



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

INGENIERÍA EN ALIMENTOS

ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE EXTRACTOS POLARES DE *Galium mexicanum* Kunth

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

RAFAEL MATADAMAS LÓPEZ

DIRECTORA: DRA. BEATRIZ HERNÁNDEZ CARLOS

CO-DIRECTORA: DRA. NORMA FRANCENIA SÁNTOS SÁNCHEZ

JUNIO 2022, HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA, MÉXICO

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Análisis Instrumental del Instituto de Agroindustrias y en el Laboratorio de Principios Bioactivos, perteneciente al edificio de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca bajo la dirección de la Dra. Beatriz Hernández Carlos y la codirección de la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez.

Parte de los resultados obtenidos de esta tesis se presentaron en la modalidad de presentación *flash* en la 7^{ma} Reunión de Resonancia Magnética Experimental en su modalidad virtual, impartida los días 28 y 29 de octubre del año 2021 por la Sociedad Mexicana de Resonancia Magnética Nuclear A. C. (SOMERMN).

Dedicatoria

A mi familia, por apoyarme siempre.

A mi abuelita, Mamajose, por amarme tanto.

Agradecimientos

A mi familia, por brindarme todas las posibilidades para estudiar lo que me gusta, poder desarrollarme plenamente y por su arduo trabajo para salir adelante.

A mis mejores amigos, Albita, Alfredo y Luis Ángel, por formar parte esencial de mi vida y desarrollo como persona, los quiero mucho.

A mi directora de tesis, la Dra. Beatriz Hernández Carlos, por sembrar en mí el interés por la RMN, por brindarme la oportunidad de trabajar con ella, por su paciencia, dedicación e interés por este proyecto, así como también por los conocimientos brindados durante el desarrollo del mismo.

A mi codirectora de tesis, la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez, por todos los conocimientos brindados durante el desarrollo de este proyecto, por transmitir su pasión por la química a través de sus clases, por los consejos brindados como parte del programa de tutorías, así como también por mostrar a los estudiantes el rigor científico que nos permite mejorar como investigadores.

A mis evaluadores, la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza, Dr. Raúl Salas Coronado y Dra. Edith Graciela González Mondragón por las aportaciones a este proyecto, así como por ser parte fundamental de mi educación durante la carrera.

A la técnico de laboratorio, Angélica López, por la asistencia brindada durante el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos de la carrera, Nalle, Chu, Magda, Darwin, Erika, Irma, por los todos los momentos que viví a su lado durante este periodo de mi vida.

A mis amigos del laboratorio, Jerza, Isa, Karla, Germán, Héctor, por todas las convivencias, pláticas y consejos, en especial a Juan Carlos y Yare, por cuidar de mí durante mi estancia en el laboratorio.

A Alexandra Asánovna Elbakián y sus colaboradores, por el acceso libre al conocimiento científico que proporcionan a través de su base de datos.

RESUMEN

Galium mexicanum Kunth es una planta consumida tradicionalmente en México para el tratamiento de problemas fisiológicos diversos, cuyos extractos presentan actividades biológicas *in vitro* destacables. En este proyecto de tesis se presenta el primer estudio químico de la especie en cuestión, la cual se obtuvo del municipio de San Miguel Suchixtepec, Oaxaca.

En primera instancia se obtuvo el extracto metanólico de las partes aéreas de *G. mexicanum* mediante extracción asistida por ultrasonido. A partir de este extracto se aislaron diez metabolitos secundarios mediante el uso de técnicas cromatográficas en fase normal y reversa. Tres de estos metabolitos secundarios se identificaron en la fracción menos polar (fracción AcDS) y los siete restantes se obtuvieron de la fracción más polar del extracto (fracción M3Me). Los compuestos purificados fueron caracterizados mediante el análisis de los datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear en una y dos dimensiones. Los metabolitos identificados en la fracción M3Me fueron: asperulósido (I), ácido clorogénico (II), dafilósido (III), isoquercetina (IV), rutina (V), astragalina (VI) y nicotiflorina (VII); mientras que en la fracción AcDS se identificaron los siguientes: β -sitosterol (VIII), luteína (IX) e iresina (X). Los compuestos VII y X se aislaron por primera vez en el género *Galium*.

La fracción M3Me, evaluada mediante el ensayo de reducción del radical libre DPPH, mostró el IC₅₀ más bajo (IC₅₀ = 23.41 ± 1.11 µg/mL) con respecto a las 3 fracciones evaluadas (M3Me, EMeF y extracto crudo metanólico), valor que concuerda con el tratamiento realizado para la obtención de esta fracción al aumentar la proporción de polifenoles y flavonoides en la misma, mientras que el extracto metanólico presentó una capacidad antioxidante aproximadamente seis veces menor que la fracción M3Me en el mismo ensayo (IC₅₀ = 145.91 ± 1.01 µg/mL), mostrando actividad antirradicalar moderada con respecto a otras especies del género *Galium*. Se propone que los metabolitos secundarios identificados en las fracciones de los extractos de esta especie pueden ser los responsables de la capacidad antioxidante, actividad antiparasitaria y/o antiinflamatoria.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Importancia del estudio.....	2
2.	MARCO TEÓRICO	3
2.1.	Generalidades de <i>Galium mexicanum</i> Kunth	3
2.2.	Métodos de extracción	5
2.3.	Métodos de separación cromatográfica	6
2.3.1.	Cromatografía en columna	7
2.3.2.	Cromatografía en capa fina (CCF)	7
2.4.	Productos naturales y su uso potencial como aditivos en la industria alimentaria	8
2.4.1.	Antioxidantes	9
2.4.2.	Ensayo de reducción del radical libre DPPH [•]	9
2.4.3.	Capacidad antioxidante en el género <i>Galium</i>	11
2.5.	Compuestos orgánicos descritos en el género <i>Galium</i>	13
2.5.1.	Iridoides	15
2.5.2.	Antraquinonas	16
2.5.3.	Flavonoides	18
2.5.4.	Triterpenos.....	19
2.5.5.	Ácido hidroxicinámico y derivados.....	20
2.6.	Elucidación estructural de metabolitos secundarios	21
2.6.1.	Resonancia magnética nuclear (RMN)	22
3.	JUSTIFICACIÓN	31
4.	HIPÓTESIS	32
5.	OBJETIVOS	33
5.1.	Objetivo general	33
5.2.	Objetivos específicos	33
5.3.	Metas	33
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
6.1.	Reactivos, consumibles y disolventes	34
6.2.	Materiales y equipos	34
6.3.	Material vegetal.....	37
6.4.	Obtención de extractos	37
6.5.	Obtención de la infusión.....	38

6.6.	Separación y purificación.....	38
6.6.1.	Partición del extracto metanólico	38
6.6.2.	Tratamiento de la fracción EMeF.....	39
6.6.3.	Tratamiento de la fracción M2Me	40
6.6.4.	Tratamiento de la fracción M3Me	40
6.6.5.	Tratamiento de la fracción EAc.....	43
6.6.6.	Tratamiento de la infusión	47
6.7.	Obtención de constantes físicas de los compuestos purificados.....	47
6.7.1.	Experimentos de RMN	47
6.7.2.	Elucidación estructural	47
6.8.	Evaluación de la capacidad antioxidante, CAO, de los extractos.....	48
6.8.1.	Preparación de las disoluciones	48
6.8.2.	Cuantificación	49
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
7.1.	Fraccionamiento de extracto de <i>Galium mexicanum</i>	51
7.2.	Interpretación de los datos espectroscópicos de RMN.....	52
7.2.1.	Elucidación de la fracción M2MeB	54
7.2.2.	Elucidación de la fracción M3Me 2-5.....	61
7.2.3.	Elucidación de la fracción M3Me 20-26.....	66
7.2.4.	Elucidación de la fracción FM1b	71
7.2.5.	Elucidación de la fracción M3Me 65-74.....	75
7.2.6.	Elucidación de la fracción FM3 Ac	78
7.2.7.	Elucidación de la fracción A	82
7.2.8.	Elucidación de la fracción D	83
7.2.9.	Elucidación de la fracción AB-AD.....	86
7.2.10.	Elucidación de la fracción r-w	93
7.3.	Evaluación de la capacidad antirradicalar	99
8.	CONCLUSIONES.....	104
9.	PERSPECTIVAS.....	105
10.	APÉNDICES	106
	Apéndice A. Experimentos de RMN en 1D y 2D de compuestos aislados de <i>G. mexicanum</i> ...	106
	Apéndice A-1. Espectros de RMN del compuesto I	106
	Apéndice A-2. Espectros de RMN del compuesto II.....	109
	Apéndice A-3. Espectros de RMN del compuesto III.....	111

Apéndice A-4. Espectros de RMN del compuesto IV	113
Apéndice A-5. Espectros de RMN de la mezcla de compuestos IV y V	115
Apéndice A-6. Espectros de RMN de la mezcla de compuestos VI y VII	118
Apéndice A-7. Espectros de RMN del compuesto IX	121
Apéndice A-8. Espectros de RMN del compuesto X	124
Apéndice B. Curvas de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante frente al radical libre DPPH'	128
Apéndice B-1. Curvas de calibración de los controles (ácido gálico, ácido ascórbico y ácido clorogénico) para el cálculo del IC₅₀ frente al radical libre DPPH'	128
Apéndice B-2. Curvas de calibración de las fracciones M3Me, EMeF y del extracto metanólico crudo para el cálculo del IC₅₀ frente al radical libre DPPH'	129
Apéndice B-3. Cálculos realizados para la prueba de rangos múltiples de Duncan	130
11. REFERENCIAS	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Galium mexicanum</i> (amor de hortelano, pegarropa, cuajaleche) y su clasificación taxonómica	3
Figura 2. Partes aéreas de <i>Galium mexicanum</i>	3
Figura 3. Proceso de cromatografía en columna	7
Figura 4. Esteviósido, un edulcorante de origen natural	8
Figura 5. Reducción del radical libre DPPH'	10
Figura 6. Biosíntesis de terpenoides en plantas.....	14
Figura 7. Ruta del ácido shikímico.....	15
Figura 8. Estructura química base de los iridooides.....	16
Figura 9. Iridooides reportados en el género <i>Galium</i>	16
Figura 10. Estructura base de las antraquinonas.....	17
Figura 11. Antraquinonas reportadas en el género <i>Galium</i>	17
Figura 12. Estructura base de los flavonoides.....	18
Figura 13. Clasificación de los flavonoides.....	18
Figura 14. Flavonoides reportados en el género <i>Galium</i>	19
Figura 15. Escualeno, precursor de los triterpenos	19
Figura 16. Ácido oleanólico, triterpeno reportado en el género <i>Galium</i>	20
Figura 17. Derivados principales del ácido hidroxicinámico	21
Figura 18. Correlaciones observadas en los experimentos de RMN (isoquercetina)	25
Figura 19. Espectrómetro de RMN usado en este estudio (Laboratorio de principios bioactivos, UTM).....	35
Figura 20. Metodología general empleada en este trabajo.....	36
Figura 21. Obtención del extracto metanólico de <i>G. mexicanum</i>	37
Figura 22. Tratamiento de la fracción acuosa con amberlita.....	39
Figura 23. Extracción líquido-líquido H ₂ O-AcOEt	39
Figura 24. Columna C18 de la fracción M3Me	40
Figura 25. Purificación de la fracción AB-AD	45
Figura 26. Lector de microplacas utilizado en este estudio.....	49
Figura 27. Espectros de protón del a) extracto crudo y las fracciones b) 5', c) AgMe (MeOH- <i>d</i> ₄) y d) EAc en CDCl ₃ 400 MHz	52
Figura 28. Espectro DEPTQ del extracto crudo (trazo superior, MeOH- <i>d</i> ₄) y de la fracción EAc (trazo inferior, CDCl ₃) 400 MHz	53
Figura 29. Espectro de ¹ H del asperulósido (I) en piridina- <i>d</i> ₅ (400 MHz)	55
Figura 30. Espectro DEPTQ del asperulósido (I) en piridina- <i>d</i> ₅ (100 MHz)	55
Figura 31. Sección del espectro COSY 2D de I y sus correlaciones clave	56

Figura 32. Espectro HMBC de I y sus correlaciones clave	57
Figura 33. Sección del espectro NOESY 2D de I y sus correlaciones clave.....	59
Figura 34. Espectro de ^1H del ácido clorogénico (II) en $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz)	61
Figura 35. Espectro DEPTQ del ácido clorogénico (II) en $\text{MeOH-}d_4$ (100 MHz)	62
Figura 36. Espectro HMBC de II y sus correlaciones clave	63
Figura 37. Sección del espectro COSY 2D de II y sus correlaciones clave	64
Figura 38. Espectro de ^1H del dafilósido (III) en piridina- d_5 (400 MHz)	66
Figura 39. Espectro DEPTQ del dafilósido (III) en piridina- d_5 (100 MHz).....	67
Figura 40. Espectro HMBC de III y sus correlaciones clave	68
Figura 41. Modelos 3D de las agliconas de I y III , respectivamente.	69
Figura 42. Espectro de ^1H de la isoquercetina (IV) en $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz).....	71
Figura 43. Sección del espectro HMBC de IV y sus correlaciones clave	72
Figura 44. Espectro DEPTQ de la isoquercetina (IV) en $\text{MeOH-}d_4$ (100 MHz)	73
Figura 45. Estructura de la rutina (V)	75
Figura 46. Espectro de ^1H de la mezcla isoquercetina-rutina en $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz) *s.o. señales ocultas.....	76
Figura 47. Espectro HMBC de la mezcla de IV y V y sus correlaciones clave.....	77
Figura 48. Espectro de ^1H de la mezcla astragalina (VI) – nicotiflorina (VII) en $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz)	79
Figura 49. Sección del espectro HMBC de VI y VII y sus correlaciones clave	80
Figura 50. Espectro de ^1H de la fracción A en CDCl_3 (400 MHz)	82
Figura 51. Espectro DEPTQ de la fracción A en CDCl_3 (100 MHz)	83
Figura 52. Espectro de ^1H de VIII en CDCl_3 (400 MHz).....	84
Figura 53. Espectro DEPTQ del β -sitosterol en CDCl_3 (100 MHz).....	84
Figura 54. Trazos del espectro de ^1H de IX en acetona- d_6 (400 MHz).....	86
Figura 55. Sección del espectro COSY 2D de IX y sus correlaciones clave.....	88
Figura 56. Sección del espectro HMBC de IX y sus correlaciones clave.....	89
Figura 57. Espectro DEPTQ de la luteína en acetona- d_6 (100 MHz).....	92
Figura 58. Espectro DEPTQ de X en CDCl_3 (100 MHz)	93
Figura 59. Espectro de ^1H de X en CDCl_3 (400 MHz)	94
Figura 60. Ampliación del espectro de protón de la iresina en la región 1.2-2.9 ppm (CDCl_3 , 400 MHz)	94
Figura 61. Sección del espectro COSY 2D de X y sus correlaciones clave.....	95
Figura 62. Sección de espectro HMBC de X y sus correlaciones clave.....	96
Figura 63. Espectros TOCSY 1D de X (Frecuencia irradiada trazo superior: 3.511 ppm, trazo inferior: 2.793 ppm)	97
Figura 64. Sección del espectro de X NOESY 2D y sus correlaciones clave	97

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Capacidad antioxidante por el método del radical DPPH' en el género <i>Galium</i>	12
Tabla 2. Experimento de RMN utilizados en la elucidación estructural	24
Tabla 3. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de RMN de ¹ H de compuestos descritos en <i>Galium</i>	28
Tabla 4. Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C de compuestos descritos en <i>Galium</i>	30
Tabla 5. Cromatografía de la fracción M3Me	41
Tabla 6. Cromatografía de la fracción M3 55-64	42
Tabla 7. Cromatografía de la fracción M3 75-79	43
Tabla 8. Cromatografía de la fracción AcDS	44
Tabla 9. Cromatografía de la fracción AO-AU (sin la fracción AS)	46
Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto I (piridina- <i>d</i> ₅).....	60
Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto II (MeOH- <i>d</i> ₄)	65
Tabla 12. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto III (piridina- <i>d</i> ₅)	70
Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto IV (MeOH- <i>d</i> ₄)	74
Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN de los compuestos VI y VII (MeOH- <i>d</i> ₄).....	81
Tabla 15. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto VIII (CDCl ₃)	85
Tabla 16. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto IX (acetona- <i>d</i> ₆).....	90
Tabla 17. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto X (CDCl ₃)	98
Tabla 18. Ecuaciones de regresión lineal, coeficientes de determinación y valores de IC ₅₀ obtenidas en la evaluación de la capacidad antirradicalar para el crudo y fracciones de <i>G. mexicanum</i>	100
Tabla 19. Valores de IC ₅₀ de plantas del género <i>Galium</i> y de algunas ampliamente consumidas.....	101
Tabla 20. Valores de IC ₅₀ de compuestos puros identificados en el extracto de <i>G. mexicanum</i>	102

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
AcOEt	Acetato de etilo
CAO	Capacidad antioxidante
CC	Cromatografía en columna
CCF (TLC)	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetro
DPPH [•]	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EtOH	Etanol
g	gramos
Glc	Glucosa
Hz	Hercios
Hx	Hexano
IC ₅₀	Concentración requerida para inhibir el 50 % del radical DPPH [•]
kg	Kilogramo
MeOH	Metanol
MIC	Concentración mínima inhibitoria
L	Litro
mL	Mililitros
min	Minutos
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
UV	Ultravioleta
µg	Microgramos
µL	Microlitros

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la vida de la sociedad ha pasado a depender en gran medida de los alimentos procesados, por lo que la industria alimenticia ha tratado de satisfacer la demanda con una gran variedad de productos. Sin embargo, este hecho también ha resaltado la importancia de la nutrición de calidad en las personas debido al incremento en las enfermedades y problemas de salud asociados a una mala alimentación. Esta situación ha propiciado que los consumidores sean más conscientes de lo que compran y consumen, creando tendencias diferentes en la industria alimenticia con el fin de reducir las inquietudes del consumidor y satisfacer sus necesidades, tal es el caso del uso de aditivos de origen natural, como lo son los antioxidantes.

Los alimentos funcionales han tomado relevancia debido a las tendencias que la sociedad ha desarrollado en los últimos años, esta importancia se puede atribuir a las funciones que este tipo de alimentos pueden cumplir: asegurar una nutrición de calidad que a su vez puede tener efectos benéficos extras en nuestra salud. Aquí es donde el estudio químico de las plantas usadas en la medicina tradicional mexicana toma relevancia, ya que muchas de éstas han sido empleadas durante generaciones para tratar enfermedades diversas y han sido consumidas por la población de manera cotidiana. Sin embargo, la generación de este conocimiento ancestral ha sido de manera meramente empírica, por lo que establecer los fundamentos científicos del uso de estas especies es importante para demostrar su efectividad y descartar efectos adversos.

El estudio químico de *Galium mexicanum* Kunth supone una fuente importante de principios bioactivos que pueden ser utilizados en las industrias química, alimentaria y farmacéutica, tomando en cuenta las tendencias y necesidades que la sociedad presenta.

1.1. Importancia del estudio

Galium mexicanum es una planta, cuyas partes aéreas (tallo, flor y hoja) se usan tradicionalmente en la sierra norte del estado de Oaxaca para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, de la piel, así como antiinflamatorio. Existen reportes en la literatura que soportan el uso tradicional ya que el extracto metanólico y fracciones mostraron actividades antimicrobiana, antiparasitaria, antifúngica, antiinflamatoria y antitopoisomerasa (potencial anticancerígeno). Sin embargo, los metabolitos secundarios presentes en la especie todavía no se han caracterizado. Este es el primer estudio químico de aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos presentes en *G. mexicanum* que pueden contribuir al conocimiento químico de la especie, así como relacionar los compuestos orgánicos con sus actividades biológicas *in vitro* y con el uso tradicional de la planta. Así mismo, de este estudio se generará más evidencia para una mayor seguridad en el consumo de esta especie. Adicionalmente, se plantea establecer la capacidad antioxidante del extracto metanólico y sus fracciones para conocer su potencial como fuente de sustancias inhibidoras de radicales libres.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de *Galium mexicanum* Kunth

Galium mexicanum (Figura 1) es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia *Rubiaceae*, que puede localizarse en el sur y centro de México. Esta especie cuenta con alrededor de seis hojas por nodo que comúnmente miden entre 2 y 4 cm, puede tener de pocos a muchos pelos plumosos en el tallo y las hojas, generalmente tienen flores hermafroditas, con una corola con pétalos unidos entre sí parecida a una campana y frutos con pelos en forma de gancho (Figura 2)^{1,2}.



Reino *Plantae*

División *Magnoliophyta*

Clase *Magnoliopsida*

Orden *Rubiales*

Familia *Rubiaceae*

Género *Galium*

Figura 1. *Galium mexicanum* (amor de hortelano, pegarropa, cuajaleche) y su clasificación taxonómica

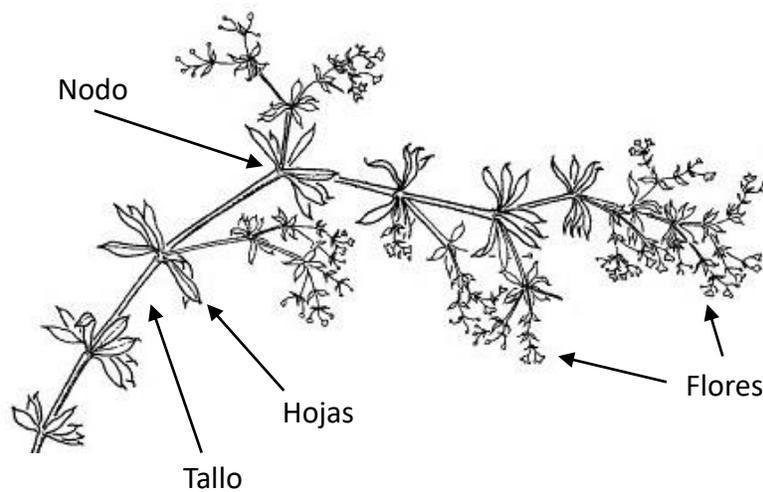


Figura 2. Partes aéreas de *Galium mexicanum*²

En México, *G. mexicanum* se utiliza para el tratamiento de problemas fisiológicos diversos como la diarrea, infecciones estomacales, dolor e inflamación del sistema digestivo y enfermedades de la piel. Los extractos de hexano, cloroformo y metanol (% rendimiento: 0.5, 0.47 y 15.62, respectivamente, base seca) de las partes aéreas de la planta (colectada en el estado de Oaxaca) mostraron diversas actividades biológicas que señalan a *G. mexicanum* como una fuente potencial de compuestos bioactivos³. Las actividades descritas son:

- a) Actividad contra bacterias Gram positivas con valores de MIC (concentración mínima inhibitoria, por sus siglas en inglés) de 67 a 999 $\mu\text{g/mL}$ de fracciones provenientes de los tres extractos (hexano, cloroformo y metanol).
- b) Actividad citotóxica baja de dos fracciones cromatográficas del extracto metanólico ($\text{IC}_{50} = 951.5 \pm 12.0, 1000 \pm 70.7 \mu\text{g/mL}$) y una fracción del extracto de hexano ($\text{IC}_{50} = 1398.5 \pm 72.3 \mu\text{g/mL}$) contra macrófagos indicando una menor toxicidad en estas fracciones para su posible consumo.
- c) Actividad antiparasitaria de dos fracciones del extracto de hexano (MIC: 333 $\mu\text{g/mL}$) contra el parásito *Leishmania donovani*.
- d) Actividad antiinflamatoria de una fracción del extracto de hexano y una del extracto metanólico inhibiendo un 50 % y un 90 %, respectivamente. Este experimento se hizo midiendo la secreción de interleucina-6 en macrófagos.
- e) Actividad antifúngica de fracciones de hexano y metanol (MIC: 333 - 500 $\mu\text{g/mL}$) contra *Trichophyton rubrum*, mientras que una fracción del extracto de cloroformo (MIC: 666 $\mu\text{g/mL}$) mostró actividad contra *Candida albicans*, de igual manera se observó actividad en contra de *Cryptococcus neoformans* por parte de una fracción del extracto de hexano y una fracción del extracto de metanol (MIC: 333 y 999 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente)³.

El extracto metanólico de las partes aéreas de *G. mexicanum* colectada en el estado de Oaxaca (rendimiento: 7.6 %, base seca) ha sido evaluado como inhibidor de la enzima topoisomerasa I mediante el uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente (JN362a, JN394, JN394_{t-1}, JN394_{t2-4 t} y JN394_{t2-5}), dando resultados positivos

(inhibición del crecimiento: $34.28 \pm 7.07 \%$). La inhibición de esta enzima es un mecanismo estudiado debido a su potencial en la prevención y tratamiento del cáncer. El estudio de mutagenicidad en el modelo de *Salmonella typhimurium* TA1535, por su parte, mostró resultados negativos, indicando que el extracto en concentraciones de 5 mg/mL no presenta efectos mutagénicos⁴.

2.2. Métodos de extracción

La extracción se puede definir como el proceso de separación de compuestos producidos por especies diversas mediante su metabolismo (metabolitos), tomando como base la afinidad que estos tienen por disolventes selectivos⁵. La extracción de estos compuestos se fundamenta en el proceso de difusión molecular, el cual se encuentra descrito por las ecuaciones de las leyes de Fick (Ecuación 1), siendo la superficie de contacto (A_T), el coeficiente de difusión del sólido en el disolvente (D_{XA}), la distancia desde el interior de la partícula (dz) y el gradiente de concentración (dC_x) los principales parámetros que influyen en la velocidad transferencia de masa del soluto (\dot{M}_x)⁶.

$$\frac{\dot{M}_x}{A_T} = -D_{XA} \frac{dC_x}{dz} \text{ ----- Ecuación 1}$$

Generalmente los métodos de extracción conducen a la obtención de mezclas de metabolitos diferentes (primarios y secundarios) dependiendo del material vegetal a estudiar y de los disolventes empleados, pudiendo contener alcaloides, flavonoides, terpenoides, entre otros. Estas mezclas pueden ser usadas para evaluaciones biológicas debido a las posibles sinergias positivas entre los compuesto para diversos fines, sin embargo, en ocasiones éstas mezclas son purificadas para evitar sinergias negativas, así como para conocer las moléculas responsables de las actividades biológicas y de esta manera tratar de explicar la actividad evaluada⁷.

Los métodos de extracción más conocidos son la maceración, infusión, digestión, decocción, percolación, extracción Soxhlet, hidroalcohólica por medio de fermentación, por arrastre de vapor, asistida por ultrasonido (EAU) y asistida por fluidos supercríticos⁵. Cada método

tiene sus ventajas y desventajas, y en la actualidad hay una mayor demanda por aquellos que permiten la automatización, la reducción en la cantidad de disolvente utilizado y en el tiempo de extracción⁸. La EAU ha tomado relevancia debido a su uso fácil, disponibilidad, bajo costo, así como por el menor tiempo y cantidad de disolvente empleados en la extracción con respecto a otros métodos, por lo que es una opción viable para la extracción de compuestos provenientes de plantas⁹.

La EAU, o comúnmente denominada sonicación, se basa en el uso del ultrasonido, involucrando frecuencias de 20 a 2000 kHz, lo que provoca que la permeabilidad de las paredes celulares incremente y se produzca el fenómeno de la cavitación, generando pequeños poros o canales en la membrana celular, favoreciendo la extracción de los compuestos presentes en las plantas. Una de las desventajas de este método, sin embargo, es que la energía ultrasónica puede producir cambios indeseables en las moléculas de interés debido a la formación de radicales libres (al aumentar la proporción de agua en la mezcla de disolventes)⁵. Debido a esto la selección de las condiciones de extracción es de suma importancia, ya que cada factor (disolvente utilizado, tiempo, temperatura) influye en el rendimiento del proceso, así como en el tipo de compuestos obtenidos.

2.3. Métodos de separación cromatográfica

A partir de los métodos de extracción más comunes se pueden obtener mezclas complejas de estos metabolitos secundarios y primarios, mismas que será necesario separar por diversos motivos, tales como la evaluación de las actividades biológicas de compuestos puros, elucidación estructural o por interés comercial del compuesto, entre otros. Aquí es donde la cromatografía adquiere una gran importancia.

La cromatografía es un método de separación que se distingue por el uso de una fase móvil o eluyente y el uso de una fase estacionaria, mismas en las que se basa la separación cromatográfica¹⁰. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa y se hace pasar a través de la fase estacionaria, la cual suele ser un empaquetamiento de partículas sólidas que contienen

la fase estacionaria en su superficie. Los métodos cromatográficos se pueden clasificar con base en la forma en que el soluto interacciona con la fase estacionaria, dando lugar a la cromatografía por adsorción, partición, intercambio-iónico, exclusión molecular y por afinidad¹¹.

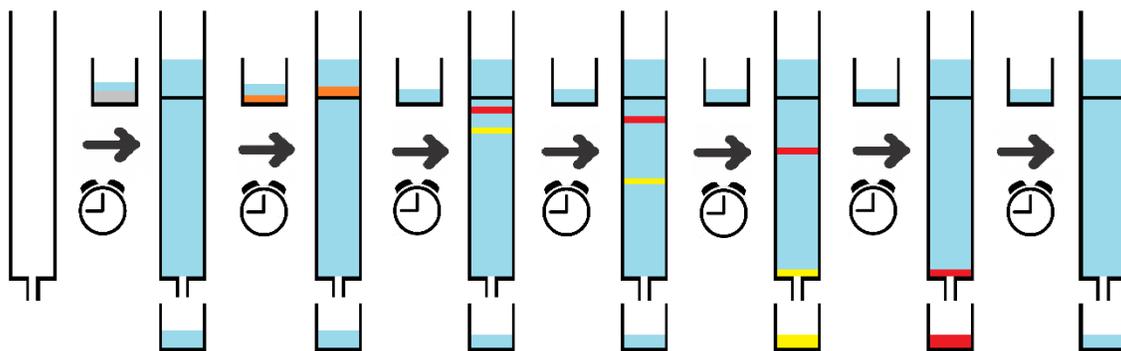


Figura 3. Proceso de cromatografía en columna

2.3.1. Cromatografía en columna

En este tipo de cromatografía se utiliza una columna de vidrio que ha sido previamente empaquetada con la fase estacionaria, a través de la cual se hace pasar la fase móvil (disolvente) mediante presión o gravedad. Una mezcla de los compuestos a separar es añadida en la cabeza de la columna y el disolvente utilizado se empieza a recolectar al final de la misma, añadiendo más disolvente a la columna para promover la elución de los compuestos presentes de acuerdo con su afinidad por la fase móvil o la fase estacionaria¹⁰. Este proceso se ilustra en le **Figura 3**.

2.3.2. Cromatografía en capa fina (CCF)

La CCF (o TLC por sus siglas en inglés) es una forma de cromatografía en la que la fase estacionaria es una capa fina que se coloca sobre un soporte adecuado, misma sobre la cual se mueve la fase móvil por acción capilar. Las ventajas de esta técnica son su bajo costo y la velocidad con la que se obtienen los resultados, mismos que se pueden usar para predecir

las condiciones óptimas para separar mezclas en columnas y monitoreo de las fracciones por obtenidas por cromatografía en columna ¹¹.

2.4. Productos naturales y su uso potencial como aditivos en la industria alimentaria

De acuerdo con el *Codex Alimentarius*, un aditivo es una sustancia que no se consume como alimento normalmente, pero que es adicionado a los alimentos de forma intencionada con la finalidad de modificar sus propiedades tanto sensoriales como tecnológicas, pudiendo ser añadido en las diferentes fases de elaboración del alimento¹².

Actualmente hay un interés y tendencia en el uso de aditivos de origen natural debido a una población cada vez más interesada en lo que consume y cómo esto afecta su salud. Por esta razón existen estudios químicos de plantas con la finalidad de extraer compuestos bioactivos que puedan ser usados en la industria alimentaria (así como en la industria química y farmacéutica). El uso de estos compuestos debe ser regulado para garantizar la inocuidad de los alimentos, por lo que debe existir una serie de estudios que puedan comprobar este efecto¹³. Un ejemplo de este tipo de compuestos es el esteviósido (**Figura 4**), el cual es un aditivo ampliamente usado en la industria alimenticia como edulcorante sustituto debido a su bajo aporte calórico.

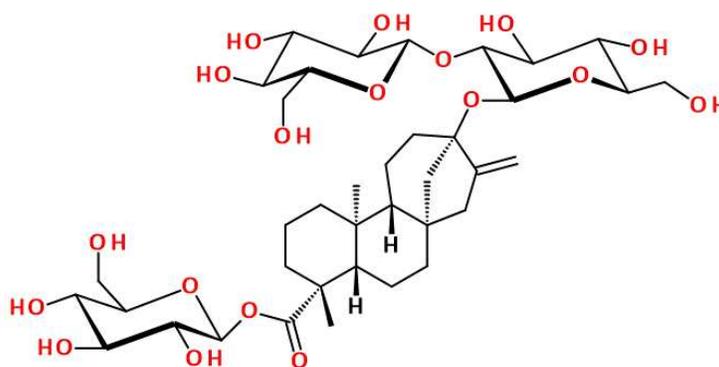


Figura 4. Esteviósido, un edulcorante de origen natural

Debido a la gran diversidad estructural que presentan los productos naturales existe particular interés en los mismos por la variedad de actividades biológicas que éstos pueden presentar. En la industria alimenticia se ha enfatizado la búsqueda en posibles aditivos que actúen como conservadores de los alimentos para extender su vida útil (antimicrobianos, antioxidantes, antifúngicos, etc.), sin embargo, aún hay muchas fuentes sin explorar¹⁴.

2.4.1. Antioxidantes

En la naturaleza existen diversas fuentes de moléculas con capacidad antioxidante, las cuales son capaces de interactuar con agentes oxidantes mediante diversos mecanismos de reacción. Estas interacciones permiten mantener un equilibrio en los sistemas biológicos, que de ser desestabilizado propicia el estrés oxidativo, lo que podría tener consecuencias graves como la generación de enfermedades cardiovasculares o incluso el cáncer. Cuando existe una deficiencia de este tipo de compuestos se puede compensar consumiéndolos a través de diversos alimentos. Sin embargo, estos mismos pueden sufrir daños causados por agentes oxidantes debido a su reacción con las biomoléculas que éstos contienen (principalmente las grasas), afectando de manera significativa su vida útil¹⁵.

2.4.2. Ensayo de reducción del radical libre DPPH[•]

El radical libre DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) es un radical comercial relativamente estable debido a la presencia de anillos aromáticos en su estructura que promueven la deslocalización de los electrones, estabilizando de esta manera a la molécula. Cuando este compuesto se encuentra en su forma de radical libre, tiene un color violeta muy característico en disolución, teniendo un máximo de absorción cerca de los 517 nm. El ensayo de reducción del radical libre DPPH[•] se basa en la medición de la disminución de las unidades de absorbancia de la disolución (a una longitud de onda máxima de 517 nm) debido a la interacción del radical con los compuestos antioxidantes, estabilizando el mismo (**Figura 5**). El porcentaje de inhibición del radical se puede calcular con la Ecuación 2¹⁶.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs}_{\text{DPPH}\cdot} - \text{Abs}_{\text{Ext}}}{\text{Abs}_{\text{DPPH}\cdot}} * 100 \quad \text{----- Ecuación 2}$$

Dónde: $\text{Abs}_{\text{DPPH}\cdot}$ es la absorbancia del radical, y Abs_{Ext} es la absorbancia del extracto o muestra analizada que reacciona con el radical libre.

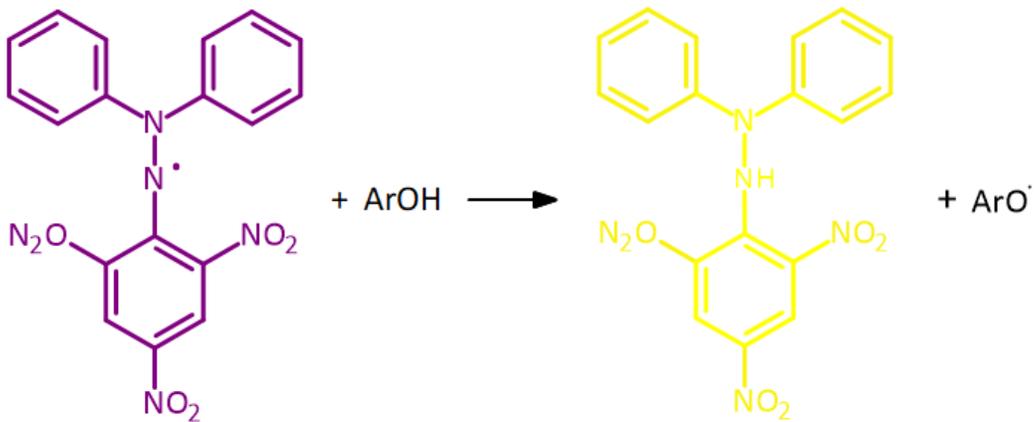


Figura 5. Reducción del radical libre DPPH \cdot

Los resultados del ensayo pueden reportarse con el valor del IC_{50} , el cual indica la concentración del extracto o de la muestra evaluada necesaria para obtener una disminución del 50 % de la concentración inicial del radical DPPH \cdot . Para determinar este parámetro es necesario realizar una curva de calibración de la muestra a evaluar, estableciendo diversas concentraciones que inhiban al radical en un intervalo de 20 a 90 % con la finalidad de establecer una regresión lineal de la cual se pueda obtener el valor del IC_{50} para una muestra específica.

2.4.3. Capacidad antioxidante en el género *Galium*

Existen diversos estudios que han determinado la capacidad antioxidante de especies del género *Galium* (**Tabla 1**); sin embargo, hasta el momento no hay reportes para *G. mexicanum*. En estos reportes, los autores atribuyen la capacidad antioxidante mostrada por parte de los extractos y fracciones a su composición, principalmente a los flavonoides y polifenoles, al observar correlaciones de Pearson significativas entre los valores de IC₅₀ obtenidos en los ensayos de actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales cuantificados ($R^2 = 0.8527^{21}$).

Otros factores evaluados en estos estudios fueron el método de secado del material vegetal, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de IC₅₀ obtenidos mediante los métodos de liofilización (IC₅₀ = 554 – 555 µg/mL) y secado con aire (IC₅₀ = 467 – 884 µg/mL)²⁰. También se mostró la diferencia significativa entre las medias (comparación de rangos múltiples de Duncan, $\alpha = 0.05$) del valor de IC₅₀ dependiente del método de extracción: maceración, reflujo y EAU (IC₅₀ = 46 -73 µg/mL)²². Por otra parte, el uso de disolventes diferentes para la obtención de los extractos también mostró una influencia en los valores de IC₅₀ reportados¹⁷. En la **Tabla 1** de IC₅₀ de cada estudio de acuerdo a las diferentes metodologías, también se muestra el valor de la concentración del radical libre DPPH· utilizado, siendo éste relevante en el valor de IC₅₀ obtenido.

Tabla 1. Capacidad antioxidante por el método del radical DPPH· en el género *Galium*

Especie	Parte de la planta	Extracto	Observaciones	[DPPH·] (μM)	IC ₅₀ (μg/mL)	Referencia y país de estudio
<i>G. verum</i> L.	---	Acuoso Metanólico	Liofilizado	250	209 261	[17] Turquía
	Partes aéreas	Metanol acuoso al 80 % (v/v)	Mt. Zlatar (Lugar de colecta)	22.5	3.10	[18] Serbia
			Veternik (Lugar de colecta)		8.04	
	Partes aéreas	Metanol acuoso al 80 % (v/v)	EAU	N.R.	30.72	[19] Croacia
<i>G. aparine</i> L.	Hojas, tallos, flores y semillas	Metanol acuoso al 80 % (v/v)	Liofilizado	54	555 ± 4	[20] Portugal
			Secado con aire		884 ± 12	
		Infusión	Liofilizado Secado con aire		554 ± 11 467 ± 3	
<i>G. aparine</i> L.	Planta entera	Metanol acuoso al 95 % (v/v)	Fracción hexano	N.R.	>500	[21] Pakistán
			Fracción acetato de etilo		>250	
			Fracción butanol		61.7 ± 1.94	
			Fracción metanol		75 ± 2	
			Fracción acuosa		58.3 ± 1.32	
<i>G. mollugo</i> L.	Partes aéreas	Etanol acuoso al 50 % (v/v)	Maceración	85.7	51 ± 2	[22] Serbia
			Reflujo		45 ± 3	
			EAU		62 ± 2	
<i>G. cruciata</i>	Partes aéreas	Metanol al 80 % (v/v)	EAU	N.R.	30.30	[19] Croacia
<i>G. divaricatum</i>	Partes aéreas	Metanol al 80 % (v/v)	EAU	N.R.	27.62	[19] Croacia

EAU: Extracción asistida por ultrasonido, N.R.: No reportado

2.5. Compuestos orgánicos descritos en el género *Galium*

Los metabolitos producidos por las plantas pueden clasificarse en primarios y secundarios. Los primarios incluyen polisacáridos, glucosa, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, los cuales son necesarios para el crecimiento de la especie que los produce²³. Los metabolitos secundarios son compuestos que no son necesariamente indispensables para el desarrollo de las plantas, teniendo restricciones taxonómicas en cuanto a su ocurrencia, pero que desempeñan un rol importante en la interacción de los organismos con el ambiente²⁴.

Los metabolitos secundarios se generan principalmente para cumplir una función protectora a estímulos externos que afecten a los sistemas biológicos, como el daño inducido por la luz, o debido a su interacción con otros organismos, sintetizando compuestos con propiedades que puedan ser de utilidad a la planta (antiparasitarios, antifúngicos, antimicrobianos, entre otros). También pueden cumplir funciones de reconocimiento en relaciones simbióticas con otras especies²⁵. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son los flavonoides, alcaloides, terpenoides, saponinas y polifenoles, entre otros²⁶.

En las **Figuras 6 y 7** se muestran dos de las principales rutas involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios, en las cuales participan múltiples enzimas que no se mencionan en este texto. A continuación, se presentan generalidades de los grupos de compuestos orgánicos que se han reportado en el género *Galium*.

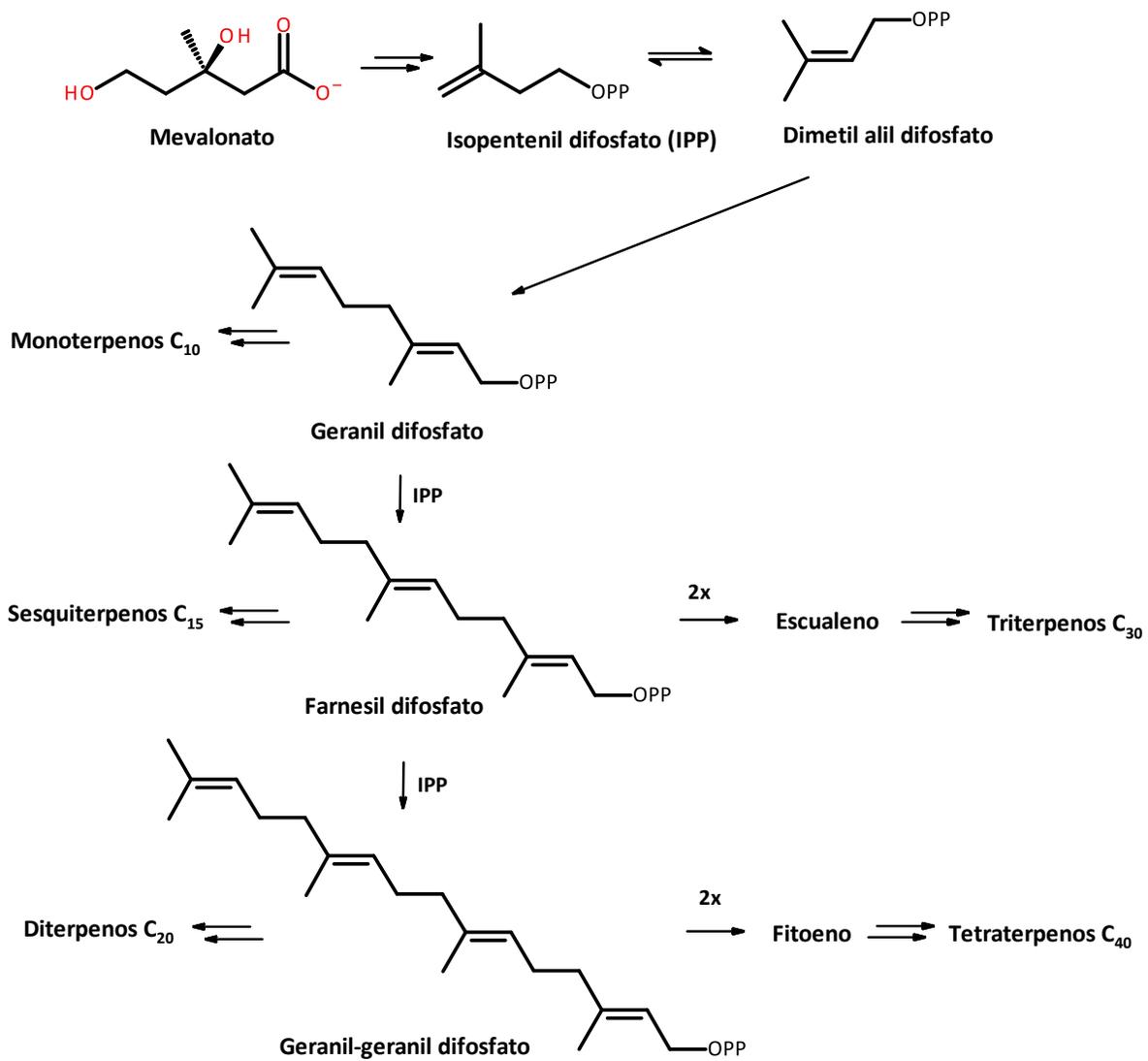


Figura 6. Biosíntesis de terpenoides en plantas²⁴

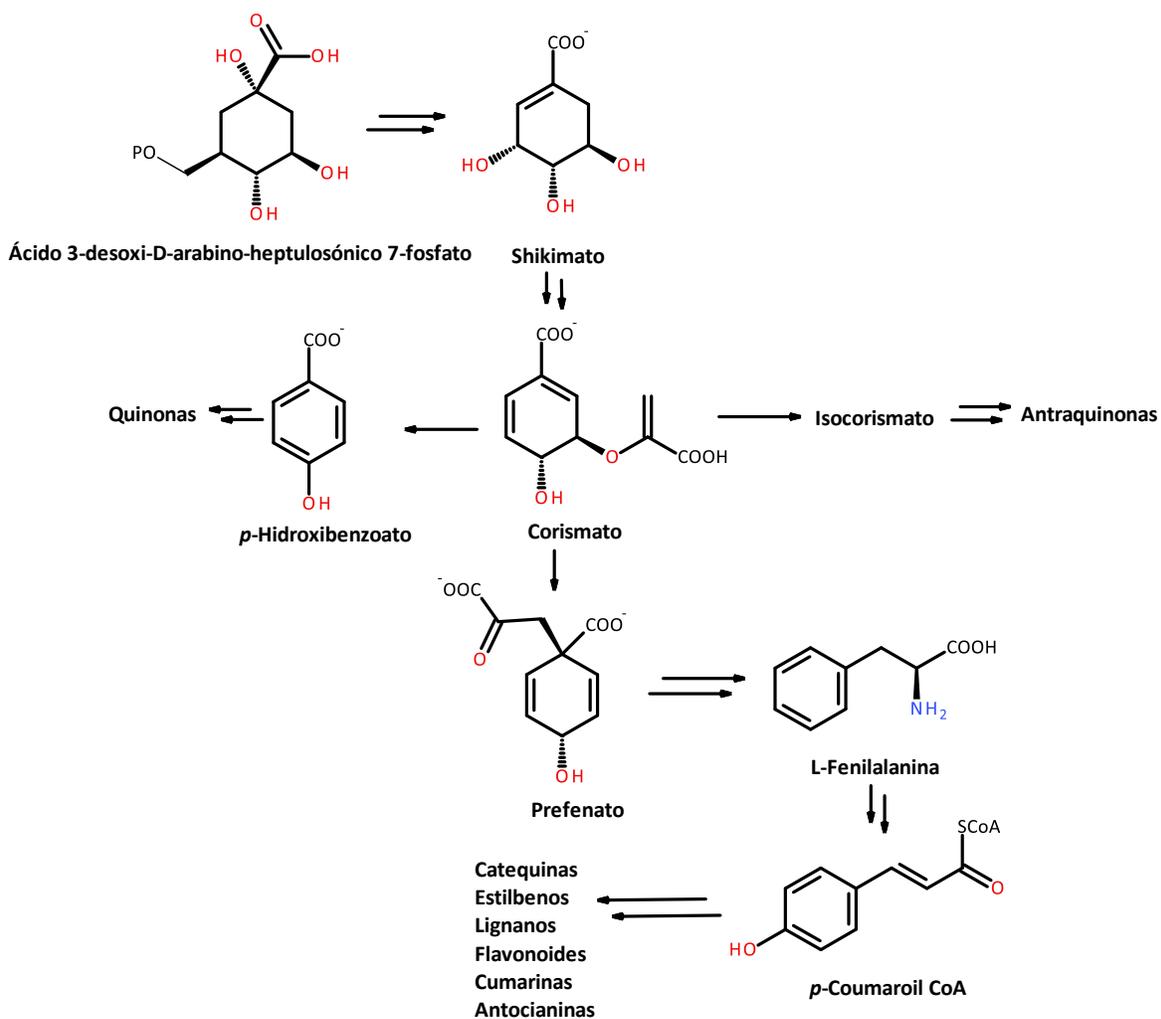


Figura 7. Ruta del ácido shikímico²⁴

2.5.1. Iridoides

Los iridoides pertenecen a la familia de los monoterpenos, compuestos formados por 10 átomos de carbono, y se caracterizan por tener como base estructural al ciclopentano[c]pirano (**Figura 8**). Existen cuatro tipos de iridoides de acuerdo a su estructura, los iridoides simples, los iridoides glicosilados, los secoiridoides y los bisiridoides. En las plantas existe una marcada predominancia de los iridoides glicosilados sobre los otros tipos de iridoides²⁷.

