



# Instituto Politécnico Nacional

---

Centro Interdisciplinario de Investigación para el  
Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca

Maestría en Ciencias en Conservación y  
Aprovechamiento de los Recursos Naturales

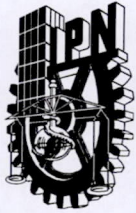
"Identificación de metabolitos secundarios con  
actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa en  
extractos de hojas de *Agave potatorum* Zucc."

Tesis que para obtener el grado de:  
**Maestro en Ciencias**

Presenta:  
Nahúm Galindo Vargas

Directores de tesis:  
Dra. Delia Soto Castro  
Dr. Edgar García Sánchez

Junio, 2022



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, 08 de mayo del 2022

El Colegio de Profesores de Posgrado de **CIIDIR UNIDAD OAXACA** en su Sesión  
(Unidad Académica)

Ordinaria No. 10 celebrada el día 04 del mes octubre de 2021, conoció la solicitud presentada por el alumno:

Apellido Paterno:	Galindo	Apellido Materno:	Vargas	Nombre (s):	Nahúm
-------------------	---------	-------------------	--------	-------------	-------

Número de registro: A 2 0 0 2 8 3

del Programa Académico de Posgrado: Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

"Identificación de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa en extractos de hojas de *Agave potatorum* Zucc."

Objetivo general del trabajo de tesis:

Identificar los metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa presentes en los extractos de hojas de *Agave potatorum* Zucc., mediante cromatografía de capa fina-bioautografía y espectrofotometría UV visible.

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Directora: Dra. Delia Soto Castro 2° Director: Dr. Edgar García Sánchez  
No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

En el Laboratorio de Biomacromoléculas y en el Laboratorio de Bioquímica de Alimentos del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca.

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Directora de Tesis

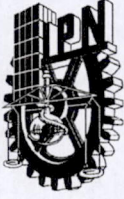
Dra. Delia Soto Castro  
Aspirante

  
Galindo Vargas Nahúm

2° Director de Tesis

Dr. Edgar García Sánchez  
Presidente del Colegio

  
Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Santa Cruz Xoxocotlán, Oax., siendo las 13:00 horas del día 03 del mes de junio del 2022 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada

por el Colegio de profesores de posgrado del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR UNIDAD OAXACA) para examinar la tesis titulada:

"Identificación de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de  $\alpha$ - glucosidasa en extractos de hojas de *Agave potatorum* Zucc."

del alumno:

Apellido Paterno:	Galindo	Apellido Materno:	Vargas	Nombre (s):	Nahúm
-------------------	---------	-------------------	--------	-------------	-------

Número de registro: A 2 0 0 2 8 3

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: Maestría en Ciencias en Conservación y

Aprovechamiento de Recursos Naturales

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene **12%** de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI**  **NO**  **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

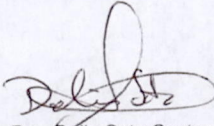
**JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:** El porcentaje de similitud del 12 % corresponde a términos técnicos, frases de uso común (estas corresponden al 6 % de similitud) y algunas metodologías correctamente referenciadas, por lo cual se concluye que el porcentaje de similitud no corresponde a plagio. Cabe mencionar que para el análisis de similitud se excluyeron las referencias bibliográficas debido a que se usó el formato APA, comúnmente usado en la escritura de tesis.

**\*\*Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**


Finalmente, y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **SUSPENDER**  **NO APROBAR**  la tesis por **UNANIMIDAD**  o **MAYORÍA**  en virtud de los motivos siguientes:

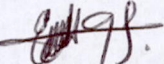
La tesis constituye un trabajo original con aporte al conocimiento en el tema de agentes inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa a partir de un material considerado como residuo, las hojas de *Agave potatorum* Zucc., es la primera evidencia científica que avala el uso etnomedicinal de a infusión de dichas hojas. En el trabajo se plasman las metodologías y resultados in vitro que validan los resultados. La tesis está correctamente estructurada, y las conclusiones guardan relación con las metodologías y resultados obtenidos.

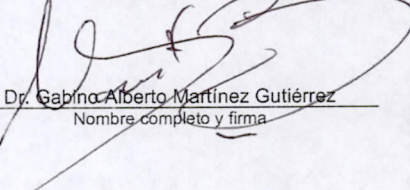
### COMISIÓN REVISORA DE TESIS

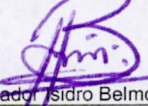
  
Dra. Delia Soto Castro  
Directora de Tesis  
Nombre completo y firma

  
Dra. Patricia Araceli Santiago García  
Nombre completo y firma

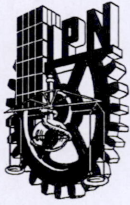
  
M. C. Frank Manuel León Martínez  
Nombre completo y firma

  
Dr. Edgar García Sánchez  
2° Director de Tesis  
Nombre completo y firma

  
Dr. Gabino Alberto Martínez Gutiérrez  
Nombre completo y firma

  
Dr. Salvador Sidro Belmonte Jiménez  
Nombre completo y firma  
**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL OAXACA**





# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### CARTA DE AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA PARA DIFUSIÓN

En la Ciudad de México el día 08 del mes de junio del año 2022, el que suscribe **Galindo Vargas Nahúm** alumno del programa de **Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales** con número de registro **A200283**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de la **Dra. Delia Soto Castro** y el **Dr. Edgar García Sánchez** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Identificación de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa en extractos de hojas de Agave potatorum Zucc.**”, al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expresado del autor y/o directores. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo: [nahum.galindo@gmail.com](mailto:nahum.galindo@gmail.com). Si el permiso se otorga, al usuario deberá dar agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
UNIDAD OAXACA

**Galindo Vargas Nahúm**

## Agradecimientos

a Dios....,

a los integrantes de mi Comité Tutorial  
por su interés, enseñanzas y apoyo,

al CONACYT por el financiamiento del proyecto INFRA-300802,

al Instituto Politécnico Nacional por el financiamiento de los proyectos  
SIP-20200758 y SIP-20210545,

al Ingeniero Juyher Bolaños por las facilidades para la colecta de las  
hojas de *Agave potatorum*

al CONACYT por la beca de estudios de maestría.

En memoria de Sofia...  
por tu lucha diaria con la DMT2.

## Resumen

En este trabajo se presenta el estudio de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* por extractos obtenidos de hojas de *Agave potatorum* Zucc. mediante extracción asistida por ultrasonido usando cinco disolventes en polaridad ascendente (hexano, acetato de etilo, metanol y agua), además de una infusión. Los estudios de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa por bioautografía-cromatografía de capa fina de los extractos y la acarbosa, como control positivo, demostraron que los extractos en hexano y acetato de etilo poseen metabolitos capaces de inhibir a la enzima de forma dependiente de la concentración. Con el perfil fitoquímico en cromatografía de capa fina de los extractos se determinó que los metabolitos secundarios que contribuyen a la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa pertenecen a terpenos, compuestos fenólicos, cumarinas, flavonoides y glucósidos cardiotónicos. Las señales características de estos compuestos se confirmaron por espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Los extractos activos fueron fraccionados en cromatografía en columna, obteniendo cinco fracciones activas. El porcentaje de inhibición enzimática, determinado mediante espectrofotometría UV-visible, de dos de las fracciones activas (F8 y F9), la infusión y la acarbosa, evidenció que tanto la infusión como la F8 poseen mayor actividad inhibitoria que el control positivo. Estos resultados son la primera evidencia científica que valida el potencial antidiabético de los extractos de hojas de *A. potatorum*, cuya infusión es utilizada en la etnomedicina del estado de Oaxaca para el tratamiento de los síntomas de la diabetes mellitus tipo 2.

## Abstract

This work presents the inhibition assays of the enzyme  $\alpha$ -glucosidase of *S. cerevisiae* by extracts obtained from leaves of *Agave potatorum* Zucc. via ultrasound-assisted extraction using five solvents in ascending polarity (hexane, ethyl acetate, methanol and water), in addition to an infusion. Inhibition studies of  $\alpha$ -glucosidase by bioautography-thin layer chromatography of the extracts and acarbose, as a positive control, showed that the extracts in hexane and ethyl acetate possess metabolites capable of inhibiting the enzyme in a concentration-dependent manner. Phytochemical profiling in thin layer chromatography of the extracts evidencing that the secondary metabolites contributing to the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase belong to terpenes, phenolic compounds, coumarins, flavonoids and cardiogenic glycosides. The characteristic signals of these compounds were confirmed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. The active extracts were fractionated in column chromatography, obtaining five active fractions. The percentage of enzymatic inhibition, determined by UV-visible spectrophotometry, of two of the active fractions (F8 and F9), the infusion and acarbose, showed that both the infusion and F8 had higher inhibitory activity than the positive control. These results are the first scientific evidence that validates the antidiabetic potential of *A. potatorum* leaves extracts, used as infusion in the ethnomedicine of the state of Oaxaca for the treatment of the symptoms of type 2 diabetes mellitus.

## Productividad relacionada con esta investigación

Exposición del cartel "Optimización del tiempo de extracción por ultrasonido de hojas de *Agave potatorum* Zucc. mediante  $^1\text{H}$  RMN" en la 6ª reunión de Resonancia Magnética Nuclear Experimental llevada a cabo el 12 y 13 de noviembre de 2020.

Exposición del cartel "Inhibición de  $\alpha$ -Glucosidasa y perfil fitoquímico de extractos de hojas de *Agave potatorum* Zucc." en el Congreso Internacional de la Sociedad Química de México efectuada del 30 de agosto al 3 de septiembre de 2021.

Presentación flash del video "Terpenic compounds from residues of *Agave potatorum* as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors" en el Congreso Internacional de la Sociedad Química de México efectuada del 30 de agosto al 3 de septiembre de 2021.

Publicación en extenso de "Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa y perfil fitoquímico de extractos de hojas de *Agave potatorum* Zucc." en la Colección de Memorias de los Congresos de la Sociedad Química de México, Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2021. ISSN 2448-914X.



<b>Contenido</b>	
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>8</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>9</b>
<b>Listado de Abreviaturas</b> .....	<b>11</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Problema de investigación</b> .....	<b>13</b>
1.1 Planteamiento del problema.....	13
1.2 Justificación .....	15
1.3 Antecedentes.....	16
1.4 Hipótesis.....	18
1.5 Objetivo general.....	19
1.6 Objetivos específicos.....	19
<b>2. Marco Teórico</b> .....	<b>20</b>
2.1 Genero <i>Agave</i> .....	20
2.2 Usos tradicionales del <i>Agave</i> .....	21
2.3 <i>Agave potatorum</i> Zucc.....	22
2.4 Patología de la diabetes mellitus.....	24
2.5 Las enzimas y su clasificación .....	26
2.6 Mecanismo de acción de la enzima $\alpha$ -glucosidasa .....	27
2.7 Mecanismo de acción de inhibidores de la enzima $\alpha$ -glucosidasa.....	30
2.7.1 Acarbosa .....	31
2.7.2 Flavonoides.....	32
2.7.3 Terpenos .....	32
2.7.4 Otros metabolitos secundarios .....	33
2.8 Extracción de metabolitos secundarios .....	33
2.9 Bioautografía- cromatografía de capa fina .....	35
2.10 Porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa y determinación del IC <sub>50</sub> .....	36
2.11 Resonancia magnética nuclear .....	37
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>38</b>
3.1 Materiales, reactivos y equipos .....	38
3.2 Recolección de hojas de <i>A. potatorum</i> .....	39

3.3 Secado y trituración de hojas de <i>A. potatorum</i> .....	39
3.4 Metodología de extracción.....	40
3.5 Separación por Cromatografía de Capa Fina.....	42
3.6 Perfil fitoquímico.....	42
3.7 Screening por bioautografía-CCF de la actividad inhibitoria sobre la $\alpha$ -glucosidasa de los extractos de hojas de <i>A. potatorum</i> .....	45
3.8 Fraccionamiento por cromatografía de columna .....	45
3.9 Resonancia magnética nuclear.....	46
3.10 Porcentaje de inhibición de extractos y fracciones activas sobre $\alpha$ -glucosidasa .....	46
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>48</b>
4.1 Secado de hojas de <i>A. potatorum</i> .....	48
4.2 Extracción de metabolitos de hojas de <i>A. potatorum</i> .....	49
4.3 Selección de la mezcla de elución .....	50
4.4 Perfil fitoquímico de extractos crudos de <i>A. potatorum</i> .....	52
4.5 Bioautografía-CCF sobre la $\alpha$ -glucosidasa de los extractos de hojas de <i>A. potatorum</i> .....	56
4.6 Fraccionamiento por cromatografía en columna de extractos activos.....	58
4.7 Bioautografía de fracciones activas obtenidas por cromatografía en columna .....	60
4.8 Perfil fitoquímico de fracciones activas .....	61
4.9 Identificación de señales características en RMN de los componentes de las fracciones activas .....	66
4.9.1 Acarbosa .....	66
4.9.2 Fracción 2 del extracto en hexano.....	68
4.9.3 Fracción 1 del extracto en AcOEt .....	70
4.9.4 Fracciones 8 y 9 del extracto en AcOEt.....	72
4.10 Porcentaje de inhibición del extracto por infusión sobre $\alpha$ -glucosidasa .....	74
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>78</b>
<b>Anexo 1. Perfil fitoquímico de extractos en Hex, DCM, AcOEt, MeOH, H<sub>2</sub>O e Infusión y fracciones activas de extractos en Hex y AcOEt.....</b>	<b>80</b>
Anexo 1a: Perfil fitoquímico ordenado por extractos y grupos de metabolitos.....	80
Anexo 1b: Perfil fitoquímico ordenado por prueba fitoquímica.....	89

Anexo 1c: Perfil fitoquímico de fracción 2 del extracto en Hex y fracciones 1, 8 y 9 del extracto en AcOEt.....	100
<b>Anexo 2. Espectros de <sup>1</sup>H en RMN de acarbosa y fracción 9 del extracto en AcOEt. ....</b>	<b>103</b>
<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>105</b>

## Índice de tablas

Tabla 3.1. Disolventes para la disolución de las fracciones activas, la acarbosa y la infusión y concentraciones ensayadas espectrofotométricamente.....	45
Tabla 4.1. Masa seca obtenida por muestra de hoja fresca de agave.....	46
Tabla 4.2. Masa de extractos en disolventes de polaridad ascendente obtenidos secuencialmente mediante extracción asistidas por ultrasonido.....	47
Tabla 4.3. Medios de elución utilizados por tipo de extracto.....	49
Tabla 4.4. Familias de metabolitos secundarios identificados en el perfil fitoquímico en CCF de extractos crudos de <i>A. potatorum</i> .....	50
Tabla 4.5. Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hexánico de hojas de <i>A. potatorum</i> .....	56
Tabla 4.6. Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto en acetato de etilo de hojas de <i>A. potatorum</i> .....	57
Tabla 4.7. Resumen del perfil fitoquímico sobre placas de CCF de zonas de inhibición de fracciones activas.....	59
Tabla 4.8. Disolventes deuterados para la adquisición de espectros <sup>1</sup> H y APT- <sup>13</sup> C de fracciones con actividad inhibitoria de α-glucosidasa.....	63
Tabla 4.9. Porcentaje de inhibición de la enzima α-glucosidasa por las fracciones 8 y 9 del AcOEt, infusión y acarbosa.....	72

## Índice de figuras

Figura 1.1. Estructura de: a) apigenina, b) puerarina y c) ácido <i>p</i> -coumárico....	17
Figura 2.1. Características morfológicas del <i>Agave potatorum</i> Zucc.....	23
Figura 2.2. Estructura tridimensional de la enzima $\alpha$ -glucosidasa, mostrando los dominios A, B y C.....	27
Figura 2.3. Puentes de hidrogeno formados por residuos de Asp y Arg con una molécula de maltosa.....	28
Figura 2.4. Mecanismo de reacción $\alpha$ -glucosidasa-sustrato.....	29
Figura 2.5. Inhibición del sitio activo de $\alpha$ -glucosidasa humana por acarbosa.....	29
Figura 2.6. Unión del donador de protones de la enzima a la acarbosa.....	30
Figura 2.5. Hidrólisis del 2-naftil- $\alpha$ -D-glucopiranosido por la enzima $\alpha$ -glucosidasa y visualización del producto formado por reacción con la sal Fast Blue B.....	35
Figura 3.1. Hojas secas cortadas en secciones pequeñas.....	39
Figura 3.2. Preparación del sistema disolvente-hoja de agave para la extracción.....	40
Figura 4.1. Pérdida de humedad por muestra de agave en función del tiempo....	48
Figura 4.2. Extractos eluidos con los sistemas seleccionados bajo luz UV de a) 254 y b) 365 nm.....	50
Figura 4.3. Pruebas fitoquímicas del extracto en AcOEt vistas bajo luz UV 365 nm, a) NP-PEG y b) KOH, eluidas en cloroformo-metanol-ácido acético (90:10:1).....	53
Figura 4.4. Prueba de cloramida-ácido trifluoroacético positiva a glucósidos cardiotónicos en los extractos en AcOEt, MeOH, H <sub>2</sub> O e infusión, vistas bajo luz UV 365 nm.....	54
Figura 4.5. Actividad inhibitoria de los extractos de hojas de <i>A. potatorum</i> sobre $\alpha$ -glucosidasa en placas de CCF bajo luz UV de 365 nm: a) extracto en Hex, b) extracto en AcOEt y c) acarbosa.....	55
Figura 4.6. Actividad inhibitoria sobre $\alpha$ -glucosidasa por a) extracto en infusión de hojas de <i>A. potatorum</i> y b) acarbosa, ambos sin eluir.....	56

Figura 4.7. Comparación entre el perfil de elución del extracto crudo en Hex en CCF a) antes y b) después del fraccionamiento en columna.....	57
Figura 4.8. Elución de extractos crudos y sus fracciones en placas de CCF: a) hexano y b) AcOEt.....	58
Figura 4.9. Actividad inhibitoria sobre $\alpha$ -glucosidasa del extracto en Hex: a) extracto crudo, b) fracción 1 y c) fracción 2.....	59
Figura 4.10. Comparación entre placas de CCF de fracciones activas eluidas, con bioautografía y con pruebas fitoquímicas: a) fracción 2 del extracto en Hex; del extracto en AcOEt: b) fracción 1, c) fracción 8, y d) fracción 9.....	63
Figura 4.11. Espectro de RMN APT- <sup>13</sup> C de la acarbosa.....	65
Figura 4.12. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de la fracción 2 del extracto en hexano y estructuras tipo terpénica lineal y esteroide.....	67
Figura 4.13. Espectro de RMN APT- <sup>13</sup> C de la fracción 2 del extracto en hexano.....	68
Figura 4.14. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de la fracción 1 del extracto en AcOEt y estructuras tipo cumarina y glucósido cardiotónico.....	69
Figura 4.15. Espectro de RMN APT- <sup>13</sup> C de la fracción 1 en AcOEt.....	70
Figura 4.16. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de la fracción 8 del extracto en AcOEt.....	71
Figura 4.17. Comparación grafica del porcentaje de inhibición de fracciones 8 y 9 del extracto en AcOEt, extracto por infusión y acarbosa.....	73

## Listado de Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
APT	Attached Proton Test
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
CCF	Cromatografía de Capa Fina
CFA	Cloramida-Ácido Trifluoroacético
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
FBB	Fast Blue B Salt
GLP-1	péptido-1 tipo glucagón
Glu	Ácido glutámico
H <sub>2</sub> O	Agua
Hex	Hexano
His	Histidina
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria media
LB	Liebermann-Burchard
MeOH	Metanol
NP-PEG	Natural Products-Polyethylene Glycol
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta
VAF	Vainillina-Ácido Fosfórico
VAS	Vainillina-Ácido Sulfúrico

## Introducción

Las hojas *Agave potatorum* Zucc. son utilizadas en la medicina tradicional del estado de Oaxaca para el tratamiento de enfermedades circulatorias y síntomas de la diabetes mellitus tipo II (DMT2). De los medicamentos utilizados actualmente para el tratamiento de la DMT2, los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa bloquean la absorción intestinal de glucosa y evitan la hiperglicemia postprandial. Debido a los efectos secundarios de estos inhibidores comerciales se plantea la búsqueda de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa obtenidos de extractos vegetales con fundamento en la medicina tradicional. Estudios previos muestran el potencial antidiabético del género *Agave*, al encontrarse metabolitos capaces de inhibir a la enzima  $\alpha$ -amilasa. Los estudios sobre actividad biológica de extractos de hojas *A. potatorum* Zucc. se limitan a la actividad antioxidante. El objetivo del presente trabajo fue la identificación de inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa en extractos de hojas de *A. potatorum* Zucc. La hipótesis planteada establece que de los metabolitos secundarios presentes en extractos de hojas de *Agave potatorum* Zucc., al menos uno será capaz de inhibir a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa mediante ensayos de bioautografía.

Esta investigación se conforma de: el secado de material vegetal, la obtención de extractos asistida por ultrasonido, el ensayo de bioautografía en cromatografía de capa fina para evaluar la actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa, el fraccionamiento de los extractos activos por cromatografía en columna y la identificación de familias de metabolitos secundarios por pruebas fitoquímicas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Se espera que los resultados de esta investigación, además de validar el uso etnomedicinal de las hojas de agave, contribuyan al estudio y descubrimiento de compuestos que coadyuven a los tratamientos existentes de la DMT2.



# 1. Problema de investigación

## 1.1 Planteamiento del problema

La diabetes mellitus es un grupo de desórdenes metabólicos ocasionados principalmente por la hiperglicemia y la intolerancia a la glucosa (Sen, Chakraborty, y De, 2016). Los dos tipos principales son la diabetes mellitus insulino-dependiente (tipo 1) y la no insulino-dependiente (tipo 2). De acuerdo con Sen *et al.* (2016) la DMT2 ocasiona, dependiendo de su avance, desde mal funcionamiento y disfunción hasta daños duraderos en múltiples órganos.

Los tratamientos farmacológicos para este padecimiento incluyen tratamiento con insulina de por vida para la DMT1, y agentes hipoglucemiantes para la DMT2. Entre ellos están fármacos de las familias de las sulfonilureas, meglitinidas, biguanidas, tiazolidinedionas e inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa. Dentro de los tratamientos recientes están hipoglucemiantes de la peptidasa-4 dipeptidil, del cotransportador 2 sodio-glucosa y análogos de péptido-1 tipo glucagón y amilina.

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) limita la capacidad del cuerpo de transformar el alimento en energía, incrementando los niveles de azúcar y grasa en el cuerpo, colocándose como la segunda causa de muerte a nivel nacional con más de 100 000 muertes anuales (Instituto Nacional de Salud Pública, 2016; Rosas-Ramírez, Escandón-Rivera, y Pereda-Miranda, 2018). Se estima que en el año 2019 la DMT2 afectó a 463 millones de personas y provocó 4.2 millones de fallecimientos, con un gasto de 760 mil millones de dólares estadounidenses a nivel mundial (International Diabetes Federation, 2019). Se prevé que para el 2030 sean 578 millones las personas afectadas.

Los medicamentos utilizados actualmente para el tratamiento de la DMT2 generan efectos secundarios indeseables como el aumento de peso y náuseas (Kaul, Tarr, Ahmad, Kohner, y Chibber, 2012). La metformina, obtenida en un principio de *Galega officinalis*, es un medicamento de primera línea para el tratamiento de la

DMT2 desde los años sesenta (Clapham, 2020). Sin embargo, puede presentar interacciones con otros medicamentos, e incluso causar severos problemas gastrointestinales, posiblemente por absorción de sales biliares (Clapham, 2020). Mientras que la acarbosa, voglibosa y el miglitol, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa usados actualmente como agentes hipoglucemiantes, producen malestares estomacales como efecto secundario, entre ellos diarrea, dolor abdominal y flatulencias (Mata, Cristians, Escandón-Rivera, Juárez-Reyes, y Rivero-Cruz, 2013; Li *et al.*, 2013; Clapham, 2020).

Ante la necesidad de compuestos hipoglucemiantes con efectos secundarios mínimos para el tratamiento de la DMT2 se han estudiado diferentes plantas. De las 383 especies de plantas reportadas en la etnomedicina de nuestro país para el tratamiento de los síntomas de la DMT2, solo se ha estudiado la actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa en 38 de ellas (Mata *et al.*, 2013). Entre las que se incluyen el estafiate (Anaya-Eugenio, Rivero-Cruz, Rivera-Chávez, y Mata, 2014), chuchupate o hierba del cochino (Mata *et al.*, 2013; Brindis, Rodríguez, Bye, González-Andrade, y Mata, 2011), resinas de la familia Convolvulaceae (Rosas-Ramírez *et al.*, 2018), prodigiosa, especies del complejo copalchi (Mata *et al.*, 2013) y las semillas del árbol de caoba (Mata, Figueroa, Navarrete, y Rivero-Cruz, 2019).

No obstante, y con base en el conocimiento etnobotánico de que las hojas de *Agave potatorum* se utilizan para tratar los síntomas de la diabetes mellitus (Padilla Gómez, 2007; García-Mendoza, 2010), se considera importante determinar si los metabolitos secundarios presentes en hojas de *A. potatorum* Zucc. inhiben a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*, y en consecuencia serán capaces de inducir un efecto hipoglucemiante. Lo anterior permitirá validar el uso etnomedicinal de extractos de hojas de *A. potatorum* para el tratamiento de los síntomas de la DMT2 como alternativa a los tratamientos existentes y sentar las bases para el desarrollo de inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa alternativos a los existentes.

## 1.2 Justificación

El manejo de los pacientes con DMT2 genera altos costos sociales y económicos (Clapham, 2020), por lo que mitigar esta condición es un reto mundial. Los fármacos utilizados para el tratamiento de los síntomas de la DMT2, además de causar efectos secundarios, representan un costo muy elevado para las finanzas públicas (Clapham, 2020).

Las plantas medicinales tienen menos y menores efectos secundarios al ser utilizados apropiadamente (Li *et al.*, 2013). Una gran parte de la población mundial confía en las plantas para el tratamiento de la DMT2, pues en comparación con tratamientos farmacológicos las considera menos tóxicas y costosas, y a la vez más efectivas (Martinez, Mandariaga-Mazón, Rivero-Cruz, Bye, y Mata, 2016).

Con el incremento de la población diabética a nivel mundial, la investigación, a partir de plantas medicinales, de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa con efectos secundarios mínimos, se ha convertido en una tarea significativa para encontrar alternativas viables para el manejo de estos pacientes (Yin, Zhang, Feng, Zhang, y Kang, 2014; Rosas-Ramírez *et al.*, 2018). La búsqueda de estos inhibidores se realizará en las hojas de *Agave potatorum* Zucc., un residuo de la industria del mezcal, contribuyendo además al cuidado del ambiente.

Esta investigación, además de contribuir al conocimiento científico sobre *A. potatorum*, permitirá validar su uso etnomedicinal en el tratamiento de los síntomas de la DMT2. A futuro, la transferencia de este conocimiento permitiría la formación de empresas de base tecnológica para la producción de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, extractos o infusiones, como alternativa para pacientes en comunidades con acceso limitado a atención médica y medicamentos.

### 1.3 Antecedentes

Los inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa funcionan inhibiendo a dicha enzima, y por lo tanto obstaculizan la absorción de la glucosa en el tracto gastrointestinal, minimizando así la hiperglicemia postprandial, componente clave de la patogénesis diabética (Li *et al.*, 2013). También reducen la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (*Very Low Density Lipoprotein*), es decir, estos inhibidores no tienen potencial lipogénico como la insulina o las sulfonilureas (Truscheit *et al.*, 1988). La inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa es, por tanto, una de las mejores estrategias para disminuir el aumento postprandial de los niveles de glucosa en la sangre y evitar complicaciones diabéticas tardías (Kumar, Narwal, Kumar, y Prakash, 2011; Truscheit *et al.*, 1988). Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa más empleados en la actualidad son la acarbosa y el miglitol (Mata *et al.*, 2013).

Se han identificado varios productos naturales que inhiben a las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa y sus efectos en la hiperglicemia postprandial (Li *et al.*, 2013), entre ellos están extractos y compuestos aislados de diferentes fuentes como hojas, rizomas, corteza, flores, raíces, frutas, ramas y semillas de diversas plantas (Mata *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2011). Estos inhibidores pertenecen principalmente a flavonoides y compuestos fenólicos como lignanos glucosilados, bromofenoles, estilbenos, y a otros grupos como terpenos, antocianinas, alcaloides y curcúminoides (Assefa *et al.*, 2020; Mata *et al.*, 2019; Anaya-Eugenio *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2011).

La investigación en productos naturales está ligada al descubrimiento y desarrollo de fármacos, guiada por el conocimiento etnobotánico (Heinrich, Frei Haller, y Leonti, 2014). Cuando se realiza un estudio biodirigido en búsqueda de una actividad farmacológica específica, un enfoque común para recolectar el material vegetal se basa precisamente en los usos etnomedicinales de cierta especie (Siedel, 2012), obtenidos por revisión de literatura o mediante entrevistas personales (Jones y Kinghorn, 2006; Silva, Lee, y Kinghorn, 1998; Atanasov *et al.*, 2015). Otro enfoque,

el quimiotaxonómico, se basa en la selección de especies por sus relaciones filogenéticas, de las cuales se tiene conocimiento que producen ciertos compuestos de interés (Jones y Kinghorn, 2006; Silva, Lee, y Kinghorn, 1998; Atanasov *et al.*, 2015).

El estudio de actividad inhibitoria sobre la  $\alpha$ -glucosidasa bajo el enfoque etnomedicinal se ha realizado sobre especies como el árbol de caoba, también conocido como zopilote o flor de venadillo, el copalquín o copalchi y la salvia (Mata *et al.*, 2019). En la etnomedicina del estado de Oaxaca, las hojas de *Agave potatorum* se utilizan para tratar heridas, inflamación y los síntomas de la diabetes mellitus (Padilla Gómez, 2007; García-Mendoza, 2010). Sin embargo, en cuanto a estudios de actividad biológica, no se tienen reportes sobre la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa por los extractos de hojas de *Agave potatorum* Zucc., limitándose estos a reportes sobre el perfil fitoquímico y actividad antioxidante (Soto-Castro, Pérez-Herrera, García-Sánchez, y Santiago-García, 2021).

*Agave potatorum* Zucc. es una especie del género *Agave*, morfológica y ecológicamente similar a *Agave cupreata* (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013), por lo que desde un punto de vista quimiotaxonómico es relevante mencionar que se ha reportado actividad antibacteriana y antiinflamatoria de extractos obtenidos de hojas de *Agave cupreata* (Salazar-Pineda *et al.*, 2017). Además, se ha estudiado el efecto inhibitorio sobre la enzima  $\alpha$ -amilasa de la apigenina, puerarina y ácido *p*-coumárico (Figura 1.1), extraídos de las hojas de *Agave americana* con acetato de etilo mediante ultrasonido, colocándolos como una nueva alternativa en terapias antidiabéticas (Sahnoun *et al.*, 2019; Sahnoun, Saibi, Brini, y Bejar, 2018).

