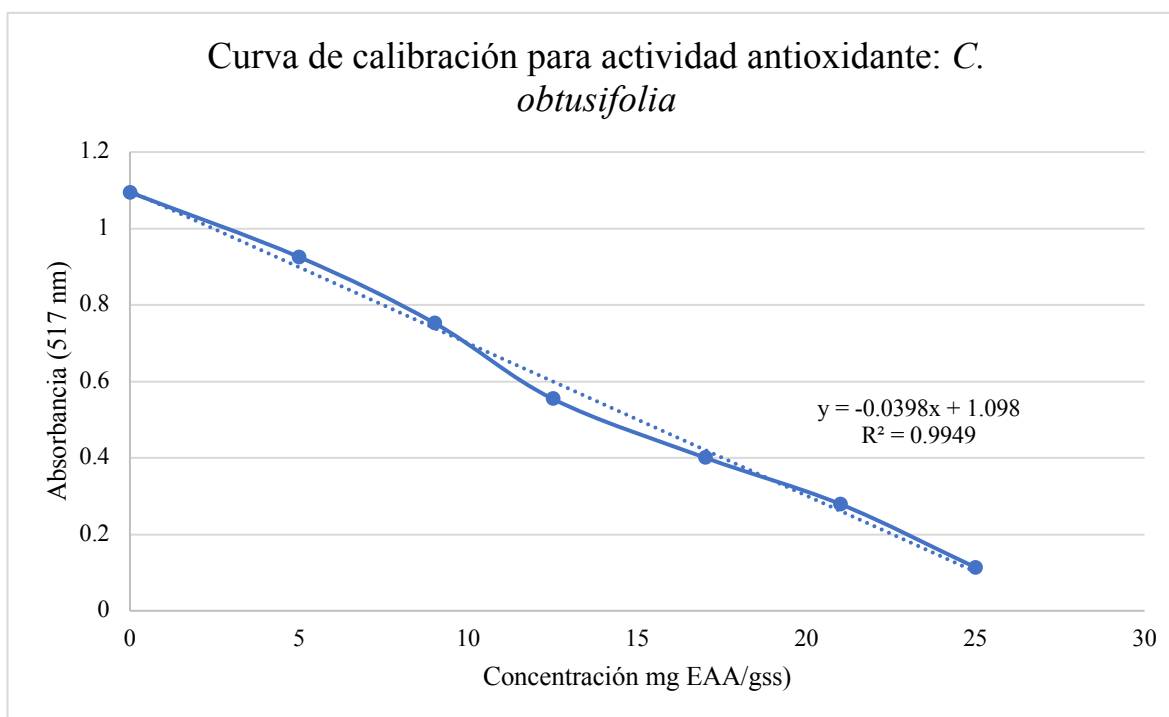
Anexo 5. Curva de calibración para la cuantificación de AA de extractos de hojas de *E. caribaeum*.

Concentración (mg EAA/gss)	Absorbancia (517 nm)
25	0.037388
21	0.093628
17	0.117708
12.5	0.328529
9	0.47597
5	0.657506
0	0.853528



Anexo 6. Curva de calibración para la cuantificación de AA de extractos de hojas de *C. obtusifolia*

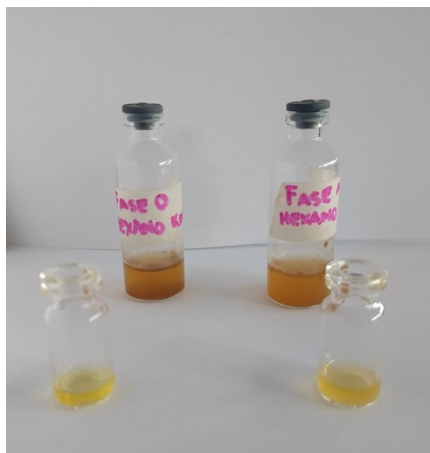
Concentración (mg EAA/gss)	Absorbancia (517 nm)
25	0.113522
21	0.279192
17	0.400777
12.5	0.554424
9	0.752871
5	0.925452
0	1.094553



Anexo 7. Análisis fitoquímico para la fase orgánica y acuosa de los extractos fraccionados de hojas de *E. caribaeum*