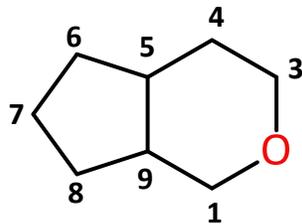


Figura 8. Estructura química base de los iridoides

Estas moléculas han sido identificadas con frecuencia en las partes aéreas de las plantas del género *Galium*^{28,29,30,31,32,33,34}. Las actividades neuroprotectora, anticancerígena y antiinflamatoria se han asociado principalmente a este tipo de compuestos, aunque el mecanismo de acción aún no está bien establecido³⁵.

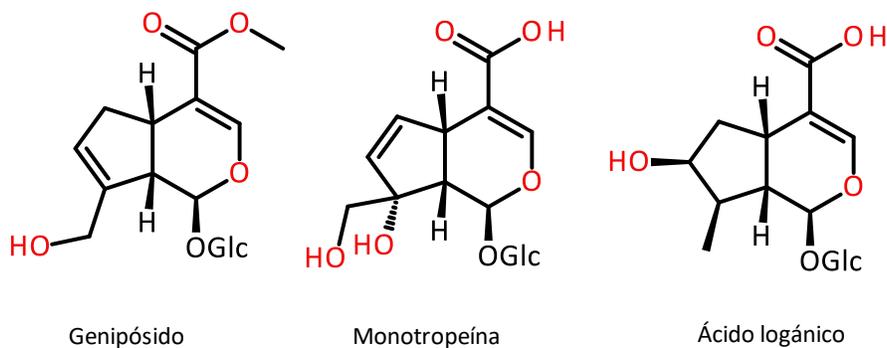


Figura 9. Iridoides reportados en el género *Galium*^{31,32}

2.5.2. Antraquinonas

Las antraquinonas pertenecen a la familia de las quinonas y tienen como base estructural un anillo de antraceno, **Figura 10**, el cual cuenta con un grupo carbonilo en las posiciones 9 y 10 (por lo cual se les conoce también como dioxoantracenos o antracenedionas), pudiendo tener grupos funcionales distintos sustituyendo diferentes posiciones del anillo³⁶.

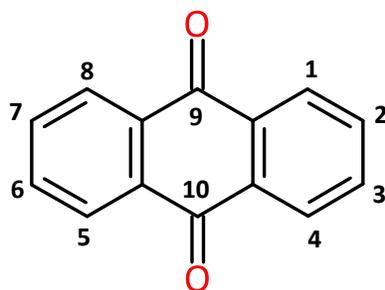
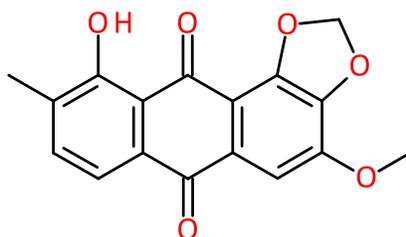
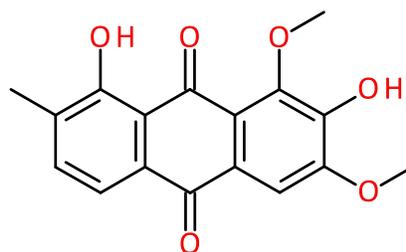


Figura 10. Estructura base de las antraquinonas

Este tipo de compuestos han sido caracterizados en las raíces de distintas plantas del género *Galium*^{30,37,38,39,40}. Entre los efectos biológicos atribuidos comúnmente a las antraquinonas se encuentra la actividad laxante, hepatoprotectora, anticancerígena, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antidiabética y antioxidante^{36,41}.



8-hidroxi-3-metoxi-7-metil-1,2-metilendioxi-9,10-antraquinona



2,8-dihidroxi-1,3-dimetoxi-7-metil-9,10-antraquinona

Figura 11. Antraquinonas reportadas en el género *Galium*⁴⁰

2.5.3. Flavonoides

La familia de los flavonoides se compone de compuestos polifenólicos, que se caracterizan químicamente por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por un puente de tres carbonos ciclizado a través de un átomo de oxígeno (C), **Figura 12**⁴².

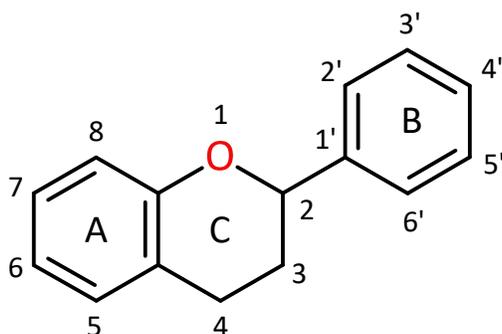


Figura 12. Estructura base de los flavonoides

En cuanto a su clasificación, los flavonoides se pueden dividir en seis subgrupos mayoritarios: flavonoles, isoflavonas, flavonas, antocianidinas, flavanonas y chalconas (**Figura 13**)⁴³.

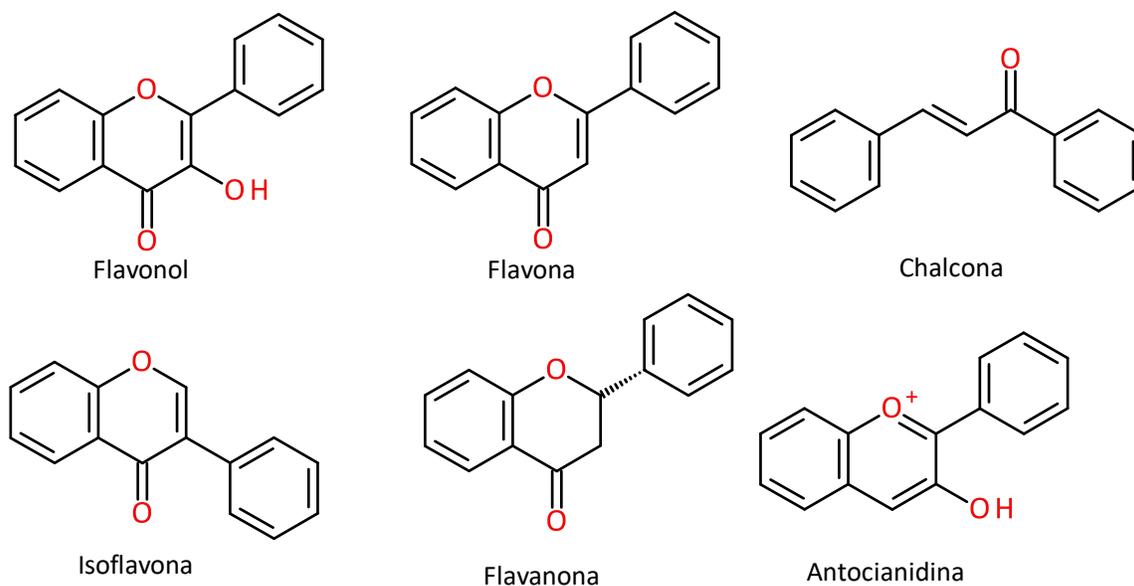


Figura 13. Clasificación de los flavonoides

La caracterización de flavonoides en el género *Galium* ha sido reportada por distintos autores, siendo las flavonas, los flavonoles y sus derivados glicosilados los más recurrentes^{31,32,44,45}. Las actividades biológicas reportadas para los flavonoides comprenden la actividad antioxidante, hepatoprotectora, antibacterial, antiinflamatoria, anticancerígena y antiviral⁴⁶.

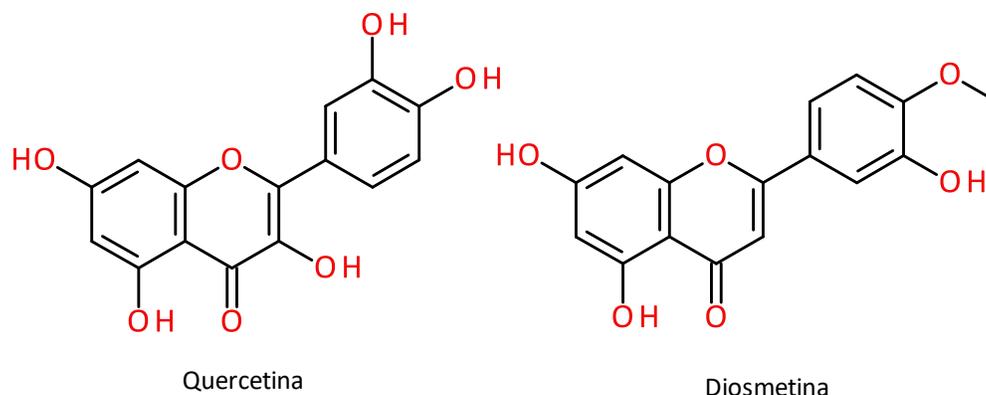


Figura 14. Flavonoides reportados en el género *Galium*⁴⁵

2.5.4. Triterpenos

Los triterpenos son compuestos que abarcan diversas familias de metabolitos conformados por isoprenoides policíclicos que se encuentran distribuidos en gran medida en el reino vegetal. Su estructura deriva de la condensación de dos moléculas de pirofosfato de farnesilo dando como producto de reacción al escualeno, **Figura 15**, el cual puede experimentar distintos tipos de reacciones de ciclización, resultando así en una amplia variedad de triterpenoides⁴⁷.

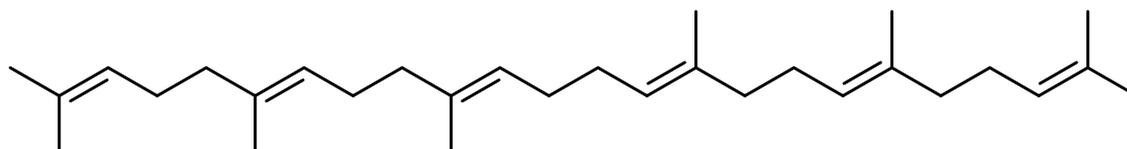


Figura 15. Escualeno, precursor de los triterpenos

Entre los triterpenos pentacíclicos reportados para el género *Galium* se encuentran saponinas, ácidos oleanólicos y fitoesteroles^{32,48}. Algunas de las actividades biológicas reportadas para los triterpenos son la actividad hepatoprotectora, antiinflamatoria, analgésica, antimicrobiana, antimicótica, virostática, entre otras, pudiendo usarse en el tratamiento y prevención de distintas enfermedades⁴⁹. La medicina tradicional de Tailandia ha hecho uso de plantas que contienen este tipo de compuestos como remedios para diversas enfermedades, principalmente la malaria⁵⁰.

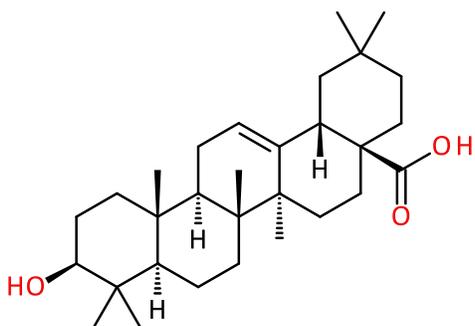


Figura 16. Ácido oleanólico, triterpeno reportado en el género *Galium*³²

2.5.5. Ácido hidroxicinámico y derivados

Los ácidos hidroxicinámicos son una clase de metabolitos secundarios abundantes en el reino vegetal⁵¹. Su estructura básica corresponde a un esqueleto fenilpropanoide (C6-C3) y los compuestos más comunes de este grupo son los ácidos *p*-cumárico, caféico y ferúlico (**Figura 17**)⁴².

La presencia de los hidroxicinamatos se ha reportado con frecuencia en las partes aéreas de las plantas del género *Galium*^{44,52,53}. Las actividades biológicas descritas para estas moléculas son la actividad antioxidante, prevención de enfermedades cardiovasculares, prevención y tratamiento de cáncer, control de los efectos secundarios de la quimioterapia, actividad antimicrobiana y actividad antiosteoclástica⁵⁴.

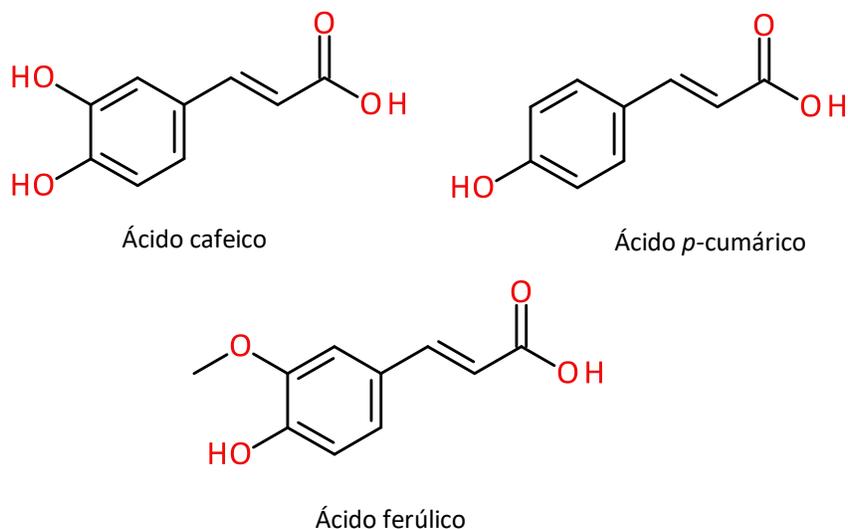


Figura 17. Derivados principales del ácido hidroxicinámico

2.6. Elucidación estructural de metabolitos secundarios

Posterior a la extracción y purificación de los metabolitos secundarios, la caracterización estructural de los mismos es de suma importancia para conocer los posibles responsables de las actividades biológicas de los extractos, así como para establecer los marcadores quimiotaxonómicos de la especie. Las técnicas espectroscópicas son de gran ayuda en esta etapa, ya que, a diferencia de las pruebas químicas, las cuales requieren cantidades mayores de muestra y generalmente destruyen esta misma, las técnicas espectroscópicas requieren una cantidad de muestra relativamente pequeña y generalmente la muestra no es destruida, por lo que puede ser recuperada para análisis posteriores⁵⁵.

Entre las técnicas usadas para la elucidación se encuentra la resonancia magnética nuclear (RMN), la espectrometría de masa (EM) y la espectroscopía de infrarrojo (IR). Los datos obtenidos con estas técnicas y aquéllos reportados en la literatura científica pueden ser usados de manera complementaria para poder asignar la estructura a compuestos distintos invariablemente.

La espectroscopía de RMN ha sido utilizada como la técnica principal para la elucidación estructural de compuestos diversos en las últimas décadas⁵⁶. La ventaja de esta técnica radica en que la cantidad de muestra utilizada es mínima y ésta no se daña, además de que el análisis del espectro obtenido brinda información acerca de los átomos presentes en la molécula, así como su entorno químico⁵⁵. Aunque el conocimiento de la masa molecular es importante en la elucidación estructural, cuando los compuestos son conocidos, el análisis y la comparación de los datos espectroscópicos con aquéllos reportados en la literatura, puede ser suficiente para establecer la estructura del compuesto en cuestión. Si el compuesto aislado no se ha identificado previamente, el uso de otras técnicas espectroscópicas y espectrométricas es necesario para la elucidación estructural del mismo.

2.6.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

En 1946, Purcell y Bloch demostraron experimentalmente una teoría propuesta por W. Pauli en 1942, la cual afirmaba que ciertos núcleos atómicos podrían absorber radiación electromagnética al someterse a un campo magnético intenso debido al desdoblamiento de sus niveles de energía. Esta demostración fue la base que llevó a los químicos en años posteriores a descubrir la influencia del entorno químico y magnético en la absorción de la radiofrecuencia por parte de los átomos, desarrollándose así la técnica espectroscópica más poderosa para el análisis estructural de una molécula⁵⁷.

Entre los núcleos más comunes que se pueden observar por RMN se encuentran: ^1_1H , $^{13}_6\text{C}$, $^{15}_7\text{N}$, $^{19}_9\text{F}$ y $^{31}_{15}\text{P}$, siendo los dos primeros los más usados. El núcleo de hidrógeno, o más comúnmente conocido como protón, es el más fácil de observar y, por ende, el más estudiado⁵⁶.

En el espectro obtenido para este núcleo se observan señales, denominadas picos, para los distintos átomos de hidrógeno presentes en la molécula. Estas señales se diferencian por el

área relativa bajo la curva, que nos indica el número de protones relativo de la misma naturaleza presentes en la molécula, y por su desplazamiento químico δ (ppm), el cual es un efecto por el cual las frecuencias de absorción de los núcleos cambian, mismo que tiene origen debido al campo magnético generado por el movimiento de los electrones que se encuentran alrededor del núcleo⁵⁵.

El estudio del núcleo de ^{13}C se basa en los mismos principios que la RMN ^1H ; sin embargo, existen pequeñas diferencias que se pueden observar para cada uno de los espectros. La primera diferencia entre los espectros es la escala de desplazamientos químicos, mientras que en el protón se encuentra entre 0 y 12 ppm aproximadamente, en el espectro de ^{13}C los desplazamientos generalmente van de 0 a 220 ppm. La otra diferencia entre los espectros es el desdoblamiento espín-espín, mismo que se puede observar como la separación de las señales debido a las interacciones entre los distintos átomos que conforman la molécula (^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C). En la RMN de ^1H se observan señales que se separan en dos o más resonancias estrechas (señales dobles, triples, múltiples, etc.). La abundancia natural del ^{13}C es de aproximadamente 1 %, por lo que el acoplamiento entre átomos de carbono es difícil de observar⁵⁷.

De este fenómeno se deriva un parámetro de gran importancia en la caracterización estructural, la constante de acoplamiento J , que se mide en Hz. Esta constante es equivalente a la separación entre dos líneas de una señal múltiple y su magnitud es la misma para cierto grupo de átomos independientemente del campo magnético al que se sometan, por lo que es de gran utilidad en la documentación y comparación de ciertos átomos y el entorno al que están sometidos en compuestos distintos⁵⁷.

En la elucidación estructural de productos naturales se suelen utilizar técnicas unidimensionales y bidimensionales de RMN para fundamentar y corroborar las estructuras moleculares propuestas, en la **Tabla 2** se describen algunas de estas técnicas⁵⁸, mientras

que en la **Figura 18** se muestran las correlaciones que es posible observar con los diferentes experimentos de RMN, utilizando como ejemplo la molécula de isoquercetina.

Tabla 2. Experimento de RMN utilizados en la elucidación estructural

Experimento	Tipo	Información
^1H		Tipos de protones, área de integración y constantes de acoplamiento (J)
DEPTQ (<i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer including the detection of Quaternary nuclei</i>)	Unidimensional	Tipos de carbonos, grado de saturación de los mismos
TOCSY 1D		Correlación entre sistemas de espines (^1H - ^1H) mediante transferencia de magnetización
COSY (<i>CO</i>rrelation <i>SpectroscO</i>Y)		Correlación homonuclear entre átomos de ^1H a dos y tres (o más) enlaces de distancia
HSQC (<i>Heteronuclear Simple Quantum Coherence</i>)	Bidimensional	Correlación heteronuclear entre átomos de ^1H y ^{13}C a un enlace de distancia
HMBC (<i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>)		Correlación heteronuclear entre átomos de ^1H y ^{13}C a dos y tres (o más) enlaces de distancia
NOESY (<i>Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY</i>)		Correlación homonuclear entre átomos de ^1H a través del espacio

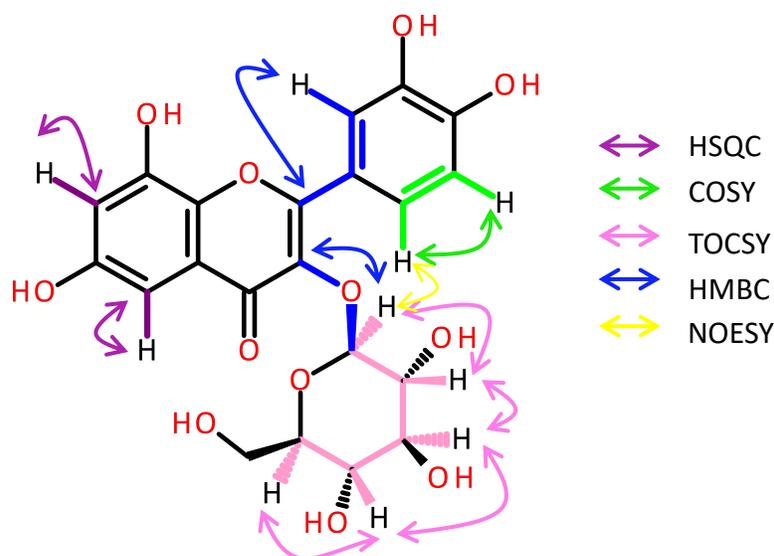


Figura 18. Correlaciones observadas en los experimentos de RMN (isoquercetina)

En las **Tablas 3 y 4** se enlistan los desplazamientos químicos δ (ppm) y las constantes de acoplamiento J (Hz) de RMN de ^1H y ^{13}C de compuestos descritos en los extractos de plantas del género *Galium* y que son de interés para este trabajo.

Con respecto a los iridoides, las regiones de interés en la RMN de ^1H son las comprendidas entre δ 2.00-3.00 ppm (debido a los protones H-5 y H-6 característicos del anillo iridano), mientras que los desplazamientos alrededor de δ 7.00 ppm denotan la presencia de las insaturaciones del anillo en las posiciones 3 y 7, la región cercana a δ 5.00 ppm se puede asociar al hidrógeno H-1 debido a que su carbono suele estar unido a dos oxígenos, la presencia de una señal simple cerca de δ 2.10 ppm puede denotar la presencia de un metilo α de carbonilo que puede asociarse a grupos acetilo unidos al anillo de iridano. En la RMN de ^{13}C existe un amplio intervalo en donde pueden aparecer las señales para los carbonos de la molécula, los carbonos C-5 y C-9 aparecen en regiones alifáticas, mientras que C-1 lo hace en la región de carbonos unidos a heteroátomos, también hay señales en la región de carbonos vinílicos debido a la presencia de insaturaciones en el anillo de iridano, mientras que la sustitución del anillo con cadenas laterales que contengan carbonos carbonílicos

hace que esta región muestre señales características de ácidos carboxílicos y/o ésteres. En la elucidación estructural de este tipo de compuestos es común utilizar la RMN en dos dimensiones, el espectro COSY 2D ayuda a corroborar la presencia de anillo iridano, mientras que el espectro HMBC establece la posición de los sustituyentes del anillo. El espectro NOESY por su parte resulta de interés para establecer la configuración de los centros estereogénicos de la molécula.

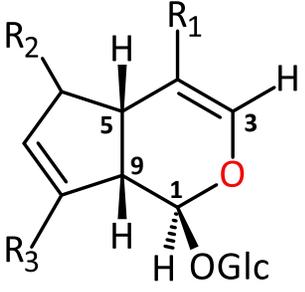
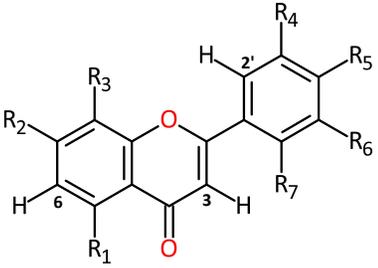
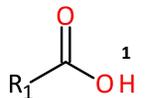
En el caso de los flavonoides, el espectro de protón no suele mostrar muchas señales debido a que la mayoría de los carbonos presentes en la estructura son cuaternarios; sin embargo, los protones que se observan suelen aparecer en la región de δ 6.00-8.00 ppm, observándose como señales simples en el caso del anillo A, debido a la sustitución 5,7 característica de este anillo. Mientras que debido a las diferentes sustituciones del anillo B, los patrones observados suelen variar. En el espectro de ^{13}C por su parte, se puede observar la señal en la región cercana a δ 180.0 ppm característica de la posición 4 del anillo C, mientras que los carbonos aromáticos con sustituyentes hidroxilo aparecen cerca de δ 150.0 ppm, debido a su estructura no aparecen señales en la región de carbonos alifáticos, los demás carbonos aromáticos aparecen a desplazamientos mayores de 90.0 ppm. El espectro HMBC adquiere importancia para poder establecer las sustituciones del anillo, ya sea por los grupos hidroxilo, o por unidades de azúcares.

En cuanto a los derivados del ácido hidroxicinámico, el espectro de protón muestra señales características del anillo aromático (cuyo patrón varía dependiendo de la sustitución del anillo) en la región de δ 6.50-8.00 ppm, además de dos señales características correspondientes a los protones vinílicos H-7 y H-8, cuya constante de acoplamiento es de aproximadamente 15.00 Hz debido a la configuración del doble enlace (*E*). Al igual que los flavonoides, el espectro de ^{13}C muestra señales con desplazamientos mayores a 100.0 ppm debido a los carbonos vinílicos y aromáticos, así como los carbonos carbonílicos característicos de estas moléculas. El espectro COSY 2D de estas moléculas puede ayudar a corroborar el patrón de sustitución de los hidroxilos del anillo aromático, mientras que el

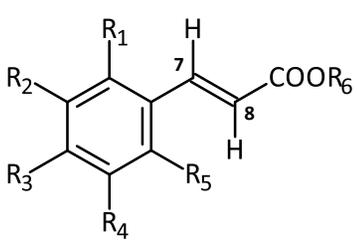
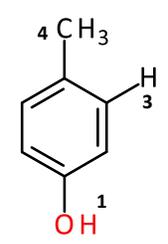
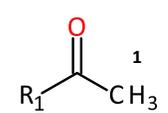
espectro HMBC adquiere importancia cuando existen sustituciones de otro tipo de cadenas en la molécula.

En el caso de las antraquinonas, el espectro de ^1H suele variar debido a las posibilidades de sustitución del anillo de antraceno, sin embargo, las señales aparecen en la región de protones aromáticos. El espectro de ^{13}C muestra las señales características de los carbonos carbonílicos cerca de δ 180.0 ppm, las demás señales de los carbonos aromáticos aparecen a desplazamientos mayores de 100.0 ppm.

Tabla 3. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de RMN de ^1H de compuestos descritos en *Galium*

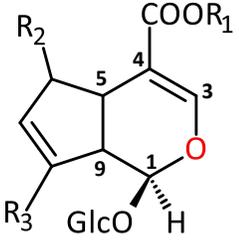
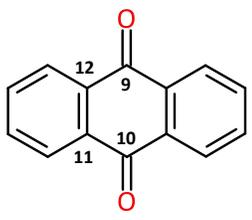
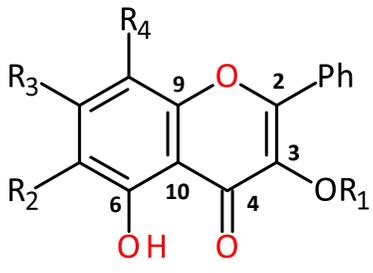
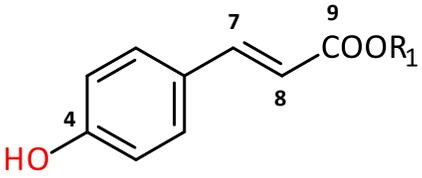
Tipo de átomo	Número	δ (ppm) ^1H	J (Hz)	Referencias
	1	4.86 – 5.63	d, 1.95 – 9.22	[29,31,33]
	3	7.03 – 7.68	s	
	5	2.92 – 3.59	ddd, $\sim 7.5/4.7 - 5.8/1.03 - 1.1$	
			t, 6.6 – 7.3	
			dd, 6.45 – 7.51/6.45 – 7.51	
	9	2.0 – 3.03	m	
	3	~ 6.78	s	[32,45]
	6	6.13 – 6.38	s	
	2'	7.45 – 7.84	s	
	1	10 – 12	-	[55]

...continuación **Tabla 3**

Tipo de átomo	Número	δ (ppm) ^1H	J (Hz)	Referencias
	7	7.48 – 7.65	d, 15.9	[59,60]
	8	6.1 – 6.9	d, 15.9	
	1	4 – 7	-	[55]
	3	6.5 – 8.3	<i>orto</i> , 6 - 9 <i>meta</i> , 1 – 3 <i>para</i> , 0 – 1	
	4	2.3 – 2.6	s	
	1	2.1	s	
R – CH₃ (alifático)	1	0.9	-	
R – OH (alifático)	1	2 – 5	s	

s= señal simple, d= señal doble, dd= señal doble de dobles, m= señal múltiple, t= señal triple, ddd= señal doble de doble de dobles

Tabla 4. Desplazamientos químicos de RMN ¹³C de compuestos descritos en *Galium*

Tipo de átomo	Número	δ (ppm)	Referencias
	1	93.3 – 101.6	[29,31,32,33]
	3	145.3 – 156.0	
	4	106.2 – 118.7	
	5 y 9	30.9 – 49.04	
	9 y 10	180.0 – 184.4	[37,38,39,40]
	11 y 12	108.2 – 139.2	
	2	146.8 – 164.2	[31,32,45]
	3	135.4 – 135.6	
	4	176.3 – 181.9	
	6	158.4 – 163.0	
	9	157.2 – 159.8	
	10	102.7 – 105.8	
	4	149.59 – 149.9	[59,60]
	7	147.2 – 148.8	
	8	113.9 – 114.7	
	9	~170	
C = C (Aromático)		100 – 150	
C = C (Alqueno)		110 – 140	[55]
C – OH		40 – 90	

3. JUSTIFICACIÓN

Oaxaca cuenta con una gran biodiversidad de especies vegetales, con alrededor de 8400 de plantas diferentes, número que representa un poco más de un tercio de la flora reportada en todo México⁶¹. Esta gran biodiversidad ha contribuido a que los habitantes del estado usen estas plantas en el tratamiento y prevención de todo tipo de enfermedades e inclusive en su alimentación diaria. El conocimiento generado a través de los años ha sido de manera empírica y se ha pasado de generación en generación, aunque en la mayoría de los casos no se cuenta con datos escritos que soporten este conocimiento⁶².

En las últimas décadas, se ha buscado explicar y fundamentar el conocimiento empírico generado mediante el estudio químico y biológico de las plantas utilizadas para tratar o prevenir diversas enfermedades (tales como el cáncer, la diabetes, entre otras). Estos estudios hacen uso del método científico, aprovechando las técnicas espectroscópicas y espectrométricas para la elucidación estructural de productos naturales⁵⁸, así como la evaluación de las actividades biológicas *in vitro* e *in vivo*⁶³.

El estudio químico de las especies vegetales provee información acerca de los compuestos presentes en géneros y familias distintos, contribuyendo de esta manera al establecimiento de la quimiotaxonomía de las mismas⁶⁴. A su vez, la identificación de compuestos nuevos abre posibilidades para que la industria química y alimentaria puedan satisfacer las necesidades de la sociedad de acuerdo con las tendencias que esta desarrolla. Entre éstas se encuentra el uso de aditivos de origen natural y el consumo de alimentos funcionales, siendo las plantas medicinales una fuente importante de metabolitos secundarios con actividades biológicas diversas⁶⁵.

Las especies del género *Galium* han sido utilizadas en la medicina tradicional de diversos países para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la piel, el sistema digestivo, e incluso el cáncer, siendo *Galium aparine* una de las más destacables^{66,67}. En el mercado en línea existen diversos productos basados en especies del género *Galium*, entre estos se encuentran tinturas, extractos secos, cápsulas de extracto y especies vegetales secas. Los precios de estos artículos varían dependiendo de la presentación y se encuentran en un

rango de 10 a 50 dólares aproximadamente. Las especies principales que se encuentran en estos productos son *Galium aparine* y *Galium verum*. Entre las propiedades que se le atribuyen a este tipo de mercancía se pueden mencionar su acción terapéutica como antimicrobiano, analgésico, desintoxicante, diurético, así como en el tratamiento de enfermedades renales, cardíacas, articulares y del tracto urinario.

Con base en lo anterior, es recomendable realizar estudios químicos y biológicos de plantas con uso potencial, para aportar bases científicas al uso tradicional de estas especies, conocer los metabolitos secundarios presentes en las mismas y evaluar sus propiedades biológicas. Los beneficios de este estudio residen en el descubrimiento de metabolitos secundarios que puedan ser usados en las industrias química, alimentaria y/o farmacéutica, como aditivos de origen natural que promuevan y ayuden a la preservación de los alimentos, así como en el tratamiento y/o prevención de enfermedades de interés actual.

Esta investigación pretende aportar conocimiento básico sobre la composición química de *Galium mexicanum* Kunth, así como de la capacidad antioxidante *in vitro* para evaluar su potencial como fuente de antioxidantes.

4. HIPÓTESIS

A partir de los antecedentes de la especie *Galium mexicanum* y los compuestos que han sido aislados e identificados en el género *Galium* se plantea la siguiente hipótesis:

Los extractos polares de las partes aéreas de *Galium mexicanum* Kunth contienen compuestos orgánicos con estructuras químicas que proporcionan a sus fracciones capacidad antioxidante, así como pueden justificar las actividades antiinflamatoria, antiparasitaria, antimicrobiana, antifúngica, así como su potencial anticancerígeno reportados previamente para esta especie.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Elucidar la estructura y evaluar la capacidad antioxidante de los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos polares de las partes aéreas de *Galium mexicanum* Kunth.

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las partes aéreas de *G. mexicanum* y de las particiones de acetato de etilo y metanol.
2. Obtener los compuestos orgánicos mayoritarios de las fracciones de acetato de etilo y metanol mediante técnicas cromatográficas.
3. Elucidar la estructura de los compuestos orgánicos puros mediante el análisis de los datos espectroscópicos de RMN.

5.3. Metas

1. Determinar el IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) del extracto metanólico y sus particiones con el ensayo de reducción del radical libre DPPH \cdot .
2. Obtener al menos dos compuestos puros de cada partición del extracto metanólico.
3. Establecer la estructura química de los compuestos aislados efectuando un análisis de sus constantes espectroscópicas de RMN.
4. Determinar el IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos puros identificados que no se encuentren descritos en la literatura, utilizando el ensayo de reducción del radical libre DPPH \cdot .

6. MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente sección se establece la metodología, los materiales y equipos usados en cada parte del desarrollo del proyecto de tesis, comprendiendo desde la colección del material vegetal, la extracción de metabolitos, su purificación y elucidación estructural, así como el ensayo de capacidad antioxidante, CAO, de fracciones seleccionadas. En la **Figura 20** se muestra un esquema general de la metodología empleada.

6.1. Reactivos, consumibles y disolventes

Los disolventes usados fueron MeOH, AcOEt, hexano (Hx), y acetona (Conquimex, 95 %), los cuales se destilaron en una columna fraccionada previo a su uso, H₂O tipo 1 (Conductividad 18.2 $\mu\Omega$), AgNO₃ (J.T. Baker), gel de sílice (SiO₂, Merck 230-400 mallas), fase reversa RP18 (0.040-0.063), sefadex LH-20 (25-100 μm), amberlita XAD16N (20-60 mallas), radical libre DPPH \cdot (1,1-difenil-2-picrilhidracilo), ácido ascórbico, ácido clorogénico y ácido gálico obtenidos de Sigma Aldrich.

Para la obtención de los espectros de RMN se utilizaron cloroformo-*d* (99.8 % D), DMSO-*d*₆ (99.9 % D), metanol-*d*₄ (99.8 % D), piridina-*d*₅ (99.5 % D) y acetona-*d*₆ (99.9 % D). La pureza de estos disolventes es del 98 % y fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

6.2. Materiales y equipos

Material de vidrio en general, molino ciclónico (FOSS Cyclonic Cyclotec™ 1093) con un tamiz de 0.5 mm, balanza analítica OHAUS® Pioneer PA214, recirculador (SEV ECO10), baño ultrasónico (Scientz 180 W), rotavapor (Heidolph 2) con bomba de vacío (MD 4 NT), rotavapor (Buchi R-3) con bomba de vacío (Vacuum pump V-700), lámpara de luz ultravioleta con longitudes de onda de 254 y 365 nm Spectroline, espectrómetro de RMN Avance III HD de 400 MHz Bruker (**Figura 19**), tubos para RMN de 5 mm, columnas cromatográficas de vidrio de 55, 45 y 28 cm de longitud y 2.5, 2.0 y 1.5 cm de diámetro, respectivamente, espátulas, algodón, papel filtro Whatman, cromatofolios de 20 x 20 cm TLC de gel de sílice 60 F₂₅₄ y RP-18F₂₅₄ (Merck), lector de microplacas BioTek modelo Synergy

HTX y una microplaca Costar de 96 pozos con fondo plano, micropipetas (Accumax 100-1000 μ L, DLABSCI 10-100 μ L, CTR Scientific 20-200 μ L).



Figura 19. Espectrómetro de RMN usado en este estudio (Laboratorio de principios bioactivos, UTM)

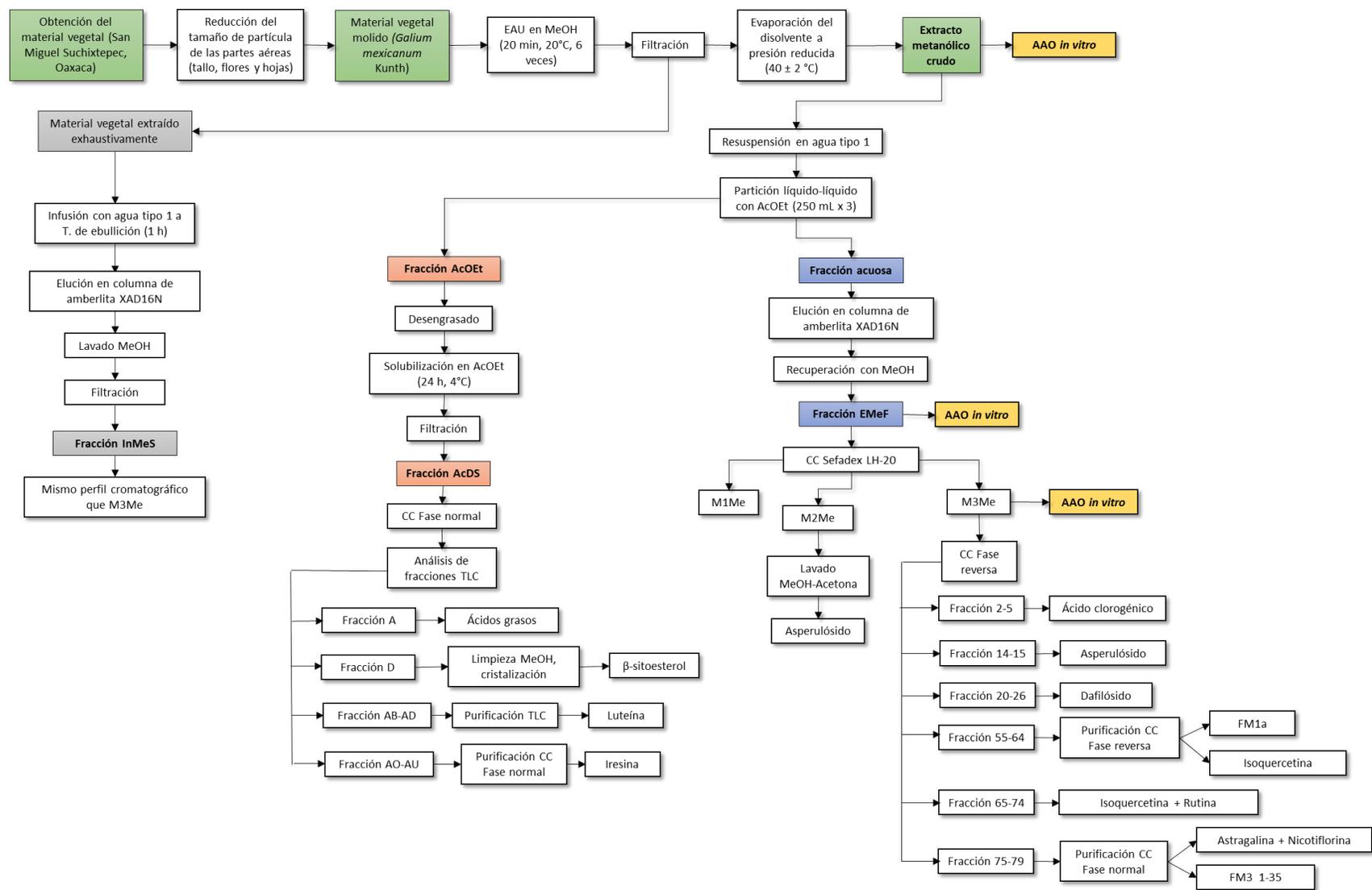


Figura 20. Metodología general empleada en este trabajo

6.3. Material vegetal

Las partes aéreas de la planta (hojas, tallo y flores) se colectaron en el mes de febrero del año 2020 en la reserva comunitaria de San Miguel Suchixtepec, Miahuatlán, Oaxaca a 2504 m por encima del nivel del mar (16°05'08''N 96°27'50''W). La identificación de la planta se efectuó en la Universidad Autónoma de Chapingo por la M.C. Ernestina Cedillo Portugal. No. registro UACH 23994. La planta se dejó secar a temperatura ambiente en la sombra y posteriormente se almacenó a 4 °C. Las partes aéreas de la planta seca se pulverizaron en un molino ciclónico con un tamiz de 0.5 mm, disminuyendo el tamaño de partícula para favorecer y acelerar la EAU.

6.4. Obtención de extractos

La obtención de los extractos crudos de *G. mexicanum* se efectuó con metanol destilado, 100 g de material vegetal molido se repartieron en dos matraces Erlenmeyer de 500 mL y se le adicionaron 250 mL de metanol destilado a cada uno. La disolución se sometió a un baño de ultrasonido a una frecuencia de 40 kHz por un lapso de 20 min con temperatura de 25 ± 2 °C, agitando la muestra cada 5 min (**Figura 21**).



Figura 21. Obtención del extracto metanólico de *G. mexicanum*

La mezcla se dejó reposar durante 10 min y después el sobrenadante se filtró a través papel filtro para eliminar sólidos. El filtrado se recibió en un frasco de vidrio de 1 L forrado con papel aluminio, a fin de prevenir la degradación de las muestras cuando son expuestas por periodos prolongados a la luz. Se realizaron extracciones consecutivas hasta que el peso del residuo seco fue igual o menor al 15 % del peso del primer extracto seco (6 extracciones en total). El metanol procedente de extracciones consecutivas se eliminó en un evaporador rotatorio ($T = 40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) a presión reducida a sequedad total para obtener los residuos, los cuales se pesaron y guardaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para su uso posterior. El procedimiento de extracción se realizó 5 veces (100 g de material vegetal en cada repetición).

6.5. Obtención de la infusión

En dos matraces Erlenmeyer de 500 mL se repartieron 200 g de material vegetal recuperado posterior a la EAU (6 extracciones consecutivas), se les añadieron 250 mL de agua tipo 1 a temperatura de ebullición y se dejaron en reposo durante una hora, agitando cada 10 min. El líquido de la infusión se filtró y guardó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.6. Separación y purificación

6.6.1. Partición del extracto metanólico

Una parte del extracto obtenido de las partes aéreas de la planta (34 g), libre de disolvente, se resuspendió en agua tipo 1 y se sometió a extracción líquido-líquido con AcOEt (250 mL x 3 veces) para separar compuestos no polares (**Figura 22**). El disolvente orgánico con la muestra se colectó en un matraz bola de 1 L y el AcOEt se eliminó en un rotavapor a una temperatura no mayor de $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Se obtuvo el residuo **EAc** (24.1 %). Se eliminaron las trazas de AcOEt presentes en la fracción acuosa con ayuda de un rotavapor y posteriormente se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Las partículas sólidas se eliminaron por filtración sobre papel filtro de poro mediano.

La disolución se eluyó por una columna de vidrio (2.5 x 50 cm) empacada con amberlita XAD16N (2.5 x 20 cm) acondicionada previamente con agua tipo 1, a un flujo de 3 gotas/minuto (**Figura 23**). Una vez que toda la solución se pasó por la columna, se lavó con 150 mL de agua des-ionizada y enseguida se lavó la columna con 200 mL de MeOH para recuperar la muestra (con el mismo flujo), el MeOH con la muestra se colectó en un matraz bola. El disolvente se eliminó en un rotavapor a no más de 45 °C. Se obtuvo el de residuo **EMe**. Este residuo fue disuelto en MeOH y se filtró para eliminar sólidos, obteniendo el residuo seco **EMeF**.

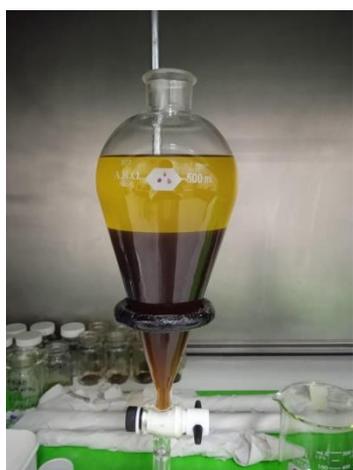


Figura 23. Extracción líquido-líquido
H₂O-AcOEt

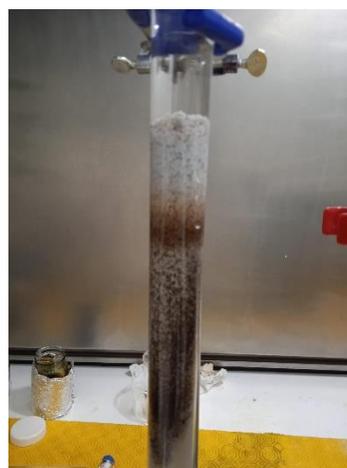


Figura 22. Tratamiento de la
fracción acuosa con amberlita

6.6.2. Tratamiento de la fracción EMeF

El tratamiento de la fracción **EMeF** se realizó en primera instancia usando una columna de vidrio (28 x 1.5 cm) empacada con sefadex LH-20 (14 x 1.5 cm) acondicionada con MeOH. El proceso se realizó con 100 mg de muestra en cada repetición para evitar la saturación de la columna, la muestra se disolvió en MeOH y se eluyó con el mismo disolvente. De cada repetición de la columna se obtuvieron cinco fracciones que fueron analizadas por TLC (C18) las cuales fueron mezcladas de acuerdo a su perfil cromatográfico obteniendo tres fracciones principales (M1Me, M2Me y M3Me).

6.6.3. Tratamiento de la fracción M2Me

El compuesto observado en esta fracción se purificó mediante cristalización, para lo cual se usaron mezclas de MeOH-Acetona, decantando el sobrenadante (color café) en un frasco separado, el disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente y se obtuvieron cristales más puros. Este procedimiento se realizó repetidas veces obteniendo agujas cristalinas incoloras (Fracción **M2MeB**).

6.6.4. Tratamiento de la fracción M3Me

La separación de los compuestos presentes en esta fracción se realizó mediante cromatografía en una columna de vidrio (50 x 2.5 cm) empacada con fase reversa C18 (20 x 2.5 cm, **Figura 24**) que se acondicionó con MeOH, cambiando la polaridad hasta llegar a agua tipo 1 (previamente desgasificada por sonicación). La muestra (600 mg) fue soportada en C18 (700 mg) y se empezó a eluir con agua, aumentando la polaridad del sistema con MeOH. Se obtuvieron fracciones de un volumen aproximado de 25 mL.



Figura 24. Columna C18 de la fracción M3Me

Tabla 5. Cromatografía de la fracción M3Me

FASE MÓVIL	VOLUMEN (mL)	FRACCIONES
Agua	140	---
Agua-MeOH 95:5	100	1-5
Agua-MeOH 9:1	100	7-12
Agua-MeOH 8:2	600	13-40
Agua-MeOH 75:25	100	41-44
Agua-MeOH 7:3	100	45-49
Agua-MeOH 65:35	200	50-62
Agua-MeOH 6:4	200	63-71
Agua-MeOH 5:5	200	72-79
MeOH	100	80-81
AcOEt	100	82-83

Cada fracción fue analizada por TLC y aquellas que se observaron similares fueron mezcladas para su posterior purificación y/o la obtención de espectros de RMN.

Las mezclas de fracciones fueron las siguientes:

F 2-5, F 9-11, F 14-15, F 17-19, F 20-26, F 36-43, F 44-49, F 55-64, F 65-74, F 75-79

6.6.4.1. Tratamiento de la fracción M3 55-64

En la placa fina de esta mezcla de fracciones se observaron dos manchas con R_f de 0.45 y 0.3 (C18, MeOH-H₂O 1:1) por lo que la muestra (69.8 mg) se purificó en una columna de vidrio (45 x 2.5 cm) empacada con C18 (9 x 2.5 cm) acondicionada con H₂O tipo 1. Las fracciones fueron colectadas de un volumen aproximado de 25 mL y se usaron las polaridades descritas en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Cromatografía de la fracción M3 55-64

FASE MÓVIL	VOLUMEN (mL)	FRACCIONES
Primera purificación		
H ₂ O	50	
H ₂ O-MeOH 9:1	100	
H ₂ O-MeOH 8:2	200	1-8
MeOH	50	9-10
Segunda purificación (fracciones 9-10)		
H ₂ O	50	
H ₂ O-MeOH 9:1	50	
H ₂ O-MeOH 8:2	150	
H ₂ O-MeOH 7:3	150	0-1
H ₂ O-MeOH 6:4	100	2-4
H ₂ O-MeOH 1:1	50	5-6

Este tratamiento purificó la mancha con R_f mayor, sin embargo, las fracciones 9-10 aún contenían la mezcla de ambas manchas, por lo que se realizó una columna con las fracciones 9-10 (42.1 mg) con las mismas condiciones, utilizando nuevas polaridades (**Tabla 5**), colectando fracciones de 25 mL aproximadamente.

De acuerdo con el perfil de la TLC de las fracciones, se mezclaron las fracciones 1-5 de la primera purificación con la 0-1 de la segunda purificación, estas fracciones correspondieron a la mancha con R_f mayor (17.3 mg) obteniendo la fracción **FM1a**. La mancha con el R_f menor se observó pura en las fracciones 3-5 de la segunda purificación, por lo que se mezclaron para su análisis (12.3 mg), obteniendo la fracción **FM2a**.

6.6.4.2. Tratamiento de la fracción M3 75-79

Esta mezcla de fracciones (37.7 mg) se observó como a una mancha amarilla con R_f de 0.2 (C18, MeOH-H₂O 1:1), la cual se montó en una columna (28 x 1.5) empacada con gel de sílice (8 x 1.5 cm) acondicionada con Hx. Se obtuvieron fracciones de 15 mL aproximadamente, las cuales de acuerdo a su R_f se juntaron en dos fracciones principales, **FM3Ac** (15.0 mg) y **FM3 1-35** (10.7 mg). La fracción **FM3 1-35** no se trató posteriormente.

