



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

---

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA  
E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS

CARACTERIZACIÓN DE UN POLISACÁRIDO CON ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE Y ANTI-GLICACIÓN AISLADO DE LAS SEMILLAS DE  
CALABAZA *Cucurbita argyrosperma*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO QUÍMICO INDUSTRIAL

PRESENTA:

JOSÉ ANTONIO LEANDRO FELIPE

ASESOR:

Dra. ROSA MARTHA PÉREZ GUTIÉRREZ



CIUDAD DE MÉXICO, 2019



T-DEySA-123-18

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapala"  
60 años de la Unidad Profesional Adolfo López Mateos  
70 Aniversario del CECyT No. 3 "Estanislao Ramírez Ruiz"  
60 años de XEIPN Canal Once, orgullosamente politécnico  
60 Aniversario del CECyT No. 4 "Lázaro Cárdenas"

**Asunto**

Autorización de Impresión

CDMX, a 27 de agosto de 2019

**Pasante**

JOSÉ ANTONIO LEANDRO FELIPE  
PRESENTE

**Boleta**  
2012320432

**Programa Académico**  
I.Q.I.

Los suscritos tenemos el agrado de informar a usted, que habiendo procedido a revisar el borrador de la modalidad de titulación correspondiente denominado:

**"Caracterización de un polisacárido con actividad antioxidante y anti-glicación aislado de las semillas de calabaza Cucurbita argyrosperma"**

encontramos que el citado trabajo escrito de **Tesis Individual**, reúne los requisitos para **autorizar el examen profesional y proceder a su impresión** según el caso, debiendo tomar en consideración las indicaciones y correcciones que al respecto se le hicieron.

Atentamente  
**JURADO**

Ing. Rosa Martha Pérez Gutiérrez  
Presidenta

Ing. Elysa Urbina Valle  
Secretario

Ing. Víctor Manuel Martínez Reyes  
Vocal 1

M. en E. Berenice Ferrablanca Gudiño  
Vocal 2

Ing. Sergio Odín Flores Valle  
Vocal 3

c.c.p.- Depto. de Evaluación y Seguimiento Académico.  
c.c.p.- Depto. de Gestión Escolar  
CRG/mlcp





Folio  
T-DEySA-123-18

Asunto  
Cesión de derechos

CDMX, 27 de agosto de 2019

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"  
60 años de la Unidad Profesional Adolfo López Mateos  
70 Aniversario del CECyT No. 3 "Estanislao Ramírez Ruíz"  
60 años de XEIPN Canal Once, orgulloosamente politécnico  
60 Aniversario del CECyT No. 4 "Lázaro Cárdenas"

## CARTA CESIÓN DE DERECHOS

El/La que suscribe: **José Antonio Leandro Felipe** estudiante del Programa de: **Ingeniería Química Industrial** con número de Boleta: **2012320432**, manifiesta que es autor/a intelectual del presente trabajo escrito, por la opción: **Tesis Individual**, bajo la dirección del profesor/a **Q.F.I. Rosa Martha Pérez Gutiérrez** ceden los derechos del trabajo: **"Caracterización de un polisacárido con actividad antioxidante y anti-glicación aislado de las semillas de calabaza Cucurbita argyrosperma"** 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 expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico **josleandrof@gmail.com** Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A t e n t a m e n t e

  
José Antonio Leandro Felipe  
Nombre y Firma del/la  
estudiante

  
Rosa Martha Pérez Gutiérrez  
Nombre y Firma  
Del/la director(a)





Instituto Politécnico Nacional  
"La Técnica al Servicio de la Patria"

Escuela Superior de  
Ingeniería Química e  
Industrias  
Extractivas

Departamento de  
Evaluación y  
Seguimiento  
Académico

Asunto  
Autorización de tema

Folio  
T-DEySA-123-18

Lugar  
Ciudad de México

Fecha  
08 de enero de 2019.

CRG/mlcp.

Pasante  
JOSÉ ANTONIO LEANDRO FELIPE

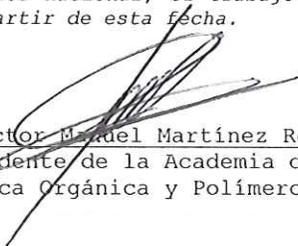
Boleta                      Programa Académico  
2012320432                      I.Q.I.

Mediante el presente se hace de su conocimiento que la Subdirección Académica a través de este Departamento autoriza a la **Q.F.I. Rosa Martha Pérez Gutiérrez** sea asesora en el tema que propone usted desarrollar como prueba escrita en la opción **Tesis Individual**, con el título y contenido siguiente:

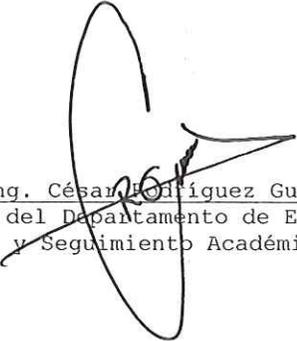
**"Caracterización de un polisacárido con actividad antioxidante y anti-glicación aislado de las semillas de calabaza Cucurbita argyrosperma"**

Resumen  
Introducción  
I: Antecedentes.  
II: Material y métodos.  
III: Resultados y discusión.  
Conclusiones.  
Referencias.  
Anexos.

De acuerdo al artículo 28 del Reglamento de Titulación Profesional del Instituto Politécnico Nacional, el trabajo deberá ser concluido en un término no mayor de un año, a partir de esta fecha.

  
Ing. Víctor Manuel Martínez Reyes  
Presidente de la Academia de  
Química Orgánica y Polímeros

  
Q.F.I. Rosa Martha Pérez Gutiérrez  
Directora

  
Ing. César Rodríguez Guerrero  
Jefe del Departamento de Evaluación  
y Seguimiento Académico.

  
M. en C. Isaura García Maldonado  
Subdirectora Académica

c.c.p.- Depto. de Evaluación y Seguimiento Académico.  
c.c.p.- Depto. de Gestión Escolar



## RECONOCIMIENTOS

*Al Instituto Politécnico Nacional por darme la oportunidad de forjarme un futuro y vivir una de las mejores experiencias de mi vida.*

*A la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas por brindarme las herramientas necesarias en mi formación como Ingeniero Químico Industrial, a esas aulas que fueron mi segundo hogar y que forman parte de memorables momentos.*

*Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales por las facilidades y recursos para la realización de la presente investigación.*

## AGRADECIMIENTOS

“Con el poder de tu mente, tu determinación, tu instinto y la experiencia,  
puedes volar muy alto”.

