



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA FRACCIÓN  
METANÓLICA FRACC. 2A NATURAL Y ACETILADA DE LAS HOJAS  
DE *Eysenhardtia platycarpa***

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

P R E S E N T A:

*Cinthia Sofía Espinal Nájera*

Para obtener el Título de Bióloga

**DIRECTORA:**

**DRA. MARÍA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMÍREZ**

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2021



EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO 325 DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. María Luisa Del Carmen Garduño Ramírez quien con sus conocimientos y apoyo me guio a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados buscados, por darme la oportunidad de trabajar con ella, por ser mi ejemplo a seguir no solo en lo académico sino también como persona siendo integra y fiel a sus principios.

También quiero agradecer a mi sínodo, el doctor Jonathan Cortes por brindarme las herramientas y orientación para la culminación del proyecto, y por compartir su conocimiento.

En especial quiero hacer mención de mis mejores amigos, Estefany García Albavera por cuidar de mí y apoyarme siempre, alegrando mis días con su carácter. A Karina Elizabeth Ríos Ramos por compartir su pasión por las plantas conmigo, a Miguel Ángel Carreño Contreras por hacer mis días más amenos llenándolos de energía y alegría. A Adrián Rojas Romero por hacer de mí alguien más responsable y a Juan Antonio Rodríguez por renovar mi energía con su compañía. Sin ellos la experiencia en la universidad no habría sido tan significativa.

También agradezco a mis papás y hermano, quienes con sus palabras de apoyo y amor incondicional fueron los pilares para realizar esta trayectoria.

Y por último quiero agradecer a mi hermana y Liam quienes son mi mayor fuente de inspiración para seguir superándome.

## **DEDICATORIAS**

A mi papá Justino Espinal Mendoza por darme el mejor regalo que se puede dar a una persona, creer en mí, también por su apoyo incondicional y por alegrarme con su peculiar carácter.

A mi hermana Diana y Liam por iluminar mi vida.

A mi mamá y mi hermano por su confianza y amor incondicional.

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	2
2.1 Radicales libres	2
2.1.1 Especies reactivas de oxígeno	2
2.1.2 Daños de los Radicales libres sobre las macromoléculas biológicas	3
2.1.3 Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial	4
2.1.4 Enfermedades asociadas al estrés oxidativo	5
2.2 Antioxidantes como preventivos de enfermedades	6
2.2.1 Clasificación de antioxidantes	7
2.2.2 Fuente de origen natural de compuestos antioxidantes	8
2.3 <i>Eysenhardtia platycarpa</i> Pennell & Safford descripción botánica	9
2.3.1 Distribución Geográfica	9
<b>3. ANTECEDENTES</b>	10
3.1 Productos naturales aislados de <i>E. platycarpa</i>	10
3.2 Evaluaciones farmacológicas sobre extractos y productos puros de <i>E. platycarpa</i>	11
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	15
<b>5. HIPÓTESIS</b>	15
<b>6. OBJETIVOS</b>	16
6.1 Objetivo general	16
6.2 Objetivos particulares	16
<b>7. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	17
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	19
8.1. Consideraciones Generales	19
8.2 Técnicas de separación cromatográfica	19
8.2.1 Separación de compuestos de la F2A-NAT en CCFP	19
8.3 Reacción de acetilación de la fracción F2A-NAT	21
8.3.1 Mecanismo de la reacción de acetilación	22
8.3.2 Recuperación de la fase orgánica de la reacción de acetilación.	23
8.3.3 Concentración de las fracciones obtenidas en el rotavapor	24
8.3.4 Separación de los compuestos de la Fracción Acetilada (F2A-ACET).	24

8.4 Evaluación de la actividad antioxidante	24
8.5 Caracterización de los componentes de las fracciones 2A-NAT y 2A-ACET.	25
<b>9. RESULTADOS</b>	27
9.1 Separación de compuestos de la F2A-NAT por CCFP.	27
9.2 Reacción de acetilación de la fracción F2A-NAT	28
9.2.1 Recuperación de la fase orgánica de la reacción de acetilación.	29
9.2.2 Separación de compuestos de la F2A-ACET.	30
9.3 Prueba de actividad antioxidante	32
9.3.1 Evaluación del extracto metanólico de las hojas de <i>E. platycarpa</i> y las fracciones F2A-NAT y F2A-ACET.	32
9.3.2 Evaluación de los componentes de la fracción F2A-NAT	33
9.3.3 Evaluación de los componentes de la fracción F2A-ACET.	38
9.4. Caracterización de los componentes	40
9.4.1 Caracterización de los componentes de las fracciones 2A-NAT y 2A-ACET.	40
9.4.2 Caracterización del compuesto EPSEN-C-NAT de la fracción F2A-NAT	44
9.4.3 Caracterización del compuesto EPSEN-D-NAT de la fracción F2A-ACET	46
<b>10. DISCUSIÓN</b>	00
<b>11. CONCLUSIONES</b>	60
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b>	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

## PÁGINA

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de estrés oxidativo que afecta a la mitocondria produciendo más O <sub>2</sub> •	5
<b>Figura 2.</b> Enfermedades asociadas al estrés oxidativo debido al daño a las biomoléculas por las ERO.	6
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de los antioxidantes primarios.	7
<b>Figura 4.</b> <i>Eysenhardtia platycarpa</i> en su hábitat natural en Tetipac, Guerrero (Fotografía propiedad de Garduño Ramírez, M.L., tomada en 2007).	9
<b>Figura 5.</b> Flores de <i>Eysenhardtia platycarpa</i> tomado de Sagarpa. Flora nectarífera y polinífera en el estado de Chiapas.2011.	9
<b>Figura 6.</b> Mapa de distribución de <i>E. platycarpa</i> en la República Mexicana tomado de Enciclopedia of life <a href="http://www.eol.org/pages/416264">http://www.eol.org/pages/416264</a> 2011.	9
<b>Figura 7.</b> Estructura química de los compuestos naturales aislados de <i>E. platycarpa</i>	10
<b>Figura 8.</b> Diagrama de diseño experimental, fraccionamiento del extracto metanólico de <i>E. platycarpa</i>	17
<b>Figura 9.</b> Diagrama de diseño experimental, purificación de compuestos, actividad antioxidante y resonancia magnética nuclear.	18
<b>Figura 10.</b> Diagrama de separación de compuestos en CCFP	20
<b>Figura 11.</b> Mecanismo de reacción de la acetilación de alcoholes.	22
<b>Figura 12.</b> Tratamiento para la recuperación de la fase orgánica de la reacción de acetilación.	23
<b>Figura 13.</b> Método del 2, 2 -difetil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	25
<b>Figura 14.</b> Cromatografía en capa fina preparativa de la <b>F2A-NAT</b> en un sistema de disolventes 3:7 AcOEt: MeOH.	27
<b>Figura 15.</b> Compuestos obtenidos de la CCFP de la a) fracción natural, las cuales fueron nombradas 1) <b>EPSEN-A NAT</b> , 2) <b>EPSEN-B NAT</b> , 3) <b>EPSEN-C NAT</b> , 4) <b>EPSEN-D NAT</b> , 5) <b>EPSEN-E NAT</b> y 6) <b>EPSEN-F NAT</b> y b) CCF de los compuestos en fase normal en un sistema de disolventes 25:75 AcOEt: MeOH. (Considerar las siguientes equivalencias: 1=A, 2=B, 3=C, 4=D, 5=E y 6=F)	27
<b>Figura 16.</b> a) Fracción <b>F2A-NAT</b> y b) fracción de media polaridad <b>F2A-ACET</b> , obtenida de la reacción de acetilación, c) CCF de la <b>F2A-NAT</b> en un sistema de disolventes 3:7 AcOEt: MeOH y d) CCF de la <b>F2A-ACET</b> en un sistema de disolventes 3:7 Hex: AcOEt.	28
<b>Figura 17.</b> Recuperación de la fase orgánica de la fracción <b>F2A-ACET</b>	29
<b>Figura 18.</b> a) CCFP de la <b>F2A-ACET</b> en un sistema de disolventes 3:7 Hex: AcOEt vista bajo una lámpara de Luz UV y b) CCF de los compuestos separados en la CCF. (Considerar las siguientes equivalencias: 1=A, 2=B, 3=C, 4=D, 5=E y 6=F)	30
<b>Figura 19.</b> CCF de los compuestos separados de las fracciones a) <b>F2A-NAT</b> en un sistema de disolventes 25:75 AcOEt: MeOH y b) <b>F2A-ACET</b> en un sistema de disolventes 3:7 Hex: AcOEt.	31
<b>Figura 20.</b> Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones, <b>F2A-NAT</b> a una concentración de a) 10 ppm b) 100 ppm c) 1000 ppm y <b>F2A-ACET</b> a una concentración de d) 10 ppm e) 100 ppm f) 1000 ppm.	33

<b>Figura 21.</b> % de Reducción del radical libre DPPH a una concentración de a) 10 ppm b) 100 ppm y c) 1000 ppm del extracto integro metanólico, la fracción natural F2A-NAT y los compuestos naturales aislados.	35
<b>Figura 22.</b> % de Reducción del radical libre DPPH en las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm del extracto integro metanólico, la fracción natural F2A-NAT y los compuestos naturales aislados.	36
<b>Figura 23.</b> Celdas con DPPH y los compuestos naturales aislados a las concentraciones de a) 10, b) 100 y c) 1000 ppm, cuyas absorbancias fueron leídas en un espectrofotómetro genesys UV.	37
<b>Figura 24.</b> Celdas con DPPH y los compuestos naturales aislados a las concentraciones de a) 10, b) 100 y c) 1000 ppm, cuyas absorbancias fueron leídas en un espectrofotómetro genesys UV (continuación).	39
<b>Figura 25.</b> Espectro calculado de RMN <sup>1</sup> H del compuesto inositol.	40
<b>Figura 26.</b> Estructura química del inositol.	41
<b>Figura 27.</b> Espectro experimental de RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>EPSEN-A-NAT</b>	42
<b>Figura 28.</b> Espectro calculado de RMN <sup>1</sup> H de coatlina B.	43
<b>Figura 29.</b> Estructura química de coatlina B.	43
<b>Figura 30.</b> Espectro calculado de RMN <sup>1</sup> H del isoflavano natural	45
<b>Figura 31.</b> Estructura química de isoflavano natural	45
<b>Figura 32.</b> Superposición de los espectros calculados de RMN- <sup>1</sup> H de coatlina B e isoflavano con el espectro experimental de <b>EPSEN-C-NAT</b> .	46
<b>Figura 33.</b> Espectro calculado de RMN <sup>1</sup> H de coatlina B acetilada	47
<b>Figura 34.</b> Coatlina B aislada de <i>Eysenhardtia polystachia</i> y su reacción de acetilación	48
<b>Figura 35.</b> Espectro calculado de RMN- <sup>1</sup> H del isoflavano acetilado	49
<b>Figura 36.</b> Estructura química de isoflavano acetilado	50
<b>Figura 37.</b> Espectro experimental de RMN <sup>1</sup> H del componente <b>EPSEN-E-ACET</b>	50
<b>Figura 38.</b> Superposición de los espectros calculados de RMN- <sup>1</sup> H de coatlina B y del isoflavano junto con el espectro experimental de RMN- <sup>1</sup> H <b>EPSEN-E-ACET</b>	51
<b>Figura 39.</b> Ampliaciones a) del espectro calculado de coatlina B y b) del espectro experimental del componente <b>EPSEN-E-ACET</b> de 1.8 a 3 ppm.	52
<b>Figura 40.</b> Ampliaciones a) del espectro calculado de coatlina B y b) del espectro experimental del componente <b>EPSEN-E-ACET</b> de 1.8 a 3 ppm.	53
<b>Figura 41.</b> Ampliaciones a) del espectro calculado de coatlina B y b) del espectro experimental del componente <b>EPSEN-E-ACET</b> de 4.5 a 6 ppm.	54
<b>Figura 42.</b> Ampliaciones a) del espectro calculado de coatlina B y b) del espectro experimental del componente <b>EPSEN-E-ACET</b> de 6.5 a 7.5 ppm.	55
<b>Figura 43.</b> Ampliaciones a) del espectro calculado de coatlina B y b) del espectro experimental del componente <b>EPSEN-E-ACET</b> de 8.0 a 8.5 ppm.	56
<b>Figura 44.</b> Espectros experimentales de RMN- <sup>1</sup> H en CD <sub>3</sub> OD de los componentes	57



**INDICE DE TABLAS****PÁGINA**

<b>Tabla 1.</b> Especies reactivas de oxígeno y su ecuación de reacción	3
<b>Tabla 2.</b> Daños a las biomoléculas producido por las ERO	4
<b>Tabla 3.</b> Estructura de compuestos antioxidantes	8
<b>Tabla 4.</b> Actividad antioxidante de los extractos de especies del género <i>Eysenhardtia</i> con el radical DPPH tomado de Narváez-Mastache <i>et al.</i> , 2007.	11
<b>Tabla 5.</b> Actividad antioxidante reportada para cumarinas y compuestos de tipo flavonoide de <i>Eysenhardtia subcoriace</i> , tomado de Narváez-Mastache <i>et al.</i> , 2008.	12
<b>Tabla 6.</b> Actividad anti-inflamatoria del extracto metanólico y flavanonas preniladas (1-5) tomado de Domínguez-Villegas <i>et. al.</i> , 2013.	12
<b>Tabla 7.</b> Actividad citotóxica ( <i>Artemia salina</i> ) tomado de Domínguez-Villegas <i>et. al.</i> , 2013.	13
<b>Tabla 8.</b> Actividad antioxidante con el radical DPPH de las flavanonas preniladas (1-5) tomado de Domínguez-Villegas <i>et. al.</i> , 2013.	13
<b>Tabla 9.</b> Actividad antioxidante con el radical DPPH y su efecto en el GSH pancreático de compuestos aislados de <i>E. platycarpa</i> , tomado de Narváez-Mastache <i>et al.</i> , 2007.	14
<b>Tabla 10.</b> Pesos de los componentes obtenidos de la fracción <b>F2A-NAT</b>	28
<b>Tabla 11.</b> Pesos de los componentes obtenidos de la fracción <b>F2A-ACET</b>	31
<b>Tabla 12.</b> Comparación de los pesos y el rendimiento de la <b>F2A-NAT</b> y <b>F2A-ACET</b>	32
<b>Tabla 13.</b> Porcentaje de reducción del radical libre DPPH	32
<b>Tabla 14.</b> % de reducción del radical libre DPPH de los compuestos naturales aislados.	34
<b>Tabla 15.</b> Porcentaje de reducción del radical libre DPPH de los compuestos acetilados.	38
<b>Tabla 16.</b> Desplazamientos químicos del espectro calculado de inositol.	41
<b>Tabla 17.</b> Desplazamientos químicos del espectro calculado de RMN <sup>1</sup> H de coatlina B.	44
<b>Tabla 18.</b> Desplazamientos químicos de las señales para los hidrógenos del espectro calculado para Coatlina B acetilada.	48

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas contienen compuestos con propiedades anti-radicales libres, fundamentalmente los compuestos antioxidantes de origen natural se dirigen hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en modificación de la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos), entre otras; se sabe que la capacidad antioxidante de los productos naturales también puede prevenir la enfermedad de Alzheimer (Martínez-Florez, *et al* 2002). Es así que *Eysenhardtia platycarpa* ha sido estudiada mediante el ensayo del radical libre DPPH encontrando que su extracto metanólico de las hojas mostró un porcentaje de reducción del radical libre de 68.15 % a la concentración de 1000 ppm (Domínguez-Villegas, *et al* 2013). En la presente investigación se trabajó sobre la fracción metanólica obtenida de la cromatografía en columna del extracto metanólico de las hojas de *E. platycarpa* (**F2A-NAT**). Debido a la alta polaridad de los componentes, se decidió realizar la reacción de acetilación (Andrade-Carrera, *et al* 2017). Tanto la fracción natural como la acetilada (**F2A-NAT** y **F2A-ACET**) fueron evaluadas sobre su potencial antioxidante con el radical libre DPPH.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Radicales libres

Los radicales libres (RL) son especies reactivas que poseen un electrón desapareado en su último orbital, son altamente inestables y reaccionan con biomoléculas, especialmente con moléculas que componen las membranas biológicas, proteínas y los ácidos nucleicos. El radical libre sustrae el electrón de una molécula estable, que a su vez queda con un electrón desapareado, este nuevo RL formado tiene la capacidad de abstraer el electrón de otro compuesto, iniciando así una reacción en cadena (Saavedra, *et al* 2010).

Los RL se producen de manera endógena a partir del O<sub>2</sub>, por reacciones de transferencia de electrones que involucran la cadena respiratoria, la fagocitosis, reacciones del retículo endoplásmico, la acción enzimática de xantina oxidasa y la síntesis de prostaglandinas, en la reacción de Fenton que involucra metales de transición como el ion ferroso y otras fuentes exógenas como la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas (Saavedra, *et al.* 2010; Sánchez-Valle, & Méndez-Sánchez, 2018).

#### 2.1.1 Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) tiene dos electrones desapareados en su último orbital, debido a esto puede dar origen a especies reactivas de oxígeno (ERO), entre las cuales se encuentran: el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el anión peróxido (O<sub>2</sub><sup>•2-</sup>), el radical perhidroxilo (HO<sub>2</sub>), el radical hidroxilo (•OH), oxígeno singulete (O<sub>2</sub>) y especies de radicales no libres, tales como peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las ERO poseen distintos grados de reactividad, siendo el radical •OH el más reactivo por su capacidad de reaccionar con casi cualquier molécula: proteínas, ácidos nucleicos, fenoles y azúcares, en la tabla 1 se muestran las reacciones de la formación de las ERO (Torres 2002; Birben *et al.* 2012).

**Tabla 1.** Especies reactivas de oxígeno y su ecuación de reacción.

Radical libre	Formula	Reacción
Anión superóxido	$O_2\cdot$	$NADP + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2\cdot + H^+$ $2O_2\cdot + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Peróxido de hidrógeno	$H_2O_2$	Hipoxantina + $H_2O + O_2$ Xantina + $H_2O_2$ Xantina + $H_2O + O_2$ ácido úrico + $H_2O_2$
Radical hidroxilo	$OH\cdot$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$
Ácido hipocloroso	$HOCl$	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Radical peroxilo	$ROO\cdot$	$R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$
Radical hidroperoxilo	$HOO\cdot$	$O_2 + H_2O \rightarrow HOO\cdot + OH^-$

### ***2.1.2 Daños de los Radicales libres sobre las macromoléculas biológicas***

Las ERO dañan a las estructuras celulares, como los lípidos, proteínas y ADN, que afectan la permeabilidad y fluidez de la membrana celular, así como la desestabilización de las funciones de proteínas y mutaciones en ácidos nucleicos, además de causar disfunciones mitocondriales y daños al ADN mitocondrial (Lin, & Beal, 2006). A continuación se muestra en la tabla 1 los posibles daños causados a las biomoléculas por ERO.

**Tabla 2.** Daños a las biomoléculas producido por las ERO

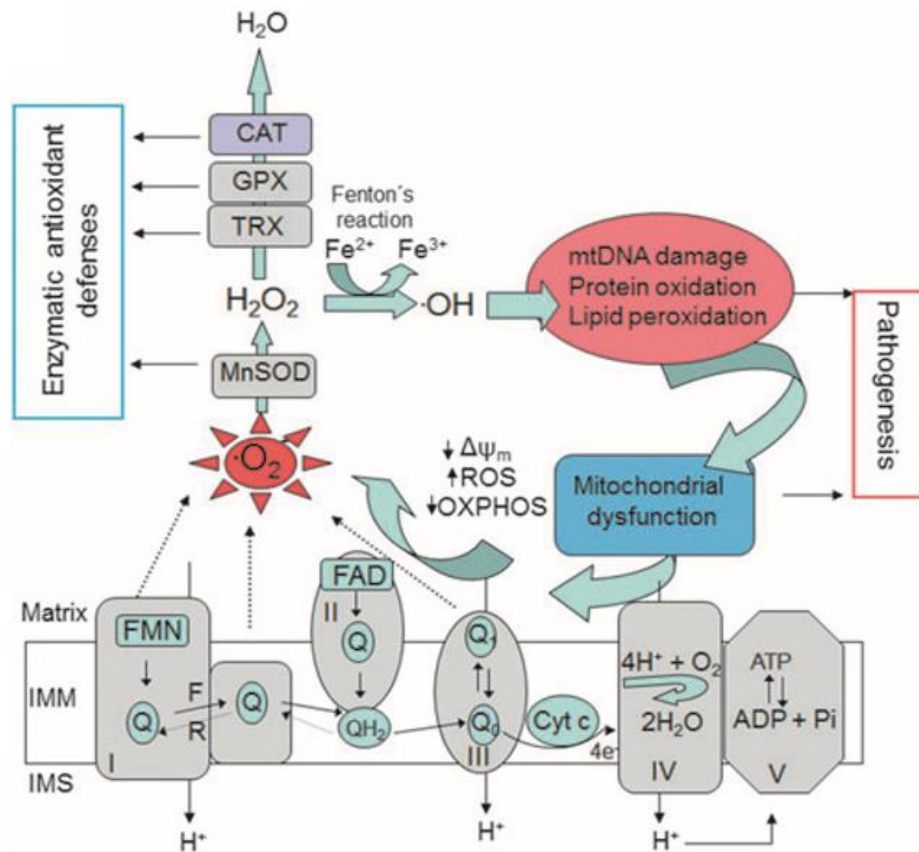
<b>Biomoléculas</b>	<b>Daño</b>	<b>Autor</b>
<b>Lípidos</b>	Lipoperoxidación: reacción en cadena, desencadenada por la oxidación de ácidos grasos poli-insaturados de la membrana celular, formando el radical peroxilo (ROO·) y aldehídos insaturados, que son capaces de inactivar proteínas unidas a la membrana y receptores.	(Venereo-Gutiérrez, 2002; Birben <i>et al.</i> 2012).
<b>Proteínas</b>	Oxidación de residuos de los aminoácidos, rompimiento de los enlaces peptídicos, la agregación entre proteínas y formación de grupos carbonilos.	(Pedraza-Chaverri & Cárdenas-Rodríguez 2006).
<b>ADN</b>	La 8-hidroxiguanina es el principal producto de oxidación de las bases nitrogenadas, también hay rupturas de ADN de una sola hebra y de doble hebra, alteración en la modulación de la expresión génica y en la organización de la cromatina.	(Torres 2002; Kryston <i>et al.</i> 2011).

### ***2.1.3 Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial***

El estrés oxidativo se produce por un cambio en el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, debido al agotamiento de los antioxidantes o la acumulación de ERO.

El mayor daño provocado por las ERO en la célula ocurre en la mitocondria, específicamente en la cadena transportadora de electrones (CTE) en CI, CIII y el flujo de electrones inverso en el Complejo II, generando más O<sub>2</sub>• (figura 1).

La modificación del estado redox y el aumento de la producción de ERO dentro de la mitocondria, conlleva a daños en los procesos extramitocondriales y la modulación de fenómenos celulares fundamentales como la autofagia y apoptosis (Apostolova & Victor 2014).