Tabla 7. Cromatografía de la fracción M3 75-79

FASE MÓVIL	Volumen (mL)	Fracción	FASE MÓVIL	Volumen (mL)	Fracción
Hx	20		AcOEt-MeOH 8:2	80	
Hx-AcOEt 1:1	20		AcOEt-MeOH 1:1	60	
Hx-AcOEt 2:8	20	FM3 Ac	AcOEt-MeOH 25:75	100	FM3 1-35
AcOEt	40		AcOEt-MeOH 2:8	60	
AcOEt-MeOH 95:5	60				
AcOEt-MeOH 9:1	60				

6.6.5. Tratamiento de la fracción EAc

Previamente al tratamiento de la fracción se guardaron en refrigeración 1.2 g de esta misma para referencia y determinación de la capacidad antioxidante.

En primera instancia esta fracción se sometió a un proceso de desengrasado, para lo cual se disolvieron 5 g de EAc en 40 mL de MeOH y se dejaron reposar a temperatura de refrigeración durante 24 horas, posteriormente se filtró obteniendo 3.6 g de fracción desengrasada **AcD**.

La fracción **AcD** fue solubilizada en AcOEt y nuevamente se dejó reposar en refrigeración durante 12 horas, observando la precipitación de sólidos, por lo cual se filtró y se obtuvieron 2.86 g del sobrenadante seco (Fracción **AcDS**). (La fracción insoluble no se trató más.)

Esta última fracción fue tratada con ayuda de una columna de vidrio (55 x 2.5 cm) empacada con gel de sílice (20 x 2.5 cm) que previamente fue desactivado con MeOH para disminuir la reactividad del soporte con los compuestos de la fracción. La muestra fue soportada en 3 g de gel de sílice (desactivados de igual manera) y se añadieron a la columna de vidrio previamente acondicionada con Hx, eluyendo la muestra con un gradiente de polaridad. Se obtuvieron fracciones de un volumen aproximado de 80-100 mL.

Tabla 8. Cromatografía de la fracción **AcDS**

POLARIDAD	VOLUMEN (mL)	FRACCIONES	POLARIDAD	VOLUMEN (mL)	FRACCIONES
Hexano	600	A-I	Hx-AcOEt 5:5	300	AK-AN
Hx-AcOEt 9:1	600	J-R	Hx-AcOEt 4:6	200	AO-AP
Hx-AcOEt 8:2	500	S-AB	Hx-AcOEt 3:7	100	AQ-AR
Hx-AcOEt 7:3	500	AC-AH	Hx-AcOEt 2:8	200	AS-AT
Hx-AcOEt 6:4	200	AI-AJ	AcOEt	200	AU-AV

Las fracciones se analizaron por TLC y se mezclaron de acuerdo a sus factores de retención. La fracción A, correspondiente a un aceite rojizo insoluble en MeOH, se lavó con MeOH y se obtuvieron sus espectros de RMN.

Se observó que la fracción D podía cristalizar, sin embargo, la fracción tenía impurezas por lo que se lavó con MeOH y se dejó en reposo a temperatura de refrigeración, posteriormente se filtró y se obtuvo un compuesto de apariencia cristalina de color blanco (15 mg).

Se mezclaron las fracciones AB-AD para su posterior purificación, así como las fracciones AO-AU (Sin la fracción AS).

6.6.5.1. Tratamiento de la fracción AB-AD

La fracción AB-AD (15.2 mg), se relacionó con un compuesto reactivo ya que se observaron cambios de coloración con el tiempo con la presencia de cloroformo, por lo que se decidió utilizar AgNO_3 en su tratamiento con la finalidad de evitar su degradación (debido a la presencia de insaturaciones de doble enlace observadas en la RMN). Estas fracciones se observaron como a una mancha con R_f de 0.375 (Sistema Hx-AcOEt 7:3) la cual se encontraba con otra impureza de color verde (R_f 0.625, mismo sistema).

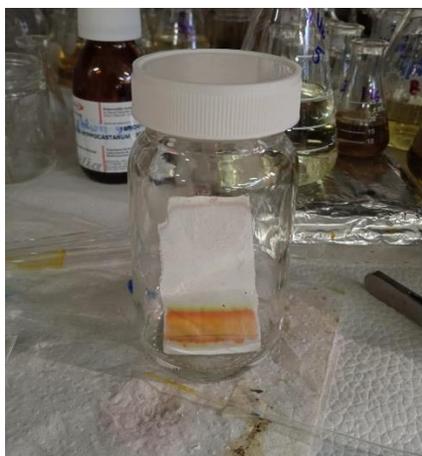


Figura 25. Purificación de la fracción AB-AD

Debido a la poca cantidad de muestra que se tenía se decidió utilizar cromatofolios de gel de sílice impregnados con una disolución de AgNO_3 (MeOH- H_2O 1:1) al 20 %, activándolas en una estufa a 105 °C durante 1 hora. Posteriormente se procedió a aplicar la muestra en los cromatofolios tratados (20 en total) con ayuda de un tubo capilar, eluyendo cada muestra con una mezcla de Hx-AcOEt 1:1 (**Figura 25**). Posteriormente se recortó la parte de la placa que mostraba el R_f similar a la muestra, descartando las demás partes. Esta parte

de la placa se raspó con una espátula y se depositó en un vaso de precipitados. Al terminar de eluir todas las placas se procedió a extraer el compuesto de gel de sílice usando 40 mL de AcOEt con ayuda de agitación durante 20 min y 5 veces en total. Todo este procedimiento se realizó en ausencia de luz. El disolvente se evaporó a temperatura ambiente en un frasco protegido de la luz.

6.6.5.2. Tratamiento de la fracción AO-AU

Se mezclaron las fracciones AO-AU, sin la fracción AS (105.9 mg), para purificar posteriormente un compuesto de interés presente en esta mezcla. Esta purificación se realizó utilizando una columna de vidrio (28 x 1.5 cm) empacada con gel de sílice (10 x 1.5 cm) previamente desactivado con MeOH, soportando la muestra en 150 mg de gel de sílice desactivado, añadiendo la muestra a la columna previamente acondicionada con Hx, eluyendo la muestra con un gradiente de polaridad. Se obtuvieron fracciones con un volumen aproximado de 10 mL.

Tabla 9. Cromatografía de la fracción AO-AU (sin la fracción AS)

POLARIDAD	VOLUMEN (mL)	FRACCIONES	POLARIDAD	VOLUMEN (mL)	FRACCIONES
Hexano	20		Hx-AcOEt 4:6	60	o-t
Hx-AcOEt 8:2	20	a	Hx-AcOEt 3:7	100	u-ac
Hx-AcOEt 7:3	20	b-c	Hx-AcOEt 2:8	40	ad-aj
Hx-AcOEt 6:4	40	d-h	Hx-AcOEt 9:1	60	ak-ao
Hx-AcOEt 5:5	60	i-n	AcOEt	40	ap-ar

El compuesto de interés (iresina) se observó en las fracciones r-w, las cuales se mezclaron (19.5 mg) y se analizaron por espectroscopía.

6.6.6. Tratamiento de la infusión

Esta fracción se trató de la misma manera que la fracción acuosa del extracto metanólico, eluyendo en una columna de vidrio (45 x 2.5 cm) empacada con amberlita XAD16N previamente acondicionada con MeOH, posteriormente agua tipo 1 y eluyendo la muestra con un flujo de 3 gotas/min. La muestra se recuperó con 150 mL de MeOH y se secó en rotavapor. La muestra se disolvió en MeOH y se filtró con papel filtro de poro mediano, obteniendo 347.8 mg de la fracción 5'. La cromatografía en capa fina de esta fracción mostró un perfil cromatográfico igual al observado en la fracción M3Me, por lo que se descartó para su posterior análisis.

6.7. Obtención de constantes físicas de los compuestos purificados

6.7.1. Experimentos de RMN

La determinación de las constantes espectroscópicas de RMN se efectuó en un espectrómetro ASCEND™400 AVANCE III HD (400 MHz frecuencia de ^1H) (Bruker, Rheinstetten, Alemania) a 298 Kelvin. Se usaron los programas de pulsos para experimentos en una dimensión: ^1H (zg30), DEPTQ (deptqgpp), TOCSY (seldigpzs); y en dos dimensiones: COSY (cosygpppqf), HMQC (hmqcgppqf), HSQC (hsqctgpsi2), HMBC (hmbcgpplndqf) y NOESY (noesygpph), empleando como disolventes CDCl_3 , piridina- d_5 , acetona- d_6 , CD_3OD o $\text{DMSO-}d_6$ y tubos para muestras de 5 milímetros usando la señal del disolvente como referencia. Los datos se analizaron en el *software* MestReNova versión 14.2.0.

6.7.2. Elucidación estructural

Los espectros de RMN de protón y ^{13}C se analizaron de acuerdo con los desplazamientos químicos para conocer el entorno químico de los átomos que conforman las moléculas. El experimento DEPTQ permitió conocer el número de átomos de hidrógeno unido a cada carbono, corroborando con las áreas de integración del espectro de protón, así como usando el experimento HSQC para la asignación de cada par carbono-protón. El experimento COSY permitió establecer la cercanía de los distintos átomos de hidrógeno, mientras que el experimento HMBC ayudó a establecer el esqueleto de la molécula.

La caracterización estructural se completó con la asignación total de los desplazamientos químicos para la estructura propuesta, comparándose también con los reportes encontrados en la literatura.

6.8. Evaluación de la capacidad antioxidante, CAO, de los extractos

6.8.1. Preparación de las disoluciones

Disolución patrón de DPPH[•] al 0.1 % (p/v). Se pesaron 10 mg de DPPH[•], y se disolvieron en EtOH hasta un volumen de 10 mL en ausencia de luz. De esta disolución se preparó una disolución de DPPH[•] al 0.004 % (400 µL se aforaron a 10 mL con EtOH), la cual se resguardó de la luz en un frasco ámbar y se mantuvo en refrigeración entre mediciones. Se preparó una nueva disolución del radical diariamente.

Disoluciones de estándares de ácido gálico 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 µg/mL. En primera instancia se preparó una disolución patrón de 1000 µg/mL de ácido gálico (10 mg de ácido gálico llevado a un volumen final de 10 mL con EtOH). A partir de esta disolución se preparó una disolución de 100 µg/mL, la cual se utilizó para preparar 10 mL de los estándares previamente mencionados, utilizando los volúmenes adecuados para la dilución.

Disoluciones estándares de ácido ascórbico 2, 3, 4, 5 y 6 µg/mL. Se preparó una disolución de ácido ascórbico de 1000 µg/mL, (10 mg aforados a 10 mL), de la cual se preparó una disolución con una concentración de 100 µg/mL. De esta última disolución se prepararon las disoluciones estándar de 2 a 6 µg/mL.

Disoluciones estándares de ácido clorogénico 3, 5, 7, 9, 11 y 13 µg/mL. Se preparó una disolución patrón de 1000 µg/mL de ácido clorogénico (10 mg aforados a 10 mL) y de esta disolución se tomaron los volúmenes adecuados aforando con EtOH a un volumen final de 10 mL para preparar las disoluciones estándar.

Las disoluciones estándar de los ácidos gálico, clorogénico y ascórbico se utilizaron para el ensayo de reducción del radical libre DPPH[•] como controles positivos del mismo.

Disoluciones de extractos y fracciones. Inicialmente, estas disoluciones se prepararon en EtOH a una concentración de 1000 µg/mL en el caso de las fracciones EMeF y M3Me. El extracto crudo se preparó a partir de 11.6 mg (aforado a 25 mL de EtOH al 95 %, 464 µg/mL) de extracto crudo obtenido con menos de 12 horas. A partir de estas disoluciones se prepararon diluciones de las mismas con la finalidad de determinar el intervalo adecuado para la determinación del IC₅₀ de las muestras, estableciendo los puntos de la curva que se adecuen a una regresión lineal.



Figura 26. Lector de microplacas utilizado en este estudio

6.8.2. Cuantificación

En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se mezclaron 70 µL del extracto crudo (60-220 µg/mL), fracción (EMeF: 20-100 µg/mL, M3Me: 10-40 µg/mL) o control (ácidos gálico, ascórbico o clorogénico) con 70 µL de DPPH[•] al 0.004 %, y se dejaron por 30 min a temperatura ambiente en ausencia de luz y con agitación. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro de microplacas, **Figura 26**. La mezcla de 70 µL del DPPH[•] al 0.004 % y 70 µL de EtOH se usó como control negativo. El blanco de las curvas de calibración se obtuvo con la disolución menos concentrada de extracto, fracción o control. Todos los estándares, blancos y controles se leyeron por triplicado.

El IC₅₀ de cada fue calculado mediante el análisis del porcentaje de inhibición del radical libre con respecto a las concentraciones de cada muestra evaluada, obteniendo una curva de calibración para cada una. La regresión lineal se obtuvo a partir de los valores de porcentaje de inhibición y se calculó el IC₅₀ a partir de la ecuación de regresión lineal del gráfico correspondiente. El valor de IC₅₀ expresa la concentración en µg/mL requerida para disminuir el 50 % de la concentración inicial de DPPH· y son la media de tres mediciones¹⁶. El método de rangos múltiples de Duncan fue utilizado para la comparación de medias, considerando un nivel de confianza del 95% (p < 0.05).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs}_{\text{DPPH}\cdot} - \text{Abs}_{\text{Ext}}}{\text{Abs}_{\text{DPPH}\cdot}} * 100 \quad \text{----- Ecuación 2}$$

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Fraccionamiento de extracto de *Galium mexicanum*

La extracción asistida por ultrasonido de *G. mexicanum* por un lapso de 20 min a una temperatura de 25 ± 2 °C utilizando MeOH generó un rendimiento de 17.04 ± 1.58 %. Posteriormente, con la finalidad de fraccionar el extracto obtenido de *G. mexicanum*, 34 g del extracto seco se resuspendieron en agua tipo 1 y se realizó la extracción líquido-líquido con AcOEt tres veces, obteniendo la fracción **EAc** (8.2 g, 24.1 %). A partir de la fracción acuosa se obtuvo la fracción **EMe** (4.48 g, 13.1 %). Esta última se disolvió en MeOH y se filtró, obteniendo la fracción **EMeF** (3.5 g, 10.3 %).

Los reportes previos del estudio de *Galium mexicanum* describen rendimientos del extracto metanólico del 7.6 %⁴ y 15.62 %³, utilizando la maceración como método de extracción en un lapso de dos semanas y seis días, respectivamente, lo que permite observar que la EAU además de obtener mayores rendimientos de extracción, permite que el uso de disolvente sea menor, reduciendo el impacto ambiental, así como reduciendo el tiempo necesario para la obtención de los extractos.

Posterior al tratamiento de la fracción acuosa del extracto metanólico se observó una coloración azul/negra en la amberlita, que puede atribuirse a los productos de oxidación de los compuestos presentes en la fracción, especialmente los iridoides⁶⁸.

El tratamiento de la fracción **EMeF** con el soporte Sefadex LH-20 dio lugar a tres fracciones principales; en la fracción **M1Me** (858.2 mg) se observaron compuestos de peso molecular alto que no eluyeron en el cromatofolio, en la mezcla **M2Me** (1.75 g) se observó la cristalización de un compuesto con impurezas de color café, y en la fracción **M3Me** (757.3 mg) se observó una mezcla más compleja de compuestos en el cromatofolio.

Debido a que en el tratamiento de la fracción acuosa con amberlita se observó que el lavado con agua aún mostraba coloración se decidió recolectar esta fracción acuosa y evaporar 20 mL de la disolución con ayuda de MeOH anhidro, esta fracción se etiquetó como **AgMe**.

En el caso de la infusión, ésta se trató de manera similar a la fracción acuosa del extracto metanólico, obteniendo 347.8 mg de la fracción 5'.

7.2. Interpretación de los datos espectroscópicos de RMN

A continuación, se muestran los espectros de protón de las fracciones EMeF, EAc, AgMe y 5' (Figura 27).

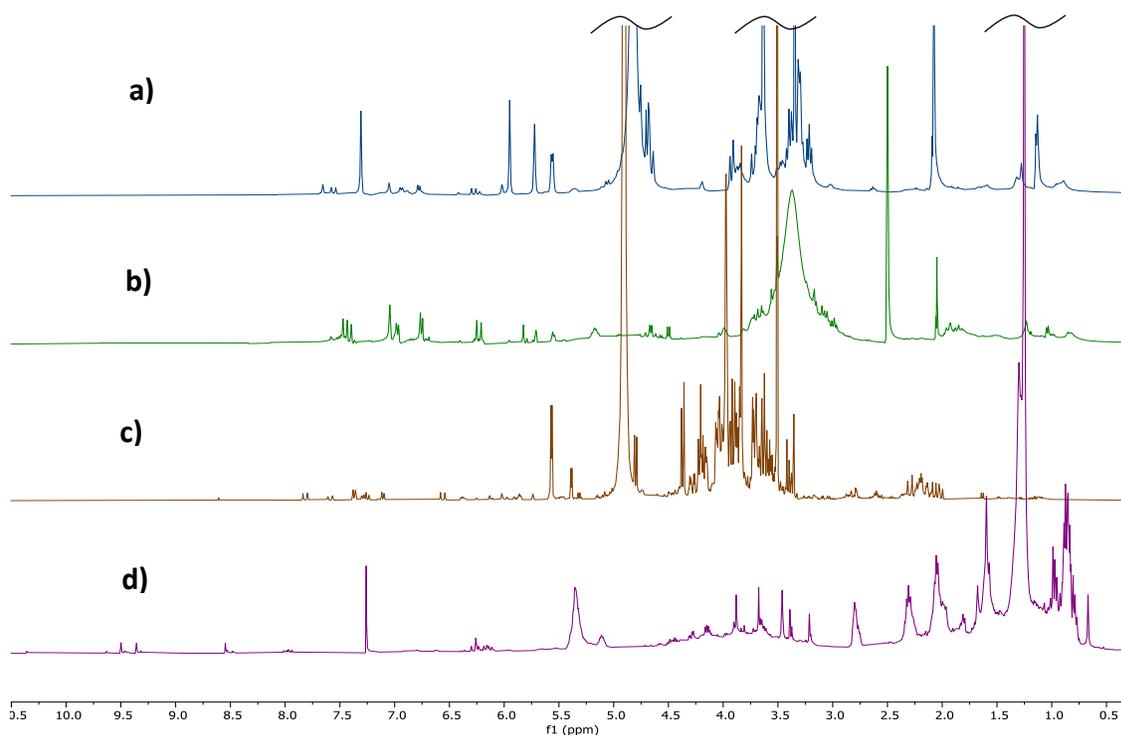


Figura 27. Espectros de protón del a) extracto crudo y las fracciones b) 5', c) AgMe (MeOH- d_4) y d) EAc en $CDCl_3$ 400 MHz

El espectro de RMN de protón del extracto crudo (**Figura 27a**) mostró una señal simple en δ 7.30 de la que se puede asumir forma parte de un sistema vinílico o aromático, la región de δ 5.40-6.00 muestra tres señales que pueden corresponder a protones vinílicos, mientras que la región de δ 3.00-4.00 muestra una gran cantidad de señales atribuibles a protones de carbonos base de oxígeno, también se observa una señal simple en δ 2.06 que puede atribuirse a un metilo α de carbonilo. Por su parte el espectro de ^{13}C (**Figura 28**) mostró

señales en la región alifática (δ 10.0-50.0), mientras que la región de δ 55.0-100.0 muestra señales atribuibles a carbonos bases de oxígeno como carbonos anoméricos, en la región de δ 105.0-150.0 se observan señales que se pueden atribuir a carbonos vinílicos, también se observaron señales cercanas a δ 170.0 correspondientes a carbonos carbonílicos de éster. De acuerdo con la información de ambos espectros se puede asumir que en esta fracción existe un compuesto mayoritario que corresponde a las señales intensas.

Por su parte, el espectro de protón de la fracción 5' (**Figura 27b**) mostró señales presumiblemente similares a las de la fracción EMe, con la diferencia de que las intensidades de las señales cambian, observando que las señales de la región δ 5.00-7.60 tienen una intensidad semejante, por lo que se puede asumir que el compuesto mayoritario de la fracción EMe se encuentra en menor proporción en la fracción 5'. Además, en esta fracción se observa una mayor cantidad de señales de protones aromáticos y vinílicos, atribuibles a otro tipo de compuestos como podrían ser los flavonoides.

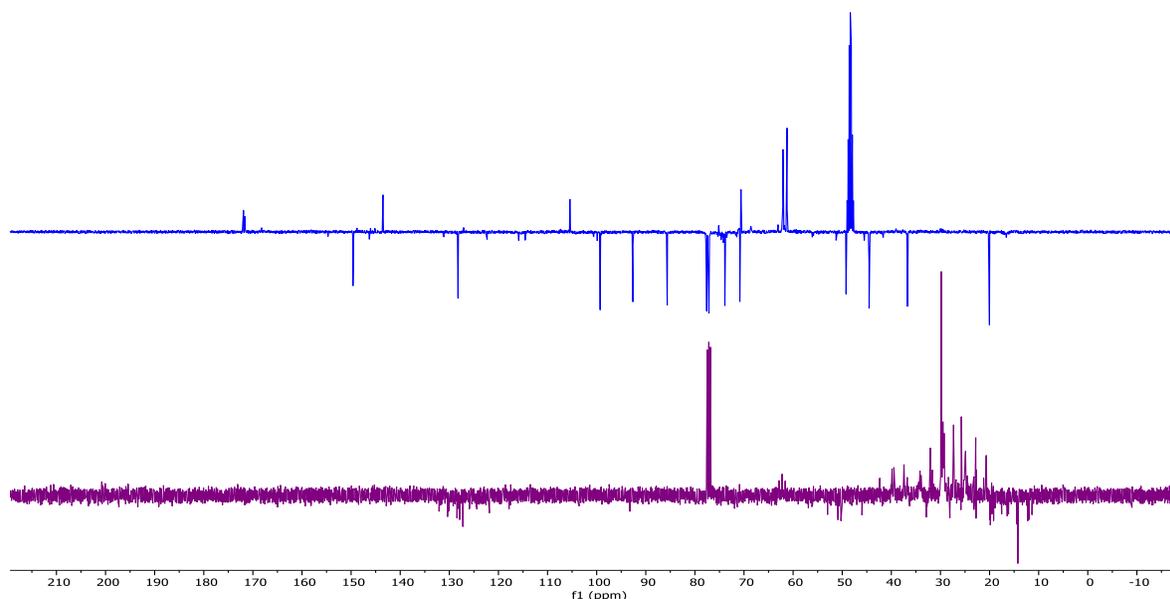


Figura 28. Espectro DEPTQ del extracto crudo (trazo superior, MeOH- d_4) y de la fracción EAc (trazo inferior, CDCl₃) 400 MHz

La **Figura 27c** corresponde al espectro de protón de la fracción AgMe, en el cual se observa una gran cantidad de señales superpuestas en la región de δ 3.50-4.00, observándose señales de posibles carbonos anoméricos, indicando la presencia de azúcares, lo cual concuerda con el tratamiento descrito para esta fracción, ya que este mismo conllevó al enriquecimiento en azúcares de la fracción. Sin embargo, en este espectro aún se pueden observar señales en la región de protones vinílicos y aromáticos, por lo que se asume que algún compuesto con polaridad alta y soluble en agua se encuentra en esta fracción.

El espectro de protón la fracción EAc (**Figura 27d**) muestra señales en la región de protones alifáticos δ 0.50-2.80 y también se observan señales en la región de protones vinílicos, la presencia de estos dos grupos de señales se puede atribuir a la presencia de ácidos grasos insaturados en la fracción. Por otra parte, se observan señales simples en la región de δ 3.00-4.00 correspondientes a señales de metoxilos, y señales en frecuencias altas (δ 8.00-10.00), estos dos grupos de señales pueden atribuirse a la presencia de clorofilas⁶⁹. El espectro de ¹³C de esta fracción muestra también una gran cantidad de señales en la región alifática, y algunas señales en la región de carbonos vinílicos.

7.2.1. Elucidación de la fracción M2MeB

El lavado de la fracción M2MeB con mezclas de MeOH-acetona llevó a la limpieza de los cristales obteniendo 370 mg de agujas cristalinas, posterior a su recristalización a temperatura ambiente. En la TLC de estos cristales se observó una única mancha con un R_f de 0.7 (Sistema MeOH-H₂O 1:1). El revelado de la placa fina con H₂SO₄ al 50 % mostró en un inicio una coloración azul y finalmente una tonalidad negra, posible indicador de la presencia de un iridoide glicosilado⁶⁸.

Los datos espectroscópicos de M2MeB revelaron la identidad del compuesto en cuestión, tratándose de un iridoide glicosilado denominado asperulósido, constituido por el anillo básico de iridano, un grupo acetilo, una lactona de cinco miembros y una unidad de glucosa. Este compuesto ha sido reportado previamente en el género *Galium* siendo considerado un metabolito característico del género⁷⁰.

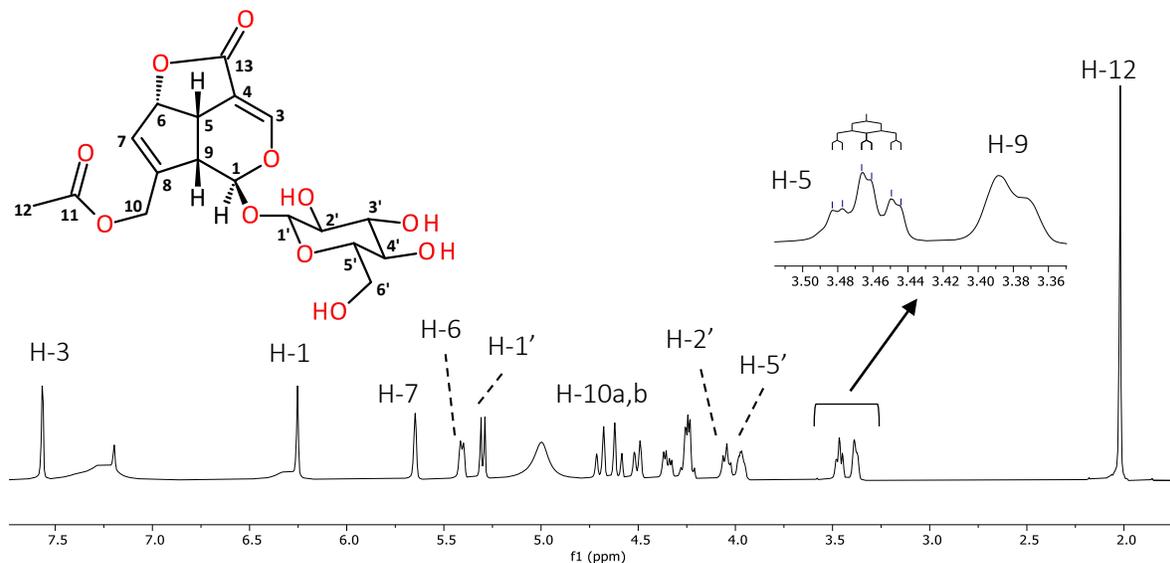


Figura 29. Espectro de ^1H del asperulósido (I) en piridina- d_5 (400 MHz)

En el espectro de RMN- ^1H del asperulósido (**Figura 29**) se observa la señal doble de un protón vinílico en δ 7.56 ($^4J_{\text{H-3,5}} = 2.03$ Hz) que corresponde al C-3 en δ 149.0. Las señales observadas en δ 3.38 y 3.46 ppm son típicas el sistema del anillo iridano, y corresponden a H-9 y H-5, respectivamente, el experimento HSQC (Apéndice A-1) las correlacionó con sus respectivos carbonos en δ 44.4 (C-9) y δ 36.3 (C-5).

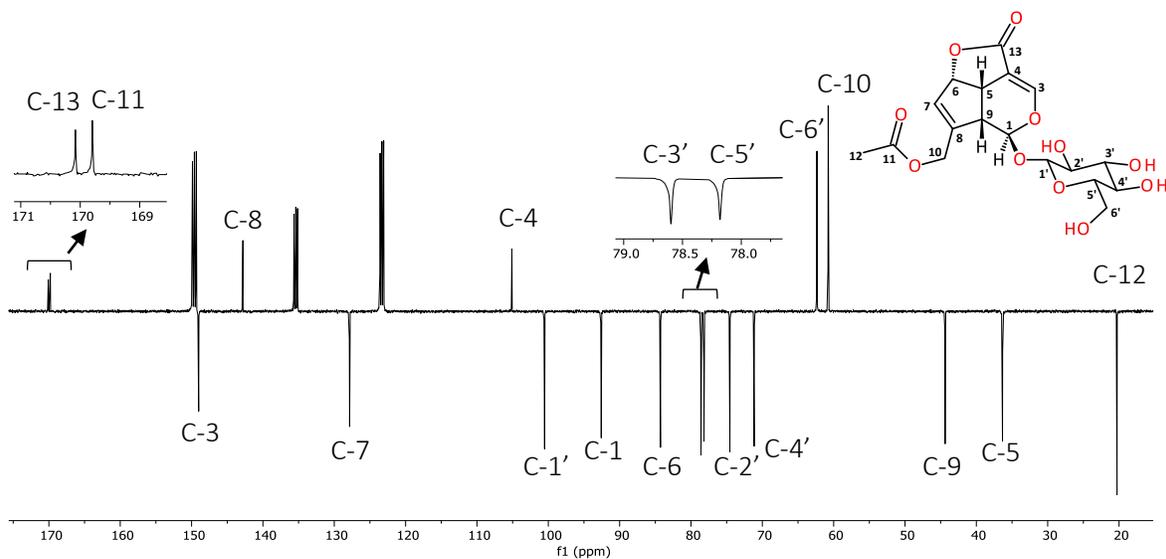


Figura 30. Espectro DEPTQ del asperulósido (I) en piridina- d_5 (100 MHz)

El espectro DEPTQ de **I** (**Figura 30**) mostró un total de 18 señales, de entre las cuales se observó la presencia de dos carbonos carbonílicos, cuatro carbonos vinílicos, dos metilenos base de oxígeno, siete metinos base de oxígeno, un metilo y dos metinos alifáticos.

En el caso de H-5, que apareció como una señal doble de doble de dobles, mostró correlaciones en el experimento COSY (**Figura 31**) con los protones en δ 7.56 (H-3) y δ 5.41 (H-6), asignando así el C-6 en δ 84.3. Por otra parte, en el experimento HMBC (**Figura 32**), este protón mostró correlaciones con los carbonos en δ 149.0 (C-3), δ 105.1 (C-4), δ 127.8 (C-7) y δ 142.8 (C-8).

El protón H-9, que se observó como una señal doble ancha, mostró correlaciones en el experimento COSY con H-1 (δ 6.26), H-5 (δ 3.46) y H-7 (δ 5.65), mientras que en el experimento HMBC se observaron correlaciones con los carbonos en δ 92.6 (C-1), δ 142.8 (C-8) y δ 60.8 (C-10).

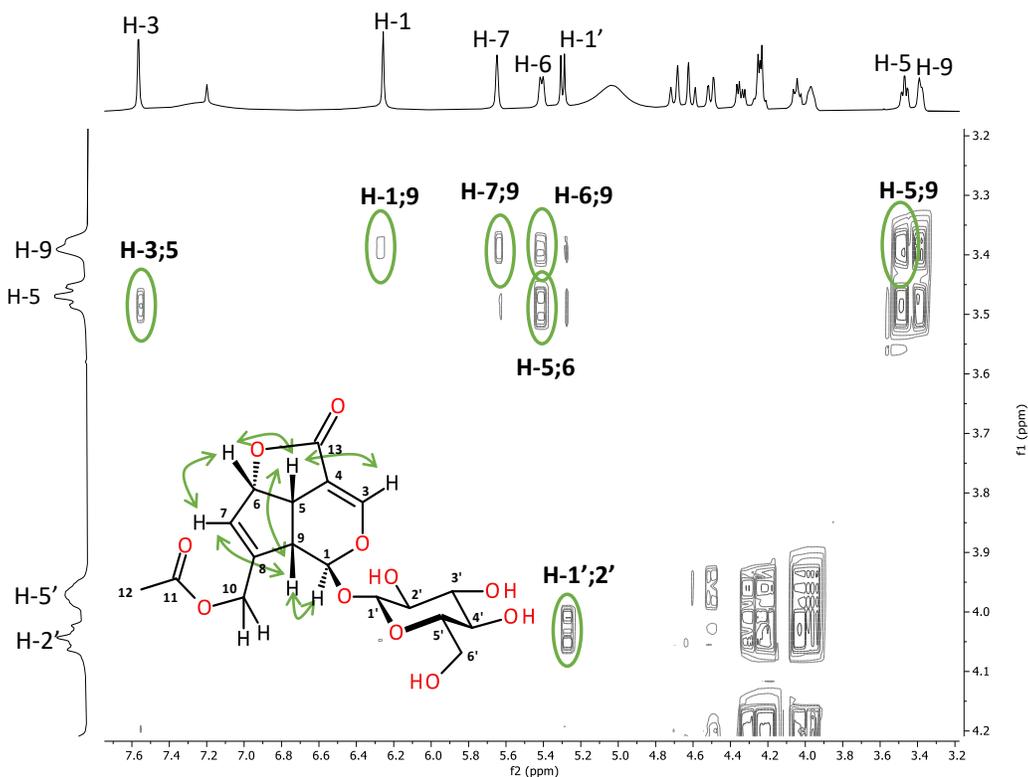


Figura 31. Sección del espectro COSY 2D de **I** y sus correlaciones clave

En el espectro de protón de la muestra también se observó una señal simple en δ 2.02 (H-12) que corresponde al carbono en δ 20.3, el cual mostró correlación en el experimento HMBC con los carbonos de δ 169.8 (C-11) y δ 60.8 (C-10), evidenciando la presencia de un grupo acetato unido a un metileno (H-10). La señal de este metileno diastereotópico (δ 4.60,4.69) mostró correlaciones heteronucleares con los carbonos en δ 142.8 (C8), δ 127.8 (C7) y δ 44.4 (C9), estableciendo que este metileno se encuentra unido al anillo de iridano en la posición del C-8 cuaternario, ya que no se observan correlaciones en el experimento COSY.

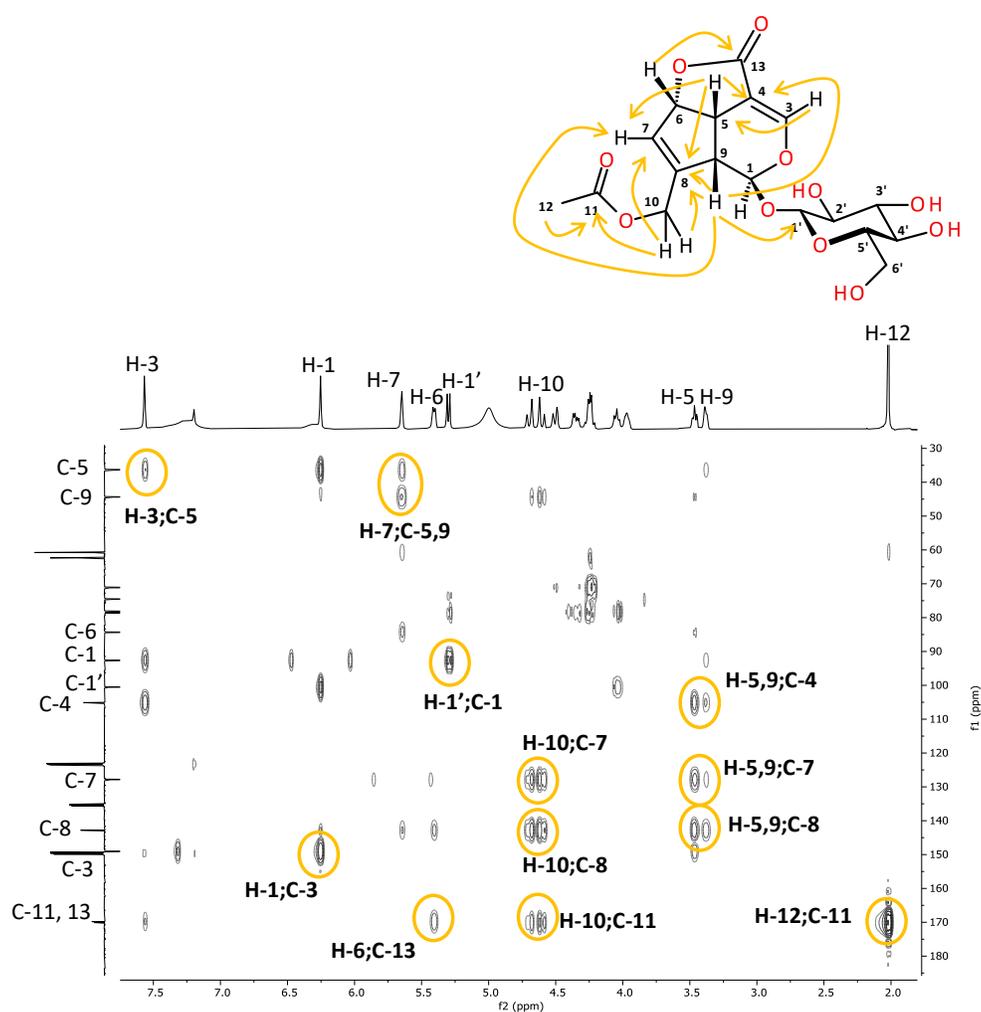


Figura 32. Espectro HMBC de I y sus correlaciones clave

Los protones H-6 y H-3, mostraron correlación en el experimento HMBC con el carbono en δ 170.1(C-13), estableciendo la presencia del grupo carbonilo en la posición 4 del anillo de iridano, el desplazamiento químico de este carbono sugirió la presencia de un éster por lo que se infirió la presencia de una lactona de cinco miembros en las posiciones 4 y 6 del anillo.

El protón H-1 (δ 6.26) se asoció con un grupo acetal (δ 92.6), por lo que su desplazamiento aparece en frecuencias más altas de lo normal. En el experimento COSY, este protón se correlacionó con H-5 y H-9, mientras que el HMBC mostró correlaciones con los carbonos en δ 36.3 (C-5), δ 100.5 (C-1') y 149.0 (C-3). La correlación con C-1' evidencia la posición en la que se encuentra la porción del sacárido en la molécula.

La porción de azúcar en la molécula se identificó como β -glucosa debido a la señal del protón del carbono anomérico en δ 5.30, la cual apareció como una señal doble con una $^3J_{H-1',2'}$ de 7.88 Hz (Constante de acoplamiento alta debido a la interacción axial-axial)⁷¹. Esta señal mostró correlación en el experimento COSY con la señal en δ 4.05 (H-2'), correspondiente al carbono en δ 74.5.

Con la finalidad de determinar la configuración relativa de la molécula se usó el experimento NOESY 2D (**Figura 33**), con el cual se pudieron observar las correlaciones entre los protones a través del espacio. El espectro mostró correlaciones entre protones H-5 y H-9, concordando con lo reportado con demás estudios para este tipo de compuestos, así como también se observó la correlación entre H-5 y H-6, descrita de igual manera para este compuesto⁷². Una correlación que no se esperaba ver era la correspondiente a la de H-1 con H-9, ya que la configuración descrita para la molécula indicaba una configuración anti para este par de hidrógenos. Por esta razón se realizó un modelo 3D simple de la molécula con el *software* Avogadro, observando que el ángulo diedro formado por estos protones en la configuración descrita en la literatura es de aproximadamente 70°, dato que en conjunto con la información que brinda la gráfica de Karplus, puede explicar el valor pequeño de acoplamiento ($^3J_{H-1,9} = 1.39$ Hz) observada para este par de protones, así como su correlación a través del espacio observada en el espectro NOESY.

Existe en la literatura un reporte hecho por Lu y colaboradores⁷³, en el que se menciona haber obtenido el 1-epiasperulósido de *Saprosma ternatum*; sin embargo, el comparativo de los datos espectroscópicos obtenidos en este estudio, así como con demás reportes mostró que se trata del mismo compuesto, lo que sugiere que faltaron evidencias para confirmar la asignación de la configuración relativa de los centros estereogénicos de la molécula.

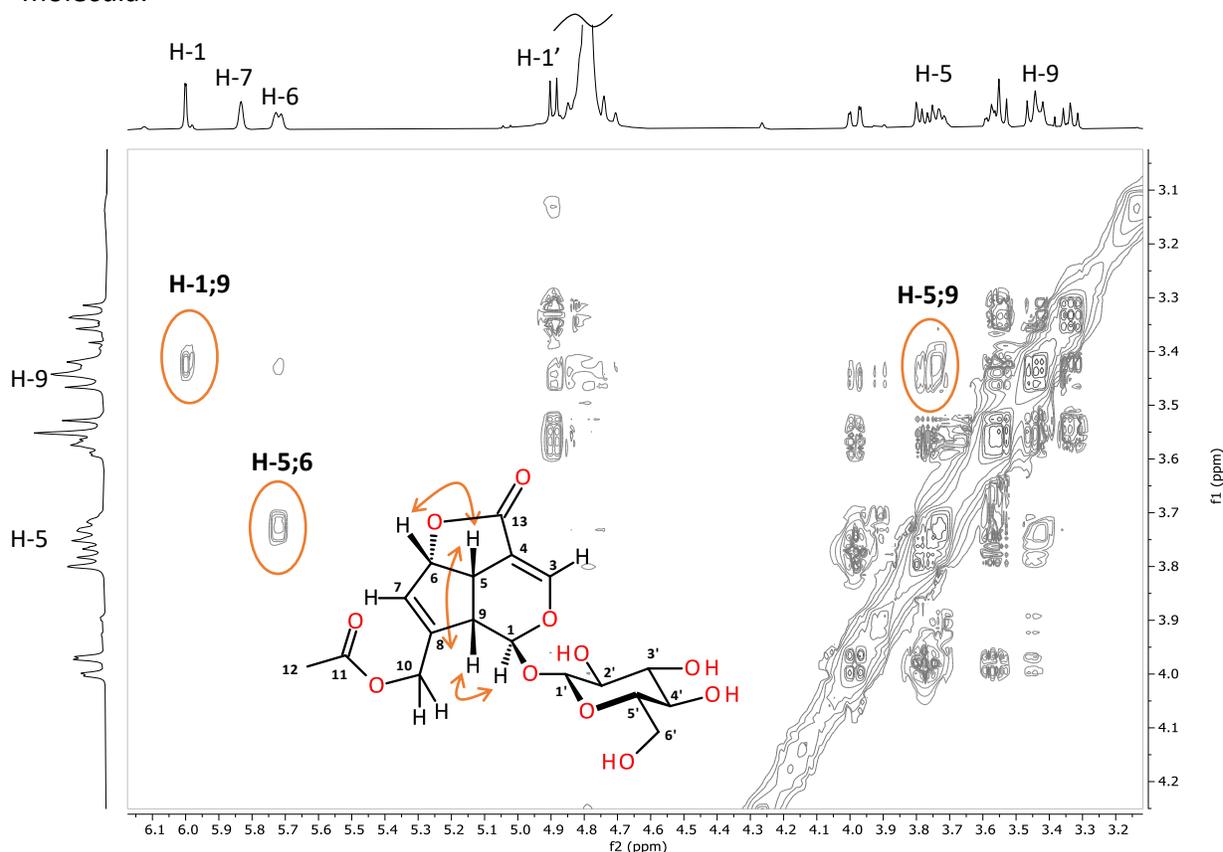


Figura 33. Sección del espectro NOESY 2D de I y sus correlaciones clave

Aunque entre las actividades biológicas del asperulósido no destaque su capacidad antioxidante, existen algunas más que han sido reportadas para este compuesto, entre las que podemos mencionar la actividad antiviral, antiprotozoaria, antimalaria, antimutagénica, antiproliferativa, antitumorígenica, antiangiogénica, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antihipertensiva y antiobesidad⁶⁸. La actividad antiinflamatoria previamente reportada³ para fracciones cromatográficas polares puede asociarse presumiblemente a este compuesto.

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto I (piridina-*d*₅)

Posición	Desplazamientos (δ ppm)			Correlaciones	
	DEPTQ	¹³ C	¹ H (mult., <i>J</i> (Hz))	COSY	HMBC (H-C)
1	CH	92.6	6.26 (d, 1.39)	3.38	36.3, 100.5, 149.0
3	CH	149.0	7.56 (d, 2.03)	3.46	36.3, 92.6, 105.1, 170.1
4	C	105.1	-	-	-
5	CH	36.3	3.46 (ddd, 6.81, 6.78, 1.96)	3.38, 5.41, 7.56	44.4, 105.1, 127.8, 142.8, 149.0
6	CH	84.3	5.41 (d, 6.01)	3.38	142.8, 170.1
7	CH	127.8	5.65 (d, 2.39)	3.38	36.3, 44.4, 60.8, 84.3, 142.8
8	C	142.8	-	-	-
9	CH	44.4	3.38 (d, 5.9)	3.46, 5.41, 5.65, 6.26	36.3, 105.1, 127.8, 14.8
10	CH ₂	60.8	4.60 (d, 14.61) 4.69 (d, 14.45)	-	44.4, 127.8, 142.8, 169.8
11	C	169.8	-	-	-
12	CH ₃	20.3	2.02, s	-	60.8, 169.8
13	C	170.1	-	-	-
1'	CH	100.5	5.30 (d, 7.88)	4.05	78.6, 92.6
2'	CH	74.5	4.05, dd 8.15, 8.15	5.30	78.6, 100.5
3'	CH	78.6	4.25, m	-	71.1, 78.2
4'	CH	71.1	4.25, m	-	-
5'	CH	78.2	3.97 (ddd, 7.73, 6.20, 6.20)	4.25, 4.35, 4.50	-
6'	CH ₂	62.3	4.35 (dd 5.59, 11.80) 4.50 (dd, 1.73, 12.25)	3.97	74.5

s: señal simple, d: señal doble, dd: señal doble de dobles, ddd: señal doble de doble de dobles, m: señal múltiple

7.2.2. Elucidación de la fracción M3Me 2-5

Se obtuvieron 20.8 mg de las primeras fracciones del tratamiento de la fracción M3Me (naturaleza muy polar), y se observó una mancha con un R_f igual a 0.65 en el cromatofolio (Sistema H_2O -MeOH 7:3, C18).

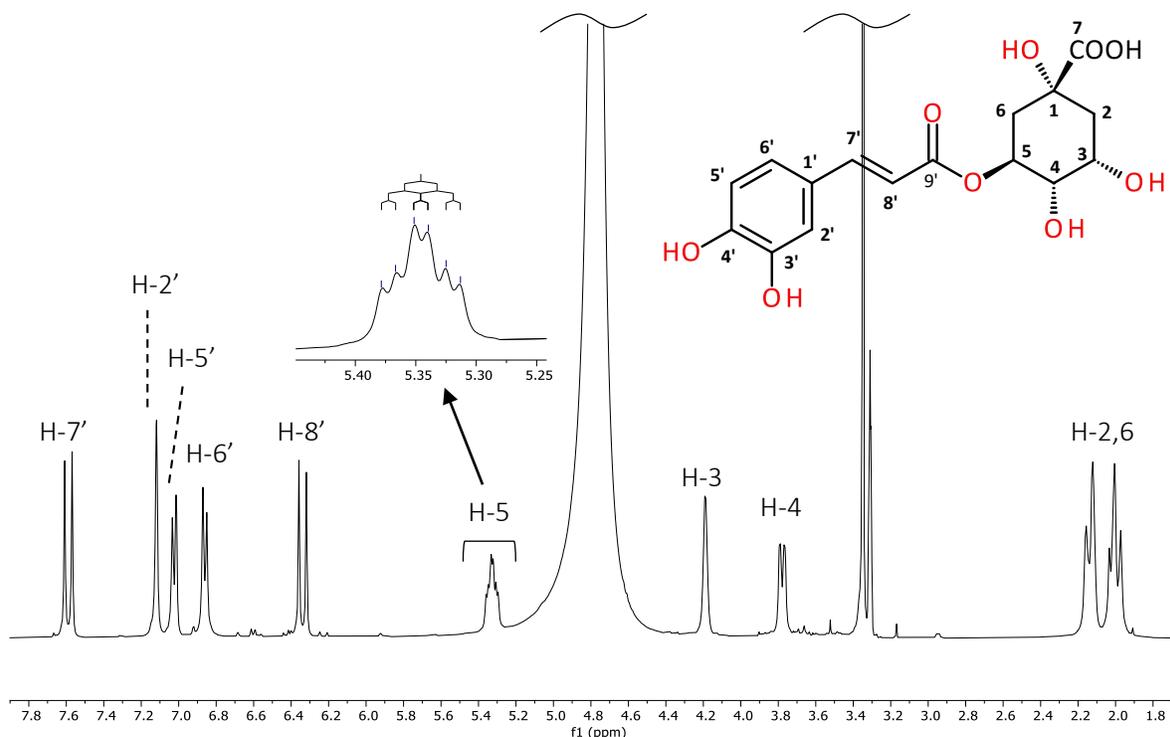


Figura 34. Espectro de 1H del ácido clorogénico (II) en $MeOH-d_4$ (400 MHz)

El análisis de los datos espectroscópicos reveló que el compuesto en cuestión se trata del ácido clorogénico (II), el cual se encuentra distribuido ampliamente en el reino vegetal⁷⁴, y que se encuentra conformado por una porción de ácido cafeico unida a una porción de ácido quínico.

En el espectro de RMN- 1H (Figura 34) se observaron dos señales de protones vinílicos en δ 7.59 (H-7') y δ 6.34 (H-8'), los cuales se encuentran acoplados entre sí, con una $^3J_{H-7',8'}$ de 15.9 Hz, valor que es típico para protones vinílicos con estereoquímica *E*. El espectro DEPTQ de II (Figura 35) mostró un total de 16 señales, entre las que se observaron 2 señales de carbonilos, 8 carbonos vinílicos, 4 carbonos base de oxígeno y 2 metilenos alifáticos.