Ayrton Senna

*A mis padres por el cariño y apoyo que siempre he recibido y con el cual logre culminar una carrera profesional, la cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir, de igual forma gracias por la oportunidad que me brindaron, por su sacrificio, por su ejemplo de superación, sus consejos, comprensión y confianza, porque sin su respaldo no hubiera sido posible llegar hasta donde hoy me encuentro. Con admiración y respeto.*

*A mis hermanos por su apoyo en todo momento, por permitirme compartir alegrías, enseñanzas, tristezas, desvelos, por sus consejos, por impulsarme a ser mejor en cada etapa de mi vida, quiero expresarles mi agradecimiento, por lo que ha sido y será... Gracias.*

*A mis tíos por abrirme las puertas de su hogar incondicionalmente al iniciar mi carrera profesional, tanto a mis familiares su cariño y aprecio.*

*A mi asesora por su gran apoyo para el desarrollo del presente trabajo, por los conocimientos transmitidos, por su paciencia y valiosa aportación. Gracias.*

*A mis amigos del laboratorio y muchos más, por permitirme compartir varios momentos durante este tiempo, por sus enseñanzas y consejos. Gracias por su amistad.*

*A los integrantes del jurado por su orientación y aportaciones a este trabajo.*

*José Antonio Leandro Felipe*

## ÍNDICE

Resumen .....	iv
Abreviaturas.....	vi
Introducción.....	vii
Objetivos.....	ix
Hipótesis .....	x
CAPÍTULO I.....	1
Antecedentes.....	1
I.1 <i>Cucurbita argyrosperma</i> .....	1
I.1.1 Origen.....	1
I.1.2 Clasificación taxonómica y descripción botánica .....	2
I.1.3 Usos y propiedades medicinales .....	4
I.1.4 Distribución y cultivo en México.....	4
I.2 Radicales libres .....	6
I.2.1 Relación con el estrés oxidativo.....	8
I.2.1.1 Diabetes mellitus .....	9
I.3 Antioxidantes.....	10
I.3.1 Compuestos con efecto antioxidante en plantas.....	12
I.3.2 Antioxidantes sintéticos .....	14
I.3.3 Aplicaciones .....	14
I.3.4 Análisis de actividad antioxidante.....	15
I.4 Productos finales de glicación avanzada (AGEs) .....	16
I.5 Polisacáridos .....	19
I.5.1 Estudios en el género <i>Cucurbita</i> .....	20

I.6 Métodos cromatográficos.....	21
I.6.1 Cromatografía en capa fina .....	22
I.6.2 Cromatografía en columna.....	22
I.7 Métodos espectroscópicos.....	22
I.7.1 Espectrometría en el infrarrojo (IR).....	23
I.7.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	24
I.7.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV/VIS).....	26
Capítulo II.....	28
Material y métodos .....	28
II.1 Reactivos y disolventes.....	29
II.2 Materiales.....	30
II.3 Equipo .....	30
II.3 Planta .....	31
II.4 Preparación de extractos .....	32
II.5 Prueba preliminar de efecto antioxidante en <i>C. argyrosperma</i> . .....	33
II.6 Biofraccionamiento del polisacárido. ....	34
II.7 Hidrólisis ácida .....	37
II.8 Cromatografía en papel.....	38
II.9 Espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) del compuesto aislado .....	41
II.10 Estudio espectroscópico de Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ ) del compuesto aislado.....	41
II.11 Análisis de UV-vis.....	41
II.12 Ensayos para evaluar la actividad antioxidante in vitro. ....	41
II.12.1 Ensayo de captación del radical DPPH (2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo).....	41

II.12.2 Captación del radical catiónico ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ABTS <sup>+</sup> .....	43
II.12.3 Captación del radical hidroxilo .....	45
II.12.4 Captación del radical superóxido.....	46
II.13 Ensayo de inhibición en productos finales de glicación avanzada (AGEs) <i>in vitro</i> .....	48
II.13.1 Glicación por el método de BSA. ....	48
Capitulo III .....	50
Resultados y discusión .....	50
III.1 Obtención de extractos .....	50
III.2 Actividad antioxidante en <i>C. argyrosperma</i> .....	50
III.3 Identificación de azúcares presentes en PLS.....	52
III.4 Caracterización del polisacárido.....	52
III.4.1 Análisis del espectro FT-IR.....	52
III.4.2 Análisis del espectro de RMN del polisacárido.....	54
III.4.3 Análisis del espectro UV. ....	59
III.5 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	60
III.5.1 Captación del radical DPPH por el polisacárido (PLS).....	60
III.5.2 Captación del radical ABTS <sup>+</sup> por PLS. ....	61
III.5.3 Captación del radical hidroxilo.....	63
III.5.4 Captación del radical superóxido. ....	65
III.6 Actividad anti-glicación <i>in vitro</i> .....	65
Conclusiones.....	67
Referencias .....	69

## Índice de figuras

<i>No.</i>	<i>Nombre</i>	<i>Pág.</i>
<i>I.1</i>	<i>Morfología de C. argyrosperma</i>	<i>2</i>
<i>I.2</i>	<i>Calabaza pipiana</i>	<i>3</i>
<i>I.3</i>	<i>Calabaza pipián o chigua (C. argyrosperma)</i>	<i>3</i>
<i>I.4</i>	<i>Distribución geográfica de los taxa silvestres de los grupos argyrosperma y pepo</i>	<i>5</i>
<i>I.5</i>	<i>Registros de presencia “calabaza de castilla”</i>	<i>6</i>
<i>I.6</i>	<i>Reacciones en cadena de los radicales libres</i>	<i>6</i>
<i>I.7</i>	<i>Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)</i>	<i>7</i>
<i>I.8</i>	<i>Clasificación y estructura química de los polifenoles</i>	<i>13</i>
<i>I.9</i>	<i>Reacción de Maillard</i>	<i>17</i>
<i>I.10</i>	<i>Productos finales de glicación avanzada (AGEs)</i>	<i>18</i>
<i>I.11</i>	<i>Estructura de un polisacárido</i>	<i>19</i>
<i>I.12</i>	<i>Cromatografía de capa fina</i>	<i>21</i>
<i>I.13</i>	<i>Vibraciones típicas de los átomos</i>	<i>23</i>
<i>I.14</i>	<i>Espectros de RMN del Etanol a 60 MHz con baja y alta resolución</i>	<i>25</i>
<i>I.15</i>	<i>Espectro electromagnético</i>	<i>27</i>
<i>II.1</i>	<i>Métodología del trabajo realizado</i>	<i>28</i>
<i>II.2</i>	<i>Preparación de la semilla</i>	<i>31</i>
<i>II.3</i>	<i>Extracción por maceración</i>	<i>32</i>
<i>II.4</i>	<i>Filtración del extracto y secado de semillas</i>	<i>32</i>
<i>II.5</i>	<i>Rotavapor utilizado para la concentración de los extractos.</i>	<i>33</i>
<i>II.6</i>	<i>Disolución de extractos de C. argyrosperma</i>	<i>33</i>
<i>II.7</i>	<i>Cromatogramas con muestra en placas de (TLC)</i>	<i>34</i>