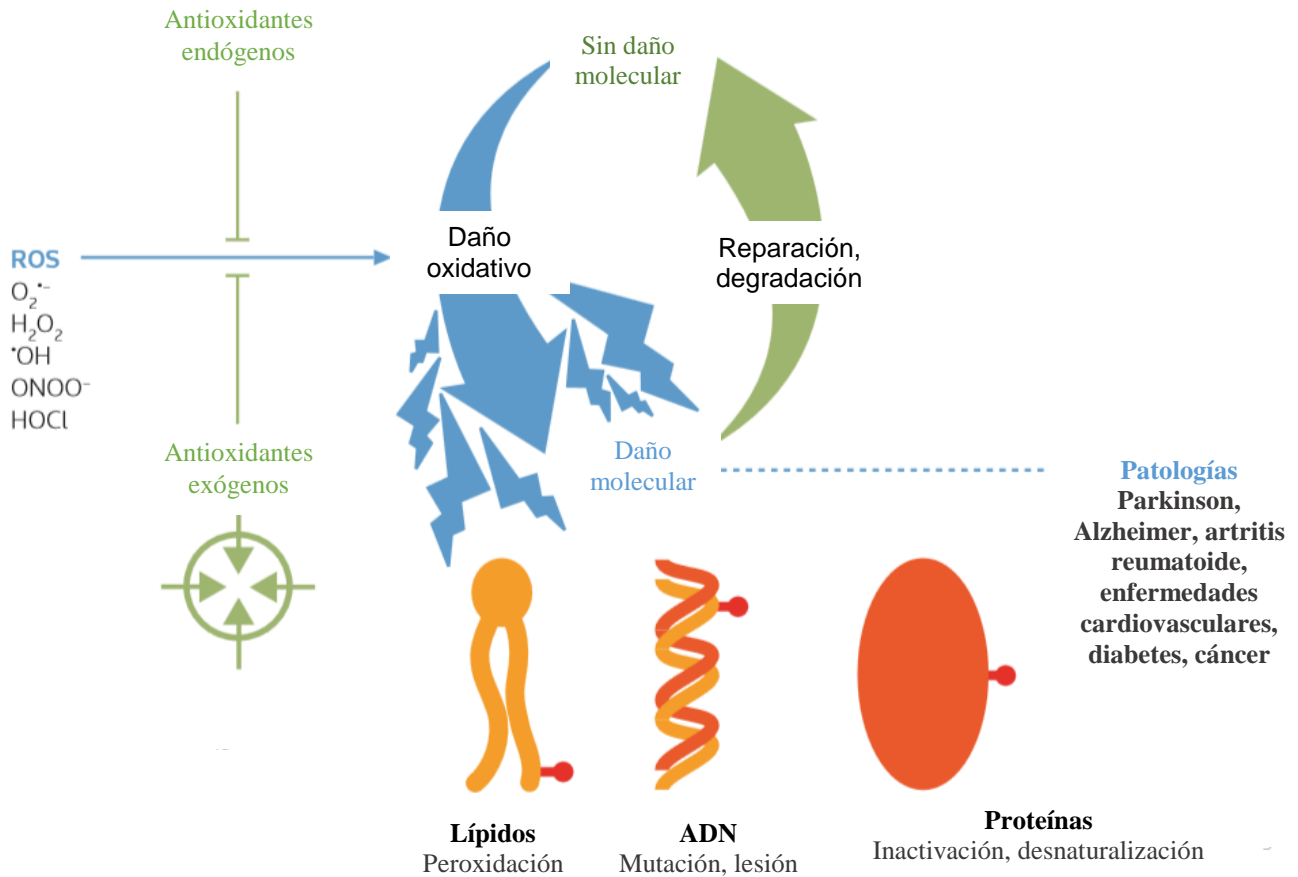


**Figura 1.** Mecanismo de estrés oxidativo que afecta a la mitocondria produciendo más  $O_2\bullet$

### 2.1.4 Enfermedades asociadas al estrés oxidativo

Las células de los tejidos difieren en la susceptibilidad hacia el ataque de las ERO producidos por la disfunción mitocondrial, los más susceptible a este ataque son, el sistema nervioso central (SNC), músculo liso y cardiaco. Las ERO producidos, tienen implicaciones importantes en la señalización citosólica, como la estimulación de fosfolipasas  $A_2$  ( $PLA_2$ ), liberación de ácido araquidónico, el flujo intracelular de  $Ca^{+2}$ , entre otros, de esta manera se

desencadenan señales oxidativas implicadas en distintas patologías como se muestra en el siguiente esquema (Gilgun-Sherki *et al.* 2001; Kryston *et al.* 2011; Apostolova & Victor 2014).



**Figura 2.** Enfermedades asociadas al estrés oxidativo debido al daño a las biomoléculas por las ERO.

## 2.2 Antioxidantes como preventivos de enfermedades

Las células contrarrestan el daño provocado por las ERO mediante distintos mecanismos de defensa, incluyendo eliminadores de RL exógenos adquiridos en la dieta diaria y las enzimas antioxidantes endógenas (Kryston *et al.* 2011).

Los antioxidantes son moléculas que pueden prevenir la formación incontrolada de radicales libres o inhibir sus reacciones con biomoléculas, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante. (Venereo, 2002).

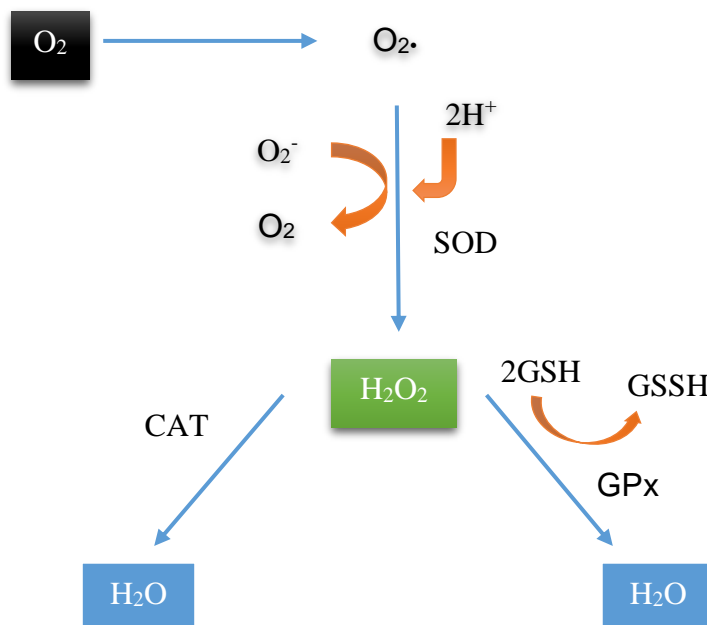
La propagación y el inicio de la reacción en cadena de los RL es interrumpida por la donación de electrones o de hidrógeno del antioxidante (Hamid *et al.* 2010).

### 2.2.1 Clasificación de antioxidantes

Estos pueden clasificarse según el mecanismo de acción en;

- a) Primarios, previenen la formación de RL
- b) Secundarios, inactivan los RL ya formados
- c) Terciarios, reparan el daño oxidativo principalmente el ocasionado al ADN.

Los antioxidantes primarios son el primer nivel de protección e impiden la formación de RL mediante la descomposición del  $H_2O_2$  o la quelación de los metales. Estos antioxidantes son enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), transferrina o ceruloplasmina. La SOD dismuta el oxígeno para formar  $H_2O_2$  y la CAT o GPx catalizan la reacción formando  $H_2O$  como se muestra en la figura 3 (Saavedra *et al.* 2010).



**Figura 3.** Mecanismo de acción de los antioxidantes primarios.



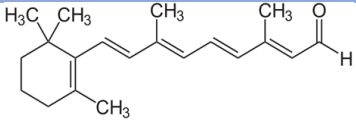
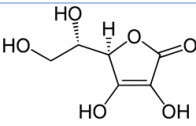
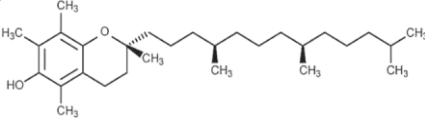
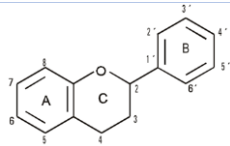
En los antioxidantes que eliminan o secuestran a los RL, se incluyen los agentes de bajo peso molecular como: glutatión,  $\alpha$ -tocoferol, bilirrubina, la vitamina A, vitamina E, vitamina C y compuestos fenólicos como los flavonoides, flavonas, flavononas, antocianinas y fenilpropanoides. Estos inhiben el inicio de la cadena redox y rompen la propagación de RL (Bi Huet Breña 2017; Pedraza-Chaverri and Cárdenas-Rodríguez 2006).

Y por último los de reparación o “síntesis de novo” reparan los daños y la reconstrucción de la membrana como es el caso de las enzimas de reparación del ADN, proteasas y transferrinas (Polo de Santos, 2016).

### 2.2.2 Fuente de origen natural de compuestos antioxidantes

Las plantas son una fuente importante de antioxidantes naturales, que son aportados al hombre por medio de la dieta. Se han encontrado compuestos antioxidantes en las plantas, como la vitamina E, la vitamina C, el  $\beta$ -caroteno, compuestos fenólicos, entre otros (figura 4), que inhiben la formación de RL. La capacidad antioxidante de los productos naturales puede prevenir o disminuir el deterioro celular y funcional del organismo, así como también puede prevenir diferentes enfermedades entre las cuales se encuentran los procesos inflamatorios, la enfermedad de Alzheimer y diferentes tipos de cáncer, entre otras (García, *et al* 2001; Martínez-Florez *et al* 2002).

**Tabla 3.** Estructura de compuestos antioxidantes

Antioxidante	Estructura
Vitamina A	
Vitamina C	
Vitamina E	
Flavonoides	

### 2.3 *Eysenhardtia platycarpa* Pennell & Safford descripción botánica

*Eysenhardtia platycarpa* como fuente de agentes antioxidantes es un árbol de 10 m de altura, con tronco de más de 25 cm de diámetro, de corteza delgada y esponjosa; planta moderadamente pubescente; hojas de 10 a 20 cm de largo; folíolos 15 a 25 pares, principalmente de 10 a 18 mm de largo, pubescentes o casi glabros, con muchas glándulas pequeñas, pedicelos de 1 mm de largo y cáliz de 3 a 3.2 mm de largo, siempre pubescente; corola 6 a 8 mm de largo, los lóbulos al secarse se tornan con manchas o rayas rojizas; fruto 12 a 13 mm de largo o más por 3.5 a 4 mm de ancho, glabro, glandular-punteado, ascendente en los racimos, se propaga mediante semillas (Sagarpa, 2011).



**Figura 4.** *Eysenhardtia platycarpa* en su hábitat natural en Tetipac, Guerrero (Fotografía propiedad de Garduño Ramírez, M.L., tomada en 2007).



**Figura 5.** Flores de *Eysenhardtia platycarpa* tomado de Sagarpa. Flora nectarífera y polinífera en el estado de Chiapas.2011.

#### 2.3.1 Distribución Geográfica

Es una especie característica y abundante de la selva baja caducifolia, se distribuye en los estados de Sinaloa, Nayarit, Colima, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Puebla y Oaxaca (Enciclopedia of life, 2011) (Ver figura 6).



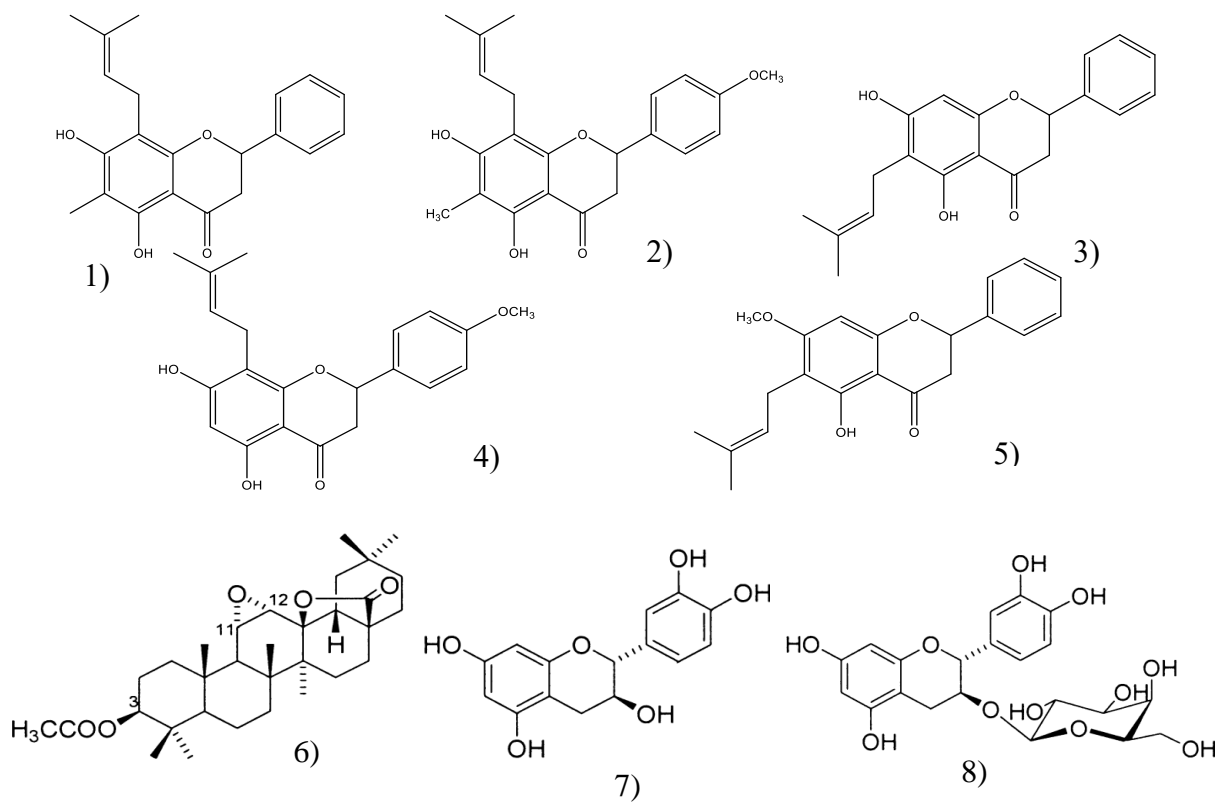
**Figura 6.** Mapa de distribución de *E. platycarpa* en la República Mexicana tomado de Enciclopedia of life <http://www.eol.org/pages/416264> 2011.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Productos naturales aislados de *E. platycarpa*

La especie vegetal *Eysenhardtia platycarpa* ha sido objeto de estudio anteriormente en el grupo de investigación. De esos estudios se logró el aislamiento y caracterización de 5 flavanonas isopreniladas mayoritarias a partir del extracto metanólico de las hojas y las ramas de esta especie: 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-flavanona (**1**) 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**2**) 5,7-dihidroxi-6-prenil-flavanona (**3**), 5,7-dihidroxi-8-prenil-4'-metoxi-flavanona (**4**), 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenil-flavanona (**5**). Posteriormente se aislaron y se caracterizaron otros compuestos de *E. platycarpa*: 3-*O*-Acetil-11 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -epoxioleanan-28, 13 $\beta$ -olido (**6**), (+) catequina (**7**), (+) catequina 3-*O*- $\beta$ -D-galactopiranosido (**8**) en la figura 7 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos (Narváez-Mastache *et al.*, 2006 & Narváez-Mastache *et al.*, 2007),

**Figura 7.** Estructura química de los compuestos naturales aislados de *E. platycarpa*



### 3.1.2 Evaluaciones farmacológicas sobre extractos y productos puros de *E. platycarpa*

Se han reportado estudios sobre la actividad antioxidante con diferentes métodos de los extractos metanólicos y compuestos de especies del género *Eysenhardtia* que incluyen a *E. platycarpa* y *E. subcoriacea* (Narváez-Mastache *et al.*, 2008). Como se muestra en las tablas 4 y 5. De las 5 flavanonas preniladas aisladas, se han realizado estudios hipoglucemiantes, anti-inflamatorios, actividad citotóxica y antioxidante, como se muestra en las tablas 6, 7 y 8 (Domínguez-Villegas *et. al* 2013), asimismo se determinó la actividad antioxidante de los compuestos 6, 7 y 8 (tabla 9) y además se ha evaluado el efecto antidiabético de los extractos metanólicos de la planta *E. platycarpa* (Narváez-Mastache *et al.*, 2007).

**Tabla 4.** Actividad antioxidante de los extractos de especies del género *Eysenhardtia* con el radical DPPH tomado de Narváez-Mastache *et al.*, 2007.

Plant species	part used (g)	AOA (EC <sub>50</sub> ) <sup>a)</sup>		DPPH (EC <sub>50</sub> ) <sup>b)</sup>	
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH
<i>E. platycarpa</i>	Leaves (300)	nd	28.3 ± 3.8	nd	102.3 ± 3.4
	Branches (2500)	nd	27.8 ± 5.1	nd	79.6 ± 3.5
	Bark (500)	nd	21.6 ± 2.9	nd	21.2 ± 0.1
<i>E. punctata</i>	Leaves (373)	>100	86.4 ± 11.2	690.2 ± 8.7	94.6 ± 4.8
	Branches (1522)	88.6 ± 6.9	56.7 ± 7.3	476.7 ± 6.8	55.1 ± 6.1
<i>E. subcoriacea</i>	Leaves (1300)	>100	26.2 ± 5.8	>1000	43.5 ± 0.5
	Branches (920)	58.3 ± 7.7	20.8 ± 4.7	113.5 ± 2.8	39.8 ± 0.5
	Bark (550)	26.9 ± 4.9	22.2 ± 3.7	96.5 ± 4.6	9.2 ± 0.1

EC<sub>50</sub>= la concentración de los extractos (ppm) requerida para reducir el 50% de a) la peroxidación pancreática lipídica (expresada como actividad antioxidante= AOA) y b) absorción del DPPH a 517nm.

**Tabla 5.** Actividad antioxidante reportada para cumarinas y compuestos de tipo flavonoide de *Eysenhardtia subcoriace*, tomado de Narváez-Mastache *et al.*, 2008.

Compound	AOA EC <sub>50</sub> ± SEM (µM)	DPPH EC <sub>50</sub> ± SEM (µM)	GSH ± SEM (µg GSH mg protein <sup>-1</sup> )	
			Untreated (0.88 ± 0.05)	APPH (0.22 ± 0.06*)
Subcoriacin	9.11 ± 1.1	51.2 ± 2.3	0.99 ± 0.05*	0.92 ± 0.05*
Epicatechin	11.4 ± 0.3	10.1 ± 2.5	1.02 ± 0.03*	1.09 ± 0.24*
Afzelechin	11.2 ± 0.3	71.2 ± 1.3	1.15 ± 0.02*	1.01 ± 0.02*
Eriodictyol	37.1 ± 0.7	32.5 ± 1.2	0.87 ± 0.01	0.85 ± 0.02
Quercetin 3- <i>O</i> -β-D-galactopyranoside	7.3 ± 0.6	16.8 ± 2.3	0.86 ± 0.09	0.85 ± 0.06
Quercetin (reference)	18.1 ± 1.1	14.3 ± 1.1	0.88 ± 0.01	0.86 ± 0.02

Cada valor representa la media de tres ensayos independientes ± el error estándar de la media (SEM). \* Turkey es una prueba de comparación múltiple que muestra la diferencia significativa comparado con el grupo no tratado ( $p \leq 0.001$ ).

**Tabla 6.** Actividad anti-inflamatoria del extracto metanólico y flavanonas preniladas (1-5) tomado de Domínguez-Villegas *et al.*, 2013.

Samples	Percentage of anti-inflammatory activity (1mg/ear)
Methanolic Ext. Leaves	77.5 ± 1.0
1	12.2 ± 1.1
2	68.4 ± 1.5
3	66.7 ± 1.1
4	46.4 ± 1.5
5	75.3 ± 1.5
Indomethacin	91.35 ± 0.47

**Tabla 7.** Actividad citotóxica (*Artemia salina*) tomado de Domínguez-Villegas *et. al.*, 2013.

Samples	Cytotoxic activity ( <i>Artemia salina</i> )
Methanolic Ext. Leaves	<17.78 ppm
1	>100 $\mu$ M
2	>100 $\mu$ M
3	>1000 $\mu$ M
4	>10 $\mu$ M
5	>100 $\mu$ M
Vehicle	No cytotoxic

**Tabla 8.** Actividad antioxidante con el radical DPPH de las flavanonas preniladas (1-5) tomado de Domínguez-Villegas *et. al.*, 2013.

Compounds	Concentration		
	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1000 $\mu$ M
1	-3.1 $\pm$ 1.7	-11.0 $\pm$ 1.0	17.4 $\pm$ 2.1
2	4.0 $\pm$ 0.08	4.6 $\pm$ 1.0	20.1 $\pm$ 2.0
3	0.08 $\pm$ 0.0	-2.1 $\pm$ 0.7	7.9 $\pm$ 1.7
4	0.2 $\pm$ 0.0	2.1 $\pm$ 0.9	7.7 $\pm$ 1.2
5	-6.6 $\pm$ 0.1	-1.9 $\pm$ 1.0	43.1 $\pm$ 3.9*
Quercetina	2.7 $\pm$ 0.9	74. $\pm$ 4.4*	92.9 $\pm$ 0.0*
	1 mM	10mM	100 mM
$\alpha$ -Tocopherol	21.6 $\pm$ 4.3	60.0 $\pm$ 2.9*	63.5 $\pm$ 3.1*

Cada valor representa la media de tres ensayos independientes  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). \* Turkey es una prueba de comparación múltiple que muestra la diferencia significativa comparado con el grupo no tratado ( $p \leq 0.001$ ).

**Tabla 9.** Actividad antioxidante con el radical DPPH y su efecto en el GSH pancreático de compuestos aislados de *E. platycarpa*, tomado de Narváez-Mastache *et al.*, 2007.

Compound	AOA (EC <sub>50</sub> ) <sup>a)</sup>	DPPH (EC <sub>50</sub> ) <sup>b)</sup>	GSH (µg GSH mg protein-1)	
			Untreated (0.89 ± 0.15)	APPH (0.32 0.06*)
3- <i>O</i> -Acetil-11α, 12α-epoxioleanan-28, 13β-olide	21.2 ± 2.2	>100	1.35 ± 0.18*	1.13 ± 0.17*
(+) catequina	7.4 ± 1.1	8.1 ± 0.3	1.04 ± 0.22*	1.01 ± 0.14*
catequina 3- <i>O</i> -β-D-galactopiranoside	11.5 ± 1.5	11.3 ± 0.3	0.88 ± 0.07	0.87 ± 0.08
Quercetin	18.1 ± 2.1	14.3 ± 1.1	0.89 ± 0.11	0.90 ± 0.12
α-Tocoferol	39.5 ± 1.5	103 ± 2.4	1.06 ± 0.09*	0.99 ± 0.06*

Cada valor representa la media de tres ensayos independientes ± el error estándar de la media (SEM). \* Turkey es una prueba de comparación múltiple que muestra la diferencia significativa comparado con el grupo no tratado ( $p \leq 0.001$ ).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

*Eysenhardtia platycarpa* ha sido estudiada por el grupo de investigación, se han aislados compuestos de tipo flavonoide en el extracto metanólico; sin embargo, la fracción más polar del extracto íntegro metanólico aún no ha sido estudiada. La presente investigación busca compuestos novedosos de la fracción más polar del extracto íntegro metanólico de *E. platycarpa*, que presenten actividad antioxidante, debido a que los compuestos antioxidantes ayudan a prevenir o disminuir el deterioro celular y funcional del organismo. Además se tiene como finalidad, profundizar en el conocimiento químico de la especie y caracterizar los compuestos por medio de la reacción de acetilación de la **F2A-NAT**, permitiendo disminuir la polaridad de los compuestos y poder aislar los que presenten mayor actividad antioxidante para futuras investigaciones de uso farmacológico.

#### 5. HIPÓTESIS

**H1.** La fracción polar cuenta con metabolitos secundarios con actividad antioxidante demostrada con el modelo de reducción del radical libre DPPH y éstos compuestos pueden resultar novedosos a partir de esta especie.

**H2.** La reacción de acetilación permitirá la caracterización de los compuestos presentes en la fracción polar como derivados acetilados, debido a la sustitución del grupo hidroxilo por el grupo acetato, permitiendo la separación de los compuestos.