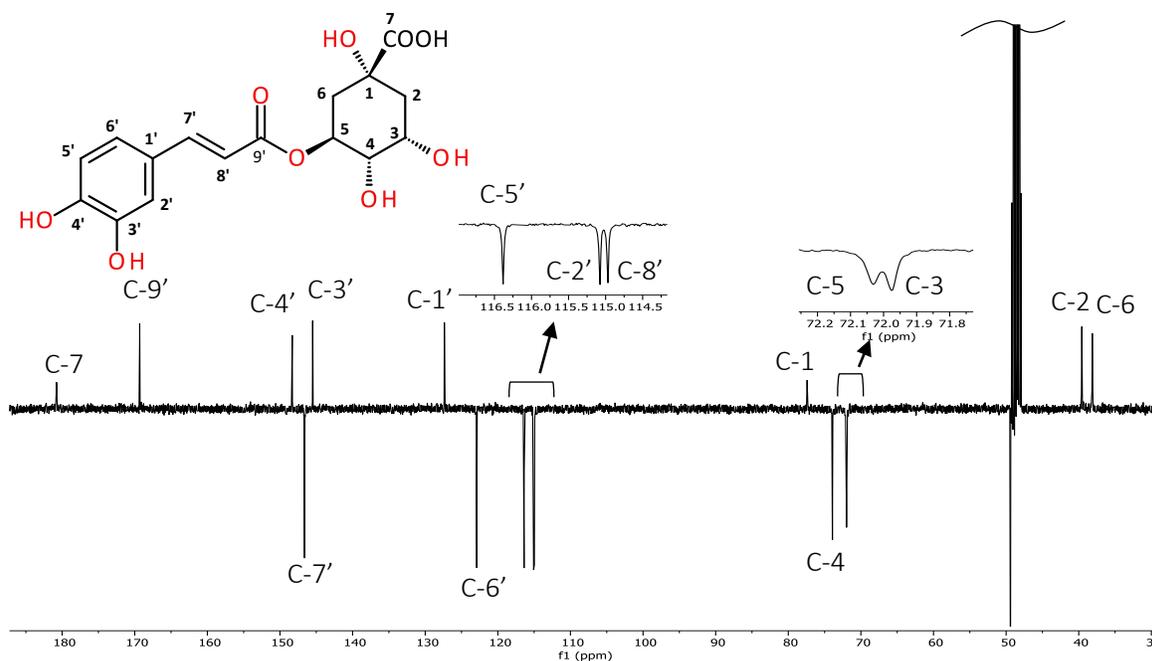


Figura 35. Espectro DEPTQ del ácido clorogénico (II) en MeOH- d_4 (100 MHz)

El experimento HSQC (Apéndice A-2) mostró los carbonos correspondientes a estos hidrógenos en δ 146.6 (C-7') y δ 114.9 (C-8'). El experimento HMBC (Figura 36) mostró la correlación de estos protones con un anillo aromático, y a su vez con un carbono carbonílico en δ 169.3, correspondiente a C-9'.

En cuanto al anillo aromático presente en la molécula, se observaron tres señales en la región de δ 6.3-7.3, mostrando un patrón típico de la sustitución en las posiciones 1, 3, 4 del anillo bencénico. La señal en δ 7.12 (H-2') apareció como un doble con una $^4J_{H-2',6'}$ de 1.98 Hz que puede asociarse al acoplamiento *meta* entre los hidrógenos H-2' y H-6', mientras que las señales en δ 7.02 (H-5') y δ 6.86 (H-6') aparecieron como dobles con constantes de acoplamiento de 8.1 Hz, el cual es un valor típico para el acoplamiento *orto* de los protones. El experimento HSQC mostró los carbonos correspondientes para estos protones, ubicados en δ 115.1 (C-2'), δ 116.4 (C-5'), y δ 122.9 (C-6'). Estas señales mostraron correlación heteronuclear con los carbonos en δ 127.4, δ 145.5 y δ 148.3, asignando así los

carbonos C-1', C-3' y C-4' respectivamente. Con esta información se identificó la primera mitad de la molécula como una porción del ácido cafeico.

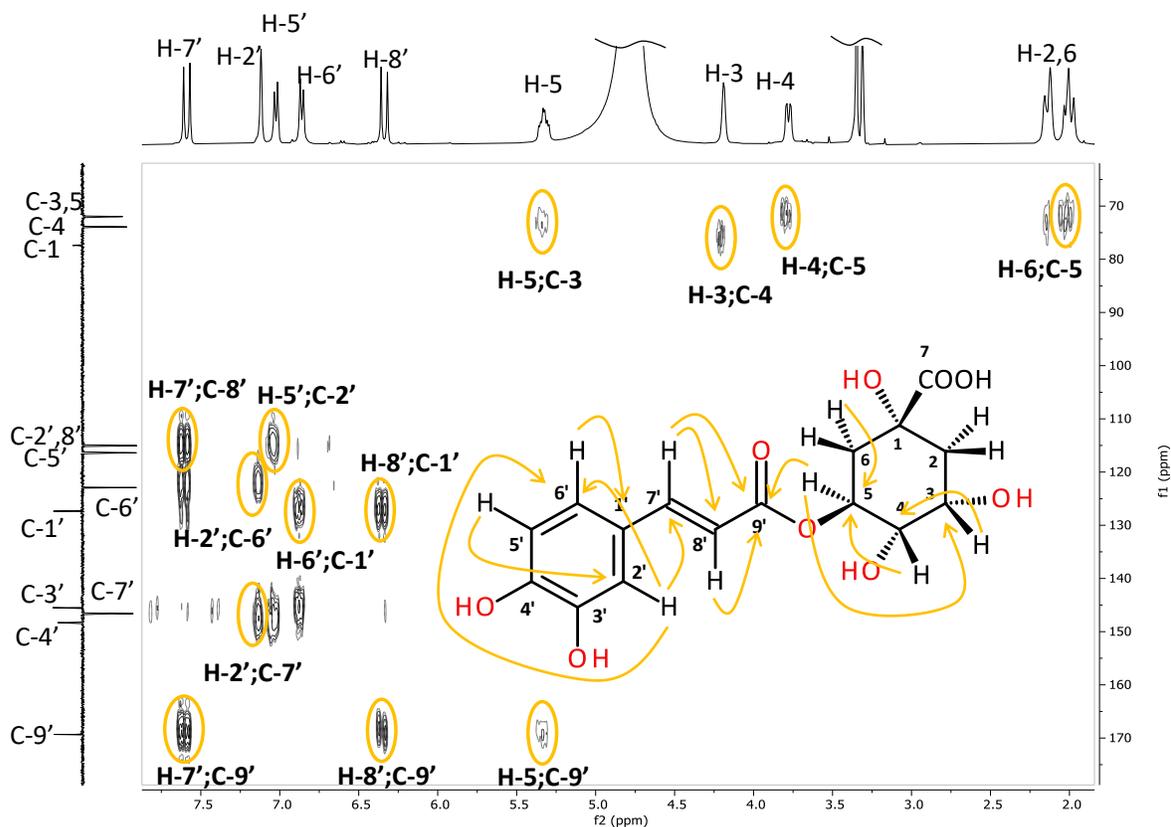


Figura 36. Espectro HMBC de II y sus correlaciones clave

El carbono C-9' mostró una correlación heteronuclear con el protón en δ 5.33, que apareció como una señal doble de doble de dobles ($^3J_{H-5,6a} = 10.74$, $^3J_{H-5,4} = 10.63$, $^3J_{H-5,6b} = 4.74$ Hz), observando su correlación homonuclear en el espectro COSY (Figura 37) con los protones de un metileno en δ 2.01,2.13 (H-6a,b), y con un metino en δ 3.78 (H-4). El protón H-4 mostró correlación homonuclear con el hidrógeno en δ 4.19, asignando así a H-3, el cual a su vez mostró una correlación homonuclear a 3 enlaces con el metileno en δ 2.01,2.13, cuyas señales se encuentran solapadas con H-6, corroborando la posición del metileno H-2. Los carbonos correspondientes a cada protón se encontraron en δ 73.9 (C-4),72.0 (C-5), 71.9 (C-3), 39.6 (C-2) y 38.1 (C-6), atribuyendo los tres primeros a carbonos base de oxígeno y los dos últimos a metilenos alifáticos. Con esta información se relacionó esta parte de la

molécula con el ácido quínico, concluyendo que el compuesto en cuestión se trata del ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico).

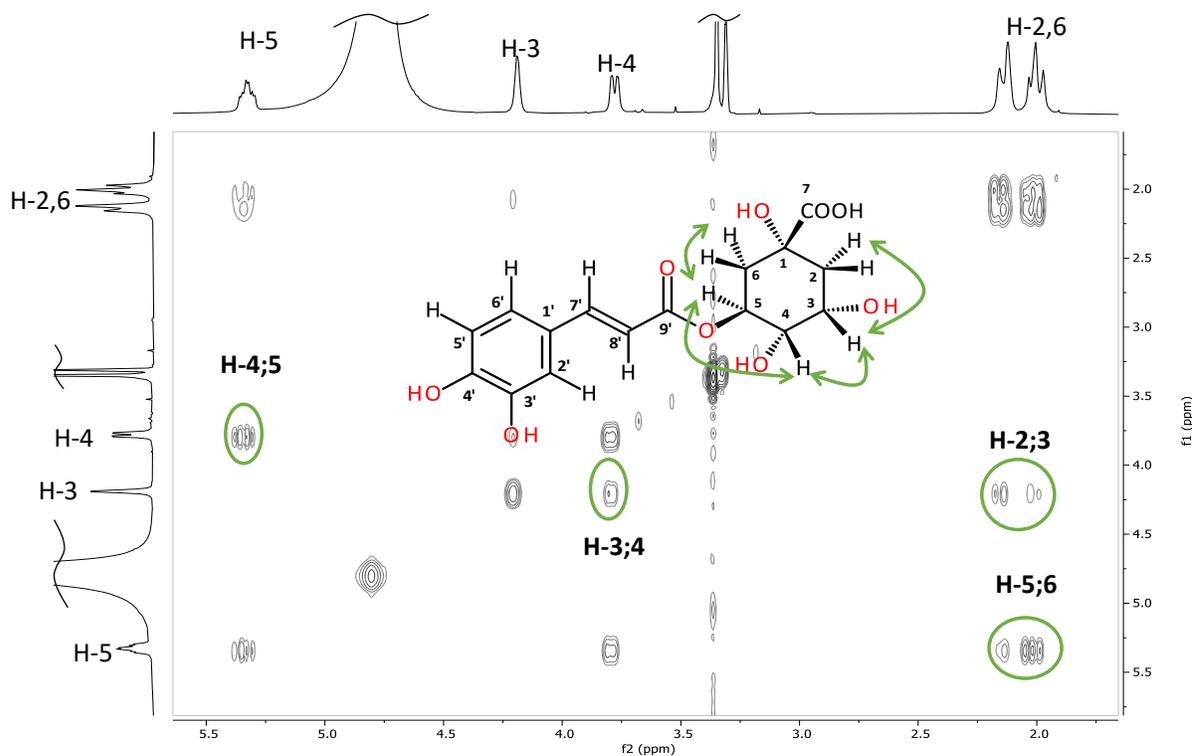


Figura 37. Sección del espectro COSY 2D de II y sus correlaciones clave

El análisis de la estereoquímica de la porción del ácido quínico de la molécula se realizó con la ayuda de las constantes de acoplamiento observadas y la información que proporciona la gráfica de Karplus, asociando constantes de acoplamiento altas (>7 Hz) con acoplamientos axial-axial, y constantes de acoplamiento bajas (<5 Hz) con acoplamientos axial-ecuatorial o ecuatorial-ecuatorial. Se estableció que el H-5 se encuentra en una posición axial acoplado con H-4 en posición axial y un metileno, mientras que H-4 se relaciona con H-3 en posición ecuatorial, y este último a su vez con otro metileno.

Entre las actividades biológicas estudiadas para la molécula del ácido clorogénico destaca la actividad antioxidante, actividad antidiabética, antiobesidad, antihipertensiva y antimicrobiana⁷⁴.

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto II (MeOH- d_4)

Posición	Desplazamientos δ (ppm)			Correlaciones	
	DEPTQ	^{13}C	^1H (mult., J(Hz))	COSY	HMBC (H - C)
1	C	77.4	-	-	-
2	CH ₂	39.6	2.01 (m) 2.13 (m)	2.13, 4.19 2.01, 4.19	38.1, 71.9, 77.4
3	CH	71.9	4.19 (d, 3.65)	2.01, 2.13, 3.78	77.4
4	CH	73.9	3.78 (dd, 3.16, 9.83)	4.19, 5.33	71.9, 72.0
5	CH	72.0	5.33(ddd, 10.74, 10.63, 4.74)	2.01, 2.13, 3.78	73.9, 169.3
6	CH ₂	38.1	2.01 (m) 2.13 (m)	5.33	39.6
7	C	180.7	-	-	-
1'	C	127.3	-	-	-
2'	CH	115.1	7.12 (d, 1.98)	-	122.9, 146.6,
3'	C	145.5	-	-	-
4'	C	148.3	-	-	-
5'	CH	116.4	7.02 (dd, 1.86, 8.09)	6.86	115.1, 146.6 148.3,
6'	CH	122.9	6.86 (d, 8.18)	7.02	127.3, 145.5
7'	CH	146.6	7.59 (d, 15.89)	6.34	114.9, 122.9, 169.3
8'	CH	114.9	6.34 (d, 15.93)	7.59	127.3, 169.3
9'	C	169.3	-	-	-

d: señal doble, dd: señal doble de dobles, ddd: señal doble de doble de dobles, m: señal múltiple

7.2.3. Elucidación de la fracción M3Me 20-26

Esta fracción corresponde a la segunda mancha de la fracción M3 observada en TLC con un R_f de 0.55 (Sistema MeOH-H₂O 1:1), con un peso de 30.2 mg, que al revelarse con H₂SO₄ al 50 % tomó una coloración azul al inicio para terminar con una tonalidad negra, indicando nuevamente la presencia de un iridoide glicosilado, que con el análisis de los datos espectroscópicos se identificó como dafilósido (**III**), el cual ha sido reportado en el género *Galium*^{31,32,34}. Estructuralmente hablando, el dafilósido es un análogo del asperulósido, con la diferencia de la presencia de la lactona para el caso exclusivo en el caso del asperulósido.

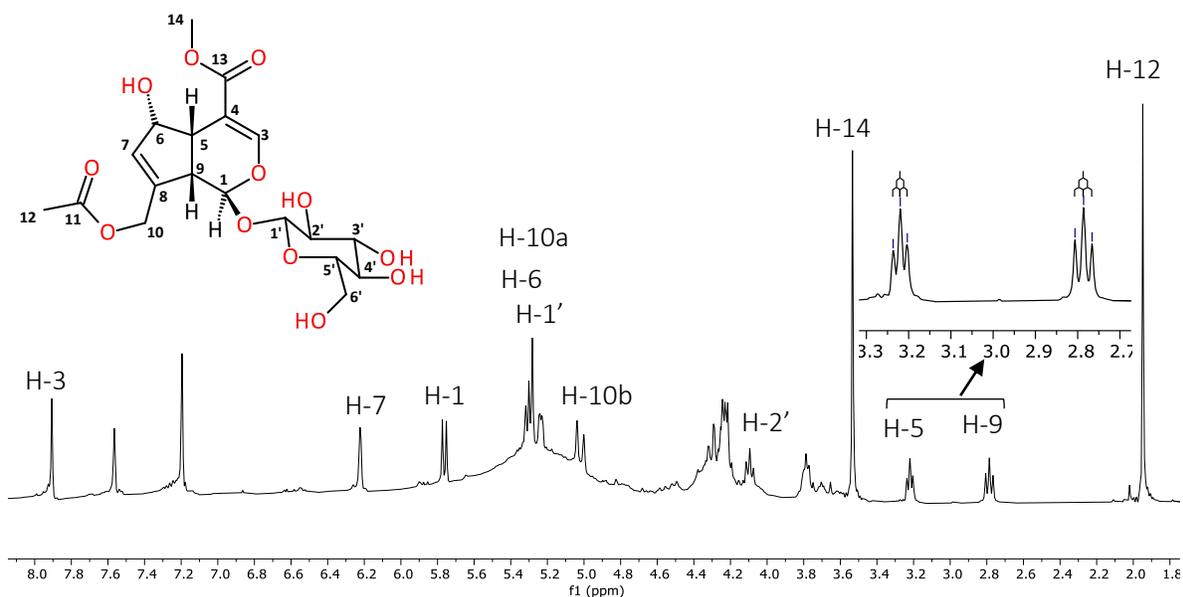


Figura 38. Espectro de ¹H del dafilósido (**III**) en piridina-*d*₅ (400 MHz)

El espectro de hidrógeno del compuesto **III** (**Figura 38**) mostró las dos señales típicas para el anillo iridano correspondientes a H-5 y H-9, las cuales aparecen en δ 3.22 y δ 2.79 respectivamente, y cuyos carbonos se encontraron en δ 42.0 (C-5) y δ 45.6 (C-9). El protón H-9 apareció como una señal doble de dobles, estableciendo su correlación homonuclear con el hidrógeno H-1 en δ 5.76 (d, $^3J_{H-1,9} = 8.79$ Hz), y con H-5, el cual apareció como una señal doble de dobles, y que a su vez muestra su correlación homonuclear con H-6 (δ 5.23).

Los carbonos correspondientes para H-1, H-3 y H-6 se encontraron con el experimento HSQC (Apéndice A-3) en δ 101.3 (C-1), δ 154.1 (C-3) y δ 74.0 (C-6).

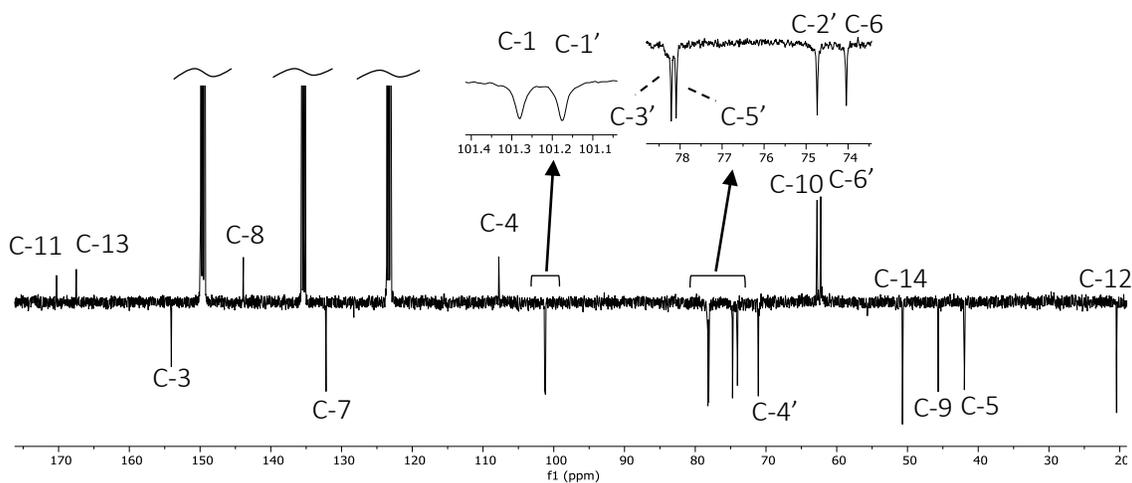


Figura 39. Espectro DEPTQ del dafilósido (III) en piridina- d_5 (100 MHz)

El experimento HMBC (Figura 40) mostró las correlaciones del protón H-3 (δ 7.91) con los carbonos en δ 107.8 y δ 167.5, asignando así las posiciones C-4 y C-13. El C-13 mostró una correlación heteronuclear con el metilo en δ 3.53 (H-14), estableciendo la presencia de un éster metílico en esta posición.

Al igual que en el compuesto I, se observó la presencia de un grupo acetato unido a un metileno debido a la presencia de la señal del metilo H-12 en δ 1.95, el cual mostró correlaciones heteronucleares con los carbonos en δ 170.3 (C-11) y δ 62.8 (C-10). La posición de la sustitución de este grupo se observó con el experimento HMBC, el cual mostró las correlaciones de H-10 (δ 5.02, 5.29) con C-7 (δ 132.2), C-8 (δ 143.9) y C-9.

La porción del monosacárido de la molécula se identificó como β -glucosa debido a la presencia de la señal en δ 5.31 ($^3J_{H-1',2'} = 7.68$ Hz), la cual mostró una correlación heteronuclear larga distancia con C-1, estableciendo la posición la glucosa en la molécula. El experimento COSY (Apéndice A-3) mostró una correlación entre H-1' y la señal en δ 4.09 (H-2') que aparece como una señal doble de dobles ($^3J = 8.04, 8.04$ Hz) y se encuentra

asociada al carbono en δ 74.7. Las señales restantes de esta unidad de glucosa se obtuvieron con ayuda de los experimentos HMBC y COSY.

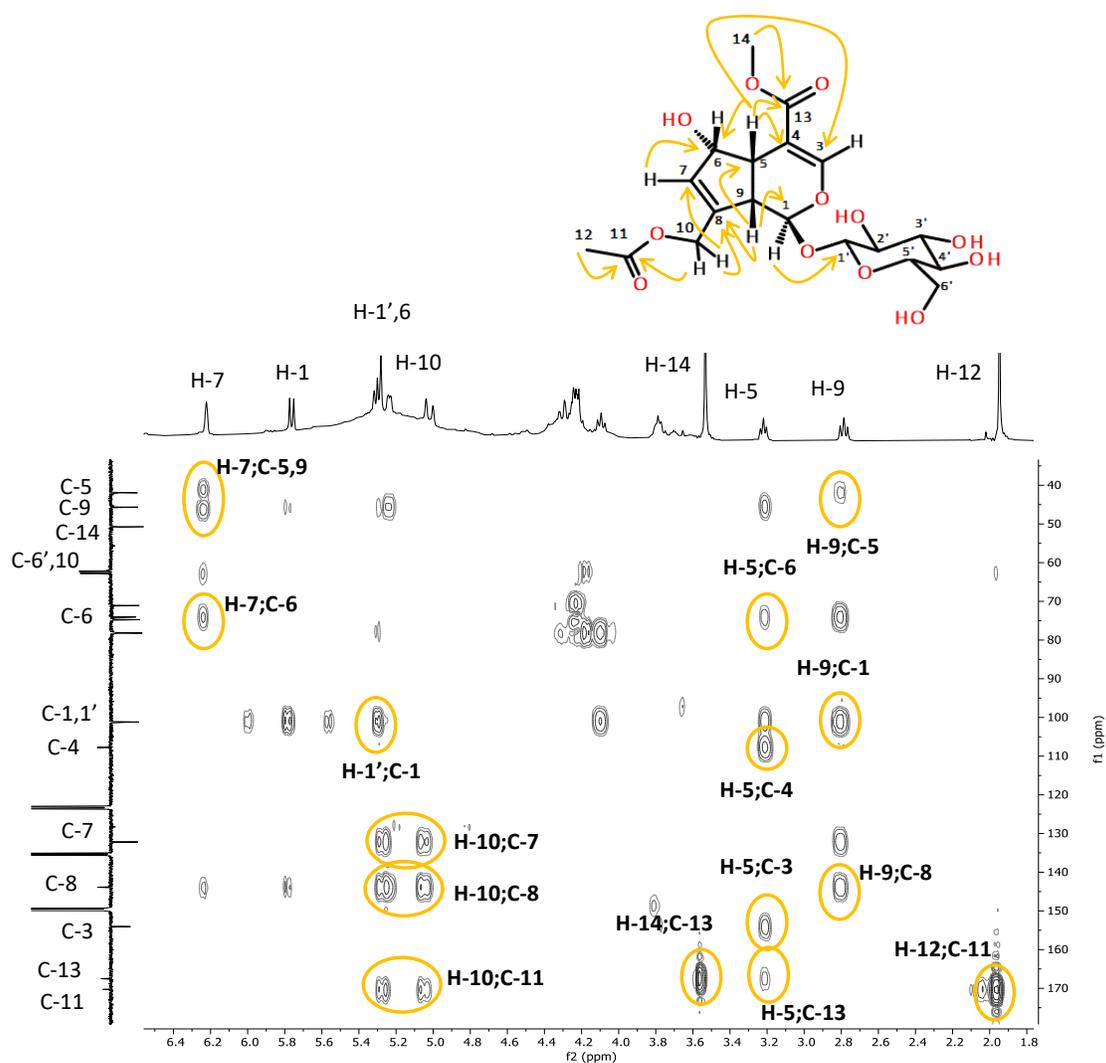


Figura 40. Espectro HMBC de III y sus correlaciones clave

Un aspecto relevante que se encontró al realizar el análisis de la estequiometría de la molécula es la magnitud de la constante de acoplamiento entre los protones H-1 y H-9 ($^3J_{H-1,9} = 8.79$ Hz), la cual tiene una variación importante con la observada para el mismo par de protones en el caso del compuesto I ($^3J_{H-1,9} = 1.39$ Hz), a pesar de que la configuración de este centro estereogénico es la misma para ambas moléculas. Esta diferencia puede ser

explicada con ayuda de la gráfica de Karplus y un modelo 3D (**Figura 41**) simple del dafilósido (*software* Avogadro), el cual establece una conformación antiperiplanar para este par de protones, elevando de esta manera la magnitud de su constante de acoplamiento. La diferencia entre los ángulos diedros para las diferentes moléculas puede explicarse debido a la rigidez que proporciona la lactona en el caso del asperulósido, haciendo que la molécula tome una conformación con una mayor restricción estérica.

El dafilósido cuenta con pocos reportes sobre sus actividades biológicas, destacando su actividad moduladora del estrés del retículo endoplasmático⁷⁵.

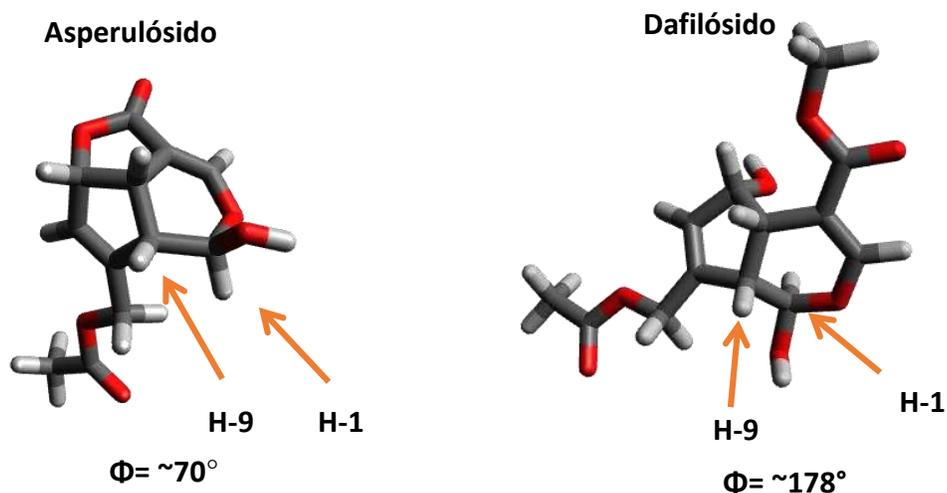


Figura 41. Modelos 3D de las agliconas de I y III, respectivamente.

Tabla 12. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto III (piridina-*d*₅)

Posición	Desplazamientos δ (ppm)			Correlaciones	
	DEPTQ	¹³ C	¹ H (mult., J(Hz))	COSY	HMBC (H - C)
1	CH	101.3	5.76 (d, 8.79)	2.79	45.6, 101.2, 143.9
3	CH	154.1	7.91 (d, 1.38)	-	42.0, 101.3, 107.8, 167.5
4	C	107.8	-	-	-
5	CH	42.0	3.22 (dd, 6.69, 6.69)	2.79, 5.23	45.6, 74.0, 101.3, 107.8, 154.1, 167.5
6	CH	74.0	5.23 (dd, 2.80, 6.00)	3.22	45.6
7	CH	132.2	6.22 (d, 2.30)	-	42.0, 45.6, 62.8, 74.0, 143.9
8	C	143.9	-	-	-
9	CH	45.6	2.79 (dd, 8.09, 8.09)	3.22, 5.76	42.0, 74.0, 101.3, 132.2, 143.9
10	CH ₂	62.8	5.29 (d, 13.8) 5.02 (d, 14.79)	-	132.2, 143.9, 170.3
11	C	170.3	-	-	-
12	CH ₃	20.4	1.95, s	-	62.8, 170.3
13	C	167.5	-	-	-
14	CH ₃	50.7	3.53, s	-	167.5
1'	CH	101.2	5.31 (d, 7.68)	4.09	78.2, 101.3
2'	CH	74.7	4.09 (dd, 8.09, 8.09)	3.78, 5.31	78.2, 101.2
3'	CH	78.2	3.78, m	4.09	-
4'	CH	71.1	4.26, m	-	-
5'	CH	78.1	4.26, m	-	71.1, 78.2
6'	CH ₂	62.3	4.26, m 4.26, m	-	-

s: señal simple, d: señal doble, dd: señal doble de dobles, ddd: señal doble de doble de dobles, m: señal múltiple

7.2.4. Elucidación de la fracción FM1b

Esta fracción se observó como a una mancha con R_f de 0.3 (Sistema MeOH-H₂O 1:1, C18) de la fracción M3 55-64, posterior a su purificación se obtuvieron así 12.3 mg del compuesto en cuestión. El análisis de los datos espectroscópicos reveló que esta fracción contenía un compuesto puro de tipo flavonoide, específicamente aquel conocido como isoquercetina (IV), el cual ha sido reportado en el género *Galium*, y que se encuentra distribuido ampliamente en diversas especies vegetales con usos en la medicina tradicional⁷⁶.

El espectro de ¹³C de la isoquercetina mostró 21 señales, 15 de las cuales pueden asociarse a la aglicona (quercetina), de las cuales la gran mayoría se encuentra en la región olefínica, y las señales restantes se pueden relacionar con la β-glucosa.

El espectro de hidrógeno (**Figura 42**) de esta fracción mostró tres protones en la región de hidrógenos aromáticos que se disponen en un patrón típico para la sustitución del anillo bencénico en las posiciones 1, 3, 4. La señal en δ 7.69 apareció como un singulete por lo que se puede asignar al protón en la posición 2', mientras que las señales en δ 6.89 y δ 7.56 aparecieron como dobles con una constante de acoplamiento de 8.41 y 8.13 Hz que puede atribuirse a su acoplamiento *orto*, asignando de esta manera su posición en 5' y 6', respectivamente. El experimento HMQC (Apéndice A-4) mostró los carbonos correspondientes a estos protones en δ 116.9 (C-2'), δ 115.5 (C-5') y δ 122.4 (C-6').

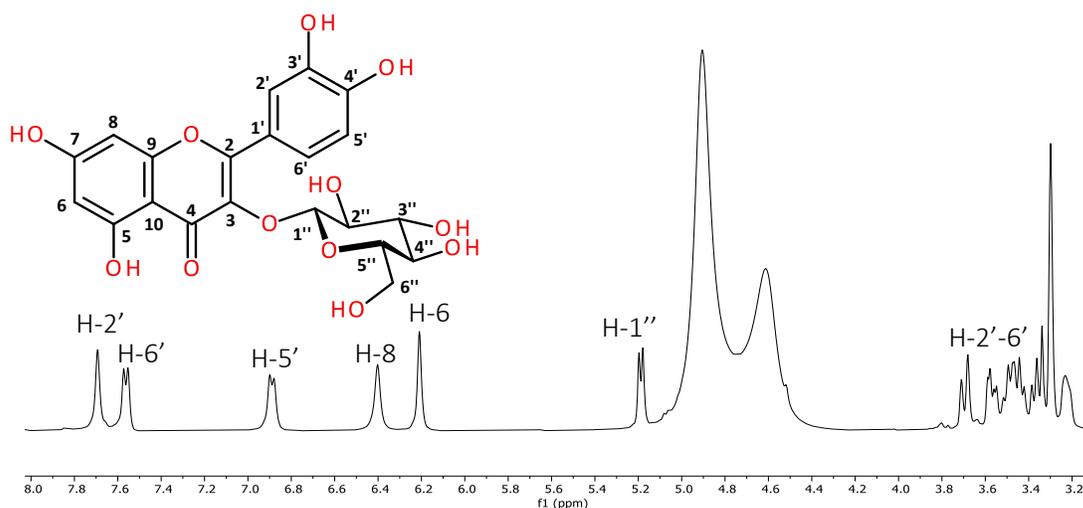


Figura 42. Espectro de ¹H de la isoquercetina (IV) en MeOH-*d*₄ (400 MHz)

Los protones H-2' y H-6' mostraron correlaciones con los carbonos cuaternarios del anillo aromático (C-1', C-3' y C-4'), a su vez que se observó su correlación con el carbono en δ 157.7 (C-2). En el espectro de RMN-¹H también se observaron dos señales simples en δ 6.21 (H-6) y δ 6.40 (H-8), mostrando la primera señal correlaciones heteronucleares en el experimento HMBC (**Figura 43**) con los carbonos en δ 94.3 (C-8), δ 104.9 (C-10), δ 162.1 (C-5) y δ 165.2 (C-7), mientras que la señal de H-8 mostró correlaciones con los carbonos C-6 (δ 99.4), C-10, C-2 y C-7. Todas estas correlaciones en conjunto con los desplazamientos químicos observados en el espectro DEPTQ (**Figura 44**) permitieron discernir la estructura tipo flavonol para la molécula, en específico aquella para el flavonoide conocido como quercetina³¹.

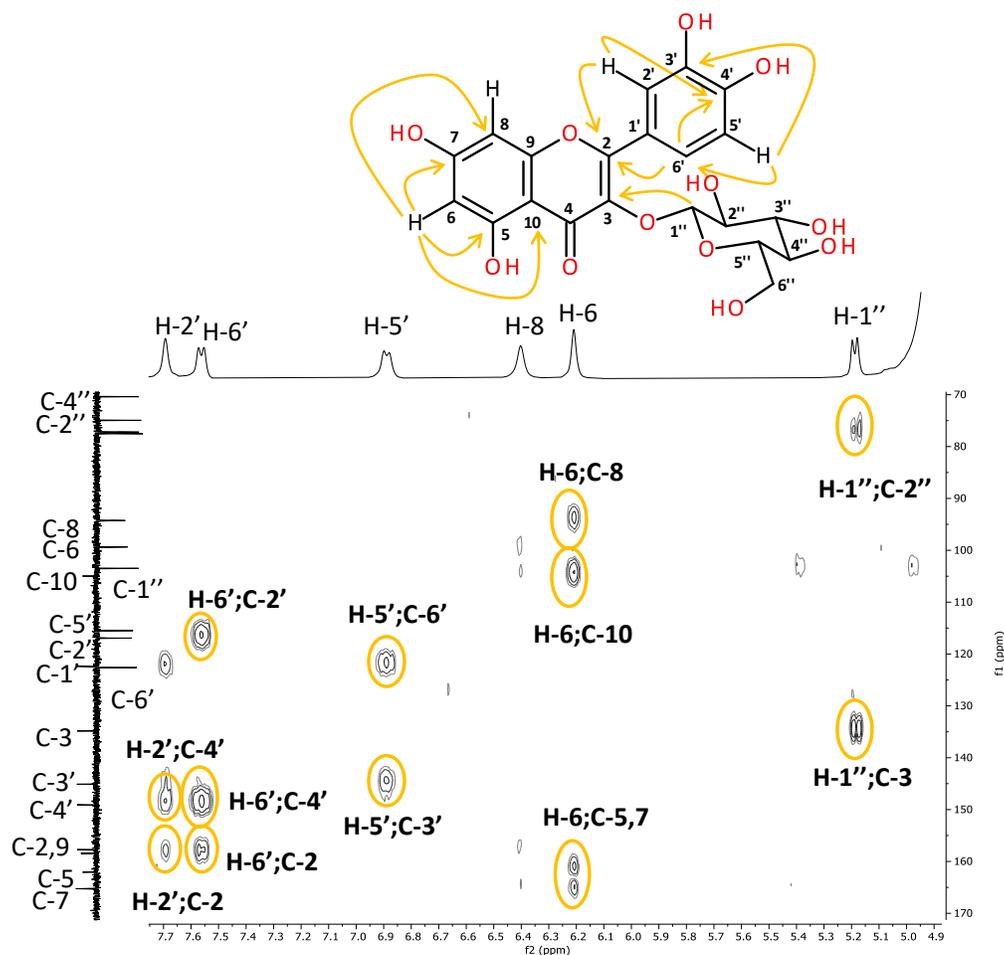


Figura 43. Sección del espectro HMBC de IV y sus correlaciones clave

El protón anomérico que aparece en δ 5.19 (d, $^3J_{H-1',2'} = 7.28$ Hz) mostró una correlación con el carbono en δ 134.8 (C-3), estableciendo la posición de la sustitución del monosacárido en la molécula. La constante de acoplamiento para la señal del protón anomérico permitió conocer la identidad del monosacárido en cuestión, tratándose de la β -glucosa. Las señales correspondientes a la región δ 3.00-3.80 se pueden asociar a esta porción de la molécula, sin embargo, se encuentran solapadas.

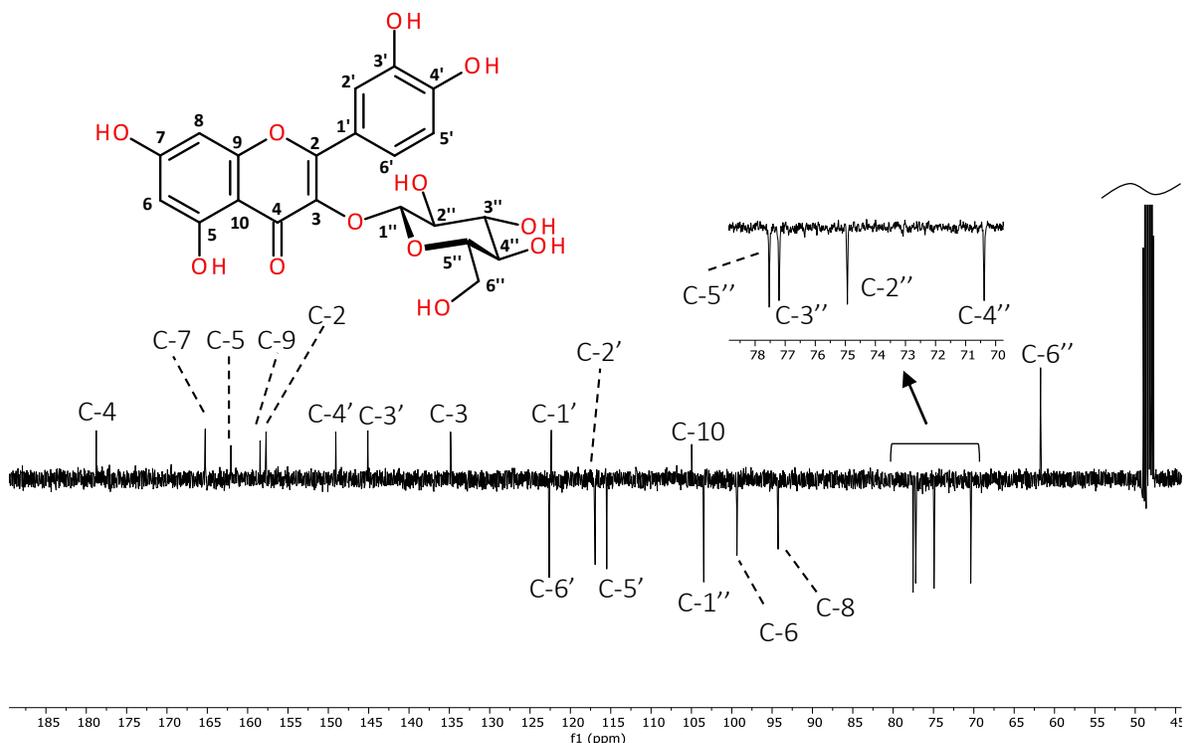


Figura 44. Espectro DEPTQ de la isoquercetina (IV) en MeOH- d_4 (100 MHz)

Los beneficios a la salud que se asocian a los flavonoides como la isoquercetina han sido relacionados principalmente con su potencial antioxidante y actividad antiinflamatoria, además de estas dos, las actividades cardioprotectoras, antialérgicas, antidiabéticas y neurofarmacológicas han sido el foco de diversos estudios con resultados positivos. Debido a su potencial como aditivo alimenticio se recomienda una mayor investigación en cuanto a la toxicología de la isoquercetina⁷⁷. La actividad antiinflamatoria reportada para fracciones polares de *G. mexicanum* también puede asociarse a este tipo de compuestos polifenólicos.

Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto IV (MeOH-*d*₄)

Posición	Desplazamientos δ (ppm)			Correlaciones
	DEPTQ	¹³ C	¹ H (mult., <i>J</i> (Hz))	HMBC (H - C)
2	C	157.7	-	-
3	C	134.8	-	-
4	C	178.7	-	-
5	C	162.1	-	-
6	CH	99.4	6.21 (s)	94.3, 104.9, 162.1, 165.2
7	C	165.2	-	-
8	CH	94.3	6.40 (s)	-
9	C	158.5	-	-
10	C	104.9	-	-
1'	C	122.3	-	-
2'	CH	116.9	7.69 (s)	122.3, 122.6, 149.1, 157.7
3'	C	145.1	-	-
4'	C	149.1	-	-
5'	CH	115.5	6.89 (d, 8.41)	122.3, 122.6, 145.1
6'	CH	122.6	7.56 (d, 8.13)	116.9, 149.1, 157.7
1''	CH	103.5	5.19 (d, 7.28)	77.5, 134.8
2''	CH	74.9	3.46 (m)	103.5
3''	CH	77.2	3.21 (m)	-
4''	CH	70.4	3.36 (m)	61.7
5''	CH	77.5	3.41 (m)	-
6''	CH ₂	61.7	3.56 (dd 4.99, 12.04) 3.69 (d, 11.9)	70.4

s: señal simple, d: señal doble, dd: señal doble de dobles, m: señal múltiple

7.2.5. Elucidación de la fracción M3Me 65-74

Esta fracción (88.6 mg) corresponde a una mancha con un R_f de 0.3 en el sistema MeOH-H₂O 1:1 (el cual es el mismo que la fracción FM1b), sin embargo, al observar el cromatofolio bajo luz UV (onda corta 254 nm) se observa que esta mancha tiene una mayor intensidad en la parte superior de la misma, por lo que se decidió eluir nuevamente esta placa en el mismo sistema de disolventes (cuatro veces en total), observándose la separación de dos manchas. El análisis de los datos espectroscópicos mostró que esta fracción se trataba de una mezcla de dos flavonoides; el compuesto **IV** descrito en la sección previa, y la rutina (**V**), esta última siendo reportada en género *Galium* con anterioridad³¹. Estos dos compuestos comparten la misma aglicona (quercetina), lo que puede explicar que su R_f sea el mismo en la TLC C18, mientras que se diferencian debido a que la rutina cuenta con un sacárido extra unido a la glucosa. Debido a que el compuesto **IV** se elucidó previamente, el análisis de los datos de la mezcla se facilitó para poder encontrar las señales y correlaciones del compuesto **V**.

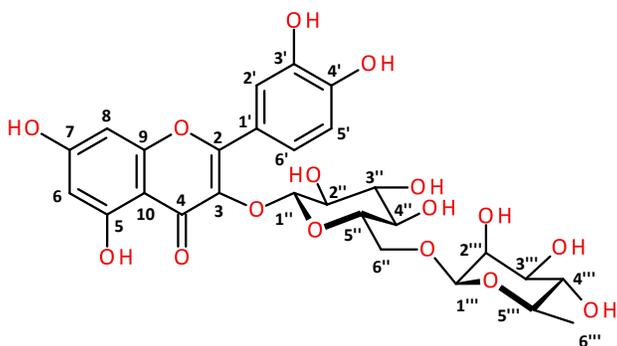


Figura 45. Estructura de la rutina (**V**)

El espectro de hidrógeno (**Figura 46**) de la mezcla estableció la presencia de tres carbonos anoméricos en la mezcla de flavonoides, el protón en δ 5.20 que puede asociarse a la β -glucosa presente en **IV**, mientras que las señales en δ 5.07 y δ 4.49 se pueden asociar con la β -glucosa y la α -ramnosa que contiene el compuesto **V**. Esta afirmación se puede corroborar con ayuda de la integral para cada pico de estos protones, asignando el valor de 1.0 a la señal en δ 5.20, los otros dos protones integran para 0.75 y 0.82, estableciendo así mismo una proporción aproximada de la mezcla isoquercetina:rutina. La señal en 1.09 (d,

$^3J_{H-6''',5'''} = 6.15 \text{ Hz}$) por su parte integra para 2.1, valor que concuerda para un metilo con la proporción descrita, asignando este mismo a la posición 6''' en la ramnosa.

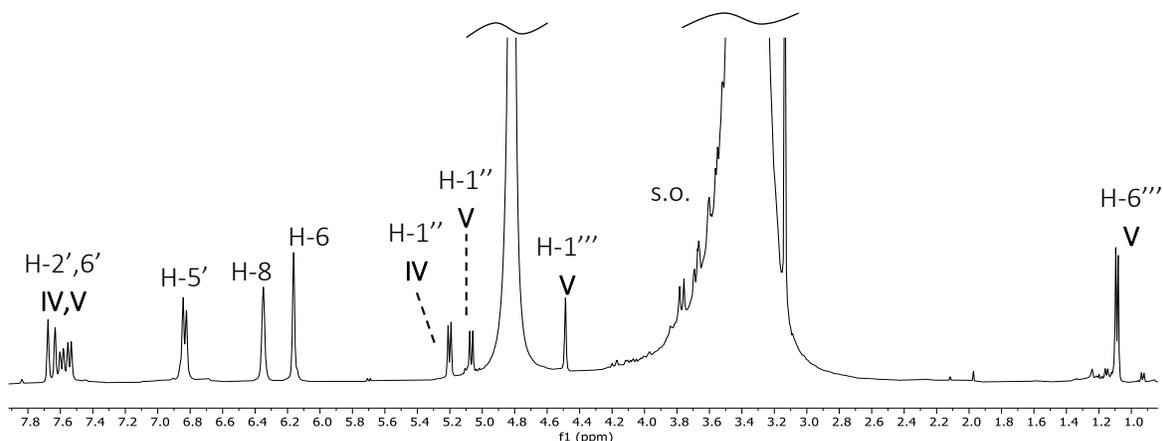


Figura 46. Espectro de ^1H de la mezcla isoquercetina-rutina en $\text{MeOH-}d_4$ (400 MHz)
*s.o. señales ocultas

En el espectro de protón también se observaron las señales de los protones H-6 y H-8 solapadas para ambos compuestos en δ 6.16 y δ 6.35, de las cuales se pudieron observar sus correlaciones con los correspondientes carbonos en el experimento HSQC, y es que en el espectro DEPTQ (Apéndice A-5) se pudieron observar dos señales de carbono (cuya diferencia es $< 1 \text{ ppm}$) para cada protón, corroborando la presencia de los dos compuestos, estableciendo su similitud estructural ya que existen pocas diferencias en los desplazamientos químicos relacionados a la aglicona de la molécula. La señal en δ 6.83 se puede asociar al protón en la posición 5', el cual nuevamente apareció solapado para ambos compuestos. Las señales de los protones H-2' y H-6' son distinguibles para cada compuesto en la región de δ 7.52-7.68, diferencia que podría ser explicada por los efectos a través el espacio que inducen los diferentes azúcares sobre estos protones. Las señales de los protones de los azúcares de los compuestos se encuentran ocultas debido al disolvente.

Por otra parte, el espectro de carbono revela señales con desplazamientos químicos similares a los descritos para la isoquercetina, apareciendo cada señal como si de un doblete se tratara, sin embargo, algunas señales no cumplen esta condición ya que se diferencian entre cada molécula. Este es el caso del carbono en δ 16.5 que puede ser asociado con la posición 6''' perteneciente a la ramnosa, así como del carbono en δ 68.3 cuyo desplazamiento puede ser asociado a la posición 5''', y el carbono en δ 61.2 cuyo desplazamiento es típico para el C-6'' de la glucosa y corresponde a la molécula de isoquercetina, y su análogo C-6'' en la molécula de rutina se encuentra desplazado hacia frecuencias más altas (δ 67.1) debido a la diferencia estructural que supone el hecho de que la ramnosa esté unida en esta posición a la glucosa.

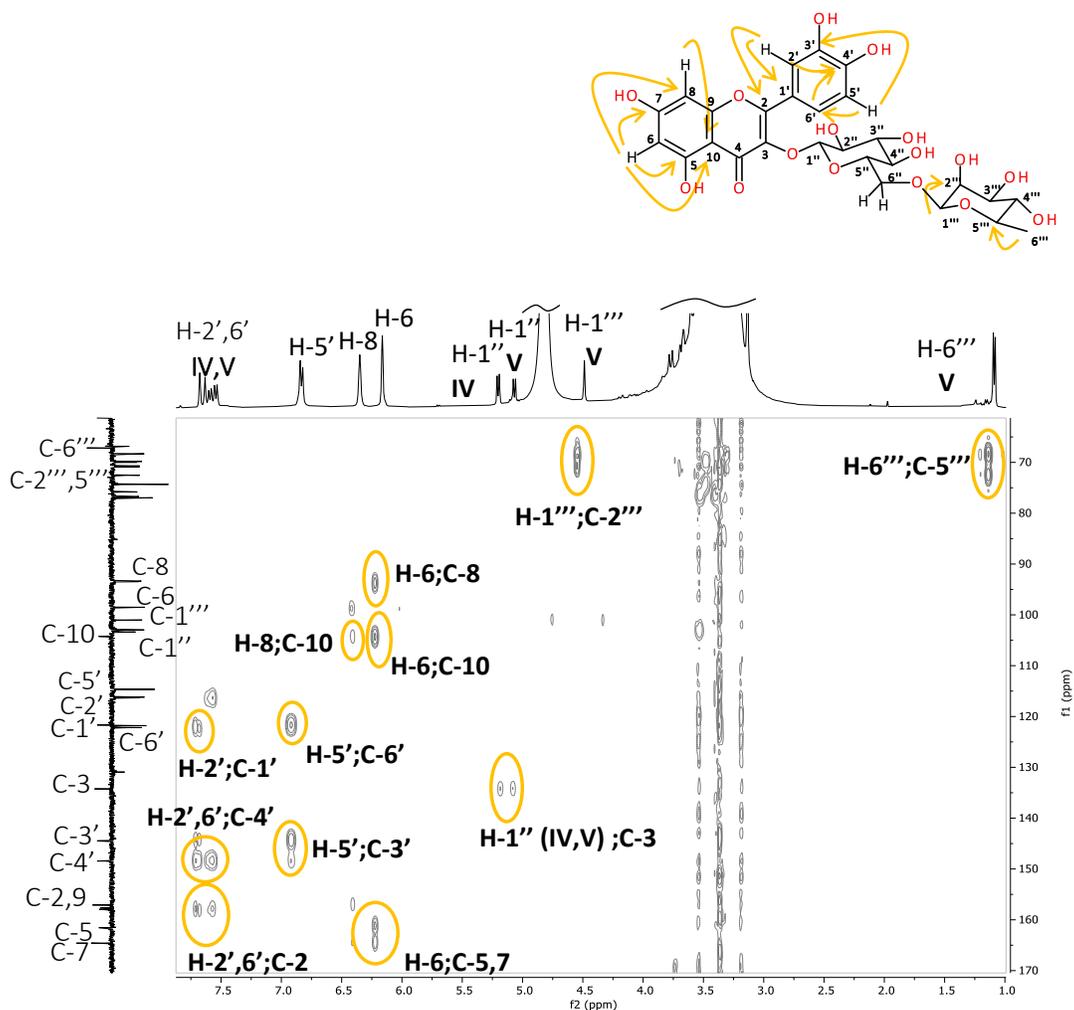


Figura 47. Espectro HMBC de la mezcla de IV y V y sus correlaciones clave

Con el experimento HMBC (**Figura 47**) se pudo observar la correlación de los protones anoméricos de la glucosa con la señal de C-3, estableciendo la posición de la sustitución de los azúcares con respecto a la aglicona de la molécula. El protón anomérico de la ramnosa muestra correlación con el carbono en $\delta 68.3$, asociado con la posición C-6'' de la glucosa de la rutina.