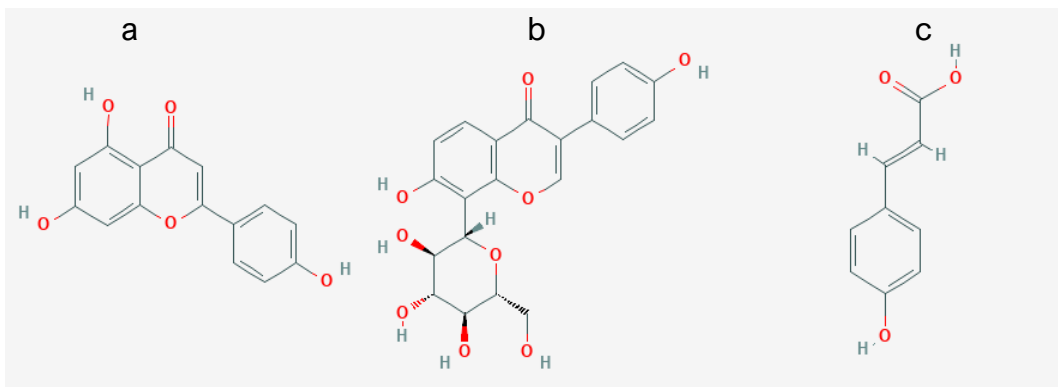


Figura 1.1. Estructura de: a) apigenina, b) puerarina y c) ácido *p*-coumárico. Tomado de National Center for Biotechnology Information (2021).

La técnica más conocida para determinar la actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -glucosidasa es el método espectrofotométrico utilizando el *p*-nitrofenil- $\alpha$ -*D*-glucopiranosido como sustrato (Mata *et al.*, 2013; Simões-Pires, Hmicha, Marston, y Hostettmann, 2009). Otra técnica para mezclas complejas, económica y rápida, es el método de bioautografía en cromatografía de capa fina empleando el 2-naftil- $\alpha$ -*D*-glucopiranosido como sustrato y la sal Fast Blue B, para formar un colorante de diazonio violeta (Simões-Pires *et al.*, 2009). Se tienen reportes de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa mediante bioautografía en extractos de plantas como *Tussilago farfara* L., *Urtica dioica* L., *Justicia secunda* Vahl y *Phlomis tuberosa* (Simões-Pires *et al.*, 2009; Theiler *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2015).

Es de notar la ausencia de un estudio biodirigido sobre la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa por metabolitos secundarios presentes en *Agave potatorum* Zucc., el cual es utilizado en la etnomedicina para el tratamiento de síntomas de la DM2. Por este motivo, el trabajo a desarrollar tiene la finalidad de determinar la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por los extractos de hojas de *Agave potatorum* Zucc., empleando la técnica de bioautografía en cromatografía de capa fina.

#### 1.4 Hipótesis

Los extractos de hojas de *A. potatorum* Zucc. contienen metabolitos secundarios que inhiben la actividad enzimática de la  $\alpha$ -glucosidasa, y puede ser determinada mediante ensayos de bioautografía y espectrofotometría UV-visible.

## **1.5 Objetivo general**

Identificar los metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa presentes en los extractos de hojas de *Agave potatorum* Zucc. mediante bioautografía en cromatografía de capa fina y espectrofotometría UV-visible.

## **1.6 Objetivos específicos**

1. Evaluar por bioautografía-CCF la actividad inhibitoria sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de extractos de hojas de *A. potatorum* obtenidos por extracción asistida por ultrasonido con disolventes de polaridad creciente.
2. Identificar el perfil fitoquímico de los extractos y zonas activas sobre placas de cromatografía de capa fina.
3. Determinar el porcentaje de inhibición sobre la  $\alpha$ -glucosidasa mediante espectrofotometría de UV-visible de las fracciones activas, obtenidas mediante fraccionamiento por cromatografía en columna, e infusión.
4. Caracterizar las fracciones activas mediante RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y correlacionar las señales con los metabolitos secundarios identificados en el perfil fitoquímico.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Genero *Agave*

Los agaves son plantas xerofitas perennes, con hojas dispuestas en espiral, arregladas en roseta en el ápice de un tallo (Espinosa-Barrera, 2015). Sus hojas son suculentas, fibrosas y carnosas, de forma linear a lanceolada u ovalada, con una espina al final del ápice, de algunos milímetros hasta 5 centímetros (García-Mendoza, 2007). La forma de las hojas permite capturar y dirigir agua de lluvia o de rocío hacia las raíces (Espinosa-Barrera, 2015). Otras características adicionales en las hojas como su disposición, presencia de tejidos fibrosos, dientes al margen y espina terminal, cutícula gruesa en epidermis con acumulación de cera en su superficie y estomas complejos (García-Mendoza, 2007) así como el metabolismo ácido propio de las crasuláceas (CAM), tallos reducidos y raíces superficiales adventicias, le han permitido a esta especie habitar en ambientes áridos de Norteamérica (Pérez-López y Simpson-Williamson, 2019).

El tallo es el principal órgano de almacenamiento de agua y carbohidratos de reserva en agaves (Espinosa-Barrera, 2015); puede ser corto, de unos centímetros, o largo y erecto, hasta de tres metros de altura (García-Mendoza, 2007). El número de hojas varía entre las distintas especies, de 5-10 hasta 150-200, con peso menor a veinte gramos en especies pequeñas hasta más de 30 kg por hoja, como en el maguey pulquero (García-Mendoza, 2007). La inflorescencia del maguey es desproporcionada con relación al tamaño de la planta, son bisexuales, tubulares, con seis tépalos de color verdoso-amarillo en varias especies; el fruto es una cápsula seca trilocular con semillas negras aplanadas (García-Mendoza, 2007). La reproducción sexual y asexual tiene lugar en agaves. La reproducción sexual se lleva a cabo por murciélagos nectarívoros en el subgénero *Agave* (inflorescencia racemosa) y por insectos y aves en el subgénero *Littaea* (inflorescencia espigada).



La mayoría de los agaves se reproducen asexualmente, mediante clones en la base de la planta, roseta o inflorescencia (García-Mendoza, 2007).

El género *Agave* incluye aproximadamente 200 especies, de las cuales 150 habitan en México (García-Mendoza A., 2007; Chávez-Ortiz *et al.*, 2019), más 36 que pertenecen a categorías infraespecíficas, teniéndose 186 taxones en total (García-Mendoza, 2007). La mayor cantidad de taxones se localizan en México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala, y menos de 8 especies están distribuidas en diversos países del Caribe y hasta Colombia y Venezuela (García-Mendoza, 2007). Por subgéneros, *Agave* está constituido por 103 especies y *Littaea* por 47 (García-Mendoza, 2007). Es posible considerar que el género se encuentra en una etapa de evolución activa ya que en los procesos de especiación existe un alto grado de afinidad genética entre las especies (García-Mendoza, 2007).

## **2.2 Usos tradicionales del *Agave***

Existen indicios de la utilización del agave como alimento y fibras desde hace más de 7000 años, pues se han encontrado fibras mascadas en el Valle de Oaxaca, Valle de Tehuacán y Coahuila, además de cordeles de ixtle y sandalias de fibra de maguey en este último sitio (García-Mendoza, 2007). Durante siglos el agave ha ocupado un lugar importante en la economía y cultura de México (García-Mendoza, 2007), siendo utilizado como alimento, bebida, medicina, combustible, ornato, fibras, forraje, decoración, construcción, entre otros (García-Mendoza, 2007; Nava-Cruz, Medina-Morales, Martínez, Rodríguez, y Aguilar, 2014). Actualmente los agaves son utilizados principalmente para la elaboración de bebidas alcohólicas, utilizándose *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. salmiana* para el mezcal; *A. salmiana* para el pulque y *A. tequilana* para el tequila (Nava-Cruz *et al.*, 2014). Dentro de estos, el *A. potatorum* es la especie usada para la producción del mezcal tobalá, bebida apreciada por su aroma y sabor (Vera-Guzmán, Santiago-García, y López, 2009).

El agave también se usa para la obtención de fructanos y jarabes de agave (Diario Oficial de la Federación, 2016), los cuales son comercializados como azúcares y fibra dietética soluble. La flor de múltiples especies y los gusanos obtenidos del maguey son comestibles, en tanto las hojas son empleadas en la preparación de barbacoa y mixiotes (López-Salazar *et al.*, 2019; Nava-Cruz *et al.*, 2018; Barriada-Bernal *et al.*, 2014; Padilla-Eugenio, 2007). En la etnomedicina, *A. angustifolia* se utiliza para tratar padecimientos como la deshidratación, escorbuto, heridas, golpes, dolores reumáticos y de muelas, indigestión, picaduras de animales venenosos y esguinces en huesos tanto de personas como de animales (López-Salazar *et al.*, 2019). Mientras que las hojas de *A. potatorum* se utilizan para tratar heridas, inflamación y los síntomas de la diabetes mellitus (Padilla Gómez, 2007). Los residuos de las cabezas de agave, conocido como bagazo, también se utilizan en la fabricación de ladrillos y colchones (Iñiguez, Acosta, Martínez, Parra, y González, 2005).

### **2.3 *Agave potatorum* Zucc.**

*Agave potatorum*, probablemente procedente de Tehuacán, Puebla, fue descrito por Zuccarini en 1832 (García-Mendoza, 2007). *Potatorum* proviene del latín *potator*, -*oris*, bebedor de vino, y es conocido comúnmente como maguey papalometl (del náhuatl: agave mariposa), papalomé, tobalá y *jä nāk tsääjts* (mixe) (García-Mendoza, 2007; Ortiz-Hernández, Gutiérrez-Hernández, Corzo-Ríos, García-Ramírez, y Martínez-Tomás, 2018). Es endémica de los estados de Oaxaca y Puebla (Rangel-Landa, Casas, y Dávila, 2015), distribuyéndose en el extremo oriental de la cuenca del Río Balsas, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y pie de montes de la sierra Mixteca y del Valle Central de Oaxaca (García-Mendoza, 2007). Crece en suelos arenosos derivados de roca caliza, a una altitud de 1300-2400 metros, en sitios planos o de baja pendiente con clima árido o semiárido (García-Mendoza, 2007). Su uso principal es para la elaboración de mezcal; las flores y el pedúnculo floral se utiliza en la alimentación, mientras que sus hojas se utilizan en la medicina tradicional como

antiinflamatorio (García-Mendoza, 2007). Las características morfológicas del *Agave potatorum* (Figura 2.1) son descritas como:

“Plantas perennes, solitarias, acaules, rara vez con 1-3 hijuelos estoloníferos; rosetas compactas, 30-50 cm alto, 40-60 cm diámetro. Hojas 30-60(-100) por planta, 15-35 cm largo, (5-)8-10 cm ancho, ovadas, oblongas o lanceoladas, suculentas, erectas, flexibles a rígidas, planas o algo cóncavas hacia el ápice, engrosadas hacia la base, glaucas a verde-glaucas; margen sinuado a crenado, mamilas 4-7(-10) mm alto; dientes de la parte media, 4-6(-12) mm largo, 4-6(-8) mm ancho, retrorsos, antrorsos o rectos, castaños a grisáceos, separados por 1-3 cm; espina 3-4 cm largo, 0.4-0.7 cm ancho, recta o sinuosa, aguda, ampliamente acanalada a plana en el haz, decurrente por menos de 1 cm, castaña a grisácea. Inflorescencia 3-5(-6) m alto, porción fértil en la mitad o tercio superior, paniculada, abierta, con (7-)11-25 ramas primarias 10-30 cm largo, separadas entre sí por 15-30 cm, a veces con ramas secundarias 0.5-4 cm largo; pedúnculo verde a pardo-rojizo, brácteas del pedúnculo 12-20 cm largo, 3.5-4 cm ancho en la base, triangulares, cartáceas, con algunos dientecillos en el margen, espina 0.5-2.5 cm largo, 0.7-1 cm ancho, pardo-rojiza; brácteas de las ramas primarias 5-8 cm largo, 2-5 cm ancho, ovadas, amplexicaules. Flores (15-)20-40 por umbela, (5-)5.5-7 cm largo, campanuladas a algo urceoladas, suculentas, verde amarillentas con tintes purpúreos o rojizos, ovario verde; pedicelos 1-1.5 cm largo; ovario 2.5-3 cm largo, 4-6 mm ancho, cilíndrico a ligeramente triquetro, cuello 2-3(-5) mm largo, tubo (1-)1.3-1.6 cm largo, (0.8-)1.3-1.8 cm diámetro en la porción distal, sulcado; tépalos 1.2-1.5(-2) cm largo, 3-6 mm ancho, triangulares u oblongos, erectos, gruesos, los externos 1-2 mm más largos que los internos, margen involuto, ápice cuculado, duro, los internos aquillados; filamentos 3-4(-4.5) cm largo, aplanados adaxialmente, insertados a la mitad o en el tercer cuarto superior del tubo, amarillentos, a veces con tintes purpúreos, anteras 1.5-2.5 cm largo, 2-3 mm ancho, rectas, versátiles, amarillentas; estilo 5.5-6 cm largo, estigma claviforme, trilobado. Cápsulas (3.5-) 4-6 cm largo, 1.5-2 cm ancho, oblongas,

estipitadas, rostradas. Semillas 5-6 mm largo, 4-5 mm ancho, lunulares, con un ala apenas perceptible, aplanadas, negras.” (García-Mendoza, 2007, p.74-75)

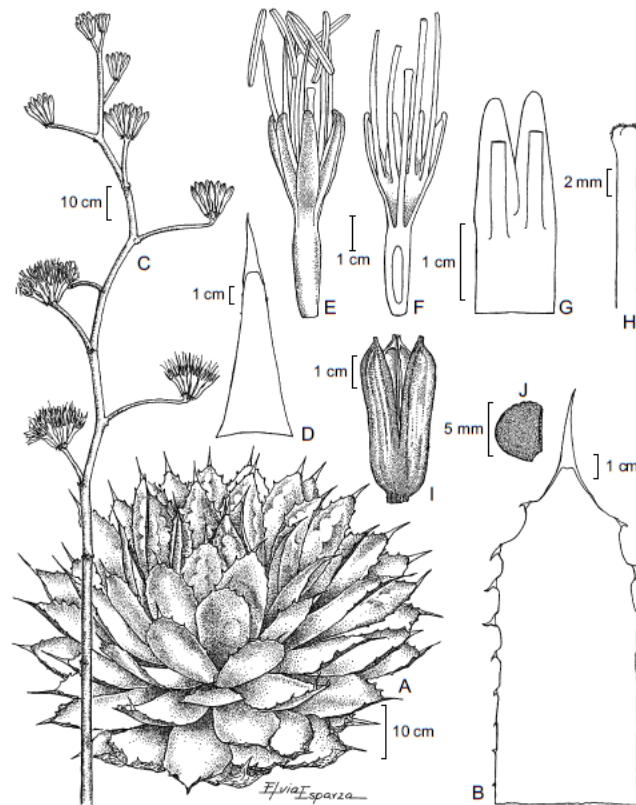


Fig. 1. *Agave potatorum* Zucc. A. roseta; B. hoja; C. inflorescencia; D. bráctea del pedúnculo; E. flor; F. flor disecada; G. detalle de la inserción del filamento; H. estilo y estigma; I. cápsula; J. semilla.

Figura 2.1. Características morfológicas del *Agave potatorum* Zucc., tomado de García-Mendoza, (2007) (p. 74).

## 2.4 Patología de la diabetes mellitus

En países desarrollados, la diabetes mellitus tipo I (insulino-dependiente) representa del 5-10 % de los casos, mientras que la diabetes mellitus tipo II (no insulino-dependiente) está presente en el 90 a 95 % de los casos (Sen *et al.*, 2016; International Diabetes Federation, 2019). La diabetes mellitus tipo 1 es 1A si resulta de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas, y 1B si es idiopática (etiología desconocida). Por otro lado, en la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se

observa una resistencia a la acción de la insulina o una disminución en su secreción (Sen *et al.*, 2016).

Los daños ocasionados a distintos órganos son tan variados y depende del avance del padecimiento (Sen *et al.*, 2016). Algunos órganos afectados son, por ejemplo, piel, corazón, ojos, riñones y vasos sanguíneos, con complicaciones tales como un estado hiperglucémico hiperosmolar, acidosis láctica e hipoglicemia. Las complicaciones en la visión incluyen retinopatía diabética, glaucoma, edema macular, keratopatía, neuropatía óptica isquémica; complicaciones en el pie como úlceras, gangrena y amputación. A nivel cardiovascular se presentan hipertensión, aterosclerosis, derrame cerebral, infarto al miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, cardiomiopatía, mientras que a nivel digestivo se observan anomalías en nervios y motilidad gástrica, anorexia, náuseas, vómitos, disfagia, saciedad temprana, reflujo, dolor, esofagitis por *Candida*, diarrea, constipación, enfermedad celiaca, síndrome megasigmoide, gastropatía y gastroparesias, hígado graso, cálculos biliares, colecistitis, hiperamilasemia, pancreatitis, secreciones pancreáticas anormales y carcinoma en el tracto gastrointestinal.

En la piel se llegan a presentar acantosis nigricans, calcifilaxis, dermatopatía, xantelasma, xantoma eruptivo, eritema tipo erisipelas, granuloma anular, trastornos perforantes, telangiectasia periungueal, pigmentación purpura, psoriasis, rubeosis faciei, piel roja, vitíligo, sarcoma de Kaposi, infecciones bacterianas y fúngicas, y virales, macro y microangiopatía. A nivel dental las complicaciones son gingivitis, periodontitis, disfunción de glándulas salivales, xerostemia, caries dental, síndrome de boca quemada, perturbación del gusto, candidiasis, úlceras y fibromas. En el riñón se pueden presentar glomeruloesclerosis diabética, nefropatía, necrosis papilar renal, disfunción de la vejiga, infección del tracto urinario y pielonefritis. En cuanto a complicaciones sexuales se tienen disfunción eréctil, problemas eyaculatorios, eyaculación retrógrada, balanitis, aspermia, baja cantidad de fluido seminal, deficiencia de testosterona, desordenes de la libido, defectos de lubricación vaginal, problemas menstruales, amenorrea, alteración de la función ovárica,

síndrome de ovario poliquístico y anorgasmia. También se presentan neuropatías, mayor incidencia de desórdenes infecciosos como tuberculosis, hepatitis e infecciones en el tracto respiratorio y complicaciones del sistema nervioso central.

## **2.5 Las enzimas y su clasificación**

El término enzima es utilizado para describir a un catalizador biológico (Punekar, 2018), el cual se enlaza de manera específica a un sustrato, facilitando ciertas reacciones en particular para producir uno o más productos (Stenesh, 1998; Traut, 2008). Dependiendo de su especificidad, una enzima puede tener más de un compuesto como sustrato (Stenesh, 1998). A los componentes no proteicos necesarios para la función catalítica de la enzima se les conoce como cofactores, si estos están enlazados fuertemente se les conoce como grupos prostéticos (Punekar, 2018; Stenesh, 1998), mientras que si es un ion metálico se le conoce como activador, y si es un compuesto orgánico se le denomina coenzima (Stenesh, 1998). Al componente proteico de las enzimas se le llama apoenzima, y a la unión de la apoenzima y el cofactor se le denomina holoenzima. Las enzimas alostéricas son enzimas multisubunidades, con múltiples sitios activos, por lo cual presentan efectos cooperativos. Una misma actividad enzimática en un organismo u organismos diferentes, puede presentarse en diferentes formas de la enzima, que difieren en su estructura primaria y propiedades (Punekar, 2018). A estas enzimas, que catalizan las mismas reacciones, se les conoce como isozimas o isoenzimas (Stenesh, 1998). Las isoenzimas comparten el mismo número de clasificación de la Enzyme Commission (EC) y nombre sistemático (ver más adelante), por lo que es conveniente utilizar prefijos y sufijos para indicar las modificaciones u origen al nombrarlas (Punekar, 2018).

Debido a que se han caracterizado más de 5000 enzimas (Traut, 2008), el Comité de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica ha diseñado un sistema de nomenclatura y clasificación de enzimas (Punekar, 2018). La clasificación del EC se basa en la naturaleza de la reacción catalizada por la enzima, otorgando a cada

enzima un nombre y un número de clasificación únicos. El EC recomienda utilizar el nombre común, y para evitar ambigüedades, el nombre sistemático (Punekar, 2018; Stenesh, 1998). Los nombres comunes recomendados por el EC pueden ser triviales (papaína), o incluir al sustrato (catalasa) o reacción catalizada (lactato deshidrogenasa) (Stenesh, 1998). El nombre sistemático consiste en el nombre del sustrato con el sufijo *asa*, seguido una de las seis clases de enzimas (Punekar, 2018; Stenesh, 1998). Estas clases corresponden a las oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, y ligasas. Por ejemplo, para la enzima  $\alpha$ -glucosidasa se utiliza el número EC 3.2.1.20. el primer dígito indica que pertenece a la clase de las hidrolasas y el segundo que hidroliza uniones glicosídicas. El nombre sistemático de esta enzima es  $\alpha$ -D-glucósido glucohidrolasa, el nombre recomendado por la EC es  $\alpha$ -glucosidasa, mientras que sus nombres comunes son maltasa, glucoinvertasa, maltasa glucoamilasa,  $\alpha$ -glucopiranosidasa, glucosídoinvertasa,  $\alpha$ -D-glucosidasa,  $\alpha$ -glucósido hidrolasa,  $\alpha$ -1,4-glucosidasa, entre otros (Schomburg y Salzmann, 1991).

## **2.6 Mecanismo de acción de la enzima $\alpha$ -glucosidasa**

La enzima  $\alpha$ -glucosidasa es una exo-hidrolasa, es decir, actúa para liberar glucosa del enlace  $\alpha$ -glucosídico de la terminación no reductora del sustrato (Okuyama, Saburi, Mori, y Kimura, 2016). La  $\alpha$ -glucosidasa existe en casi todos los organismos, siendo similar la estructura tridimensional entre ellas (Okuyama *et al.*, 2016) (Figura 2.2):

Dominio A: dominio catalítico con pliegue de barril, Asp (aspartato) como nucleófilo y Glu (ácido glutámico) como ácido base.

Dominio B: forma parte de la pared del compartimento del sitio activo al estar insertado entre el dominio A, con  $\alpha$ -hélices y láminas  $\beta$ .

Dominio C: sigue al dominio A y está formado por láminas  $\beta$  antiparalelas.

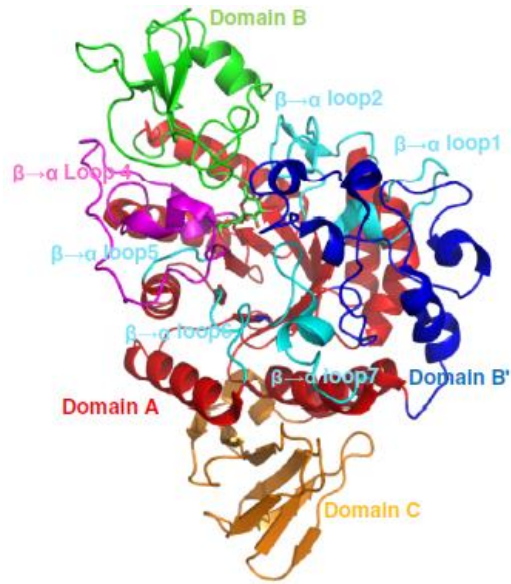


Figura 2.2. Estructura tridimensional de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, mostrando los dominios A, B y C.  
Tomado de Okuyama *et al.* (2016).

Un residuo de Arg (arginina) y dos de His (histidina) en la región no catalítica forman puentes de hidrogeno con la terminal no reductora del residuo de glucosil del sustrato, una Tyr (tirosina) del dominio A se apila sobre el residuo de glicosil, mientras que un residuo de Asp y Arg reconocen la terminación no reductora por interacción con el 4OH formando un puente salino (Okuyama *et al.*, 2016). Tres moléculas de agua ocupan desde el fondo del compartimento del sitio activo hasta la superficie de la enzima, las cuales son desplazadas por una vía de drenaje al entrar el sustrato (Okuyama *et al.*, 2016; Yamamoto, Miyake, Kusunoki, y Osaki, 2010).

Durante el metabolismo de los carbohidratos, las enzimas  $\alpha$ -amilasa salival y pancreática catalizan la hidrólisis de polisacáridos como el almidón, a oligosacáridos y disacáridos como la dextrina y maltosa (Li *et al.*, 2013). Posteriormente estos son hidrolizados por la  $\alpha$ -glucosidasa, localizada en las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado, a glucosa y otros monosacáridos para su absorción intestinal (Li *et al.*, 2013; Clapham, 2020).



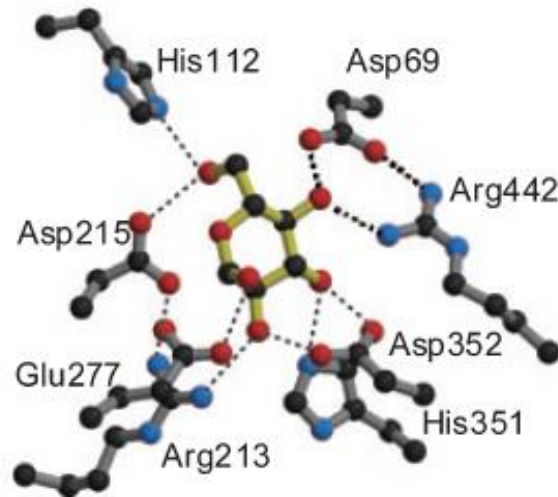


Figura 2.3. Puentes de hidrogeno formados por residuos de Asp y Arg con una molécula de maltosa (solo se indica el lado no reductor del residuo de glucosa). El Asp actúa como nucleófilo y el Glu como donador de protones. Las esferas en rojo indican átomos de oxígeno, en azul átomos de nitrógeno y en negro átomos de carbono. Los puentes de hidrogeno se señalan con líneas punteadas. Tomado de Yamamoto *et al.* (2010).

Las glucosidasas liberan  $\alpha$ -glucosa por hidrolisis de la terminación no reductora de las uniones glucosídicas  $\alpha$ -1,4 principalmente, aunque también actúan sobre uniones  $\alpha$ -1,6-,  $\alpha$ -1,2- y  $\alpha$ -1,3- (Taniguchi y Honnda, 2009). El mecanismo de reacción para la enzima-sustrato, de acuerdo con la teoría del intermediario enlazado covalentemente (Figura 2.4), sugiere que el donante de protones del sitio activo dona su protón al oxígeno glicosílico, rompiendo la unión alfa, en tanto que el carbono anomérico es atacado por el nucleófilo del sitio activo en el lado opuesto (Taniguchi y Honnda, 2009). Esto conduce a la formación de un intermediario enlazado covalentemente con configuración  $\beta$ , mecanismo denominado inversión de Walden. Por su parte, el donador de protones ataca al hidrogeno de una molécula de agua presente en el compartimento del sitio activo, la que a su vez ataca por el lado opuesto al carbono anomérico del intermediario, dando origen a una segunda inversión de Walden y, por tanto, generándose la  $\alpha$ -glucosa.

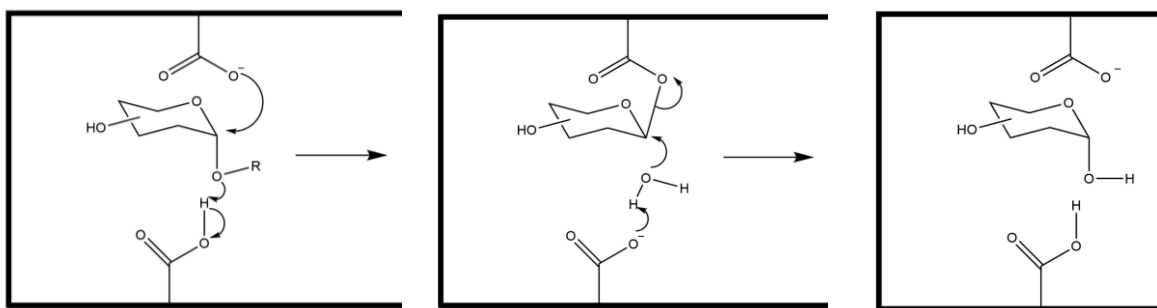


Figura 2.4. Mecanismo de reacción  $\alpha$ -glucosidasa-sustrato. Adaptado de Taniguchi y Honnda (2009).

## 2.7 Mecanismo de acción de inhibidores de la enzima $\alpha$ -glucosidasa

La inhibición competitiva y reversible de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa se da debido a que los compuestos inhibidores forman puentes de hidrogeno con residuos de aminoácidos de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, principalmente en el sitio activo (Figura 2.5) (Rosas-Ramírez *et al.*, 2018; Mata *et al.*, 2013; Anaya-Eugenio *et al.*, 2014; Brindis *et al.*, 2011; Flores-Bocanegra, González-Andrade, Bye, Linares, y Mata, 2017; Valdes, Calzada, y Mendieta-Wejbe, 2019; Verastegui-Omaña *et al.*, 2017; Rangel-Grimaldo, Rivero-Cruz, Madariaga-Mazón, Figueroa, y Mata, 2017). El tipo de inhibición depende de la forma en que el compuesto inhibidor se une a la enzima.

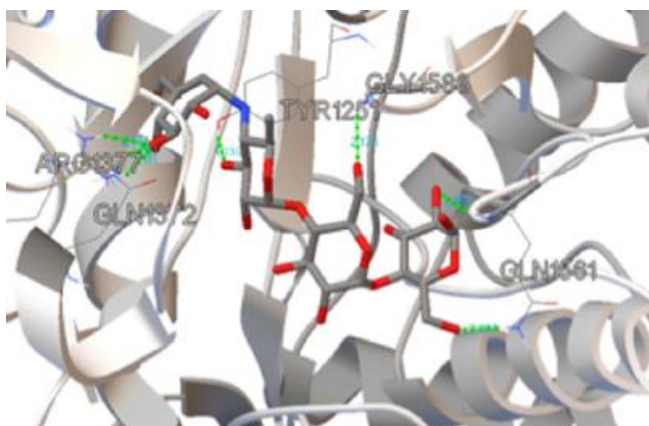


Figura 2.5. Inhibición del sitio activo de  $\alpha$ -glucosidasa humana por acarbosa. Los puentes de hidrogeno se indican con líneas verdes punteadas, y el nitrógeno glucosídico en color azul. Tomado de Rosas-Ramírez *et al.* (2018).

### 2.7.1 Acarbosa

La acarbosa es un metabolito secundario producido por cepas de *Actinoplanes*, la estructura esencial para su actividad inhibitoria corresponde a dos residuos de glucosa unidos al pseudo-disacárido denominado acarviosina, constituido por una unidad de ciclitol (residuo de hidroximetilconduritol) y otra de 4-amino-4,6-didesoxi-D-glucopiranosido (residuo de 4-amino-4-desoxy-D-quinovosa) (Truscheit *et al.*, 1988). El arreglo de los sustituyentes es estereoquímicamente similar al arreglo presente en la unidad  $\alpha$ -D-glucopiranosido. La acarviosina concede la actividad inhibitoria a la molécula, ya que se enlaza al centro activo de la enzima, en los residuos de Asp (Truscheit *et al.*, 1988).

La inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por la acarbosa tiene lugar cuando la unidad de ciclitol se une al sitio de enlace del glucopiranosil y el nitrógeno axial toma la posición alfa del oxígeno del sustrato y se protoniza (Figura 2.6), mientras que el residuo de quinovosa se fija al sitio de enlace de la aglicona (Truscheit *et al.*, 1988). La reacción enzimática se detiene debido a que la unión entre C-1 del ciclitol y el nitrógeno no puede romperse, siendo una inhibición de tipo competitiva y reversible (Truscheit *et al.*, 1988).

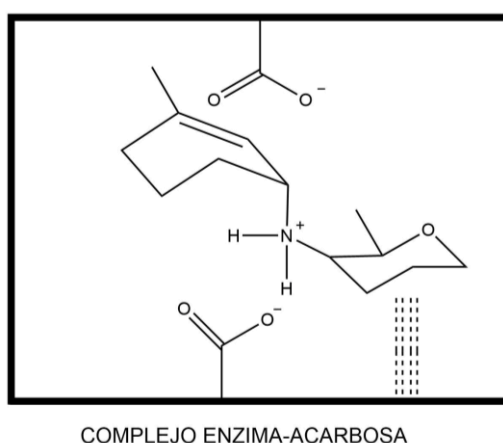


Figura 2.6. Unión del donador de protones de la enzima a la acarbosa. El enlace del N en posición  $\alpha$  no puede romperse por la formación de un ion cargado positivamente, dando lugar al complejo enzima-acarbosa. Adaptado de Truscheit *et al.* (1988).

### 2.7.2 Flavonoides

En la inhibición de la isoenzima isomaltasa/ $\alpha$ -metilglucosidasa (EC 3.2.1.10) por distintos flavonoides, se encontraron interacciones similares a las que se producen entre la acarbosa y los residuos del compartimento del sitio activo de la enzima mediante estudios de docking molecular. Los sustituyentes OH del anillo B del flavonoide donan enlaces hidrógenos al Asp214; el Glu276 (glutamato) dona un enlace de hidrogeno al OH del anillo B, mientras que el OH en posición 3 del anillo C dona un enlace de hidrogeno al Asp349 (Proença *et al.*, 2017). El anillo B se une a la cavidad del compartimento del sitio activo, el anillo C en la entrada de esta cavidad y el anillo A queda expuesto en la parte amplia del compartimento, semejante al modelo obtenido con la acarbosa (Proença *et al.*, 2017), y genera una inhibición de tipo competitivo. Cuando el flavonoide carece del enlace doble entre C2 y C3 en el anillo B (por ejemplo, la taxifolina), éste queda fuera del plano de los anillos A y C, y en lugar de insertarse en el compartimento más pequeño del sitio activo, lo hace en un sitio menos profundo (Proença *et al.*, 2017). Esto da por resultado una inhibición no competitiva, demostrada también por estudios de cinética enzimática (Proença *et al.*, 2017). En general, para los flavonoides se reportan tanto la inhibición competitiva, no competitiva y mixta mediante análisis de la cinética de inhibición (Mata *et al.*, 2013; Proença *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2014).

### 2.7.3 Terpenos

En estudios de docking del diterpeno tipo amarisólido, obtenido de *Salvia circinata*, y la  $\alpha$ -glucosidasa de *Ruminococcus obeum* (la cual posee actividad maltasa y glucoamilasa), se presume una inhibición del sitio activo con uniones en Asp197, Arg404, y Glu481, semejante al observado en la acarbosa (Asp197 y Asp307 para la unidad ciclitol, y Glu481 para la glucosa terminal de la acarbosa) (Flores-Bocanegra *et al.*, 2017). También se reporta inhibición de tipo mixto mediante análisis de cinética enzimática para el sesquiterpeno salvinina del estafiate (Anaya-Eugenio *et al.*, 2014), y uniones por enlaces de hidrogeno y contacto hidrofóbico a diferentes sitios de la enzima, en estudios de docking con el complejo isomaltasa-sacarasa. Diversos estudios de cinética enzimática demuestran que los terpenos

pueden presentar inhibiciones del tipo competitivo, no competitivo y mixto (Yin *et al.*, 2014).

#### **2.7.4 Otros metabolitos secundarios**

Para una cumarina inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa aislada de la corteza del “copalquín”, se ha señalado por estudios de docking que se une al mismo compartimento del sitio activo que la acarbosa (Mata *et al.*, 2019). Del mismo modo, se concluye que los glicolípidos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa analizados forman enlaces de hidrogeno con los residuos His279 y Gln322 (glutamina) del sitio activo de  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae*, al igual que la acarbosa (Rosas-Ramírez *et al.*, 2018). Para estos glicolípidos se observaron uniones con el residuo de Tyr1251 e interacciones hidrofóbicas en el sitio activo de maltasa-glucoamilasa humana (Rosas-Ramírez *et al.*, 2018). Por la naturaleza química de estos compuestos, se cree que estos provocan impedimento estérico en la superficie del compartimento del sitio activo hacia los sustratos. En el caso de péptidos y glucopéptidos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, se observa una inhibición enzimática no competitiva irreversible debido a interacciones proteína-proteína (Truscheit *et al.*, 1988). Un caso especial es el nopal (*Opuntia ficus-indica*), al cual no se le han detectado metabolitos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa. Sin embargo, se ha concluido que los polisacáridos voluminosos presentes en los cladodios actúan bloqueando mecánicamente las paredes del intestino, impidiendo de este modo la absorción de la glucosa (Heinrich *et al.*, 2014).

### **2.8 Extracción de metabolitos secundarios**

La mayoría de las extracciones en la medicina tradicional se llevan a cabo por infusión o decocción, pero en el laboratorio es preferible no trabajar con extractos acuosos por las dificultades para su separación, concentración en rotavapor (Jones y Kinghorn, 2006) y facilidad para desarrollar crecimiento bacteriano. El método de extracción ideal debe ser exhaustivo (extraer tantos compuestos como sea posible), rápido, simple, económico, ambientalmente amigable y reproducible (Siedel, 2012).

Tras la extracción, la disolución resultante debe ser filtrada (Jones y Kinghorn, 2006) para remover cualquier partícula remanente y evitar el riesgo de formación de artefactos, descomposición o isomerización. El extracto debe concentrarse a baja presión con ayuda de un rotavapor, con temperaturas debajo de los 40 °C para evitar descomposición de componentes termolábiles (Siedel, 2012; Jones y Kinghorn, 2006; Silva, Lee, Kinghorn, 1998). Después de tres cambios de disolvente se considera que el material vegetal ha sido extraído exhaustivamente, casi por completo (Jones y Kinghorn, 2006). Con frecuencia, los compuestos bioactivos presentes en las plantas son desconocidos por lo cual es conveniente extraer la mayoría de los compuestos con distintos disolventes (Atanasov *et al.*, 2015). Es común en los métodos de extracción emplear disolventes orgánicos de distinta polaridad para extraer los compuestos con distintas solubilidades (Siedel, 2012; Atanasov *et al.*, 2015). Los disolventes más comunes utilizados en extracción son el hexano, éter de petróleo, diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOEt), *n*-butanol, etanol, metanol y agua (Siedel, 2012).

La maceración, es una de las técnicas de extracción más empleadas por el bajo costo energético. Esta extracción parte de muestras en estado sólido, sumergiendo la muestra en el disolvente o mezcla de disolventes y es el método más simple y eficiente para los fitoquímicos (Tsao y Li, 2013). En la extracción sólido-líquido, el disolvente se difunde dentro de las células, solubiliza los metabolitos, que se difunden fuera de las células y enriquece el medio con los metabolitos extraídos (Siedel, 2012; Silva, Lee, y Kinghorn, 1998).

La extracción por ultrasonido es una de las técnicas de extracción que requiere de tiempos cortos y menor cantidad de disolventes, además de su gran rendimiento (Jones y Kinghorn, 2006). La cavitación producida por las ondas ultrasónicas rompe la pared celular, permitiendo la salida de metabolitos intracelulares de manera más rápida y eficiente (Siedel, 2012).

## 2.9 Bioautografía- cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (CCF) es considerada como una técnica fácil, rápida y económica para la separación de productos naturales (Gibbons, 2012). Además, puede acoplarse a un bioensayo de inhibición enzimática, con algún cambio colorimétrico en la placa, como prueba de actividad biológica (Gibbons, 2012). La unión de un análisis cromatográfico planar y un método de detección biológica se conoce como bioautografía (Ramallo, Salazar, y Furlan, 2020). Este ensayo es útil para analizar el perfil de inhibición de enzimas por compuestos presentes en mezclas complejas, como los extractos (Gibbons, 2012; Ramallo *et al.*, 2020). La separación por CCF y la determinación subsecuente *in situ* de actividad biológica de los metabolitos presentes en la mezcla permite asignarles actividad (Ramallo *et al.*, 2020). Los compuestos absorbidos sobre la placa de CCF dan un cambio de color al atomizarles un reactivo, sea por actividad enzimática o una reacción química (Gibbons, 2012; Ramallo *et al.*, 2020).

La técnica bioautográfica para la detección de metabolitos secundarios inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa se basa en la hidrólisis enzimática del 2-naftil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, en la cual se libera el 2-naftol y una unidad de D-glucosa (Figura 2.5). El 2-naftol se forma en las zonas donde la enzima está libre, es decir, donde no existan inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. Posteriormente, el 2-naftol reacciona con la sal Fast Blue B formando un compuesto azoico de color violeta. Las zonas con inhibidores enzimáticos se visualizan entonces como zonas blancas debido a la ausencia de naftol y por tanto del compuesto azoico color violeta.

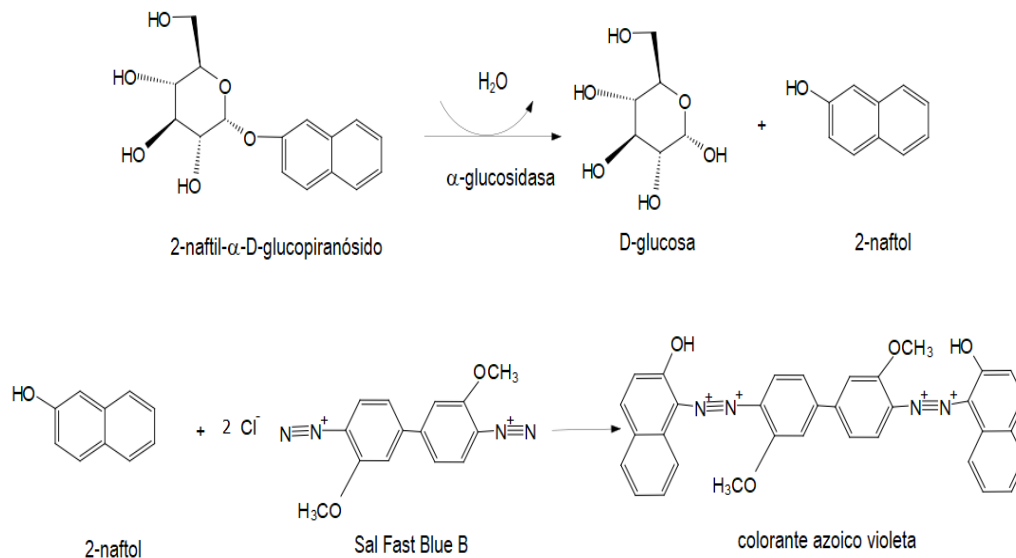


Figura 2.5. Hidrólisis del 2-naftil- $\alpha$ -D-glucopiranosido por la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y visualización del producto formado por reacción con la sal Fast Blue B.

## 2.10 Porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa y determinación del $IC_{50}$

La técnica empleada para la determinación cuantitativa del porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa emplea al 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido como sustrato, que por acción enzimática libera una molécula de glucosa y una molécula de 4-nitrofenol, el cual se determina espectrofotométricamente dado que absorbe a una longitud de onda de 405 nm (Bräm y Wolfram, 2017; Yang *et al.*, 2015).

El valor de  $IC_{50}$  (concentración inhibitoria media) es la concentración necesaria de un inhibidor para alcanzar una inhibición del 50% (Copeland, 2000). El  $IC_{50}$  es una lectura practica de los efectos de diferentes sustancias sobre la actividad enzimática bajo las mismas condiciones de laboratorio (Copeland, 2000). Las gráficas de dosis-respuesta permiten comparar la potencia inhibitoria relativa de múltiples compuestos para la misma enzima bajo las mismas condiciones, además de permitir determinar el valor del  $IC_{50}$  sobre un rango amplio de concentraciones de inhibidor a una concentración fija de sustrato (Copeland, 2000). De este modo, los valores de



IC<sub>50</sub> de varios compuestos puede determinarse sin el conocimiento previo del rango de concentraciones necesario para tener un efecto inhibitorio potente de la enzima (Copeland, 2000).

## **2.11 Resonancia magnética nuclear**

Uno de los procedimientos dentro del enfoque general para la determinación estructural de productos naturales es a través de la identificación de los grupos funcionales y número de átomos de carbono e hidrogeno a través de la resonancia magnética nuclear (RMN) (Kumar Talapatra y Talapatra, 2016). La presencia de grupos funcionales se identifica en el espectro de RMN (gráfica de desplazamiento químico contra intensidad de señal) por el desplazamiento químico adimensional expresado en partes por millón (ppm), tanto por las señales de protón (<sup>1</sup>H) como de carbono (<sup>13</sup>C) que presentan desplazamientos característicos en función de su ambiente químico (Kumar Talapatra y Talapatra, 2016). La muestra se prepara en un tubo especial llamado tubo de RMN, generalmente con CDCl<sub>3</sub> (cloroformo deuterado) o, dependiendo de su solubilidad, en otro disolvente deuterado (Kumar Talapatra y Talapatra, 2016). La muestra se somete a un campo magnético para posteriormente aplicar una frecuencia específica que permite obtener una función de decaimiento exponencial (FID), que al ser transformado por funciones de Fourier arroja un espectro de RMN asignable.

### 3. Materiales y métodos

En este capítulo se detallan los materiales, equipos y métodos empleados. Se explican los pasos seguidos en la experimentación, correspondientes a la obtención de la muestra, extracción de metabolitos secundarios, determinación de inhibición enzimática por bioautografía e identificación fitoquímica de extractos y fracciones, fraccionamiento guiado por actividad, adquisición de espectros de resonancia magnética nuclear de fracciones activas y determinación del porcentaje de inhibición de fracciones activas e infusión. La técnica de extracción se basó en protocolos indicados para estudios de actividad biológica y de perfil fitoquímico (Siedel, 2012). Se siguieron las recomendaciones de Gibbons (Gibbons, 2012) para la separación de metabolitos secundarios en cromatografía de capa fina, el protocolo de Simões-Pires *et al.* (2009) para la bioautografía, y las técnicas de perfil fitoquímico sobre placas de cromatografía fina de Wagner y Bladt (2001) y Bailey y Bourne (1960).

#### 3.1 Materiales, reactivos y equipos

Los reactivos y disolventes se emplearon sin previa purificación y se adquirieron de diferentes proveedores. El 2-naftil- $\alpha$ -D-glucopiranosido se adquirió de Goldbio© (St Louis MO, USA);  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, cloruro de tosilo (cloruro de sulfamida de sodio o cloramida), difenilboriloxietilamina, polietilenglicol 4000, dimetilsulfóxido (DMSO), ácido trifluoroacético y sal fast blue B se adquirieron de Sigma-Aldrich© (Toluca, México); en grado analítico se utilizó acetato de sodio trihidratado, cloruro de hierro III, hidróxido de potasio, vainillina, ácido gálico, diosgenina, anilina, difenilamina, acetona, ácido acético, diclorometano, etanol, hexano, sílica anhidra malla 4-8 con indicador, agua destilada, ácido acético glacial, anhídrido acético, ácido sulfúrico concentrado, ácido fosfórico al 85%, acetato de etilo y metanol grado HPLC, de Meyer© (Tláhuac, Ciudad de México). La Acarbosa de Laboratorios Pisa© (Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco) se sometió a extracción a partir de 20 tabletas de 50

mg cada una. Las tabletas se trituraron y se mezclaron con 20 mL de metanol con agitación magnética; la mezcla se filtró y concentró en evaporador rotatorio a presión reducida. La digoxina se extrajo con etanol de 4 tabletas de 0.25 mg de Valvulan, de Armstrong Laboratorios (Coyoacán, Ciudad de México).

Se emplearon placas de CCF de sílica gel 60 F<sub>254</sub> de Merck© de 2.5 x 5.0 cm (Darmstadt, Alemania), columna cromatográfica Supelco (Darmstadt, Alemania), sílica gel 60 malla 70-230 de Sigma-Aldrich© (Toluca, México), micropipetas Rainin Classic© (Oakland CA, EUA) de 1.0-10.0 µL y 100.0-1000.0 µL, baño ultrasónico de 1.5 galones Branson Ultrasonics© (Danbury CT, EUA), evaporador rotatorio R-100 Büchi© (Flawil, Suiza), espectrofotómetro UV-visible Shimadzu UV-1601 (Japón), termomezclador Eppendorf F2.0 (Hamburgo, Alemania), balanza analítica Vel-lab© (Tlalpan, Ciudad de México) y equipo de resonancia magnética nuclear Spinsolve 80 (Danbury CT, EUA).

### **3.2 Recolección de hojas de *A. potatorum***

Se recolectaron las hojas de la zona media y basal de 3 especímenes de seis años de edad (A, B y C), elegidos al azar, en una plantación en Infiernillo, San Antonio Huitepec, Zaachila (latitud 16° 53' 44" N, longitud 97° 12' 14" O) el día 24 de septiembre de 2020. Se buscó, de acuerdo con Siedel (2012), que las plantas estuvieran sanas, sin signos de contaminación por hongos, bacterias o virus.

### **3.3 Secado y trituración de hojas de *A. potatorum***

Para el secado y trituración se empleó la metodología descrita por Siedel (2012), adaptada a las características de las hojas de *A. potatorum*. Se realizaron los siguientes pasos: a) las hojas se lavaron con agua corriente y cepillo, removiendo tierra y desechos; b) se quitaron las espinas y las hojas se cortaron longitudinalmente en secciones de 0.5-0.7 cm de ancho, se distribuyeron uniformemente 3 kg de hoja en una charola y se secaron a la sombra en la campana de extracción a temperatura ambiente (18-28 °C), con flujo de aire constante para un secado homogéneo; el peso

se monitoreo durante ocho días en balanza analítica; c) las hojas secas se cortaron en secciones de 0.2-0.5 cm para hacer la muestra más homogénea y aumentar la superficie de contacto para la extracción (Figura 3.1); se emplearon tijeras y cuchillas (Silva, Lee, y Kinghorn, 1998); d) las hojas se almacenaron en empaques sellados en un lugar fresco y seco, para disminuir la posibilidad de descomposición de alguno de los metabolitos presentes.



Figura 3.1. Hojas secas cortadas en secciones pequeñas.

### 3.4 Metodología de extracción

La extracción de metabolitos secundarios de las hojas de agave se realizó secuencialmente con los disolventes hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua, recomendados por Brusotti *et al.* (2014) y Siedel (2012). Se realizó la extracción asistida por ultrasonido, tomando en cuenta las recomendaciones generales de Siedel (2012).

En un matraz cerrado se colocaron 100 g de hojas secas y trituradas de *A. potatorum* y se adicionaron 200 mL de disolvente. La boca del matraz se tapó con papel

aluminio para evitar la evaporación del disolvente (Figura 3.2). La extracción se realizó en un baño ultrasónico de 40 kHz durante 180 minutos, a temperatura ambiente (18 °C), cuidando que la temperatura del baño ultrasónico no excediera los 34 °C.



Figura 3.2. Preparación del sistema disolvente - hoja de agave para la extracción.

Posteriormente, se decantó el disolvente de las hojas de agave con ayuda de papel filtro Whatman #1. El disolvente filtrado se concentró en evaporador rotatorio a presión reducida, a una temperatura de 40 °C. El extracto concentrado se transvasó a un vial ámbar con una cantidad mínima de disolvente y se secó bajo una corriente de aire en la campana de extracción hasta alcanzar peso constante. Se eliminó cualquier exceso de humedad almacenando el vial en un recipiente con silica gel anhidra a 4 °C. Los fragmentos de hoja se sometieron nuevamente a extracción, utilizando la misma cantidad de disolvente. Este proceso se repitió para obtener tres extracciones sucesivas (Jones y Kinghorn, 2006), utilizando hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH) y agua (H<sub>2</sub>O) en orden secuencial. El material vegetal se secó por aireación entre cada cambio de polaridad del disolvente.

Con la finalidad de comparar el rendimiento de extracción y la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa entre los extractos y la infusión, forma en la cual es utilizada en la etnomedicina, se prepararon infusiones a partir de 123.48, 123.50 y 123.7 g de hoja

fresca en agua destilada (207.45 mL de agua por cada 123.50 g de hoja fresca). El extracto se secó en estufa a 40 °C hasta obtener peso constante y se almacenó a 4° C con desecante. El rendimiento para todos los extractos se reporta como el promedio  $\pm$  la desviación estándar, utilizando Excel© versión 2013, compilación 13901-20400 de Microsoft©.

### **3.5 Separación por Cromatografía de Capa Fina**

Para los extractos se probaron distintos medios de elución con la finalidad de obtener la mayor separación posible, es decir, se seleccionó como adecuado aquel sistema de fase móvil en el cual se percibieron el mayor número de señales cromatográficas diferenciables mediante observación directa en luz visible y bajo luz UV de 254 y 365 nm. En la separación por CCF se siguieron las indicaciones de Gibbons (2012). Se aplicó el extracto en un punto sobre el sorbente. La placa de CCF se colocó entonces en un recipiente de vidrio para su desarrollo (migración del disolvente en la placa con sorbente por capilaridad), con el eluyente adecuado en cantidad suficiente. Se cuidó que el disolvente mojara la placa con el sorbente, pero no la línea donde el extracto se aplicó.

### **3.6 Perfil fitoquímico**

Los metabolitos secundarios presentes en los extractos crudos y fraccionados por cromatografía en columna fueron identificados mediante pruebas fitoquímicas sobre placas de CCF, con pruebas para triterpenos, esteroides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, taninos, glucósidos cardiotónicos y ácidos fenolcarboxílicos. Se emplearon diosgenina (50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de metanol), ácido gálico (50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de metanol) y digoxina (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de etanol) como control positivo o negativo según la prueba aplicada. Los reactivos de detección para cada grupo de metabolito secundario se aplicaron a la placa eluída de acuerdo con Wagner y Bladt (2001).

**Liebermann-Burchard:** este reactivo se utiliza recién preparado. A 10 mL de etanol absoluto, enfriado en hielo, se añadieron 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. La placa se roció con el reactivo y se calentó a 100 °C por 10

minutos, para visualizarse bajo luz UV de 365 nm de longitud de onda. Los triterpenos, esteroides, saponinas se observan en color café arena o gris claro en luz UV, mientras que en luz blanca aparecen en café oscuro o gris débil.

**Fast Blue B Salt:** se preparó una solución acuosa de Fast Blue B Salt al 0.5%. La placa se roció y se observó en luz blanca. Esta prueba es positiva a compuestos fenólicos en general, como ácidos fenolcarboxílicos, cumarinas, lignanos, taninos y flavonoides. Se observan colores rojo violeta, rojo naranja o café.

**Vainillina-ácido fosfórico:** la disolución se preparó con vainillina al 1% peso/volumen empleando ácido fosfórico al 50% como disolvente. La placa atomizada con el reactivo se calentó a 100 °C por 10 minutos y se observó en luz blanca y luz UV de 365 nm. Terpenoides y lignanos se visualizan en color amarillo, rojo o naranja.

**Vainillina-ácido sulfúrico:** la placa se atomizó con una solución etanólica al 1% de vainillina, e inmediatamente se aplicó una solución etanólica al 10% de ácido sulfúrico. La placa se calentó por 5 minutos a 110 °C y se observó bajo luz visible. Los terpenoides y fenilpropanoides se observan en color violeta-café, violeta-azul, gris o rojo.

**Cloruro de hierro III:** se preparó una solución acuosa al 10% de cloruro de hierro III. La placa se atomizó con la solución y se observó en luz blanca. Los taninos se observan en color amarillo-café a amarillo-verde.

**Productos naturales-polietilenglicol (NP-PEG):** se preparó una disolución metanólica del reactivo Productos Naturales (difetilboriloxietilamina) al 1% y una solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000. La placa se atomizó con la solución de Productos Naturales seguida de la solución de polietilenglicol. La observación se realizó bajo luz UV de 365 nm. Las cumarinas y ácidos fenolcarboxílicos se visualizan en azul fosforescente; los flavonoides, cumarinas glicosiladas o antranas en amarillo, naranja y amarillo-verde.

**Hidróxido de potasio:** la placa se atomizó con una solución etanólica al 10% de hidróxido de potasio y se observó en luz blanca y luz UV a 365 nm. Bajo luz UV, las antraquinonas se observan en rojo, las antronas en amarillo y las cumarinas en azul.

**Ácido sulfúrico concentrado:** la placa es sumergida cuidadosamente en ácido sulfúrico concentrado. La coloración café, violeta y azul se observa inmediatamente para lignanos y glucósidos cardiotónicos en luz blanca.

**Cloramida-ácido trifluoroacético:** se preparó 1 mL de solución acuosa al 3% de cloruro de tosilo y se mezcló con 4 mL de solución etanólica al 25% de ácido trifluoroacético. La placa se atomizó con la mezcla y se calentó a 100 °C durante 10 minutos. Los glucósidos cardiotónicos se observan bajo luz UV a 365 nm como zonas fluorescentes de color azul, azul-verde o amarillo-verde.

**Cloruro de cobalto:** se atomizó la placa con una solución acuosa de cloruro de cobalto al 10%. Bajo luz UV de 365 nm las cumarinas se visualizan en color azul fluorescente.

**Anilina-difenilamina:** se identificó también la presencia de azúcares libres en los extractos sobre placas de CCF (Bailey y Bourne, 1960). Se preparó una solución de difenilamina con 100 mg de difenilamina, 500 µL de ácido fosfórico y 5.0 mL de acetona. La solución de anilina se preparó con 100 µL de anilina, 500 µL de ácido fosfórico y 5.0 mL de acetona. Las placas de CCF se atomizaron con la solución de difenilamina, se secaron y calentaron a 80 °C durante 5 minutos; a continuación, se atomizaron con la solución de anilina, se secaron y calentaron a 80 °C por 5 minutos. Las placas se observaron con luz visible. Los colores amarillo, café e incoloro observados después de agregar el primer reactivo, y los cambios a amarillo, café, violeta, azul, verde, rojo y magenta al aplicar el segundo reactivo, indican el tipo de azúcares contenidos en el extracto.



### **3.7 Screening por bioautografía-CCF de la actividad inhibitoria sobre la $\alpha$ -glucosidasa de los extractos de hojas de *A. potato***

La actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa se realizó según Simões-Pires *et al.* (2009) con ligeras modificaciones en la concentración de la enzima y temperatura de incubación. La solución enzimática se preparó disolviendo 10 U de  $\alpha$ -D-glucosidasa en 4.0 mL de solución buffer (2 g de acetato de sodio en 50 mL de agua destilada, a pH 7.5 con la adición de ácido acético 0.1 M). Se disolvieron 25 mg de extracto o acarbosa en 500  $\mu$ L de disolvente (50  $\mu$ g/ $\mu$ L) para su aplicación en placas de CCF. Los disolventes usados para preparar las disoluciones de extracto fueron: acetona para los extractos en Hex, DCM y AcOEt; metanol para el extracto en MeOH y la acarbosa; metanol-agua 4:1 para el extracto en H<sub>2</sub>O; y agua-metanol 4:1 para la infusión. Las placas con extracto, eluidas y libres de disolvente, se atomizaron con la disolución enzimática; el exceso de disolución se secó con una corriente de aire. Posteriormente, se colocó la acarbosa a 2.5 cm del punto de aplicación como control positivo. Las placas se incubaron en una atmósfera húmeda a 37 °C por 30 minutos, sin que el agua mojara la placa. A continuación, las disoluciones de 2-naftil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (2 mg/mL en etanol) y sal Fast Blue B (2.5 mg/mL en agua destilada) se mezclaron en proporción 1:1 y se atomizaron sobre las placas. La inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa se visualizó por la aparición de zonas blancas en un fondo violeta en la placa, bajo luz UV a 365 nm, después de 5 minutos. Se ensayaron, por triplicado, 50, 100, 150 y 200  $\mu$ g de cada extracto por placa, y 100, 150 y 200  $\mu$ g de acarbosa. Después del fraccionamiento en columna de los extractos activos, se realizó nuevamente la bioautografía, utilizando una alícuota de cada fracción y 100  $\mu$ g de acarbosa.

### **3.8 Fraccionamiento por cromatografía de columna**

Los extractos con actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa detectados por autobiografía se sometieron a fraccionamiento guiado por actividad (Atanasov *et al.*, 2015) por cromatografía en columna. Una alícuota de los extractos activos (300 mg)

de hojas de *A. potatorum* se fraccionaron en una columna cromatográfica de 9 cm de longitud y 2 cm de diámetro, utilizando mezclas de polaridad ascendente de hexano-AcOEt para el extracto hexánico y hexano-diclorometano y diclorometano-metanol para el extracto de acetato de etilo. Las fracciones se concentraron en evaporador rotatorio a presión reducida, se secaron en campana de extracción por 24 horas y se almacenaron a 4 °C en viales ámbar.

### **3.9 Resonancia magnética nuclear**

Las fracciones activas se disolvieron en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) o algún otro disolvente deuterado, dependiendo de su solubilidad y fueron analizadas en un espectrómetro de RMN de imanes permanentes Spinsolve 80 de Magritek (Danbury CT, EUA). Los espectros se adquirieron a 80 MHz, con un ángulo de pulso de 60°, un tiempo de adquisición de 0.4 s, tiempo de repetición de 1 s y 256 escaneos para el  $^1\text{H}$  y un tiempo de repetición de 7 s y 65 536 escaneos para el APT- $^{13}\text{C}$ . En función de los desplazamientos químicos observados en los espectros de  $^1\text{H}$  y APT- $^{13}\text{C}$ , se identificaron señales características de los grupos funcionales esperados.

### **3.10 Porcentaje de inhibición de extractos y fracciones activas sobre $\alpha$ -glucosidasa**

El porcentaje de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa se determinó según Yang *et al.* (2015) con ligeras modificaciones. Se preincubaron en un termomezclador 300  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -glucosidasa 0.031 U en buffer de fosfatos a pH 7.0 a 37 °C durante 10 min con 300  $\mu\text{L}$  de disolución de infusión, fracciones activas o acarbosa a diferentes concentraciones (Tabla 3.1). La mezcla se agitó a 300 rpm durante el primer minuto de preincubación. Posteriormente, se añadieron 600  $\mu\text{L}$  del sustrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido a una concentración de 5 mM en buffer de fosfatos a pH 7.0, manteniendo la reacción a 37 °C durante 20 min. La mezcla se agitó a 300 rpm durante 1 minuto al primer y decimo minuto de incubación. Finalmente, se detuvo la

reacción añadiendo 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 M y se midió la absorbancia a 405 nm, longitud de onda a la que absorbe el p-nitrofenol formado.