## 6. OBJETIVOS

### 6.1 *Objetivo general*

Determinar la actividad antioxidante del extracto íntegro metanólico de hojas de *E. platycarpa* (**EMEp**), la fracción polar metanólica natural (**F2A-NAT**), la fracción 2A acetilada (**F2A-ACET**) y los compuestos naturales y acetilados aislados, empleando el modelo de reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

### 6.2 *Objetivos particulares*

6.2.1 Realizar la reacción de acetilación de la fracción **F2A-NAT**

6.2.2 Determinar la actividad antioxidante del extracto íntegro metanólico de hojas de *E. platycarpa* (**EMEp**), la fracción polar metanólica natural (**F2A-NAT**) y la fracción 2A acetilada (**F2A-ACET**), empleando el modelo de reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

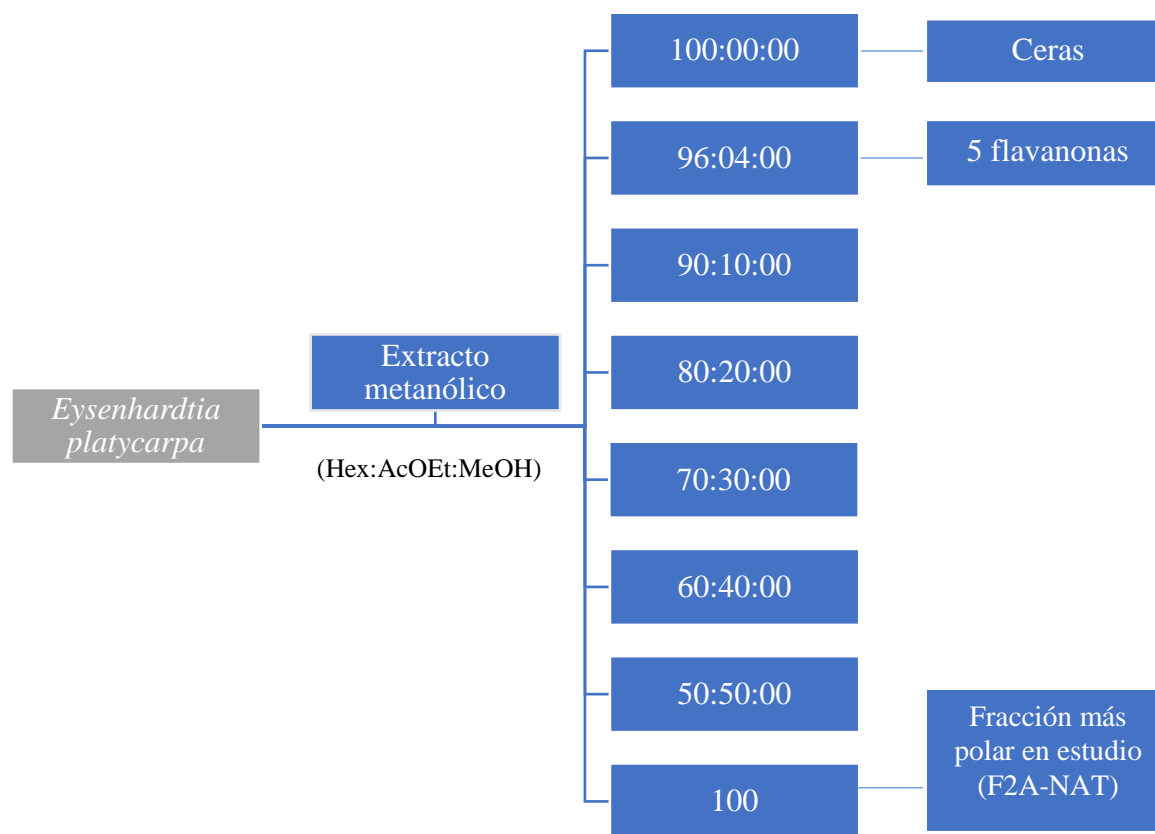
6.2.3. Aislar los compuestos presentes en ambas fracciones.

6.2.4. Determinar la actividad antioxidante de los compuestos aislados, empleando el modelo de reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

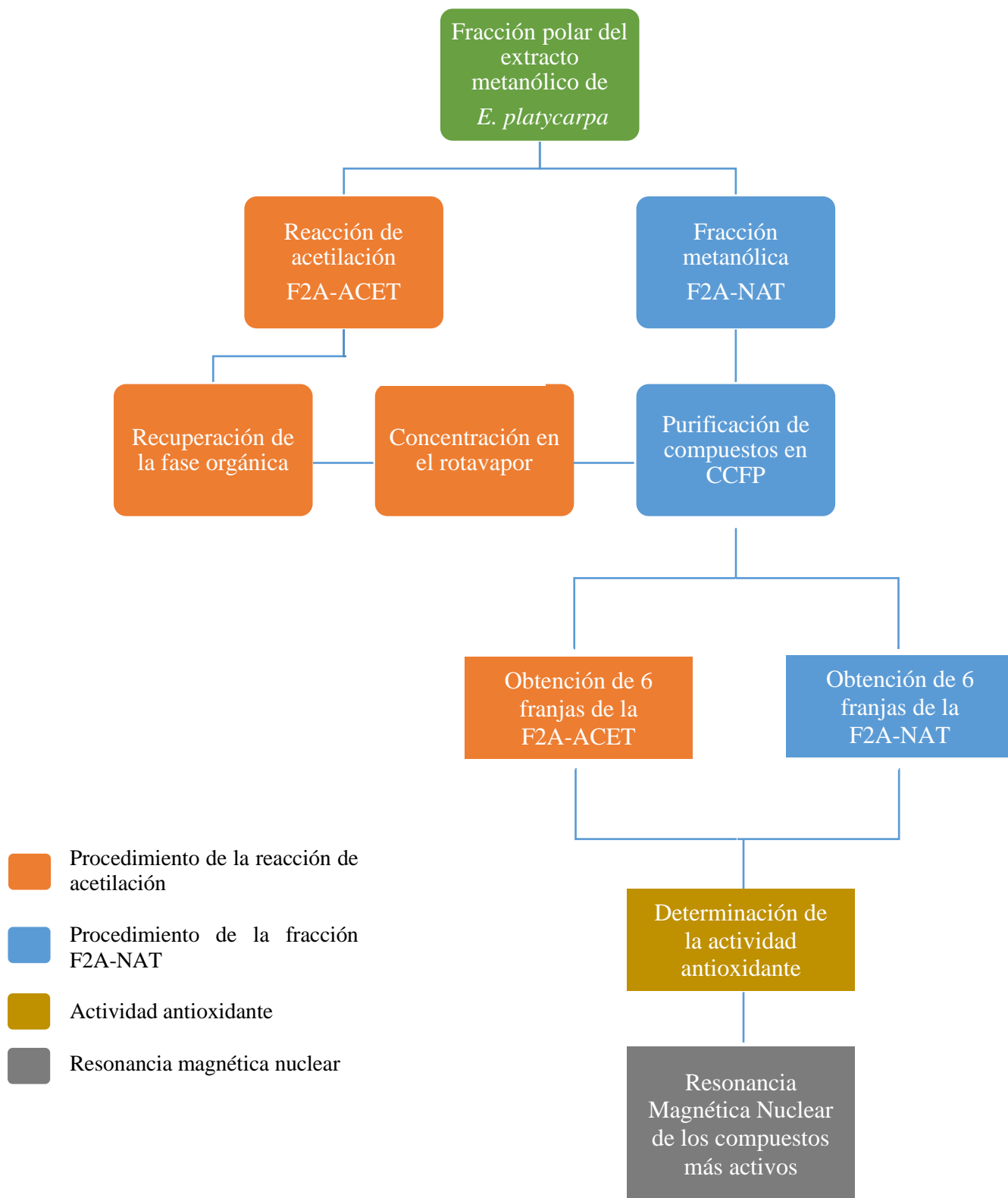
6.2.5. Caracterizar el compuesto con mayor actividad antioxidante empleando las técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN  $^1\text{H}$ ).

## 7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Del extracto metanólico de *E. platycarpa*, se realizó un fraccionamiento con diferentes disolventes: hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH), en las proporciones que se presentan en las figuras 8 y 9, la fracción en estudio se obtuvo con 100% MeOH.



**Figura 8.** Diagrama de diseño experimental, fraccionamiento del extracto metanólico de *E. platycarpa*



**Figura 9.** Diagrama de diseño experimental, purificación de compuestos, actividad antioxidante y resonancia magnética nuclear.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Consideraciones Generales

El monitoreo de las fracciones analizadas y el aislamiento de los productos de reacción se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (CCF) en cromatofolios de aluminio TLC de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> Merck. Las cromatografías en capa fina preparativa (CCFP) se efectuaron en cromatofolios de vidrio de alta resolución HPTLC de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> de Merck de 2 mm de espesor. Los métodos de visualización utilizando luz ultravioleta originada por una lámpara portátil Mineralight 254/366 nm modelo UVGL-25; y como reactivo cromogénico, una solución de 12 g de sulfato sérico amoniacal y 22 ml de ácido sulfúrico concentrado en 350 g de hielo. Los puntos de fusión se determinarán en un equipo Fisher-Johns.

Los espectros de resonancia magnética nuclear RMN de <sup>1</sup>H de los compuestos naturales se obtuvieron a 500 MHz en un espectrómetro Bruker, utilizando metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) y los acetilados se obtuvieron a 500 MHz en un espectrómetro Bruker utilizando cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

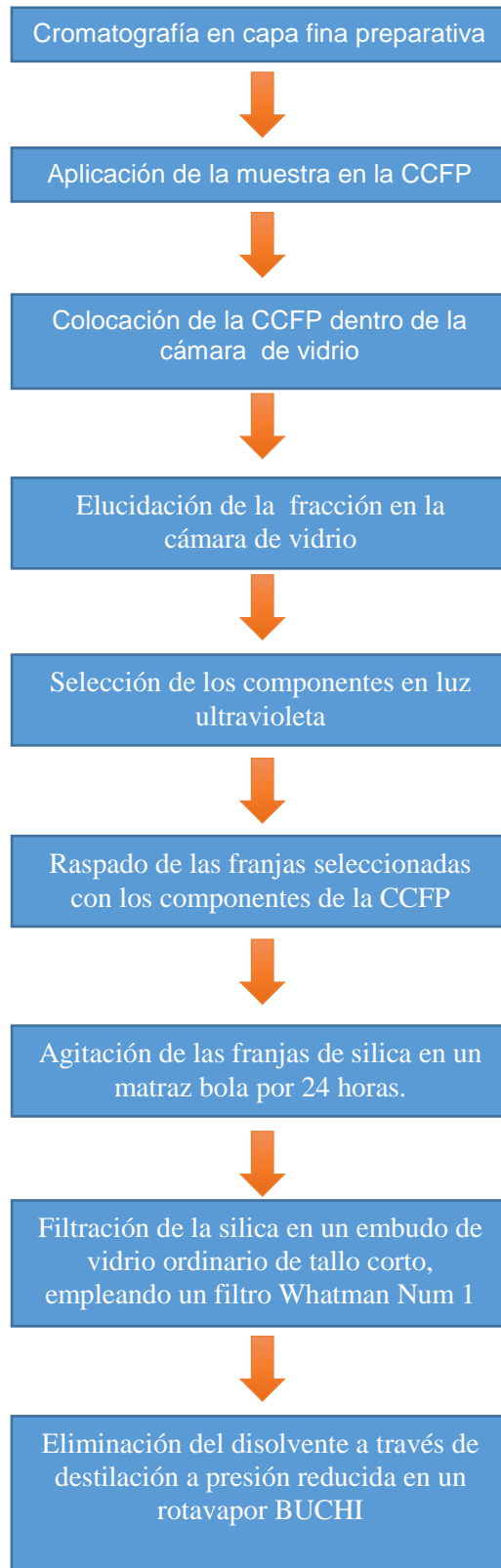
Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón; las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se encuentran en Hertz.

### 8.2 Técnicas de separación cromatográfica

La separación de los compuestos se realizó por cromatografía en capa fina preparativa (CCFP), tanto para los componentes de la fracción natural (**F2A-NAT**) como de los componentes de la fracción acetilada (**F2A-ACET**), de acuerdo a la figura 10. El seguimiento de la separación de los compuestos de la **F2A-NAT** y **F2A-ACET** se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (CCF), reveladas con sulfato sérico amoniacal.

#### 8.2.1 Separación de compuestos de la F2A-NAT en CCFP

De la fracción natural **F2A-NAT** se emplearon 200 mg que se aplicaron en una CCFP, eluyendo en un sistema de disolventes 25:75 AcOEt: MeOH. Por consiguiente los compuestos obtenidos de la CCFP se procesaron de acuerdo a lo estipulado en la figura 10.

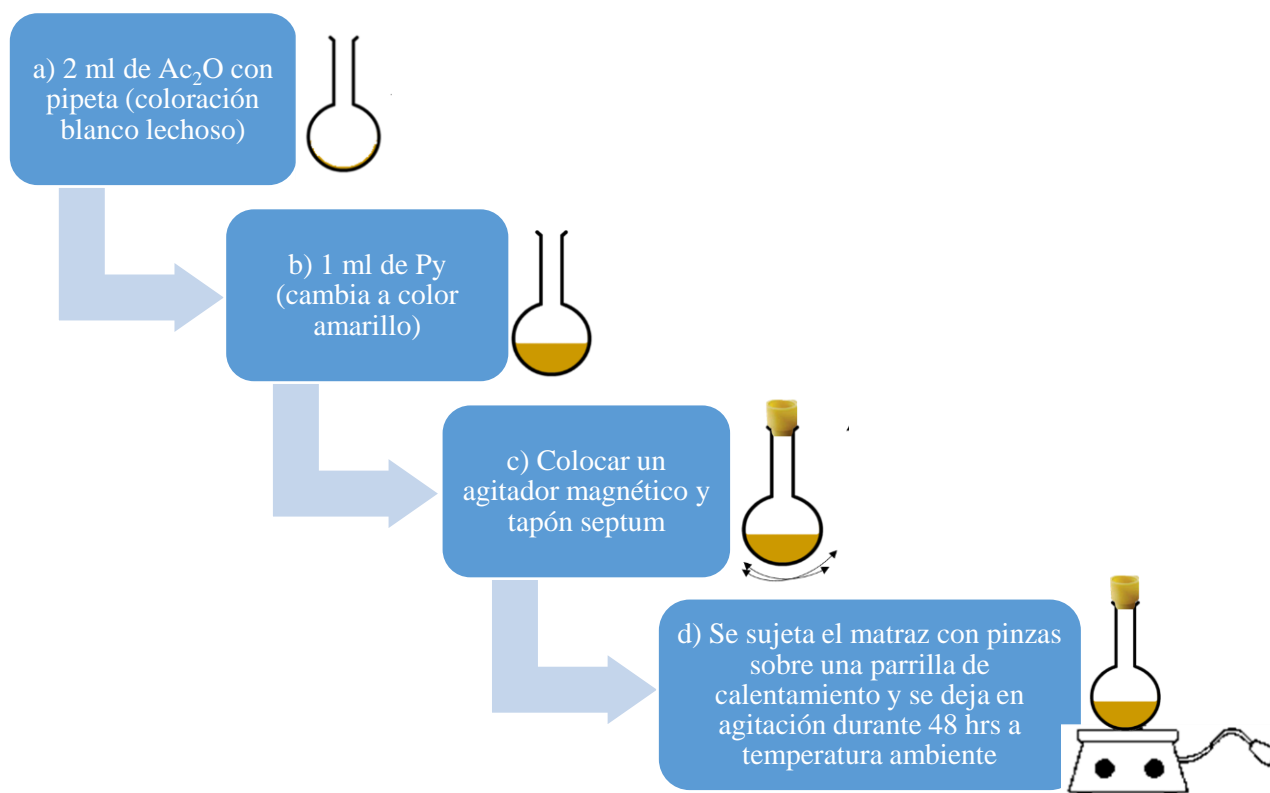


**Figura 10.** Diagrama de separación de compuestos en CCFP

### 8.3 Reacción de acetilación de la fracción F2A-NAT

La reacción de acetilación de los componentes, se realizó de acuerdo con lo descrito por Andrade-Carrera, B. 2017, empleando 0.250 mg de la F2A-NAT, anhídrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) y piridina (Py). A continuación se describe el procedimiento:

1. Con una espátula se colocó la materia prima en un matraz bola.
2. Se agregó: a) 2 ml de anhídrido acético, b) 1 ml de piridina, c) se utilizó un agitador magnético y d) se colocó en una parrilla de calentamiento.

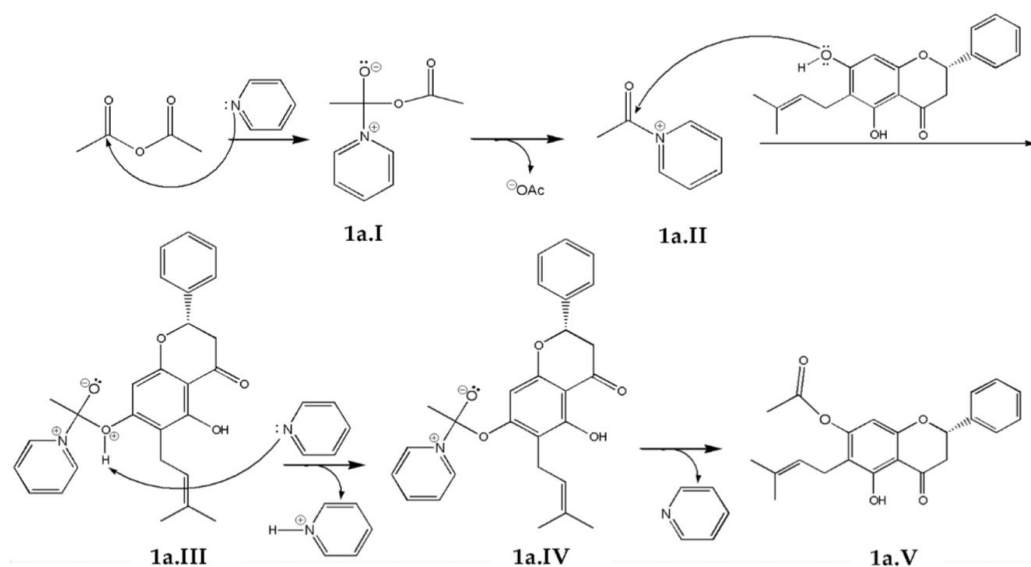


3. Transcurrido el tiempo de reacción, detener la agitación.
4. Destapar cuidadosamente el matraz de reacción manteniendo el extractor y la luz prendida de la campana.
5. Tomar con un capilar de vidrio largo un poco de la muestra de la reacción y realizar una cromatografía en capa fina, aplicando la materia prima y el producto de la reacción.
6. En el matraz de reacción se agregan a proximadamente 20 gr de hielo. Se formaran sólidos amorfos.
7. Se retira el agua y Py (residuos acuosos).

8. Se lava el solido delgado en las paredes del matraz con acetato de etilo.
9. Se agrega sulfato de sodio anhidro.
10. Sin agitar se vacían los productos acetilados en un nuevo matraz lavando con AcOEt, hasta tener 50 ml en el nuevo matraz.

### 8.3.1 Mecanismo de la reacción de acetilación

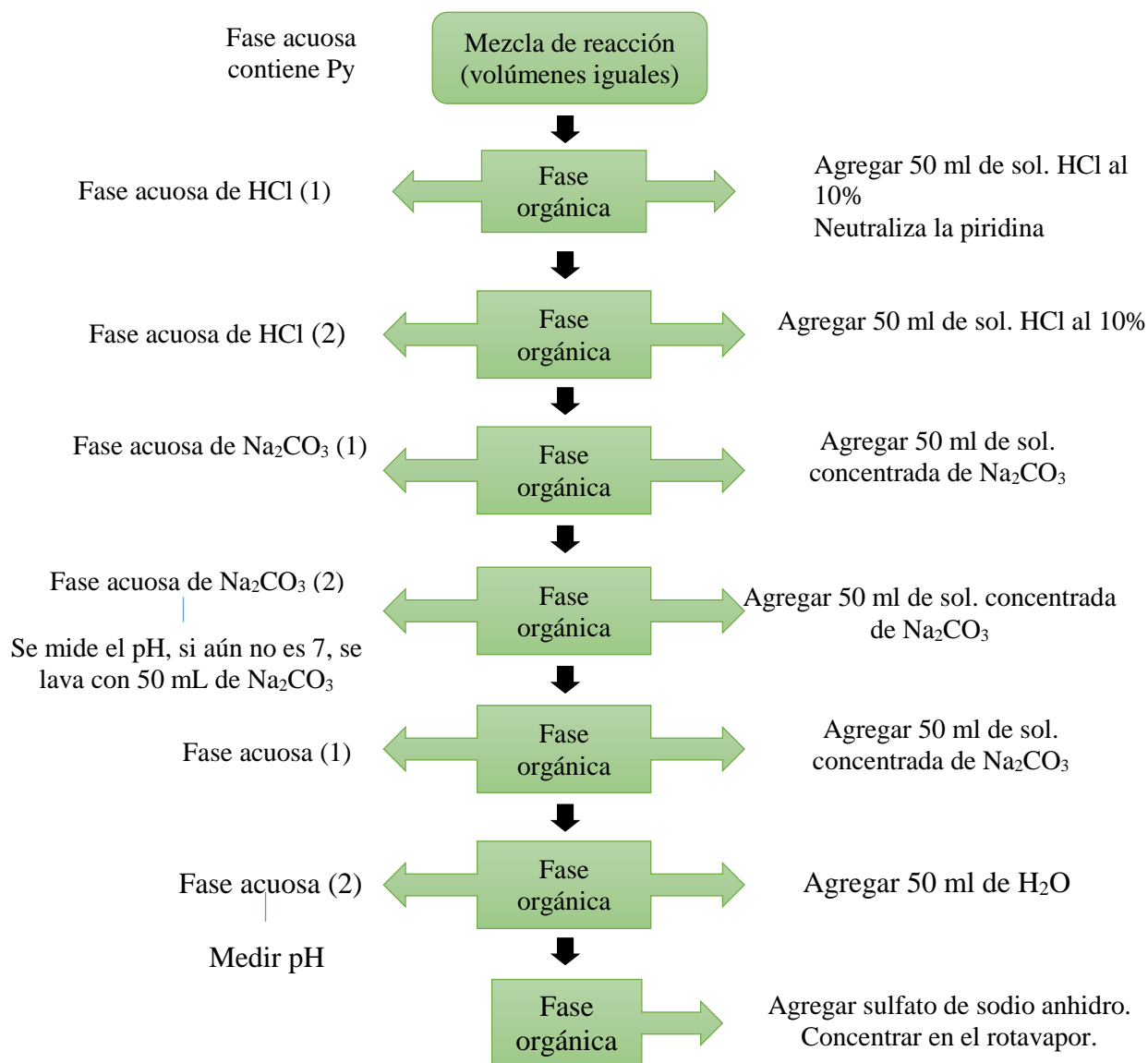
El mecanismo de la reacción propuesto para este tipo de reacción, se muestra en la figura 11. El anhídrido acético es atacado por el par de electrones de la piridina, formando el intermedio zwitterion 1a.I, asimismo conforma el intermedio 1a.II debido a la pérdida de un ion acetato. Este a su vez es atacado por el par de electrones del oxígeno del grupo hidroxilo de la posición 6 del compuesto por acetilar (en este ejemplo se trata de una flavanona) para proporcionar el intermedio 1a.III, que por abstracción del protón forma el intermedio 1a.IV más una piridina protonada, la cual es neutralizada mediante el acetato que regenera la piridina neutra y el ácido acético para formar el intermedio 1a.V que corresponde a un compuesto monoacetilado. Este mismo mecanismo se espera para el caso de los compuestos que presenten hidroxilos acetilables de la fracción **F2A-NAT**.