La rutina ha sido relevante dentro del estudio de los flavonoides debido a su amplia distribución en fuentes vegetales, entre las actividades biológicas para esta molécula se pueden destacar la actividad analgésica, antidiabética, antihipertensión, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anticancerígena, hepatoprotectora, neuroprotectora, antidepresiva, y antioxidante⁷⁸.

7.2.6. Elucidación de la fracción FM3 Ac

La fracción FM3 Ac (15 mg), proveniente de la fracción M3 75-79 una vez tratada con ayuda de una columna empacada con gel de sílice, se observó como una mancha observada en TLC con un R_f de 0.2 (sistema MeOH-H₂O 1:1). Esta fracción mostró un comportamiento similar a la fracción M3 65-74, ya que al eluir repetidamente el cromatofolio con el mismo sistema de disolventes se observa la separación de dos compuestos, los cuales han sido identificados como astragalina (**VI**) y nicotiflorina (**VII**) mediante el análisis y comparación de sus datos espectroscópicos, siendo la astragalina previamente reportada en el género *Galium*³¹, mientras que la nicotiflorina no ha sido reportada para este género.

La estructura de la aglicona que ambos compuestos tienen en común se identificó como el kaempferol, debido a que en el espectro de protón (**Figura 48**) de la mezcla se observaron los protones correspondientes a las posiciones 6 y 8 ($\delta 6.22$ y $\delta 6.41$), mientras que el patrón observado para las señales en $\delta 6.90$ (H-3',5') y $\delta 8.06$ (H-2',6') se puede atribuir a la sustitución en las posiciones 1,4 del anillo bencénico, observando de esta manera dos señales que sugieren la simetría de este mismo anillo.

La diferencia estructural entre **VI** y **VII**, se debe a que en el primero se tiene un monosacárido unido a la aglicona, mientras que en el segundo se trata de un disacárido. Esto se observó en el espectro de RMN de protón debido a la presencia tres señales en δ 5.23 (H-1'' **VI**), δ 5.13 (H-1'' **VII**) y δ 4.54 (H-1''' **VII**), integrando la señal en frecuencias más altas para un valor de 1.0, mientras que las otras dos lo hacen para un aproximado de 0.7, estableciendo la proporción de la mezcla. La correlación en el experimento HMBC (**Figura 49**) de los protones anoméricos de las dos glucosas con el C-3 (δ 134.1, 134.2) de la aglicona sugirió la sustitución en esta misma posición (C-3) para ambas moléculas.

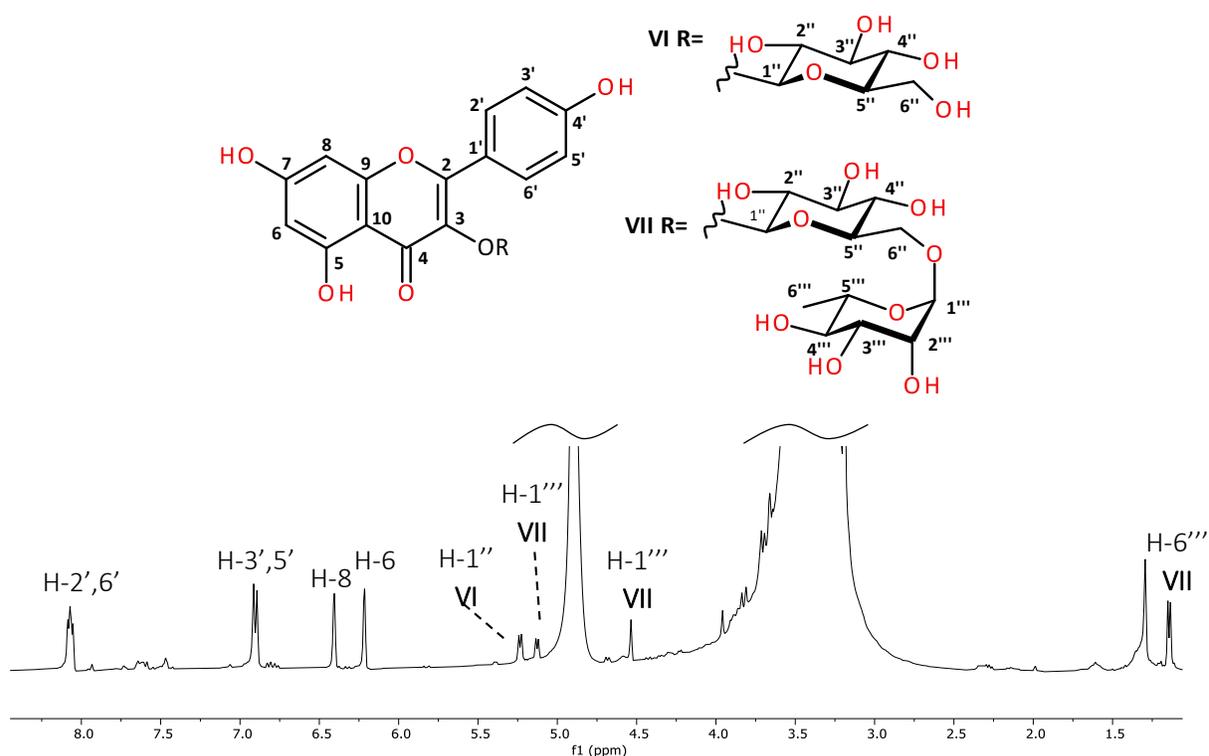


Figura 48. Espectro de ¹H de la mezcla astragalina (**VI**) – nicotiflorina (**VII**) en MeOH-d₄ (400 MHz)

Entre las actividades biológicas asociadas a la astragalina destacan la actividad antiinflamatoria, antioxidante, neuroprotectora, cardioprotectora, antidiabética, antiobesidad y anticancerígena⁷⁹.

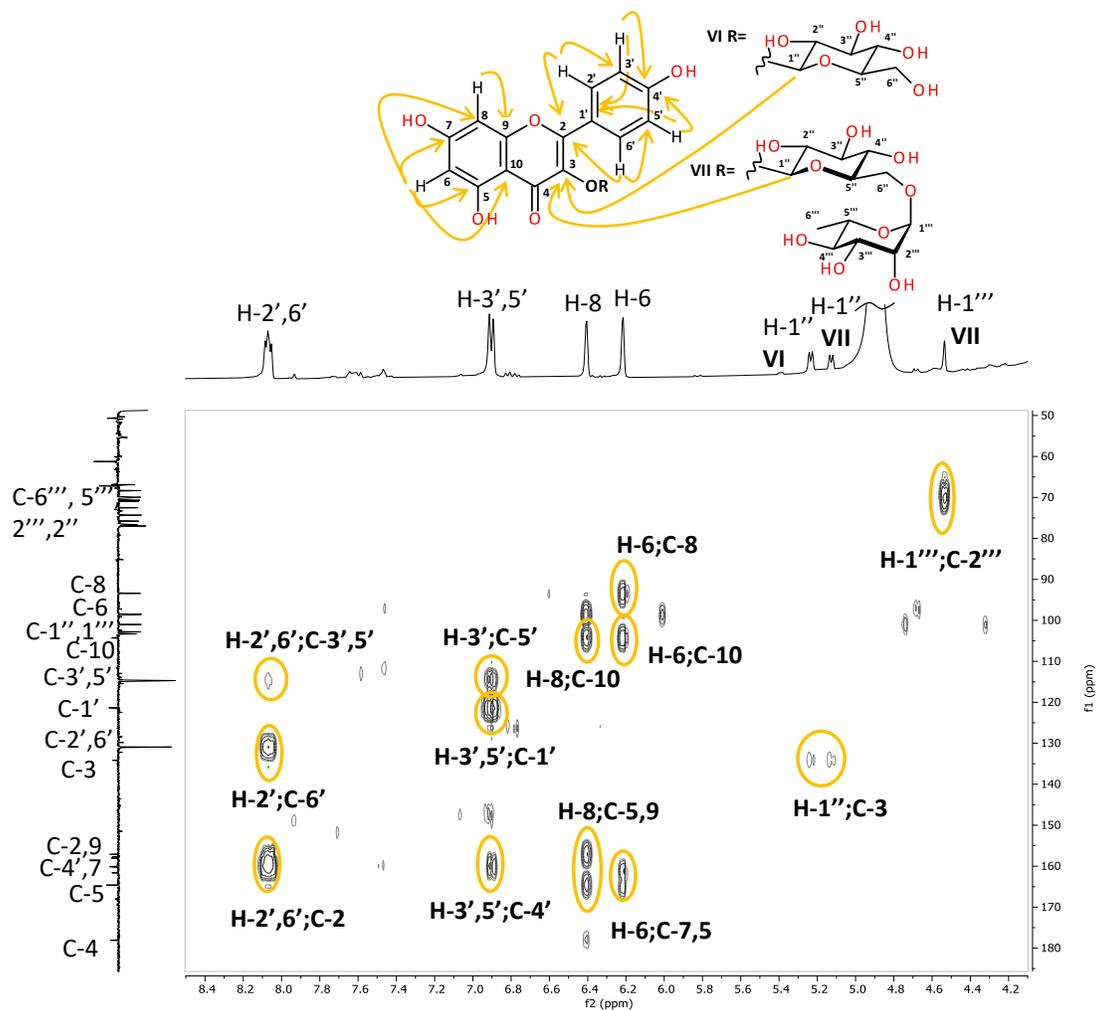


Figura 49. Sección del espectro HMBC de VI y VII y sus correlaciones clave

Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN de los compuestos **VI** y **VII** (MeOH- d_4)

Posición	Desplazamientos δ (ppm)					
	Astragalina			Nicotiflorina		
	DEPTQ	^{13}C	^1H (mult., J (Hz))	DEPTQ	^{13}C	^1H (mult., J (Hz))
2	C	157.1	-	C	157.1	-
3	C	134.2	-	C	134.1	-
4	C	178.1	-	C	178.0	-
5	C	161.6	-	C	161.5	-
6	CH	98.6	6.22 (d, 2.51)	CH	98.5	6.22 (d, 2.51)
7	C	164.6	---	C	164.6	-
8	CH	93.6	6.41 (d, 2.58)	CH	93.4	6.41 (d, 2.58)
9	C	158.0	-	C	157.7	-
10	C	104.3	-	C	104.3	-
1'	C	121.4	-	C	121.3	-
2'	CH	131.0	8.07 (d, 8.45)	CH	130.9	8.07(d, 8.45)
3'	CH	114.8	6.90 (d, 8.35)	CH	114.6	6.90 (d, 8.35)
4'	C	160.2	-	C	160.1	-
5'	CH	114.8	6.90 (d, 8.35)	CH	114.6	6.90 (d, 8.35)
6'	CH	131.0	8.07 (d, 8.45)	CH	130.9	8.07 (d, 8.45)
1''	CH	102.8	5.23 (d, 6.81)	CH	103.3	5.13 (d, 6.57)
2''	CH	74.4	-	CH	74.3	-
3''	CH	76.7	-	CH	76.6	-
4''	CH	70.0	-	CH	69.9	-
5''	CH	77.0	-	CH	75.8	-
6''	CH ₂	61.2	-	CH ₂	67.2	-
1'''	-	-	-	CH	101.0	4.54 (d, ancha)
2'''	-	-	-	CH	70.7	-
3'''	-	-	-	CH	71.0	-
4'''	-	-	-	CH	72.5	-
5'''	-	-	-	CH	68.3	-
6'''	-	-	-	CH ₃	16.5	1.14 (d, 6.17)

d: señal doble

7.2.7. Elucidación de la fracción A

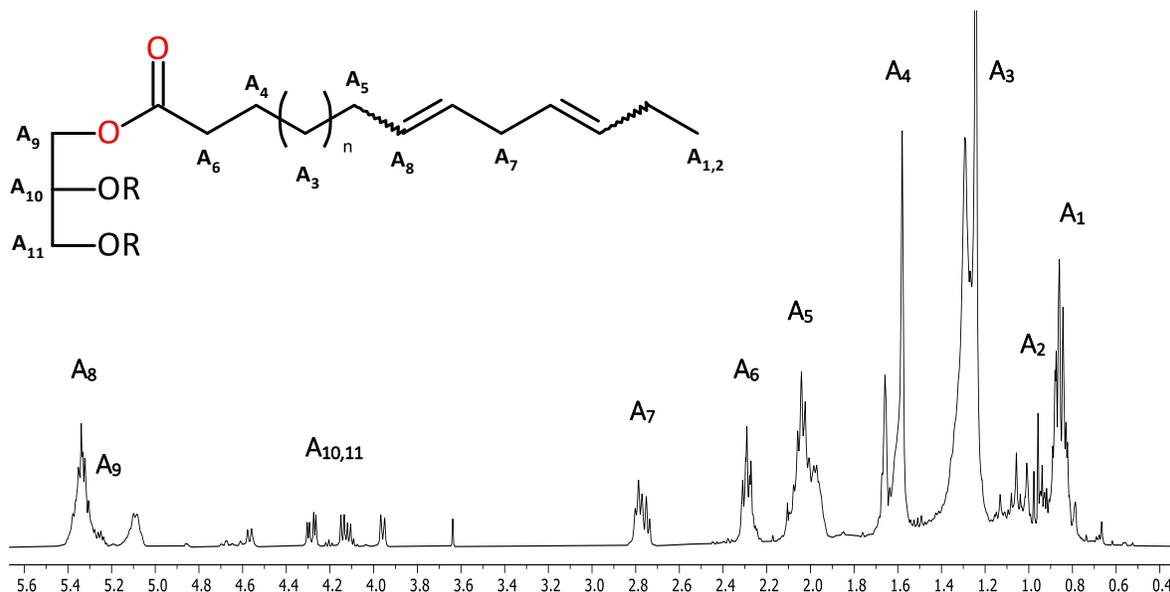


Figura 50. Espectro de ^1H de la fracción A en CDCl_3 (400 MHz)

El análisis del espectro de RMN de hidrógeno (**Figura 50**) de esta fracción mostró señales características de triacilgliceroles, asignando las señales en δ 0.85 y δ 0.96 a metilos terminales de los ácidos grasos, siendo la segunda señal característica del metilo terminal del ácido linoleico. Las señales en la región de δ 1.20-1.32 se pueden asignar a metilenos de la cadena alifática de los grupos acilo, mientras que la señal en δ 5.34 corrobora la presencia de insaturaciones dentro de la cadena de ácido graso. La señal observada en δ 2.03 corresponde a protones alílicos de la cadena, mientras que la señal en δ 2.77 corresponde a protones doblemente alílicos. Los protones α y β adyacentes al carbonilo se asignaron a las señales en δ 2.29 y δ 1.59, respectivamente⁸⁰.

Las señales correspondientes a los protones del glicerol se observaron en δ 4.13, 4.28 y 5.25, mientras que los carbonos correspondientes se observaron en el espectro DEPTQ (**Figura 51**) en δ 68.9, 66.4 y 62.1, desplazamientos típicos para carbonos unidos a heteroátomos. Las señales δ 173.1 y 172.7 corroboraron la presencia de los grupos carbonilo.

Esta fracción se infirió como una mezcla de triacilgliceroles de ácidos grasos insaturados y otro compuesto minoritario de naturaleza triterpénica debido al gran número de señales observadas en el espectro de ^{13}C en la región alifática.

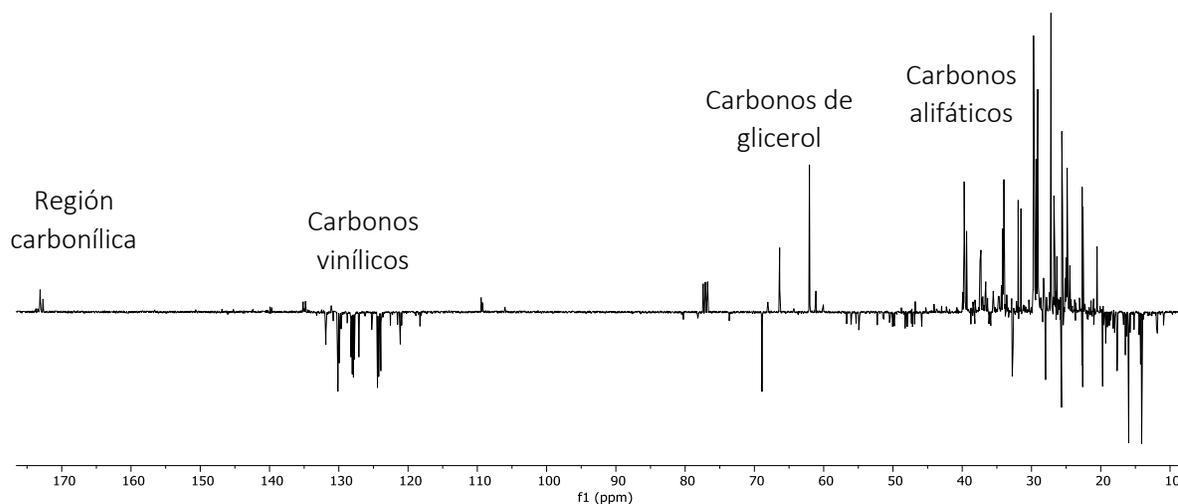


Figura 51. Espectro DEPTQ de la fracción A en CDCl_3 (100 MHz)

7.2.8. Elucidación de la fracción D

Este compuesto pertenece a las fracciones poco polares obtenidas de la columna de gel de sílice en la que se trató la fracción **AcDS**. De esta fracción se observaron cristales impuros que fueron lavados con MeOH, obteniendo así 15 mg de un compuesto cristalino de color blanco con R_f de 0.65 (sistema Hx-AcOEt 7:3). El análisis y la comparación de los datos espectroscópicos sugirieron la presencia del β -sitosterol (**VIII**)⁸¹.

En el espectro de hidrógeno de **VIII** (**Figura 52**) se observaron dos señales aisladas en δ 5.33 y δ 3.50, las cuales son características de los fitoesteros y corresponden a los protones H-6 y H-3, respectivamente. La región alifática del espectro mostró una gran cantidad de señales correspondientes a los metinos, metilenos y metilos de la molécula.

En el espectro DEPTQ (**Figura 53**) se observaron dos señales de carbonos vinílicos en δ 140.9 (C-5) y δ 121.9 (C-6), mientras que en δ 71.9 se observó un carbono unido a oxígeno correspondiente a la posición C-3. La asignación completa de las señales se muestra en la **Tabla 14**, la cual se realizó con ayuda de los datos reportados en la literatura para esta molécula⁸¹.

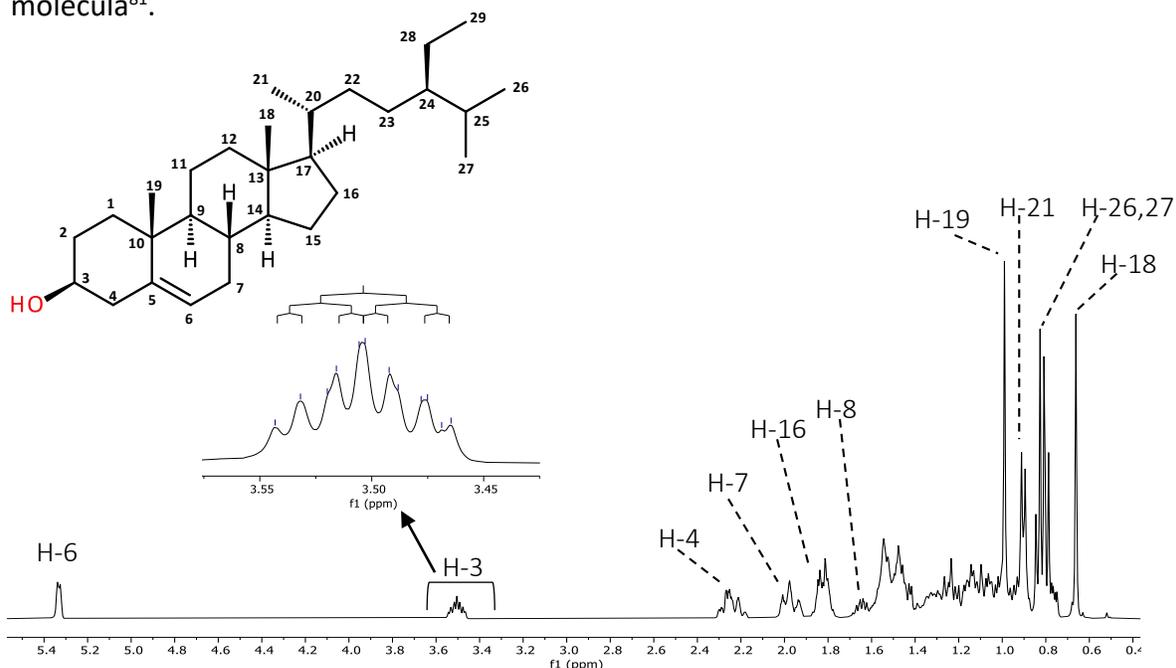


Figura 52. Espectro de ^1H de VIII en CDCl_3 (400 MHz)

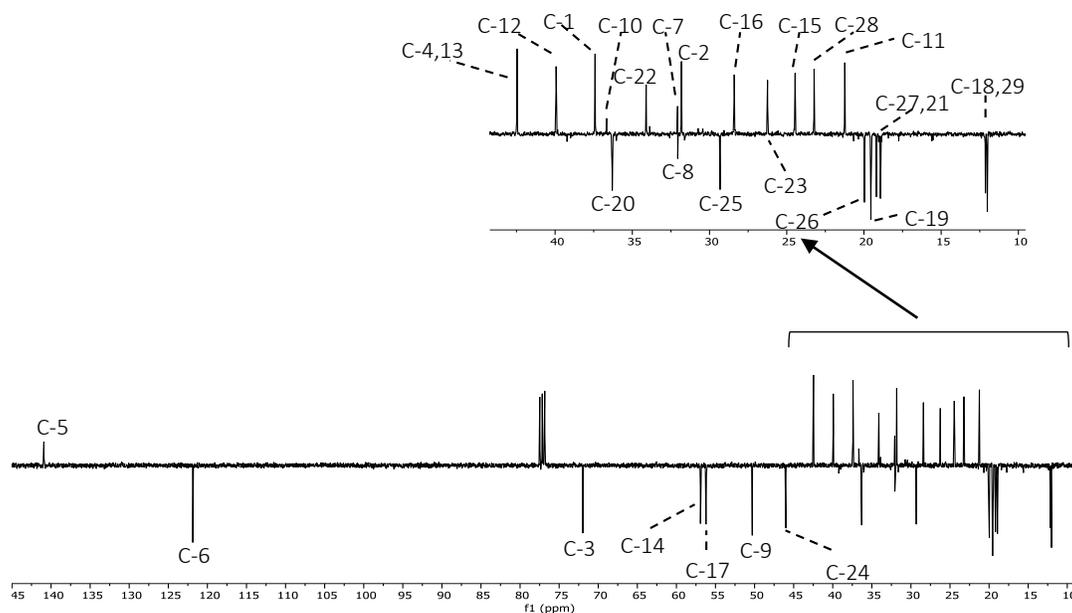


Figura 53. Espectro DEPTQ del β -sitosterol en CDCl_3 (100 MHz)

Tabla 15. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **VIII** (CDCl₃)

Posición	DEPTQ	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (mult., J (Hz))
1	CH ₂	37.4	1.46 (m)
2	CH ₂	31.8	1.53 (m)
3	CH	71.9	3.50 (ddd, 15.34, 11.00, 4.37)
4	CH ₂	42.4	2.26 (m)
5	C	140.9	---
6	CH	121.9	5.33 (dd, 1.9, 4.4)
7	CH ₂	32.1	1.97 (m)
8	CH	32.1	1.65 (m)
9	CH	50.3	1.53 (m)
10	C	36.6	---
11	CH ₂	21.2	1.46 (m)
12	CH ₂	39.9	1.46 (m)
13	C	42.4	---
14	CH	56.9	1.46 (m)
15	CH ₂	24.4	1.53 (m)
16	CH ₂	28.4	1.83 (m)
17	CH	56.2	1.46 (m)
18	CH ₃	12.0	0.66 (s)
19	CH ₃	19.5	0.99 (s)
20	CH	36.3	1.55 (m)
21	CH ₃	18.9	0.91 (d, 6.47)
22	CH ₂	34.1	0.94 (m)
23	CH ₂	26.2	1.14 (m)
24	CH	46.0	1.31 (m)
25	CH	29.3	1.53 (m)
26	CH ₃	20.0	0.81
27	CH ₃	19.2	0.81
28	CH ₂	23.2	1.06 (m)
29	CH ₃	12.1	0.81

s: señal simple, d: señal doble, m: señal múltiple

Entre las actividades biológicas que han sido reportadas para esta molécula se encuentran la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerígena, inmunomoduladora, antihiperlipidémica y antiabiabética⁸².

7.2.9. Elucidación de la fracción AB-AD

Esta fracción fue recuperada después de la cromatografía en fase normal de la fracción **AcDS**, la cual recibió un tratamiento especial para su purificación obteniendo 6 mg de este compuesto, el cual tiene un R_f de 0.375 (Sistema 7:3 Hx-AcOEt) y fue identificado como luteína (**IX**) gracias a su comparación con los datos reportados en la literatura^{83,84}.

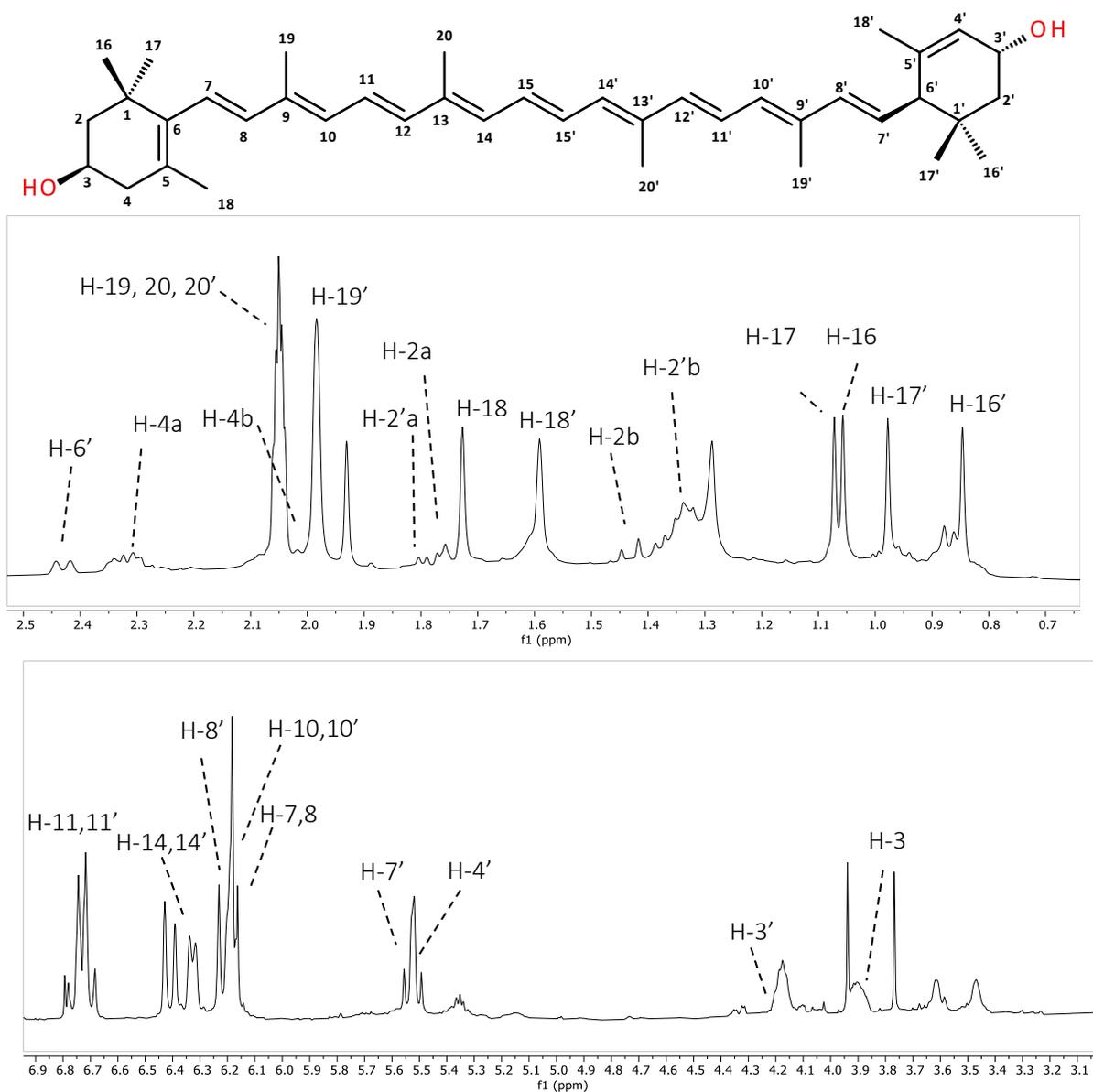


Figura 54. Trazos del espectro de ¹H de IX en acetona-*d*₆ (400 MHz)

En la **Figura 57** se pueden observar ampliaciones del espectro DPETQ del compuesto **IX**, resaltando a primera vista un número elevado de señales, lo que se tomó como referencia para la elucidación de un compuesto tetraterpénico. En la región alifática del espectro (δ 10.0-50.0) se observaron un total de quince señales, tres de las cuales corresponden a metilenos y dos a carbonos cuaternarios, mientras que las señales restantes se pueden atribuir a metilos debido a la naturaleza de la molécula. En la región de carbonos unidos a heteroátomos se observaron tres señales, mientras que en la región de carbonos olefínicos se pudieron apreciar un total de veintiuna señales, seis de las cuales pertenecen a carbonos cuaternarios y las demás a metinos, cabe resaltar que una de estas señales tiene el doble de tamaño que las demás, debido probablemente a el solapamiento de dos señales químicamente similares.

En la **Figura 54** se pueden observar ampliaciones del espectro de protón del compuesto **IX**, la región de protones olefínicos se encuentra relativamente saturada por lo que es difícil observar cada señal por separado, la región alifática por su parte mostró los metilos observados en el espectro de ^{13}C , los metilenos se encuentran solapados con otras señales por lo que su identificación resultó más fácil con ayuda del espectro HSQC (Apéndice A-7), los hidrógenos de carbonos unidos a heteroátomos aparecen en la región de δ 3.7-4.3, observándose dos señales atribuibles a dos diferentes metinos, mientras que otras dos señales simples pueden atribuirse a los protones de los grupos hidroxilo.

La señal que apareció en δ 2.43 (H-6') en el espectro de protón fue irradiada en un experimento TOCSY 1D (Apéndice A-7), con el cual se identificó el sistema de espines al que pertenecía, atribuyéndose al punto de unión del anillo β del compuesto con la cadena hidrocarbonada típica de los carotenoides, la señal en δ 55.9 se identificó como C-6' con ayuda del experimento HSQC. El experimento TOCSY 1D, así como el COSY 2D (**Figura 55**), mostraron la correlación de H-6' con la señal en δ 5.54, identificando a H-7', cuyo carbono se encontró en δ 130.1. Este último protón apareció como una señal doble ($^3J_{\text{H-7}',8'} = 15.34$ Hz) solapada con el protón identificado como 4', el cual apareció a su vez como una señal doble ($^3J_{\text{H-4}',3'} = 10.0$ Hz).

La constante de acoplamiento observada para H-7' se puede atribuir al acoplamiento con el protón H-8'a través de un doble enlace con estereoquímica *E*. La correlación de estos últimos protones se puede observar en el experimento COSY 2D, así como en experimento TOCSY 1D para este sistema de espines. La identidad del anillo β se desveló con ayuda de esta información y la proporcionada por el espectro HMBC (Figura 56), del cual se pudieron observar las correlaciones heteronucleares entre el C-1' (δ 34.7) con sus correspondientes metilos geminales H-16' y H-17' (δ 0.85 y 0.98, respectivamente), así como su correlación con el metileno H-2' (δ 1.34,1.78). También se observó la correlación del protón H-18' con los carbonos C-4' (δ 126.7), C-5' (δ 137.3) y C-6'. Otra correlación importante para la elucidación de este anillo es la correspondiente al metileno H-2' y el protón H-3' (δ 4.18), la cual se puede observar en el experimento COSY 2D.

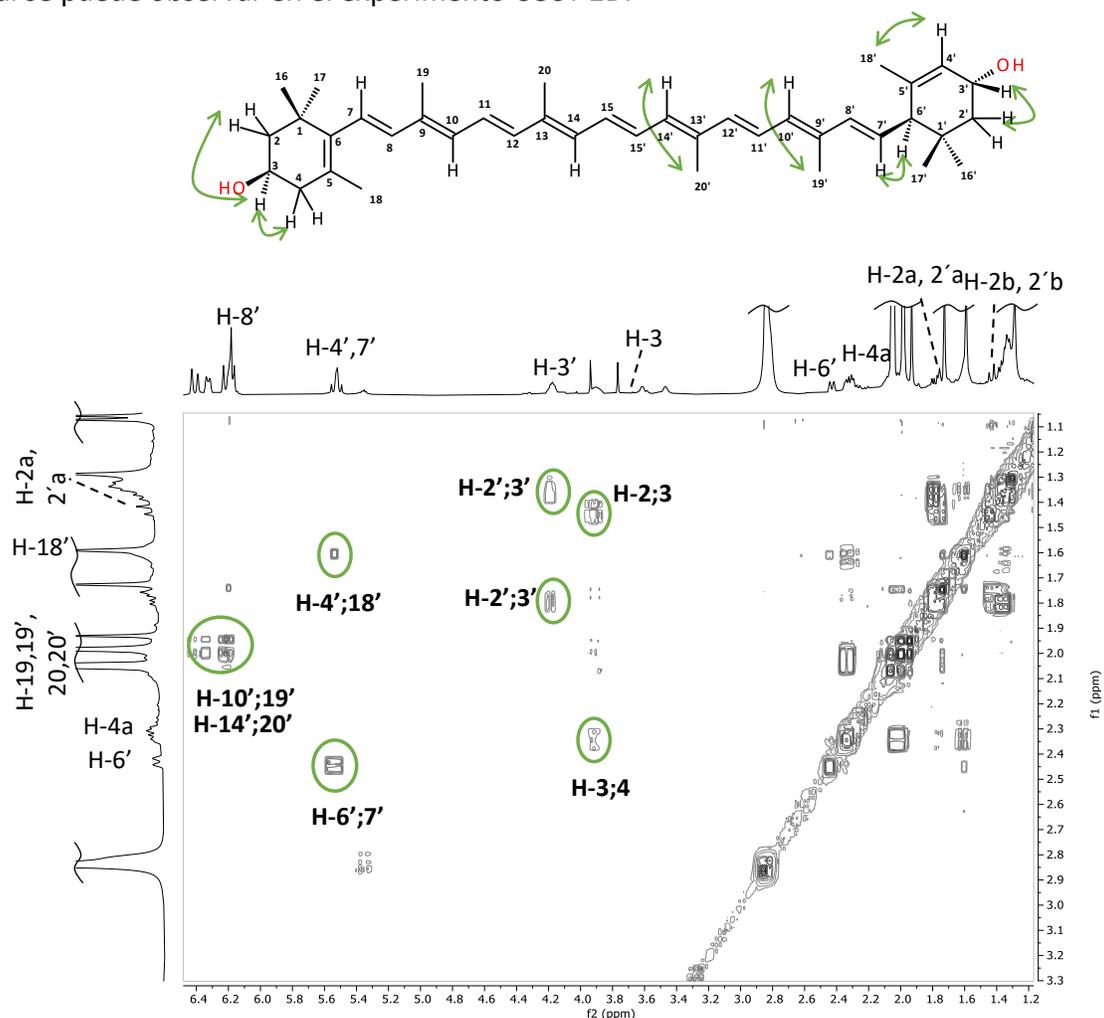


Figura 55. Sección del espectro COSY 2D de IX y sus correlaciones clave

La elucidación del anillo α de la molécula se realizó de la misma manera que con el anillo β , tomando en cuenta las correlaciones clave (hetero y homonucleares), entre las cuales se pueden resaltar las siguientes. La correlación homonuclear entre H-3 (δ 3.90) y sus metilenos adyacentes H-2 (1.42, 1.74) y H-4 (2.01, 2.32), las correlaciones heteronucleares de los metilos geminales H-16 (δ 1.06) y H-17 (δ 1.07) con los carbonos C-1 (δ 37.6), C-2 (δ 49.6) y C-6 (δ 137.2). El metilo H-18 también mostró correlaciones heteronucleares con los carbonos C-1, C-4 (δ 43.6), C-6 y C-7 (δ 127.1).

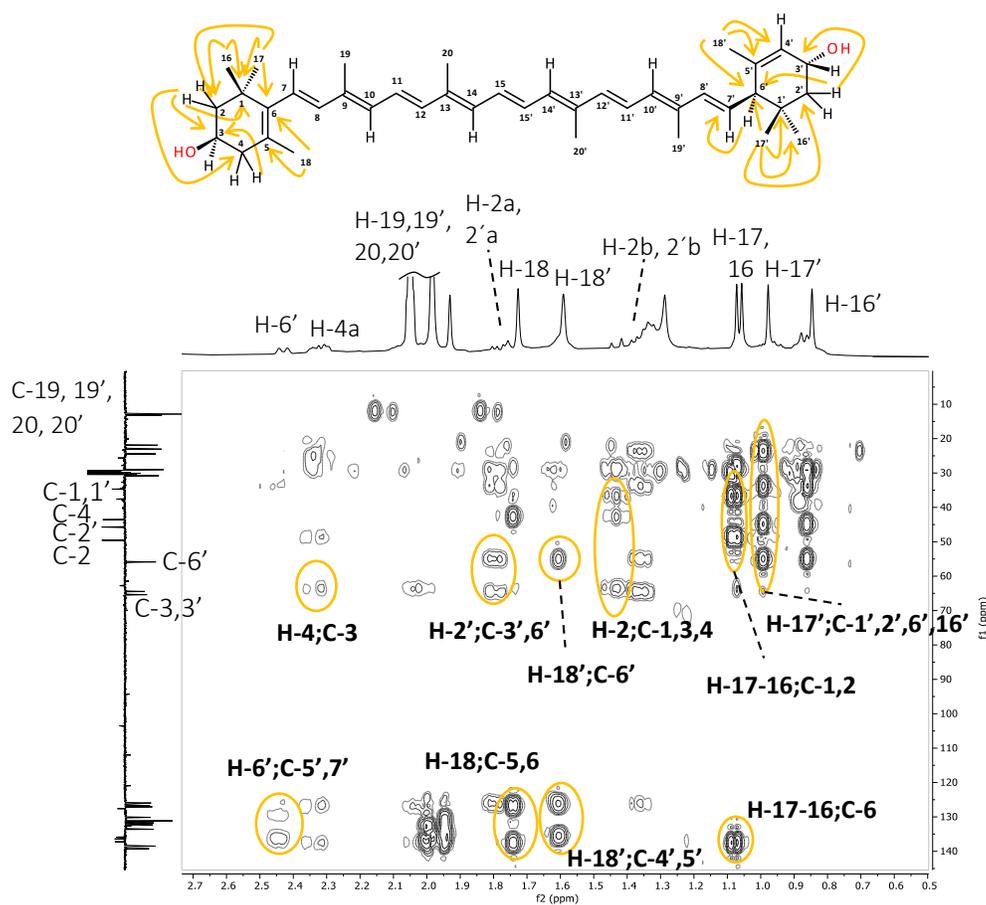


Figura 56. Sección del espectro HMBC de IX y sus correlaciones clave

La cadena insaturada de la molécula y sus metilos correspondientes fueron identificados con ayuda de los experimentos HSQC, HMBC y con los datos reportados en la literatura⁸⁴, sin embargo, la estereoquímica precisa de la molécula no se determinó debido al

solapamiento de las señales en el espectro de protón, al no obtener todas las constantes de acoplamiento de la cadena insaturada.

Tabla 16. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto IX (acetona- d_6)

Posición	Desplazamientos δ (ppm)			Correlaciones	
	DEPTQ	^{13}C	^1H (mult., J(Hz))	COSY	HMBC (H - C)
1	C	37.6	-	-	-
2	CH ₂	49.6	1.74 (m) 1.42 (m)	3.9	29.0, 37.6, 43.6, 64.4
3	CH	64.4	3.90(m)	1.42, 1.74, 2.01, 2.32	-
4	CH ₂	43.6	2.32 (m) 2.01 (m)	3.9	49.6, 64.4, 127.6, 137.2
5	C	127.6	-	-	-
6	C	137.2	-	-	-
7	CH	127.1	6.19 (m)	-	-
8	CH	138.5	6.20 (m)	-	-
9	C	135.9	-	-	-
10	CH	132.3	6.20 (m)	1.98	-
11	CH	126.0	6.72 (m)	-	-
12	CH	138.5	6.41 (d, 14.92 Hz)	-	-
13	C	136.4	-	-	-
14	CH	133.6	6.32(d, 8.63 Hz)	-	-
15	CH	131.2	6.72 (m)	-	-
16	CH ₃	29.0	1.06 (s)	-	30.8, 37.6, 49.6, 137.2
17	CH ₃	30.8	1.07 (s)	-	29.0, 37.6, 49.6, 137.2
18	CH ₃	21.9	1.73 (s)	-	37.6, 43.6, 127.6, 137.2
19	CH ₃	12.8	1.98 (s)	6.2	132.3, 135.9
20	CH ₃	12.9	1.98 (s)	-	136.4, 138.5
1'	C	34.7	-	-	-
2'	CH ₂	45.7	1.78 (m) 1.34 (m)	4.18	23.0, 30.0, 34.7, 55.9, 65.4, 126.7
3'	CH	65.4	4.18	1.78, 1.34	-
4'	CH	126.7	5.54 (d, 10.0)	1.59	-
5'	C	137.3	-	-	-
6'	CH	55.9	2.44 (d, 10.15)	5.54	130.1, 137.3
7'	CH	130.1	5.54 (d, 15.34)	6.23	-
8'	CH	139.2	6.23 (d, 15.37)	5.54	-
9'	C	135.9	-	-	-

... continuación **Tabla 16**

Posición	Desplazamientos δ (ppm)			Correlaciones	
	DEPTQ	^{13}C	^1H (mult., J(Hz))	COSY	HMBC (H - C)
10'	CH	131.7	6.20 (m)	1.98	-
11'	CH	125.9	6.72 (m)	-	-
12'	CH	138.4	6.41 (d, 14.92)	-	-
13'	C	136.4	-	-	-
14'	CH	133.5	6.32, (d, 8.63)	1.98	-
15'	CH	131.2	6.72 (m)	-	-
16'	CH ₃	24.5	0.85 (s)	-	30.0, 34.7, 45.7, 55.9
17'	CH ₃	30.0	0.98 (s)	-	24.5 34.7, 45.7, 55.9
18'	CH ₃	23.0	1.59 (s)	5.54	55.9, 126.7, 137.3
19'	CH ₃	13.2	1.93 (s)	6.2	130.1, 131.7, 135.9, 139.2
20'	CH ₃	12.9	1.98 (s)	6.32	-

s: señal simple, m: señal múltiple, d: señal doble

La luteína es un carotenoide que se encuentra en abundancia en vegetales de hojas verdes oscuras, y que funciona protegiendo del daño inducido por la luz. Sus actividades biológicas están relacionadas principalmente con la salud ocular, aunque también se ha encontrado potencial en la salud cardiovascular y de la piel. Este compuesto en su forma cristalina ha sido reconocido como un aditivo alimentario tipo GRAS (*Generally Recognized as safe*)⁸⁵.

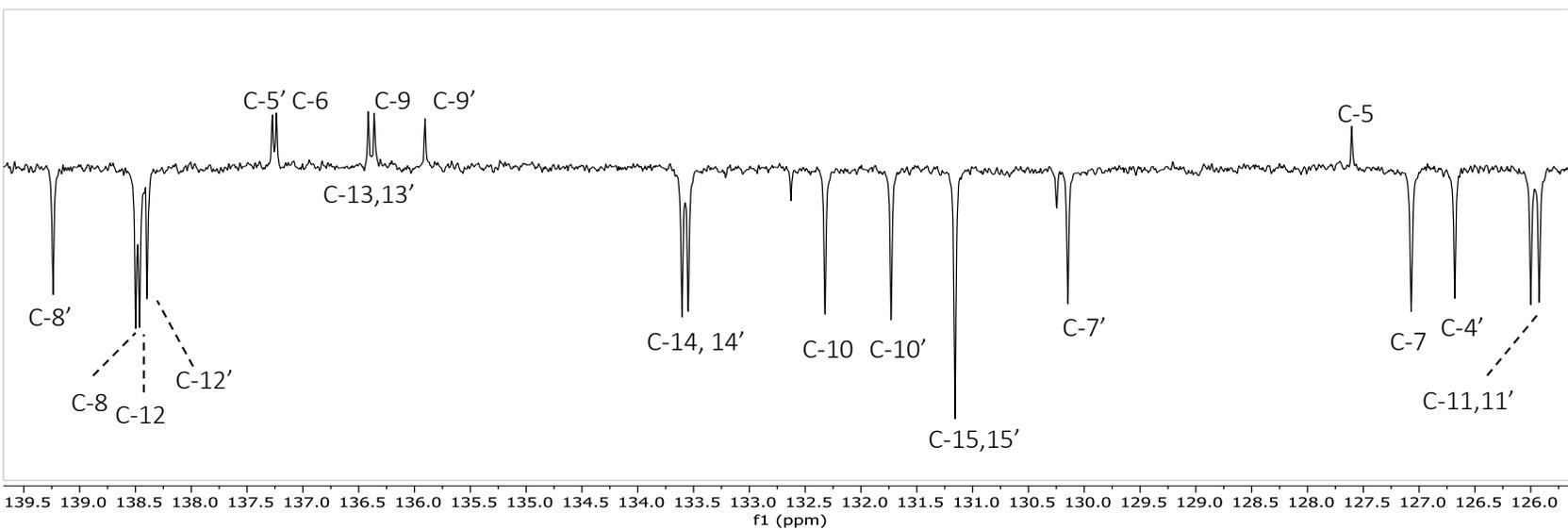
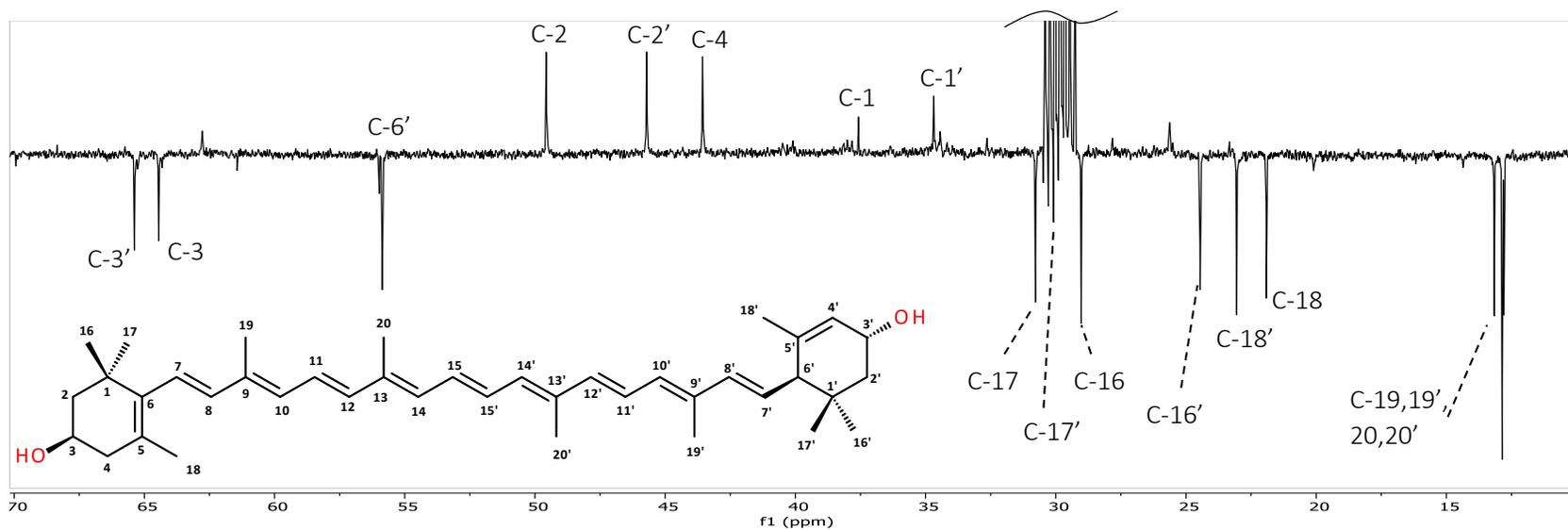


Figura 57. Espectro DEPTQ de la luteína en acetona- d_6 (100 MHz)

7.2.10. Elucidación de la fracción r-w

Este compuesto se observó en las fracciones más polares de la fracción **AcDS** con un R_f 0.375 (sistema 9:1 AcOEt-Hx) purificadas por cromatografía, obteniendo 19.5 mg del compuesto en cuestión. Los datos espectroscópicos obtenidos para este compuesto mostraron la presencia de derivado de drimano (los cuales cuentan con un esqueleto característico de biciclofarnesol y que se identificó como iresina (**X**)⁸⁶. Este estudio reporta por primera vez la presencia de este metabolito en la familia *Rubiaceae*.