Prueba de Dragendorff

Fracción enriquecida de hexano



Fracción enriquecida de acetato de etilo



Fracción enriquecida de CH₂Cl₂

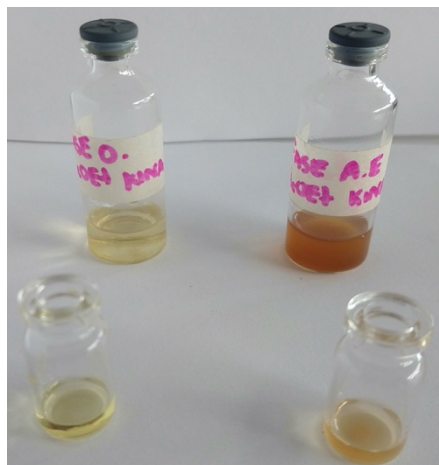


Prueba de Mayer

**Fracción enriquecida
de hexano**



**Fracción enriquecida
de acetato de etilo**



**Fracción enriquecida
de CH₂Cl₂**



Ácidos fenólicos

**Fracción enriquecida
de hexano**



**Fracción enriquecida
de acetato de etilo**



**Fracción enriquecida
de CH_2Cl_2**



Saponinas

**Fracción enriquecida
de hexano**



**Fracción enriquecida
de acetato de etilo**



**Fracción enriquecida
de CH₂Cl₂**



Lactonas insaturadas

Fracción enriquecida
de hexano



Fracción enriquecida
de acetato de etilo



Fracción enriquecida
de CH_2Cl_2

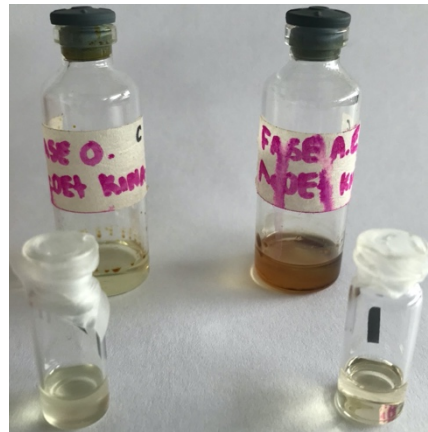


Esteroles y triterpenoides

**Fracción enriquecida
de hexano**



**Fracción enriquecida
de acetato de etilo**



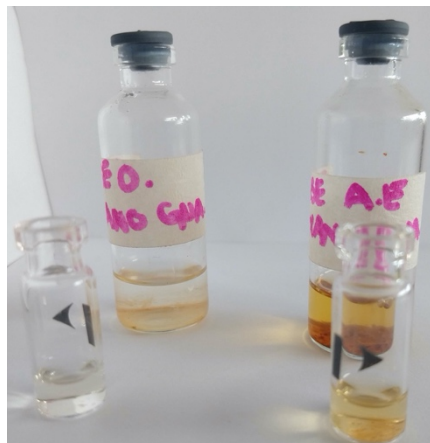
**Fracción enriquecida
de CH₂Cl₂**



Anexo 8. Análisis fitoquímico para la fase orgánica y acuosa de los extractos fraccionados de hojas de para *C. obtusifolia*