**Figura 11.** Mecanismo de reacción de la acetilación de alcoholes.

### 8.3.2 Recuperación de la fase orgánica de la reacción de acetilación.

Para tratar de recuperar más producto de la reacción, se hace un lavado en un embudo de separación, en el cual se agrega hielo y se adicionan 50 ml de acetato de etilo, posteriormente se realiza el procedimiento como se muestra en la figura 12.



**Figura 12.** Tratamiento para la recuperación de la fase orgánica de la reacción de acetilación.



### ***8.3.4 Concentración de las fracciones obtenidas en el rotavapor***

1. Conectar
2. Poner hielo en el agua donde esta el recirculador del agua.
3. Poner hielo en la trampa del disolvente.
4. En el baño debe haber agua destilada.
5. Poner el baño maría a una temperatura por debajo del punto de ebullición del disolvente .
6. Revisar si hay vacío.
7. Poner el matraz con los productos acetilados en el rotavapor.

Nota:

Debe tener solo el 50% del líquido en su interior.

No sumergir completamente, solo 1/3 del matraz.

Sugetarlo con las pinzas.

8. Prender para rotación .
9. Apagar cuando haya poca cantidad (5 mL aprox) del disolvente en el matraz:
  - Quitar vacío.
  - Desprender el matraz.

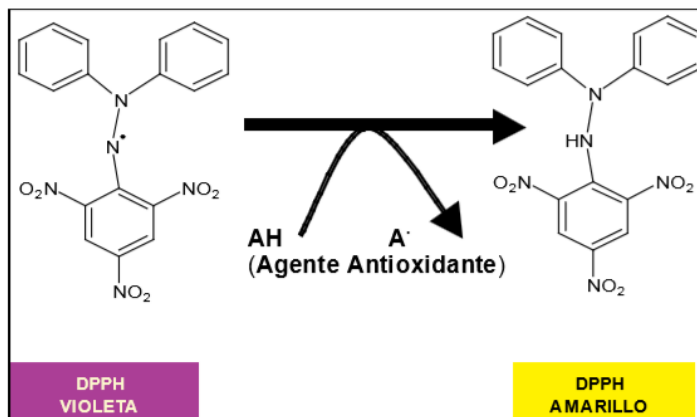
### ***8.3.5 Separación de los componentes de la F2A-ACET en CCFP.***

Una vez concluida la reacción se procedió al pesado de la muestra seca, de la cual se tomaron 200 mg para purificar sus componentes mediante CCFP. Esta CCFP se eluyó en un sistema de disolventes 25:75 Hex: AcOEt. Una vez concluida la CCFP se prosiguió con el protocolo estipulado en la figura 10.

### ***8.4 Evaluación de la actividad antioxidante***

La prueba de reducción del radical libre DPPH se realizó de acuerdo con lo descrito por Domínguez-Villegas, V. 2013. Se determinó la actividad antioxidante del extracto íntegro metanólico (EMEP), las fracciones (F2A-NAT y F2A-ACET) y quercetina como referencia en las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm, por triplicado.

La prueba de reducción del radical libre de los componentes aislados en la CCFP, así como quercetina, se evaluaron en las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm, por triplicado.



Fuente: Molyneux. J. Sci. Technol.,2004 <sup>(31)</sup>

**Figura 13.** Método del 2, 2 -difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH)

La determinación del porcentaje de reducción del radical libre DPPH se realizó empleando un espectrofotómetro genesys UV mediante la lectura de las absorbancias con respecto a un control blanco que contiene el radical libre sin ningún antioxidante.

La fórmula empleada para esta conversión se muestra a continuación.

$$\% \text{ de Reducción del DPPH} = [A_B - A_A/A_B] \times 100$$

En donde  $A_B$  es la absorbancia de la muestra blanco;  $A_A$  es la absorbancia de la muestra de prueba.

### **8.5 Caracterización de los componentes de las fracciones 2A-NAT y 2A-ACET.**

Los componentes aislados de la fracción natural (F2A-NAT) y acetilada (2A-ACET) fueron enviados a su análisis por RMN <sup>1</sup>H, para obtener su perfil de señales por resonancia magnética nuclear de hidrógeno, una vez obtenidos los espectros experimentales fueron comparados con los espectros calculados obtenidos a través del programa computacional Chem Sketch.

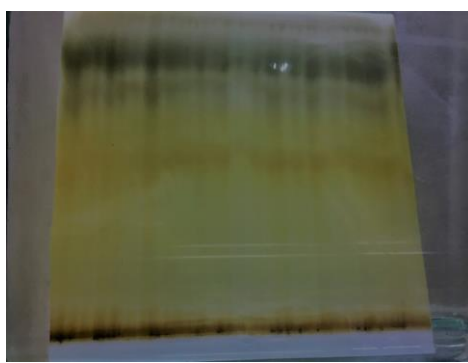
Los compuestos considerados para los espectros calculados fueron aquellos que ya previamente se han obtenido de especies vegetales del género *Eysenhardtia* y por su naturaleza polar de acuerdo a la búsqueda exhaustiva realizada mediante el buscador científico SciFinder.

La similitud en cuanto al perfil espectroscópico permitió establecer la estructura base de los compuestos pero aún no se ha logrado la caracterización definitiva de los componentes aislados ya que hacen falta más datos espectroscópicos y espectrométricos por obtenerse.

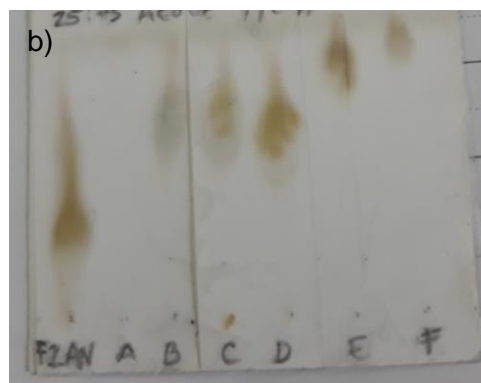
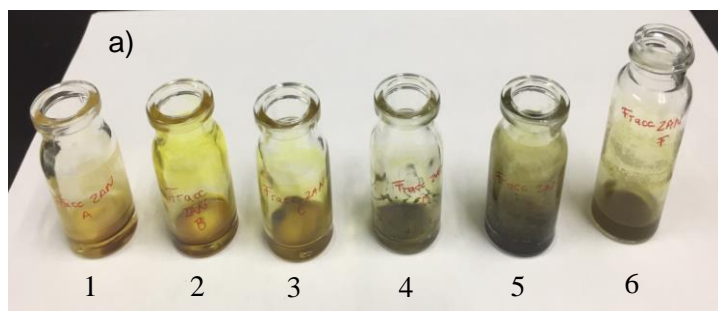
## 9. RESULTADOS

### 9.1 Separación de compuestos de la F2A-NAT por CCFP.

Se obtuvieron 6 distintos componentes de la CCFP de la **F2A-NAT** (figura 14), las cuales fueron raspadas y procesadas de acuerdo a la metodología mencionada. Una vez obtenidos los 6 componentes del matraz bola, se traspasaron a viales, los cuales fueron pesados con anterioridad, de modo que se obtuvo el rendimiento de cada componente, como se muestra en la tabla 10. Posteriormente se aplicó una muestra de cada componente en una CCF para un análisis cualitativo, revelada con sulfato cérico (figura 15).



**Figura 14.** Cromatografía en capa fina preparativa de la **F2A-NAT** en un sistema de disolventes 3:7 AcOEt: MeOH.



**Figura 15.** Compuestos obtenidos de la CCFP de la a) fracción natural, las cuales fueron nombradas 1) **EPSEN-A NAT**, 2) **EPSEN-B NAT**, 3) **EPSEN-C NAT**, 4) **EPSEN-D NAT**, 5) **EPSEN-E NAT** y 6) **EPSEN-F NAT** y b) CCF de los compuestos en fase normal en un sistema de disolventes 25:75 AcOEt: MeOH.

(Considerar las siguientes equivalencias: 1=A, 2=B, 3=C, 4=D, 5=E y 6=F)

**Tabla 10.** Pesos de los componentes obtenidos de la fracción **F2A-NAT**

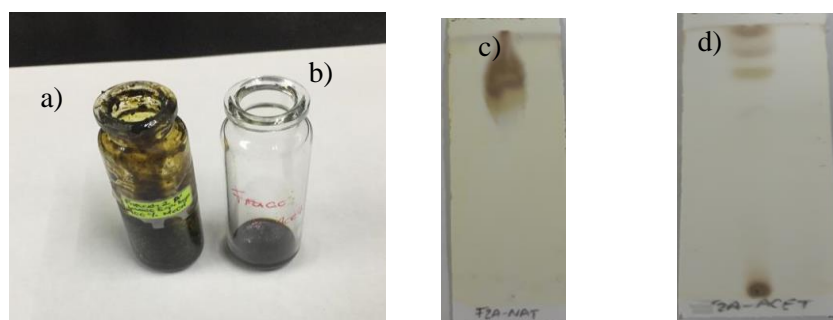
Número de muestra	Clave asignada	Peso (mg)	Rendimiento (%)
1	EPSEN-A NAT	7.8	3.90
2	EPSEN-B NAT	26.9	13.45
3	EPSEN-C NAT	42.5	21.25
4	EPSEN-D NAT	52.1	26.05
5	EPSEN-E NAT	49	24.50
6	EPSEN-F NAT	24.2	12.10

Los compontes que presentaron un mayor peso y rendimiento fueron las muestras **3 EPSEN-C NAT**, **4 EPSEN-D NAT** y **5 EPSEN-E NAT**, con un peso de 42.5, 52.1 y 49 mg, dando como resultado un rendimiento de 21.25 %, 26.05 % y 24.50 %.

### **9.2 Reacción de acetilación de la fracción F2A-NAT**

Se pesaron 200 mg de la fracción **F2A-NAT** y se colocaron en un vial adicionando 2 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina dejando la reacción por 48 horas en agitación.

Como resultado se logró acetilar la **F2A-NAT**, lo que dio origen a una mezcla de compuestos de mediana polaridad ahora nombrada **F2A-ACET**. Se aplicó una muestra de la fracción en una CCF para un análisis cualitativo, en el cual se observó una mayor separación de los compuestos como se muestra en la figura 16.

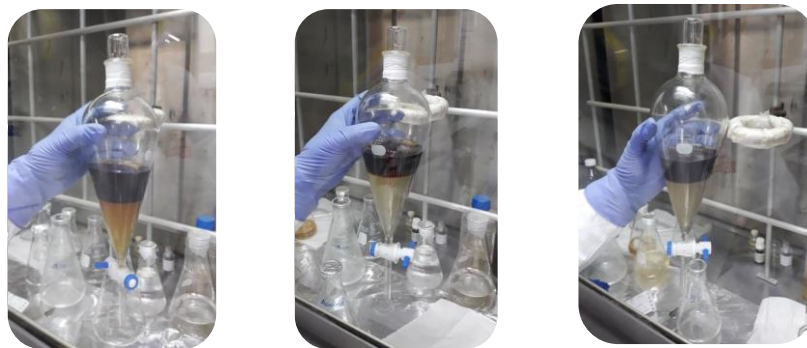


**Figura 16.** a) Fracción **F2A-NAT** y b) fracción de media polaridad **F2A-ACET**, obtenida de la reacción de acetilación, c) CCF de la **F2A-NAT** en un sistema de disolventes 3:7 AcOEt: MeOH y d) CCF de la **F2A-ACET** en un sistema de disolventes 3:7 Hex: AcOEt.

### 9.2.1 Recuperación de la fase orgánica de la reacción de acetilación.

Se recuperó más producto de reacción durante el lavado de la **F2-ACET** de acuerdo con la metodología antes mencionada.

En la mezcla de reacción se obtuvo una fase acuosa con Py y otra fase orgánica, que contiene los compuestos acetilados (figura 17).



Mezcla de la reacción, fase acuosa con Py y fase orgánica con los compuestos acetilados.



Lavado de la fase orgánica con 50 ml de solución concentrada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , hasta obtener pH 7.



Lavado de la fase orgánica con 50 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .



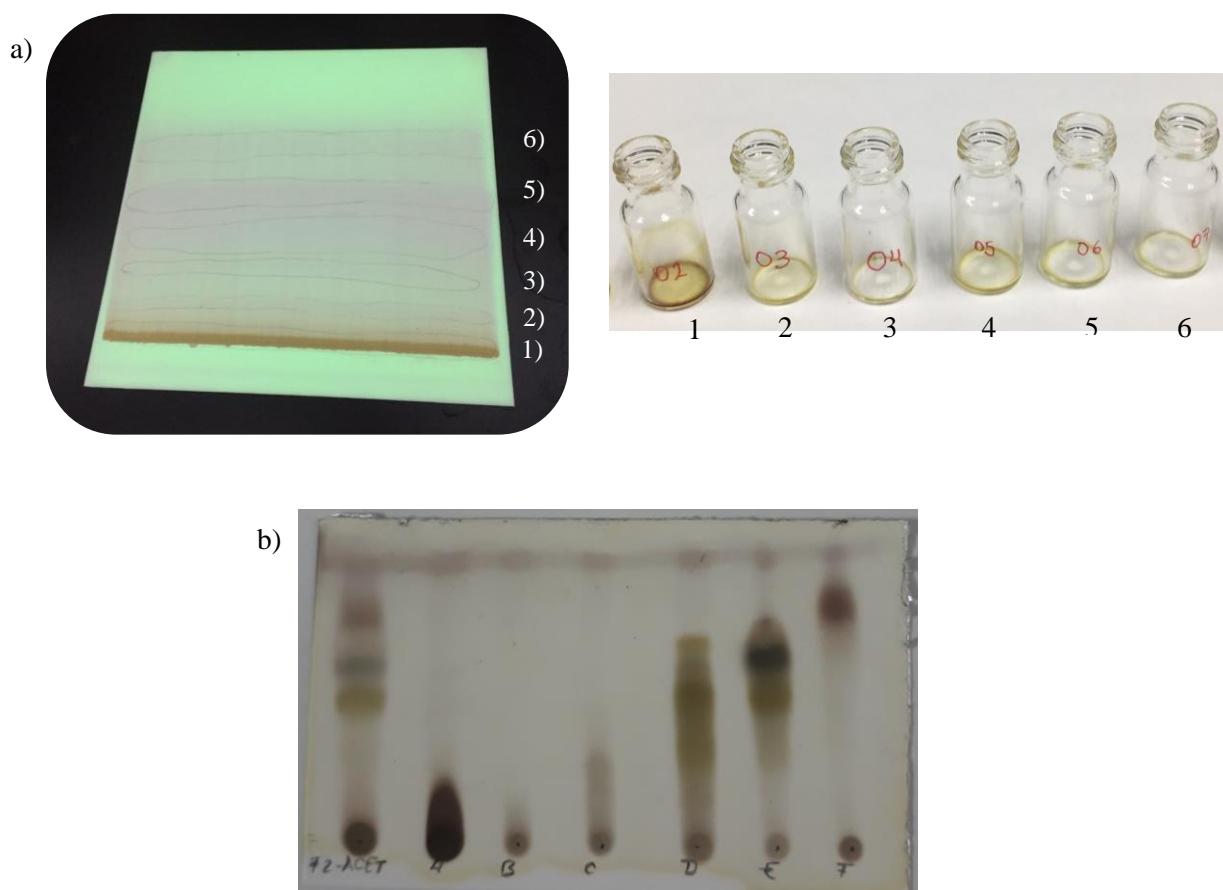
Filtración de la fase acuosa con sulfato de sodio anhidro.

**Figura 17.** Recuperación de la fase orgánica de la fracción F2A-ACET

### 9.2.2 Separación de compuestos de la F2A-ACET.

Una vez concluida la reacción y seca, se procedió a realizar una CCFP para la purificación de los componentes (figura 18a). Posteriormente se aplicó una muestra de cada componente en una CCF para un análisis cualitativo de los compuestos presentes en cada una, revelada con sulfato cérico (figura 18 b).

Los componentes aislados fueron nombrados con las siguientes claves: 1) **EPSEN-A-ACET**, 2) **EPSEN-B-ACET**, 3) **EPSEN-C-ACET**, 4) **EPSEN-D-ACET**, 5) **EPSEN-E-ACET** y 6) **EPSEN-F-ACET**. La tabla 11 muestra los pesos obtenidos y el rendimiento para cada uno de los componentes.



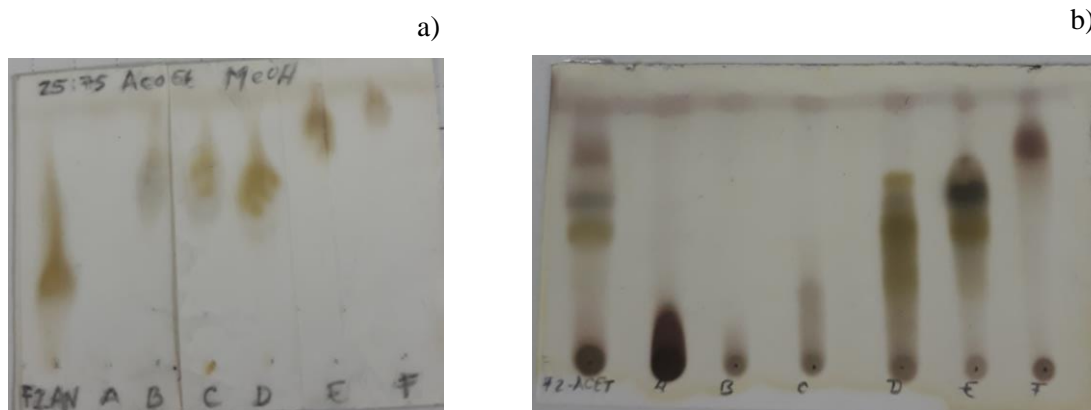
**Figura 18.** a) CCFP de la **F2A-ACET** en un sistema de disolventes 3:7 Hex: AcOEt vista bajo una lámpara de Luz UV y b) CCF de los compuestos separados en la CCF. (Considerar las siguientes equivalencias: 1=A, 2=B, 3=C, 4=D, 5=E y 6=F)

**Tabla 11.** Pesos de los componentes obtenidos de la fracción **F2A-ACET**

Número de muestra	Clave asignada	Peso (mg)	Rendimiento (%)
1	EPSEN-A-ACET	17.3	8.65
2	EPSEN-B-ACET	1.2	0.6
3	EPSEN-C-ACET	3.8	1.9
4	EPSEN-D-ACET	11.2	5.6
5	EPSEN-E-ACET	25.5	12.75
6	EPSEN-F-ACET	17.8	8.9

Los componentes de los cuales se obtuvo mayor cantidad de peso y rendimiento fueron la muestra **4. EPSEN-D-ACET**, **5. EPSEN-E-ACET** y **6 EPSEN-F-ACET** con un peso de 11.2, 25.5 y 17.8 mg, obteniendo un rendimiento de 5.6 %, 12.75% y 8.9 %.

A continuación se muestra la CCF de la **F2A-NAT** y de la **F2A-ACET**, en la cual se observa que los compuestos de alta polaridad ahora son de mediada polaridad, logrando una mayor separación de compuestos. Sin embargo, el peso y el rendimiento obtenido de la **F2A-NAT** es mayor comparado con los pesos de la **F2A-ACET**, como se muestra en la tabla 12.



**Figura 19.** CCF de los compuestos separados de las fracciones a) **F2A-NAT** en un sistema de disolventes 25:75 AcOEt: MeOH y b) **F2A-ACET** en un sistema de disolventes 3:7 Hex: AcOEt.



**Tabla 12.** Comparación de los pesos y el rendimiento de la **F2A-NAT** y **F2A-ACET**

Número de muestras	Peso (mg)		Rendimiento (%)	
	<b>F2A-NAT</b>	<b>F2A-ACET</b>	<b>F2A-NAT</b>	<b>F2A-ACET</b>
1	7.8	17.3	3.9	8.65
2	26.9	1.2	13.45	0.6
3	42.5	3.8	21.25	1.9
4	52.1	11.2	26.05	5.6
5	49	25.5	24.5	12.75
6	24.2	17.8	12.1	8.9

### 9.3 Prueba de la actividad antioxidante

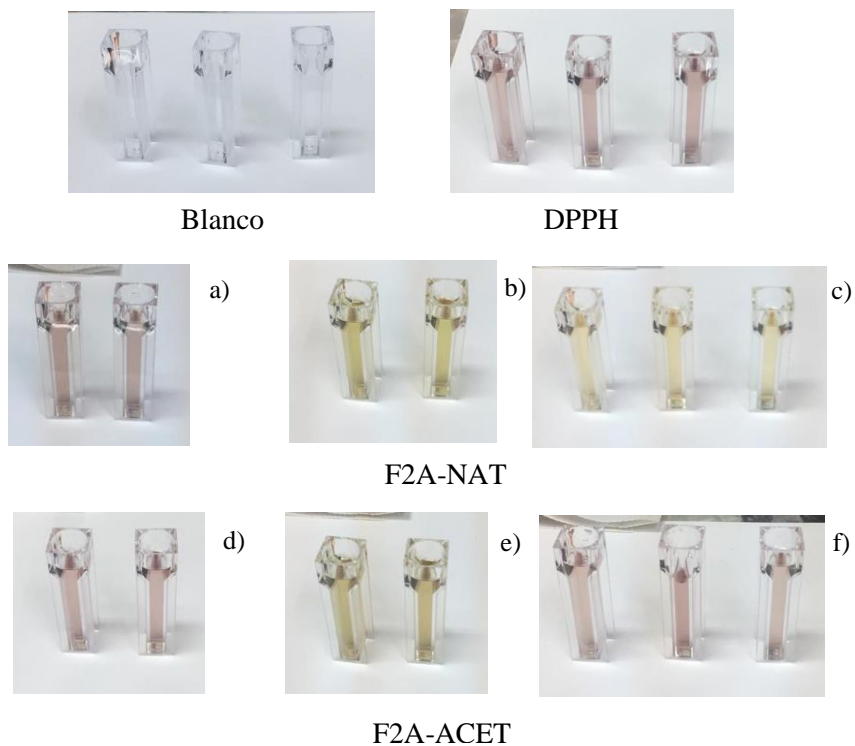
#### 9.3.1 Evaluación del extracto metanólico de las hojas de *E. platycarpa* y las fracciones **F2A-NAT** y **F2A-ACET**.

Se determinó la actividad antioxidante de acuerdo con lo expuesto en el apartado de materiales y métodos, el % de reducción del extracto metanólico, la fracción **F2A-NAT** y **F2A-ACET** se muestran en la tabla 13 y las imágenes obtenidas de esta determinación se muestran en la figura 20.

**Tabla 13.** Porcentaje de reducción del radical libre DPPH

<b>MUESTRA</b>	<b>10 ppm</b>	<b>100 ppm</b>	<b>1000 ppm</b>
<b>Blanco (EtOH)</b>	0.00	0.00	0.00
<b>Extracto Metanólico de las hojas de <i>E. platycarpa</i></b>	17.568*	71.815*	68.147*
<b>F2A-NAT</b>	13.14 ± 2.63	63.41 ± 1.356	33.44 ± 0.497
<b>F2A-ACET</b>	-0.65 ± 1.128	11.40 ± 0.564	-0.22 ± 0.188
<b>Quercetina</b>	88.42 ± 0.9	87.10 ± 4.4	90.86 ± 0.00

\*Datos obtenidos de Carrillo, M. 2004



**Figura 20.** Determinación de la actividad antioxidante de las fracciones, F2A-NAT a una concentración de a) 10 ppm b) 100 ppm c) 1000 ppm y F2A-ACET a una concentración de d) 10 ppm e) 100 ppm f) 1000 ppm.