II.8	<i>Rociado de cromatogramas</i>	34
II.9	<i>Proceso para la obtención de CA-MI</i>	35
II.10	<i>Cromatografía en capa fina</i>	35
II.11	<i>Columna de cromatografía empacada con silica gel</i>	36
II.12	<i>Columna de Sephadex LH20</i>	37
II.13	<i>Hidrólisis ácida de PLS</i>	38
II.14	<i>Preparación de cromatografía ascendente</i>	39
II.15	<i>Cámara cromatográfica</i>	40
II.16	<i>Revelado de los estándares y PLS</i>	40
II.17	<i>Formación del radical cationico ABTS</i>	45
III.1	<i>Porcentaje de Rendimiento de los extractos</i>	50
III.2	<i>Prueba de actividad antioxidante</i>	51
III.3	<i>Espectro de FT-IR del polisacárido</i>	53
III.4	<i>Espectro de IR de un polisacárido aislado de calabaza</i>	54
III.5	<i>Espectro de <sup>1</sup>H RMN del polisacárido</i>	56
III.6	<i>Espectro de <sup>13</sup>C RMN del polisacárido</i>	57
III.7	<i>Estructura propuesta del polisacárido de Cucurbita argyrosperma</i>	58
III.8	<i>Espectro COSY para PLS</i>	59
III.9	<i>Ensayo de captación del radical DPPH</i>	60
III.10	<i>Reacción entre el radical libre (DPPH•) y un antioxidante a la forma (DPPH)</i>	60
III.11	<i>Captación del radical hidroxilo (PLS y control)</i>	62
III.12	<i>Captación del radical ABTS a diferentes concentraciones</i>	64
III.13	<i>Inhibición en la formación de AGEs por PLS</i>	66

## Índice de Tablas

<i>No.</i>	<i>Nombre</i>	<i>Pág.</i>
II.1	<i>Reactivos y disolventes</i>	29
II.2	<i>Dilución seriada de (PLS) para ensayo DPPH.</i>	42
II.3	<i>Concentración y volúmenes de Trolox.</i>	43
II.4	<i>Dilución seriada de muestra para ensayo ABTS.</i>	44
II.5	<i>Ajuste de absorbancia a <math>0.7 \pm 0.2</math></i>	44
II.6	<i>Concentración y volúmenes de PLS</i>	45
II.7	<i>Concentración y volúmenes de PLS.</i>	47
II.8	<i>Preparación de soluciones</i>	47
II.9	<i>Concentración y volúmenes de PLS.</i>	49
III.1	<i>Relación de frentes (Rf)</i>	52
III.2	<i>Cambio químico de las señales de los espectros RMN de <math>^1\text{H}</math> y <math>^{13}\text{C}</math>.</i>	55

## Índice de Gráficas

<i>No.</i>	<i>Nombre</i>	<i>Pág.</i>
III.1	<i>Actividad de captación de radicales DPPH</i>	61
III.2	<i>Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de PLS en la captación del radical ABTS<sup>+</sup></i>	62
III.3	<i>Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de Trolox en la actividad de captación del radical ABTS<sup>+</sup></i>	63
III.4	<i>Porcentaje de inhibición de PLS en la captación del radical hidroxilo</i>	64
III.5	<i>Porcentaje de inhibición de PLS en la captación del radical superóxido</i>	65

## Resumen

Un antioxidante es cualquier sustancia, que, al ser comparada con un sustrato oxidable, retrasa o elimina la oxidación de dicho sustrato. Los antioxidantes inhiben la oxidación de biomoléculas con la finalidad de evitar reacciones de oxidación en cadena.

La presente investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar un polisacárido con efecto antioxidante y antiglicante contenido en las semillas de *Cucurbita argyrosperma*. Para lograr tal propósito se empleó un extracto metanólico y mediante biofraccionamiento se aisló un polisacárido. Posteriormente se caracterizó por medio de Espectroscopia de Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  en dos dimensiones.

La actividad antioxidante del polisacárido aislado se evaluó por diferentes ensayos *in vitro*. Lo anterior incluye la captación de radicales superóxido, para la cual se obtuvo un porcentaje de inhibición del 35.23% al 67.01%, mientras que la captación del radical hidroxilo mostró un porcentaje de inhibición del 18.77% al 45.56%, en tanto que los radicales (DPPH) tuvieron un porcentaje de inhibición del 36.72% al 93.9%. Además, la captación del radical catiónico (ABTS<sup>+</sup>) representó un porcentaje de inhibición del 26.5% al 71.15%.

La inhibición de productos finales de glicación avanzada se realizó mediante el método de BSA, obteniendo un porcentaje de inhibición del 33.33% al 55.05%. Por tanto, las semillas de calabaza *C. argyrosperma* pueden ser una opción para el tratamiento de padecimientos relacionados con radicales libres.

El estudio de espectrometría de infrarrojo mostró picos característicos de un polisacárido y la presencia de un pico intenso se atribuyó a las vibraciones de estiramiento del grupo hidróxilo de los enlaces de hidrógeno. Los picos complejos se deben a la vibración de estiramiento de la banda glucosídica (C-O-C) y la del grupo lateral C-OH. No obstante, la fuerte absorción a 917  $\text{cm}^{-1}$  sugirió la abundancia de enlaces  $\beta$ -glucosídicos y el pico débil a 851  $\text{cm}^{-1}$  aseguró la presencia de un enlace glucosídico.