En el espectro DEPTQ de **X** (**Figura 58**) se observaron un total de 15 señales correspondientes a la molécula, por lo que se puede intuir una estructura sesquiterpénica. Se observó una señal de carbono carbonílico en δ 170.0, dos señales correspondientes a carbonos vinílicos en δ 135.9 y δ 127.1 (carbono cuaternario), mientras que en la región de carbonos unidos a heteroátomos se observaron tres señales, dos correspondientes a metilenos y una a un metino. En la región alifática del espectro se observaron tres señales asociadas a metilenos, dos a carbonos cuaternarios, dos a metinos y dos más a metilos.

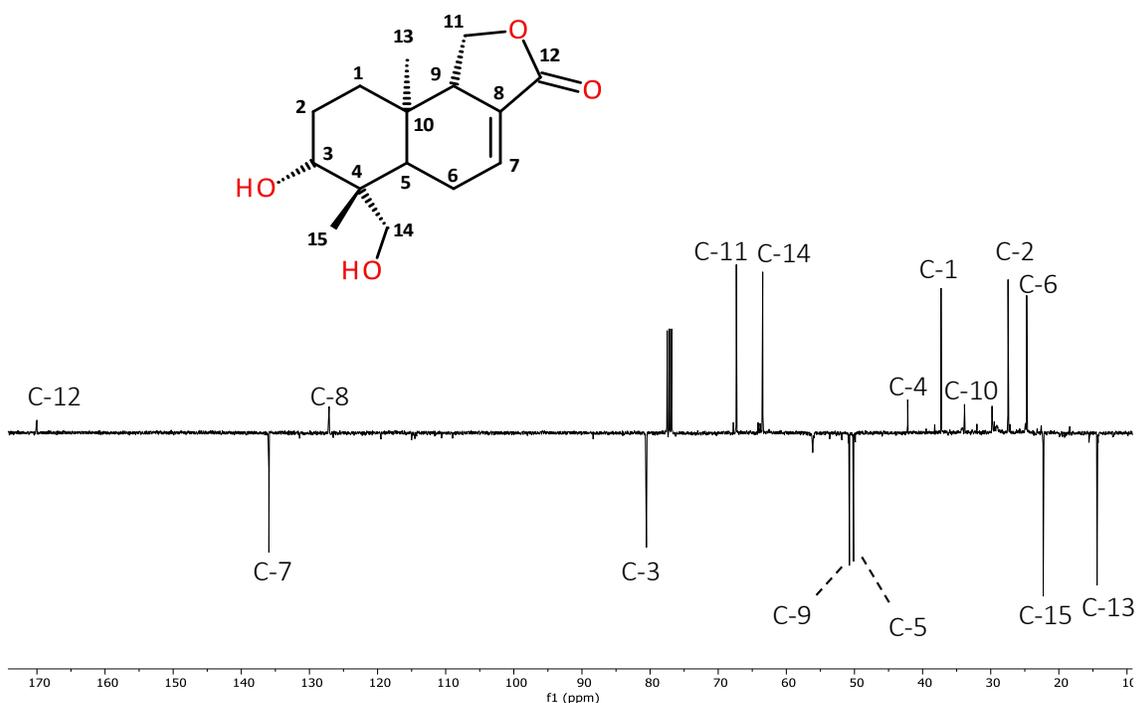


Figura 58. Espectro DEPTQ de **X** en $CDCl_3$ (100 MHz)

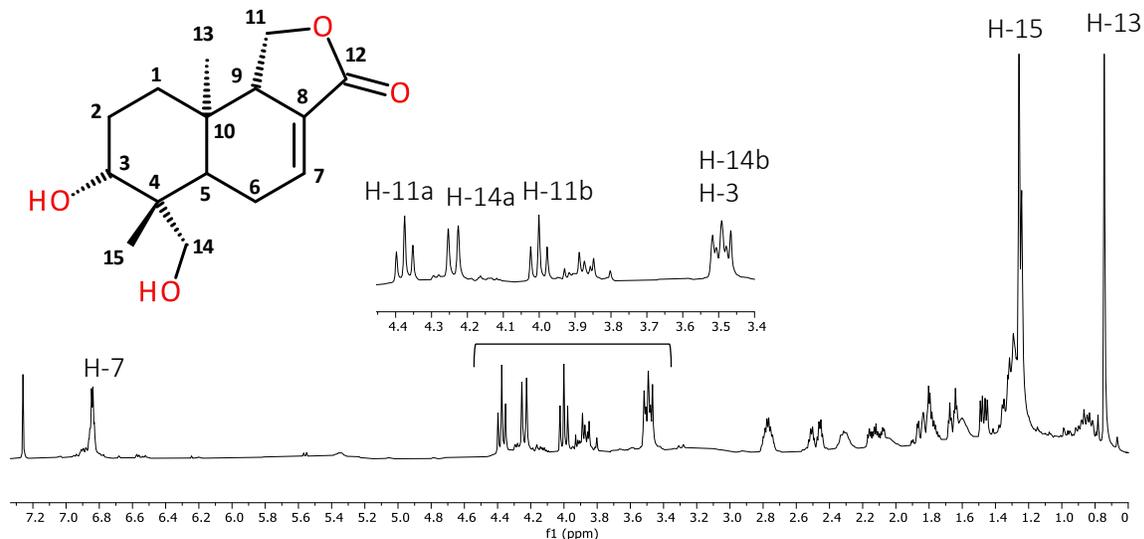


Figura 59. Espectro de ^1H de X en CDCl_3 (400 MHz)

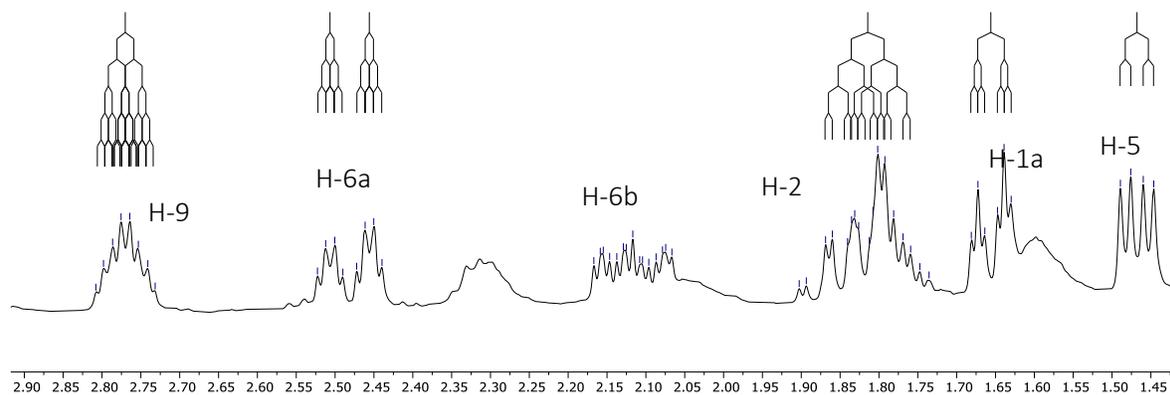


Figura 60. Ampliación del espectro de protón de la iresina en la región 1.2-2.9 ppm (CDCl_3 , 400 MHz)

El experimento HMQC (Apéndice A-8) permitió correlacionar cada señal de carbono con sus protones correspondientes, observándose que todos los metilenos de la molécula son diastereotópicos. Las señales en δ 4.37 y δ 4.00 (H-11a,b) del espectro de hidrógeno (Figuras 59, 60) mostraron una correlación con el carbono en δ 67.3, y aparecieron como señales dobles de dobles ($^3J_{\text{H-11,9}} = 9.15$, $^3J_{\text{H-11a,11b}} = 9.15$ Hz) indicando el acoplamiento entre ellos mismos y con el hidrógeno en δ 2.77 (H-9), correlación observada en el experimento

COSY 2D (**Figura 61**). La correlación presente en el experimento HMBC (**Figura 62**) con la señal del carbono carbonílico (C-12) permitió establecer la presencia de una lactona en la molécula, observándose correlaciones heteronucleares con el protón en δ 6.85 (H-7) infiriendo la presencia de una insaturación α, β . Éste último protón vinílico mostró correlaciones homonucleares con H-9 (a través del doble enlace) y con el metileno en δ 2.51,2.12 (H-6a,b), mientras que este último se correlacionó con la señal doble de dobles ($^3J_{H-5,6a,b} = 11.8, 5.4$ Hz) en δ 1.47 (H-5), estableciendo de esta manera el primer sistema de spines dentro de la molécula, el cual se observó de igual manera con la información del experimento TOCSY 1D (**Figura 63**).

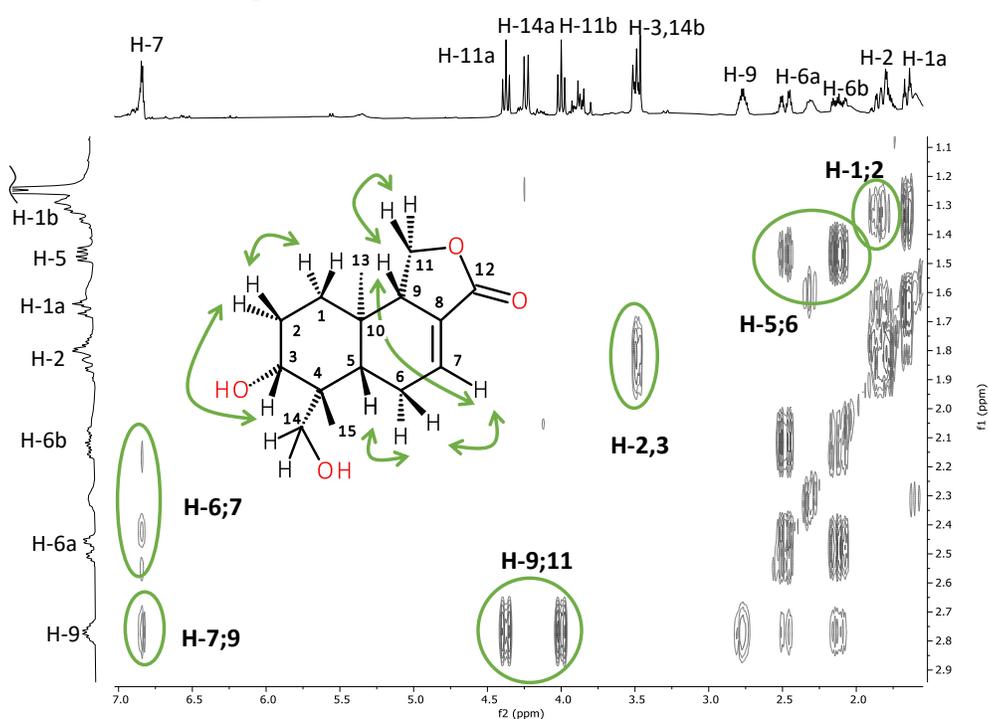


Figura 61. Sección del espectro COSY 2D de **X** y sus correlaciones clave

Las señales en δ 4.24,3.49 del espectro de hidrógeno, correspondientes a un metileno diastereotópico de un carbono base de oxígeno (δ 63.5, C-14) aparecieron como señales dobles ($^3J_{H-14a,b} = 11.2$ Hz) debido al acoplamiento entre ellos mismos, intuyendo su unión a un carbono cuaternario ya que no se observan correlaciones homonucleares con otros protones, observando la correlación heteronuclear en HMBC con el carbono cuaternario en

δ 42.2 (C-4), así como la correlación con el carbono de un metilo en δ 22.3 (C-15) y con C-5 (δ 50.1).

El protón H-5, a pesar de contar solamente con una correlación homonuclear con H-6a,b, denotó correlaciones heteronucleares en HMBC con diversos carbonos, información que sirvió para establecer claramente la estructura de la molécula y la posición de sus sustituyentes. Las correlaciones observadas fueron con los carbonos en δ 14.4 (C-13), δ 22.3 (C-15), δ 24.7 (C-6), δ 33.8 (C-10), δ 42.2 (C-4), δ 50.7 (C-9), δ 63.5 (C-14) y δ 80.7 (C-3).

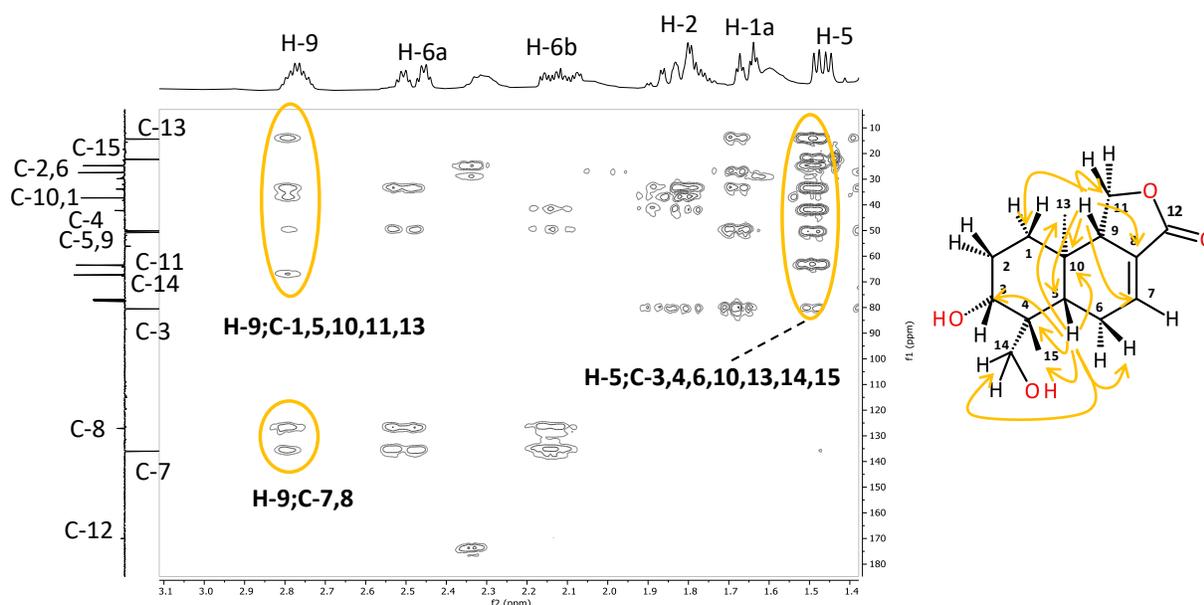


Figura 62. Sección de espectro HMBC de X y sus correlaciones clave

La señal observada en el espectro de protón en δ 1.81 (H-2) mostró correlaciones homonucleares con el metileno diastereotópico en δ 1.66,1.31 (H-1a,b) y con el metino en δ 3.49 (H-3). Éstas dos últimas señales no mostraron alguna otra correlación homonuclear más que con H-2, por lo que se infirió que son adyacentes a carbonos cuaternarios, afirmación corroborada con las correlaciones observadas en el experimento HMBC, estableciendo de esta manera la estructura de la molécula. El análisis del espectro NOESY 2D (**Figura 64**) corroboró la configuración relativa de los centros estereogénicos de la molécula.

Las actividades biológicas de la iresina no han sido estudiadas hasta el momento. La actividad antiparasitaria reportada previamente³ en las fracciones de *G. mexicanum*, se puede asociar a los drimanos, grupo al que pertenece la iresina⁸⁷.

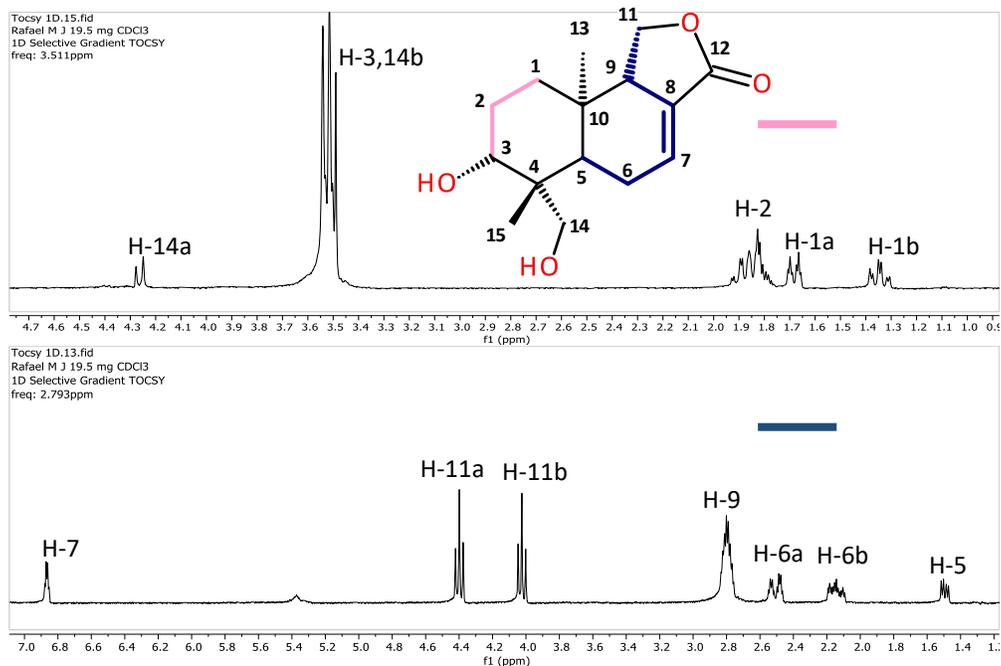


Figura 63. Espectros TOCSY 1D de X (Frecuencia irradiada trazo superior: 3.511 ppm, trazo inferior: 2.793 ppm)

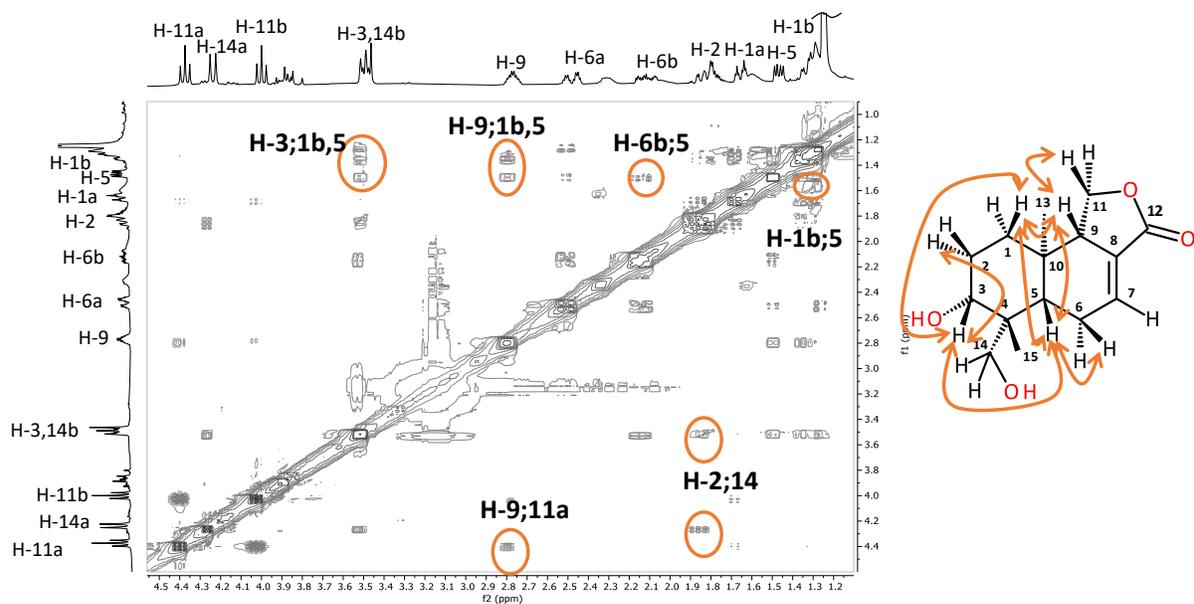


Figura 64. Sección del espectro de X NOESY 2D y sus correlaciones clave

Tabla 17. Datos espectroscópicos de RMN del compuesto **X** (CDCl₃)

Posición	Desplazamientos δ (ppm)			Correlaciones		
	DEPTQ	¹³ C	¹ H (mult., J (Hz))	COSY	HMBC (H - C)	NOESY
1a			1.31 (m)	1.66, 1.81	14.4, 27.5,	2.77, 3.49
1b	CH ₂	37.3	1.66 (ddd, 13.57, 3.55, 3.55)	1.31, 1.81	33.8, 50.7, 80.7	1.81
2	CH ₂	27.5	1.81 (dddd, 16.97, 13.26, 10.04, 3.72)	1.31, 1.66, 3.49	33.8, 37.3, 42.2, 80.7	3.49, 4.24
3	CH	80.7	3.49 (m)	1.81	50.1, 63.5	1.31, 1.47, 1.81
4	C	42.2	-	-	-	-
5	CH	50.1	1.47 (dd, 11.81, 5.37)	2.12, 2.48	14.4, 22.3, 24.7, 33.8, 42.2, 50.7, 63.5, 80.7	2.77, 3.49
6a			2.12 (m)	1.47, 2.48	33.8, 50.1, 42.2	2.48,
6b	CH ₂	24.7	2.48 (dddd, 20.08, 4.23, 4.23, 4.16)	1.47, 2.12	127.1, 135.9	-
7	CH	135.9	6.85 (d, 3.51)	2.12, 2.48, 2.77	24.7, 50.1, 170.0	2.12, 2.48
8	C	127.1	-	-	--	-
9	CH	50.7	2.77 (dddd, 8.66, 8.66, 3.84, 3.84, 3.76)	4.00, 4.37	14.4, 33.8, 37.3, 50.1, 67.3, 127.1, 135.9	1.31, 1.47
10	C	33.8	-	-	-	-
11a			4.00 (dd, 9.15, 9.15)	4.37	50.7, 33.8,	2.77, 4.37
11b	CH ₂	67.3	4.37 (dd, 9.16, 9.16)	4.00	127.1, 170.0	2.77, 4.00
12	C	170.0	-	-	-	-
13	CH ₃	14.4	0.74 (s)	-	33.8, 37.3, 50.7	-
14a			3.49 (d, 11.17)	4.24	22.3, 42.2,	4.24
14b	CH ₂	63.5	4.24 (d, 11.12)	3.49	80.7	3.49, 1.81
15	CH ₃	22.3	1.26 (s)	-	42.4, 50.1, 63.5, 80.7	2.48, 3.49

s: señal simple, d: señal doble, dd: señal doble de dobles, dddd: señal doble de doble de doble de dobles, ddddd: señal doble de doble de doble de doble de dobles, m: señal múltiple

7.3. Evaluación de la capacidad antirradicalar

En la **Tabla 18** se observan los valores de IC_{50} obtenidos mediante el ensayo de reducción del radical libre DPPH \cdot para las diferentes fracciones evaluadas, así como los de los controles utilizados. La fracción M3Me presentó el valor más bajo de IC_{50} , 23.41 ± 1.11 μ g de muestra seca/mL, indicando que tiene mejor capacidad antioxidante con respecto a las demás fracciones. Este valor obtenido puede explicarse debido a la diferencia en el contenido de compuestos, ya que contiene una mayor proporción de flavonoides y polifenoles con respecto a las otras dos fracciones (EMeF y extracto crudo).

En el caso de la fracción EMeF se obtuvo un valor de IC_{50} de 60.74 ± 0.94 μ g de muestra seca/mL, siendo aproximadamente tres veces menos efectivo que la fracción M3Me, hecho que se puede asociar con un mayor contenido en peso del compuesto mayoritario de la planta en esta fracción (asperulósido), el cual estructuralmente no tiene grupos funcionales para la reducción del radical libre, ya sea por transferencia de radicales de hidrógeno o transferencia de electrones, lo que resulta en una capacidad antioxidante relativamente baja.

El extracto crudo de la planta mostró un IC_{50} de 145.91 ± 1.01 μ g de muestra seca/mL, siendo la fracción con menor capacidad antioxidante de las tres evaluadas, lo que se puede atribuir a un mayor contenido de azúcares libres y compuestos menos polares que no cuentan con propiedades antioxidantes. Ninguna de las fracciones o extractos mostró una capacidad antioxidante comparable con los controles, sin embargo la fracción M3Me mostró un IC_{50} semejante al del BHT puro, compuesto que ha sido utilizado en la industria alimentaria por sus propiedades antioxidantes¹⁶.

La fracción EAc fue seleccionada para realizar el ensayo de capacidad antioxidante, sin embargo, esta fracción no se pudo solubilizar en EtOH y mezclas de etanol acuoso (90, 80 y 70 %) por lo que no fue posible cuantificar dicha actividad. Este comportamiento se debió posiblemente a la oxidación de los compuestos de esta fracción, así como la presencia de compuestos poco solubles en estos disolventes.

Tabla 18. Ecuaciones de regresión lineal, coeficientes de determinación y valores de IC₅₀ obtenidas en la evaluación de la capacidad antirradicalar para el crudo y fracciones de *G. mexicanum*

Fracción	Ec. de regresión	R ²	IC ₅₀ (µg/mL)
Crudo	y = 0.3211x + 3.1399	0.9956	145.91 ± 1.0a
EMeF	y = 0.8321x – 0.4373	0.9994	60.74 ± 0.94b
M3Me	y = 2.1135x – 1.5726	0.9989	23.41 ± 1.11c
Control 1	y = 24.418x + 10.477	0.9957	1.61 ± 0.04
Control 2	y = 11.235x + 2.3502	0.9927	4.21 ± 0.14
Control 3	y = 5.3287x + 0.1367	0.9973	9.35 ± 0.17

Control 1: ác. gálico, control 2: ác. ascórbico, control 3: ác. clorogénico. Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$) por el método de rangos múltiples de Duncan.

En la **Tabla 19** se muestra el IC₅₀ de diversos extractos de plantas pertenecientes al género *Galium*, así como de extractos del té verde y té negro, los cuales son comercializados a nivel mundial como antioxidantes naturales. Todos los valores de IC₅₀ se expresaron en unidades de kg m.s./kg DPPH· para poder realizar un análisis comparativo adecuado.

De acuerdo con la **Tabla 19**, se observa que las plantas del género *Galium* en general poseen una capacidad antioxidante importante (IC₅₀ = 0.34 - 41.52 kg m.s./kg DPPH·). En el estudio de Lakic y colaboradores¹⁸, se reporta un valor de IC₅₀ de 0.34 kg m.s./kg DPPH· (realizado en la especie *Galium verum*) el cual es 2 y 2.8 veces menor al reportado para el té verde y el té negro (IC₅₀ = 0.67 y 0.97 kg m.s./kg DPPH·, respectivamente), siendo el valor de IC₅₀ más bajo para el género *Galium*.

El valor de IC₅₀ encontrado en este trabajo es mayor (IC₅₀ = 3.64 kg m.s./kg DPPH·) que los descritos para *G. verum* (IC₅₀ = 0.34 – 2.64 kg m.s./kg DPPH·) y *G. mollugo* (IC₅₀ = 1.33 – 1.83 kg m.s./kg DPPH·) y es aproximadamente 6 veces mayor que el IC₅₀ del té verde, lo que establece una menor capacidad antioxidante con respecto a estos extractos. En el estudio de Senio y colaboradores²⁰, *G. aparine* muestra valores de IC₅₀ que son mayores (IC₅₀ = 26.02–41.52 kg m.s./kg DPPH·) a los IC₅₀ de las demás especies y es hasta 11 veces mayor al IC₅₀ (3.64 kg m.s./kg DPPH·) del extracto crudo de *G. mexicanum*.

Tabla 19. Valores de IC₅₀ de plantas del género *Galium* y de algunas ampliamente consumidas

Planta	Parte de la planta	Extracto	Observaciones	IC ₅₀ (kg m.s./ kg DPPH*)	Referencia y país de estudio
<i>G. mexicanum</i>	Partes aéreas	Metanólico	EAU	3.64	Este estudio, México
<i>G. aparine</i>	Hojas, tallos, flores y semillas	Metanol 80 % (v/v)	Liofilizado Secado con aire	26.06 41.52	[20] Portugal
		Infusión	Liofilizado Secado con aire	26.02 21.93	
<i>G. verum</i>	Partes aéreas	Metanol 80 % (v/v)	Mt. Zlatar (Lugar de colecta) Veternik (Lugar de colecta)	0.34 0.906	[18] Serbia
			---	Acuoso Metanólico	Liofilizado
<i>G. mollugo</i>	Partes aéreas	Etanol al 50 % (v/v)	Maceración	1.50	[22] Serbia
			Reflujo	1.33	
			EAU	1.83	
Té verde (<i>Camellia sinensis</i> Linn)	Hojas	Metanólico	Maceración	0.67	[88] Jordania
Té negro (<i>Camellia sinensis</i> Linn)	Hojas	Metanólico	Maceración	0.97	

m.s.: muestra seca

Un objetivo en este trabajo fue cuantificar la capacidad antioxidante de los compuestos puros obtenidos de *G. mexicanum*, sin embargo, los compuestos aislados con potencial antioxidante (ácido clorogénico, isoquercetina, rutina, astragalina y nicotiflorina) ya poseen estudios de capacidad antioxidante usando el ensayo de reducción del radical libre DPPH. Para analizar la capacidad antioxidante observada del extracto se investigaron los valores de IC₅₀ de los compuestos puros identificados, los cuales se encuentran en la **Tabla 20**.

Debido a la variación de la concentración de radical libre DPPH[·] utilizado en cada estudio se realizó el cálculo para obtener un valor más adecuado para lograr su comparativo. De entre los compuestos citados en la tabla se puede observar que la isoquercetina cuenta con los valores más bajos (0.082-0.22 kg m.s./kg DPPH[·]) de IC₅₀ con respecto a los demás compuestos, lo que indica una mayor capacidad antirradicalar.

La rutina, compuesto que comparte la misma aglicona con la isoquercetina, tiene valores mayores (0.22-0.42 kg m.s./kg DPPH[·]) con respecto a la isoquercetina, lo cual puede atribuirse a la diferencia en masas moleculares de ambos compuestos. Esto debido a la presencia del fragmento de ramnosa en la rutina.

Tabla 20. Valores de IC₅₀ de compuestos puros identificados en el extracto de *G. mexicanum*

Compuesto	[DPPH [·]] (μM)	IC ₅₀ μg/mL (μM)	IC ₅₀ (kg m.s./kg DPPH [·])	Referencia
Ácido clorogénico	50	13.8 ± 1.3 (38.94)	0.69	[89]
	60	10.62 (30)	0.44	[90]
	100	16.16 (45.61)	0.41	[91]
Isoquercetina	66.6	5.89 ± 0.25 (12.68 ± 0.54)	0.22	[92]
	200	7.63 ± 0.17 (16.44)	0.096	[93]
	20	0.65 (1.4 ± 0.06)	0.082	[94]
Rutina	100	15.25 (24.97)	0.38	[95]
	61.6	5.56 ± 0.05 (9.10)	0.22	[96]
	85.7	14.16 ± 0.2 (23.19)	0.42	[97]
Astragalina	66.6	144.1 ± 25.1 (321.3 ± 55.8)	5.48	[98]
	100	182.93 (408.0)	4.64	[99]
Nicotiflorina	400	77.64 (130.6 ± 1.33)	0.49	[100]

El ácido clorogénico por su parte también muestra una capacidad antioxidante relativamente alta con valores de IC_{50} (0.41-0.69 kg. m.s./kg DPPH \cdot) similares a los de la rutina, mientras que la astragalina posee valores de IC_{50} más altos (4.64, 5.68 kg. m.s./ kg DPPH \cdot), indicando una menor capacidad antioxidante. Esta disminución de la capacidad antioxidante se debe a que la aglicona (kaempferol) sólo cuenta con un grupo hidroxilo sustituyente del anillo B (en comparación con los dos hidroxilos con que cuenta la quercetina), disminuyendo su capacidad para atrapar los electrones y deslocalizarlos a través de sus sistemas aromáticos¹⁰¹. El valor reportado para la nicotiflorina destaca debido a que no concuerda con los datos reportados para los flavonoides, lo cual puede deberse al uso de una metodología diferente para la reacción con el radical libre DPPH \cdot (buffer pH 5.5).

8. CONCLUSIONES

Las siguientes conclusiones se generan del presente proyecto de tesis en concordancia con la hipótesis planteada:

1. A partir del extracto metanólico de las partes aéreas de *Galium mexicanum*, se aislaron por primera vez mediante técnicas cromatográficas en fase normal y reversa diez metabolitos secundarios que fueron caracterizados mediante el análisis de los datos de RMN:
 - 1.1. Dos iridoides glicosilados que han sido reportados previamente en la literatura para el género *Galium*: asperulósido (I) y dafilósido (III), siendo el asperulósido el compuesto mayoritario encontrado en esta especie.
 - 1.2. Ácido clorogénico (II), un derivado del ácido hidroxicinámico.
 - 1.3. Dos flavonoides glicosilados derivados de la Quercetina, la isoquercetina (IV) y la rutina (V); y dos derivados glicosilados del kaempferol, la astragalina (VI) y la nicotiflorina (VII). Este último compuesto se identificó por primera vez en el género *Galium*.
 - 1.4. β -sitosterol (VIII), un fitoesterol ampliamente distribuido en el reino vegetal.
 - 1.5. Un carotenoide reconocido como aditivo GRAS en su forma cristalina: luteína (IX), y;
 - 1.6. Un derivado de drimano: iresina (X), cuya presencia se reporta por primera vez en la familia *Rubiaceae*.

2. Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto metanólico de *G. mexicanum* y de dos de sus fracciones polares mediante el ensayo de reducción del radical DPPH:
 - 2.1. El extracto metanólico de *G. mexicanum* mostró actividad antirradicalar moderada ($IC_{50} = 145.91 \pm 1.01 \mu\text{g/mL}$) con respecto a otras plantas del género.

- 2.2. La fracción EMeF mostró un IC_{50} menor ($60.74 \pm 0.94 \mu\text{g/mL}$) al del extracto metanólico debido a su tratamiento, y;
 - 2.3. La fracción M3Me mostró una capacidad antioxidante mayor ($IC_{50} = 23.41 \pm 1.11 \mu\text{g/mL}$) con respecto a la fracción EMeF y al extracto metanólico.
3. La presencia de polifenoles, iridoides, el carotenoide y el derivado de drimano puede justificar la capacidad antioxidante, actividad antiinflamatoria y antiparasitaria descritas para esta especie.

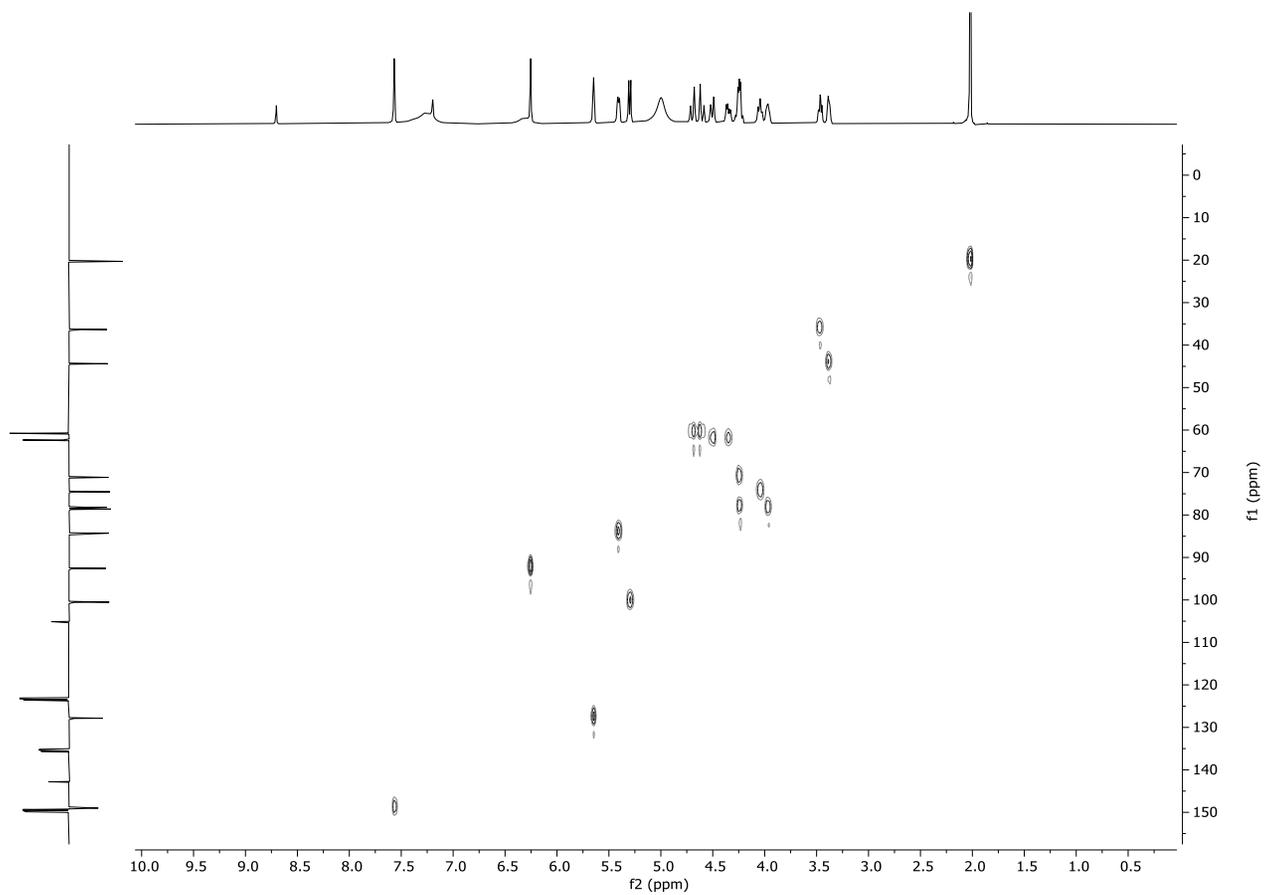
9. PERSPECTIVAS

1. Analizar el contenido de ácidos grasos insaturados en la fracción AcDS (Identificación y cuantificación).
2. Cuantificar el contenido de flavonoides y fenoles totales del extracto metanólico.
3. Cuantificar el contenido de iridoides totales del extracto metanólico.
4. Aislar, purificar y elucidar la estructura de los metabolitos secundarios minoritarios.
5. Efectuar estudios biológicos de la iresina para demostrar su actividad antiparasitaria.
6. Analizar el potencial en el área médica, de alimentos o farmacéutica del extracto o fracciones de *G. mexicanum*.

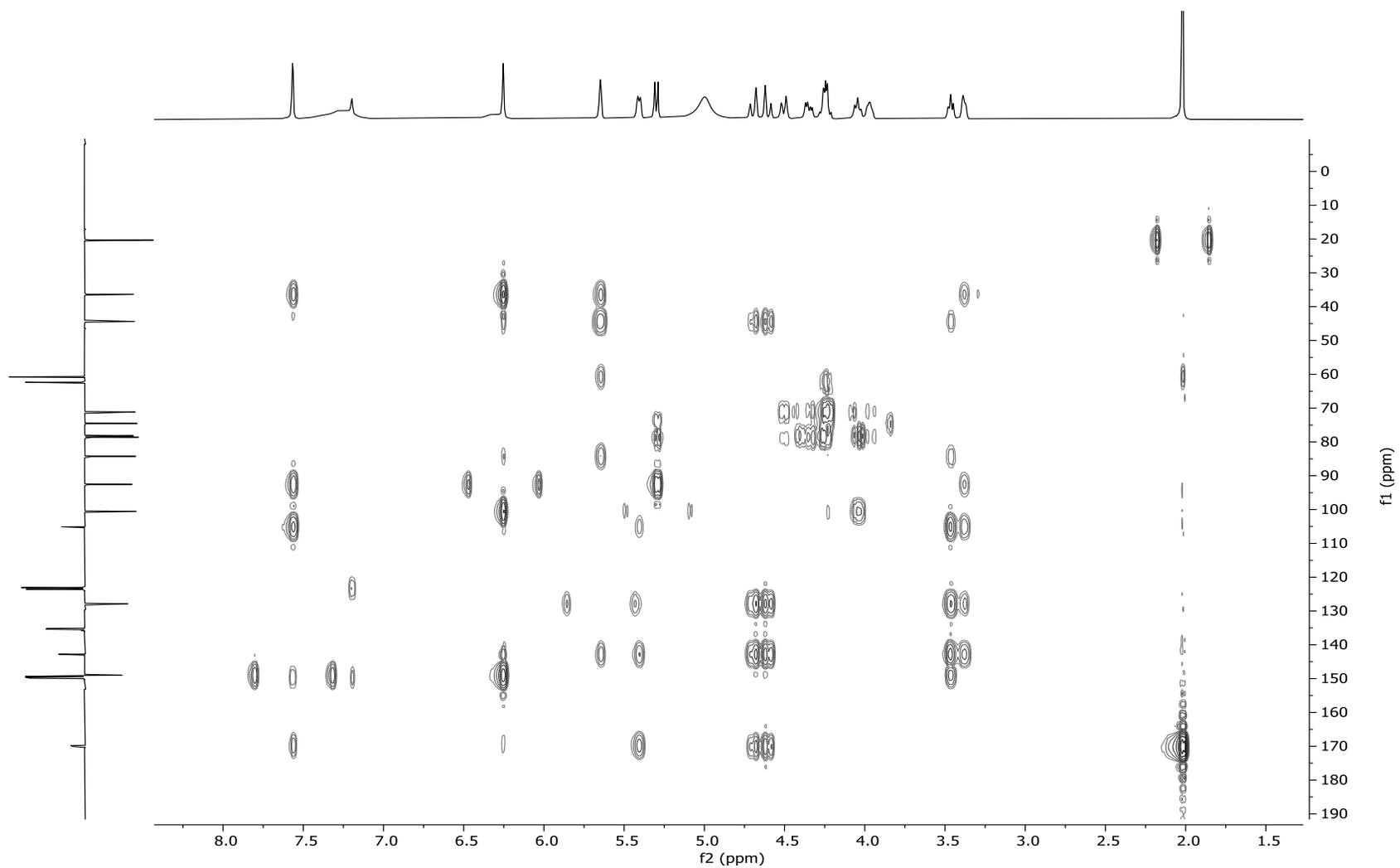
10. APÉNDICES

Apéndice A. Experimentos de RMN en 1D y 2D de compuestos aislados de *G. mexicanum*

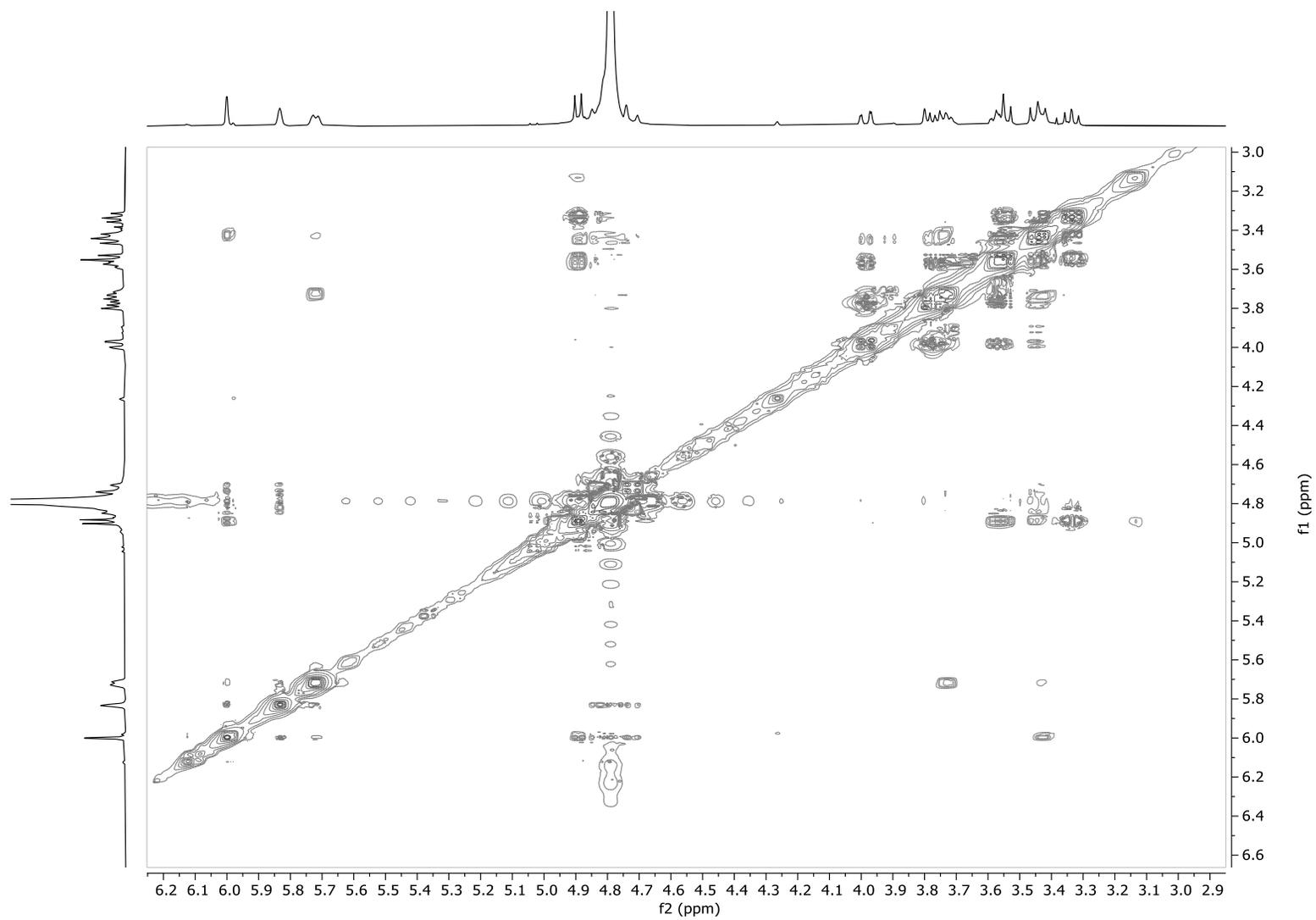
Apéndice A-1. Espectros de RMN del compuesto I



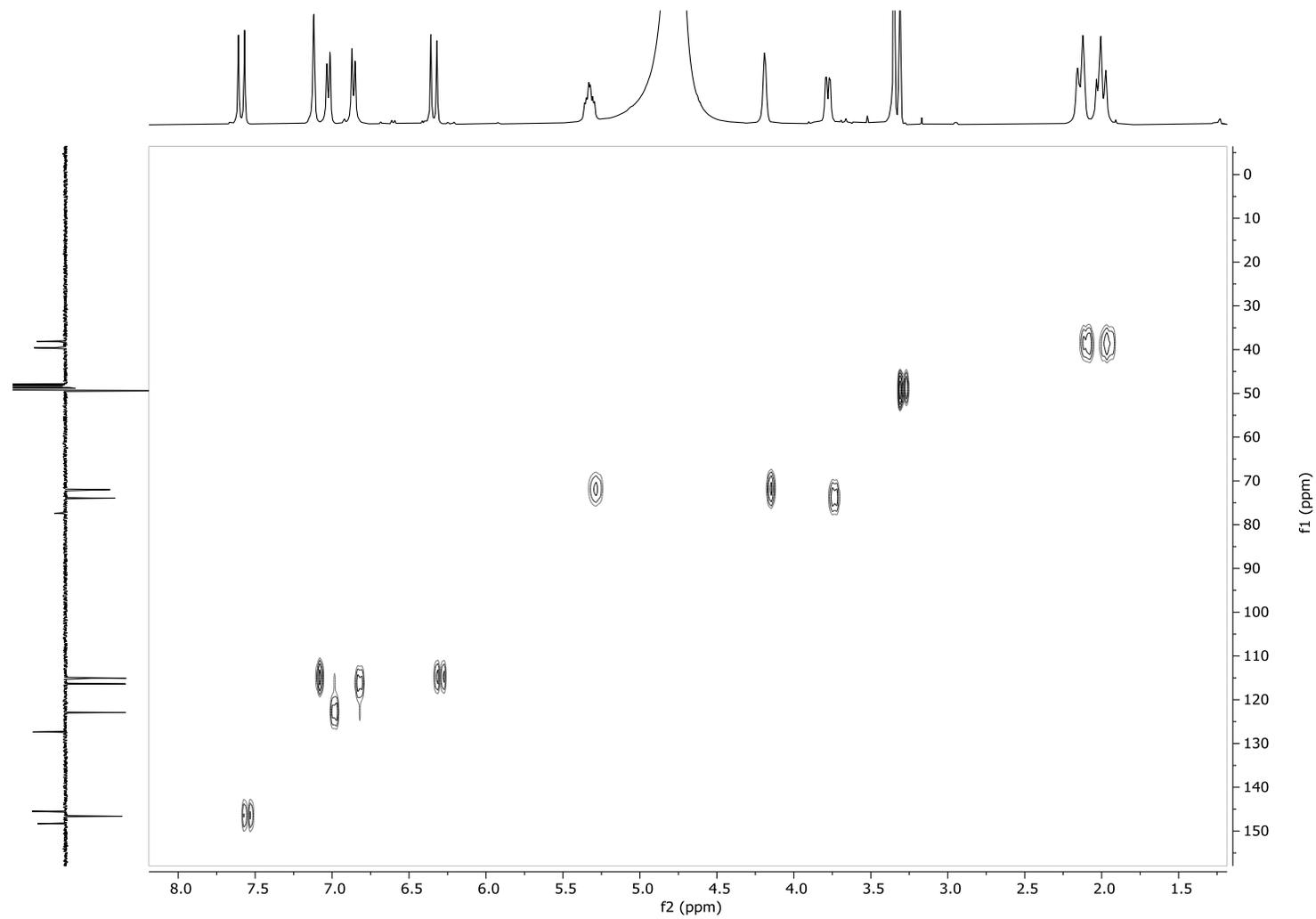
Espectro HSQC de I (Piridina- d_5)