La fracción **F2A-NAT** mostró mayor capacidad de reducción del DPPH, logrando un 63.41 % a la concentración de 100 ppm y la fracción **F2A-ACET** mostró un 11.40 % de reducción a la misma concentración. A 1000 ppm en ambas fracciones se observó una disminución de su capacidad antioxidante, esto es posible explicarlo de acuerdo con las interacciones moleculares que podrían ocurrir entre los componentes al incrementarse su concentración y con ello interferir en la transferencia de hidrógenos al radical libre DPPH. Por su parte, quercetina como antioxidante de referencia mostró un porcentaje de reducción de 88.42 % a 10 ppm.

### **9.3.2 Evaluación de los componentes de la fracción F2A-NAT**

Se realizó la determinación de la actividad antioxidante de los componentes de la fracción natural F2A-NAT de acuerdo a lo estipulado en el apartado de materiales y métodos. En la tabla

14 se presentan los % de reducción del radical libre DPPH, los datos obtenidos fueron graficados (figura 21). Las celdas en las que se realizó la lectura de las absorbancias con el radical libre y los compuestos aislados se muestran en la figura 23.

**Tabla 14.** % de reducción del radical libre DPPH de los compuestos naturales aislados.

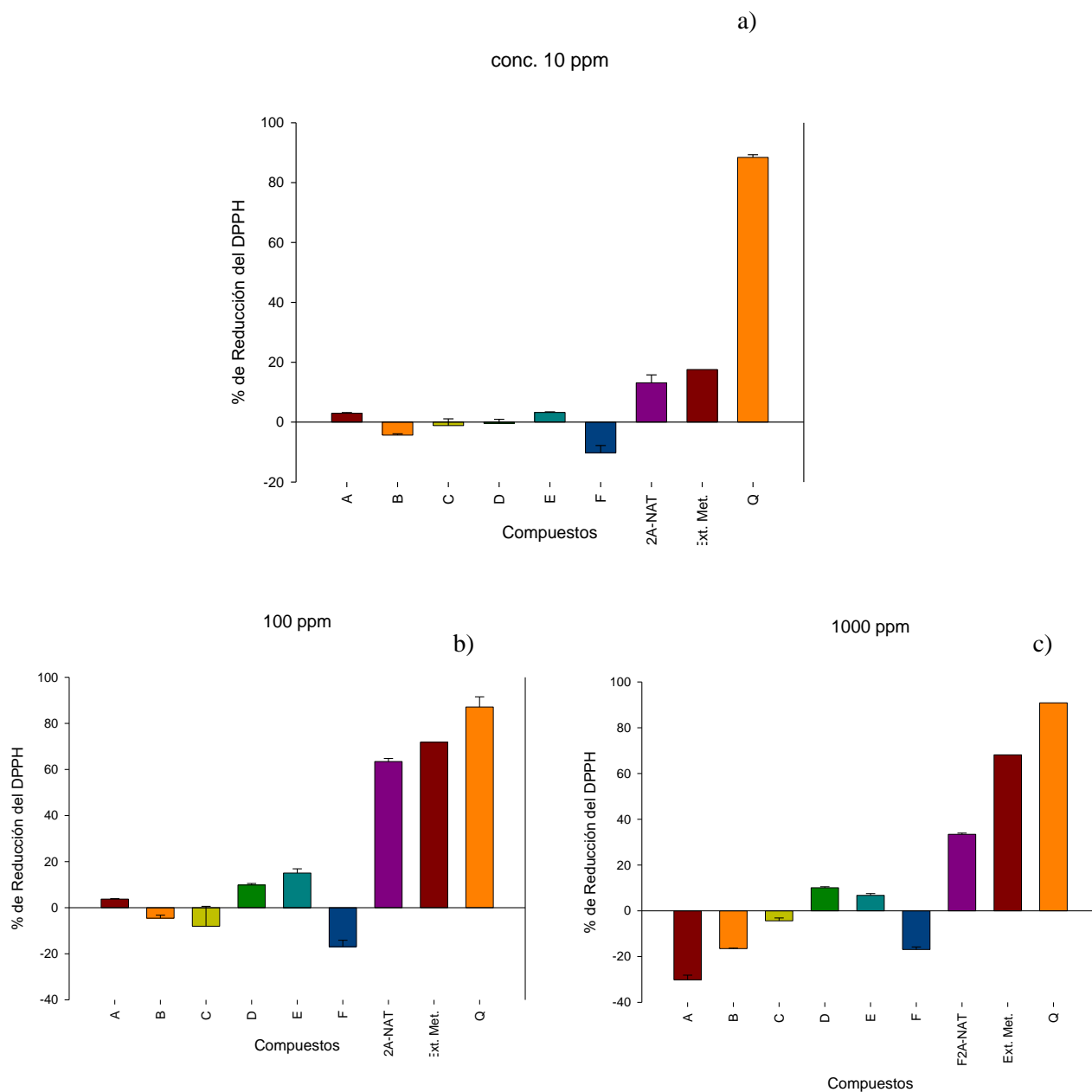
<b>MUESTRA</b>	<b>10 ppm</b>	<b>100 ppm</b>	<b>1000 ppm</b>
<b>Blanco (EtOH)</b>	0.00	0.00	0.00
<b>EPSEN-A-NAT</b>	2.99 ± 0.23	3.69 ± 0.23	-30.20 ± 2.07
<b>EPSEN-B-NAT</b>	-4.33 ± 0.44	-4.58 ± 1.33	-16.55 ± 0.23
<b>EPSEN-C-NAT</b>	-1.15 ± 2.25	-8.06 ± 8.64	-4.38 ± 1.25
<b>EPSEN-D-NAT</b>	-0.42 ± 1.36	9.84 ± 0.68	10.05 ± 0.44
<b>EPSEN-E-NAT</b>	3.23 ± 0.21	15.04 ± 1.84	6.75 ± 0.53
<b>EPSEN-F-NAT*</b>	-19.35 ± 15.86	-16.94 ± 2.81	-16.94 ± 1.11
<b>Quercetina</b>	88.42 ± 0.9	87.10 ± 4.4	90.86 ± 0.00

\*La muestra EPSEN-F-NAT se descarta para el análisis de RMN-<sup>1</sup>H debido a que en una segunda cromatografía en capa fina preparativa tanto la muestra EPSEN-F-NAT como la EPSEN-E-NAT aparecen reunidas en la franja denominada EPSEN-E-NAT de esa nueva cromatografía.

En la concentración de 10 ppm (figura 21a) la fracción F2A-NAT y el extracto metanólico presentaron un % de reducción de 13.14 y 17.568 mientras que el control quercetina (Q), presento un % de reducción de 88.42. Los compuestos naturales aislados no presentaron actividad antioxidante a esta concentración.

El extracto metanólico y la F2A-NAT a 100 ppm (figura 21b) presentaron mayor actividad antioxidante con un % de reducción de 71.815 y 63.41± 1.35 con respecto a la concentración de 10 ppm. Los compuestos naturales aislados a la concentración de 100 ppm con mayor % de reducción fueron EPSEN-D-NAT de 9.84 ± 0.68 y el compuesto EPSEN-E-NAT de 15.04 ± 1.84.

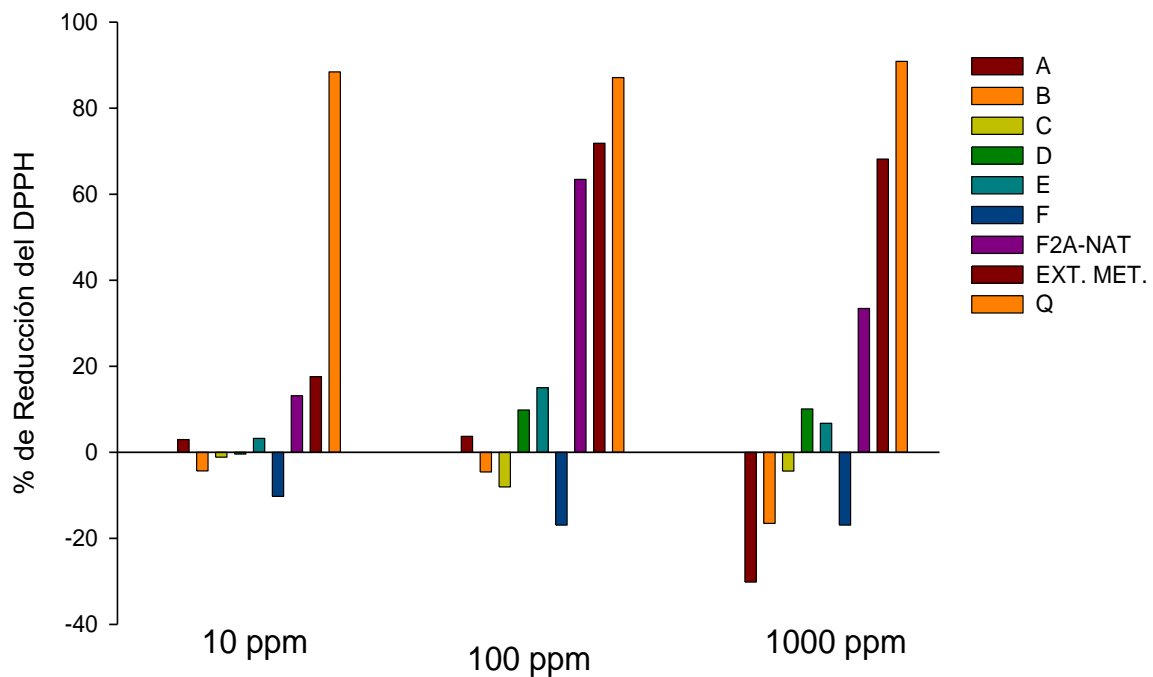
El % de reducción del extracto metanólico y la F2A-NAT a la concentración de 1000 ppm (figura 21c), disminuyo a 68.147 y 33.44 ± 0.497. Los compuestos naturales aislados con mayor % de reducción fueron EPSEN-D-NAT de 10.05 ± 0.44 y EPSEN-E-NAT de 6.75 ± 0.5.



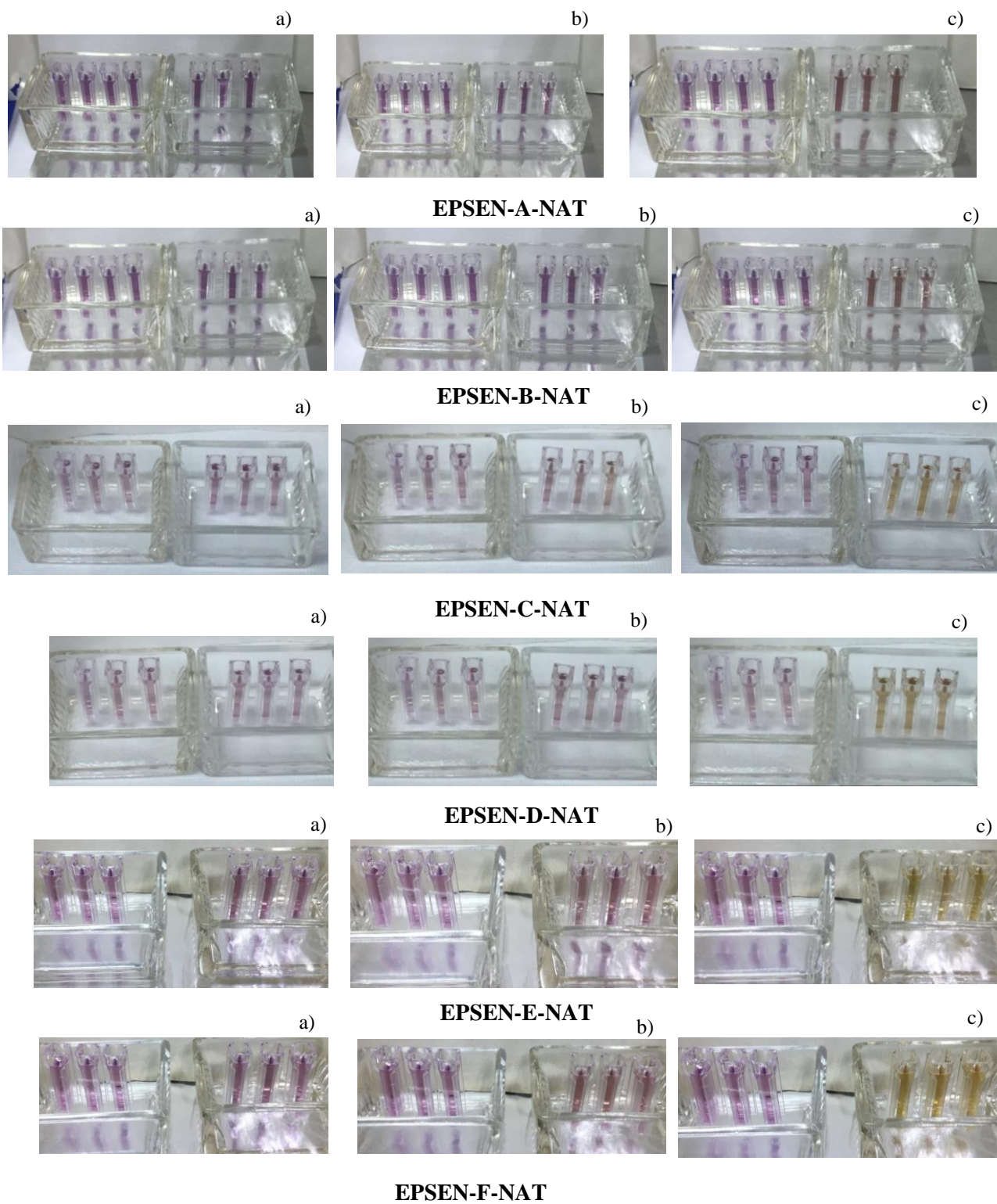
**Figura 21.** % de Reducción del radical libre DPPH a una concentración de a) 10 ppm b) 100 ppm y c) 1000 ppm del extracto integro metanólico, la fracción natural F2A-NAT y los compuestos naturales aislados.

El extracto metanólico y la F2A-NAT a 100 ppm presentaron mayor actividad antioxidante con respecto a la concentración de 10 y 1000 ppm.

Los compuestos naturales aislados con mayor actividad antioxidante fueron **EPSEN-D-NAT** a una concentración de 1000 ppm siendo dependiente de la concentración y el compuesto **EPSEN-E-NAT** a la concentración de 100 ppm (figura 22).



**Figura 22.** % de Reducción del radical libre DPPH en las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm del extracto integro metanólico, la fracción natural F2A-NAT y los compuestos naturales aislados.



**Figura 23.** Celdas con DPPH y los compuestos naturales aislados a las concentraciones de a) 10, b) 100 y c) 1000 ppm, cuyas absorbancias fueron leídas en un espectrofotómetro genesys UV.

### 9.3.3 Evaluación de los componentes de la fracción F2A-ACET.

Se determinó la actividad antioxidante con el radical libre DPPH de los compuestos acetilados aislados en las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm. En la tabla 15 se muestra el % de reducción de los compuestos acetilados aislados y en la figura 24 se muestran las celdas en las que se realizó la lectura de las absorbancias del radical libre con los compuestos aislados.

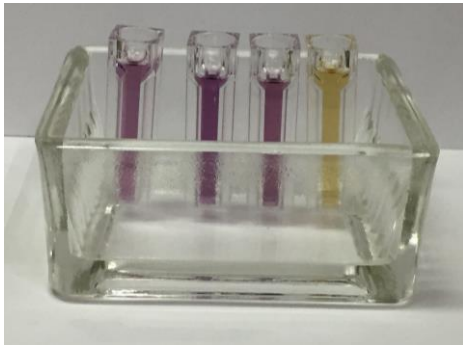
**Tabla 15.** Porcentaje de reducción del radical libre DPPH de los compuestos acetilados.

Muestra	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
Blanco (EtOH)	0.00	0.00	0.00
EPSEN-A-ACET	-41.38	-15.79	55.35
EPSEN-B-ACET	-37.02	-1.63	7.80
EPSEN-C-ACET	-36.84	-29.40	21.78
EPSEN-D-ACET	-24.14	-28.13	49.00
EPSEN-E-ACET	-35.75	-17.06	-8.71
EPSEN-F-ACET	-31.58	-13.43	-3.81

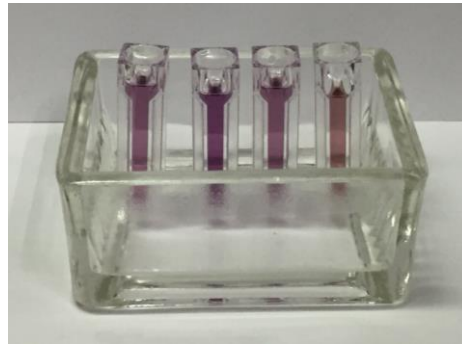
La fracción acetilada presento un % de reducción de  $-0.65 \pm 1.128$  a una concentración de 10 ppm, ningún compuesto acetilado aislado presento actividad antioxidante a esta concentración.

En la concentración de 100 ppm la fracción acetilada presento un % de reducción de  $11.40 \pm 0.564$ , los compuestos acetilados aislados no presentaron actividad antioxidante a esta concentración.

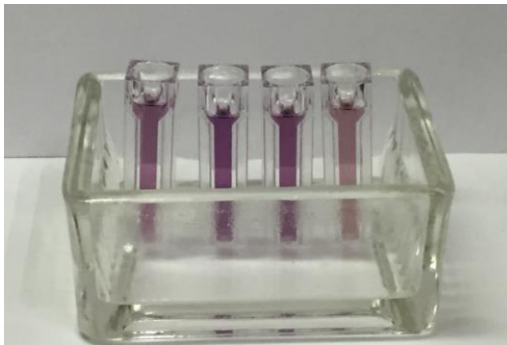
En la concentración de 1000 ppm la fracción acetilada **F2A-ACET** presento un % de reducción de  $0.22 \pm 0.188$ , los compuestos aislados con mayor % de reducción fueron el **EPSEN-A-NAT** y **EPSEN-D-NAT** con 55.35 y 49 respectivamente.



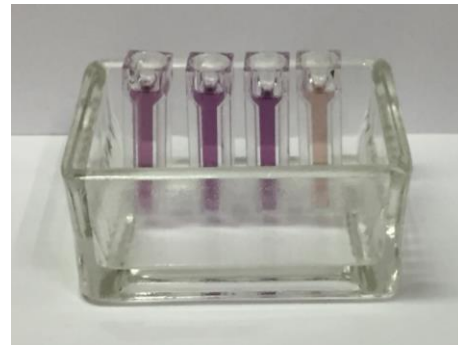
**Blanco y EPSEN-A-ACET**



**Blanco y EPSEN-B-ACET**



**Blanco y EPSEN-C-ACET**



**Blanco y EPSEN-D-ACET**



**Blanco y EPSEN-E-ACET**



**Blanco y EPSEN-F-ACET**

**Figura 24.** Celdas con DPPH y los compuestos naturales aislados a las concentraciones de a) 10, b) 100 y c) 1000 ppm, cuyas absorbancias fueron leídas en un espectrofotómetro genesys UV (continuación).



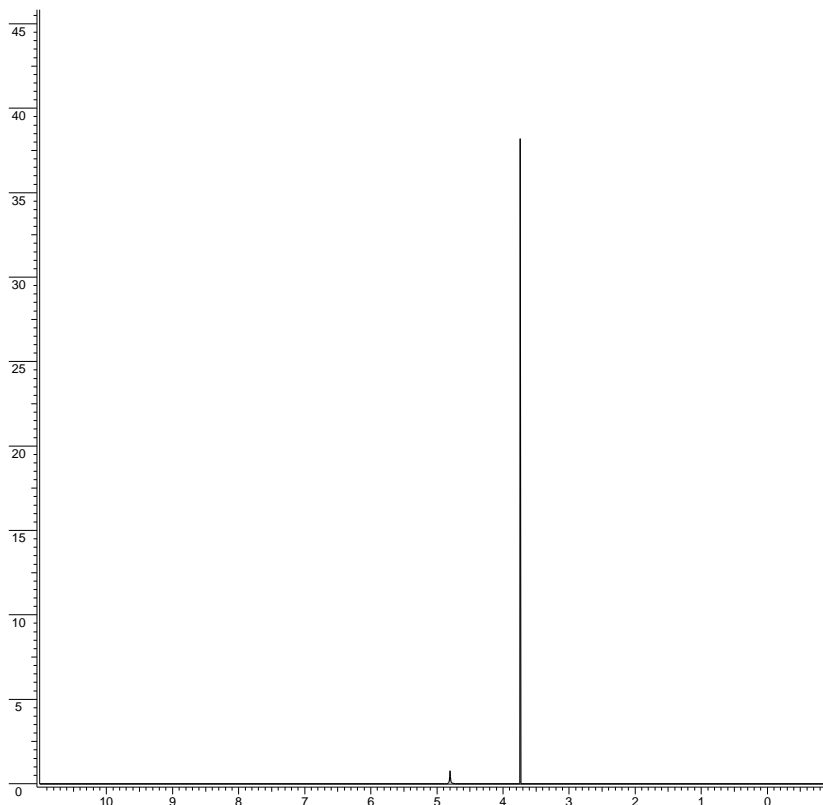
## 9.4 Caracterización de los componentes

### 9.4.1 Caracterización del compuesto EPSEN-A-NAT de la fracción F2A-NAT

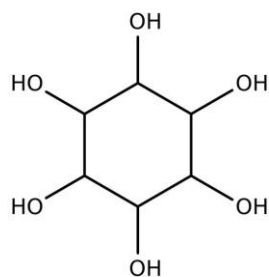
Una vez obtenidos los componentes de la fracción **F2A-NAT** se procedió a su análisis por RMN  $^1\text{H}$ ; se analizaron el compuesto **EPSEN-A-NAT** y el compuesto **EPSEN-C-NAT**.

Se estableció el perfil estructural del compuesto **EPSEN-A-NAT** a partir de la comparación de su espectro experimental obtenido con el espectro calculado del inositol (figura 25 y 27).

El espectro calculado del inositol se hizo en el programa Chem Sketch. La estructura química del inositol se muestra en la figura 26 y los datos de la tabla 16 muestran los desplazamientos químicos del espectro calculado del inositol.