El polisacárido aislado mostró señales de cuatro protones anoméricos en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , indicando que estaba formado por cuatro tipos de azúcares. De igual manera, otros desplazamientos químicos de hidrógeno indicaron que las posiciones de C-2 a C-6 de los

residuos de azúcar se acumularon en el campo de 3.3 a 3.8 ppm. Además, las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  manifestaron que el polisacárido era de la forma  $\alpha$  y  $\beta$ .

El polisacárido se compone de cuatro residuos, unidos entre sí por enlaces glucosídicos, los cuales se identificaron de acuerdo a los siguiente: el residuo A se distinguió como  $\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Galactopiranososa}$ , seguido del residuo B que se señaló como  $\rightarrow 3)-\beta\text{-D-Galactopiranososa-(1}\rightarrow$ , el residuo C se asignó como  $\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-Glucopiranososa}$ , En cambio, las correlaciones (C-1/H-1) mostraron que el residuo D correspondió a  $\alpha\text{-Glucopiranososa libre}$ .

Palabras clave: antioxidante, polisacárido, AGEs, *Cucurbita argyrosperma*.

## Abreviaturas

**PLS:** polisacárido

***C. argyrosperma:*** *Cucurbita argyrosperma*

**DPPH:** 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:** Cloruro de metileno

**CHCl<sub>3</sub>:** Cloroformo

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**ERO:** Especies Reactivas de Oxígeno

**ERN:** Especies Reactivas de Nitrógeno

**DM:** Diabetes Mellitus

**AGEs:** Productos Finales de Glicación Avanzada

**ABTS:** Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

**Trolox:** Ácido-6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

**BSA:** Albúmina de Suero Bovino

**NBT:** Nitroazul de tetrazolio

**AG:** aminoguanidina

**GC:** glucosa

**IR:** Espectrometría en el infrarrojo

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**EC<sub>50</sub>:** Concentración que provoca una respuesta al 50%.

**Galp:** Galactopiranososa

**GlcP:** Glucopiranososa

## Introducción

El ritmo actual de vida propicia malos hábitos alimenticios, al consumir alimentos con baja calidad nutricional y un gran contenido calórico, en lugar de incluir alimentos de origen natural. Lo anterior influye en el aumento de problemas de salud en la sociedad principalmente desnutrición y obesidad.

En años recientes existe un gran interés en el estudio de compuestos bioactivos que tengan capacidad de inhibir radicales libres, mismos que están relacionados con enfermedades crónico-degenerativas, por mencionar diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas<sup>1</sup>. Los radicales libres son cualquier sustancia química con uno o más electrones desapareados, inestables que pueden reaccionar fácilmente con otras moléculas. Aunado a esto, la exposición a contaminantes, la radiación y solventes industriales ayudan a la creación de estos radicales libres<sup>2</sup>.

La mayoría de frutas, vegetales, semillas y plantas contienen diversas sustancias que actúan como antioxidantes. Los antioxidantes tienen la función de retardar la tasa de oxidación de radicales libres en el organismo y en los alimentos evitar la descomposición<sup>3</sup>. La industria alimenticia, química y de procesos busca nuevas tecnologías, soluciones, metodologías y productos lo cual implica que los alimentos estén enfocados a ser saludables y menos procesados<sup>4</sup>.

*C. argyrosperma* pertenece al género *Cucurbita* y es miembro de la familia *Cucurbitaceae*<sup>5</sup>, se emplea con fines medicinales y nutricionales, en tanto que las semillas forman parte de la preparación de diversos platillos en México. Estudios muestran que *Cucurbita pepo* se usa en muchos países para el tratamiento de diversas enfermedades, por ejemplo, como anti-inflamatorio, antiviral, trastornos urinarios, anticelulosos, antidiabéticos y antioxidantes. Su principal uso es alimenticio tanto en Latinoamérica como en otras regiones del mundo donde ha sido introducida.

Por ello el presente proyecto pretendió aislar y caracterizar los compuestos bioactivos responsables de la actividad antioxidante y anti-glicación de las semillas de calabaza *C. argyrosperma* debido a que no existen estudios acerca de esta especie. Asimismo, el estudio de las reacciones oxidativas ha incrementado hasta nuestros días y en prospección los polisacáridos

aislados de plantas han captado la atención en el campo biomédico debido a sus propiedades terapéuticas y toxicidad relativamente baja. En adición, los estudios acerca de la actividad antioxidante y mecanismos de los polisacáridos están aún en una etapa exploratoria.

## Objetivos

### Objetivo general

Aislar y caracterizar los compuestos con actividad antioxidante y anti-glicación contenidos en las semillas de *C. argyrosperma*.

### Objetivos específicos

- Preparar los extractos *C. argyrosperma* con disolventes de diferente polaridad.
- Aislar los bioactivos por métodos cromatográficos a partir de los extractos con actividad antioxidante.
- Caracterizar los bioactivos por medio de Espectroscopia de Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  en 2D.
- Realizar ensayos *in vitro* de actividad antioxidante a los compuestos aislados.
- Realizar un ensayo de glicación *in vitro* por el método BSA a los compuestos aislados.

## Hipótesis

Los metabolitos secundarios contenidos en las semillas de *C. argyrosperma* tendrán efecto sobre la inhibición de radicales libres y la glicación de proteínas.

# CAPÍTULO I

## Antecedentes

### I.1 *Cucurbita argyrosperma*

#### I.1.1 Origen

La calabaza es uno de los vegetales más importantes en México que pertenece al género *Cucurbita* con un total de 20 especies y subespecies, siendo *Cucurbita pepo* la más popular y distribuida, mejor conocida como “calabacita o calabacín”. En este sentido, nuestro país es un importante centro de diversidad del género *Cucurbita*, puesto que se cultivan varias especies que prosperan en estado silvestre y algunas calabazas reciben nombres como “calabazas de castilla”<sup>5</sup>.