La infusión se evaluó de 2000 a 125  $\mu\text{g/mL}$ , considerando que contiene una proporción menor de metabolitos inhibidores. El porcentaje de inhibición se determinó con la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[ 1 - \frac{Abs_{fracción} - Abs_{blanco \text{ de muestra}}}{Abs_{control} - Abs_{blanco}} \right] * 100$$

Tabla 3.1. Disolventes para la disolución de las fracciones activas, la acarbosa y la infusión y concentraciones ensayadas espectrofotométricamente.

<b>Fracción / control</b>	<b>Disolvente para disolución</b>	<b>Concentración <math>\mu\text{g/mL}</math></b>
AcOEt 8	DMSO al 1%	1000, 500, 250, 125, 62.5
AcOEt 9	DMSO al 1%	1000, 500, 250, 125, 62.5
Acarbosa	Agua	1000, 500, 250, 125, 62.5
Infusión	Agua	2000, 1000, 500, 250, 125

Al *blanco de muestra* se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de solución buffer de fosfatos a pH 7.0 en lugar de la solución enzimática; al *control*, en lugar de la muestra, se añadieron 300  $\mu\text{L}$  del disolvente apropiado sin fracción, extracto o control positivo; y al *blanco*, se añadieron tanto la solución buffer como el disolvente de la fracción, el extracto o el control positivo. Posteriormente, tanto para blancos como para el control se adicionaron los 600  $\mu\text{L}$  del sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y los 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , como se describe en el párrafo anterior. Las mediciones se realizaron por triplicado. El % de inhibición se presenta como la media  $\pm$  desviación estándar.

## 4. Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados y discusión del secado de las hojas de *Agave potatorum*, la extracción de metabolitos de las hojas secas de *A. potatorum*, los medios de elución seleccionados para la separación en CCF, la bioautografía y el perfil fitoquímico de los extractos y fracciones activas, el fraccionamiento por cromatografía en columna de extractos activos, los espectros de RMN de las fracciones activas y la acarbosa, y el porcentaje de inhibición de la infusión y fracciones activas determinado por espectrofotometría UV-visible. Se encontró en el perfil fitoquímico que metabolitos secundarios como terpenos, esteroides, glucósidos cardiotónicos, cumarinas y flavonoides son los responsables de inhibir a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

### 4.1 Secado de hojas de *A. potatorum*

Las tres muestras de hojas frescas de *A. potatorum*, lavadas, cortadas y secadas, alcanzaron una masa constante de  $397.09 \pm 17.46$  g ( $13.23 \pm 0.58\%$  del peso de hoja fresca) al término de 8 días (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Masa seca obtenida por muestra de hoja fresca de agave

Muestra	Hoja fresca (g)	Hoja seca (g)
A	3002.1	378.5
B	3001.7	413.1
C	3001.3	399.7

En la Figura 4.1 se observa la masa de cada muestra a los 0, 2, 6 y 8 días de secado. A partir del sexto día la tasa de pérdida de humedad no varió considerablemente, en comparación con los primeros días, alcanzando un peso constante al día 8. Posteriormente se cortaron las tiras transversalmente en secciones de 0.2-0.5 cm de largo, y se almacenaron en un empaque sellado hasta su uso (Siedel, 2012).

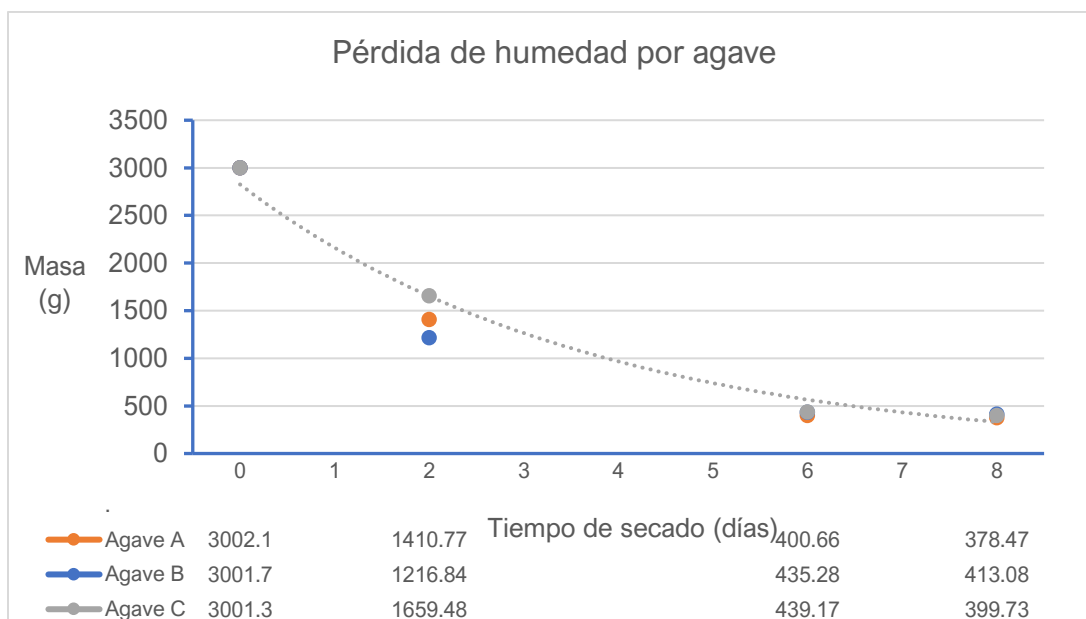


Figura 4.1. Pérdida de humedad por muestra de agave en función del tiempo

## 4.2 Extracción de metabolitos de hojas de *A. potatorum*

La masa de extracto crudo y el rendimiento de extracción se reporta en la Tabla 4.2 para cada uno de los disolventes empleados. El rendimiento de la extracción asistida por ultrasonido se calculó como  $rendimiento (\%) = \frac{w_i}{w_{agave}} \times 100$ , donde  $w_i$  corresponde a la masa de extracto obtenida con el disolvente  $i$  (Hex, DCM, AcOEt, MeOH y H<sub>2</sub>O), y  $w_{agave}$  es la masa de hoja seca de agave sometida a extracción (100 g).

Tabla 4.2. Masa de extractos en disolventes de polaridad ascendente obtenidos secuencialmente mediante extracción asistidas por ultrasonido.

Extracto	Masa (g)	Rendimiento (%)
Hex	1.063 ± 0.015	1.06 ± 0.02
DCM	0.887 ± 0.045	0.89 ± 0.05
AcOEt	0.330 ± 0.056	0.33 ± 0.06
MeOH	9.736 ± 0.884	9.74 ± 0.88
H <sub>2</sub> O	18.005 ± 1.869	18.00 ± 1.87
Infusión*	4.005 ± 0.704	24.50 ± 4.32

\* Se realizó a partir de hojas frescas, y el rendimiento fue corregido por el contenido de humedad.  
Hex: hexano, DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etilo, MeOH: metanol, H<sub>2</sub>O: agua.

El rendimiento de la extracción por infusión se calculó considerando el peso seco de la hoja de agave ( $13.23 \pm 0.58\%$  del peso de hoja fresca) y aplicando la fórmula anterior. La masa obtenida y el rendimiento se expresan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

En las extracciones asistidas por ultrasonido, el rendimiento obtenido con disolventes no polares y de baja polaridad (Hex, DCM y AcOEt) fue de 2.28%, mientras que con los extractos a partir de disolventes polares (MeOH y H<sub>2</sub>O) fue de 27.74%. El mayor rendimiento de los extractos en MeOH, H<sub>2</sub>O y por infusión indican que en las hojas secas de *A. potatorum* predominan metabolitos polares, ya que “lo similar disuelve a lo similar” y dichos disolventes son polares.

En la Tabla 4.2 se observa que la suma de los rendimientos de extracción asistida por ultrasonido es mayor al obtenido por infusión, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura, es decir, que se obtiene un mayor rendimiento en menor tiempo de extracción y volumen de disolvente para extracciones mediante ultrasonido (López-Salazar *et al.*, 2019). Cabe resaltar que se obtuvo un rendimiento mayor en la extracción asistida por ultrasonido respecto al rendimiento reportado por maceración de hojas de *A. potatorum* (Soto-Castro *et al.*, 2021). Esto se debe a que, a diferencia de la maceración, en la extracción asistida por ultrasonido el rompimiento celular incrementa la solubilidad de los metabolitos. Además, se realizaron tres extracciones sucesivas con cada disolvente, iniciando con el disolvente de menor polaridad.

### **4.3 Selección de la mezcla de elución**

Para determinar la mezcla de disolventes que mostrara una mejor separación entre las señales cromatográficas de los extractos se ensayaron distintas proporciones de disolventes. Inicialmente se ensayaron hexano-acetona 9:1 para los extractos en Hex y DCM, AcOEt-MeOH 8:2 y 5:5 para los extractos en AcOEt y MeOH, y MeOH-AcOEt 9:1 para los extractos en H<sub>2</sub>O y por infusión. Los extractos en MeOH, H<sub>2</sub>O e infusión no eluían totalmente en estos sistemas, se observaba la presencia de extracto en el

punto de aplicación en luz UV a 254 y 365 nm. Esto se corrigió aumentando la polaridad del sistema de elución. Se obtuvieron mayor número de señales cromatográficas en luz visible, luz UV de 254 y 365 nm (Figura 4.2) con los sistemas de elución mostrados en la Tabla 4.3. El sistema de elución del extracto en MeOH resultó también adecuado para eluir el extracto en AcOEt, y disminuir la señal en el punto de aplicación.

Tabla 4.3. Medios de elución utilizados por tipo de extracto

Tipo de extracto	Disolventes de elución	Proporción de mezcla
Hexano y Diclorometano	hexano-acetato de etilo	85:15
Acetato de etilo y Metanol	cloroformo-metanol-ácido acético	90:10:1
Agua e Infusión	acetato de etilo-agua-ácido acético	85:15:10

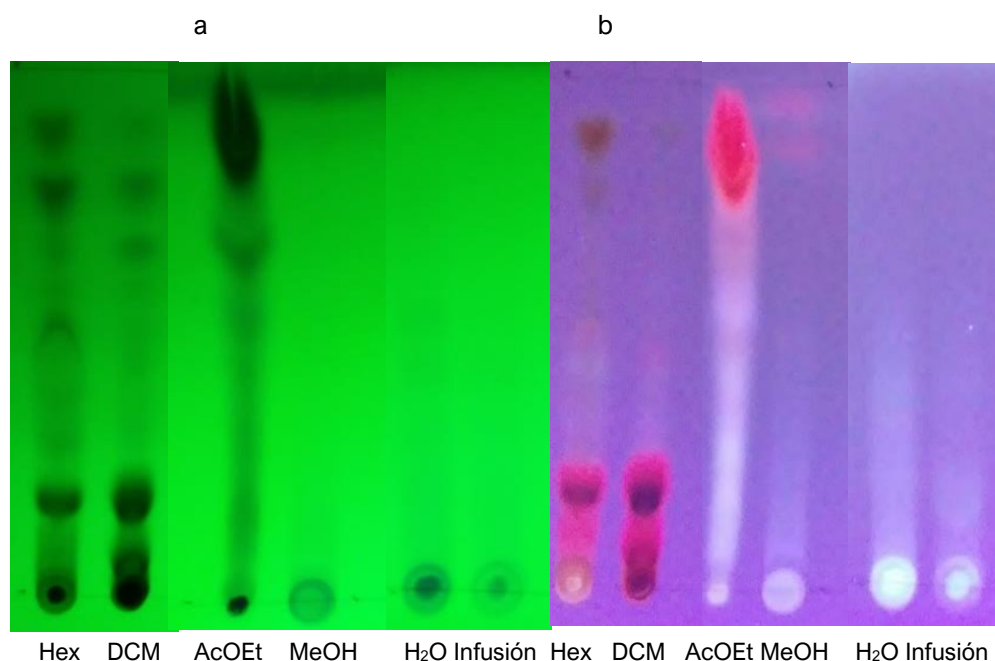


Figura 4.2. Extractos eluidos con los sistemas seleccionados (Tabla 4.3) bajo luz UV de a) 254 y b) 365 nm.

Los sistemas de elución seleccionados se utilizaron para la ejecución de la bioautografía y el perfil fitoquímico de extractos y fracciones activas sobre placas de

2.5 x 5.0 cm. Para identificar en los extractos la presencia de azúcares se utilizó el sistema de elución *n*-butanol-isopropanol-agua 10:5:4.

#### 4.4 Perfil fitoquímico de extractos crudos de *A. potatorum*

Los resultados de las pruebas fitoquímicas para los extractos crudos se resumen en la Tabla 4.4 y se encuentran en el Anexo 1a y 1b. En los extractos en Hex y DCM, los reactivos de Liebermann-Burchard, vainillina-ácido fosfórico y vainillina-ácido sulfúrico confirman la presencia de compuestos lipofílicos a lo largo de la placa, pudiendo ser estructuras de tipo terpeno, saponinas, esteroides o fenilpropanoides. Este tipo de compuestos se presentan en cantidad moderada a lo largo de la placa en el extracto en AcOEt (pruebas Liebermann-Burchard, vainillina-ácido fosfórico y vainillina ácido sulfúrico), sugiriendo que pudieran encontrarse en forma glicosilada (Wagner y Bladt, 2001).

Tabla 4.4. Familias de metabolitos secundarios identificados en el perfil fitoquímico en CCF de extractos crudos de *A. potatorum*.

Extracto	Triterpenos			Fenólicos					G. cardiotónicos		Azúcares
	LB	VAF	VAS	FBB	FeCl <sub>3</sub>	NP-PEG	KOH	CoCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *	CFA	A-D
Hex	+++	++	+++	++	+	-	++	-	+	+	-
DCM	+++	++	+++	++	+	-	++	-	+	-	-
AcOEt	++	++	++	+++	++	+++	+++	-	+++	+++	+
MeOH	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+++
H <sub>2</sub> O	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+++
Infusión	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+++

+: positivo débil, ++: positivo moderado, +++: positivo intenso, -: negativo

Pruebas: LB: Liebermann-Burchard, FBB: fast blue B, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico concentrado, VAF: vainillina-ácido fosfórico, FeCl<sub>3</sub>: cloruro de hierro III, CFA: cloramida-ácido trifluoroacético, VAS: vainillina-ácido sulfúrico, NP-PEG: natural products-PEG4000, CoCl<sub>2</sub>: cloruro de cobalto, KOH: hidróxido de potasio, A-D: anilina-difenilamina.

\* El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es un revelador universal no específico para cardiotónicos

Las pruebas de cloramida-ácido trifluoroacético y ácido sulfúrico concentrado confirman la existencia de compuestos terpénicos glicosilados en el extracto en AcOEt, ya que los glucósidos cardiotónicos constan de una parte esteroidal y otra



glicosilada. El extracto en MeOH dio negativo a estas pruebas, mientras que en el extracto acuoso ( $Rf = 0.13 - 0.32$ ) y por infusión ( $Rf = 0.13 - 0.32$ ) se observó una coloración azul fluorescente en la prueba Liebermann-Burchard, que por semejanza con el control positivo diosgenina, sugiere la presencia de un esteroide posiblemente glicosilado.

La prueba con KOH reveló la posible presencia de cumarinas (+) y antraquinonas (++) en la zona de  $Rf = 0.0 - 0.42$  para el extracto en Hex, y antraquinonas (++) y antronas (+) en la misma zona para el extracto en DCM. La prueba de cloruro de cobalto resultó negativa para cumarinas en todas las fracciones.

En el extracto en AcOEt las pruebas con Fast Blue B y cloruro de hierro III indican la presencia de compuestos fenólicos (+++) y taninos (++) , respectivamente. La prueba con NP-PEG reveló que puede tratarse de flavonoides con dos grupos OH adyacentes en el anillo B (++) por la coloración naranja (Wagner y Bladt, 2001) desde la parte media hasta el frente de elución (Figura 4.3). La prueba con KOH indica que antraquinonas también se encuentran presentes (+++) en la misma zona, pero en mayor proporción. La coloración azul fluorescente en la prueba con NP-PEG reveló cumarinas y ácidos fenolcarboxílicos (+++). Las cumarinas también revelaron a  $Rf = 0.0 - 0.37$  en color azul fluorescente en la prueba con KOH (+). Los extractos que contienen flavonoides generalmente también presentan cumarinas y ácidos fenolcarboxílicos (Wagner y Bladt, 2001). En el punto de aplicación del extracto en AcOEt se visualizan en amarillo (++) , en la prueba con NP-PEG, flavonoides con un grupo OH en el anillo B (Wagner y Bladt, 2001), flavonoides glicosilados o antronas y cumarinas glicosiladas.

Se detectaron con NP-PEG cumarinas glicosiladas en el punto de aplicación del extracto en MeOH en color amarillo, y cumarinas o ácidos fenolcarboxílicos en azul fluorescente en el punto de aplicación del extracto acuoso. En el extracto por infusión se encontraron cumarinas en el punto de aplicación con la prueba de KOH.



Figura 4.3. Pruebas fitoquímicas del extracto en AcOEt vistas bajo luz UV 365 nm, a) NP-PEG y b) KOH, eluidas en cloroformo-metanol-ácido acético (90:10:1)

Estos resultados concuerdan con reportes previos de actividad antidiabética de metabolitos secundarios presentes en hojas de *A. americana*. En ellos, se ha sugerido el potencial antidiabético de un flavonoide, un isoflavonoide y un ácido fenolcarboxílico aislados de las hojas de *A. americana*, al ser capaces de inhibir a la enzima  $\alpha$ -amilasa (Sahnoun *et al*, 2019; Sahnoun *et al*, 2018). Un estudio *in vitro* e *in silico* sobre 44 flavonoides, sugieren el potencial de estos metabolitos para reducir la hiperglicemia postprandial (Proença *et al*, 2017).

Asimismo, una revisión de los compuestos fenólicos y flavonoides encontrados en hojas, rizomas, flor o tallo de 12 especies de agave reporta familias de compuestos encontrados en el perfil fitoquímico a extractos de *A. potatorum* (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013).

Las pruebas fitoquímicas de  $H_2SO_4$  y CFA dieron positivo a glucósidos cardiotónicos a lo largo de placa en el extracto en AcOEt y en los puntos de aplicación de los extractos metanólico, acuoso y por infusión. En el extracto en Hex y DCM el resultado fue negativo para ambas pruebas. En la Figura 4.4 se observan los resultados de la prueba CFA comparados con el glucósido cardiotónico digoxina como control positivo.

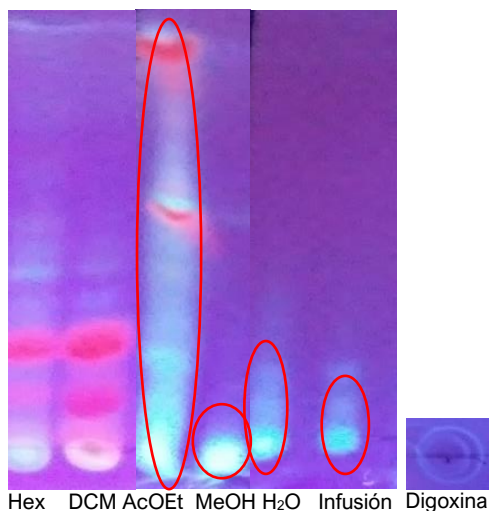


Figura 4.4. Prueba de cloramida-ácido trifluoroacético positiva a glucósidos cardiotónicos en los extractos en AcOEt, MeOH, H<sub>2</sub>O e infusión, vistas bajo luz UV 365 nm.

El resultado positivo en la digoxina se observa en un halo sobre el punto de aplicación, esto debido a la dispersión del compuesto al momento de la aplicación y a la menor cantidad de compuesto (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de digoxina contra 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de cada extracto).

Los extractos en Hex y DCM dieron negativo a azúcares libres en la prueba de anilina-difenilamina, en tanto que en el extracto en AcOEt se obtuvo un resultado débil en el frente de elución. En los extractos obtenidos con los disolventes más polares (MeOH, H<sub>2</sub>O e infusión) se confirma la presencia de azúcares libres con la prueba de anilina-difenilamina. Dada las coloraciones observadas en la aplicación de anilina es posible la presencia de D-fructosa, D-glucosa, manosa o fructanos de cadena corta, lo cual coincide con reportes previos. Por ejemplo, se ha reportado la presencia fructosa (81% en promedio respecto a los azúcares solubles en agua) en las hojas de *A. potatozum*, relacionado al metabolismo de fructanos (Soto-Castro *et al.*, 2021). También se ha encontrado la presencia de D-fructosa, D-glucosa y fructanos tipo inulina durante la síntesis de fructooligosacáridos en vacuolas del mesontle (tallo) de *A. tequilana* Weber variedad Azul (Mellado-Mojica, González de la Vara, y López, 2016). La presencia de esos azúcares en las hojas son

consecuencia del metabolismo de *A. potato* para el mantenimiento del balance hídrico y el estrés al frío (Soto-Castro *et al.*, 2021).

#### 4.5 Bioautografía-CCF sobre la $\alpha$ -glucosidasa de los extractos de hojas de *A. potato*

En la prueba bioautográfica se observó una zona de inhibición a un  $R_f = 0.6$  en el extracto en Hex, lo que sugiere que este extracto contiene metabolitos secundarios capaces de inhibir a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa (Figura 4.5). El extracto en AcOEt presentó tres zonas de inhibición, a  $R_f = 0.09\sim 0.34$ ,  $R_f = 0.38\sim 0.59$  y en el frente de elución, a  $R_f = 0.77\sim 0.98$ . La inhibición enzimática en el frente de elución del extracto en AcOEt quedó superpuesta con los metabolitos en esta zona; no obstante, la inhibición se confirmó en la bioautografía de esta fracción, posterior al fraccionamiento en columna. En el extracto en DCM no se observaron zonas de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

Para los extractos en Hex y AcOEt, la zona de inhibición posee baja intensidad a 50  $\mu\text{g}$ , y se incrementa a 100, 150 y 200  $\mu\text{g}$  de extracto, indicando un aumento proporcional de la intensidad de inhibición respecto a la cantidad de metabolitos inhibidores.

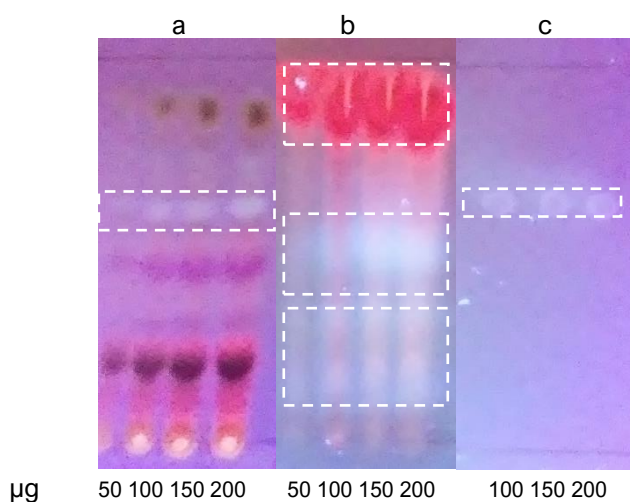


Figura 4.5. Actividad inhibitoria de los extractos de hojas de *A. potato* sobre  $\alpha$ -glucosidasa en placas de CCF bajo luz UV de 365 nm: a) extracto en Hex, b) extracto en AcOEt y c) acarbosa.

En los extractos en MeOH y H<sub>2</sub>O, así como en la infusión, no se observó inhibición evidente de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa a las cantidades ensayadas cuando las placas fueron eluidas en los sistemas de elución seleccionados (Tabla 4.3). La ausencia de zonas de inhibición en estos extractos se puede deber a que la cantidad relativa de los metabolitos no polares es baja, ya que como se discutió anteriormente, los metabolitos de polaridad baja-media (aquellos obtenidos de los extractos con Hex, DCM y AcOEt,) representan apenas el 2.3% en la hoja seca de *A. potatorum*. Aunado a lo anterior, la extracción de dichos metabolitos en agua no es favorecida, excepto por el calor.

Para evitar que los metabolitos inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa en los extractos en MeOH, H<sub>2</sub>O e infusión quedarán diluidos a lo largo de la placa y esto tuviera efecto en la visualización de la inhibición, se realizó una prueba de inhibición sobre los extractos sin eluir, de modo que la señal de inhibición de los metabolitos quedara concentrada en un solo punto. Del mismo modo, la acarbosa no se eluyó, debido a que Theiler *et al.* (2016) mencionan que Urbain y Simões-Pires recomiendan colocarla después del desarrollo la placa con el sistema de elución, para minimizar su dispersión. No se observó inhibición en los extractos MeOH y H<sub>2</sub>O. En la Figura 4.6 se observa que existe inhibición desde 50  $\mu$ g de extracto de infusión y que la intensidad de la zona de inhibición se incrementa en 150 y 200  $\mu$ g. Cabe mencionar que la visualización de las zonas de inhibición mejoró de manera notable bajo luz UV a 365 nm en contraste con la luz visible.

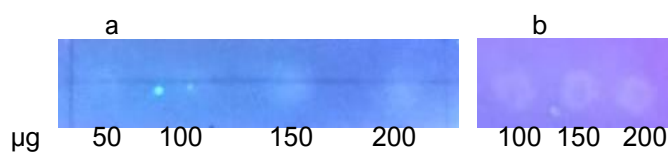


Figura 4.6. Actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -glucosidasa por a) extracto en infusión de hojas de *A. potatorum* y b) acarbosa, ambos sin eluir.

## 4.6 Fraccionamiento por cromatografía en columna de extractos activos

Las zonas de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa observadas en la bioautografía de los extractos en Hex y AcOEt se separaron por cromatografía en columna (9x2 cm). Para el extracto hexánico se utilizaron mezclas de hexano-acetato de etilo en polaridad ascendente, iniciando con hexano, seguido de una mezcla 95:5 y separando la fracción activa con 100 mL de mezcla 9:1 (Figura 4.7).

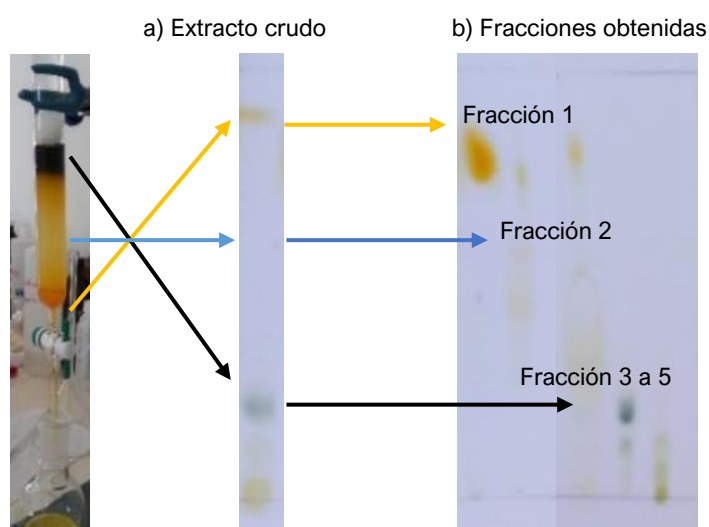


Figura 4.7. Comparación entre el perfil de elución del extracto crudo en Hex en CCF a) antes y b) después del fraccionamiento en columna

Se recuperaron 52.8 mg de la fracción 2, que de acuerdo con la CCF contenía mayoritariamente a los metabolitos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hexánico de hojas de *A. potatorum*

Mezcla y proporción de fase móvil	Volumen de fase móvil (mL)	Fracción	Peso (mg)
Hex	70		
Hex-AcOEt 95:5	140	1*	46.9
Hex-AcOEt 9:1	100	2	52.8
Hex-AcOEt 8:2	50	3	42.4
Hex-AcOEt 7:3	50	4	66.3
AcOEt	50	5	33.4

\*Para recuperar esta fracción se concentraron ambas fases móviles.

Independientemente, el extracto de acetato de etilo se fraccionó en una columna de 9.5 cm de altura, humedecida con hexano. Las zonas activas del extracto de acetato de etilo se recuperaron en las fracciones 1, 8 y 9, con masas de 53.3, 42.8 y 10.7 mg. La fracción 1 se eluyó con 50 mL de diclorometano, las fracciones 8 y 9 se recuperaron con 50 mL de diclorometano-metanol 7:3 y 50 mL de metanol, respectivamente (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto en acetato de etilo de hojas de *A. potatozum*

Mezcla y proporción de fase móvil	Volumen de fase móvil (mL)	Fracción	Peso (mg)
DCM	50	1	50.6
DCM-MeOH 99:1	50		
DCM-MeOH 98:2	50	2*	19.2
DCM-MeOH 98:2	50		
DCM-MeOH 97:3	50	3	68.5
DCM-MeOH 96:4	50	4	44.0
DCM-MeOH 96:4	50		
DCM-MeOH 92:8	50	5*	38.0
DCM-MeOH 9:1	50		
DCM-MeOH 88:12	50	6*	31.3
DCM-MeOH 8:2	50	7	39.0
DCM-MeOH 7:3	50	8	40.5
MeOH	50	9	59.6

\*Para recuperar estas fracciones se concentraron las fases móviles indicadas.

En la Figura 4.8 se observa el perfil de elución de las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica, comparadas con sus respectivos extractos crudos en Hex y AcOEt.

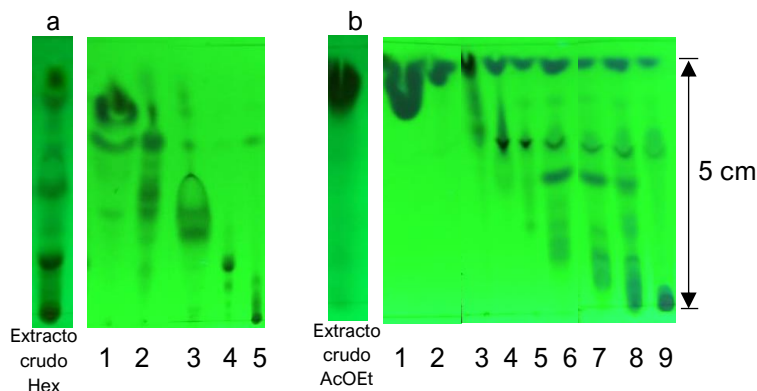


Figura 4.8. Elución de extractos crudos y sus fracciones en placas de CCF: a) hexano y b) AcOEt.

#### 4.7 Bioautografía de fracciones activas obtenidas por cromatografía en columna

Las fracciones de los extractos activos se sometieron a bioautografía. Se encontró inhibición a un  $Rf = 0.54$  para las fracciones 1 y 2 del extracto en Hex (Figura 4.9), tratándose del mismo tipo de metabolitos en ambas fracciones, pero presente en menor cantidad en la fracción 1. Las fracciones 1, 8 y 9 del extracto en AcOEt presentaron zonas de inhibición a  $Rf = 0.76 - 0.86$ ,  $Rf = 0.30 - 0.38$  y  $Rf = 0 - 0.06$ .

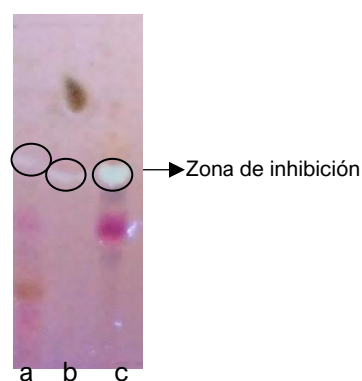


Figura 4.9. Actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -glucosidasa del extracto en Hex: a) extracto crudo, b) fracción 1 y c) fracción 2.