**Figura 25.** Espectro calculado de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto inositol.



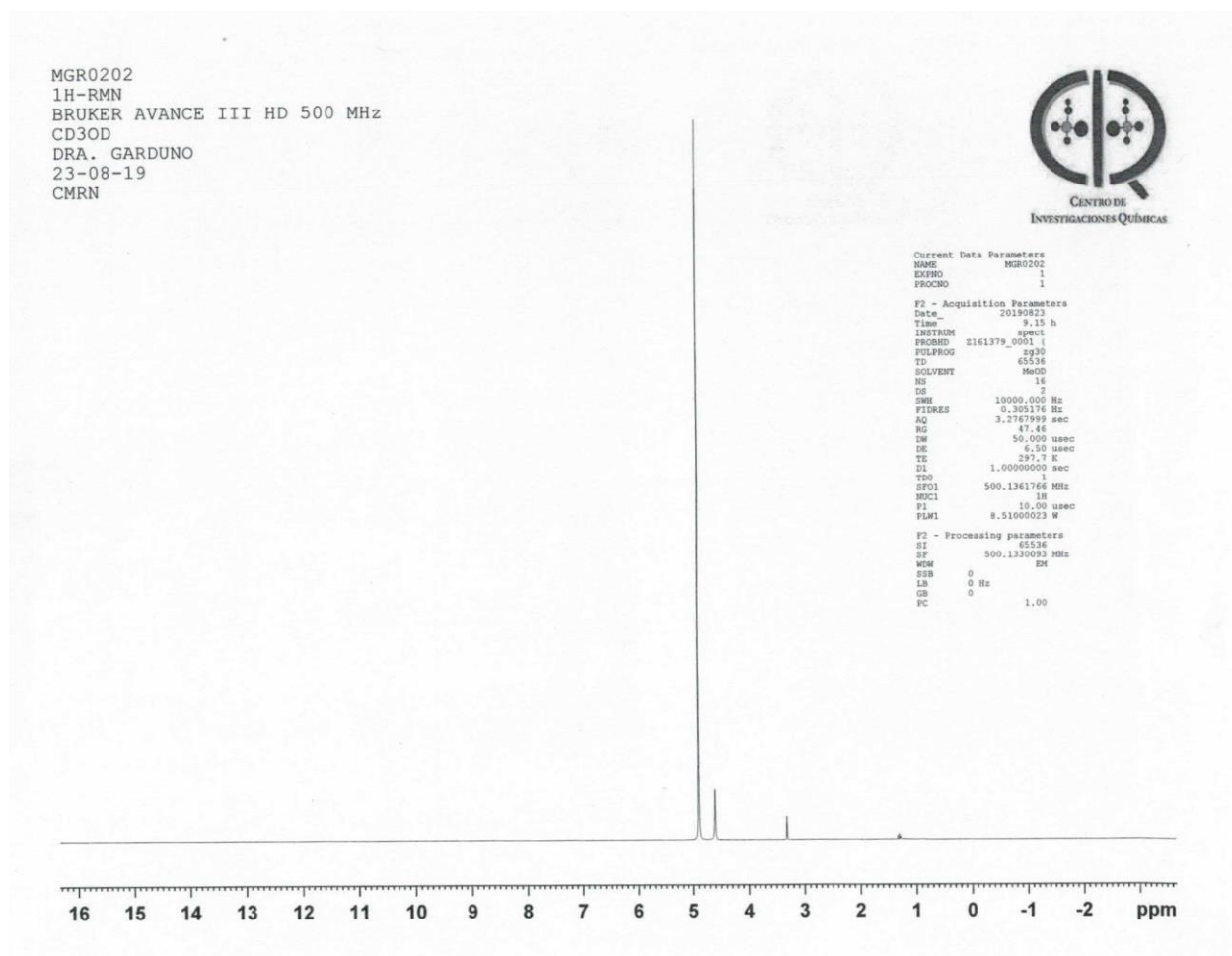
**Figura 26.** Estructura química del inositol.

**Tabla 16.** Desplazamientos químicos del espectro calculado de inositol.

Hidrógeno	$\delta$ (ppm)
(-OH)	4.80
-H	3.74
1,2,3,4,5,6	

En el espectro de hidrógeno simulado de un compuesto inositol se encuentran dos tipos de señales, en  $\delta$  54.80 ppm se encuentran los hidrógenos correspondientes a los hidroxilos de la molécula y en  $\delta$  3.74 ppm se encuentran los hidrógenos de las posiciones 1 a 6 del anillo.

El espectro experimental del compuesto **EPSEN-A-NAT** se obtuvo en metanol deuterado a 500 MHz como se muestra en la figura 27.



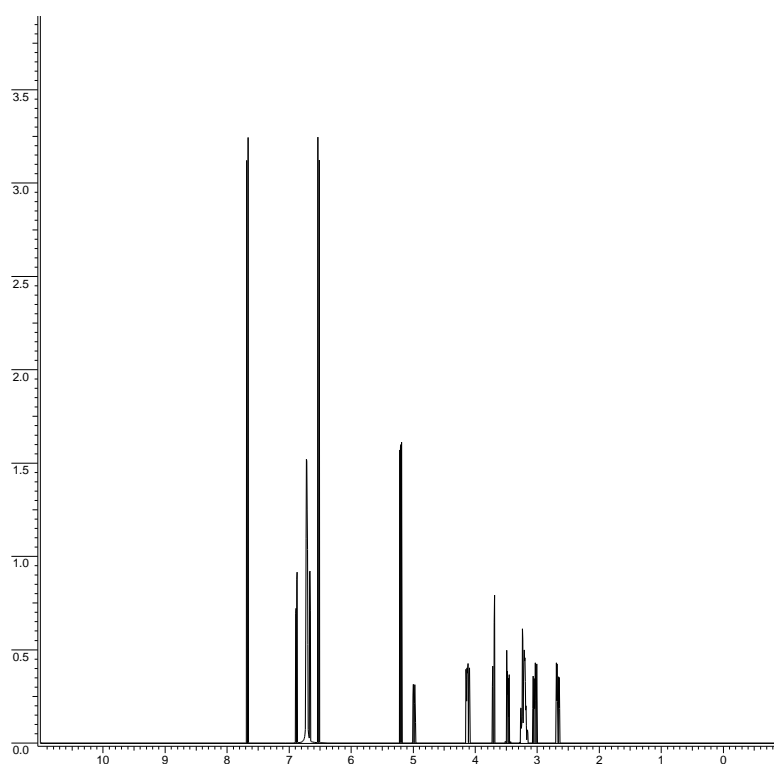
**Figura 27.** Espectro experimental de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **EPSEN-A-NAT**

Comparando el espectro simulado del inositol con las señales que se presentan para el compuesto EPSEN-A-NAT se observan las señales en  $\delta$  3.57 ppm como una señal simple que puede ser asignable a los hidrógenos del anillo de un inositol, sin embargo, la presencia de otras señales limita a dar una caracterización inequívoca únicamente con el análisis del espectro de hidrógeno unidimensional, por lo tanto solo es posible mencionar que puede corresponder a un inositol pero que probablemente se encuentre en mezcla con otros compuestos.

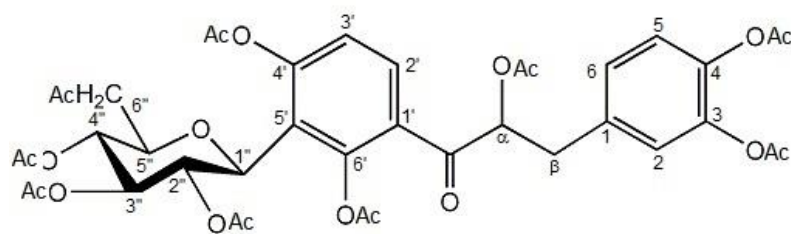
### 9.4.2 Caracterización del compuesto EPSEN-C-NAT de la fracción F2A-NAT

Se estableció el perfil estructural del compuesto **EPSEN-C-NAT** por medio de la comparación de su espectro experimental obtenido y los espectros calculados de coatlina B y del isoflavano, que es otro componente que posiblemente se encuentre en mezcla con coatlina B.

El espectro de RMN- $^1\text{H}$  de coatlina B se calculó en el programa Chem Sketch (figura 28), los datos de la tabla 17 muestran los desplazamientos químicos de coatlina B natural y en la figura 29 se muestra su estructura química.



**Figura 28.** Espectro calculado de RMN  $^1\text{H}$  de coatlina B.



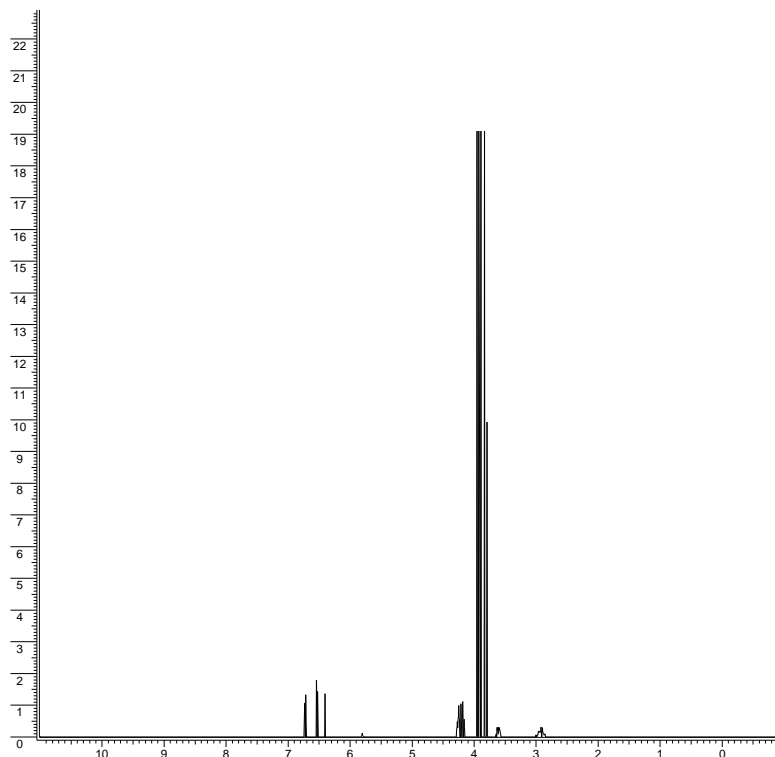
**Figura 29.** Estructura química de coatlina B.

**Tabla 17.** Desplazamientos químicos del espectro calculado de RMN <sup>1</sup>H de coatlina B.

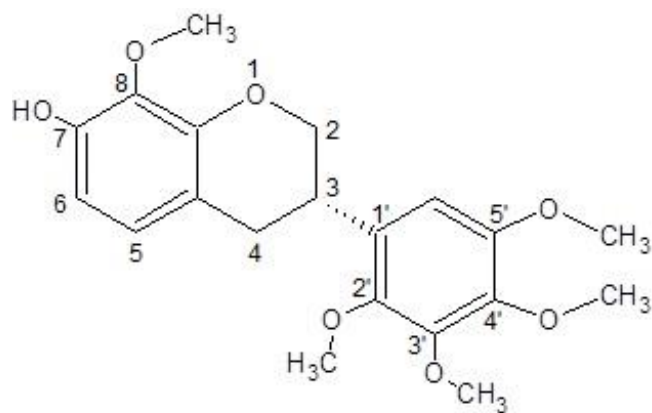
Hidrógeno	δ (ppm)
2'	7.67
5	6.87
(-OH)	6.71
2	6.66
3'	6.52
α	5.19
1"	4.99
2"	4.1
6"-β	3.7
6"α	3.48
32	3.24
5"	3.21
4"	3.19
βb	3.03
βa	2.66

En el espectro simulado de coatlina B natural a campo bajo se observa una señal en δ 7.67 ppm que corresponde al hidrógeno de la posición 2' en el anillo aromático A, posteriormente se observa en δ 6.87 ppm el hidrógeno aromático H-5 del anillo B y centrado en δ 6.87 ppm se presentan todos los hidrógenos del hidroxilo de la molécula, a 6.66 ppm asignado al hidrógeno de la posición 2, en δ 6.52 ppm aparece el hidrógeno de la posición 3' que corresponde a un hidrógeno aromático, continuando al centro se observa una señal en δ 5.19 ppm se muestra el desplazamiento químico del hidrógeno α, en δ 4.99 ppm aparece la señal correspondiente al hidrógeno base de oxígeno, continuando a δ 3.70 ppm se observa la señal del hidrógeno β6" del azúcar y en δ 3.48 ppm la señal correspondiente al hidrógeno 6"α, en δ 3.24, 3.21 y 3.19 ppm se observan las señales de los hidrógenos del azúcar correspondientes a las posiciones 3", 5" y 4" y finalmente a campo alto se observa en δ 3.03 y 2.66 ppm las señales de los hidrógenos βb y βa respectivamente.

El espectro del isoflavano (35)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxi-isoflavano aislado de *E.polystachya*, se calculó en el programa Chem Sketch (figura 30) y la estructura química se muestra en la figura 31.

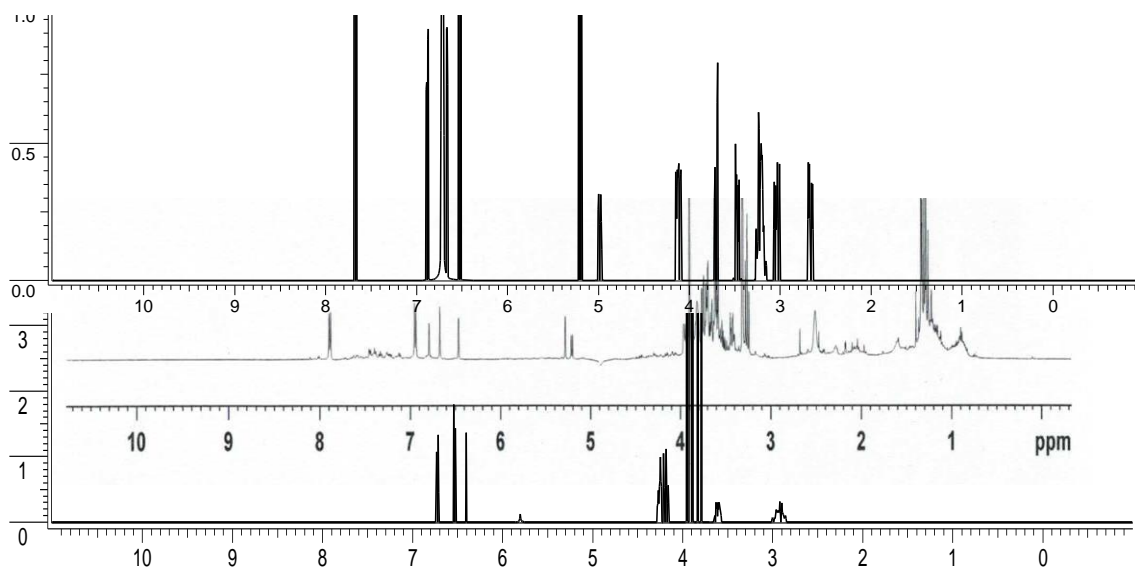


**Figura 30.** Espectro calculado de RMN  $^1\text{H}$  del isoflavano natural



**Figura 31.** Estructura química de isoflavano natural

Se realizó la superposición de los espectros calculados de coatlina B y del isoflavano con el compuesto EPSEN-C-NAT, esto nos permitió identificar similitudes de señales en los espectros como se muestra en la figura 32.



**Figura 32.** Superposición de los espectros calculados de RMN-<sup>1</sup>H de coatlina B e isoflavano con el espectro experimental de **EPSEN-C-NAT**.

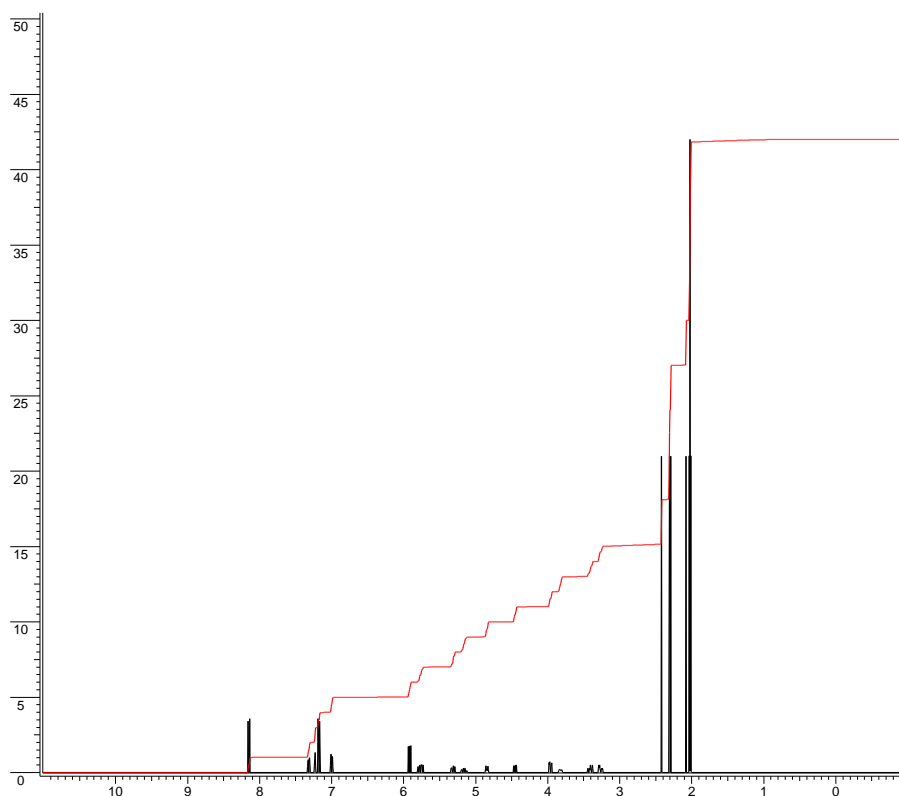
### 9.4.3 Caracterización del compuesto EPSEN-D-NAT de la fracción F2A-ACET

Se obtuvieron seis componentes de la fracción **F2A-ACET**, por medio de CCF y análisis espectroscópico por RMN  $^1\text{H}$ , se observó que aún hay mezcla de compuestos en las fracciones obtenidas.

Posteriormente se estableció el perfil estructural del compuesto **EPSEN-D-ACET** a partir de la comparación de su espectro experimental obtenido y los espectros calculados de coatlina B (figura 33).

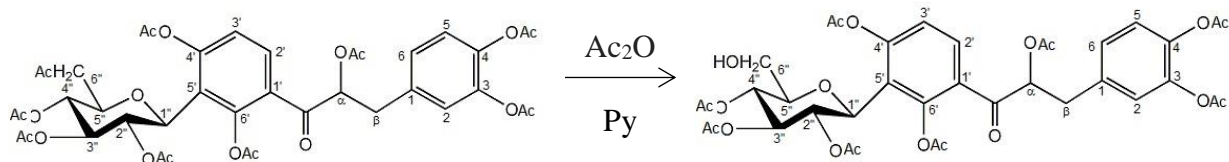
El espectro calculado de coatlina B y del Inositol se realizaron en el programa Chem Sketch, estos compuestos han sido aislado de la especie vegetal *Eysenhardtia polystachia* reportado ya en la literatura (Beltrani, E. *et al* 1982).

La reacción de acetilación de la coatlina natural a coatlina B acetilada se muestra en la figura 34, los desplazamientos químicos de las señales de hidrógeno en el espectro calculado se muestran en la tabla 18.



**Figura 33.** Espectro calculado de RMN  $^1\text{H}$  de coatlina B acetilada





**Figura 34.** Coatline B aislada de *Eysenhardtia polystachia* y su reacción de acetilación

**Tabla 18.** Desplazamientos químicos de las señales para los hidrógenos del espectro calculado para Coatline B acetilada.

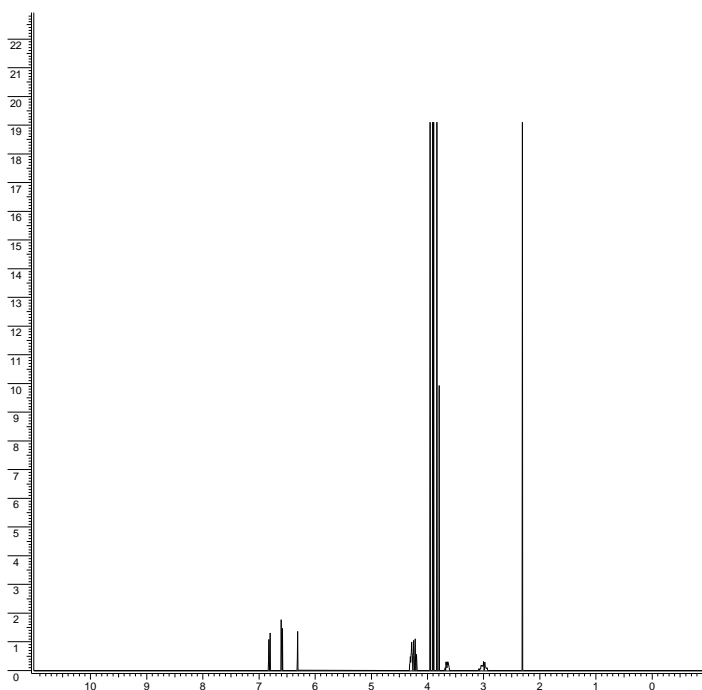
Hidrógeno	$\delta$ (ppm)	Hidrógeno	$\delta$ (ppm)
$\alpha$	5.93	5''	3.84
$\beta$ a	3.29	6''a	3.98
$\beta$ b	3.4	6''b	4.44
2	7.23	$\alpha$ OAc	2.08
5	7.3	3-OAc	2.29
6	7.01	4-OAc	2.31
5'	7.19	2'-OAc	2.42
6'	8.13	4'-OAc	2.31
1''	4.85	2''-OAc	2.03
2''	5.78	3''-OAc	2.01
3''	5.31	4''-OAc	2.03
4''	5.17	6''-OAc	2.06

En el espectro de hidrógeno simulado de coatline B se observa a campo bajo un doblete en  $\delta$  8.14 ppm correspondiente al hidrógeno aromático en  $\delta$  2', en 7.32 ppm se observa la señal para el hidrógeno aromático de la posición 5, en  $\delta$  7.23 ppm se observa la señal del hidrógeno de la posición 2, en  $\delta$  7.18 ppm la posición 3' y en  $\delta$  7.01 ppm aparece la señal correspondiente al hidrógeno aromático de la posición 6. Al centro del espectro se observa en  $\delta$  5.93 ppm el hidrógeno  $\alpha$ , en  $\delta$  5.78 ppm se observa la señal correspondiente al hidrógeno 5'', en  $\delta$  5.31 ppm la señal correspondiente al hidrógeno de la posición 3'', para el hidrógeno 4'' se observa la señal de  $\delta$  5.17 ppm, el hidrógeno anomérico del azúcar del compuesto se observa en un desplazamiento químico de 4.85 ppm esto es el hidrógeno 4'', en  $\delta$  4.44 ppm se observa la señal correspondiente

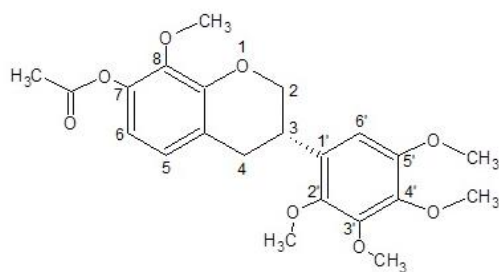
al hidrógeno 6'', en  $\delta$  3.98 ppm la señal correspondiente al hidrógeno 6'' $\alpha$ , en  $\delta$  3.84 ppm, en  $\delta$  3.4 ppm se encuentra la señal del hidrógeno  $\beta$ b y en  $\delta$  3.29 ppm la señal para  $\beta$ a.

Continuando con el análisis espectroscópico en  $\delta$  2.42 ppm se observa la señal para los hidrógenos del metilo del grupo acetato en posición 6', en  $\delta$  2.31 la señal para el metil éster de la posición 4 y en  $\delta$  2.29 ppm la señal del metil éster de la posición 4', en  $\delta$  2.29 ppm la señal correspondiente a los hidrógenos del metilo del acetato en la posición 3 y para el de los acetatos del azúcar las señales aparecen en  $\delta$  2.03, 2.01, 2.03 y 2.06 ppm para los metilos en las posiciones 2'',3'',4'' y 6'', respectivamente.

En la figura 35 se muestra el espectro simulado del isoflavano acetilado, se observa una señal en  $\delta$  6.88 ppm asignada para el hidrógeno aromático de la posición 5, en  $\delta$  6.60 ppm se observa otra señal correspondiente al hidrógeno de la posición 6 y en  $\delta$  6.31 ppm la señal del hidrógeno de la posición 6'. En  $\delta$  4.28 ppm se encuentra la señal asignada al hidrógeno 2 $\beta$  y en  $\delta$  4.22 ppm la señal del hidrógeno 2 $\alpha$  del metilo del anillo heterocíclico, en  $\delta$  3.95 ppm se encuentra la señal de los hidrógenos del metoxilo de la posición 3', posteriormente en 3.90 ppm el metoxilo de la posición 8 y en  $\delta$  3.89, 3.83 y 3.79 ppm las señales de los demás metoxilos en posiciones 4', 2' y 5', respectivamente. La estructura química del isoflavano acetilado se encuentra en la figura 36.