Prueba de Dragendorff

**Fracción enriquecida
de hexano**



**Fracción enriquecida
de acetato de etilo**



**Fracción enriquecida
de CH₂Cl₂**



Prueba de Mayer

**Fracción enriquecida
de hexano**



**Fracción enriquecida
de acetato de etilo**



**Fracción enriquecida
de CH₂Cl₂**



Ácidos fenólicos

**Fracción enriquecida
de hexano**



**Fracción enriquecida
de acetato de etilo**

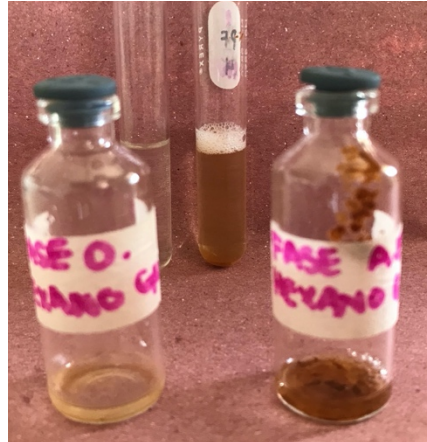


**Fracción enriquecida
de CH₂Cl₂**



Saponinas

**Fracción enriquecida
de hexano**



**Fracción enriquecida
de acetato de etilo**



**Fracción enriquecida
de CH₂Cl₂**



Lactonas insaturadas

Fracción enriquecida
de hexano



Fracción enriquecida
de acetato de etilo

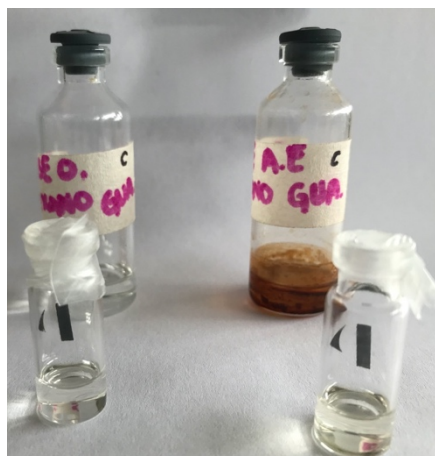


Fracción enriquecida
de CH_2Cl_2



Esteroles y triterpenoides

**Fracción enriquecida
de hexano**



**Fracción enriquecida
de acetato de etilo**



**Fracción enriquecida
de CH₂Cl₂**



Anexo 9. CCF para la detección de flavonoides en muestras de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*.

CCF Flavonoides (254 nm)

Estándares

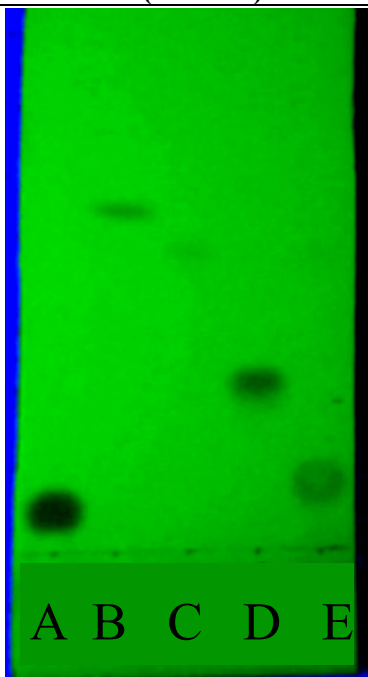


Figura 17. CCF estándares para Flavonoides

A-Ácido gálico, B-Naringenina, C-Kaempferol, D-Quercetina
E-Hidrato de morina

E. caribaeum

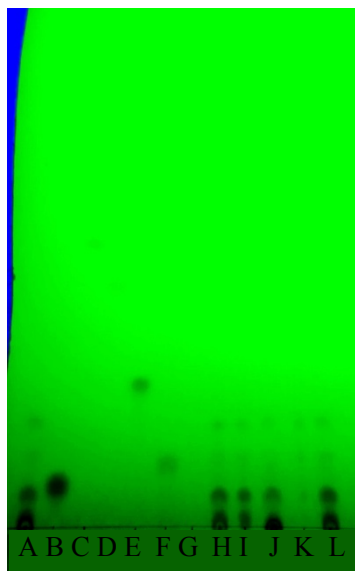


Figura 18. CCF para flavonoides de extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de *E. caribaeum*

A-EHA Kina, B-Ácido gálico, C-Naringenina, D-Kaempferol, E-Quercetina, F-Hidrato de morina, G-F.O hexano, H-F.A hexano, I-F.O acetato de etilo, J-F.A acetato de etilo, K-F.O diclorometano, L- F.A diclorometano

C. obtusifolia

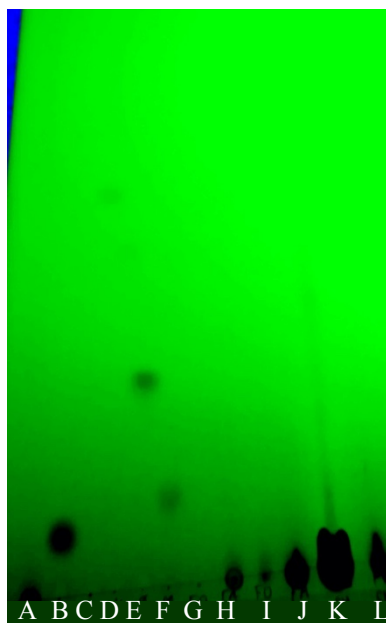


Figura 19. CCF para flavonoides de de extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de *C. obtusifolia*

A-EHA guarumbo, B-Ácido gálico, C-Naringenina, D-Kaempferol, E-Quercetina, F-Hidrato de morina, G-F.O hexano, H-F.A hexano, I-F.O acetato de etilo, J-F.A acetato de etilo, K-F.O diclorometano, L- F.A diclorometano

Fase móvil: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{O}_2$ (5:4:1), F.O: Fase Orgánica, F.A: Fase Acuosa, EHA: Extractos hidroetanólicos acidificados.