Se conservó la capacidad inhibitoria después del fraccionamiento por cromatografía de columna, lo que indica que la estructura de los metabolitos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa no fue modificada por la fase estacionaria de la columna o durante el proceso cromatográfico. Se observó una ligera disminución del  $Rf$  de las zonas de



inhibición entre los extractos crudos y sus fracciones; para el extracto en hexano de 0.60 a 0.54 en la fracción 2, y para el extracto en AcOEt a 0.0-0.06 en la fracción 9, a 0.30-0.38 en la fracción 8 y a 0.76-0.86 en la fracción 1. Se ha descrito que en la elución de los pigmentos de *Hibiscus*, los diglucósidos de delfinidina y cianidina migran a un *Rf* de 0.15-0.2, mientras que los compuestos de referencia eluyen a un *Rf* menor, de entre 0.05-0.1 (Wagner y Bladt, 2001). Esta variación en el *Rf* puede deberse a una menor cantidad de metabolitos tanto en la mezcla de referencia como en compuestos fraccionados.

#### 4.8 Perfil fitoquímico de fracciones activas

Para una mejor identificación de los metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa, se realizó el perfil fitoquímico de las fracciones activas eluidas en placas de CCF, utilizando la metodología descrita por Wagner y Bladt (2001). Los resultados para cada fracción se concentran en la Tabla 4.7 y se muestran en la figura 4.10 y en el Anexo 1c.

Tabla 4.7. Resumen del perfil fitoquímico sobre placas de CCF de zonas de inhibición de fracciones activas.

Fracción	Triterpenos			Fenólicos					Glucósidos cardiotónicos	
	LB	VAF	VAS	FBB	FeCl <sub>3</sub>	NP-PEG	KOH	CoCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CFA
<b>2 en Hex</b>	+++	-	+	-	-	-	-	-	+	+
<b>1 en AcOEt</b>	+++	++	+++	+	+	+	+	-	+++	+
<b>8 en AcOEt</b>	-	-	+	-	-	++	-	-	+	+
<b>9 en AcOEt</b>	-	-	-	++	+++	+++	++	-	+	++

LB: Liebermann-Burchard, VAF: vainillina-ácido fosfórico, VAS: vainillina-ácido sulfúrico, FBB: fast blue B, FeCl<sub>3</sub>: cloruro de hierro III, NP-PEG: natural products-PEG4000, KOH: hidróxido de potasio, CoCl<sub>2</sub>: cloruro de cobalto, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico concentrado, CFA: cloramida-ácido trifluoroacético.

Las pruebas LB y VAS (Figura 4.10, inciso a) sugieren que los metabolitos inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa en la fracción 2 del extracto en Hex corresponden a compuestos terpénicos, pudiendo ser de naturaleza triterpénica como saponinas o esteroides, o terpenos de cadena corta y fenilpropanoides (Wagner y Bladt, 2001).

Lo cual estaría acorde a reportes previos, ya que dentro de los metabolitos terpénicos inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa se han reportado en algunas plantas mexicanas triterpenos como limonoides y cucurbitacinas, diterpenos amarisólidos (Mata *et al.*, 2019), y sesquiterpenos, como la salvinina, pipitzoles A y B, caleína A y C, y perfoliatina (Escandón-Rivera, Mata, y Andrade-Cetto, 2020). Dada las características estructurales de los terpenos el tipo de inhibición podría ser competitiva por parte de monoterpenos y sesquiterpenos al interaccionar con el sitio activo. Para el caso de diterpenos y triterpenos el tipo de inhibición puede ser no competitiva o mixta por las interacciones hidrofóbicas y estéricas generadas entre los aminoácidos de la enzima y tales metabolitos secundarios. A pesar de que las pruebas para glucósidos cardiotónicos resultaron positivas, los resultados no fueron concluyentes debido a que la diosgenina, un esteroide, dio también una coloración azul fosforescente. Los glucósidos cardiotónicos están constituidos por una fracción esteroide, una lactona cíclica y una cadena glicosilada.

En la Figura 4.10, inciso b, se puede ver que la fracción 1 del crudo de AcOEt dio positiva a las pruebas para compuestos triterpénicos y glucósidos cardiotónicos, y también se puede asociar a cumarinas o antraquinonas debido a la coloración roja en la prueba con KOH y cumarinas por la prueba NP-PEG. La zona con actividad inhibitoria de las fracciones 8 y 9 del extracto en AcOEt dio positiva a las pruebas para glucósidos cardiotónicos (Figura 4.10, incisos c y d). Los compuestos fenólicos detectados por las pruebas  $\text{FeCl}_3$ , NP-PEG y KOH en las zonas de inhibición de la fracción 9 corresponden a cumarinas, taninos, ácidos fenolcarboxílicos, flavonoides y antraquinonas (Figura 4.10, inciso d). En la prueba de NP-PEG, el color azul brillante de la zona de inhibición de la fracción 8 indica que ácidos fenolcarboxílicos o cumarinas son los responsables de la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa. Los ácidos fenolcarboxílicos o cumarinas suelen encontrarse en extractos cuando se detectan flavonoides, ya que forman parte de la ruta biosintética de los mismos (Wagner y Bladt, 2001).

El color amarillo brillante en la zona activa de la fracción 9 sugiere actividad debida a flavonoides glicosilados, antranas o antranoles (Wagner y Bladt, 2001). Los flavonoides que revelan en una coloración amarillo brillante poseen un grupo OH en el anillo B (Wagner y Bladt, 2001), característica que permite a los flavonoides inhibir a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de modo competitivo, al conservarse la planaridad con respecto a los anillos A y C (Proença *et al.*, 2017), y por tanto ocupar el compartimento del sitio activo. Estos resultados concuerdan con reportes previos de actividad antidiabética de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *A. americana*, cuyo potencial antidiabético se atribuyó a un flavonoide, un isoflavonoide y un ácido fenolcarboxílico aislado de sus hojas, que fueron capaces de inhibir a la enzima  $\alpha$ -amilasa (Sahnoun *et al.*, 2019; Sahnoun *et al.*, 2018).

Los resultados de bioautografía en CCF muestran que las hojas de *A. potatorum* poseen metabolitos secundarios capaces de inhibir a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae*. Estos metabolitos podrían minimizar la hiperglicemia postprandial al obstaculizar la absorción de glucosa en el intestino, el cual es uno de los mecanismos de acción antidiabética. Además de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, los metabolitos secundarios de distintas plantas pueden actuar como reguladores de insulina (sea reduciendo la resistencia a la insulina, mejorando la sensibilidad a la insulina o actuando como compuestos tipo insulina), regulando el funcionamiento de las células  $\beta$  (aumentando su número y proliferación, regenerándolas, incrementando su tamaño, reduciendo su apoptosis) o regulando la homeostasis del péptido-1 tipo glucagón GLP-1 (inhibiendo a la dipeptidil peptidasa-4 o aumentando los niveles de GLP-1) (Sonkamble, Wagh, y Pai, 2019).

El perfil fitoquímico de los extractos y fracciones activas de las hojas de *A. potatorum* indicó la presencia de fenilpropanoides y flavonoides. En estudios previos sobre plantas mexicanas se ha reportado que los fenilpropanoides, ácido p-coumárico y ácido cafeico pueden incrementar los niveles de insulina, mientras que los flavonoides como eupatilina, cinchonáina y jaceosidina aumentan la secreción de

insulina, y el flavonol kaempferol restablece la masa de células  $\beta$  (Escandón-Rivera *et al.*, 2020).

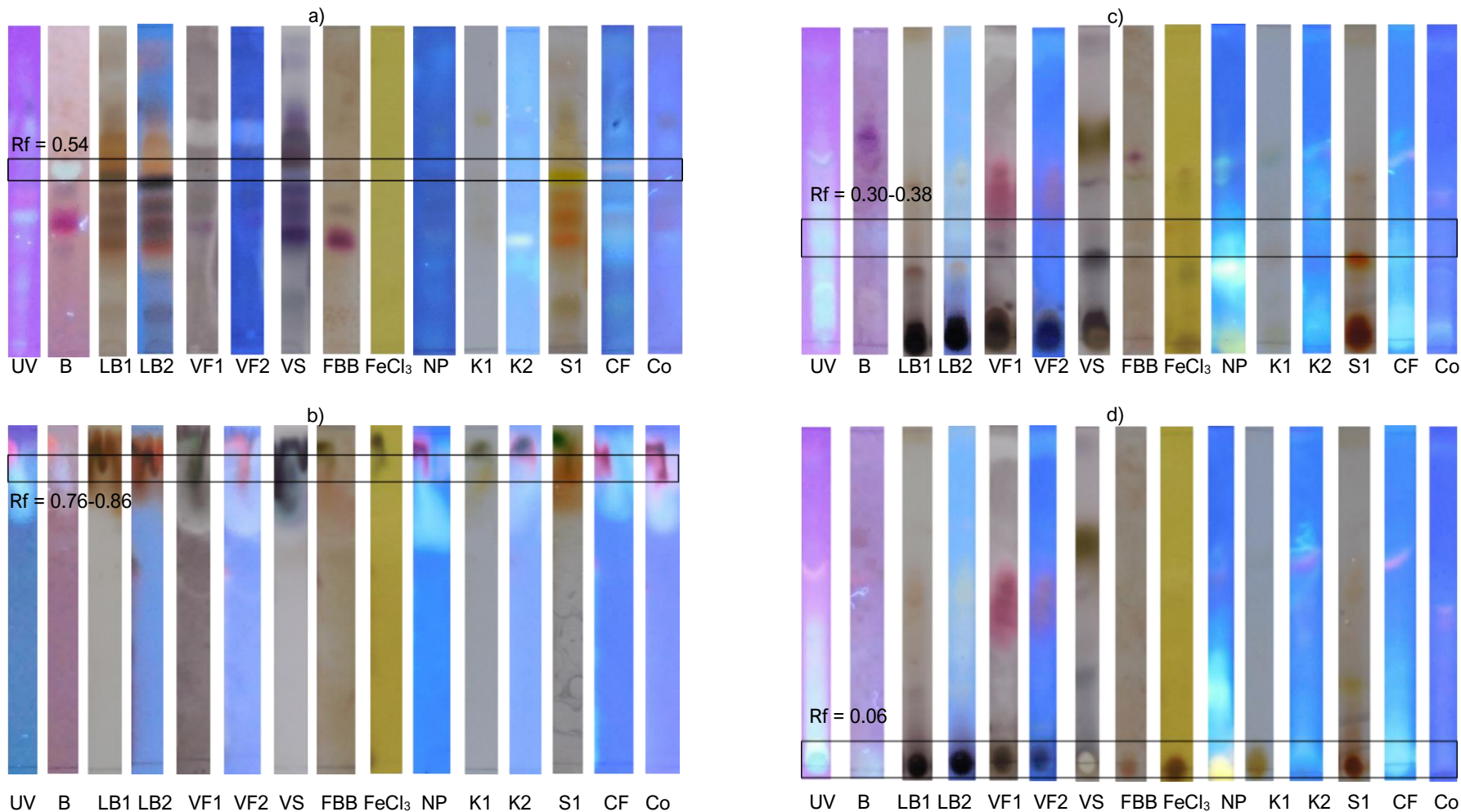


Figura 4.10. Comparación entre placas de CCF de fracciones activas eluidas, con bioautografía y con pruebas fitoquímicas: a) fracción 2 del extracto en Hex; del extracto en AcOEt; b) fracción 1, c) fracción 8, y d) fracción 9. Las zonas de inhibición se indican en un recuadro negro. Visualizaciones bajo luz UV 365 nm: UV: fracción eluída, B: Bioautografía, LB2: Liebermann-Burchard, VF2: vainillina-ácido fosfórico, NP: productos naturales, K2: hidróxido de potasio, CF: cloramida-ácido trifluoroacético y Co: Cloruro de cobalto. Visualizaciones bajo luz visible: LB1: Liebermann-Burchard, VF1: vainillina-ácido fosfórico, VS: Vainillina-ácido sulfúrico, FBB: Fast Blue B, FeCl<sub>3</sub>: cloruro de hierro, K1: hidróxido de potasio, S1: ácido sulfúrico.

## 4.9 Identificación de señales características en RMN de los componentes de las fracciones activas

La funcionalidad de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones activas se determinó mediante los espectros de  $^1\text{H}$  y APT- $^{13}\text{C}$  de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los disolventes utilizados para adquirir el espectro de RMN de las fracciones con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa se indican en la Tabla 4.8. La cantidad disponible de las fracciones 8 y 9 del extracto en AcOEt no permitieron obtener un espectro de APT- $^{13}\text{C}$  confiable para estas fracciones.

Tabla 4.8. Disolventes deuterados para la adquisición de espectros  $^1\text{H}$  y APT- $^{13}\text{C}$  de fracciones con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa.

Fracción activa o control	Disolvente
Acarbosa	$\text{D}_2\text{O}$
2 en Hex	$\text{CDCl}_3$
1 en AcOEt	$\text{CDCl}_3$
8 en AcOEt	$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (Acetona- $\text{D}_6$ )
9 en AcOEt	MeOD, $\text{CDCl}_3$

### 4.9.1 Acarbosa

Con la finalidad de corroborar que el compuesto activo extraído de pastillas comerciales de “Acarbosa” corresponde a la acarbosa, el extracto concentrado se caracterizó por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . En el espectro de APT- $^{13}\text{C}$  de la acarbosa (Figura 4.11), el grupo metilo (carbono 28) de la unidad de quinovosa se encuentra a 17.5 ppm, el carbono del ciclitol (hidroximetilcondurol) unido al nitrógeno (carbono 25) se observa a 56.1 ppm, el grupo metileno de la unidad de ciclitol (carbono 41) se encuentra a 60.7-61.7 ppm. Los grupos CH se encuentran desplazados en la zona de 64.9 a 77.4 ppm; los carbonos enlazados al oxígeno del anillo piranosido y a un grupo OH (carbonos 6, 8 y 14) se observan a 92.0 y 95.9 ppm, mientras que los carbonos anoméricos (12 y 22) están desplazados a 100.1 ppm. Un enlace característico de la molécula de acarbosa es el doble enlace de la unidad de ciclitol (carbonos 33 y 34); el carbono vinílico (33) se observa a 123.5 ppm y el carbono cuaternario (34) a 139.3 ppm. En el espectro de  $^1\text{H}$  de acarbosa (Anexo 2a) se

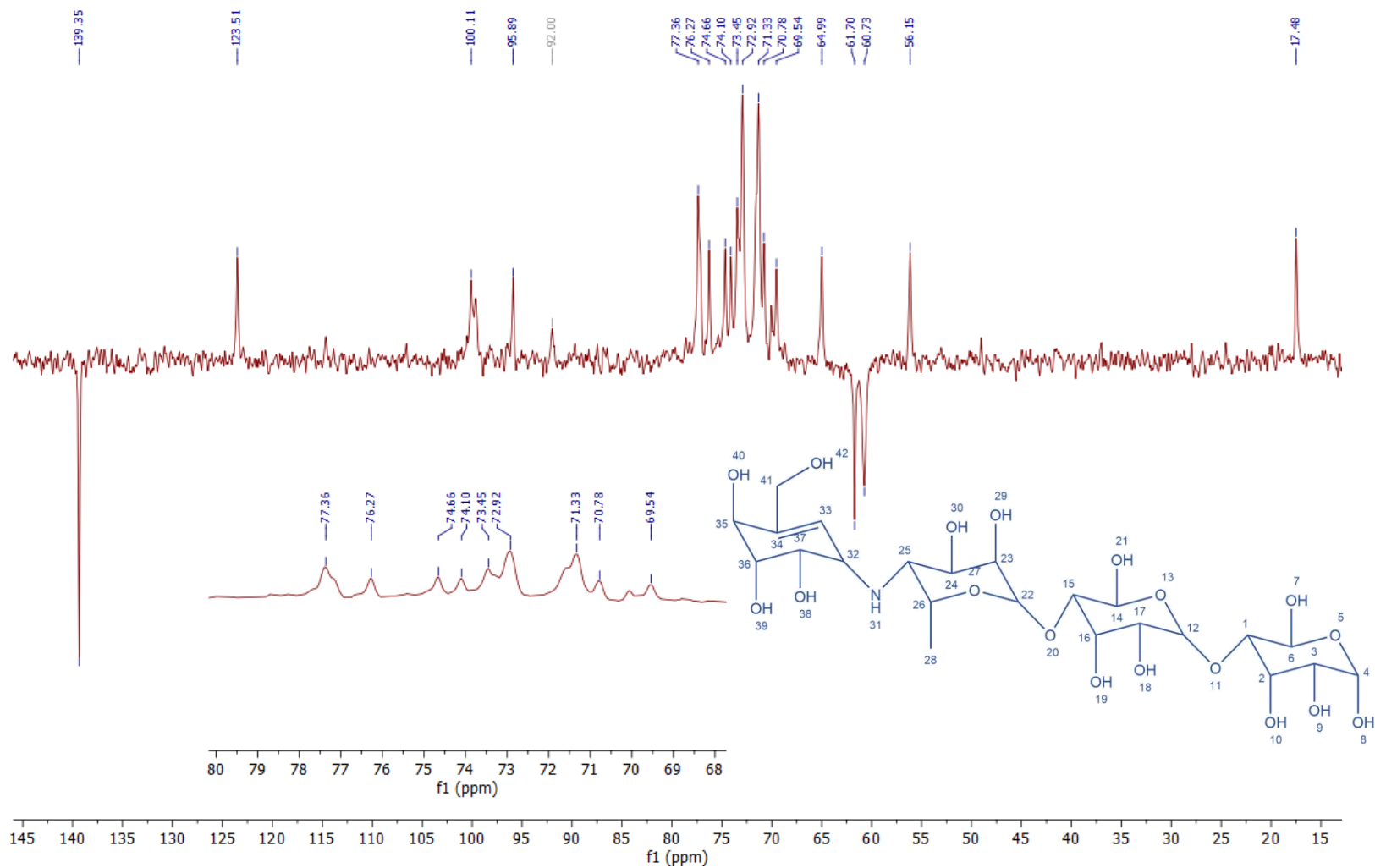


Figura 4.11. Espectro de RMN APT-<sup>13</sup>C de la acarbose. Se muestra la molécula de acarbose con los átomos distintos al hidrógeno numerados.

observa el grupo metilo (hidrógenos unidos al carbono 28) de la unidad de quinovosa en la región 1.32-1.40 ppm, mientras que los hidrógenos de los anillos quinovosa (átomo 25) y piranósido (unidos al átomo 1 y 15) se desplazan a 2.55 ppm, y 3.35 y 3.38, respectivamente. El grupo metileno (unido al átomo 41) de la unidad de ciclitol se encuentra desplazado a 4.18 ppm, debido a su vecindad con un doble enlace y un grupo alcohol. Los hidrógenos unidos a un grupo OH, por su parte, se desplazan a mayores partes por millón, entre 3.48 y 4.71 ppm, por ejemplo, los unidos a los átomos 7, 8, 21 y 39. Los hidrógenos unidos a un carbono anomérico aparecen a 5.22 y 5.32 ppm (átomos 12 y 22), mientras que los hidrógenos unidos al oxígeno del anillo piranósido y a un grupo OH (átomos 4, 6 y 14) se desplazan a 5.44-5.91 ppm. El hidrogeno vinílico se visualiza a 5.39 ppm (unido al átomo 33). La señal del disolvente aparece a 4.77 ppm. Con base en la asignación de las señales se confirma que la acarbosa, obtenida de pastillas comerciales, mantiene su integridad estructural tras el proceso de extracción y es válida para su uso como compuesto de referencia en los análisis de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa.

#### **4.9.2 Fracción 2 del extracto en hexano**

Las pruebas de perfil fitoquímico de la fracción 2 del extracto en hexano dieron positivo para compuestos fenólicos, compuestos terpénicos y esteroides (Figura 4.10). La presencia de tales metabolitos se puede corroborar en los espectros de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) considerando estructuras tipo a modo de ejemplo. Para la identificación de señales características de terpenos (lineales o esteroidales) se usaron las estructuras de la figura 4.12, donde puede apreciarse mayoritariamente la presencia de carbonos con hibridación  $\text{sp}^3$  ( $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ ), la presencia de carbonos con hibridación  $\text{sp}^2$ , así como grupos carbonilo. En el espectro de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  para la fracción 2 del extracto en Hex (Figura 4.12) se observan señales asociables a hidrógenos de metilo en la zona de 0.81 a 0.96 ppm (por ejemplo, los átomos 23 y 24 de los esteroides en la Figura 4.12). Las señales de la zona de 1.24 a 1.84 ppm pueden asignarse a grupos metilo vecinos a un doble enlace o a grupos metileno (por ejemplo, átomos 25 al 31 de un terpeno lineal, Figura 4.12), mientras que la región de 1.99 a 2.31 ppm se asocia con hidrógenos alílicos (hidrógenos en las



posiciones 4, 5, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 20 y 21 del triterpeno lineal, y 11 y 15 del esteroide). Así mismo, los hidrógenos vinílicos ( $sp^2$ ) se observan en la región de 5.12 a 5.41 ppm (los hidrógenos de las posiciones 3, 7, 14, 18, y 22 para el triterpeno lineal, y 12 para el esteroide). Por último, en la zona de 7.49 a 7.70 ppm se aprecian señales originadas por la presencia de anillos aromáticos (fenólicos).

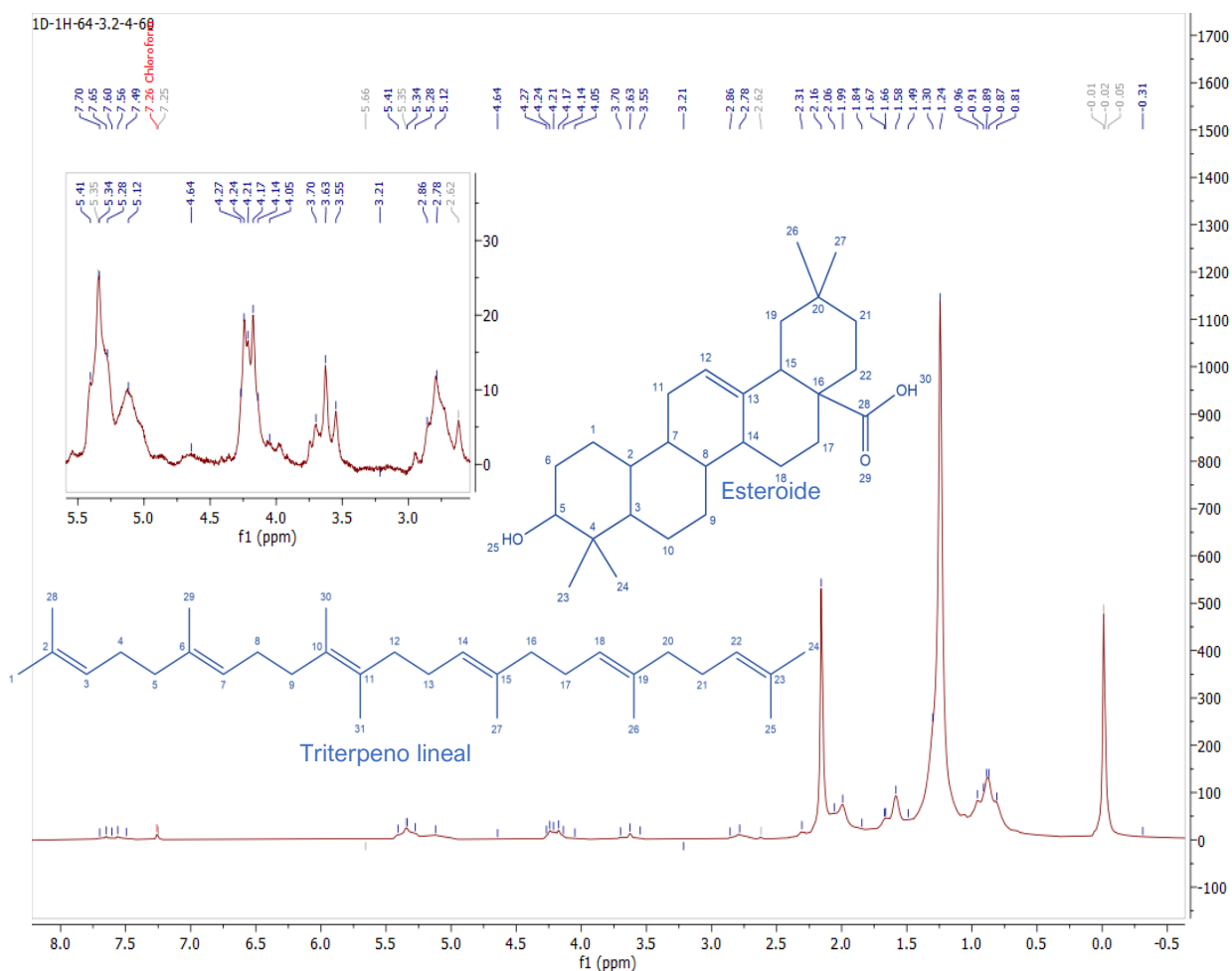


Figura 4.12. Espectro de RMN de  $^1H$  de la fracción 2 del extracto en hexano y estructuras tipo terpénica lineal y esteroide

En el espectro de APT- $^{13}C$  (Figura 4.13) de la fracción 2 del extracto en hexano se confirma la presencia de carbonos con hibridación  $sp^3$  en la zona por debajo de 70 ppm, además se diferencian los metilenos ( $CH_2$ ) de los metinos ( $CH$ ) y metilos ( $CH_3$ ), ya que los primeros dan señales negativas (carbonos 4, 5, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 20 y 21 del triterpeno lineal, y 1, 6, 10, 9, 11, 17, 18, 19, 21 y 22 del esteroide), mientras

que los otros dos grupos dan señales positivas. Las señales de los carbonos con hibridación  $sp^2$  se aprecian claramente en la zona de 124.4-135.0 ppm y a 173.4 ppm se observa la presencia de un grupo carbonilo, el cual puede ser un grupo funcional en un compuesto fenólico o un esteroide.

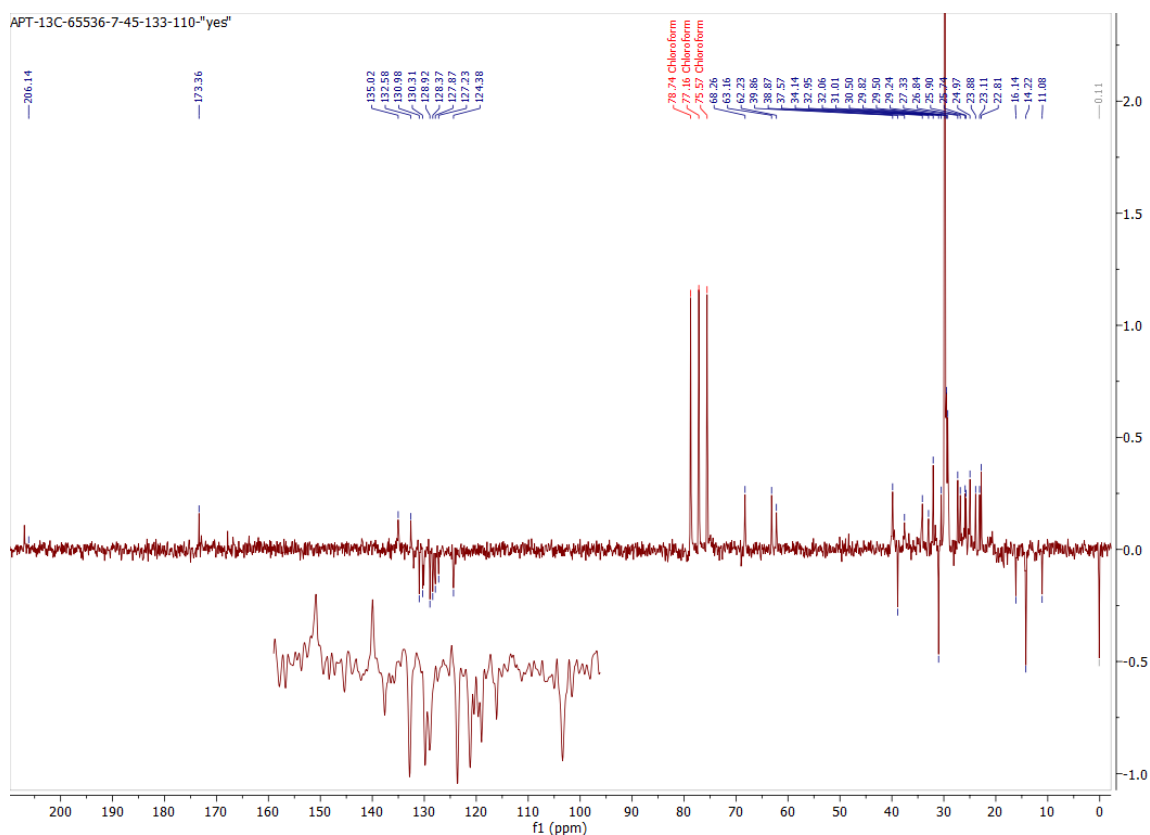


Figura 4.13. Espectro de RMN APT- $^{13}C$  de la fracción 2 del extracto en hexano.

#### 4.9.3 Fracción 1 del extracto en AcOEt

La presencia de cumarinas y glucósidos cardiotónicos en la fracción 1 en AcOEt fue positiva de acuerdo con las pruebas fitoquímicas. Para el análisis de los espectros de RMN se consideraron las estructuras de una cumarina y un glucósido cardiotónico (Figura 4.14).

El espectro de  $^1H$  de la fracción 1 en AcOEt (Figura 4.14) muestra zonas claramente diferenciables. Las señales de 0.63 a 2.25 ppm son atribuibles a grupos metilo,

metileno y metino en la estructura esteroidal del cardiotónico glicosilado. Las señales en la región de 4.00 a 4.31 ppm corresponden a hidrógenos unidos al carbono anomérico de la fracción glicosilada del cardiotónico, indicados con los números 24, 31 y 38. Los enlaces vinílicos de la parte esteroidal se observan en la zona de 5.12 a 5.40 ppm. Mientras que en la región de 7.32 a 7.81 ppm se observan señales que corresponden a la estructura altamente conjugada de una cumarina.