La familia *Cucurbitaceae* forma un amplio grupo con aproximadamente 130 géneros y 800 especies y pueden plantarse en las regiones más cálidas del mundo. En México existen evidencias arqueológicas de su consumo desde 7000 a.C. En tanto, fue ampliamente cultivada por los pueblos indígenas en México, América Central y América del Norte antes de la llegada de los españoles. Esta planta es nativa del norte de México y el sudoeste y este de Estados Unidos<sup>6</sup>. A diferencia de lo que ocurre con otras especies del género *Cucurbita*, la información difundida sobre *C. argyrosperma* fuera del continente americano es escasa. Las *Cucurbitaceae* son de importancia para la economía y cultura de diversas sociedades al formar parte de las primeras plantas domesticadas por el hombre, aprovechándolas como alimento y con fines medicinales.

*C. argyrosperma*<sup>7</sup>; también identificada como “calabaza pipiana o pipián” se aprecia en muchas partes de México y Centroamérica; dado que las semillas forman parte de diversos platillos tradicionales. De acuerdo a restos arqueológicos hallados en el valle de Tehuacán en el estado de Puebla sugieren que el origen de *C. argyrosperma* fue en el centro-sur de la República Mexicana, con un área de distribución nativa desde el suroeste de Estados Unidos hasta Centroamérica<sup>8, 9</sup>. Ahora bien, *C. argyrosperma* cuenta con dos subespecies, primero, *argyrosperma* consta de cuatro variedades; *argyrosperma*, *callicarpa*, *stenosperma*, y *palmieri*, las tres primeras forman parte de todos los tipos cultivados, en tanto *palmieri* corresponde a

poblaciones poco recurrentes. Segundo, *sororia*, incluye poblaciones silvestres con una amplia distribución de México a Nicaragua<sup>10</sup>.

### I.1.2 Clasificación taxonómica y descripción botánica

*C. argyrosperma* tiene un número cromosómico  $2n=40$  y la clasificación taxonómica se muestra como sigue<sup>11</sup>:

**Nombre común:** pipián, calabaza pipiana, calabaza, calabaza pinta

**Reino:** *Plantae*

**División:** *Magnoliophyta*

**Clase:** *Magnoliopsida*

**Orden:** *Cucurbitales*

**Familia:** *Cucurbitaceae*

**Género:** *Cucurbita*

**Especie:** *argyrosperma*

**Subespecie:** *argyrosperma*

*C. argyrosperma* es una planta herbácea, rastrera o trepadora, vellosa y áspera, con tricomas cortos, rígidos, engrosados y punzantes de raíces fibrosas y tallos ligeramente angulosos. Posee hojas pecioladas de hasta 35 cm con manchas blancas y lóbulos triangulares o elípticos, márgenes denticulados o aserrados. Sus flores son monoicas, solitarias y axilares de corola blanco-amarillenta a naranja, las flores masculinas tienen pedicelos de hasta 20 cm y las flores femeninas presentan pedúnculos robustos de 3.5 a 6.5 cm. (Figura I.1)



Figura I.1 Morfología de *C. argyrosperma*<sup>12</sup>.

Los frutos varían de tamaño de 14 a 50 cm de diámetro, con características piriformes o claviformes, cortos o largos y rectos o encorvados en la parte más delgada. Su corteza es rígida, lisa a levemente acostillada, blanca con franjas verdes, reticuladas o blancas. (Figura I.2).



*Figura I.2 Calabaza pipiana*<sup>13</sup>.

El color de la pulpa de *C. argyrosperma* es amarillo-naranja de sabor dulce, en su interior las semillas son de 1.5-3.5 cm de largo, 0.7 a 1.7 cm de ancho, planas a tumescentes, elípticas a lanceoladas, márgenes bien definidos, angostos a muy anchos e inflados, lisos y ligeramente ondulados, nulo o ligeramente fibrillosos, ápice angostado y ligeramente oblicuo. El centro de las semillas es de color blanco o blanco opaco, en ocasiones blanco-amarillento a pardo claro u obscuro y en particular con los márgenes de diferente color, desde verde grisáceos o azul-verde-grisáceo, hasta pardo claro o dorado <sup>14</sup>. (Figura I.3).



*Figura I.3 Calabaza pipián o chigua (C. argyrosperma)*<sup>15</sup>.

### I.1.3 Usos y propiedades medicinales

Los frutos inmaduros de calabaza por lo general son consumidos como vegetales, tal es el caso de las flores, que sirven de ingrediente en la preparación de quesadillas. En algunos lugares la pulpa de los frutos maduros se hierva con azúcar y canela para prepararse como dulce.

Las semillas pueden comerse enteras, asadas, tostadas o molidas y constituyen un ingrediente esencial en la elaboración de diferentes guisos; ejemplo de ello el mole verde o pipián<sup>5</sup>. Además, las semillas son ricas en aceite y se utilizan para la elaboración de dulces artesanales tales como palanquetas, alegrías y obleas.

Estudios muestran que *Cucurbita pepo*, en muchos países se emplea en el tratamiento de diversas enfermedades, tales como un antiinflamatorio, antiviral, trastornos urinarios, anticelurosos, antidiabéticos y antioxidantes. Reportes muestran que también tiene importantes propiedades fisiológicas como curación de heridas, inhibición del crecimiento tumoral, efectos hipoglucemiantes e inmunomoduladores<sup>16</sup>. Cabe mencionar que los frutos de calabaza se caracterizan por un bajo contenido de grasa, un pequeño porcentaje de la pulpa tiene un bajo contenido de aceite, carbohidratos, proteínas<sup>17</sup> y un gran contenido de carotenoides<sup>18</sup>.

El valor alimenticio por cada 100 g es de 80 kcal, 11.46% de fibra cruda y 16% de ceniza. Asimismo, el contenido de minerales de los frutos de calabaza arroja altos valores de manganeso (500 µg/kg), hierro (1370 µg/kg), cobre (3900 µg/kg), plomo (2900 µg/kg), fósforo (11,380 µg/kg), níquel (500 µg/kg), calcio (179,000 µg/kg), magnesio (190,000 µg/kg), sodio (159,000 µg/kg), y potasio (160,000 µg/kg)<sup>19</sup>.

En conjunto, las semillas de calabaza y el aceite de semillas son una fuente natural de fitoesteroles<sup>20</sup>, proteínas, ácidos grasos polinsaturados<sup>21</sup>, antioxidantes, vitaminas, carotenoides y tocoferoles<sup>22</sup>.

### I.1.4 Distribución y cultivo en México

En relación con la variación geográfica de *C. argyrosperma ssp soria*, esta comprende desde México hasta Centroamérica regularmente dentro de un intervalo de altitud y clima similar, que prospera en zonas medias y bajas generalmente de ambas vertientes de México que oscila entre los 0 a 1800 m; cubriendo la Sierra Madre Occidental y Oriental, abarcando algunos valles como la Cuenca del Balsas y la Depresión Central de Chiapas.