Anexo 10. CCF para la detección de ácidos fenólicos en muestras de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*

CCF Ácidos Fenólicos (254 nm)

Estándares

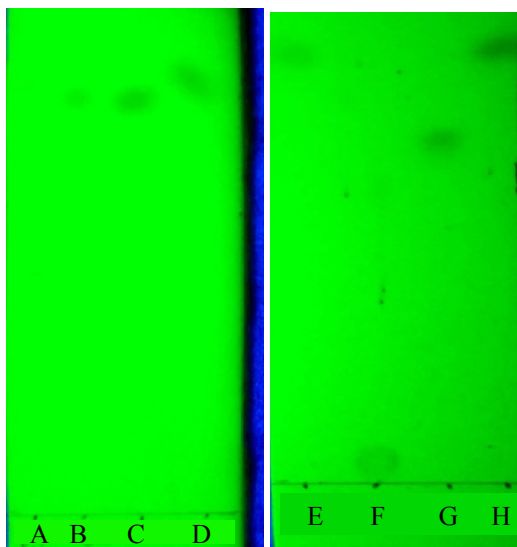


Figura 20. CCF estándares para ácidos fenólicos

A-Ácido-p-cumárico, B- Ácido siríngico, C-Ácido sinápico, D- Ácido de vainilla
E- Ácido trans-ferúlico, F- Ácido clorogénico, G- Ácido alérico, H- Ácido ferúlico

E. caribaeum

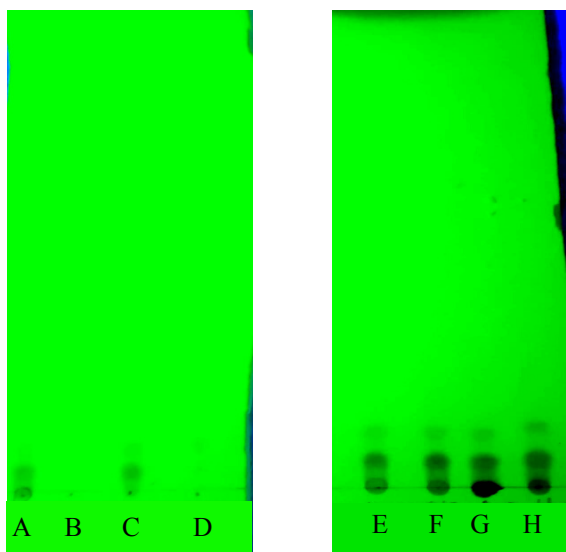


Figura 21. CCF para ácidos fenólicos de extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de *E. caribaeum*

A-Muestra Kina, B-hexano, C-diclorometano, D-acetato de etilo: de la fase orgánica
E=H-hexano, F-diclorometano, G-acetato de etilo: de la fase acuosa

C. obtusifolia

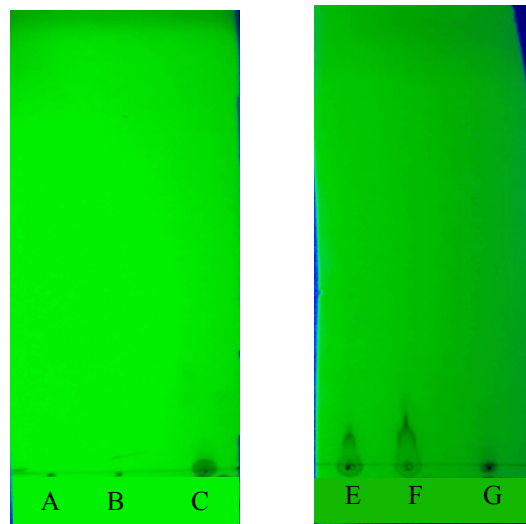


Figura 22. CCF para ácidos fenólicos de extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de *C. obtusifolia*

A-hexano, B-diclorometano, C-acetato de etilo: de la fase orgánica
D-hexano, E-diclorometano, F-acetato de etilo: de la fase acuosa

Fase móvil: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (90:10:1) F.O: Fase Orgánica, F.A: Fase Acuosa, EHA: Extractos hidroetanólicos acidificados.