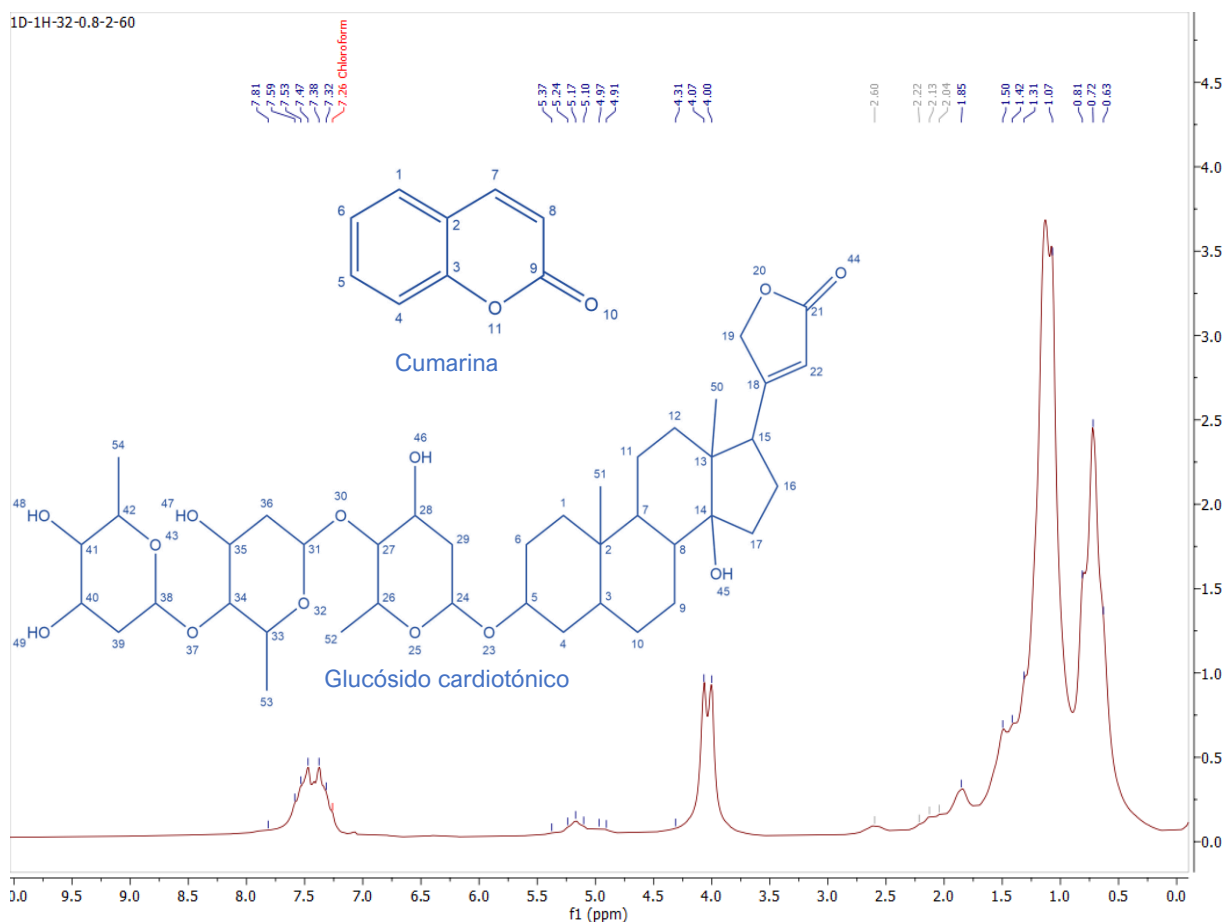


Figura 4.14. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la fracción 1 del extracto en AcOEt y estructuras tipo cumarina y glucósido cardiotónico.

En el espectro APT- $^{13}\text{C}$  de la fracción 1 del extracto en AcOEt (Figura 4.15) los carbonos con hibridación  $\text{sp}^3$  se aprecian por debajo de 70 ppm, las señales más desplazadas se asocian a carbonos que se encuentran desprotegidos por átomos de oxígeno vecinos (por ejemplo, los carbonos 28, 35, 40 y 41). Los carbonos  $\text{sp}^2$ , así como los anoméricos de la región glicosilada (24, 31, 38) son visibles en la región

de 100 a 145 ppm, mientras que la presencia de carbonilos se constata por las señales en la región de 167.8 a 176.3 ppm.

Tanto en el espectro de  $^1\text{H}$ , como en el de  $^{13}\text{C}$  se observan las señales esperadas para estructuras tipo cumarinas como de glucósidos cardiotónicos, corroborando la información obtenida en las pruebas fitoquímicas para la fracción 1.

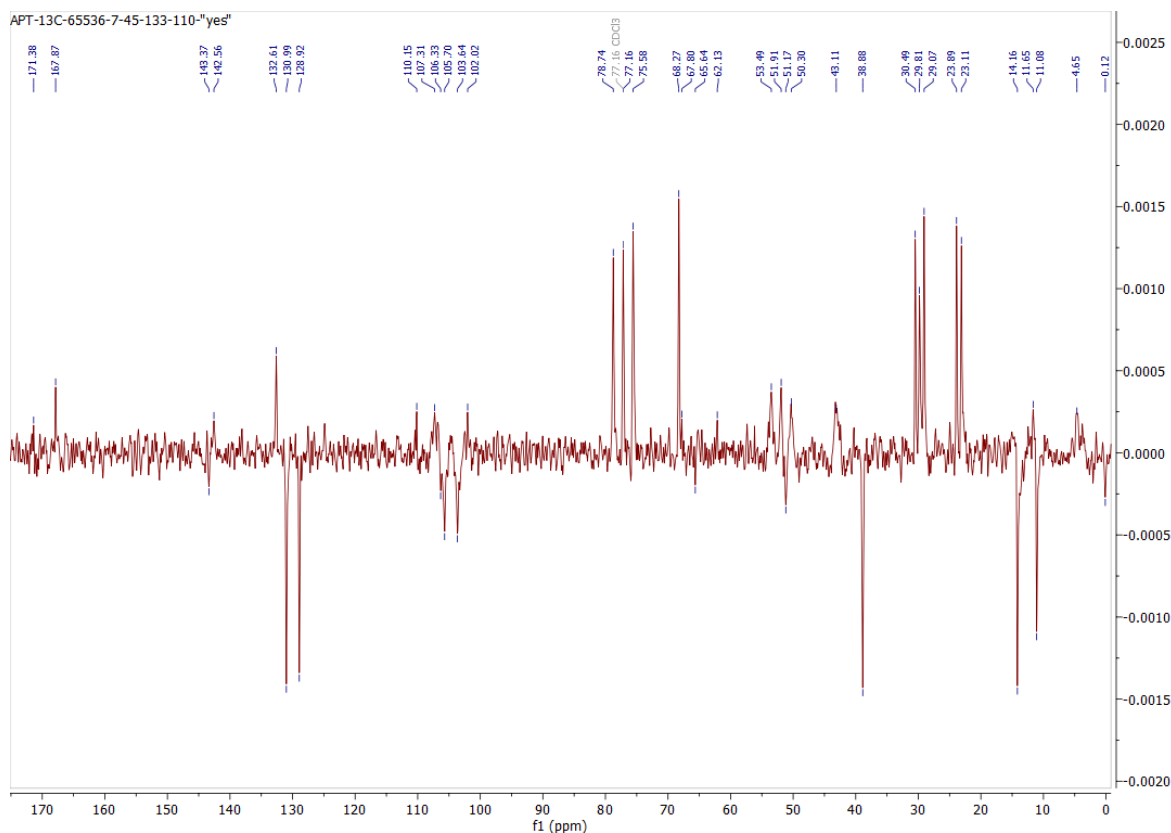


Figura 4.15. Espectro de RMN APT- $^{13}\text{C}$  de la fracción 1 en AcOEt

#### 4.9.4 Fracciones 8 y 9 del extracto en AcOEt

Las pruebas fitoquímicas, para la fracción 8 del extracto en AcOEt, dieron positivo a terpenos, cumarinas glicosiladas, esteroides y glucósidos cardiotónicos, con resultado débil para fenólicos y flavonoides. El espectro  $^1\text{H}$  (Figura 4.16) muestra las señales esperadas de un esteroide y una cumarina, los cuales podrían encontrarse en forma glicosilada, ya que se observan señales a 3.55 y de 4.18 a 4.32 ppm, zonas en las que se observan los desplazamientos de hidrógenos unidos a carbonos con

un grupo OH y los hidrógenos unidos a carbonos anoméricos, además de señales para hidrógenos alifáticos (0.82-1.52 ppm), hidrógenos alílicos desplazados a 2.24 y 2.33 ppm, y la señal a 5.17 ppm corresponde al átomo de hidrogeno del doble enlace de la estructura esteroideal (carbono 12 de la estructura en la Figura 4.16). Finalmente, las señales en la región de 7.57 a 7.83 ppm indican la presencia de una estructura aromática como la cumarina. Debido a que la cantidad de muestra de esta fracción fue muy baja, no fue posible adquirir un espectro de  $^{13}\text{C}$  para corroborar la presencia de grupos carbonilo que permitiera validar la presencia de lactonas.

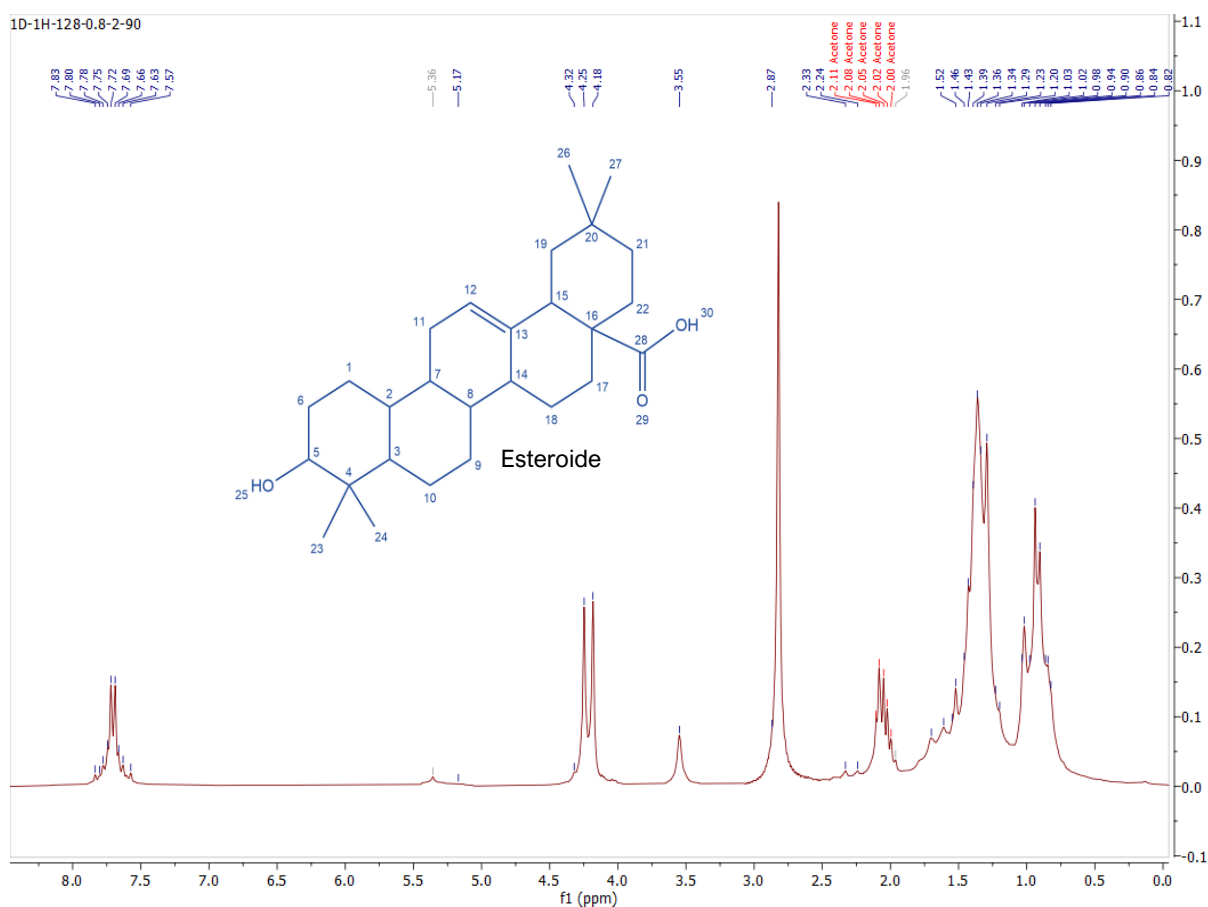


Figura 4.16. Espectro de  $^1\text{H}$  en RMN de la fracción 8 del extracto en AcOEt

La fracción 9 del extracto en AcOEt se disolvió parcialmente en los disolventes deuterados disponibles dando lugar a un espectro poco definido por lo que no es posible confirmar la presencia de señales características asociadas a los metabolitos secundarios identificados en la fitoquímica (Anexo 2b).

#### 4.10 Porcentaje de inhibición del extracto por infusión sobre $\alpha$ -glucosidasa

Una vez determinada la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa mediante bioautografía, el porcentaje de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa, para la infusión y las fracciones activas 8 y 9 obtenidas del fraccionamiento del extracto en AcOEt, se obtuvo mediante la lectura de absorbancia por espectrofotometría UV-visible del *p*-nitrofenol, formado a partir de la degradación enzimática del *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido. La fracción 2 del extracto en hexano y la fracción 1 del extracto en AcOEt, que mostraron actividad en la prueba bioautográfica, no se lograron disolver en una disolución de DMSO hasta del 2%, cantidad a la cual el DMSO no interfiere significativamente con la actividad enzimática (Lankatillake *et al.*, 2021) por lo que no pudieron ser analizadas. A la par se determinó la curva de inhibición de la acarbosa.

Los resultados del porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa para las fracciones 8 y 9 (F8 y F9) del extracto en AcOEt, la infusión y la acarbosa se encuentran en la Tabla 4.9. Para la acarbosa el valor de  $IC_{50}$  se encuentra fuera del rango de concentraciones evaluadas, con un porcentaje de inhibición del 34.8% a 1000  $\mu$ g/mL. Lo anterior coincide con la literatura, ya que en estudios previos se ha reportado un  $IC_{50}$  de 2400  $\mu$ g/mL para la acarbosa (Yang *et al.*, 2015), y el valor extrapolado en este trabajo es de 1550.7  $\mu$ g/mL.

Para la F8 del extracto en AcOEt se determinó un valor de  $IC_{50}$  de 624  $\mu$ g/mL y una inhibición de 78.1% a 1000  $\mu$ g/mL ( $R^2 = 0.96$ ), mostrando una actividad de inhibición de más del doble que la acarbosa a la misma concentración, ensayado bajo las mismas condiciones a una concentración de 1000  $\mu$ g/mL (Figura 4.12). Además, se observa que la F8 del extracto en AcOEt inhibe a la enzima de manera directamente proporcional a la concentración. Considerando que perfil fitoquímico indica la presencia de flavonoides en la F8, que en términos generales se ha reportado que son capaces de inhibir la  $\alpha$ -glucosidasa de forma competitiva, no competitiva o mixta

(Proença *et al.*, 2017), se puede sugerir que el mecanismo de inhibición de F8 sea competitivo, ya que cuando la concentración de los metabolitos inhibidores en disolución disminuye y dejan de competir por el sitio activo, una cantidad adicional del *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido se convierte en *p*-nitrofenol.

Tabla 4.9. Porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa por las fracciones 8 y 9 del AcOEt, infusión y acarbosa.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inhibición (%)			
	Fracción 8	Fracción 9	Infusión	Acarbosa
2000	-	-	11.5 $\pm$ 0.5	-
1000	78.1 $\pm$ 8.1	-26.1 $\pm$ 7.6	59.1 $\pm$ 0.7	36.2 $\pm$ 1.5
500	35.1 $\pm$ 0.2	-31.4 $\pm$ 6.0	59.7 $\pm$ 6.1	19.0 $\pm$ 0.9
250	23.8 $\pm$ 5.3	-22.4 $\pm$ 1.2	58.2 $\pm$ 8.5	15.3 $\pm$ 4.1
125	15.7 $\pm$ 1.4	1.9 $\pm$ 2.8	69.2 $\pm$ 3.5	8.6 $\pm$ 1.4
62.5	24.7 $\pm$ 5.1	36.4 $\pm$ 4.0	-	13.0 $\pm$ 1.4

La determinación del % de inhibición de la infusión se inició a una concentración de 2000  $\mu\text{g/mL}$ , dado que no se sometió a ningún proceso de purificación.

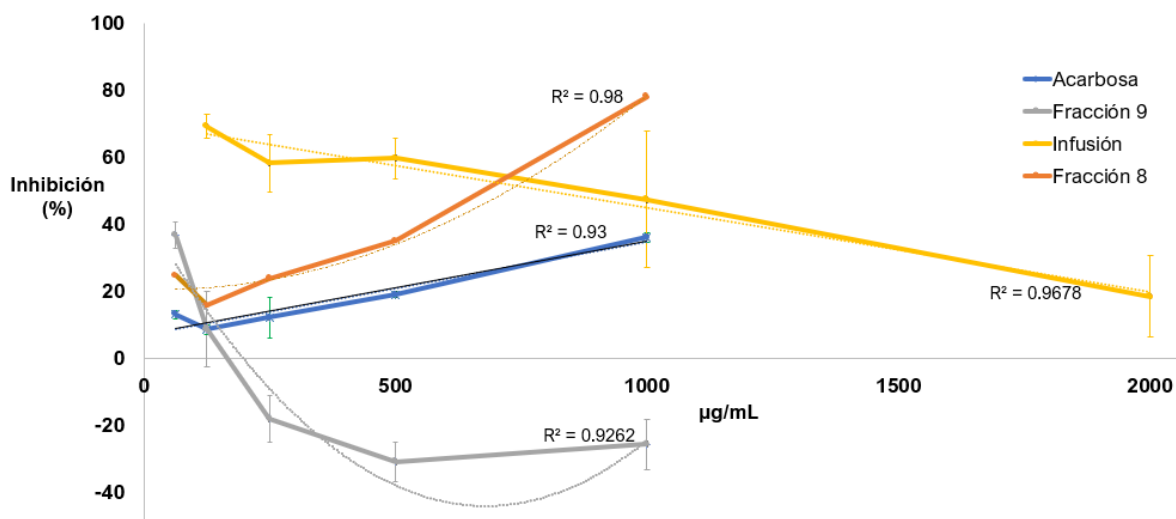


Figura 4.17. Comparación grafica del porcentaje de inhibición de fracciones 8 y 9 del extracto en AcOEt, extracto por infusión y acarbosa.

En la fracción F9 del extracto en AcOEt y la infusión se observó una relación inversa respecto a la concentración del extracto y su porcentaje de inhibición (Figura 4.17). En la determinación espectrofotométrica del porcentaje de inhibición para la F9 así como para la infusión se observó que, al aumentar la concentración de extracto o fracción, la absorbancia incrementaba por arriba de la absorbancia del control. Dado que en el control se aplicó la solución enzimática y el *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, sin extracto o fracción, la absorbancia máxima esperada entonces en la corrida corresponde a la absorbancia del control, donde la totalidad o la mayor parte del sustrato ha reaccionado para formar *p*-nitrofenol. Una absorbancia mayor a la del control indica por lo tanto la formación de otros compuestos que incrementan la absorbancia en el punto de lectura, distintos al *p*-nitrofenol. Para que esto suceda en la reacción enzimática de la  $\alpha$ -glucosidasa es necesaria la presencia de compuestos glicosilados en la F9 o la infusión, cuya fracción aglicona posea enlaces dobles conjugados que incrementen la absorbancia a 405 nm.

El comportamiento en la disminución del porcentaje de inhibición, para la F9 y la infusión, al incrementar la concentración puede deberse entonces, entre otros factores, a la presencia de metabolitos secundarios glicosilados cuya hidrólisis, enzimática o por las condiciones experimentales, genera metabolitos que incrementan la absorbancia a 405 nm (recordar que en la ecuación del porcentaje de inhibición al tener una absorbancia de muestra mayor, será menor el porcentaje de inhibición calculado). Lo anterior coincide con las pruebas fitoquímicas, que demostraron la presencia de cumarinas glicosiladas en el punto de aplicación de esta fracción, en tanto que en el espectro de RMN se encontraron anillos aromáticos, como los contenidos en las cumarinas, y la posible presencia de cadenas glicosiladas. No obstante, esta hipótesis tendrá que validarse a futuro.

Comparando los porcentajes de inhibición de la acarbosa con los de la infusión (Figura 4.17), y considerando el comportamiento inversamente proporcional del % de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa con la concentración de infusión, es necesaria una



concentración de solo 125 µg/mL para tener una inhibición del 67.3% de la enzima, mientras que la acarbosa a esa misma concentración, solo inhibe un 8.6%.

Aunque la tendencia de la infusión y F9 es opuesta a la de la acarbosa y la de F8, es claro que tanto en la infusión, como en F9 y F8 existen metabolitos secundarios capaces de inhibir a la  $\alpha$ -glucosidasa, los cuales podrían ser candidatos prometedores alternativos a la acarbosa.

## 5. Conclusiones

De acuerdo con los resultados de los ensayos de bioautografía-CCF, las hojas de *A. potatorum* poseen metabolitos secundarios con actividad inhibitoria sobre la  $\alpha$ -glucosidasa. De los 5 extractos obtenidos secuencialmente con polaridad ascendente, solo los extractos crudos en Hex y AcOEt mostraron actividad inhibitoria sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, con una relación directa entre dosis y actividad, a 50, 100, 150 y 200  $\mu$ g. El mismo comportamiento mostró la infusión.

El perfil fitoquímico de las zonas de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa exhibió que los metabolitos potencialmente responsables de la actividad inhibitoria de la enzima son compuestos terpénicos y esteroidales en la fracción activa del extracto en hexano; mientras que las fracciones activas del extracto en acetato de etilo podrían ser terpenos, esteroides, y compuestos de naturaleza fenólica, como flavonoides, cumarinas o glucósidos cardiotónicos. Los espectros de RMN permitieron identificar las señales características esperadas para ese tipo de compuestos.







El fraccionamiento en columna cromatográfica hizo posible la obtención de cuatro fracciones activas (F2 del extracto de hexano; F1, F8 y F9 del extracto en AcOEt). La evaluación de la actividad enzimática por espectrofotometría UV-visible de F8, F9, la infusión y la acarbosa, como control positivo, mostró la superioridad de F8 y la infusión respecto a la acarbosa. El porcentaje de inhibición para la infusión y para F9 resultó inversamente proporcional a la concentración, y con valores negativos para F9, por lo cual se hipotetiza sobre la existencia de metabolitos glicosilados que pueden estar siendo hidrolizados por la enzima y generando productos que incrementan la absorbancia a 405 nm, sin embargo, es necesario realizar ensayos que permitan elucidar el fenómeno en cuestión.

Estos resultados validan el uso etnomedicinal de la infusión de hojas de *A. potatorum* y se evidencia una fuente alternativa de metabolitos secundarios para tratar la diabetes mellitus tipo 2 al inhibir a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, lo que motiva a

continuar con la caracterización de metabolitos secundarios de *A. potarotum* para la generación de nuevos candidatos terapéuticos.

## Anexo 1. Perfil fitoquímico de extractos en Hex, DCM, AcOEt, MeOH, H<sub>2</sub>O e Infusión y fracciones activas de extractos en Hex y AcOEt

### Anexo 1a: Perfil fitoquímico ordenado por extractos y grupos de metabolitos

Extracto	Observaciones	LB	VAF	VAS
		Visible UV 365 nm	Visible UV 365 nm	Visible UV 365 nm
Hex	Coloraciones café, gris y verde se observaron en luz visible en la prueba de Liebermann-Burchard, con su correspondiente señal en UV. En las mismas zonas se detectaron triterpenos y esteroides con la prueba VAS. La zona de $R_f = 0.23 - 0.41$ [1], común en las tres pruebas, fue la de mayor intensidad en la prueba VAF. En la prueba VAS se hacen visibles terpenoides a lo largo de la placa.			
			[1]	
DCM	Las pruebas para triterpenos y esteroides fueron positivas en el $R_f = 0.00 - 0.36$ [1]. Por comparación con el extracto en Hex, en esta zona se observaron coloraciones semejantes, pero con mayor intensidad. Se obtuvieron señales positivas débiles en el frente de elución [2].			
			[2]	
			[1]	

Extracto

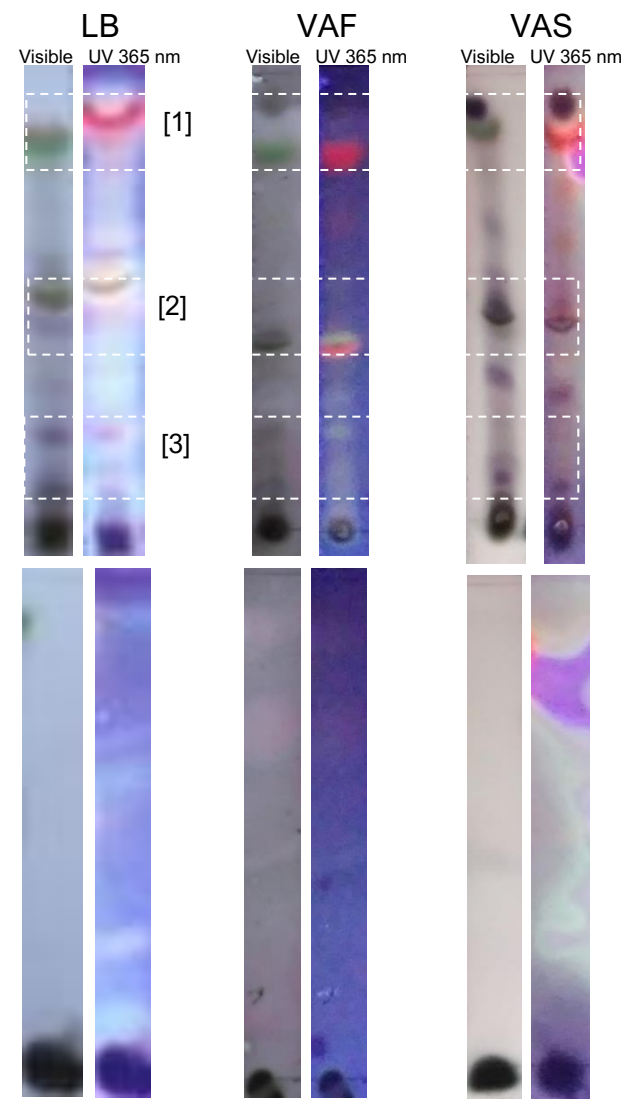
Observaciones

AcOEt

Se obtuvieron resultados positivos a las pruebas para terpenos y esteroides en el extracto en AcOEt en las zonas identificadas como [1, 2 y 3]. La intensidad de la señal es mayor en el frente de elución y disminuye hacia el punto de aplicación. Esto se debe a la baja polaridad de los terpenos y esteroides.

MeOH

Las pruebas para terpenos y esteroides dieron negativas en el extracto en MeOH, esto por el aumento en la polaridad del disolvente de extracción. No se observaron las coloraciones para este tipo de metabolitos en las pruebas LB, VAS y VAF.

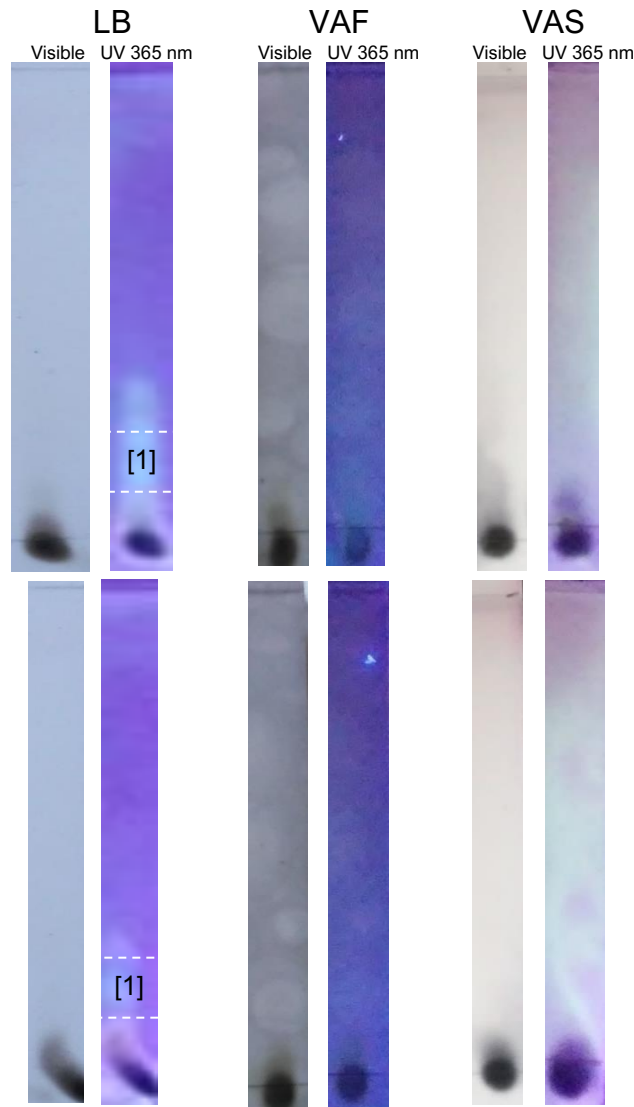


Extracto

Observaciones

H<sub>2</sub>O

El extracto acuoso dio negativo a triterpenos y esteroides en las pruebas LB, VAF y VAS. Se observó una zona de coloración azul fosforescente bajo luz UV a  $R_f = 0.12 - 0.32$  en la prueba de Liebermann-Burchard para el extracto acuoso [1]. El control positivo diosgenina (un esteroide) reveló con una coloración semejante, lo que pudiera indicar la presencia de glucósido cardiotónico, el cual contiene una fracción esteroide en su estructura.



Infusión

Las tres pruebas dieron negativas a terpenos y esteroides para el extracto por infusión. Se observa, bajo luz UV, una zona de coloración azul fosforescente a  $R_f = 0.22$  en la prueba de Liebermann-Burchard para el extracto por infusión [1], semejante al visto en el extracto acuoso. Esta coloración se obtuvo con el esteroide diosgenina utilizado como control positivo. Se trata posiblemente de un glucósido cardiotónico, el cual contiene una parte esteroidea en su estructura.

Extracto

Observaciones

Hex

Las pruebas para compuestos fenólicos revelaron metabolitos en la zona de  $R_f = 0.00 - 0.42$ . Las pruebas FBB y  $FeCl_3$  indican compuestos fenólicos y taninos. La prueba de NP-PEG indica la posibilidad de flavonoides (Wagner y Bladt, 2001). La prueba de KOH indica cumarinas en azul [1] y antraquinonas en rojo [2, 3].

FBB  
Visible



$FeCl_3$   
Visible



NP-PEG  
UV 365 nm



KOH  
Visible UV 365 nm



DCM

Se observa un perfil semejante al extracto en Hex en la zona de  $R_f = 0.00 - 0.42$ , pero con mayor intensidad. Los metabolitos corresponden a flavonoides (NP-PEG) y antraquinonas (KOH). No revelaron cumarinas y antraquinonas en KOH.