Existen únicos registros en Tamaulipas, Veracruz y zonas aledañas al noroeste de Oaxaca, mientras que al oeste la distribución se extiende de Sonora hasta Chiapas y hacia el sur<sup>23</sup>, como se muestra en la (Figura I.4).

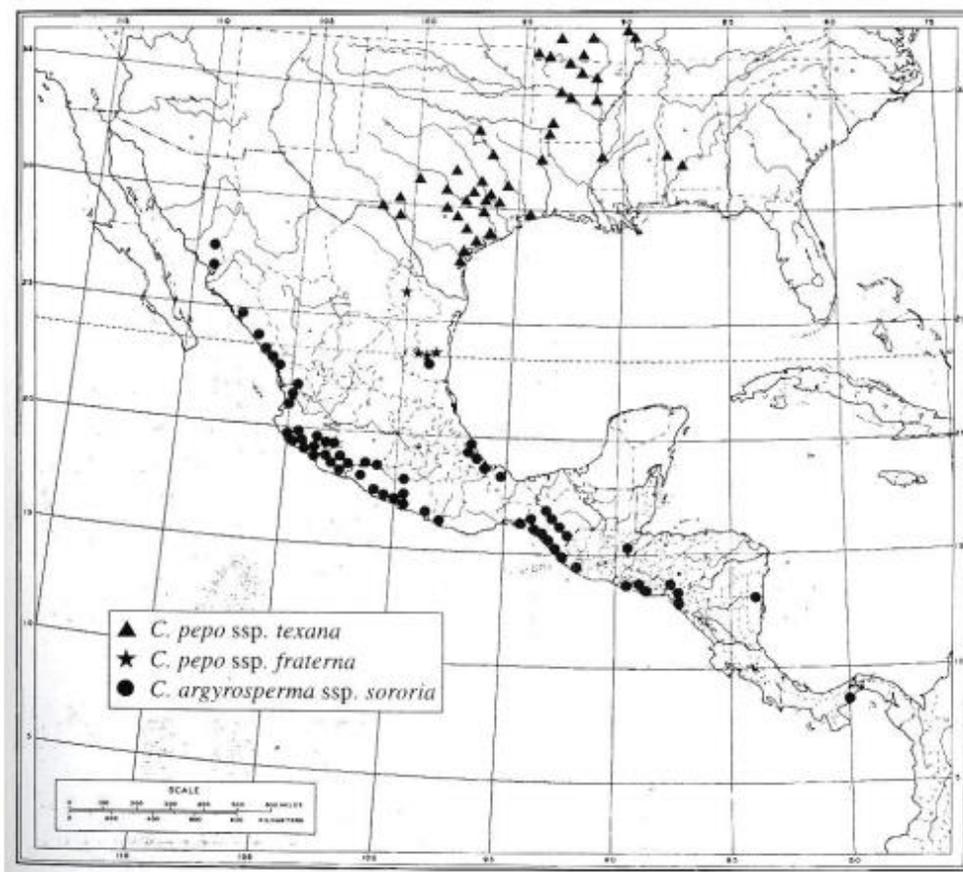


Figura I.4 Distribución geográfica de los taxa silvestres de los grupos *argyrosperma* y *pepo*<sup>9</sup>.

En México, existen registros de *C. argyrosperma* para los estados de Chihuahua, Chiapas, Guerrero, Guanajuato, Jalisco, Morelos, Michoacán, Nayarit, Quintana Roo, Oaxaca, San Luis Potosí, Puebla, Sonora, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas<sup>8,9</sup>. En la actualidad los registros de presencia de la especie *C. argyrosperma* se muestran en la Figura I.5. No obstante, *C. argyrosperma* se cultiva anualmente en un sistema de producción tradicional conocido como “milpa” en la modalidad de temporal principalmente y que, durante la época seca, mediante riego puede tener un segundo ciclo de cultivo. En México, por lo general se siembra en los meses de mayo y junio; durante julio-septiembre florece y fructifica de septiembre a diciembre<sup>14,25</sup>.

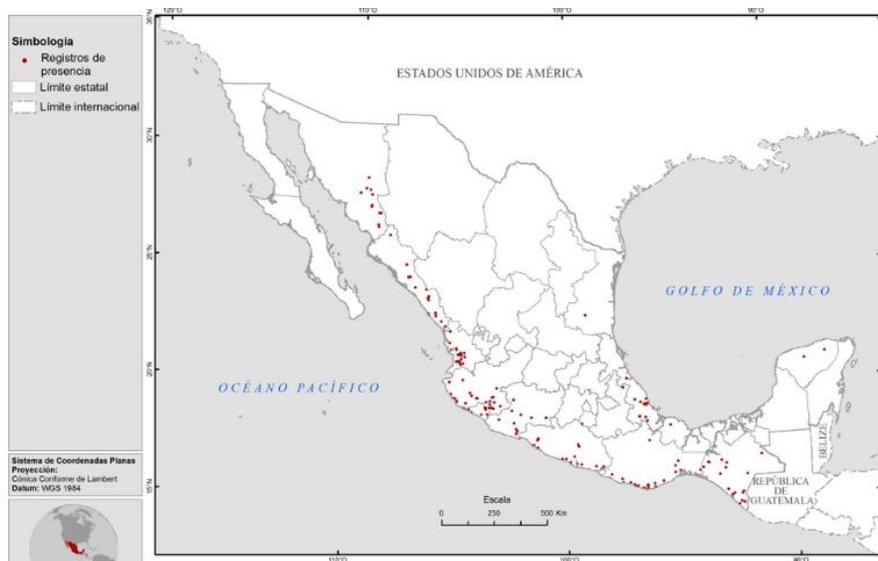


Figura I.5 Registros de presencia “calabaza de castilla”<sup>24</sup>.

## I.2 Radicales libres

La química de los radicales libres y antioxidantes se basa en un equilibrio entre ambos. Los primeros son compuestos reactivos que capturan electrones de moléculas biológicas estables provocando un daño, mientras que los antioxidantes neutralizan a los radicales libres.