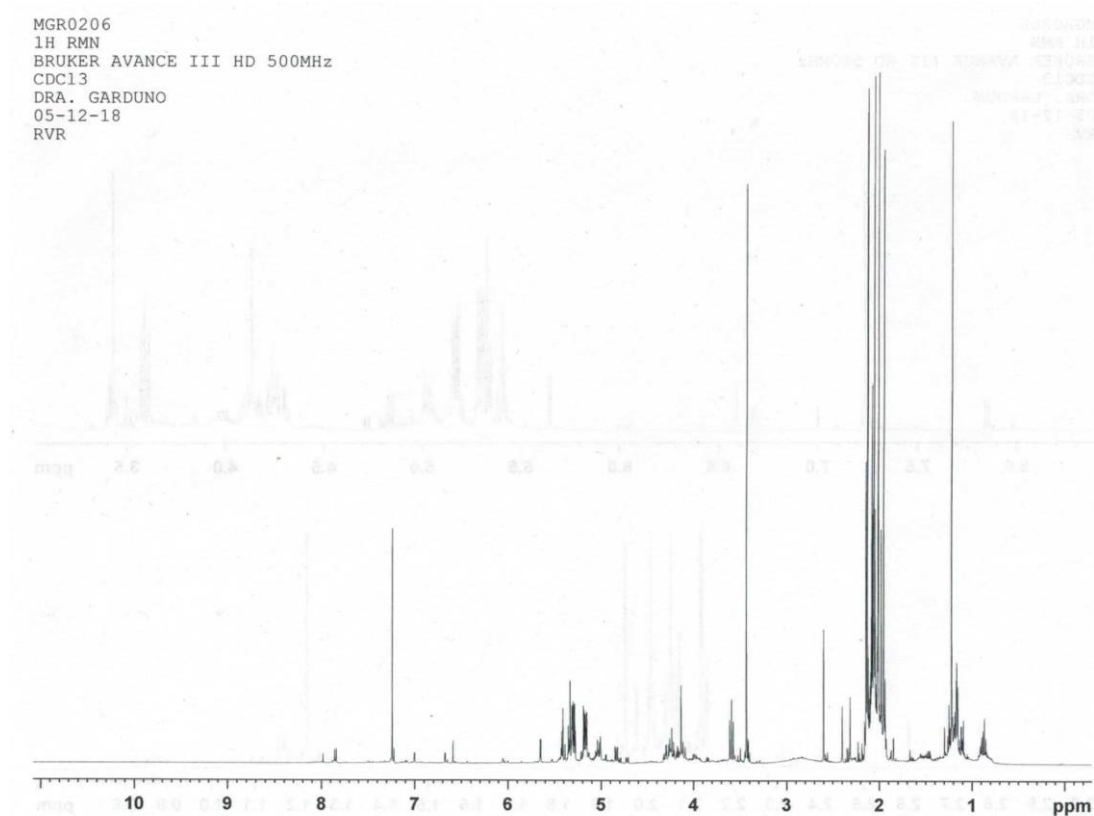
**Figura 35.** Espectro calculado de RMN-<sup>1</sup>H del isoflavano acetilado



**Figura 36.** Estructura química de isoflavano acetilado

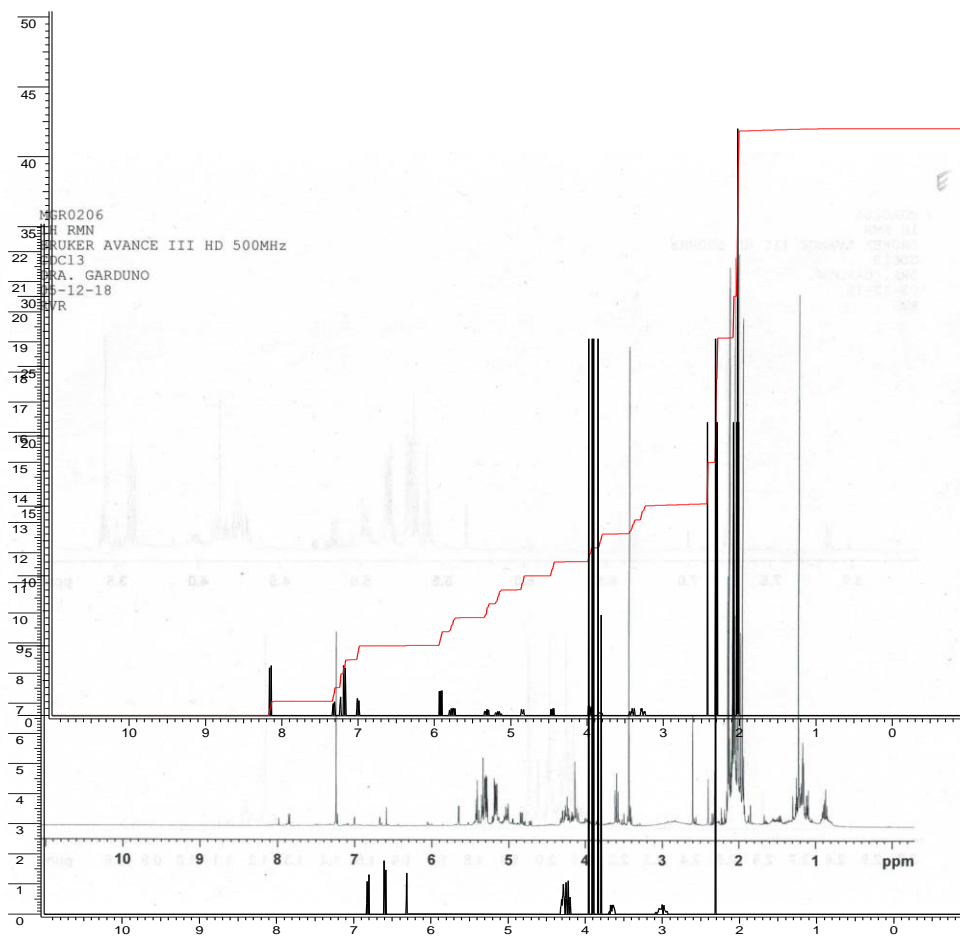
#### 9.4.4 Caracterización del compuesto EPSEN-E-NAT de la fracción F2A-ACET

El espectro experimental del componente **EPSEN-E-ACET** se obtuvo en cloroformo deuterado a 500 MHz (figura 37).



**Figura 37.** Espectro experimental de RMN  $^1\text{H}$  del componente **EPSEN-E-ACET**

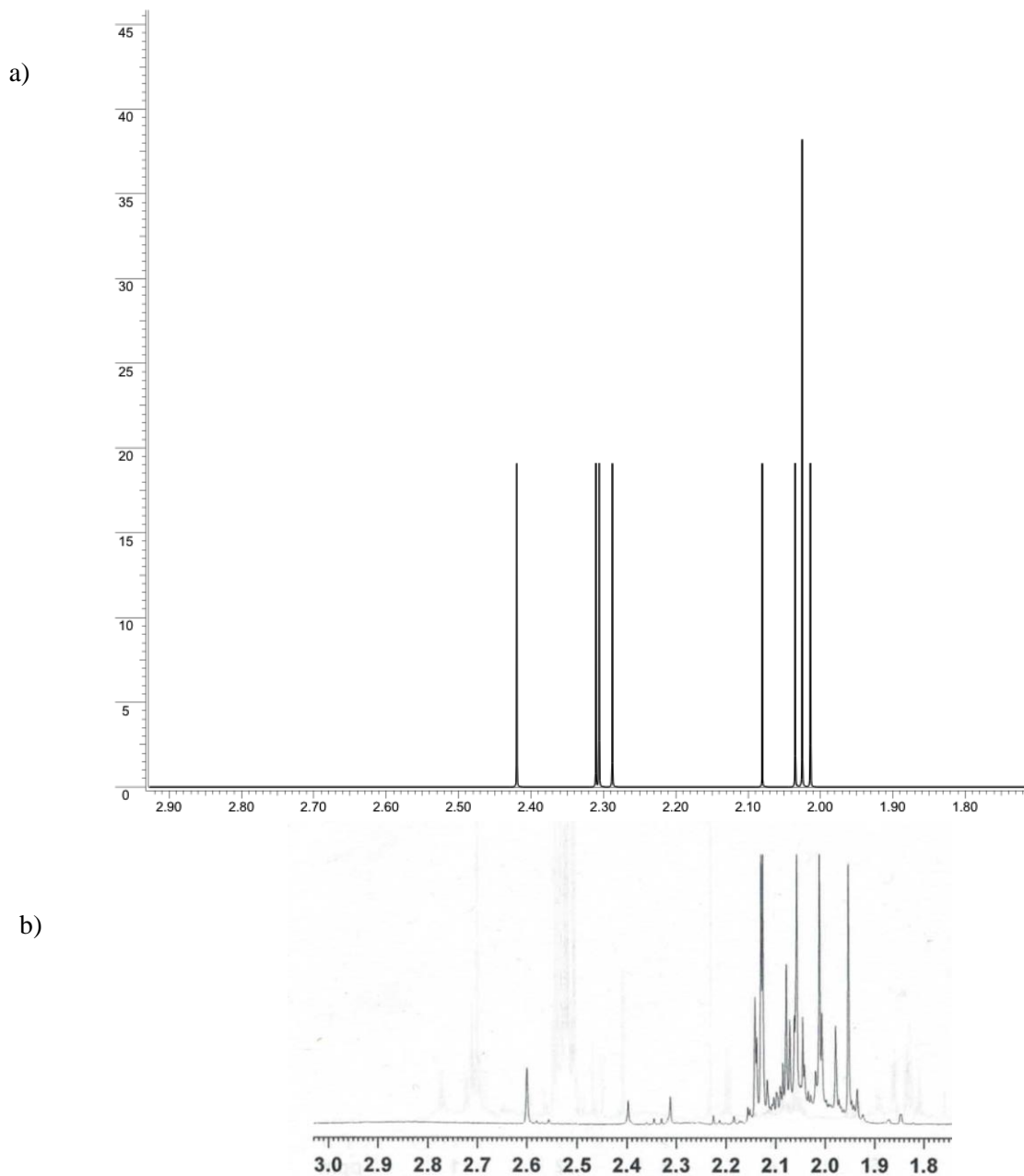
Se realizó la superposición de los espectros de coatlina B e inositol y el compuesto **EPSEN-E-ACET**, esto nos permitió identificar similitudes de señales en los espectros (Figura 38)..



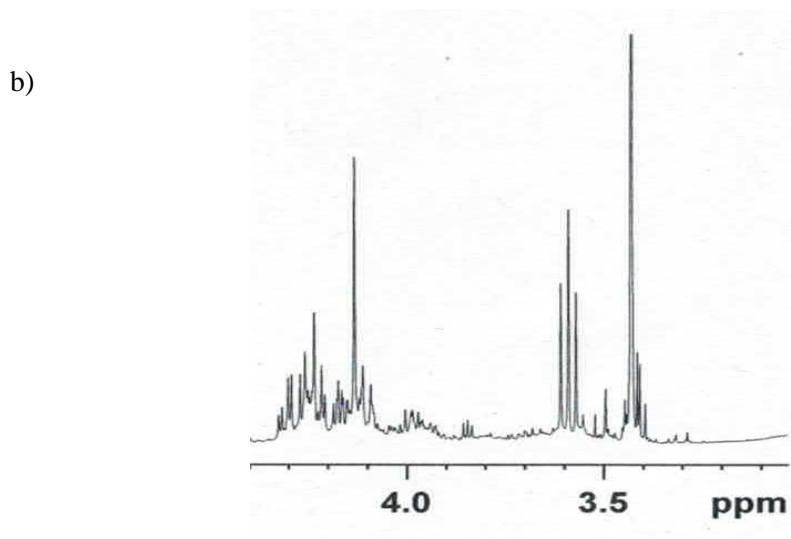
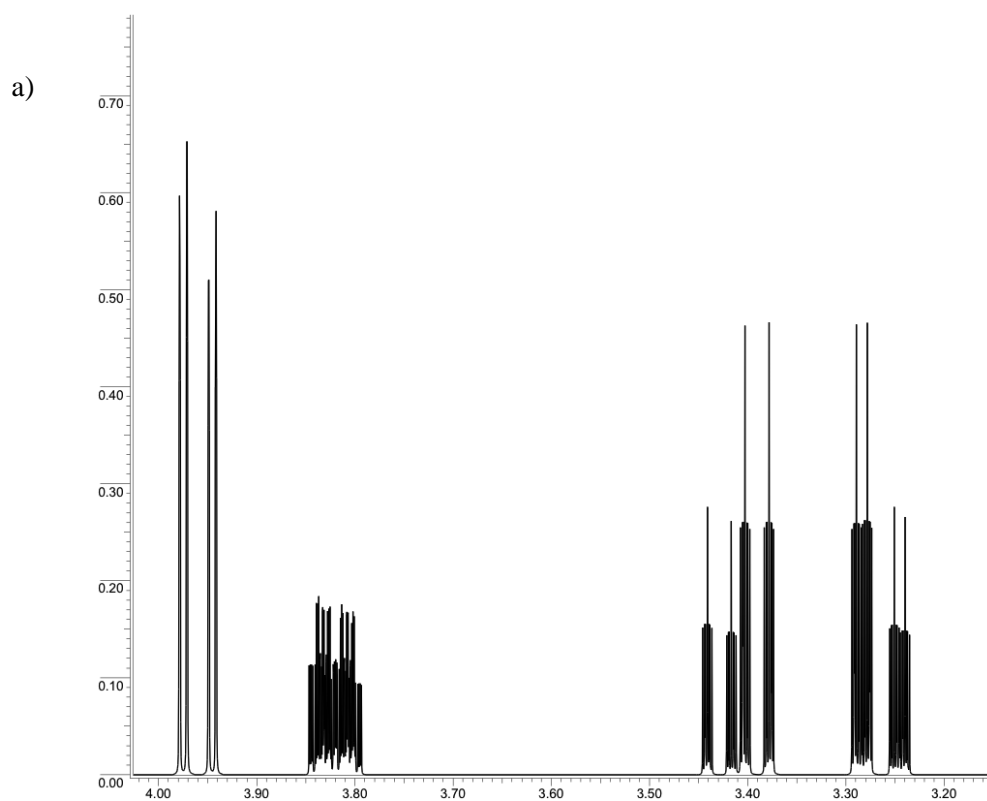
**Figura 38.** Superposición de los espectros calculados de RMN-<sup>1</sup>H de coatlina B y del isoflavano junto con el espectro experimental de RMN-<sup>1</sup>H **EPSEN-E-ACET**

Para el caso de **EPSEN-E-ACET** se considera que posiblemente otro componente se encuentre en mezcla con coatlina B que corresponde a un isoflavano, se ha calculado el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del isoflavano (3*S*)-7-acetil-2', 3', 4', 5', 8'-pentametoxi-isoflavano aislado de *E. polystachya*. Las ampliaciones comparadas del espectro calculado de coatlina B y el espectro experimental de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **EPSEN-E-NAT**. Las ampliaciones comparadas tanto

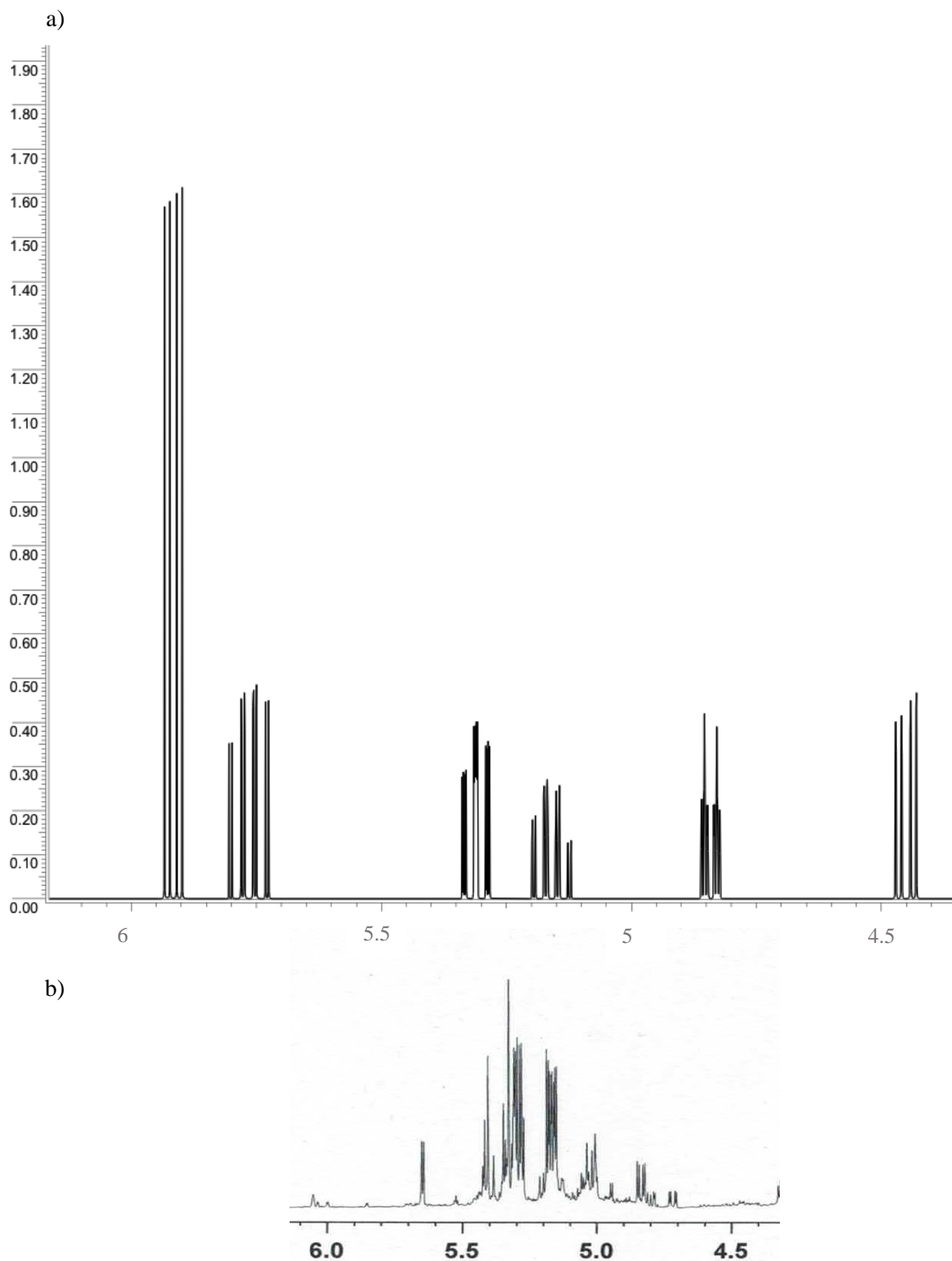
del espectro simulado como el espectro experimental se encuentran a continuación en las figuras 39 a la 43; en ellas es posible evidenciar la similitud de las señales que permiten comparar coatlina B con **EPSEN-E-NAT**. (Figuras 39-43)



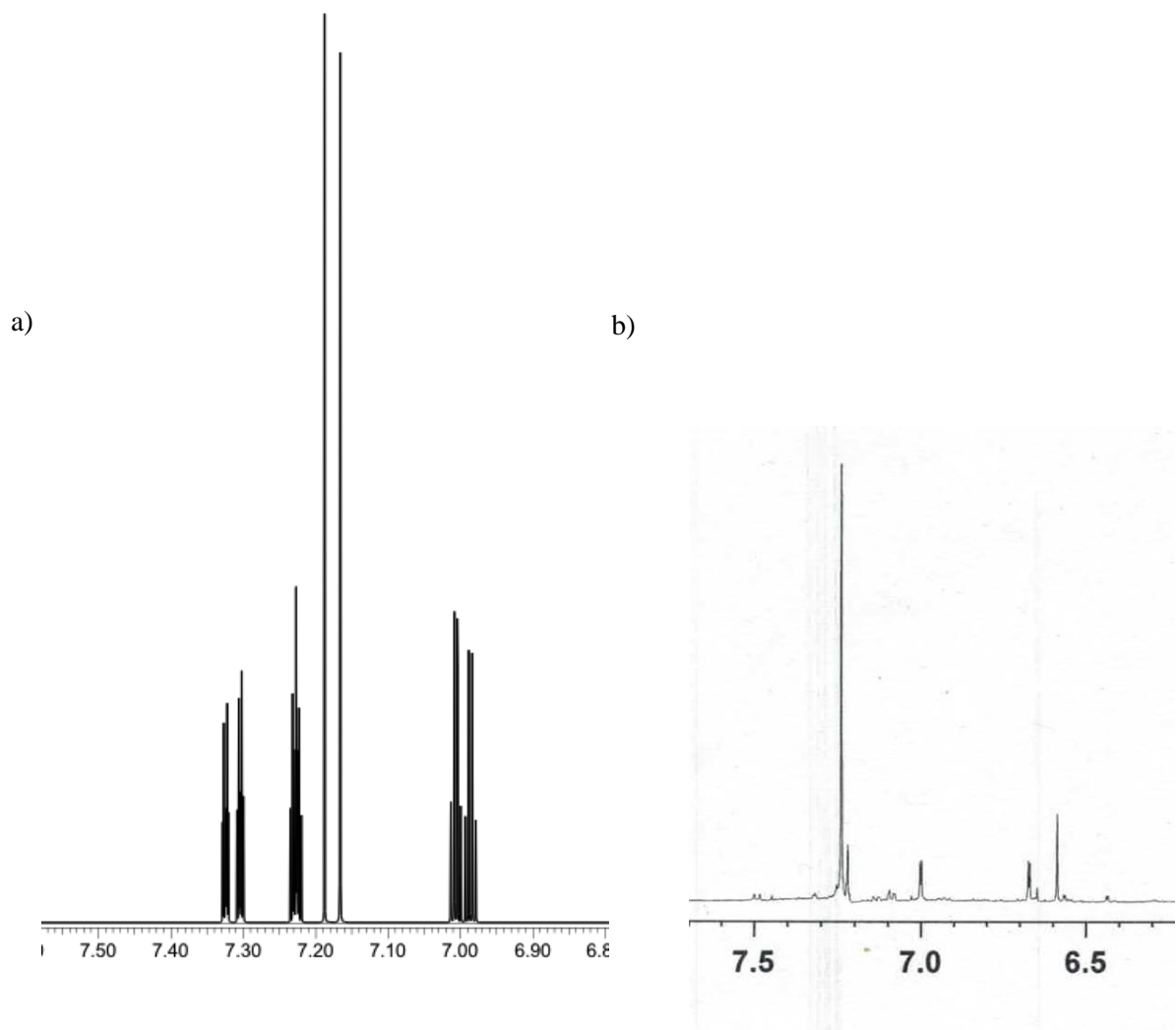
**Figura 39.** Ampliaciones a) del espectro calculado de coatlina B y b) del espectro experimental del componente **EPSEN-E-ACET** de 1.8 a 3 ppm.



**Figura 40.** Ampliaciones a) del espectro calculado de coatlina B y b) del espectro experimental del componente **EPSEN-E-ACET** de 1.8 a 3 ppm.