Extracto

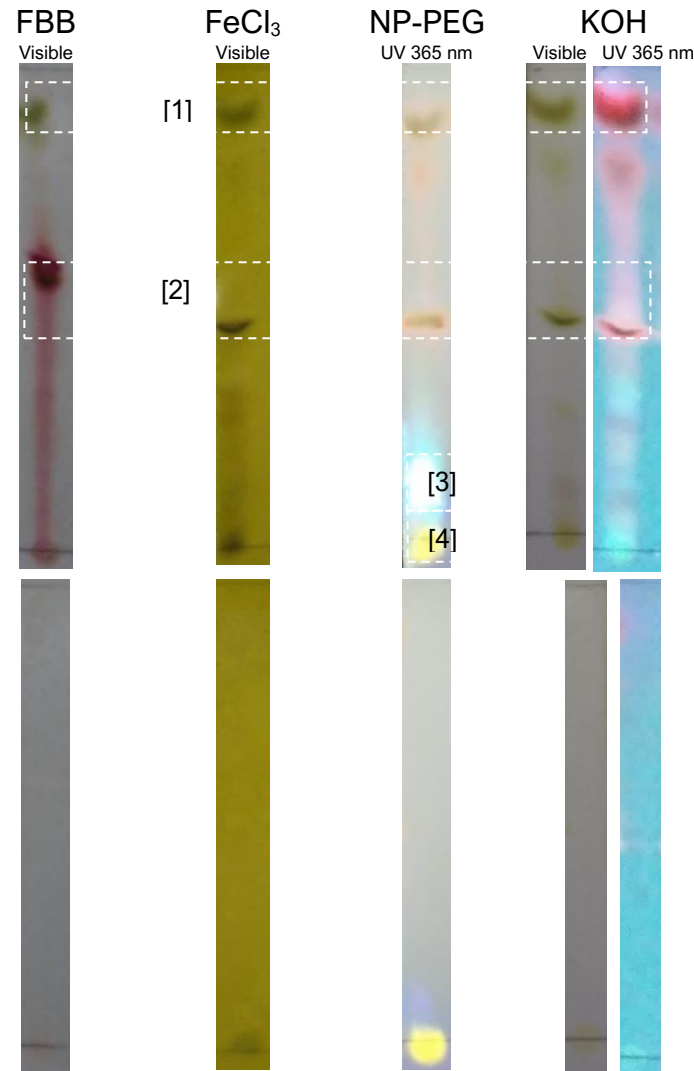
Observaciones

AcOEt

El frente de elución ( $R_f = 0.91$ ) y la zona media ( $R_f = 0.45$ ) [1, 2] resultaron positivos a metabolitos de tipo fenólico, de acuerdo con las pruebas de FBB y  $\text{FeCl}_3$ . La prueba NP-PEG revela que puede tratarse de flavonoides con dos grupos OH adyacentes en el anillo B por la coloración naranja (Wagner y Bladt, 2001), acompañados de antraquinonas (prueba con KOH). En la prueba NP-PEG, las cumarinas y ácidos fenolcarboxílicos presentan coloración azul fluorescente [3]; y los flavonoides con un grupo OH en el anillo B, flavonoides glicosilados, antranas y cumarinas glicosiladas se visualizan en amarillo fosforescente [4] (Wagner y Bladt, 2001) [3]. Las cumarinas también revelaron a  $R_f = 0.00 - 0.37$  en color azul fosforescente en la prueba con KOH.

MeOH

Los flavonoides con un grupo OH en el anillo B, flavonoides glicosilados, antranas y cumarinas glicosiladas se visualizan en amarillo fosforescente con el reactivo NP-PEG, por lo que podrían estar presentes en el punto de aplicación del extracto en MeOH. La prueba FBB resultó negativa, mientras que con  $\text{FeCl}_3$  y KOH se observó un resultado débil en el punto de aplicación, correspondiente a taninos y cumarinas.





Extracto

H<sub>2</sub>O

Observaciones

Se observó una presencia débil de cumarinas en el punto de aplicación en las pruebas con NP-PEG y KOH. Las pruebas FBB y FeCl<sub>3</sub> fueron negativas.

FBB  
Visible



FeCl<sub>3</sub>  
Visible



NP-PEG  
UV 365 nm



KOH  
Visible UV 365 nm



Infusión

El extracto por infusión dio positivo a cumarinas en el punto de aplicación con la prueba KOH, con un resultado débil.



Extracto

Observaciones

Hex

La prueba con ácido sulfúrico dio positiva (coloración café) en el frente de elución y a  $R_f = 0.00 - 0.46$ . Con la prueba de cloramida-ácido trifluoroacético, más específica a glucósidos cardiotónicos, se obtuvo un resultado débil a un  $R_f = 0.38$ . No se observó presencia de cumarinas ( $\text{CoCl}_2$ ) ni azúcares (anilina-difenilamina).

DCM

En la placa del extracto en Hex se observó resultado positivo a glucósidos cardiotónicos en el punto de aplicación; no se confirmó en la prueba CFA. Tampoco se detectaron cumarinas ni azúcares con las pruebas de  $\text{CoCl}_2$  y anilina-difenilamina.

$\text{H}_2\text{SO}_4$   
Visible



CFA  
UV 365 nm



$\text{CoCl}_2$   
UV 365 nm



Azúcares  
Visible



Extracto

Observaciones

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Visible

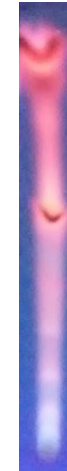
CFA  
UV 365 nm

CoCl<sub>2</sub>  
UV 365 nm

Azúcares  
Visible

AcOEt

Se observaron glucósidos cardiotónicos a lo largo de la placa en la prueba con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en color café, este resultado se confirmó con la prueba CFA al presentarse una coloración azul fosforescente en las mismas zonas. No se observaron cumarinas con la prueba de CoCl<sub>2</sub> y se detectó una señal débil de a  $R_f = 0.34$  en color amarillo-café con la prueba de anilina-difenilamina. Esta coloración indica que puede tratarse de glucosa, manosa, fructosa o fructanos de cadena corta.



MeOH

En las pruebas con ácido sulfúrico y CFA se observaron glucósidos cardiotónicos en el punto de aplicación. No se observaron cumarinas en la prueba con cloruro de cobalto. En la prueba de azúcares se obtuvo un resultado positivo a  $R_f = 0.00 - 0.46$ , pudiendo ser glucosa, manosa, fructosa o fructanos de cadena corta.



Extracto

Observaciones

H<sub>2</sub>O

En las pruebas con ácido sulfúrico y CFA se observaron glucósidos cardiotónicos en el punto de aplicación, al igual que en el extracto en MeOH. No se observaron cumarinas en la prueba con cloruro de cobalto. En la prueba de azúcares estos se detectaron desde el punto de aplicación hasta  $R_f = 0.43$ . La coloración indica que se tratan de los azúcares detectados en el extracto en MeOH.

Infusión

En las pruebas con ácido sulfúrico y CFA se observaron glucósidos cardiotónicos en el punto de aplicación, al igual que en el extracto acuoso y en MeOH. No se observaron cumarinas en la prueba con cloruro de cobalto. En la prueba de anilina-difenilamina se detectaron señales de azúcares desde el punto de aplicación hasta un  $R_f = 0.44$ . Posiblemente se trata de glucosa, fructosa, manosa o fructanos de cadena corta.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Visible



CFA  
UV 365 nm



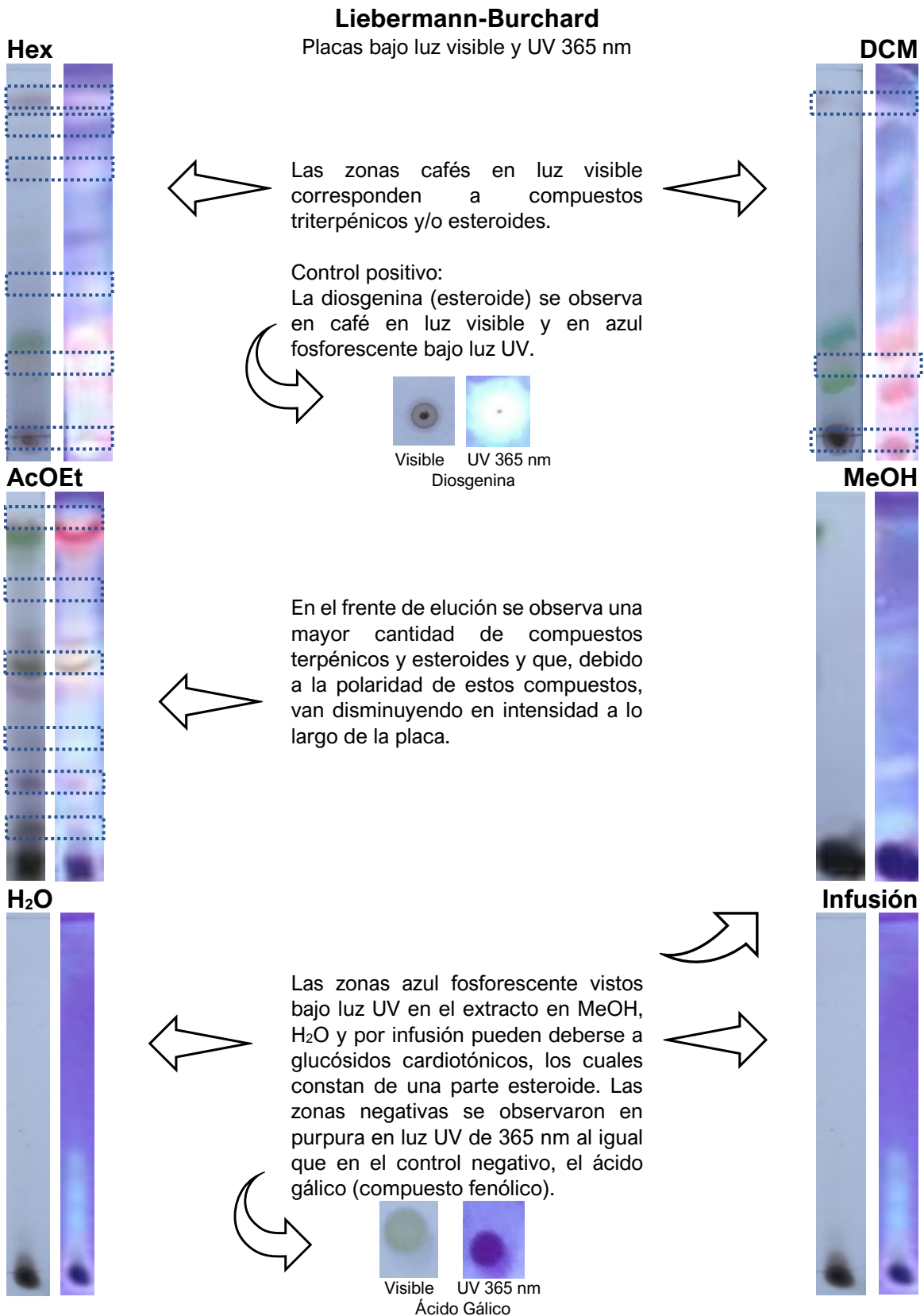
CoCl<sub>2</sub>  
UV 365 nm



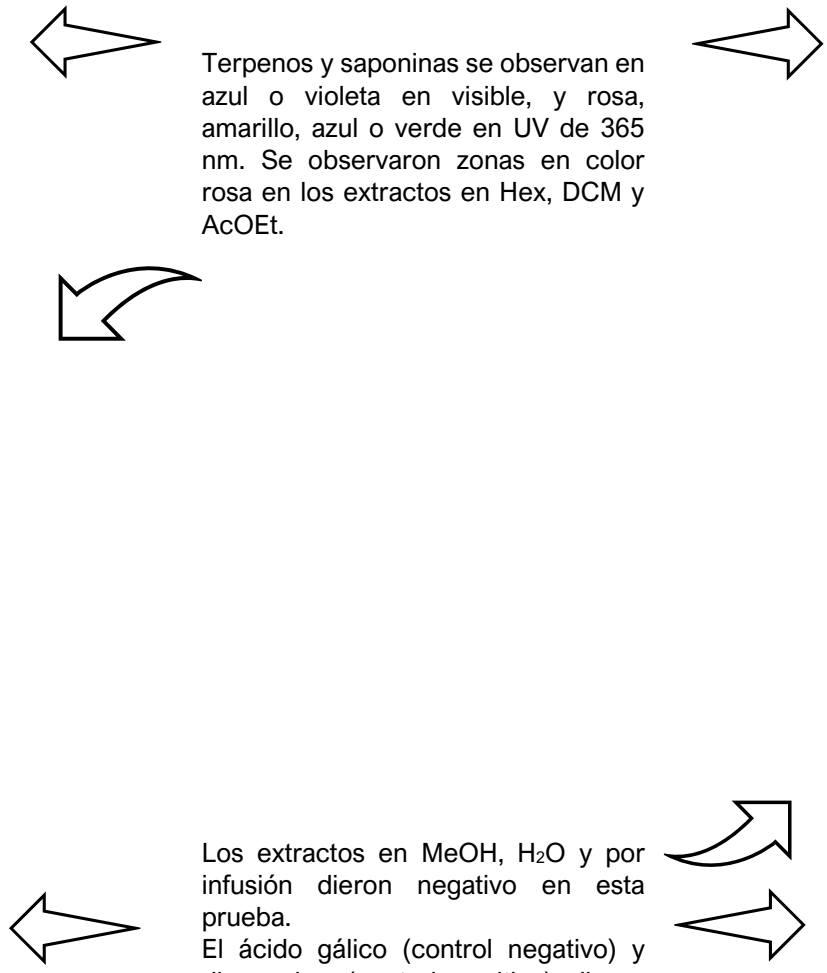
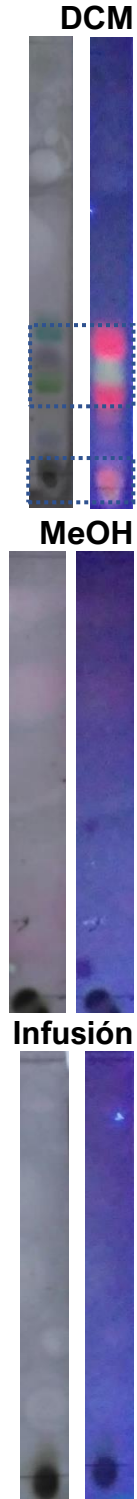
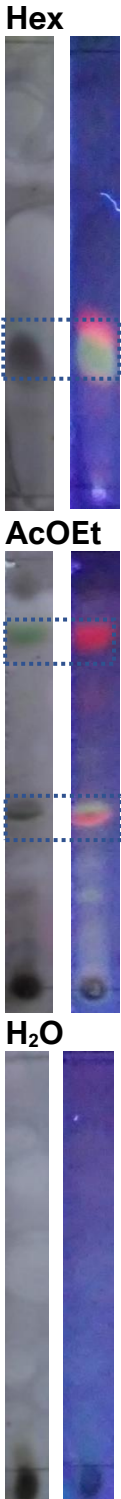
Azúcares  
Visible



## Anexo 1b: Perfil fitoquímico ordenado por prueba fitoquímica

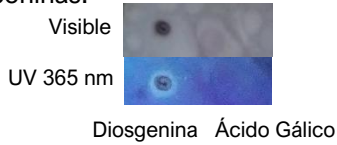


**Vainillina-Ácido Fosfórico**  
Placas bajo luz visible y UV 365 nm



Terpenos y saponinas se observan en azul o violeta en visible, y rosa, amarillo, azul o verde en UV de 365 nm. Se observaron zonas en color rosa en los extractos en Hex, DCM y AcOEt.

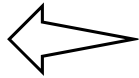
Los extractos en MeOH, H<sub>2</sub>O y por infusión dieron negativo en esta prueba. El ácido gálico (control negativo) y diosgenina (control positivo) dieron negativo. El resultado en la diosgenina puede deberse a que no se encuentra glicosilada, como lo están las saponinas.



## Vainillina-Ácido Sulfúrico

Placas bajo luz visible

Hex

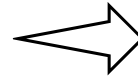


Terpenos y fenilpropanoides se visualizan bajo luz visible en color violeta, gris o rojo. Los extractos en Hex y AcOEt dieron positivo en color violeta a lo largo de la placa; en el extracto en DCM se observan zonas positivas aisladas. El control positivo diosgenina se observa en color violeta.



Visible  
Diosgenina

DCM

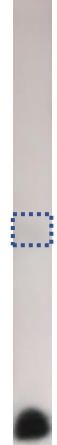
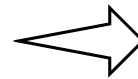


MeOH

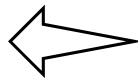
AcOEt



El extracto en MeOH reveló una zona muy débil de compuestos terpenoides.



H<sub>2</sub>O

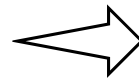


Los extractos en H<sub>2</sub>O y por infusión dieron negativo en esta prueba. Se confirmó el resultado negativo con ácido gálico.



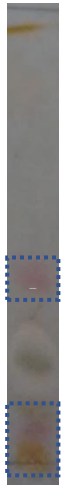
Visible  
Ácido Gálico

Infusión



**Fast Blue B**  
Placas bajo luz visible

Hex



DCM



Se detectaron zonas con metabolitos fenólicos en el extracto en Hex, DCM y AcOEt, siendo débiles en el extracto en Hex.

AcOEt



MeOH

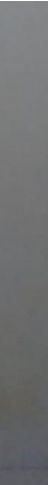


Los extractos MeOH y por infusión dieron negativo a compuestos fenólicos.

H<sub>2</sub>O



Infusión



El extracto en H<sub>2</sub>O presentó una zona de baja intensidad con metabolitos fenólicos. El control positivo (ácido gálico) se observó en color naranja. El control negativo diosgenina se observó incoloro.



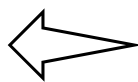
Ácido Gálico / Diosgenina





Placas vistas en luz visible

**Hex**



Se observaron resultados positivos débiles a taninos en los extractos en Hex y DCM debido a la baja polaridad de los disolventes de extracción.



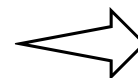
**DCM**



**AcOEt**



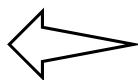
Esta prueba dio positivo en cuatro zonas en el extracto en AcOEt, en el punto de aplicación del extracto en MeOH se obtuvo un resultado positivo debil.



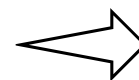
**MeOH**



**H<sub>2</sub>O**



Los extractos en H<sub>2</sub>O e infusión dieron negativo a taninos. El control positivo, ácido gálico, se observó en café oscuro. El control negativo diosgenina dio una señal débil blanca.



**Infusión**



Ácido Gálico / Diosgenina

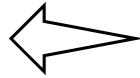
## NP-PEG

Placas vistas bajo luz UV 365 nm

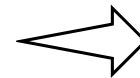
Hex



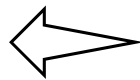
DCM



Los extractos en Hex y DCM dieron negativo a flavonoides y cumarinas.

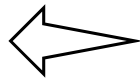


AcOEt

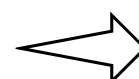


La coloración naranja indica flavonoides con dos grupos OH adyacentes en el anillo B (Wagner y Bladt, 2001). Las cumarinas y ácidos fenolcarboxílicos se observaron en azul fosforescente en el extracto en AcOEt.

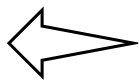
MeOH



Los flavonoides glicosilados, antranas y cumarinas glicosiladas se visualizan en amarillo en el punto de aplicación del extracto en AcOEt y MeOH. Los flavonoides con un grupo OH en el anillo B presentan esta coloración (Wagner y Bladt, 2001).

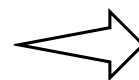


H<sub>2</sub>O



Se observó en el punto de aplicación del extracto en H<sub>2</sub>O una señal débil de cumarinas o ácidos fenolcarboxílicos en azul fosforescente. La infusión no dio positivo. El control positivo ácido gálico, un ácido fenolcarboxílico, se observó en color azul fosforescente mientras que el control negativo diosgenina dio incoloro.

Infusión

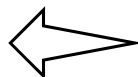


Ácido Gálico / Diosgenina

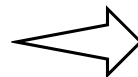
## KOH

Placas vistas bajo luz visible y UV 365 nm

Hex



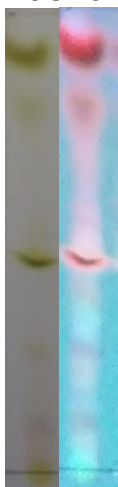
Los extractos en Hex y AcOEt dieron positivo a antraquinonas en las mismas zonas. En el extracto en Hex se observó una coloración azul a  $R_f = 0.32 - 0.39$ , lo que indica que este extracto puede contener cumarinas.



DCM

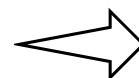


AcOEt



El extracto en AcOEt dio positivo a cumarinas desde el punto de aplicación hasta un  $R_f = 0.38$ , en tanto que las antraquinonas se observaron de un  $R_f = 0.42$  hasta el frente de elución.

El extracto en MeOH dio negativo a la prueba con KOH.



MeOH



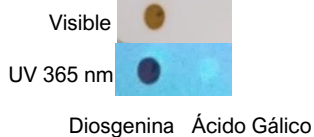
H2O



En los extractos acuoso y por infusión se observaron cumarinas en el punto de aplicación. Los controles negativos, la diosgenina se observó en color café, en tanto que el ácido gálico dio una coloración azul fosforescente débil.



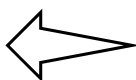
Infusión



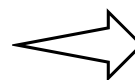


Placas bajo luz visible

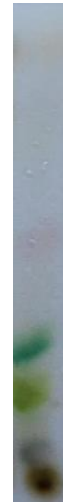
**Hex**



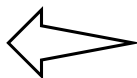
Se observaron coloraciones cafés en las zonas de  $R_f = 0.00 - 0.40$  y  $R_f = 0.80$  hasta el frente de elución en el extracto en Hex, y a  $R_f = 0.5$  y  $0.9$  para el extracto en DCM. Esto indica la posibilidad de que estos extractos contengan glucósidos cardiotónicos.



**DCM**



**AcOEt**

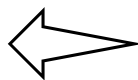


En el extracto en AcOEt la coloración café se obtuvo a lo largo de la placa.

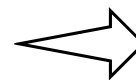
**MeOH**



**H<sub>2</sub>O**



En los extractos en MeOH, H<sub>2</sub>O y por infusión se obtuvieron resultados positivos en el punto de aplicación. La diosgenina, a pesar de no ser un glucósido cardiotónico, dio una coloración café, probablemente porque estos últimos contienen una fracción esteroide. El ácido gálico, control negativo, resultó incoloro.



**Infusión**



Ácido Gálico / Diosgenina

## CFA

Placas bajo luz UV 365 nm

Se observó una señal azul fosforescente débil a  $R_f = 0.41$  en el extracto en Hex, indicando la posibilidad de glucósidos cardiotónicos. El resultado no es concluyente puesto que con la diosgenina (esteroide) se obtuvo una coloración azul fosforescente. El ácido gálico, control negativo, se observó incoloro.



Ácido Gálico / Diosgenina

Hex



AcOEt



H2O



DCM



MeOH



Infusión



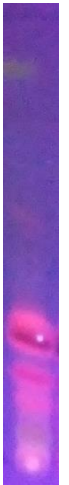
En el extracto en AcOEt se observó la coloración azul a lo largo de la placa.

En los extractos en MeOH, H<sub>2</sub>O y por infusión se observó la posible presencia de glucósidos cardiotónicos en el punto de aplicación.

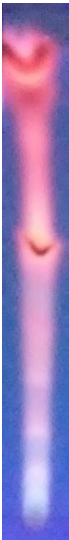
**CoCl<sub>2</sub>**

Placas bajo luz UV 365 nm

**Hex**



**AcOEt**



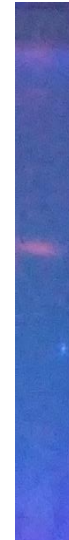
**H2O**



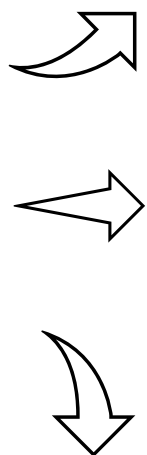
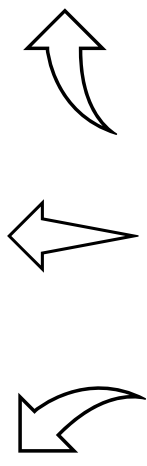
**DCM**



**MeOH**



**Infusión**



Los extractos dieron negativo a cumarinas con la prueba de cloruro de cobalto. Los controles negativos confirman en resultado negativo.



Ácido Gálico / Diosgenina

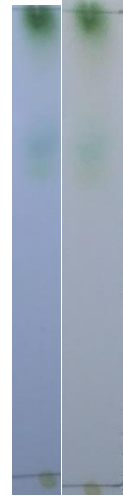
### Anilina-difenilamina

Placas bajo luz visible

Hex



DCM



La primera placa corresponde a la adición de la anilina, la segunda placa a la adición posterior de difenilamina.



Los extractos en Hex y DCM dieron negativo a azúcares.



AcOEt



MeOH



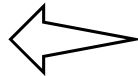
Se observó la presencia de azúcares (posiblemente glucosa, fructosa, manosa, galactosa o fructanos de cadena corta, en las siguientes zonas:

AcOEt:  $R_f = 0.34$  (débil)

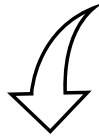
MeOH: punto de aplicación a  $R_f = 0.46$

H<sub>2</sub>O: punto de aplicación a  $R_f = 0.42$

Infusión: punto de aplicación a  $R_f = 0.44$



La intensidad aumentó con la adición del segundo reactivo y se mantuvo la misma coloración.



H<sub>2</sub>O

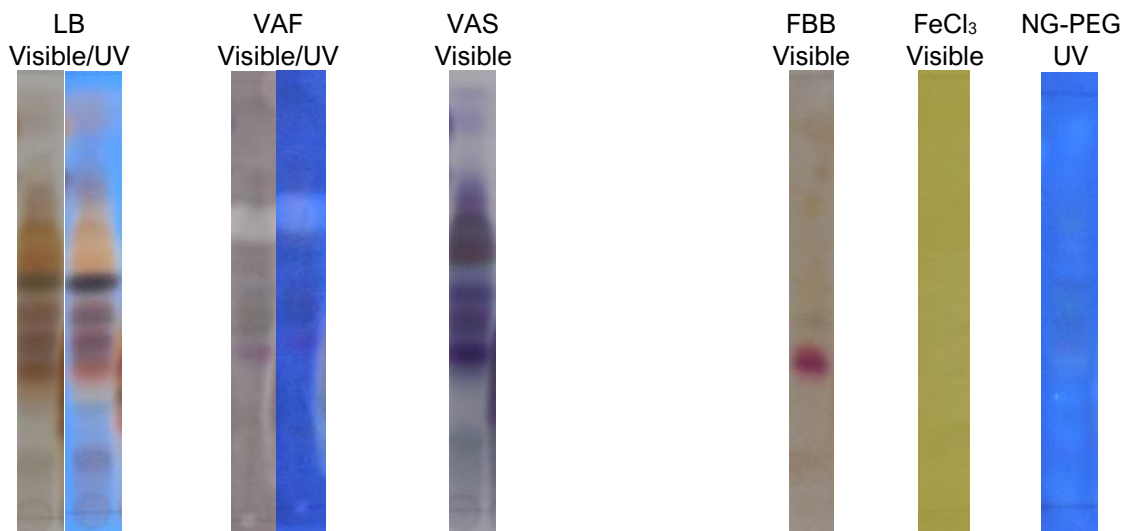


Infusión



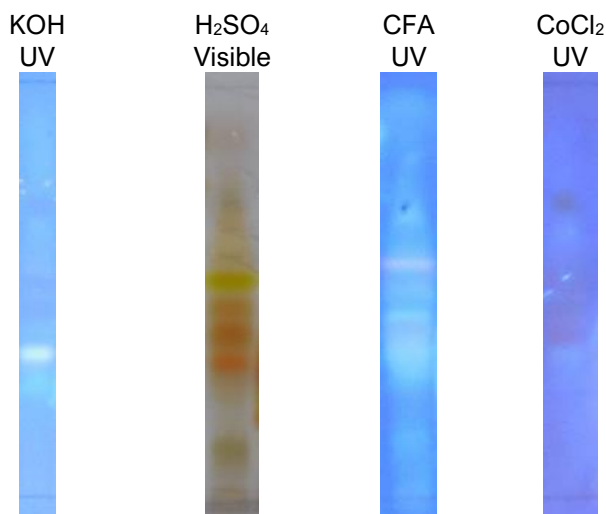
## Anexo 1c: Perfil fitoquímico de fracción 2 del extracto en Hex y fracciones 1, 8 y 9 del extracto en AcOEt

### Fracción 2 del extracto en Hex



Se observó una zona intensa de terpenos y esteroides a  $R_f = 0.28 - 0.76$  en la prueba de Liebermann-Burchard y vainillina-ácido sulfúrico. El resultado fue negativo en la prueba de vainillina-ácido fosfórico.

La prueba FBB reveló compuestos fenólicos a  $R_f = 0.32$ , la prueba de NP-PEG y taninos no detectaron metabolitos.

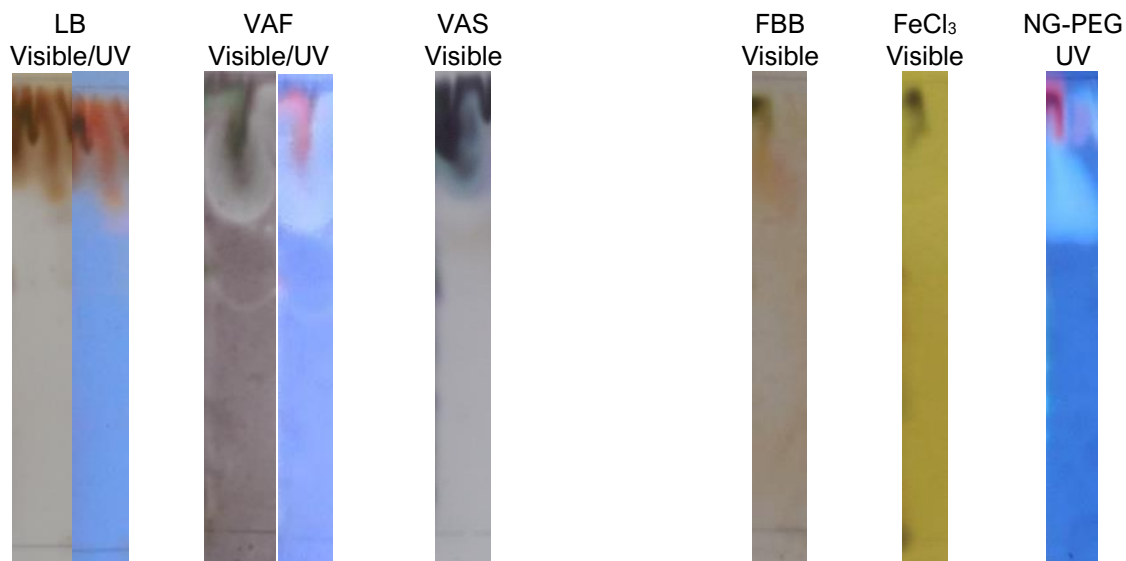


En la prueba de KOH se detectó una señal débil de cumarinas en la zona de  $R_f = 0.24 - 0.28$ , y muy débil en la misma zona con la prueba de cloruro de cobalto.

Las pruebas para glucósidos cardiotónicos (ácido sulfúrico concentrado y cloramida-ácido trifluoroacético) dieron positivas en las mismas zonas ( $R_f = 0.28 - 0.76$ ) que las pruebas Liebermann- Burchard y vainillina-ácido sulfúrico, ambas para terpenos y esteroides. Esto posiblemente porque los glucósidos cardiotónicos cuentan con una parte esteroide.