Dicho proceso tiene tres pasos definidos, la iniciación, donde se da lugar a la formación de radicales libres; seguido de la propagación, aquí sucede la reacción con otras moléculas y por último la terminación, cuando se transforman en otros productos como se muestra en la (Figura I.6).

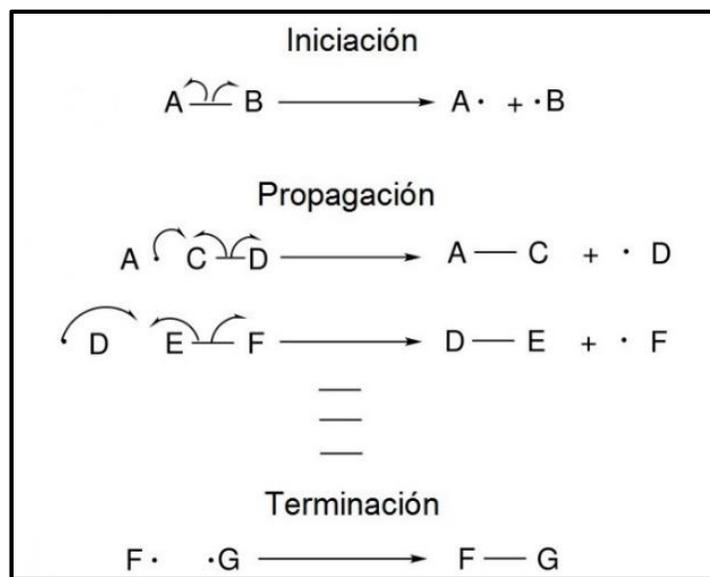


Figura I.6 Reacciones en cadena de los radicales libres<sup>26</sup>.

Los radicales libres son átomos, moléculas o iones con electrones desapareados que son inestables y activos para reaccionar con otros compuestos. En cuanto a especies radicales se refiere, existen tres clases principales, las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN), las Especies Reactivas de Azufre (ERA)<sup>39</sup>

Las ERO incluyen a radicales como el radical superóxido ( $O_2^- \cdot$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), radical hidroperoxilo ( $HO_2 \cdot$ ), el óxido nítrico (NO), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y también el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), ácido hipocloroso (HClO) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Las ERN provienen de la reacción entre óxido nítrico y el radical superóxido, por su parte la producción de ERA es posible por la reacción de ERO con grupos tioles<sup>26</sup>.

La Figura I.7 presenta la formación de algunas Especies Reactivas de Oxígeno. La Reacción 1 corresponde al radical hidroperoxilo, que al disociarse a un pH de 7.4 genera el anión superóxido (Reacción 2). Por lo que, al ser muy activo puede reaccionar con otras moléculas y producir ERO en forma directa o en presencia de procesos catalizados, por enzimas o metales.

Después, por medio de una reacción de dismutación, la enzima superóxido dismutasa (SOD) cumple la función de desintoxicar al radical superóxido y produce peróxido de hidrógeno (Reacción 3). Finalmente, el peróxido de hidrógeno puede reaccionar con  $Fe^{+2}$  y catalizar la misma dando lugar a la (Reacción 4), generando así el radical hidroxilo; un radical sumamente reactivo que finalmente reacciona con la enzima catalasa (CAT) y forma agua.

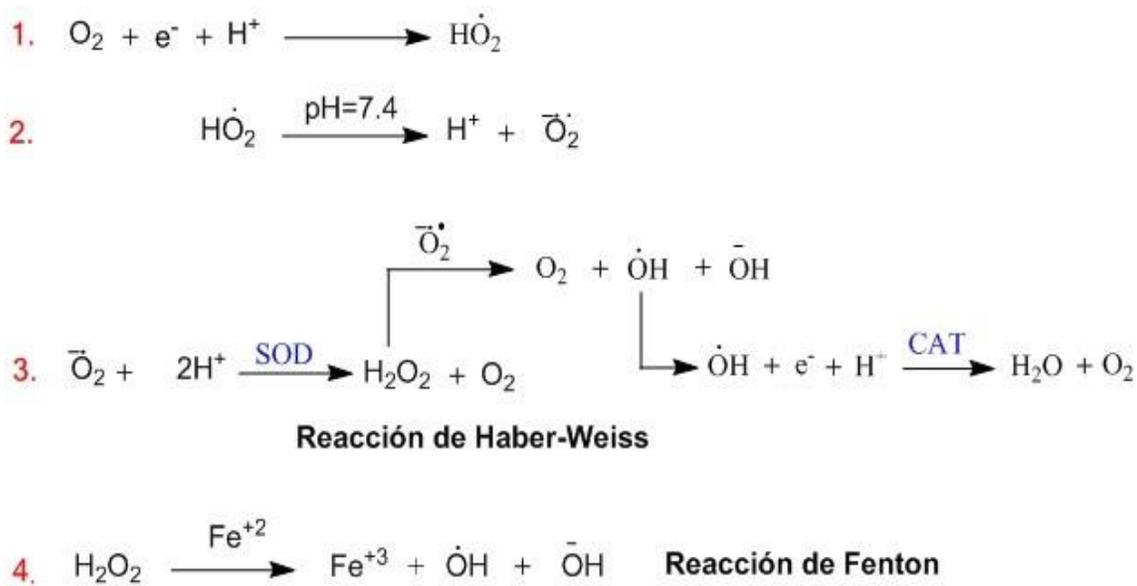


Figura I.7 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)<sup>27</sup>.

Por lo que se refiere a radicales libres y otras ERO, normalmente se generan de procesos metabólicos esenciales en el cuerpo humano, entre ellos la inflamación, infecciones microbianas que activan fagocitos o ejercicio físico. Algunos factores externos sirven de ayuda en este propósito, ejemplo de ello: la acción de contaminantes ambientales, exposición a toxinas por fumar cigarrillos, radiación, consumo de drogas, productos químicos, solventes industriales y ozono.

Si bien algunos elementos son pieza clave para la vida humana, el oxígeno puede tener efectos nocivos a través de especies reactivas. Incluso, la producción y neutralización de especies reactivas es un proceso complejo, por lo que sí existe una tendencia en el aumento de (ERO), las células sufrirán los efectos del estrés oxidativo<sup>28</sup>.