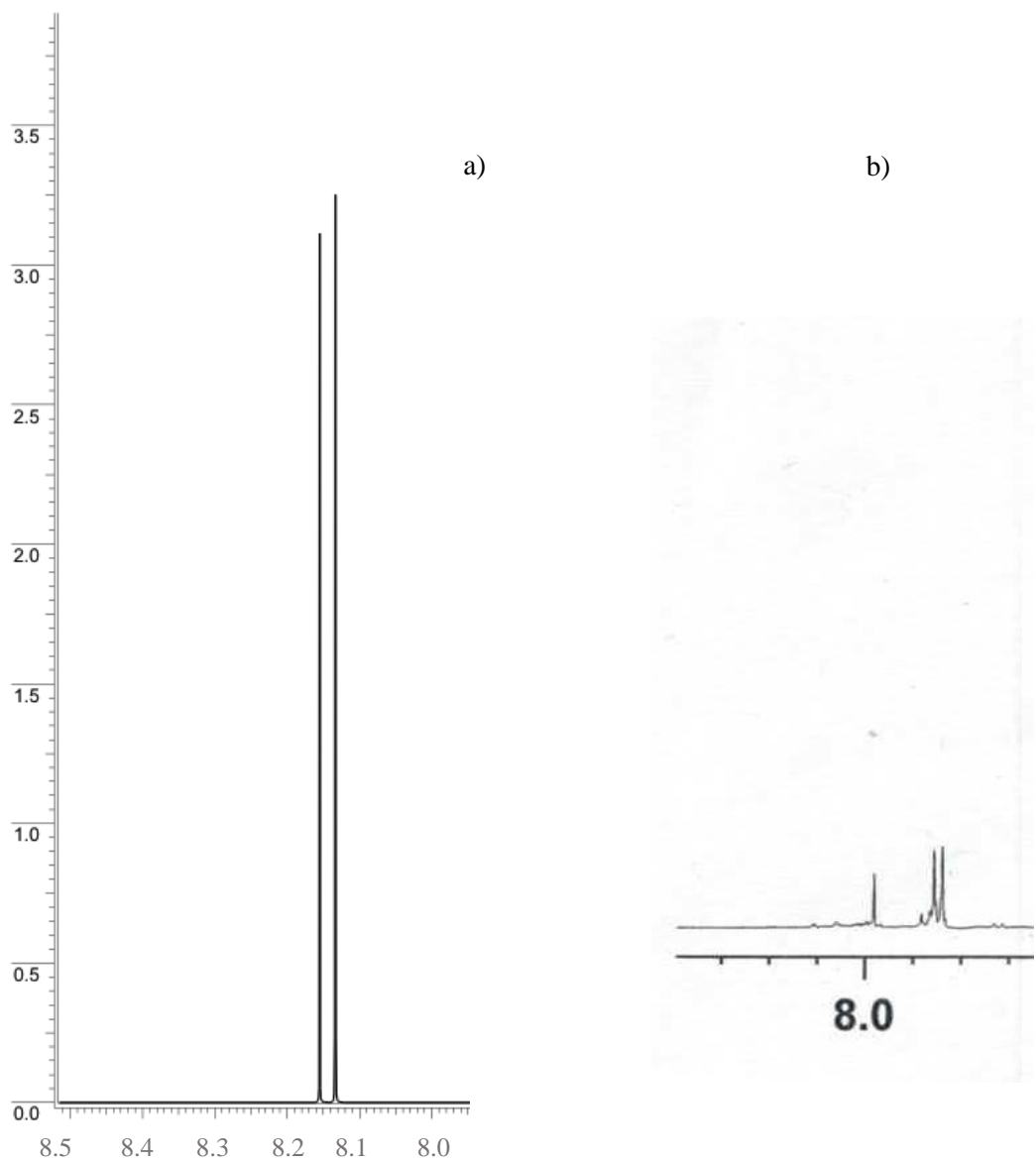


**Figura 41.** Ampliaciones a) del espectro calculado de coatlina B y b) del espectro experimental del componente **EPSEN-E-ACET** de 4.5 a 6 ppm.



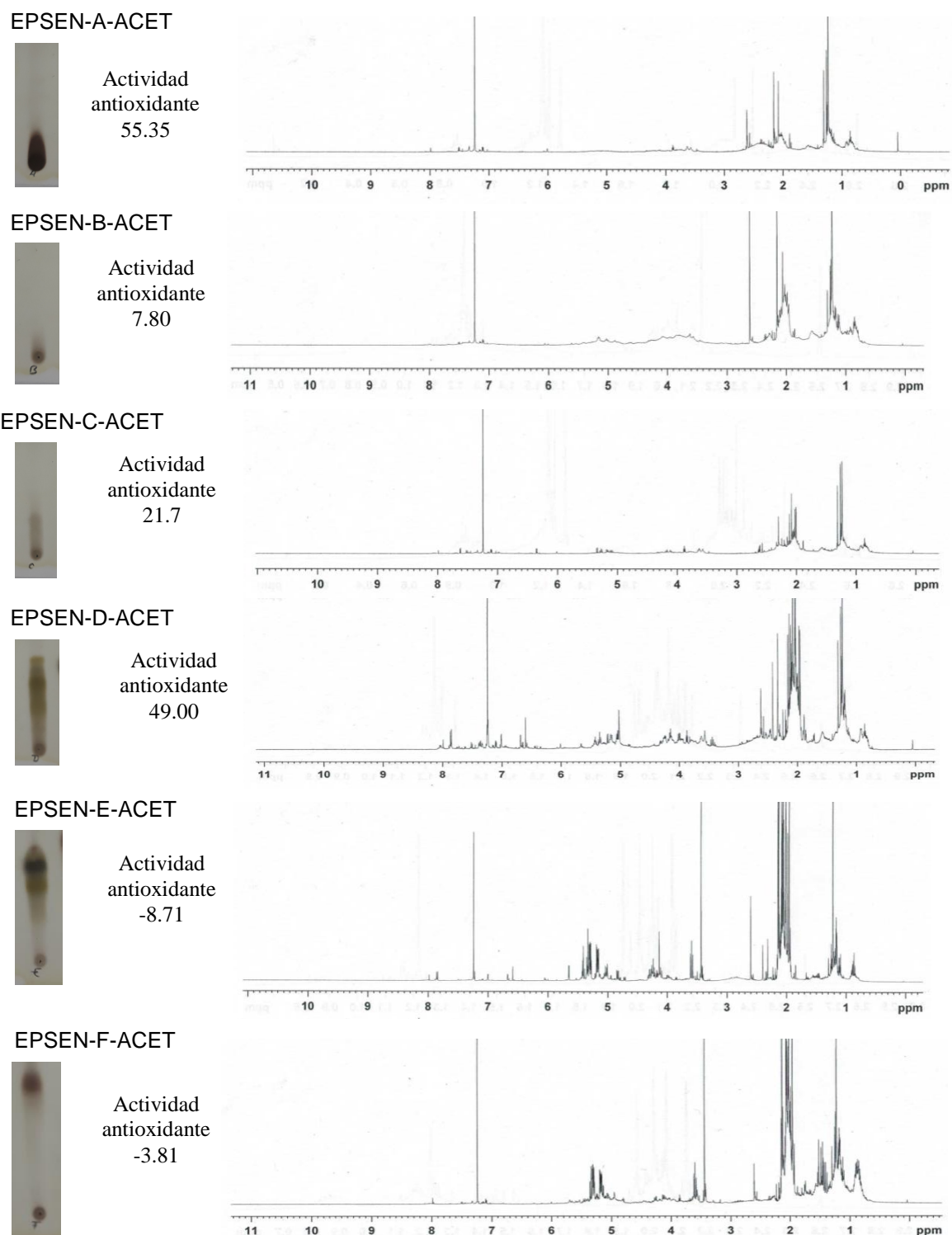
**Figura 42.** Ampliaciones a) del espectro calculado de coatlina B y b) del espectro experimental del componente **EPSEN-E-ACET** de 6.5 a 7.5 ppm.





**Figura 43.** Ampliaciones a) del espectro calculado de coatlina B y b) del espectro experimental del componente **EPSEN-E-ACET** de 8.0 a 8.5 ppm.

La figura 44 muestra los espectros experimentales, la actividad antioxidante y la CCF de los componentes obtenidos de la fracción acetilada **F2A-ACET**.



**Figura 44.** Espectros experimentales de RMN-1H en CD<sub>3</sub>OD de los componentes

## 10. DISCUSIÓN

Los compuestos antioxidantes pueden ser definidos como neutralizadores de radicales que protegen el cuerpo humano contra los radicales libres involucrados en condiciones patológicas como la anemia, artritis, inflamación, neurodegeneración, Parkinson y enfermedades cardiovasculares entre otras. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es debido principalmente a sus propiedades redox, que juegan un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres o descomponiendo peróxidos (Venereo, 2002, Hamid *et al.* 2010).

El efecto de los compuestos antioxidantes en el método del radical DPPH se debe a la capacidad de donar su electrón o hidrogeno. El DPPH es un radical libre que acepta un electrón o un hidrogeno para convertirse en una molécula más estable. La capacidad de reducción del radical DPPH fue determinado por la disminución en la absorbancia de 515 nm inducida por antioxidantes y su visualización remarcable como una decoloración de morado a amarillo. El DPPH se usa usualmente como sustrato para evaluar la actividad antioxidante de productos naturales (Guija-Poma *et al.* 2015).

La actividad antioxidante del extracto íntegro metanólico de las hojas de *E. platycarpa* fue previamente reportado, obteniendo un porcentaje de reducción de 71.815 en el método del radical DPPH (100 ppm). Entre los compuestos anteriormente aislados de *E. subcoriaceous*, *E. punctata* y *E. platycarpa* se encontraron compuestos del tipo cumarinas, flavonoides y flavanonas preniladas (Narváez-Mastache *et al.*, 2007, Narváez-Mastache *et al.*, 2008, Domínguez-Villegas *et al.*, 2013).

En la evaluación de la actividad antioxidante con el radical DPPH, la fracción natural mostro una mayor actividad con  $63.41 \pm 1.356$  porcentaje de reducción del radical libre DPPH (100 ppm), mientras que la fracción F2A-ACET presento un porcentaje de reducción de  $11.40 \pm 0.564$  a la misma concentración. La disminución de la actividad antioxidante de la F2A-ACET frente a la fracción F2A-NAT puede deberse a la sustitución del grupo hidroxilo por el grupo acetato formado en la reacción de acetilación, de forma que el hidrogeno ya no puede ser transferido al radical DPPH, sin embargo, está modificación estructural permitió una mayor separación de los compuestos (Andrade-Carrera, *et al.*, 2017).

Los compuestos de la F2A-NAT aislados con mayor porcentaje de reducción fueron el EPSEN-A-NAT con  $3.96 \pm 0.23$  (100 ppm), EPSEN-D-NAT con  $10.05 \pm 0.44$  (1000 ppm) y EPSEN-E-NAT con  $15.04 \pm 1.84$  (100 ppm). Cabe notar que en el análisis cualitativo de la cromatografía en capa fina y el espectro de RMN- $H^1$ , se observó que los compuestos EPSEN-D-NAT y EPSEN-E-NAT pueden ser el mismo compuesto.

La actividad antioxidante de los compuestos aislados disminuyó frente a la fracción natural, considerando un efecto sinérgico sumativo (la suma de la actividad individual de los compuestos teniendo un mayor efecto juntos) de los compuestos que determinan la actividad antioxidante. Como en el caso de los antioxidantes, la vitamina E y C que administradas simultáneamente ejercen un potente efecto antioxidante.

Por otro lado se obtuvieron absorbancias mayores al blanco con el RL DPPH sin antioxidante dándonos como resultado valores negativos, esto puede ser a que la capacidad antioxidante excede el valor límite de la lectura del 100 % de reducción del RL o que la absorbancia de la sustancia se solapa con la del R por lo que se debe considerar hacer otras pruebas de determinación de la actividad antioxidante.

Como se observa en las celdas que presentan una coloración amarillo verdoso a una concentración de 1000 ppm (mg/L) y debido a esta interferencia se tendrían que realizar otras pruebas de actividad antioxidante como ORAC (siglas en inglés es Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), TRAP (Potencial de Captación de Radicales Totales utilizando a Trolox (antioxidante) como referencia).

Los compuestos aislados de la F2A-ACET con mayor actividad antioxidante fueron EPSEN-A-ACET, EPSEN-B-ACET, EPSEN-C-ACET y EPSEN-D-ACET.

Esto puede ser debido al atrapamiento de RL por quelatación por medio de enlaces de coordinación entre los oxígenos de hibridación  $sp^2$  al contener  $e^-$   $\pi$  que atrapan a los RL. Como en el caso del inositol fosforilado que presenta un comportamiento de quelatación sobre radicales de hierro.

## 11. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, la fracción natural **F2A-NAT** presento actividad antioxidante a la concentración de 100 ppm con un % de reducción de  $63.41 \pm 1.356$ . La actividad antioxidante de los compuestos naturales aislados se reparte entre los compuestos **EPSEN-A-NAT**, **EPSEN-D-NAT** y **EPSEN-E-NAT**, sin embargo la capacidad antioxidante se atribuye a un sinergismo sumativo de los compuestos aislados debido a la disminución del % de reducción del radical libre DPPH frente a la fracción natural (**F2A-NAT**).

La fracción acetilada **F2A-ACET** presento una menor actividad antioxidante con respecto a la **F2A-NAT** obteniendo un % de reducción del radical libre de  $11.40 \pm 0.564$  a una concentración de 100 ppm. Por otra parte los compuestos acetilados aislados presentaron mayor actividad antioxidante frente a la fracción **F2A-ACET** y a los compuestos aislados naturales, esto se atribuye a la capacidad de secuestrar radicales libres correspondiente a la quelatación por medio de enlaces de coordinación entre los oxígenos de hibridación  $sp^2$  al contener electrones pi que atrapan a los radicales libres.

Cabe mencionar que se observó un viraje de coloración amarillo verdoso en las concentraciones de 1000 ppm de los compuestos naturales aislados que dieron resultados negativos en la actividad antioxidante, esto debido a que la capacidad antioxidante excede el valor límite de la lectura del 100 % de reducción del radical DPPH, por lo tanto se considera necesario realizar otras pruebas de actividad antioxidante.

En cuanto a la reacción de acetilación, se obtuvo una mayor separación de los compuestos que por medio de un análisis en CCF se observó que estos no están altamente puros, no obstante para la caracterización de los compuestos por medio de RMN- $^1H$ , fue posible definir la estructura base de dos compuestos a través de los espectros naturales y acetilados, sin embargo se obtuvieron señales más definidas en los espectros de los compuestos naturales con respecto a los espectros acetilados debido al bajo rendimiento de los compuestos acetilados aislados.

Finalmente se logró caracterizar al componente **EPSEN-A-NAT** correspondiente al componente **EPSEN-A-ACET** que presentan una estructura base del compuesto Inositol, así como también se caracterizó al componente **EPSEN-C-ACET** correspondiente al componente **EPSEN-D-ACET** los cuales presentan una mezcla de la estructura base de los compuestos coatlina B y (3*S*)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxi-isoflavano.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Andrade-Carrera, B., Clares, B., Noé, V., Mallandrich, M., Calpena, A., García, M., & Garduño-Ramírez, M. (2017) Cytotoxic Evaluation of (2*S*)-5,7-Dihydroxy-6-Prenylflavanone Derivatives Loaded PLGA Nanoparticles against MiaPaCa-2 Cells. *Molecules*, 22 (9), 1553.

Apostolova, N., & Victor, V. M. (2015). Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxidants & redox signaling*, 22(8), 686-729.

Beltrami, E., Bernari, M., Fronza, G., Mellerio, G., Vilardi, G & Vitafinzi, P. (1982). *Phytochemistry* 21, 2931.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9.

Cárdenas-Rodríguez, N., & Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: Aspectos Básicos. *Educación Química*, 17(2), 164-173.

Domínguez-Villegas, V., García, M. L., Calpena, A., Clares-Naveros, B., & Garduño-Ramírez, M. L. (2013). Anti-Inflammatory, Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Methanolic Extract and Prenylated Flavanones Isolated from Leaves of *Eysehadtia platycarpa*. *Natural Products Communications*, 8(2), 177–180.

Enciclopedia of life. (2011). Mapa de distribución de *E. platycarpa* en la República Mexicana. <http://www.eol.org/pages/416264>

García, L., García, V., Rojo, D., & Sánchez, E. (2001). Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20(3), 231–235.

Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., & Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8), 959-975.

Guija-Poma, Emilio, Inocente-Camones, Miguel Ángel, Ponce-Pardo, John, & Zarzosa-Norabuena, Edwin. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico (Lima)*, 15(1), 57-60.

Hamid, A. A., Aiyelaagbe O. O., Usman L. A., Ameen O. M., and Lawal A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8): 142–51.

Huet Breña, C. (2017). Métodos Analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras Biológicas. Trabajo fin de Grado. *Universidad Complutense Madrid*.

Kryston, T. B., Georgiev A. B., Pissis, P., & Georgakilas, A. G. (2011). Role of Oxidative Stress and DNA Damage in Human Carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1–2): 193–201.

Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787.

Martinez-Florez, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Flavonoids: Properties and antioxidizing action. *Nutrición hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*, 17. 271-8.

Narváez-Mastache, J.M., Garduño-Ramírez, M.L., Alvarez, L., & Delgado, G. (2006). Antihyperglycemic activity and chemical constituents of *Eysenhardtia platycarpa* (Fabaceae) J. *Natural Products* 27;69 (12):1687-1691.

Narváez-Mastache, J.M., Soto, C., & Delgado, G. (2007). Antioxidant Evaluation of *Eysenhardtia* Species (Fabaceae): Relay Synthesis of 3-O-Acetyl-11a,12a-epoxy-oleanan-28,13b-olide Isolated from *E. platycarpa* and Its Protective Effect in Experimental Diabetes. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 30(8) 1503-1510.

Narváez-Mastache, J. M., Novillo, F., & Delgado, G. (2008). Antioxidant aryl-prenylcoumarin, flavan-3-ols and flavonoids from *Eysenhardtia subcoriacea*. *Phytochemistry* 69, 451–456.

Pedraza-Chaverri, N., & Cárdenas-Rodríguez, J. (2006). Especies Reactivas de Oxígeno y Sistemas Antioxidantes : Aspectos Básicos. *Educación Química*, 17(2): 164–73.

Polo de Santos, M. (2016). Estudio de la actividad antioxidante de las aguas mineromedicinales. Tesis Doctoral. *Universidad Complutense de Madrid*.

Saavedra, O. M., Vázquez, E. N. J., Vargas, M. R., Reyes, G. M. C., & Bolaina, E. M. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 10, 32-39.

Sánchez-Valle, V., & Méndez-Sánchez, N. (2018). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Médica Sur*, 20(3), 161-168.

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. (2011) <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Flora%20nectarfera%20y%20polinifera%20de%20Chiapas/Attachments/5/chis5.pdf>

Torres, W. H. (2002). Biología de Las Especies de Oxígeno Reactivas. *Mensaje Bioquímico*, 26: 19–53.

Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.



Cuernavaca, Morelos a 5 de agosto de 2021

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **CINTHIA SOFIA ESPINAL NAJERA**, con el título del trabajo: **Determinación de la actividad antioxidante de la fracción metanólica Fracc. 2A natural y acetilada de las hojas de *Eysenhardtia platycarpa*.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DRA. MARÍA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DR. NAHIM SALGADO MEDRANO

\_\_\_\_\_

VOCAL: DRA. MARÍA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMÍREZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: M.F. JONATHAN CORTES ÁLVAREZ

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2021-08-05 14:58:47 | Firmante**

HccT6FOiZhcUFiHpltR2VkuozHNjWvjncuc6J34T1wgo7W65OSmJvMW21KYx6N7836MgbY0dxGJJZlgt7ICoAkzgf6rFn9J0m0aj2GQC6Q3lfbz0xkFK5v7QvWQUUbdjekXP/xP3SwkAq0pIkuXSy06sn4z6bpd+TD5B65LHfm1Hvd9cayKrCol1GtS/4ovR+mTeWZLEW17oHp7myFjIwCXjM2ccHTKktM4NY9woYlKu7ngycHS/I2ZX9YgkMuIgutcuB0Hgw8a2N0f5L5vAhWd71rHQ0CHKaAuTSCfV/h8alhiDnS02hF4aqSHKXV8xHoDYOHn3MNUfwaMfxew==

**NAHIM SALGADO MEDRANO | Fecha:2021-08-05 16:04:24 | Firmante**

oEX5hRk3K/IpQakgqON/e5wdb4NgEn0WT38BeMmrnWnq0SrL21f7V3inm2py9x0szZNMtAhFYMHCKE8/rjoxBjz3wzy7RD6H56LMwCJOM4gOxYPGf08/JWKVOMx/EVlwW+bgSmLvwBabmyJAF4UQioDPI8D3hrGYxop+OOIQHnJ3B8ymmrD/rzjT7tqfJVtaDShXO9ZELJhM2jD6BwJwZrEnwpw+KDP RzUDGZ8evi/WJrbFb7BQzBMxpWEVlhWzvw88nKb7a1lp3dPPt6QjctXCgmleNOQvAgrQXs+i08Nn28N+swT7d7OlvppiXNMYZuHq2AeYvgRcSbcSj+A==

**JONATHAN CORTÉS ÁLVAREZ | Fecha:2021-08-06 10:56:19 | Firmante**

TFaxZR2fR90SjQA6+zpxwVm66DIJagldKKZFtIcZuZNecsYN1j418Du/9XOcSANKYinX3wcSsN+pzbz61iwaA8ixsvJ5XA2sD8Had321GUCGEBfAwTlqVv8OIkRIT8wUSEB9IRZJtuIqWfELozSag93lCkSLX4OvbDvQ3SbVw1UFWgU6YJ84hbD4iuYJj6bndCy3jI/ZeRK94zy/k4ddZGvwffoKqstBNOqnwVofqmsHqDvYViacDigs0+WpyhE3ber2ojog+rthBZj//fx6bEi9cs9WIqXhIm9pGHjX73Sx3z67QNaJczeEwJXJk/TtaWhTfPMj9ebqBaYIXKA==

**JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER | Fecha:2021-08-06 14:22:19 | Firmante**

JWKUBQsfmEglRywj9OpBlgqLVoifgLDxa2puEBuBOKo6y9sLGEQ/ugw5PigBMBQ1LTepnCGEF3o9HRwouyoWogj8MYAMY4ZhmJETd4qcNFHVPIHtvqvOjIEWaM643u181pcfDvn713SghCycJMi3i1bw9vO6R8Oa/2eAqzITweJS8+zDhrLYkmlImcz188U99/3HW3WxdyilrODRYIt5c2Jk5duofdu5+TGhAldc+Heum6Q3GQ811cc14q3p+yHvchFD017zLWSWr1X22NNPrHJpfeGMDsh3Zew8+Gfn6fLdyPPyUHQNaEK4cjWmEJEoxv+uyocxg/qlpsv8Vggw==

**MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA | Fecha:2021-08-06 19:34:18 | Firmante**

ft/yvWPS5MGI+OG+bfJaQD+819uzUhz2HU5meoFRFPIEPfroWHy66i/lf6Z0MZcyMGkGpxLnrH6YP7LxpmseOLAIRKBuBS/ci0gQ66msVMXZ2Cf7075/SfZetEm2OeXhwSs+29JZICYixFPEQ1CMFDBhb1aGsljgzGAUBEe+3m0uUm2aGOnsfTyr7H4J1NK50uatEe2/opFNOahrpF9SC4YvgiAdHo/LHyiMjhz4omkSbN9Nm/dpVv13OTsNIHzyDDp/B+nrR10SKHrznyL0nlysvV0reSQ4uJNp72Bnt0NpYu+F4i4fJlzcTbRP+YMGlbqj5PacUIbrDXG8FIA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



zo7ncw

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EDyhH5BzrAS2f4Qgk9oEwJGKP481lc>