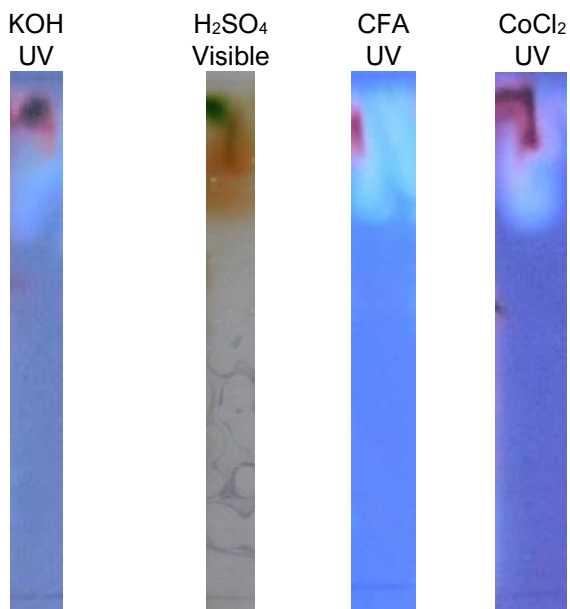


### Fracción 1 del extracto en AcOEt



Las pruebas de Liebermann-Burchard y vainillina-ácido sulfúrico dieron positivo a terpenos y esteroides en el frente de elución. La prueba con vainillina-ácido fosfórico dio positivo débil.

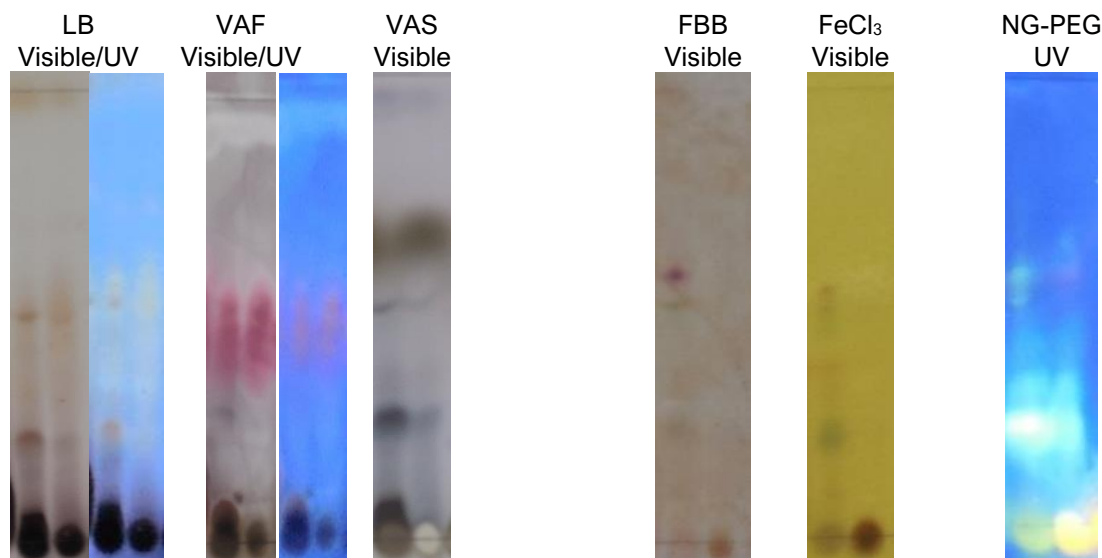
Se observaron taninos (FeCl<sub>3</sub>) y cumarinas (NP-PEG), así como una presencia débil de compuestos fenólicos (FBB) en el frente de elución de la fracción 1 en AcOEt.



Las pruebas KOH y CoCl<sub>2</sub> dieron positivas a cumarinas en el frente de elución. También es posible la presencia de glucósidos cardiotónicos en esta zona (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y CFA).

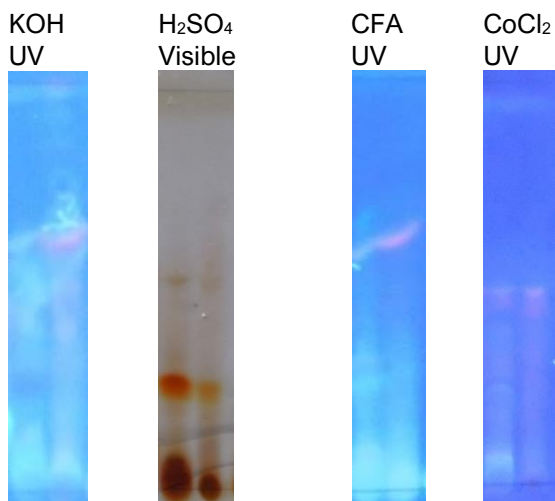
### Fracción 8 y 9 en AcOEt

La fracción 8 se encuentra a la izquierda en cada imagen, la fracción 9 a la derecha.



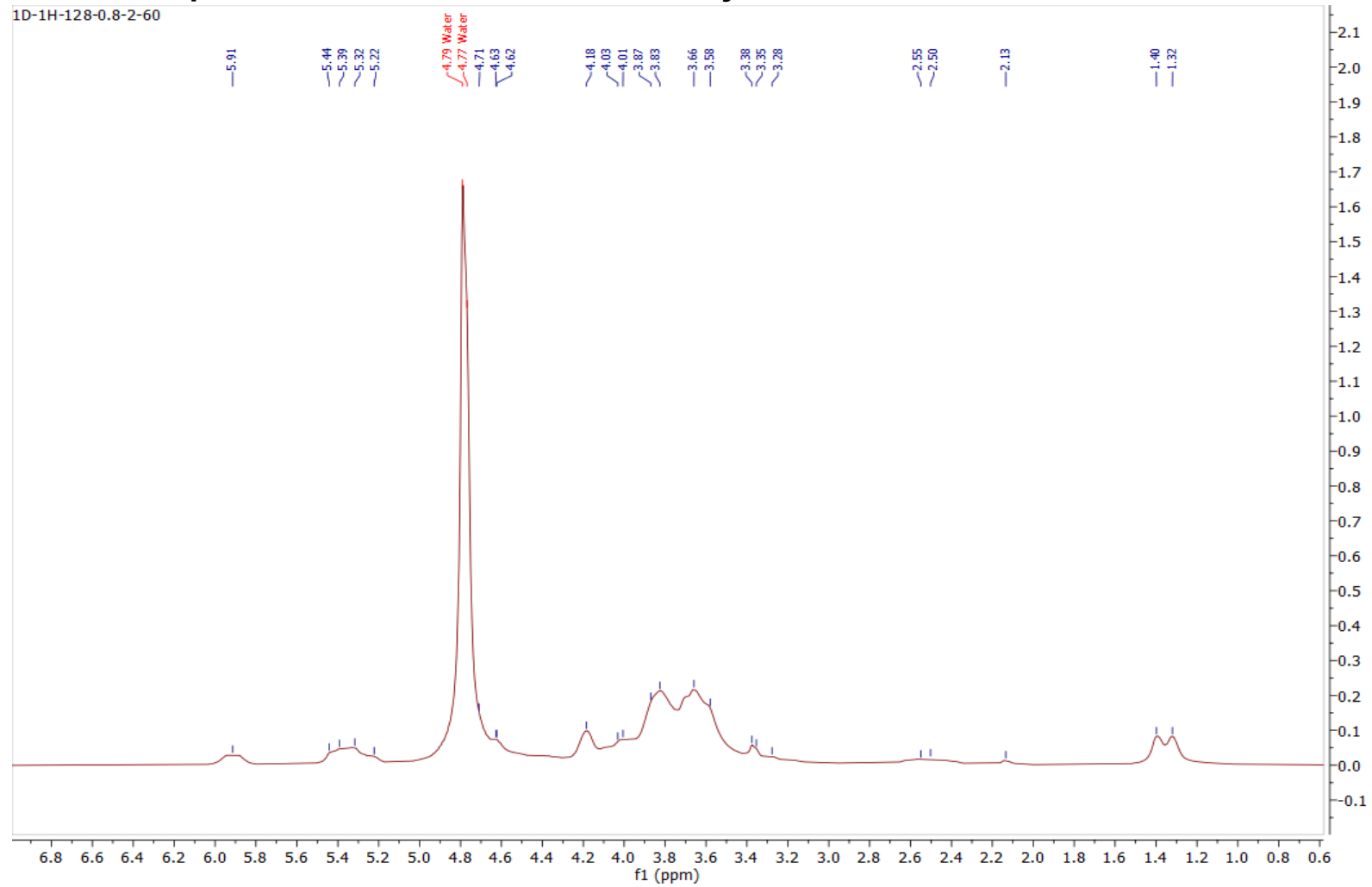
Para ambas fracciones se observó la presencia de esteroides y terpenos en las tres pruebas, resultando más intensa la coloración con vainillina-ácido fosfórico. Entre ambas fracciones, a  $R_f = 0.17$  y  $R_f = 0.52$  las señales de la fracción 9 fueron más débiles en las pruebas de Liebermann-Burchard y vainillina-ácido sulfúrico.

Las pruebas FBB y FeCl<sub>3</sub> dieron positivo para taninos (fracción 8 a  $R_f = 0.22, 0.55$  y punto de aplicación, fracción 9 en el punto de aplicación) y fenólicos (fracción 8 desde el punto de aplicación hasta  $R_f = 0.60$ , fracción 9 en punto de aplicación). Con la prueba de NP-PEG se observaron, en ambas fracciones, flavonoides y cumarinas glicosiladas en el punto de aplicación (más intenso en fracción 9) y cumarinas a  $R_f = 0.13 - 0.20$  (más intenso en fracción 8).

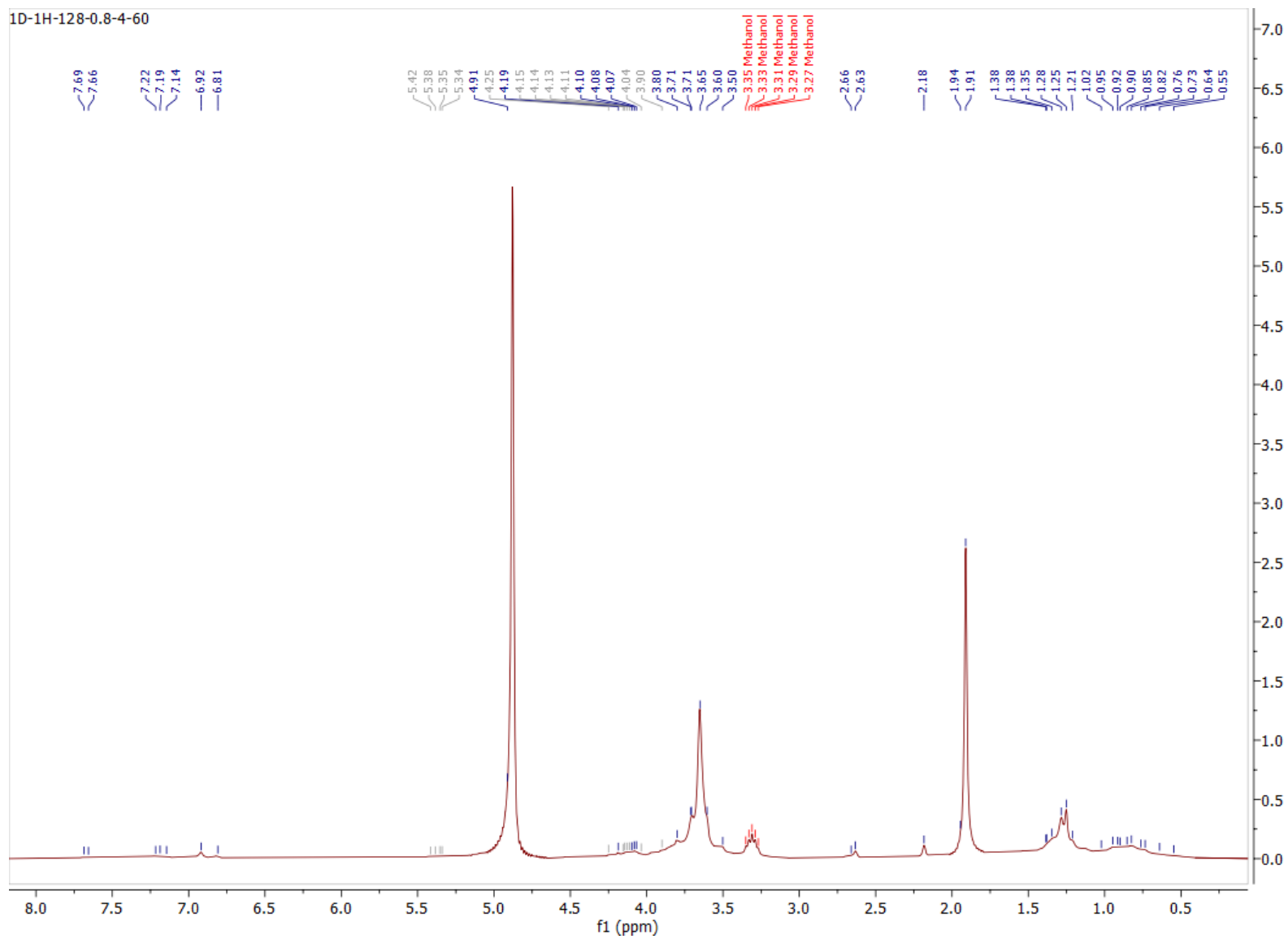


En la prueba con KOH se observaron señales débiles de antraquinonas a  $R_f = 0.49$  en la fracción 9, y cumarinas en la zona del punto de aplicación a  $R_f = 0.48$  en la fracción 8. No se encontraron cumarinas con la prueba CoCl<sub>2</sub>. Las pruebas para glucósidos cardiotónicos dieron positivas en la zona del punto de aplicación hasta  $R_f = 0.35$  en ambas pruebas.

## Anexo 2. Espectros de $^1\text{H}$ en RMN de acarbosa y fracción 9 del extracto en AcOEt.



2a. Espectro de  $^1\text{H}$  en RMN de la acarbosa disuelta en  $\text{D}_2\text{O}$



2b. Espectro de  $^1\text{H}$  en RMN de la fracción 9 del extracto en AcOEt.

## Referencias bibliográficas

- Aguirre-Dugua, X., & Eguiarte, L. (2013). Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments*(90), 36-44. doi: 10.1016/j.jaridenv.2012.10.018
- Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E., Ávila-Reyes, J., Uribe-Soto, J., & González-Valdez, L. (2013). The phenols of the genus *Agave* (Agavaceae). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4(3A), 9-16. doi:10.4236/jbnb.2013.43A002
- Anaya-Eugenio, G., Rivero-Cruz, I., Rivera-Chávez, J., & Mata, R. (2014). Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 416-425.
- Assefa, S., Yang, E., Chae, S., Song, M., Lee, J., Cho, M., & Jang, S. (2020). Alpha glucosidase inhibitory activities of plants with focus on common vegetables. *Plants*, 9(2), 1-17. doi:10.3390/plants9010002
- Atanasov, A., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*(33), 1582-1614. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001
- Bailey, R., & Bourne, J. (1960). Colour reactions given by sugars and diphenylamine-aniline spray reagents on paper chromatograms. *Journal Of Chromatography*, 206-213.
- Barriada-Bernal, L., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E., Gallardo-Velázquez, T., Ávila-Reyes, J., Torres-Morán, M., González-Elizondo, M. S., & Herrera-Arrieta, Y. (2014). Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *CyTA - Journal of Food*, 12(2), 105-114. doi:10.1080/19476337.2013.801037
- Bräm, S., & Wolfram, E. (2017). Recent advances in effect-directed enzyme assays based on thin-layer chromatography. *Phytochemical Analysis*, 28, 74-86. doi: 10.1002/pca.2669
- Brindis, F., Rodríguez, R., Bye, R., González-Andrade, M., & Mata, R. (2011). (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Journal of Natural Products*(74), 314-320. doi: 10.1021/np100447a

- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., & Massolini, G. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 218-228. doi: 10.1016/j.jpba.2013.03.007
- Chávez-Ortiz, L., De la Rosa-Carillo, M., Palomeque-Carlín, A., Dávila-Galván, A., Gómez-Aguirre, Y., Reyes-Silva, I., Pérez-Reyes, M., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2019). Establecimiento de un programa para la propagación y conservación de las cactáceas y suculentas mexicanas a través del cultivo *in vitro*. En F. Fernández-Luqueño, F. López-Valdez & J. G. Martínez-Ávalos (Eds.), *Avances Internacionales de Cactáceas y Suculentas: Manejo y Conservación ante el Cambio Global* (págs. 123-129). México: CINVESTAV.
- Clapham, J. (2020). Sixty years of drug discovery for type 2 diabetes: Where are we now? En C. J. Stocker (Ed.), *Type 2 Diabetes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 2076, págs. 1-30). New York, USA: Humana Press. doi: 10.1007/978-1-4939-9882-1\_1
- Copeland, R. (2000). *Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* (2nd edition ed.). New York: Wiley-VCH.
- Diario Oficial de la Federación. (2016). *Norma Oficial Mexicana NOM-002-SAGARPA-2016, Relativa a las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad de los fructanos de agave*. México: Autor.
- Escandón-Rivera, S., Mata, R., & Andrade-Cetto, A. (2020). Molecules isolated from mexican hypoglycemic plants: a review. *Molecules*, 25(4145), 1-33. doi:10.3390/molecules25184145
- Espinosa-Barrera, L. A. (2015). Generalidades e importancia de los agaves en México. *Desde el Herbario CICY*(7), 161-164.
- Flores-Bocanegra, L., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. (2017).  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*. *Journal of Natural Products*(80), 1584-1593. doi: 0.1021/acs.jnatprod.7b00155
- García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*(87), 14-23.
- García-Mendoza, A. (2010). Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botanica Mexicana*(91), 71-93.
- Gibbons, S. (2012). An introduction to planar chromatography and its application to natural products isolation. En S. D. Nahar (Ed.), *Natural Products Isolation*,

*Methods in Molecular Biology* (Vol. 864, págs. 117-153). Humana Press. doi: 10.1007/978-1-61779-624-1\_6

Heinrich, M., Frei Haller, B., & Leonti, M. (2014). A perspective on natural products research and ethnopharmacology in Mexico: The eagle and the serpent on the prickly pear cactus. *Journal of Natural Products*(77), 678-689. doi: 10.1021/np4009927

Instituto Nacional de Salud Pública. (2016). *Encuesta nacional de salud y nutrición de medio camino 2016. Informe final de resultados*. Ciudad de México: Instituto Nacional de Salud Pública.

International Diabetes Federation. (2019). *IDF Diabetes atlas* (9th ed.). Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.

Iñiguez, G., Acosta, N., Martinez, L., Parra, J., & González, O. (2005). Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 7. Compostaje de bagazo de agave y. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 21(1), 37-50. Recuperado el 20 de febrero de 2020, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37021105>

Jones, W., & Kinghorn, A. (2006). Extraction of plant secondary metabolites. En S. D. Sarker, Z. Latif, & A. I. Gray (Eds.), *Methods in Biotechnology, Natural Products Isolation* (Vol. 20, págs. 323-351). Totowa, N.J.: Humana Press.

Kaul, K., Tarr, J., Ahmad, S., Kohner, E., & Chibber, R. (2012). Introduction to diabetes mellitus. En S. I. Ahmad (Ed.), *Diabetes: An Old Disease, a New Insight* (págs. 1-11). New York: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.

Kumar Talapatra, S., & Talapatra, B. (2016). *Chemistry of plant natural products. Stereochemistry, conformation, synthesis, biology, and medicine*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-642-45410-3

Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2011).  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 19-29. doi: 10.4103/0973-7847.79096

Lankatillake, C., Luo, S., Flavel, M., Lenon, G., Gill, H., Huynh, T., & Dias, D. (2021). Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase assays. *Plant Methods*, 17(3), 1-19. doi: 10.1186/s13007-020-00702-5

Li, G. Q., Kam, A., Wong, K. H., Zhou, X., Omar, E. A., Alqahtani, A., Li, K. M., Razmovski-Naumovski, V., & Chan, K. (2013). Herbal medicines for the management of diabetes. En S. T. Ahmad (Ed.), *Diabetes. An Old Disease, a*

*New Insight* (págs. 396-413). New York, USA: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.

- López-Salazar, H., Camacho-Díaz, B., Ávila-Reyes, S., Pérez-García, M., González-Cortazar, M., Arenas Ocampo, M., & Jiménez-Aparicio, A. (2019). Identification and quantification of  $\beta$ -sitosterol  $\beta$ -d-glucoside of an ethanolic extract obtained by microwave-assisted extraction from *Agave angustifolia* Haw. *Molecules*, *24*(3926), 1-13. doi:10.3390/molecules24213926
- Martinez, A., Mandariaga-Mazón, A., Rivero-Cruz, I., Bye, R., & Mata, R. (2016). Antidiabetic and antihyperalgesic effects of a decoction and compounds from *Acourtia thurberi*. *Planta Medica*, *234*(6), 1-9. doi: 10.1055/s-0042-119652
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., & Rivero-Cruz, I. (2013). Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of  $\alpha$ -glucosidases. *Journal of Natural Products*, *76*(3), 468-483. doi: 10.1021/np300869g
- Mata, R., Figueroa, M., Navarrete, A., & Rivero-Cruz, I. (2019). Chemistry and biology of selected mexican medicinal plants. En A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, J. Kobayashi, Y. Asakawa, & J. K. Liu (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (págs. 1-142). Switzerland: Springer Nature. doi: 10.1007/978-3-030-01099-7\_1
- Mellado-Mojica, E., González de la Vara, L., & López, M. (2016). Fructan active enzymes (FAZY) activities and biosynthesis of fructooligosaccharides in the vacuoles of *Agave tequilana* Weber Blue variety plants of different age. *Planta*, 1-17. doi:10.1007/s00425-016-2602-7
- National Center for Biotechnology Information. (12 de enero de 2021). *PubChem compound summary for CID 5280443, apigenin*. Obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Apigenin>.
- National Center for Biotechnology Information. (12 de enero de 2021). *PubChem compound summary for CID 5281807, puerarin*. Obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Puerarin>.
- National Center for Biotechnology Information. (12 de enero de 2021). *PubChem compound summary for CID 637542, 4-hydroxycinnamic acid*. Obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxycinnamic-acid>.
- Nava-Cruz, N., Medina-Morales, M., Martinez, J., Rodriguez, R., & Aguilar, C. (2014). Agavebiotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, *35*(4), 546-559. doi:10.3109/07388551.2014.923813



- Okuyama, M., Saburi, W., Mori, H., & Kimura, A. (2016).  $\alpha$ -glucosidases and  $\alpha$ -1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-25. doi:10.1007/s00018-016-2247-5
- Ortiz-Hernández, Y., Gutiérrez-Hernández, G., Corzo-Ríos, L., García-Ramírez, E., & Martínez-Tomás, S. (2018). Varietal and germinative characterization of *Agave potatorum* (Asparagaceae) seeds with different origins. *Botanical Sciences*, 96(4), 628-639. doi:10.17129/botsci.1914
- Padilla Gómez, E. (2007). *Estudio ecológico y etnobotánico de la vegetación del municipio de San Pablo Etlá, Oaxaca*. (Tesis de maestría no publicada). CIIDIR-IPN: Oaxaca.
- Pérez-López, A., & Simpson-Williamson, J. (2019). Suculencia en hojas lanceoladas de Agave. En F. Fernández-Luqueño, F. López-Valdez & J. G. Martínez-Ávalos (Eds.), *Avances Internacionales de Cactáceas y Suculentas: Manejo y Conservación ante el Cambio Global* (págs. 38-41). México: CINVESTAV.
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E., Sousa, J., Tomé, S., Ramos, M. J., Silva, A., Fernandes, P. A., & Fernandes, E. (2017).  $\alpha$ -glucosidase inhibition by flavonoids: an *in vitro* and *in silico* structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1216-1228. doi:10.1080/14756366.2017.1368503
- Punekar, N. (2018). *Enzymes: catalysis, kinetics and mechanisms*. Singapore: Springer Nature. doi: 10.1007/978-981-13-0785-0
- Ramallo, I., Salazar, M., & Furlan, R. (2020). Enzymatic bioautographic methods. En N. E. Labrou (Ed.), *Targeting Enzymes for Pharmaceutical Development: Methods and Protocols, Methods in Molecular* (Vol. 2089, págs. 179-189). New York: Humana Press. doi: 10.1007/978-1-0716-0163-1\_12
- Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, S., Madariaga-Mazón, A., Figueroa, M., & Mata, R. (2017).  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Preussia minimoides*. *Journal of Natural Products*(80), 582-587. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00574
- Rangel-Landa, S., Casas, A., & Dávila, P. (2015). Facilitation of *Agave potatorum*: an ecological approach for assisted population recovery. *Forest Ecology and Management*(347), 57-74. doi:10.1016/j.foreco.2015.03.003
- Rosas-Ramírez, D., Escandón-Rivera, S., & Pereda-Miranda, R. (2018). Morning glory resin glycosides as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: *in vitro* and *in silico* analysis. *Phytochemistry*(148), 39-47. doi:10.1016/j.phytochem.2018.01.012
- Sahnoun, M., Bejar, S., Daoud, L., Ayadi, L., Brini, F., & Saibi, W. (2019). Effect of *Agave americana* L. on the human, and *Aspergillus oryzae* S2  $\alpha$ -amylase

- inhibitions. *Natural Product Research*, 33(5), 755-758. doi: 10.1080/14786419.2017.1408094
- Sahnoun, M., Saibi, W., Brini, F., & Bejar, S. (2018). Apigenin isolated from *A. americana* encodes human and *Aspergillus oryzae* S2  $\alpha$ -amylase inhibitions: credible approach for antifungal and antidiabetic therapies. *J Food Sci Technol*, 55(4), 1489-1498. doi: 10.1007/s13197-018-3065-6
- Salazar-Pineda, D., Castro-Alarcon, N., Moreno-Godinez, M., Nicasio-Torres, M., Perez-Hernandez, J., & Alvarez-Fitz, P. (2017). Antibacterial and anti-inflammatory activity of extracts and fractions from *Agave cupreata*. *International Journal of Pharmacology*(13), 1063-1070. doi: 10.3923/ijp.2017.1063.1070
- Schomburg, D., & Salzmann, M. (1991). Alpha-glucosidase 3.2.1.20. En D. Schomburg, & M. Salzmann (Eds.), *Enzyme Handbook 5* (págs. 115-123). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Sen, S., Chakraborty, R., & De, B. (2016). *Diabetes mellitus in 21st century*. Singapore: Springer Science+Business Media. doi: 10.1007/978-981-10-1542-7
- Siedel, V. (2012). Initial and bulk extraction of natural products isolation. En S. D. Nahar (Ed.), *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology* (Vol. 864, págs. 27-41). Humana Press. doi: 10.1007/978-1-61779-624-1\_2
- Silva, G., Lee, I., & Kinghorn, D. (1998). Special problems with the extraction of plants. En R. J. Cannell (Ed.), *Natural Products Isolation, Methods in Biotechnology* (Vol. 4, págs. 343-363). Totowa, N.J.: Humana Press.
- Simões-Pires, C., Hmicha, B., Marston, A., & Hostettmann, K. (2009). A TLC bioautographic method for the detection of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase inhibitors in plant extracts. *Phytochemical Analysis*(20), 511-515. doi:10.1002/pca.1154
- Sonkamble, V., Wagh, N., & Pai, S. (2019). Role of plant secondary metabolites as antidiabetic agents. En M. S. Akhtar, M. K. Swamy & U. R. Sinniah (Eds.), *Natural Bio-active Compounds. Volume 1: Production and Applications* (págs. 529-550). Singapore: Springer Nature. doi:10.1007/978-981-13-7154-7\_18
- Soto-Castro, D., Pérez-Herrera, A., García-Sánchez, E., & Santiago-García, P. (2021). Identification and quantification of bioactive compounds in *Agave potatorum* Zucc. leaves at different stages of development and a preliminary biological assay. *Waste Biomass Valorization*. doi:10.1007/s12649-020-01329-2
- Soto-Castro, D., Santiago-García, P., Vásquez-López, A., Sánchez-Heraz, F., Vargas-Mendoza, Y., & Gaitán-Hernández, R. (2021). Effect of ethanolic extracts from

- Agave potatorum* Zucc. leaves in the mycelial growth of *Pleurotus* spp. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 33(3), 228-236. doi:10.9755/ejfa.2021.v33.i3.2664
- Stenesh, J. (1998). *Biochemistry*. New York: Springer Science+Business Media. doi: 10.1007/1978-1-4757-9427-4
- Taniguchi, H., & Honnda, Y. (2009). Amylases. *Applied Microbiology: Industrial*, 159-173. doi: 10.1016/b978-012373944-5.00130-9
- Theiler, B., Istvanits, S., Zehl, M., Marcourt, L., Urban, E., Espinoza Caisa, L., & Glasl, S. (2016). HPTLC bioautography guided isolation of  $\alpha$ -glucosidase inhibiting compounds from *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae). *Phytochemical Analysis*. doi:10.1002/pca.2651
- Traut, T. (2008). *Allosteric regulatory enzymes*. New York: Springer Science+Business Media.
- Truscheit, E., Hillebrand, I., Junge, B., Müller, L., Puls, W., & Schmidt, D. (1988). Microbial  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: chemistry, biochemistry, and therapeutic potential. En *Drug Concentration Monitoring Microbial Alpha-Glucosidase Inhibitors Plasminogen Activators. Progress in Clinical Biochemistry and Medicine. Progress in Clinical Biochemistry and Medicine* (Vol. 7, págs. 17-99). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Tsao, R., & Li, H. (2013). Analytical techniques for phytochemicals. En B.K. Tiwari, Nigel P. Brunton & Charles S. Brennan (Eds.), *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction* (págs. 434-451). UK: John Wiley & Sons.
- Valdes, M., Calzada, F., & Mendieta-Wejebe, J. (2019). Structure–activity relationship study of acyclic terpenes in blood glucose levels: potential  $\alpha$ -glucosidase and sodium glucose cotransporter (SGLT-1) inhibitors. *Molecules*, 24(4020), 1-10. doi: 10.3390/molecules24224020
- Vera Guzmán, Araceli M., Santiago García, Patricia A., & López, Mercedes G. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. *Revista fitotecnia mexicana*, 32(4), 273-279. Recuperado en 07 de junio de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802009000400005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802009000400005&lng=es&tlng=es).
- Verastegui-Omaña, B., Rebollar-Ramos, D., Pérez-Vásquez, A., Martínez, A., Madariaga-Mazón, A., Flores-Bocanegra, L., & Mata, R. (2017).  $\alpha$ -glucosidase

inhibitors from *Malbranchea flavorosea*. *Journal of Natural Products*(80), 190-195. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00977

Wagner, H., & Blatt, S. (2001). *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M., & Osaki, S. (2010). Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose. *The FEBS Journal*, 277, 4205-4214. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07810.x

Yang, Y., Gu, L., Xiao, Y., Liu, Q., Hu, H., Wang, Z., & Chen, K. (2015). Rapid identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Phlomis tuberosa* by sepbox chromatography and thin-layer chromatography bioautography. *PLoS ONE*, 10(2), 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0116922

Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., & Kang, W. (2014).  $\alpha$ -glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*(3), 136-174. doi: 10.1016/j.fshw.2014.11.003