CCF Ácidos Fenólicos (365 nm)

Muestras

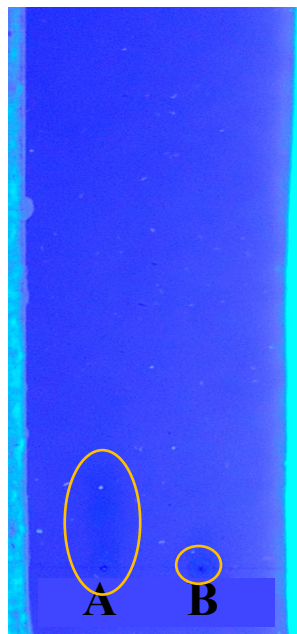


Figura 23. CCF extractos hidroetanólicos de *E. caribaeum* y *C. obtusifolia*

A-kina, B-guarumbo

E. caribaeum

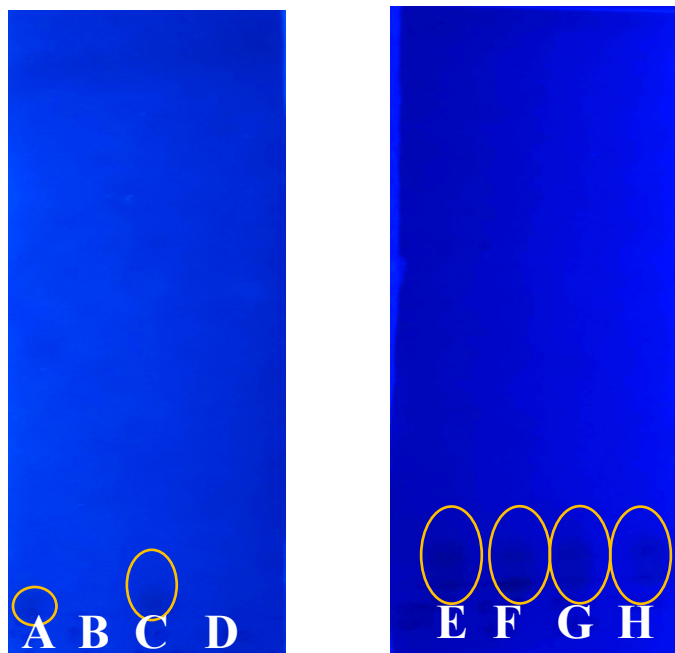


Figura 24. CCF para ácidos fenólicos de extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de *E. caribaeum* (365nm)

A-Muestra kina, B-hexano, C-diclorometano, D-acetato de etilo: de la fase orgánica
E=H-hexano, F-diclorometano, G-acetato de etilo: de la fase acuosa

C. obtusifolia

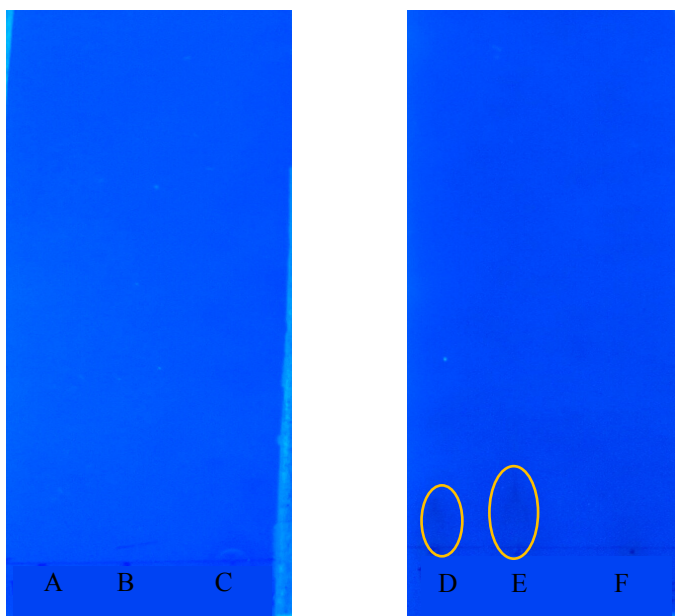


Figura 25. CCF para ácidos fenólicos de extractos hidroetanólicos acidificados de hojas de *C. obtusifolia*

A-hexano, B-diclorometano, C-acetato de etilo: de la fase orgánica
D-hexano, E-diclorometano, F-acetato de etilo: de la fase acuosa

Fase móvil: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (90:10:1) F.O: Fase Orgánica, F.A: Fase Acuosa, EHA: Extractos hidroetanólicos acidificados.