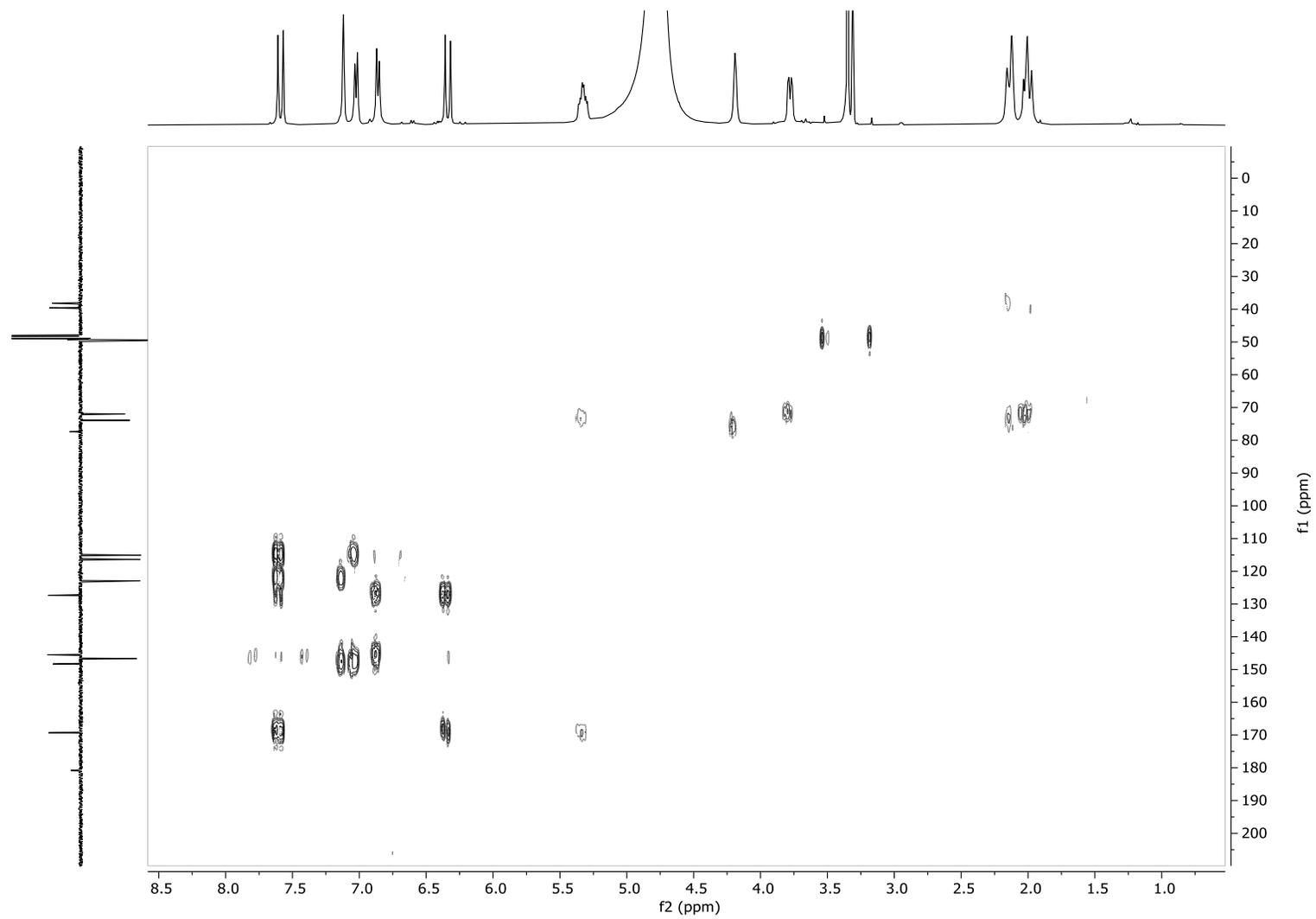
Espectro HMBC de I (Piridina- d_5)



Apéndice A-2. Espectros de RMN del compuesto II

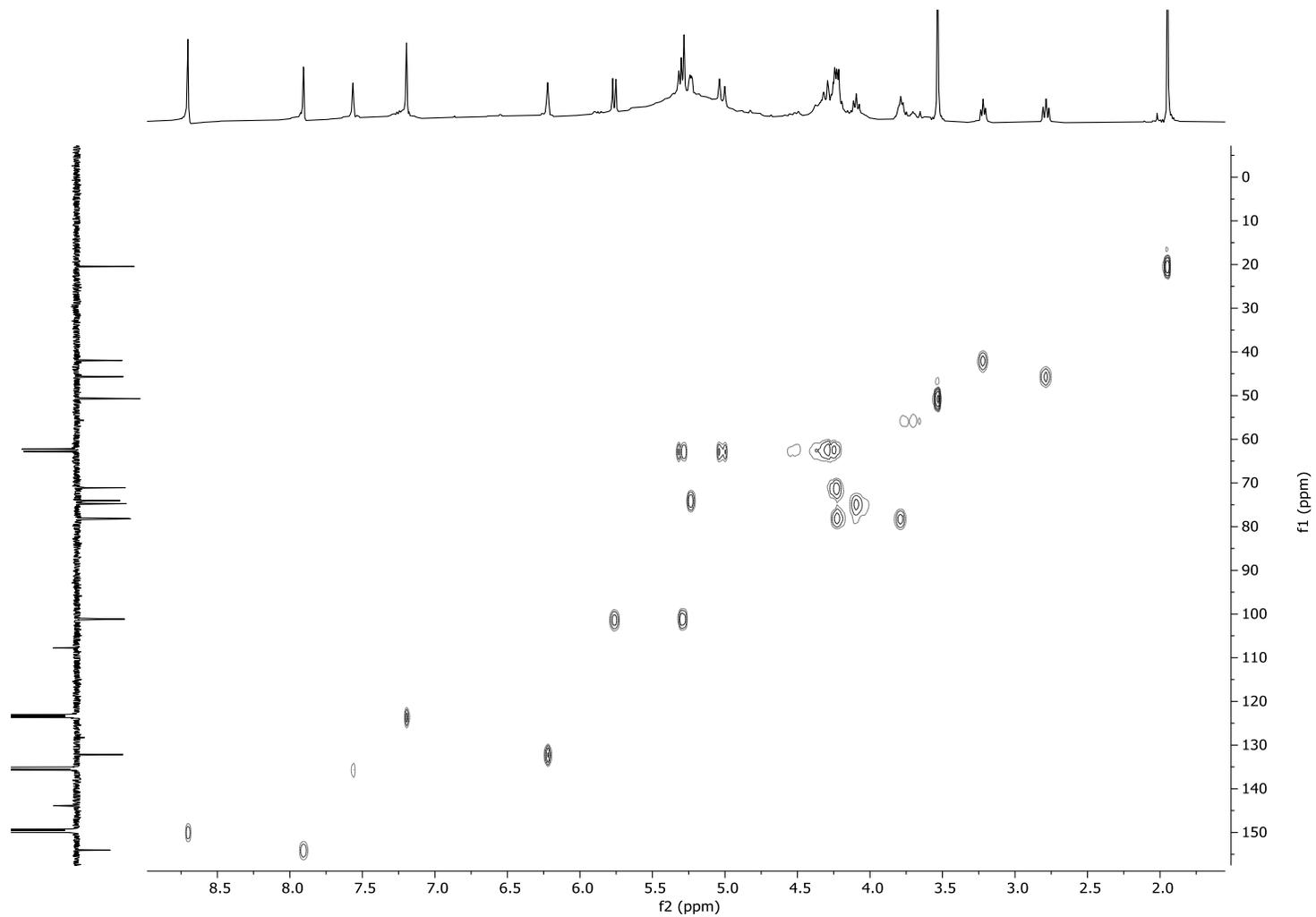


Espectro HSQC de II (MeOH- d_4)

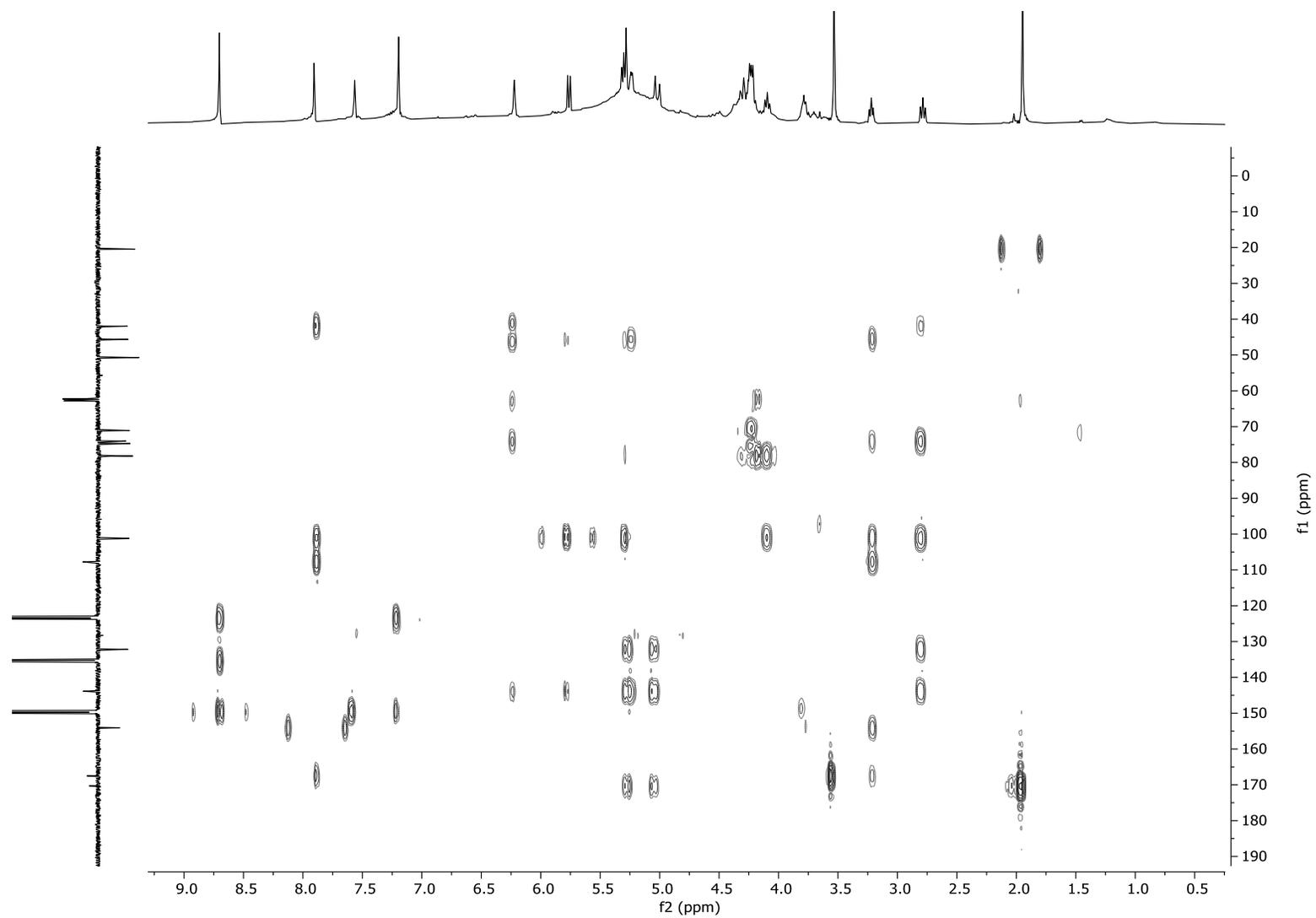


Espectro HMBC de II (MeOH-*d*₄)

Apéndice A-3. Espectros de RMN del compuesto III

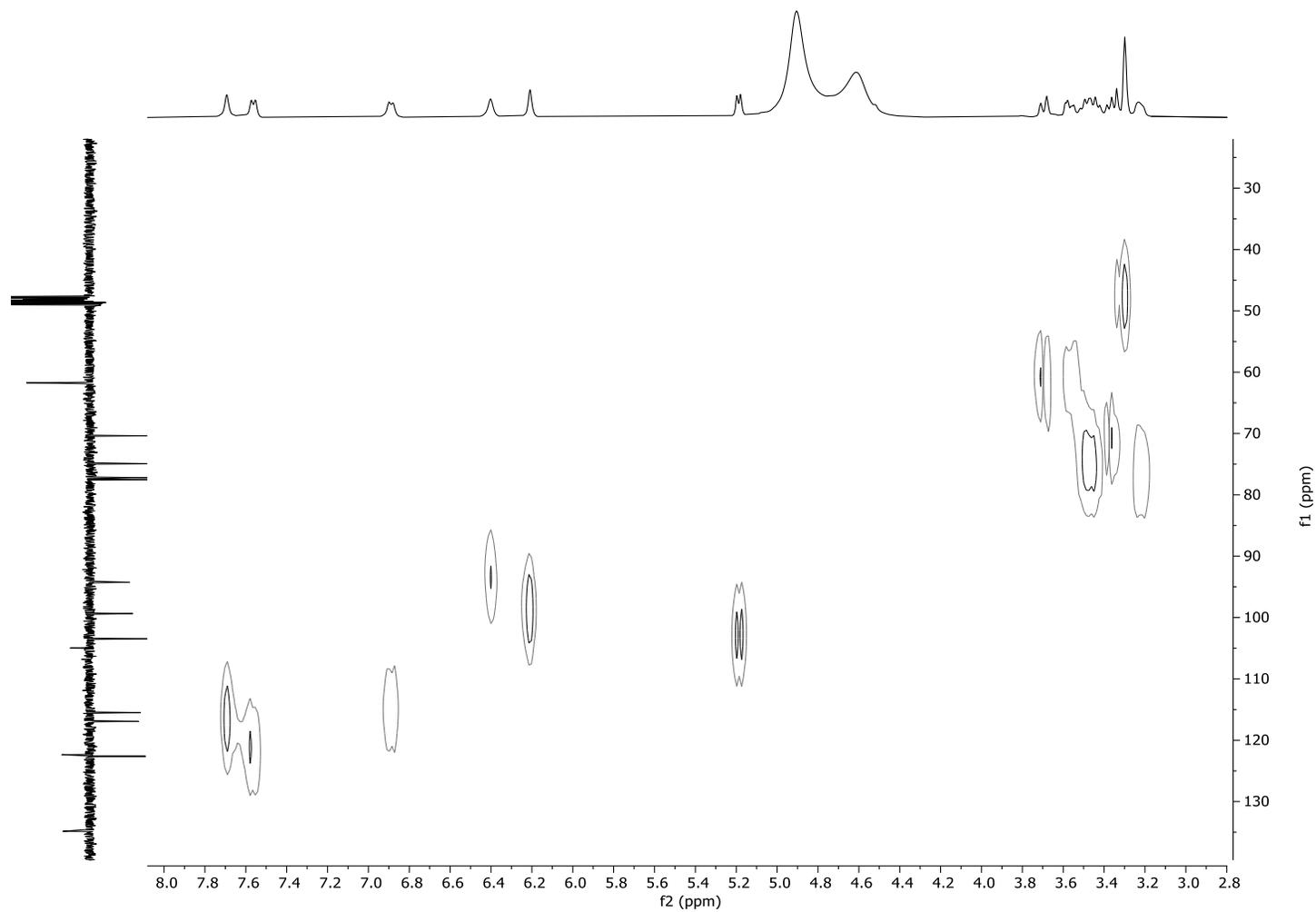


Espectro HSQC de III (Piridina- d_5)

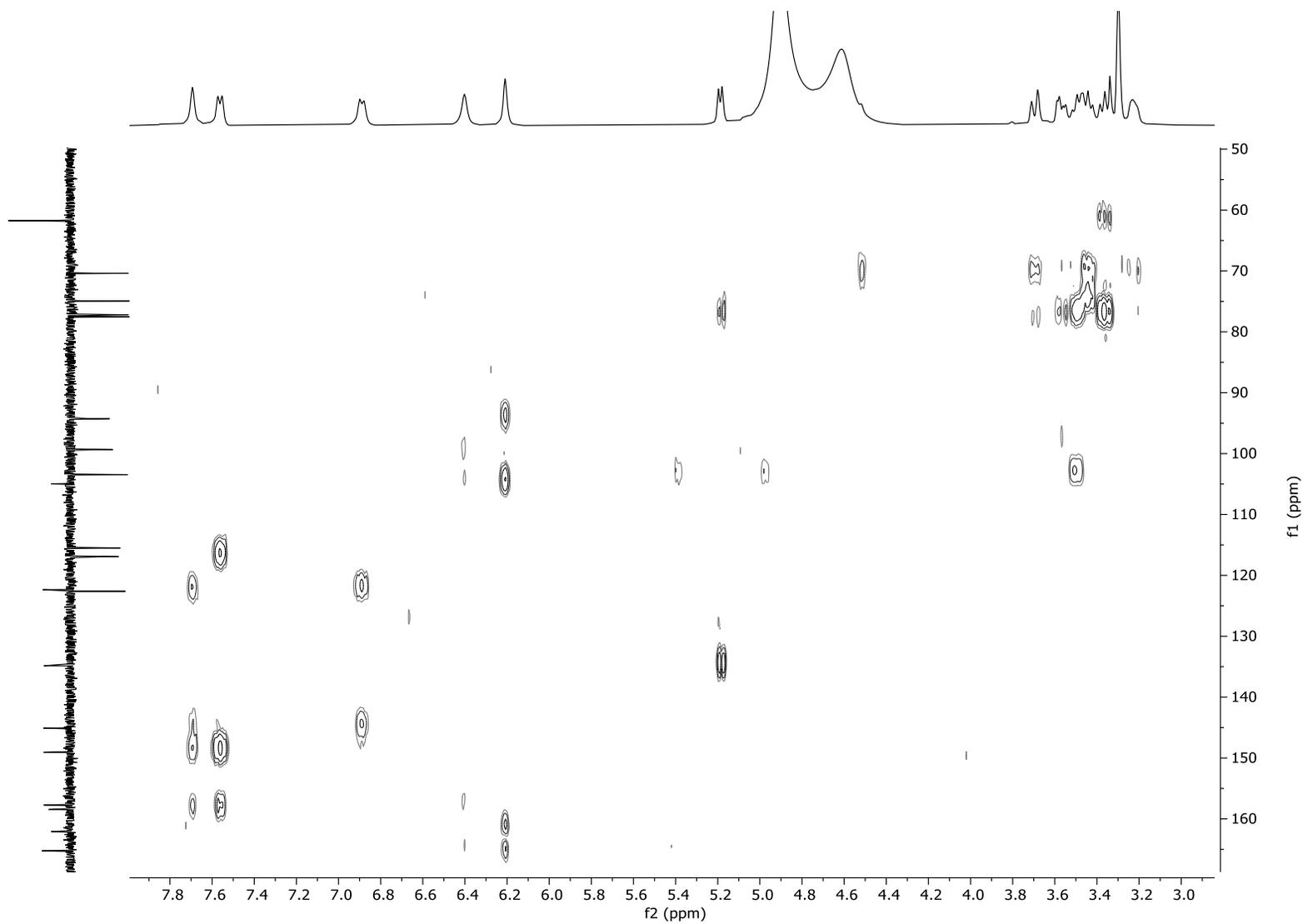


Espectro HMBC de III (Piridina- d_5)

Apéndice A-4. Espectros de RMN del compuesto IV

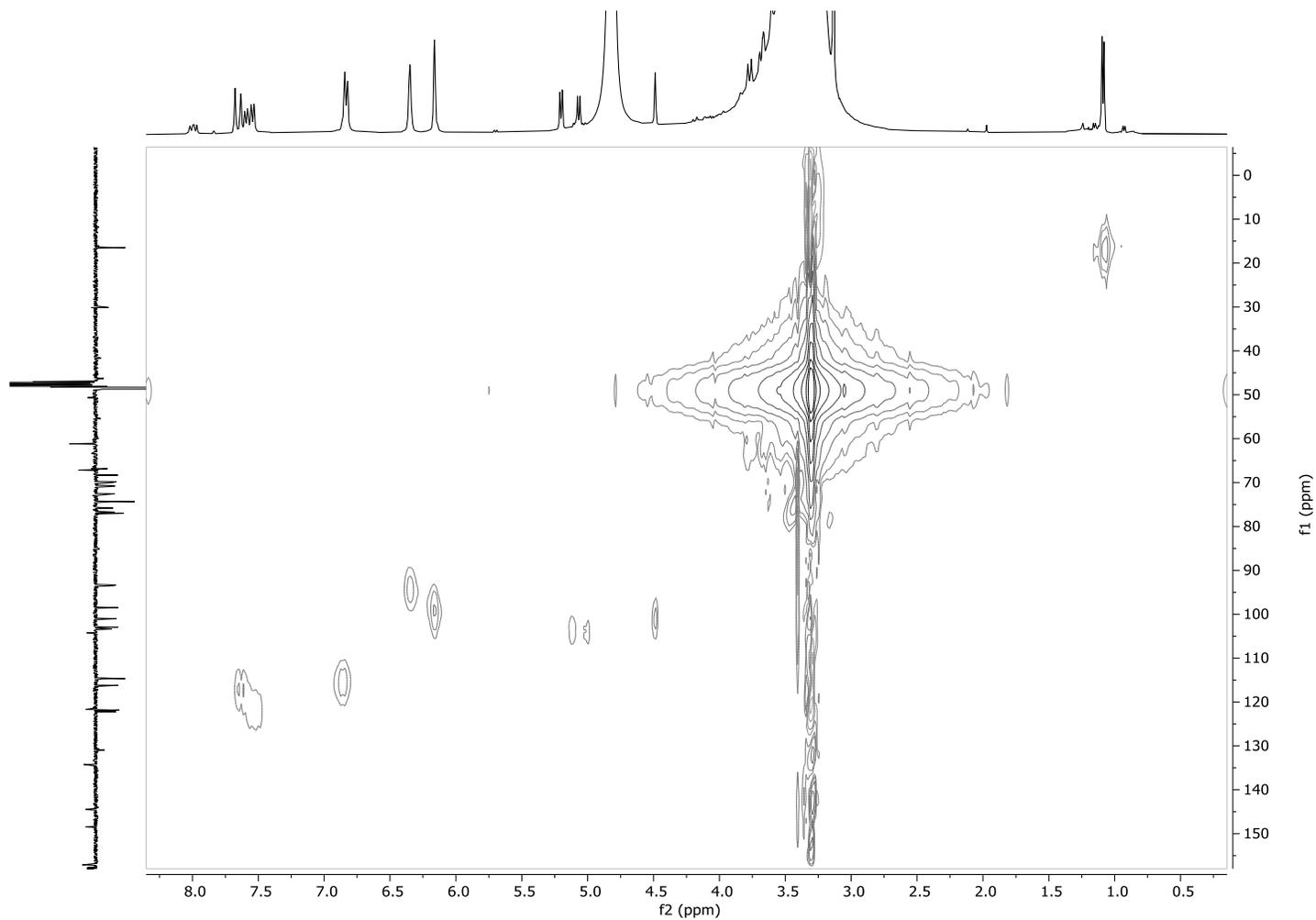


Espectro HMQC de IV ($\text{MeOH-}d_4$)

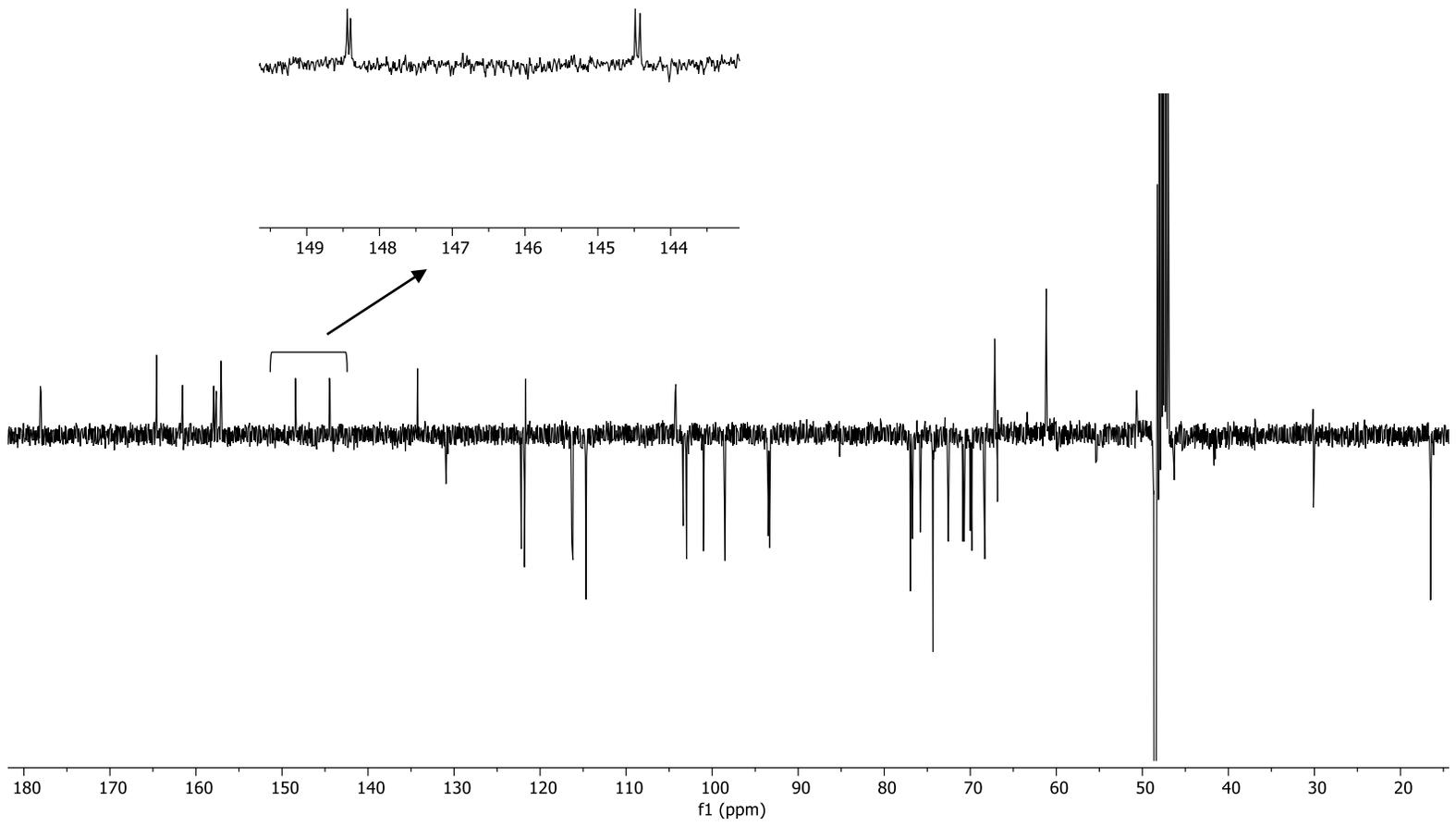


Espectro HMBC de IV (MeOH-*d*₄)

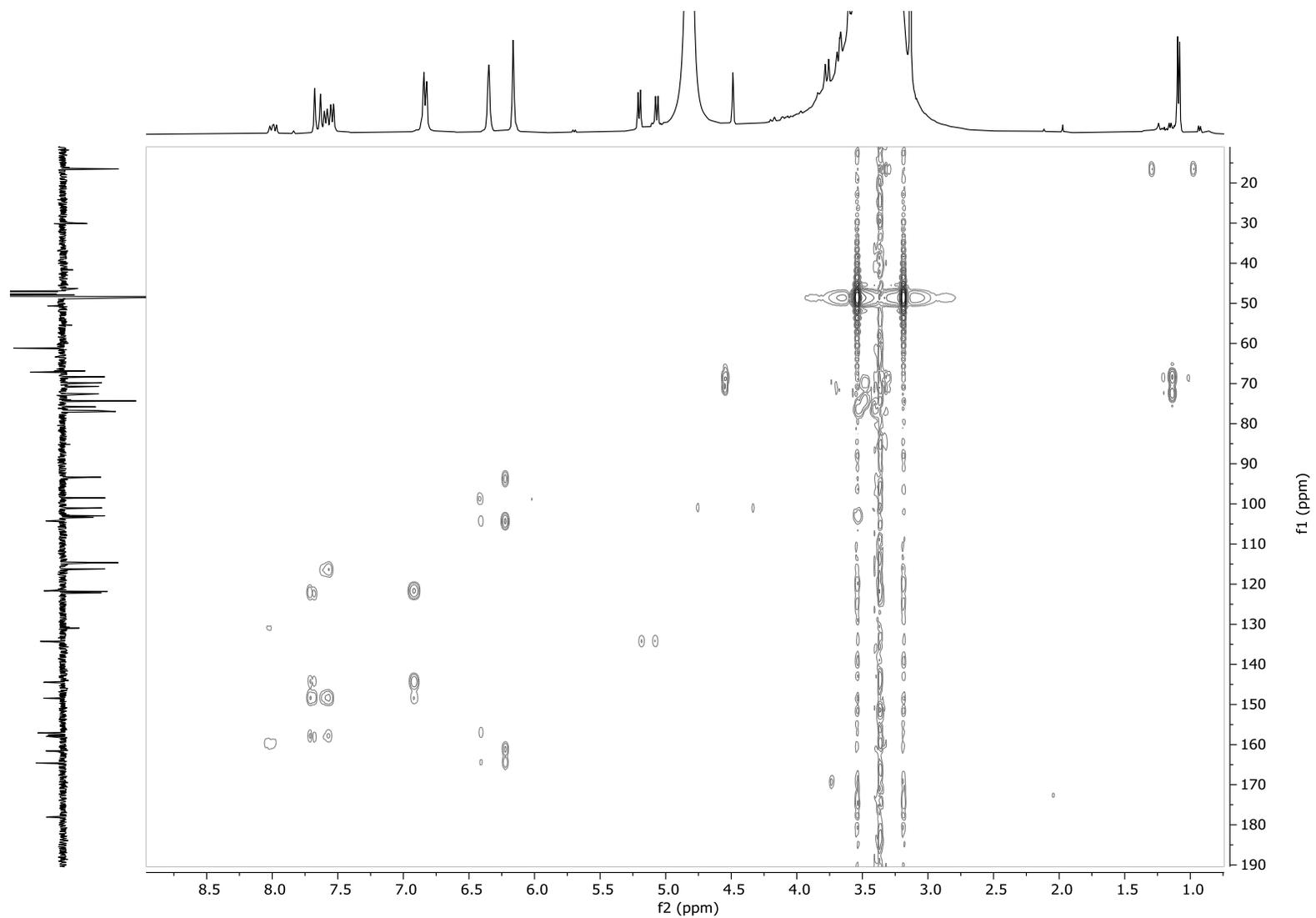
Apéndice A-5. Espectros de RMN de la mezcla de compuestos IV y V



Espectro de HSQC IV y V (MeOH- d_4)

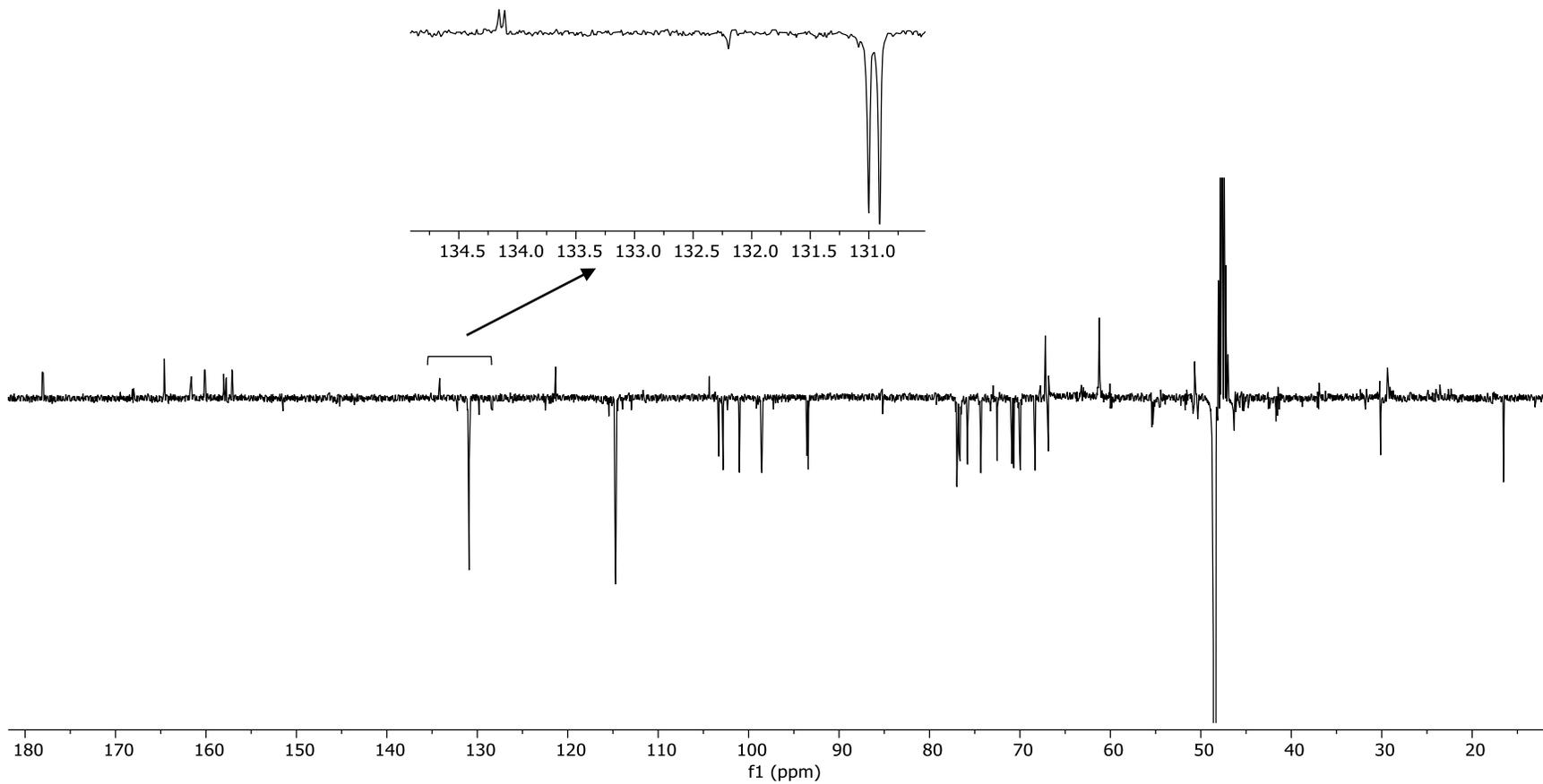


Espectro DEPTQ de IV y V (MeOH- d_4 , 100 MHz)

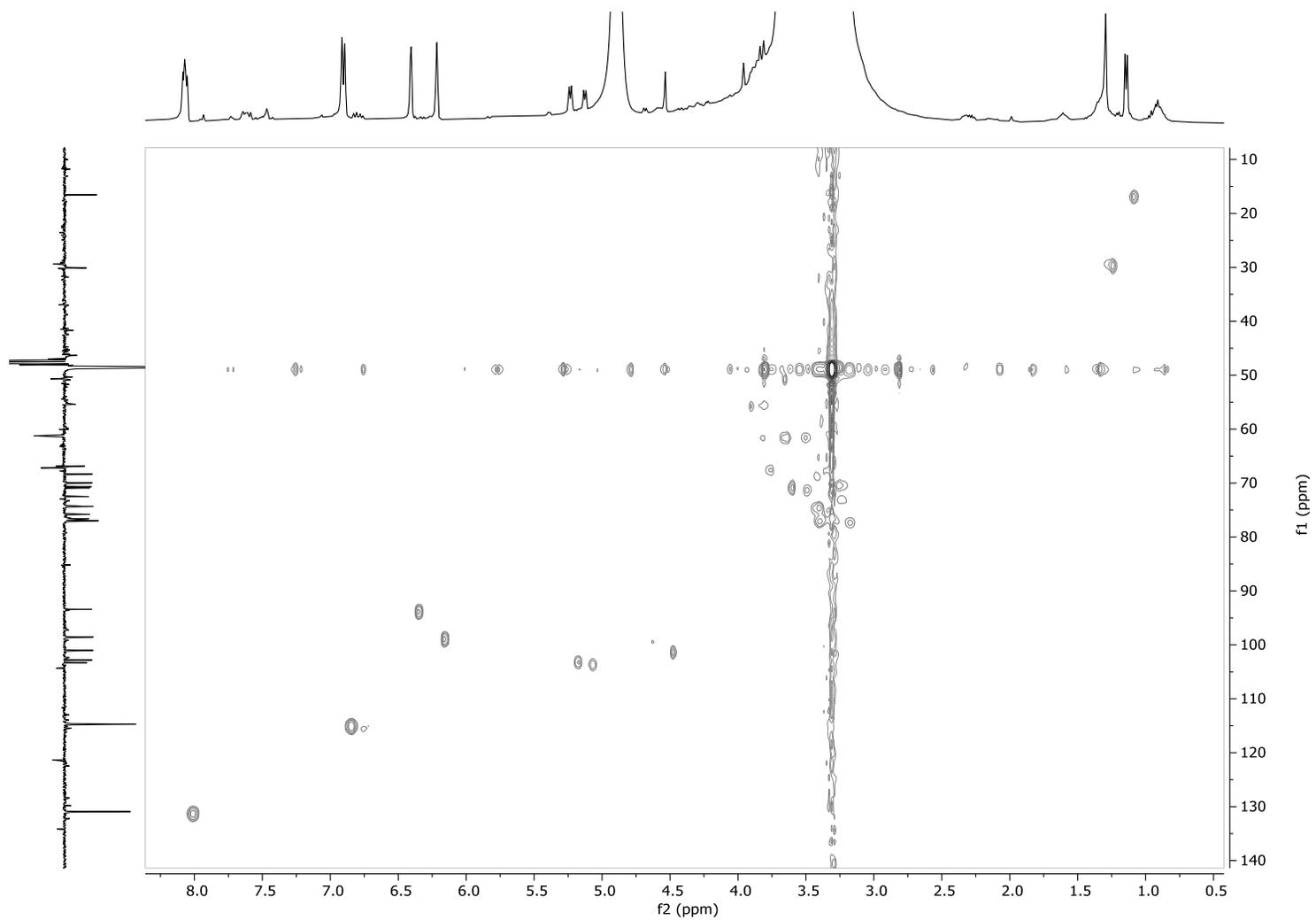


Espectro HMBC de IV y V (MeOH- d_4)

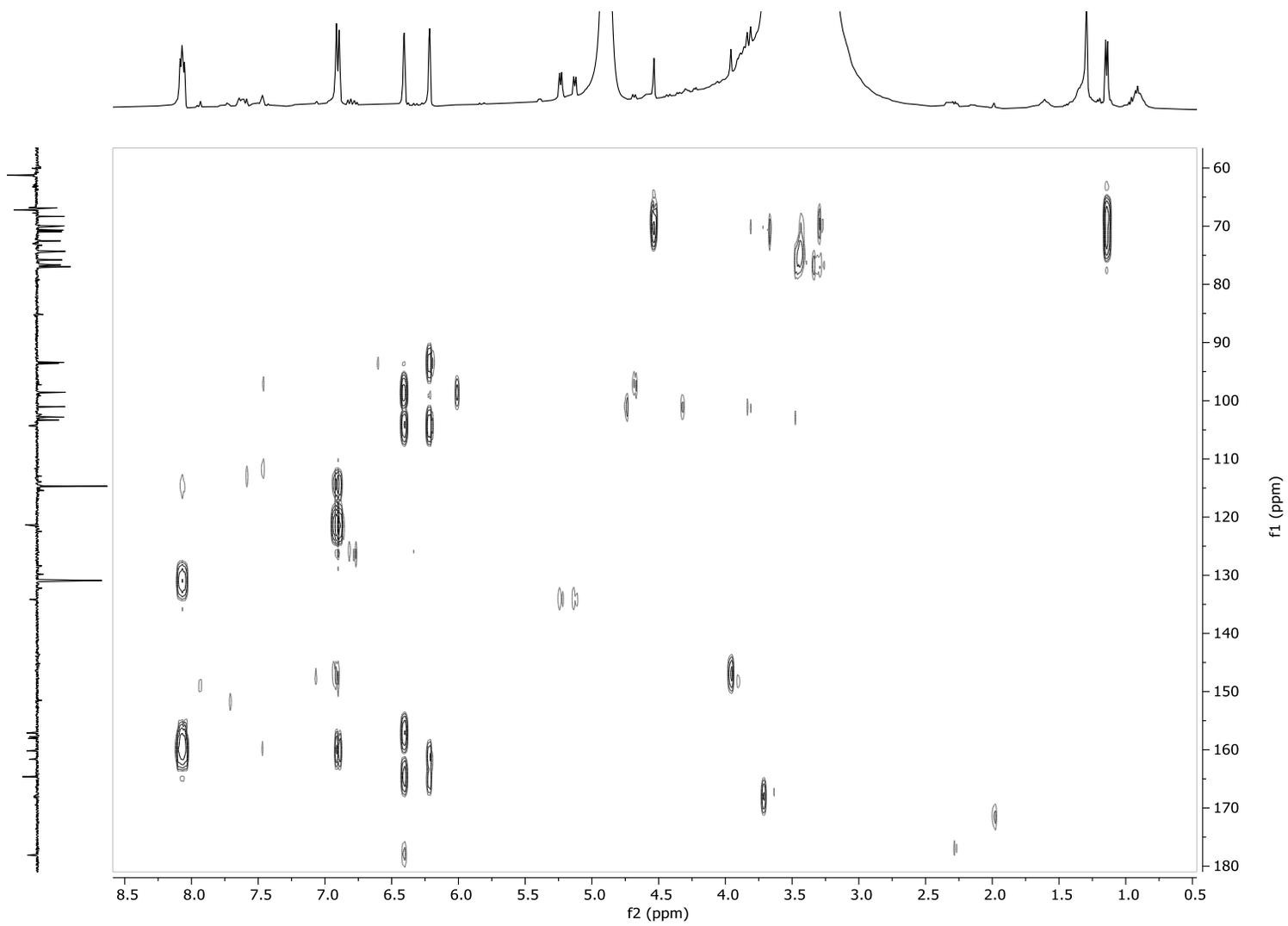
Apéndice A-6. Espectros de RMN de la mezcla de compuestos VI y VII



Espectro DEPTQ de VI y VII (MeOH-*d*₄, 100 MHz)

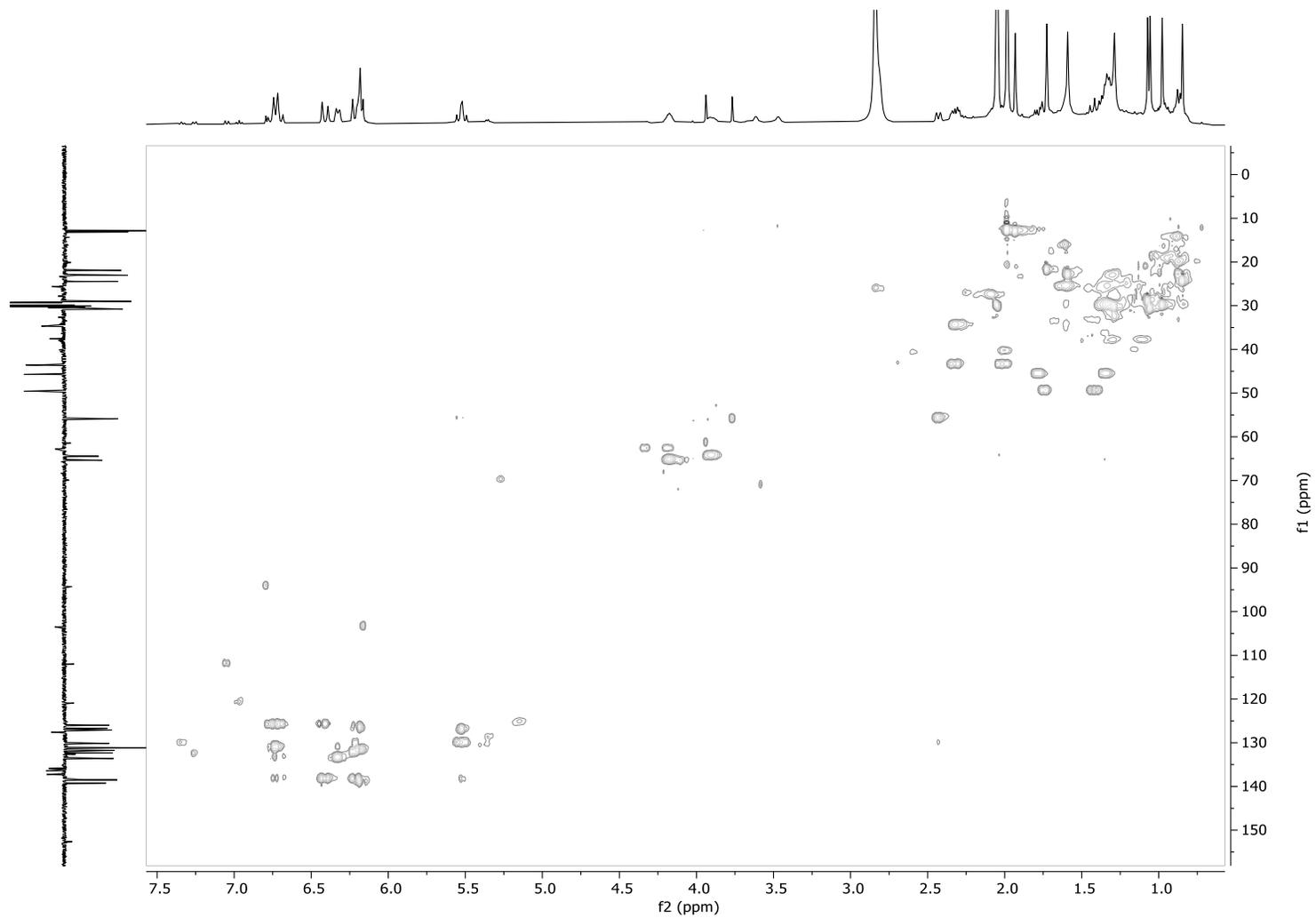


Espectro HSQC de VI y VII (MeOH- d_4)

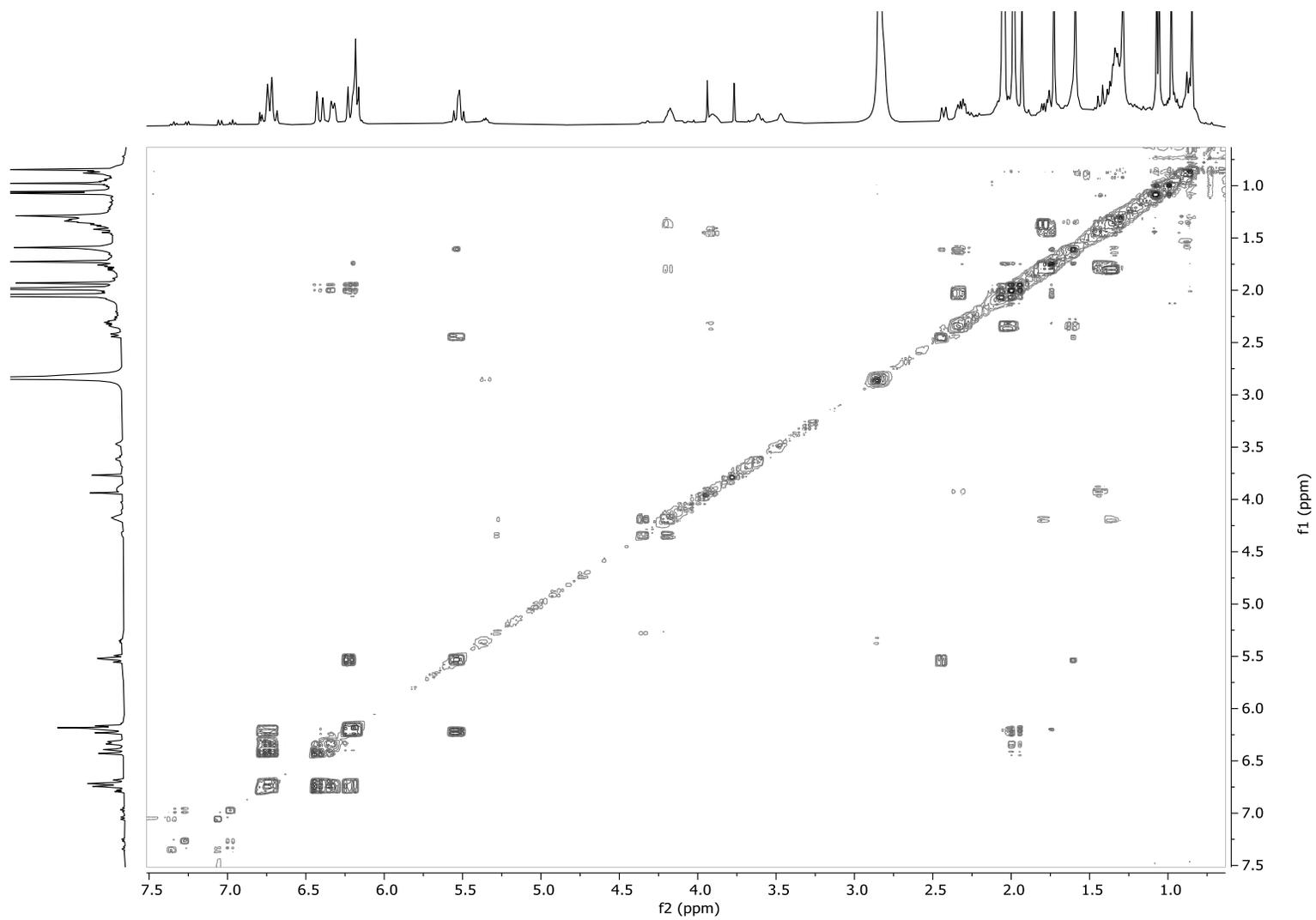


Espectro HMBC de VI y VII (MeOH-*d*₄)

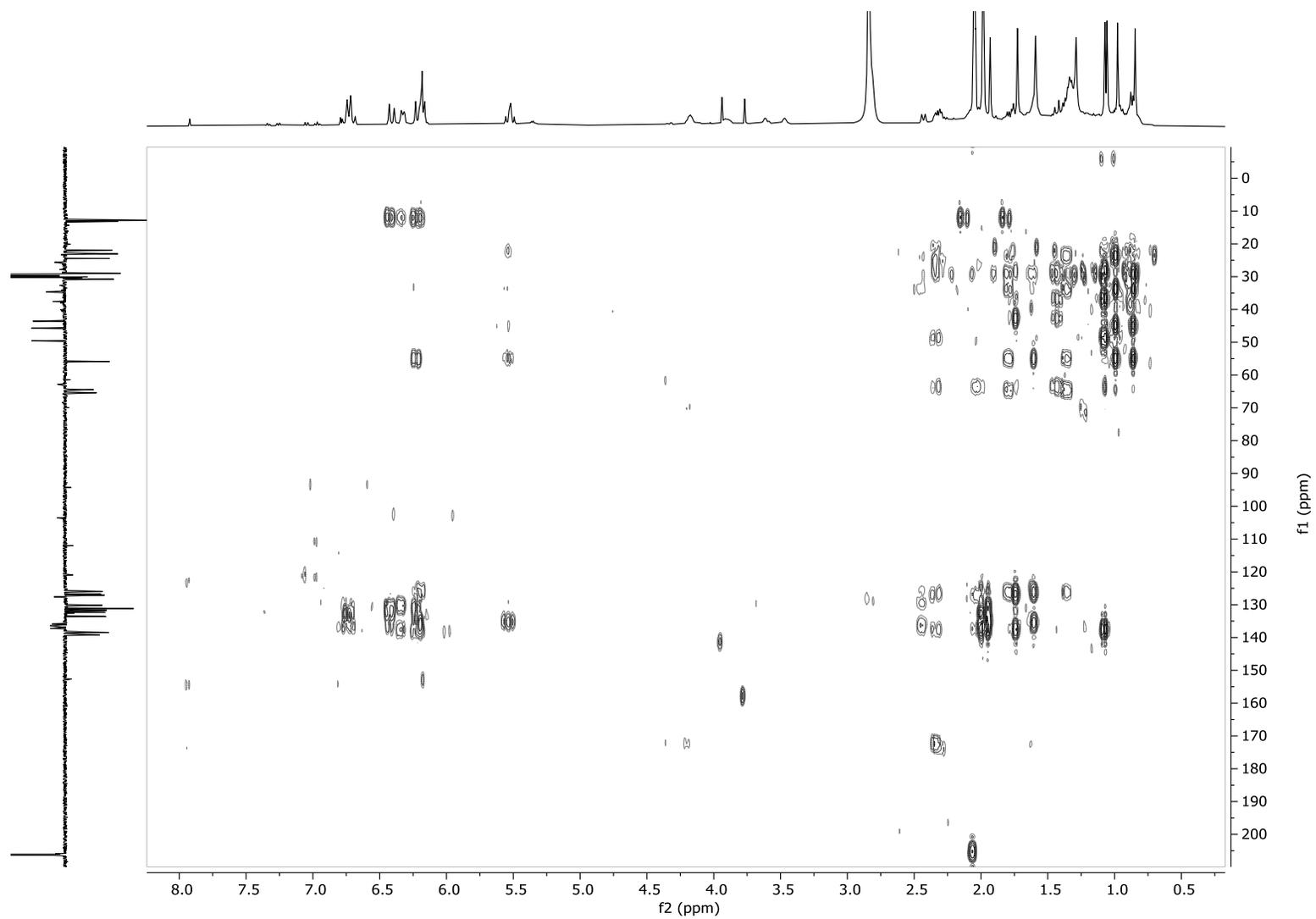
Apéndice A-7. Espectros de RMN del compuesto IX



Espectro HSQC de IX (Acetona- d_6)

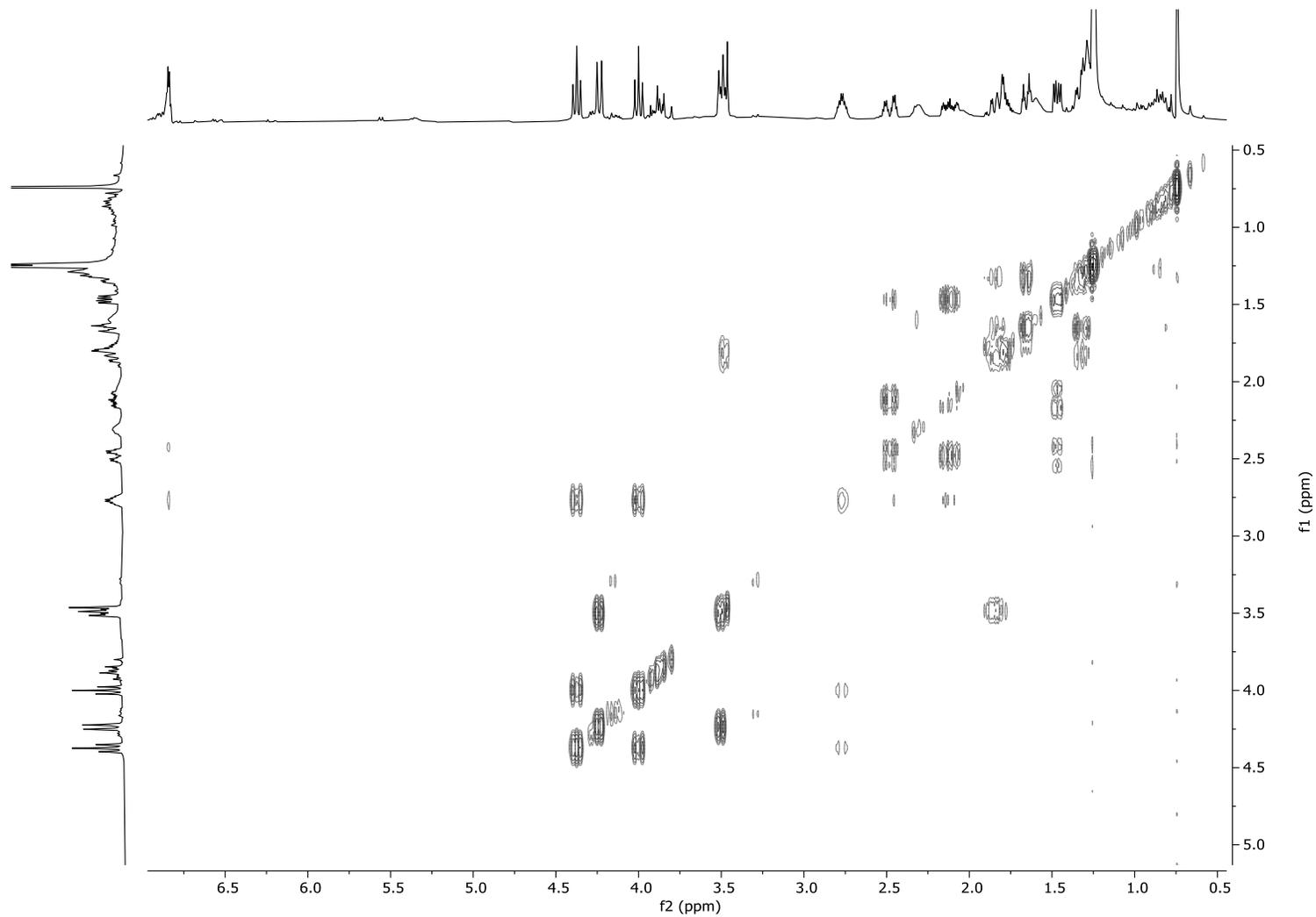


Espectro COSY 2D de IX (Acetona-*d*₆)

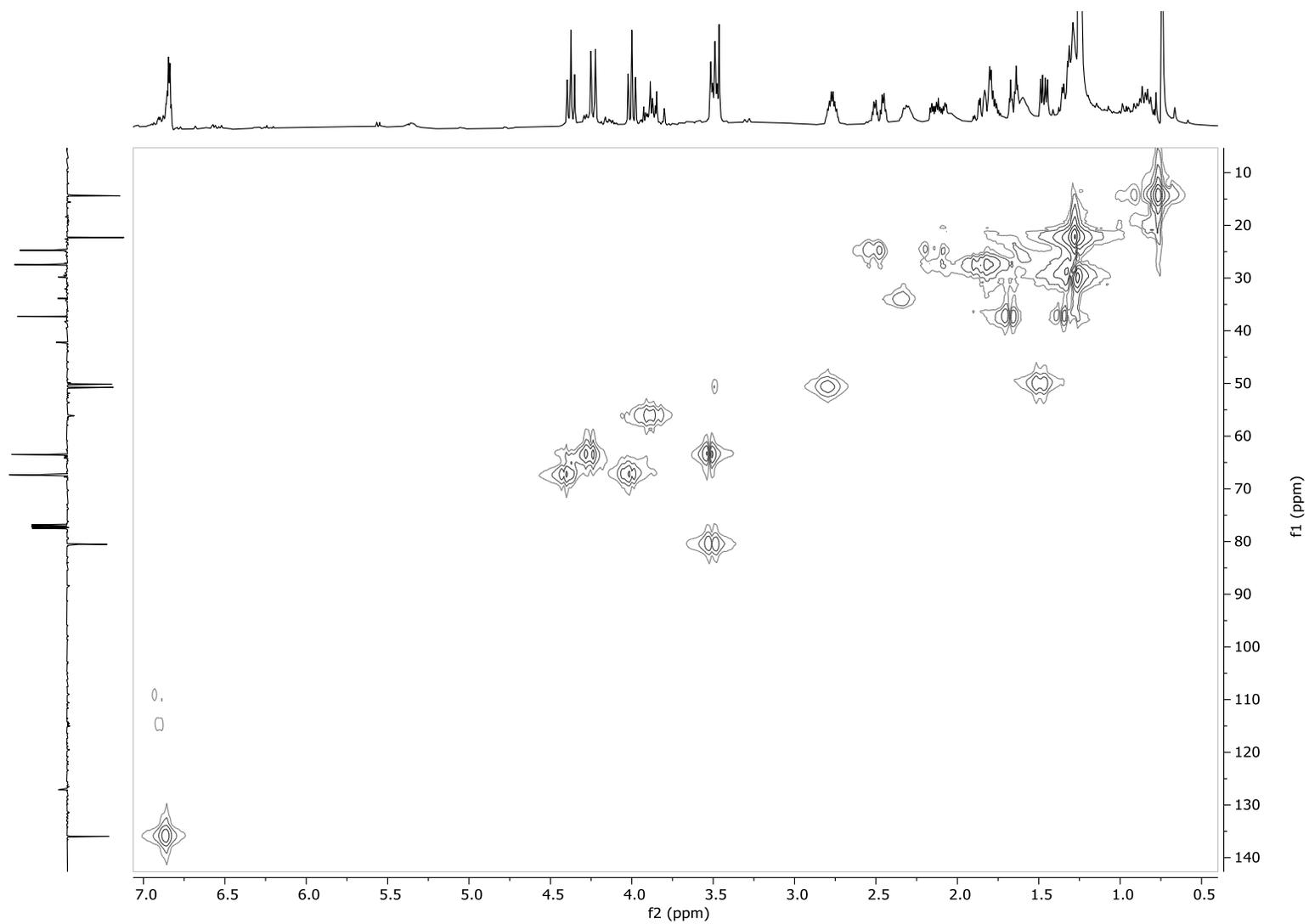


Espectro HMBC de IX (Acetona- d_6)

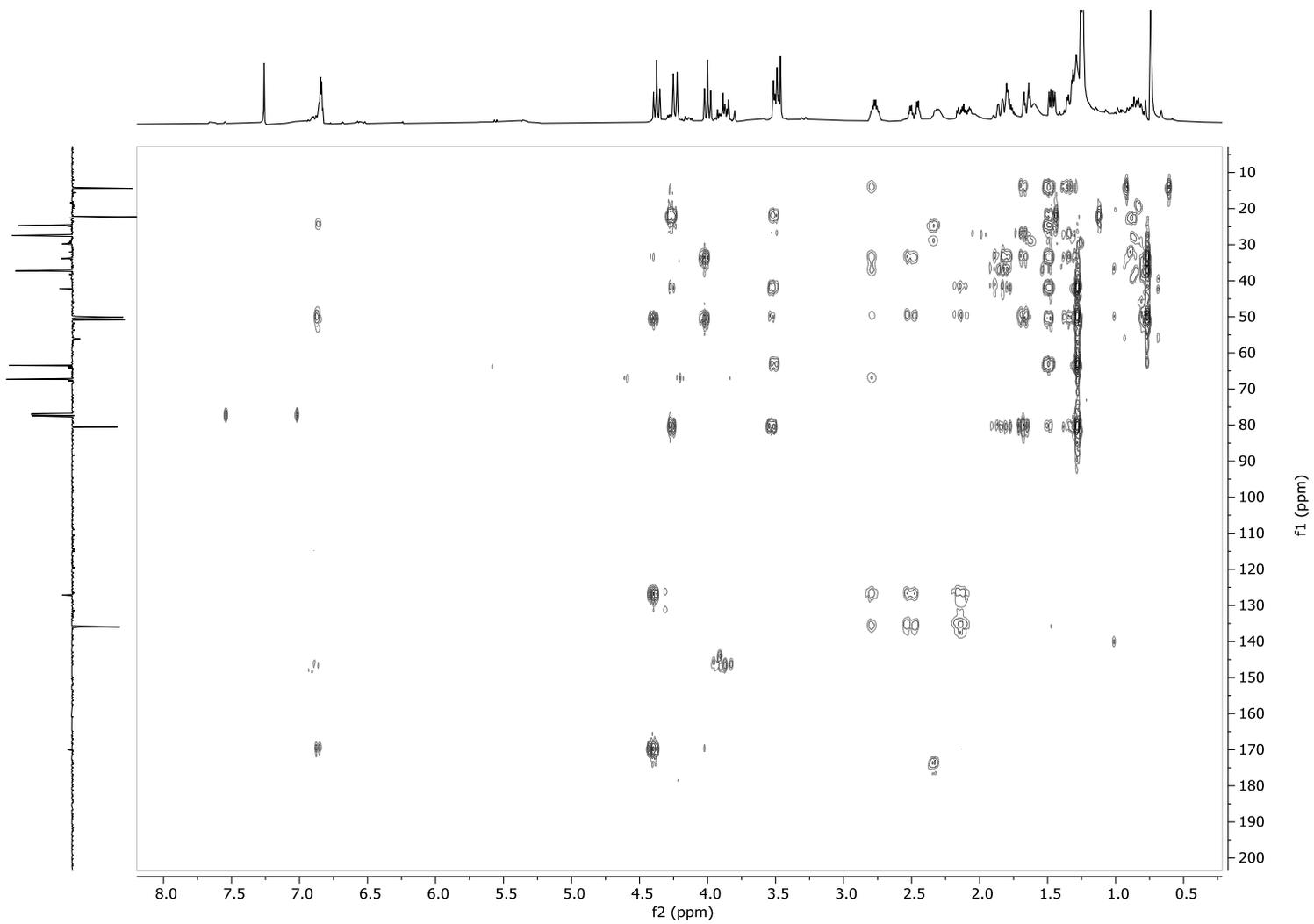
Apéndice A-8. Espectros de RMN del compuesto X



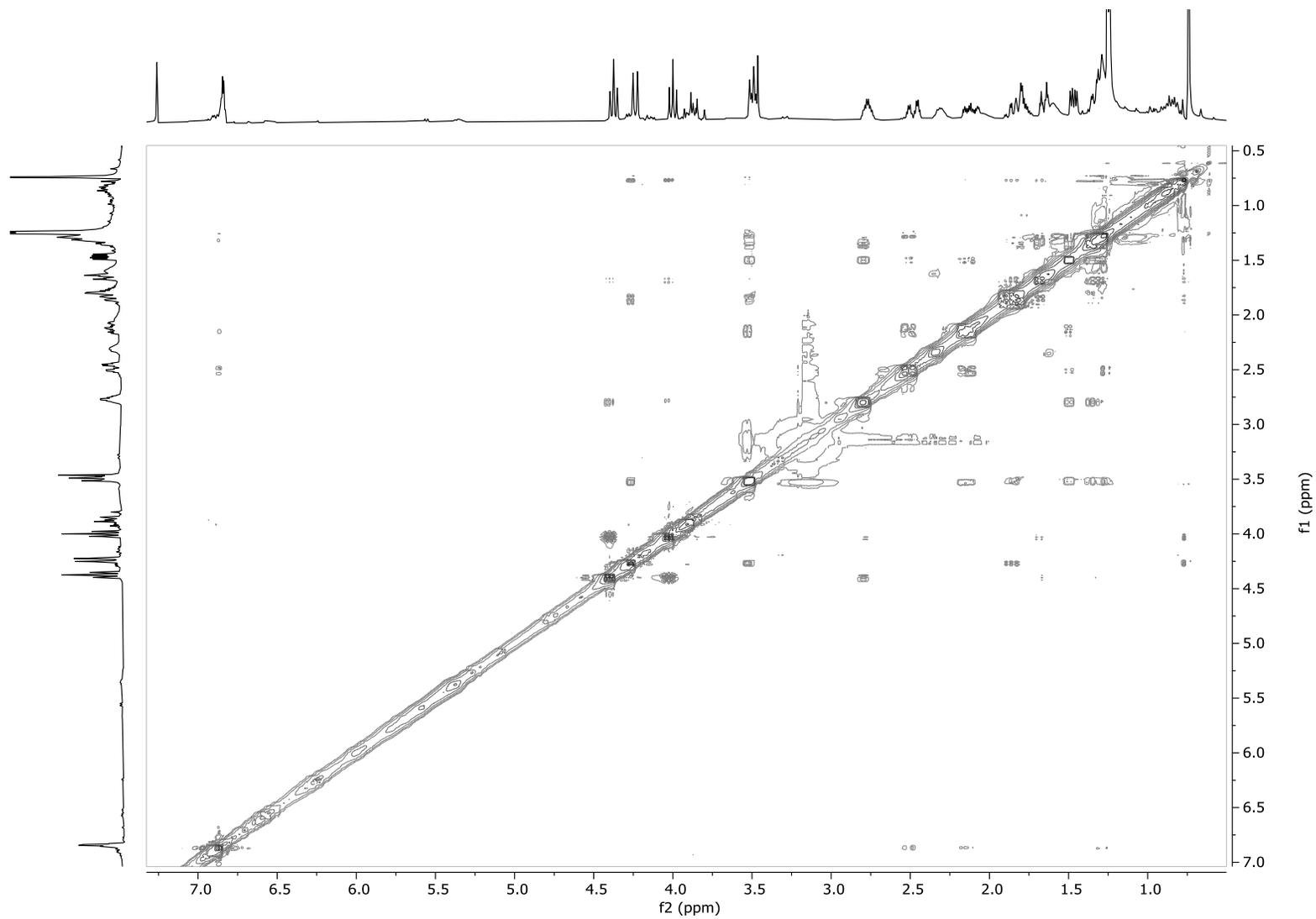
Espectro COSY 2D de X (CDCl₃)



Espectro HMQC de X (CDCl_3)



Espectro HMBC de X (CDCl₃)

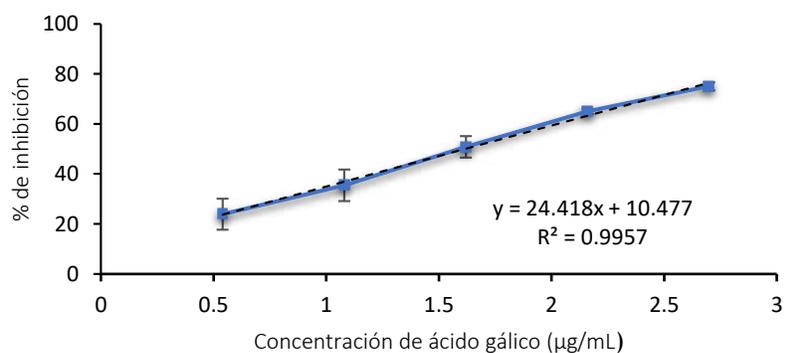


Espectro NOESY 2D de X (CDCl₃)

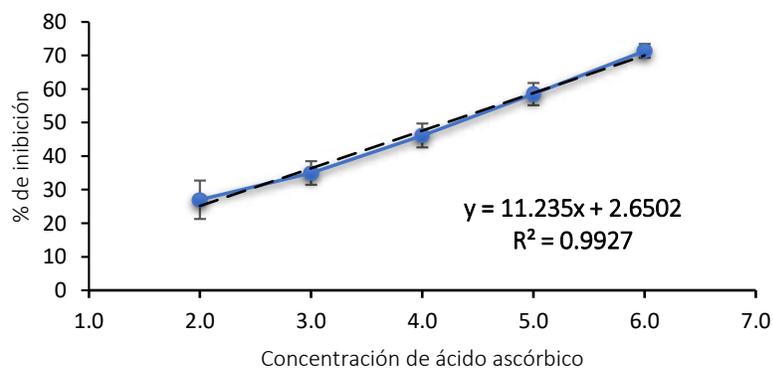
Apéndice B. Curvas de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante frente al radical libre DPPH*

Apéndice B-1. Curvas de calibración de los controles (ácido gálico, ácido ascórbico y ácido clorogénico) para el cálculo del IC₅₀ frente al radical libre DPPH*

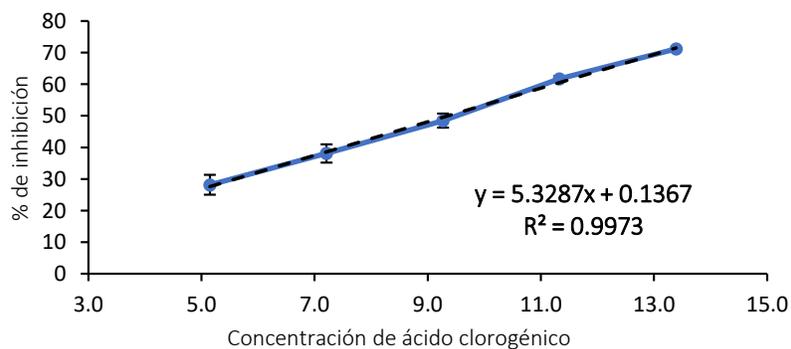
Ácido gálico



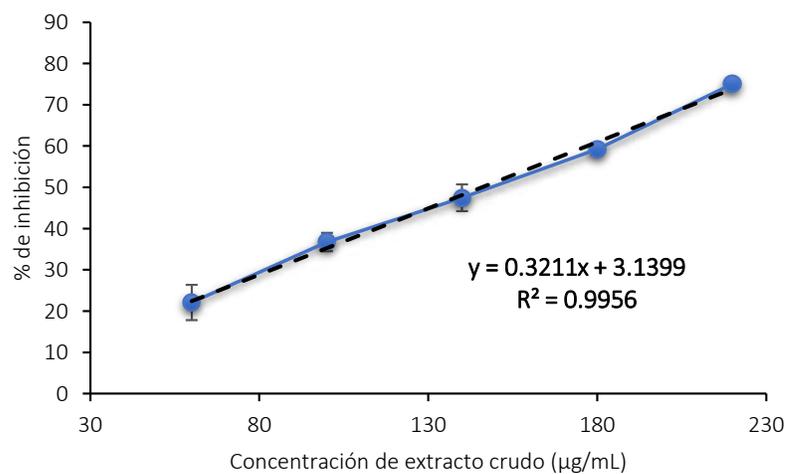
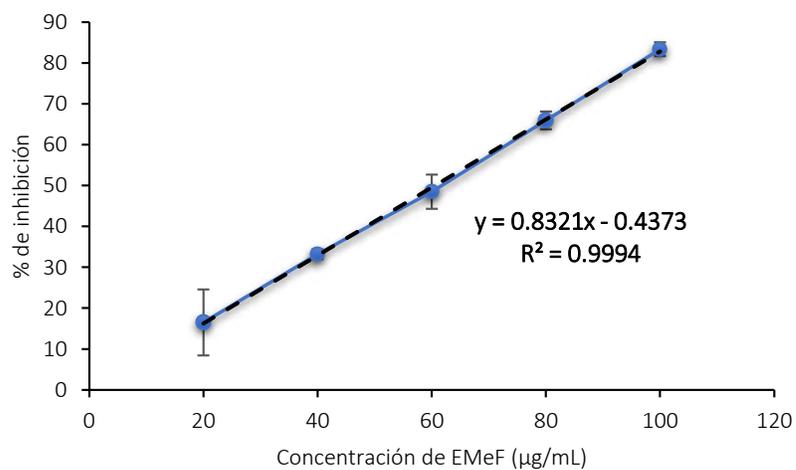
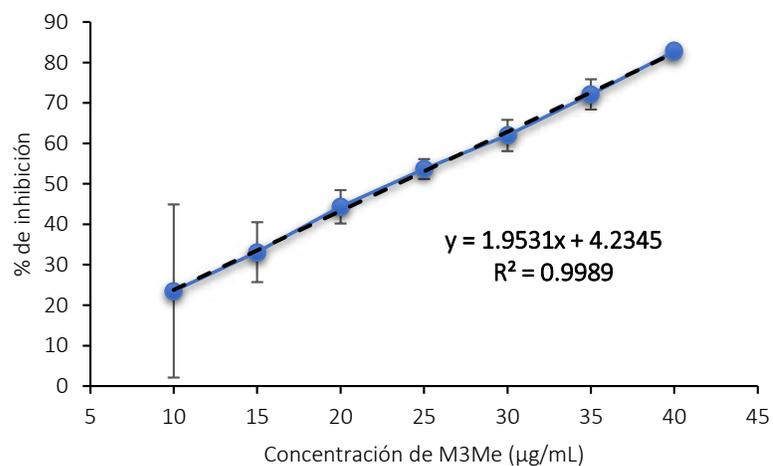
Ácido ascórbico



Ácido clorogénico



Apéndice B-2. Curvas de calibración de las fracciones M3Me, EMeF y del extracto metanólico crudo para el cálculo del IC₅₀ frente al radical libre DPPH[•].



Apéndice B-3. Cálculos realizados para la prueba de rangos múltiples de Duncan

	Muestras		
	M3Me	EMeF	Crudo
1	22.211	60.244	146.563
2	23.625	61.839	144.753
3	24.401	60.156	146.427
Sumatoria	70.237	182.239	437.743
Promedio	23.412	60.746	145.914
n	3	3	3
N	9		

	X ² M3Me	X ² EMeF	X ² Crudo
	493.329	3629.340	21480.713
	558.141	3824.062	20953.431
	595.409	3618.744	21440.866
Sumatoria x²	1646.878	11072.146	63875.010
Suma de cuadrados (SS)	2.465891	1.794753	2.032291

$$SS = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n} \quad SE = \sqrt{\frac{\sum SS}{k(n-1)}}$$

Sumatoria de suma de cuadrados	6.293	
Error estándar (SE)	1.024	
Grados de libertad (N - k)	6	
Rango menor (α = 5%)	2	3
rp (De tablas)	3.461	3.587

$$R_p = SE * rp * \sqrt{\frac{1}{n}}$$

	2 grupos	3 grupos
Rp	2.046	2.121
Dif. M3Me y EMeF	37.334	2.046
Dif. Crudo y EMeF	85.168	2.046
Dif. Crudo y M3Me	122.502	2.121

La diferencia entre las medias de cada par de muestras es mayor al valor de Rp calculado, por lo que la diferencia entre medias es significativa para cada caso.

11. REFERENCIAS

-
- ¹ Dempster L. *Galium mexicanum* (Rubiaceae) of Central America and western North America. *Madroño*. **1976**; 23(7), 378-376. Disponible en: { HYPERLINK "<https://www.jstor.org/stable/41424068?seq=1>" }
- ² *Galium mexicanum* Kunth. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Visitado el 12 de mayo del 2022. Disponible en <https://tropicos.org/name/27900178>
- ³ Bolívar, P., Cruz-Paredes, C., Hernández, L. R., Juárez, Z. N., Sánchez-Arreola, E., Av-Gay, Y., y Bach, H. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**; 137, 141-147.
- ⁴ Lira-De León, K. I., Herrera-Martínez, M., Ramirez-Mares, M. V., y Hernández-Carlos, B. Evaluation of anticancer potential of eight vegetal species from the state of Oaxaca. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. **2017**; 14(3), 61-73.
- ⁵ Handa, S. S. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. En Handa, S. S., Singh, K. S. P., Longo, G., y Rakesh, D. D. (Eds.) *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste, Italia: International Centre for Science and High Technology. **2008**; pp. 22-28.
- ⁶ Palma, M., Barbero, G. F., Piñeiro, Z., Liazid, A., Barroso, C. G., Rostagno, M. A., Prado, J. M., y Meireles, M. A. A. Extraction of natural products: Principles and fundamental aspects. En Rostagno, M. A., y Prado, J. M. (Eds.) *Natural Products Extraction: Principles and Applications*, RSC. **2013**; 55-88.
- ⁷ Azwanida, N. N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength, and limitation. *Medicinal and Aromatic Plants*. **2015**; 4(196).
- ⁸ Prakash, M. J., Manikandan, S., Vigna, N. S., y Dinesh, R. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arabian Journal of Chemistry*. **2013**; 10(1), 1145-1157.
- ⁹ Oniszczuk, A., y Podgórski, R. Influence of different extraction methods on the quantification of selected flavonoids and phenolic acids from *Tilia cordata* inflorescence. *Industrial Crops and Products*. **2015**; 76, 509-514

-
- ¹⁰ Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., y Crouch, S. R. *Fundamentos de química analítica*. De la Mora L. E., y Torres, F. J. M. (Trad). Novena Edición. México, Cengage Learning. **2014**; pp. 861-883
- ¹¹ Harris D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. Eighth Edition. Nueva York. W. H. Freeman and Company. **2010**; pp. 542-560
- ¹² FAO. Norma general para los aditivos alimentarios CODEX-STAN 192-1995. **1995**; Disponible en http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf
- ¹³ Abdel-Rahman, A., Anyangwe, N., Carlacci, L., Casper, S., Danam, R. P., Enongene, E., Erives, G., Fabricant, G., Hilmas, C. G., Hines, F., Howard, P., Levy, D., Lin, Y., Moore, R. J., Pfeiler, E., Thurmond, T. S., Turujman, S., y Walker, N. J. The safety and regulation of natural products used as foods and food ingredients. *Toxicological Sciences*. **2011**; 123(2), 333-348.
- ¹⁴ Gyawali, R., y Ibrahim, S. A. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, **2014**; 46, 412-429.
- ¹⁵ Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., y Hernández-Carlos, B. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. En Shalaby, E. (Ed.) *Antioxidants*. IntechOpen, **2019**.
- ¹⁶ Julián-Loeza, A. P., Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., Sánchez-Guzmán, B. S., y Salas-Coronado, R. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. *Industrial Crops and Products*. **2011**; 34(2), 1262-1268.
- ¹⁷ Mavi, A., Terzi, Z., Özgen, U., Yildirim, A., y Coşkun, M. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *malva neglecta* (malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum subsp. verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2004**; 27(5), 702-705.
- ¹⁸ Lakić, N. S., Mimica-Dukić, N. M., Isak, J. M., y Božin, B. N. Antioxidant properties of *Galium verum* L. (Rubiaceae) extracts. *Central European journal of biology*. **2010**; 5(3), 331-337.
- ¹⁹ Friscic, M., Baglama, M. S., Milovic, M., Pilepic, K. H., y Males, Z. Content of bioactive constituents and antioxidant potential of *Galium* L. species. *Croatica Chemica Acta*. **2018**; 91(3), 411-418.

-
- ²⁰ Senio, S., Pereira, C., Vaz, J., Sokovic, M., Barros, L., y Ferreira, I. C. Dehydration process influences the phenolic profile, antioxidant and antimicrobial properties of *Galium aparine* L. *Industrial Crops and Products*. **2018**; *120*, 97-103.
- ²¹ Bokhari, J., Khan, M. R., Shabbir, M., Rashid, U., Jan, S., y Zai, J. A. Evaluation of diverse antioxidant activities of *Galium aparine*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2013**; *102*, 24-29.
- ²² Milić, P. S., Stanojević, L. P., Rajković, K. M., Milić, S. M., Nikolić, V. D., Nikolić, L. B., y Veljković, V. B. Antioxidant activity of *Galium mollugo* L. extracts obtained by different recovery techniques. *Hemijska industrija*. **2013**; *67*(1), 89-94.
- ²³ Kumar, S. A. Medicinal plants: Future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine*. **2016**; *4*(4), 59-64.
- ²⁴ Verpoorte, R. Secondary metabolism. En Verpoorte, R. y Alfermann, A.W. (Eds.) *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers. **2000**; pp. 1-29
- ²⁵ Baikar, S., y Malpathak, N. Secondary metabolites as DNA topoisomerase inhibitors: A new era towards designing of anticancer drugs. *Pharmacognosy Reviews*. **2010**; *4*(7), 12-26
- ²⁶ Kumari, P., Kumari, C., y Shekhar, S. P. Phytochemical Screening of Selected Medicinal Plants for Secondary Metabolites. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*. **2017**; *3*(4), 1151-1157.
- ²⁷ Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., y Georgiev, M. I. Terpenoids. En Badal S. y Delgoda R. (Eds.) *Pharmacognosy*. Academic Press. **2017**; pp. 233-266.
- ²⁸ Serrilli, A. M., Ramunno, A., Amicucci, F., Chicarella, V., Santoni, S., Ballero, M., Serafini, y M., Bianco, A. Iridoidic pattern in endemic Sardinian plants: the case of *Galium* species. *Natural Product Research*. **2008**; *22*(7), 618-622.
- ²⁹ Tzakou, O., Mylonas, P., Vagias, C., y Petrakis, P. V. Iridoid glucosides with insecticidal activity from *Galium melanantherum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. **2007**; *62*(7-8), 597-602.
- ³⁰ Güvenalp, Z., Kazaz, C., Kaya, Y., y Demirezer, L. Ö. Phytochemical investigation on *Galium humifusum* growing in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2006**; *12*(34), 894-896.

-
- ³¹ Demirezer, L. Ö., Gürbüz, F., Güvenalp, Z., Ströch, K., y Zeeck, A. Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum subsp. verum*. *Turkish Journal of Chemistry*. **2006**; 30(4), 525-534.
- ³² Güvenalp, Z., Kilic, N., Kazaz, C., Kaya, Y., y Demirezer, L. Ö. Chemical constituents of *Galium tortumense*. *Turkish Journal of Chemistry*. **2006**; 30(4), 515-523.
- ³³ Deliorman, D., Calis, I., y Ergun, F. Iridoids from *Galium aparine*. *Pharmaceutical Biology*. **2001**; 39(3), 234-235.
- ³⁴ Handjieva, N., Mitova, M., Ancev, M., y Popov, S. Iridoid glucosides from *Galium album* and *G. lovcense*. *Phytochemistry*. **1996**; 43(3), 625-628.
- ³⁵ Rios, G. M. Y. Química y farmacología de iridoideas. En Delgado, G. y Romo, V. A.(Eds.) *Temas Selectos de Química de Productos Naturales*. México, UNAM. **2015**; pp. 95-133
- ³⁶ Fouillaud, M., Caro, Y., Venkatachalam, M., Grondin, I., y Duffosé, L. Anthraquinones. En Nollet, L. M. L. y Gutierrez-Urbe, J. A. (Eds). *Phenolic Compounds in Food. Characterization and Analysis*. CRC Press. **2018**; pp. 130-170.
- ³⁷ Zhao, C. C., Shao, J. H., Li, X., Xu, J., y Wang, J. H. A new anthraquinone from *Galium verum L.* *Natural Product Research*. **2006**; 20(11), 981-984.
- ³⁸ El-Gamal, A. A., Takeya, K., Itokawa, H., Halim, A. F., Amer, M. M., Saad, H. E., y Awad, S. A. Anthraquinones from the polar fractions of *Galium sinaicum*. *Phytochemistry*. **1996**; 42(4), 1149-1155.
- ³⁹ El-Gamal, A. A., Takeya, K., Itokawa, H., Halim, A. F., Amer, M. M., Saad, H. E. A., y Awad, S. A. Anthraquinones from *Galium sinaicum*. *Phytochemistry*. **1995**; 40(1), 245-251.
- ⁴⁰ Koyama, J., Ogura, T., y Tagahara, K. Anthraquinones of *Galium spurium*. *Phytochemistry*. **1993**; 33(6), 1540-1542.
- ⁴¹ Duval, J., Pecher, V., Poujol, M., y Lesellier, E. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Industrial Crops and Products*. **2016**; 94, 812-833.
- ⁴² Crozier, A., Jaganath, I. B., y Clifford, M. N. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. En Crozier, A., Clifford, M. N., y Ashihara, H. (Eds). *Plant Secondary Metabolites*.

Ocurrence, Structure and Role in the Human Diet. Oxford: Blackwell Publishing. **2006**; pp. 1-24.

⁴³ Panche, A., Diwan, A., y Chandra, S. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*. **2016**; 5, doi:10.1017/jns.2016.41.

⁴⁴ Mocan, A., Crisan, G., Vlase, L., Ivanescu, B., Badarau, A. S., y Arsene, A. L. Phytochemical investigations on four *Galium* species (*Rubiaceae*) from Romania. *Farmacía*. **2016**; 64(1), 95-99.

⁴⁵ Zhao, C. C., Shao, J. H., Li, X., Kang, X. D., Zhang, Y. W., Meng, D. L., y Li, N. Flavonoids from *Galium Verum* L. *Journal of Asian Natural Products Research*. **2008**; 10(7), 611-615

⁴⁶ Kumar, S., y Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The scientific World Journal*. **2013**; Article ID 162750.

⁴⁷ Humphrey, A. J., y Beale, M. H. Terpenes. En Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (Eds). *Plant Secondary Metabolites. Ocurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford: Blackwell Publishing. **2006**; pp. 47-101.

⁴⁸ De Rosa, S., Iodice, C., Mitova, M., Handjieva, N., Popov, S., y Anchev, M. Triterpene saponins and iridoid glucosides from *Galium rivale*. *Phytochemistry*. **2000**; 54(8), 751-756.

⁴⁹ Dzubak, P., Hajdich, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M. y Sarek, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports*. **2006**; 23(3), 394-411.

⁵⁰ Mambu, L., y Grellier, P. Antimalarial compounds from traditionally used medicinal plants. En Colegate, S. M., y Molyneux, R. J. *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation, and Structural Determination. Second Edition*. CRC Press Taylor and Francis Group. **2008**; pp. 492-522.

⁵¹ Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, G., y Borges, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *Biomed Research International*. **2013**; Article ID 251754.

⁵² Jaiswal, R., Matei, M. F., Deshpande, S., y Kuhnert, N. Identification and characterization of hydroxycinnamates of six *Galium* species from the *Rubiaceae* family. En R. A. Meyers (Ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. **2014**; 20 pp.

-
- ⁵³ Yang, J., Cai, X., Mu, S., y Yang, X. Phenolic compounds from *Galium aparine* var. *tenerum*. *China Journal of Chinese Materia Medica*. **2009**; 34(14), 1802-1804.
- ⁵⁴ El-Seedi, H. R., El-Said, A. M. A., Khalifa, S. A. M., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A. K., y Verpoorte, R. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**; 60, 10877-10895.
- ⁵⁵ Wade, L. G. *Química orgánica*. Volumen 1. Séptima Edición. Lanto, A. M. A., y Fernández, E. L. (Trad.). México. Pearson educación. **2011**; pp. 510-616.
- ⁵⁶ Byrne, L. T. Nuclear magnetic resonance spectroscopy: strategies for structural determination. En Colegate, S. M., y Molyneux, R. J. *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation, and Structural Determination. Second Edition*. CRC Press Taylor and Francis Group. **2008**; pp. 77-112.
- ⁵⁷ Skoog, D. A., Holler, F. J., y Crouch, S. R. *Principios de análisis instrumental*. Sexta edición. Anzures, M. B. J. (Trad.) México, Cengage Learning. **2008**; pp. 498-549.
- ⁵⁸ Breton, R. C., y Reynolds, W. F. Using NMR to identify and characterize natural products. *Natural Product Reports*. **2013**; 30(4), 501-524.
- ⁵⁹ Maas, M., Petereit, F., y Hensel, A. Caffeic acid derivatives from *Eupatorium perfoliatum* L. *Molecules*. **2009**; 14(1), 36-45.
- ⁶⁰ Takenaka, M., Yan, X., Ono, H., Yoshida, M., Nagata, T., y Nakanishi, T. Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**; 51(3), 793-796.
- ⁶¹ Fondo mundial para la naturaleza. Oaxaca. **s.f.**; Recuperado de https://www.wwf.org.mx/que_hacemos/programas/oaxaca/#:~:text=Oaxaca%20es%20el%20estado%20que,especies%20presentes%20en%20el%20pa%C3%ADs.
- ⁶² Leonti, M., Sticher, O., y Heinrich, M. Antiquity of medicinal plant usage in two Macro-Mayan ethnic groups (México). *Journal of Ethnopharmacology*. **2003**; 88(2-3), 119-124.
- ⁶³ Alam, M. N., Bristi, N. J., y Rafiqzaman, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **2013**; 21(2), 143-152.

-
- ⁶⁴ Frezza, C., Venditti, A., De Vita, D., Toniolo, C., Franceschin, M., Ventrone, A., Tomassini, L., Foddai, S., Guiso, M., Nicoletti, M., Bianco, A., y Serafini, M. Phytochemistry, chemotaxonomy, and biological activities of the *Araucariaceae* family—a Review. *Plants*. **2020**; *9*(7), 888.
- ⁶⁵ Rivera, G., Bocanegra-García, V., y Monge, A. Traditional plants as source of functional foods: a review. *CyTA-Journal of Food*. **2010**; *8*(2), 159-167.
- ⁶⁶ Ilina, T., Kashpur, N., Granica, S., Bazylko, A., Shinkovenko, I., Kovalyova, A., Goryacha, O. y Koshovyi, O. Phytochemical profiles and in vitro immunomodulatory activity of ethanolic extracts from *Galium aparine* L. *Plants*. **2019**; *8*(12), 541.
- ⁶⁷ Atmaca, H., Bozkurt, E., Cittan, M., y Tepe, H. D. Effects of *Galium aparine* extract on the cell viability, cell cycle and cell death in breast cancer cell lines. *Journal of ethnopharmacology*. **2016**; *186*, 305-310.
- ⁶⁸ Manzione, M. G., Martorell, M., Sharopov, F., Bhat, N. G., Kumar, N.V. A., Fokou, P. V. T. y Pezzani, R. Phytochemical and pharmacological properties of asperuloside, a systematic review. *European Journal of Pharmacology*. **2020**; *883*.
- ⁶⁹ Lötjönen, S., y Hynninen, P. H. Carbon-13 NMR spectra of chlorophyll a, chlorophyll a', pyrochlorophyll a and the corresponding pheophytins. *Organic Magnetic Resonance*. **1983**; *21*(12), 757-765.
- ⁷⁰ Taskova, R., Mitova, M., Evstatieva, L., Ancev, M., Peev, D., Handjieva, N. y Popov, S. Iridoids, flavonoids and terpenoids as taxonomic markers in *Lamiaceae*, *Scrophulariaceae* and *Rubiaceae*. *Bocconea*. **1997**; *5*(2), 631-636.
- ⁷¹ Roslund, M. U., Tähtinen, P., Niemitz, M., y Sjöholm, R. Complete assignments of the ¹H and ¹³C chemical shifts and $J_{H, H}$ coupling constants in NMR spectra of D-glucopyranose and all D-glucopyranosyl-D-glucopyranosides. *Carbohydrate Research*. **2008**; *343*(1), 101-112.
- ⁷² Al-Hamoud, G. A., Orfali, R. S., Takeda, Y., Sugimoto, S., Yamano, Y., Al Musayeib, N. M. y Matsunami, K. Lasianosides F–I: A new iridoid and three new bis-iridoid glycosides from the leaves of *Lasianthus verticillatus* (Lour.) Merr. *Molecules*. **2020**; *25*(12), 2798.
- ⁷³ Lu, X. L., Cao, X., Liu, X. Y., Long, C., Liu, J. H., Xu, Q. Z. y Jiao, B. H. Iridoid glycosides from *Saprosma ternatum*. *Planta medica*. **2010**; *76*(15), 1746-1748.

-
- ⁷⁴ Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., y XiaoHui, Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2018**; *97*, 67-74.
- ⁷⁵ Giang, V. H., Ban, N. K., Linh, T. M., Nhiem, N. X., Dung, D. T., Tai, B. H. y Van Kiem, P. Iridoid glycosides from *Morinda tomentosa* and their endoplasmic reticulum stress modulation activity. *Vietnam Journal of Chemistry*. **2015**; *53(2e)*, 112-115.
- ⁷⁶ Danila, A. O., Gatea, F. y Radu, G. L. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. *Chemistry of Natural Compounds*. **2011**; *47(1)*, 22-26.
- ⁷⁷ Valentová, K., Vrba, J., Bancířová, M., Ulrichová, J. y Křen, V. Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*. **2014**; *68*, 267-282.
- ⁷⁸ Ganeshpurkar, A., y Saluja, A. K. The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **2017**; *25(2)*, 149-164.
- ⁷⁹ Riaz, A., Rasul, A., Hussain, G., Zahoor, M. K., Jabeen, F., Subhani, Z., y Selamoglu, Z. Astragalín: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Advances in Pharmacological Sciences*, **2018**; Article ID 9794625.
- ⁸⁰ Guillén, M. D., y Ruiz, A. ¹H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2003**; *105(9)*, 502-507.
- ⁸¹ Ododo, M. M., Choudhury, M. K., y Dekebo, A. H. Structure elucidation of β -sitosterol with antibacterial activity from the root bark of *Malva parviflora*. *SpringerPlus*. **2016**; *5(1)*, 1-11.
- ⁸² Ambavade, S. D., Misar, A. V., y Ambavade, P. D. Pharmacological, nutritional, and analytical aspects of β -sitosterol: a review. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. **2014**; *14(3)*, 193-211.
- ⁸³ Englert, G. NMR of carotenoids. In *Carotenoid Chemistry and Biochemistry*, **1982**; pp. 107-134. Pergamon.
- ⁸⁴ Prapalert, W., Santiarworn, D., Liawruangrath, S., Liawruangrath, B., y Pyne, S. G. The isolation of lutein and lutein 3'-methyl ether from *Peristrophe lanceolaria*. *Natural Product Communications*. **2016**; *11(12)*, 1793-1795.

-
- ⁸⁵ Alves-Rodrigues, A., y Shao, A. The science behind lutein. *Toxicology Letters*. **2004**; 150(1), 57-83.
- ⁸⁶ Wang, B. L., Gao, H. T., y Li, W. D. Z. Total synthesis of (+)-iresin. *The Journal of Organic Chemistry*. **2015**; 80(10), 5296-5301.
- ⁸⁷ Wube, A. A., Bucar, F., Gibbons, S., Asres, K., Rattray, L., y Croft, S. L. Antiprotozoal activity of drimane and coloratane sesquiterpenes towards *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Phytotherapy Research*. **2010**; 24(10), 1468-1472.
- ⁸⁸ Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., y Farah, H. Antioxidant activity of some common plants. *Turkish Journal of Biology*. **2008**; 32(1), 51-55.
- ⁸⁹ Xu, J. G., Hu, Q. P., y Liu, Y. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**; 60(46), 11625-11630.
- ⁹⁰ Bandonienė, D., Murkovic, M., Pfannhauser, W., Venskutonis, P., y Gruzdienė, D. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH[•] free radical and on-line HPLC-DPPH[•] methods. *European Food Research and Technology*. **2002**; 214(2), 143-147.
- ⁹¹ Wang, S., Li, Y., Meng, X., Chen, S., Huang, D., Xia, Y., y Zhu, S. Antioxidant activities of chlorogenic acid derivatives with different acyl donor chain lengths and their stabilities during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*. **2021**; 357, 129904.
- ⁹² Li, X., Jiang, Q., Wang, T., Liu, J., y Chen, D. Comparison of the antioxidant effects of quercitrin and isoquercitrin: Understanding the role of the 6''-OH group. *Molecules*. **2016**; 21(9), 1246.
- ⁹³ Wang, L., Yang, X., Qin, P., Shan, F., y Ren, G. Flavonoid composition, antibacterial and antioxidant properties of tartary buckwheat bran extract. *Industrial Crops and Products*. **2013**; 49, 312-317.
- ⁹⁴ Vavříková, E., Langschwager, F., Jezova-Kalachova, L., Křenková, A., Mikulová, B., Kuzma, M., y Valentová, K. Isoquercitrin esters with mono- or dicarboxylic acids: Enzymatic preparation and properties. *International Journal of Molecular Sciences*. **2016**; 17(6), 899.
- ⁹⁵ Zou, Y., Lu, Y., y Wei, D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**; 52(16), 5032-5039.

-
- ⁹⁶ Rusmana, D., Wahyudianingsih, R., Elisabeth, M., Balqis, B., Maesaroh, M., y Widowati, W. Antioxidant activity of *Phyllanthus niruri* extract, rutin and quercetin. *The Indonesian Biomedical Journal*. **2017**; 9(2), 84-90.
- ⁹⁷ Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. D., Coube, C. S., y Leitão, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH· free radical method. *Phytotherapy Research*. **2001**; 15(2), 127-130.
- ⁹⁸ Li, X., Tian, Y., Wang, T., Lin, Q., Feng, X., Jiang, Q., y Chen, D. Role of the *p*-coumaroyl moiety in the antioxidant and cytoprotective effects of flavonoid glycosides: comparison of astragalín and tiliroside. *Molecules*. **2017**; 22(7), 1165.
- ⁹⁹ Park, S. N., Kim, S. Y., Lim, G. N., Jo, N. R., y Lee, M. H. *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. **2012**; 18(2), 680-683.
- ¹⁰⁰ Ding, H. Y. Extracts and constituents of *Rubus chingii* with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH·) free radical scavenging activity. *International Journal of Molecular Sciences*. **2011**; 12(6), 3941-3949.
- ¹⁰¹ Rasulev, B. F., Abdullaev, N. D., Syrov, V. N., y Leszczynski, J. A quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of the antioxidant activity of flavonoids. *QSAR & Combinatorial Science*. **2005**; 24(9), 1056-1065.