### I.2.1 Relación con el estrés oxidativo

Los radicales libres que representan a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO/ERN), se contrarrestan mediante los sistemas de protección antioxidante del organismo, donde su capacidad es puesta a prueba. Por lo que los antioxidantes endógenos al combatir el ataque oxidativo, carecen de capacidad para contrarrestarlo. El estrés oxidativo comprende una cantidad excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO), resultado de un desequilibrio entre la generación y agotamiento de los mismos<sup>29</sup>.

Además, este proceso puede afectar a diversas estructuras celulares, ejemplo de ello, membranas, proteínas, lipoproteínas, lípidos e inclusive ácido desoxirribonucleico (ADN). Tal es el caso del radical hidroxilo y peroxinitrito que al estar en exceso pueden desencadenar peroxidación lipídica, afectando membranas celulares y lipoproteínas a su paso. Por consiguiente, se propicia la generación de malondialdehído y compuestos dienos conjugados, considerados citotóxicos y mutagénicos. Desde luego la peroxidación lipídica se propaga con rapidez y causa un deterioro a un gran número de moléculas lipídicas.

Otra afectación del estrés oxidativo tiene lugar en las proteínas al reducir o perder su actividad enzimática. El daño causado por los radicales libres en el estrés oxidativo se ha relacionado con diversas patologías entre ellas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatorias y diabetes<sup>30</sup>. Por ello las reacciones que involucran (ROS) se han relacionado con enfermedades tales como la diabetes.

### I.2.1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (**DM**) es una enfermedad relacionada con trastornos endocrinos y metabólicos caracterizado de un gran nivel de glucosa en la sangre (hiperglucemia), consecuencia de ello puede ge

nerar trastornos del metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas<sup>31</sup>, esto debido a la insuficiencia en la acción o producción de insulina.

De forma que, la insulina permite el paso de la glucosa de la sangre a las células para producir energía, por tal motivo si la insulina no está presente o tiene anormalidades, provoca que la glucosa no entré en las células y permanezca en la sangre y pueda llegar a valores que pongan en riesgo la salud de quien la presenta. La insulina se produce en la región del páncreas conocida como islotes de Langerhans dentro de las células beta y se libera con base a las necesidades del organismo<sup>32</sup>.

La diabetes se puede clasificar de diversas maneras, pero de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes, es como sigue:

- Diabetes tipo I (Dependiente de la insulina):
- Diabetes idiopática es la Diabetes tipo I, que se refiere a formas infrecuentes de la enfermedad y se desconoce la causa de la misma.
- Diabetes tipo II (No dependiente de la insulina)
- Diabetes mellitus gestacional: intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento de embarazo.

Sin embargo, la diabetes se clasifica en dos tipos comunes: Diabetes tipo I (IDDM) y Diabetes tipo II (NIDDM), por sus siglas en inglés. La DM tipo I no dependiente de la Insulina (IDDM) se caracteriza por una deficiencia de la secreción de insulina a causa de la destrucción autoinmune de células  $\beta$  pancreáticas, que inducen alteraciones metabólicas. La DM tipo II no dependiente de la insulina (NIDDM) conduce a una secreción de insulina dañada por las células beta pancreáticas, lo cual se refleja en una resistencia a la insulina. Por tanto, los pacientes con diabetes pueden sufrir complicaciones en todo momento, entre ellas, complicaciones metabólicas agudas, en un corto plazo, tales como: infecciones, cetoacidosis diabética, hiperglucemia, fatiga, visión borrosa. Además, de complicaciones crónicas (sistemáticas): a

largo plazo, ejemplo de ello: ceguera, neuropatía, aterosclerosis, enfermedad vascular periférica, amputación, y enfermedad cerebro vascular<sup>33</sup>.

A nivel nacional, de acuerdo al informe *Health at a Glance*<sup>34</sup> 2017, sobre la prevalencia de diabetes tipos I y II, México es el primer lugar de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE), con el 15.8% de la población de entre 20 y 79 años que padecen esta enfermedad en comparación a los otros países miembros, donde el promedio oscila en un 7%.

Por otro lado, los datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) registraron en (2017), 106,525 defunciones a causa de la diabetes, lo que significó el 15% del total de muertes en nuestro país<sup>35</sup>.

Con respecto a cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la cifra de personas con diabetes en el mundo aumento considerablemente ya que en 1980 era de 108 millones, para 2014 se estimó en 422 millones. De hecho, la prevalencia aumentó rápidamente en países de ingresos bajos y medianos, en adultos (mayores de 18 años), debido a que la cifra se incrementó del 4.7% en 1980 a 8.5% en 2014. Incluso, las predicciones de la OMS muestran que para 2030 será la séptima causa de muerte<sup>36</sup>.

Actualmente los tratamientos más comunes son la insulina y agentes hipoglucemiantes orales. Sin embargo, estos últimos pueden causar efectos secundarios significativos, como el aumento de peso y trastornos gastrointestinales, por lo que es preciso la búsqueda de productos naturales con la finalidad de reducir estos<sup>31</sup>.

### 1.3 Antioxidantes

El origen de los antioxidantes se remonta a la antigüedad en particular a los conocimientos técnicos que los egipcios tenían en la preservación de cuerpos sin vida, mediante el uso de extractos de plantas ricos en polifenoles. Asimismo, la oxidación propició la investigación a fondo de los mecanismos de oxidación y como contrarrestarlos por medio de simples antioxidantes químicos. Si bien, estos estudios eran empíricos, entre 1870 y 1900, para 1940 ya se habían dilucidado los mecanismos de autooxidación de los radicales libres, así como la identificación de algunos antioxidantes que rompían cadenas.

En 1960 Denham Harman propuso que el envejecimiento estaba asociado con cambios progresivos causados por el daño acumulativo de radicales libres, de inmediato se planteó la posibilidad de que los antioxidantes retrasarían el proceso de envejecimiento y la vida útil<sup>37</sup>.

En efecto cada día nuestro organismo genera moléculas conocidas como radicales libres, su producción es necesaria y benéfica, pero sí el número de radicales aumenta, su eliminación es indispensable, por ello las frutas, semillas, vegetales y plantas juegan un papel fundamental porque contienen sustancias que actúan como antioxidantes<sup>38</sup>. Los antioxidantes son importantes en la prevención de enfermedades inhibiendo o retrasando la oxidación de las biomoléculas al evitar el inicio o la propagación de reacciones oxidantes en cadena<sup>39</sup>.

Haliwell<sup>40</sup> define los antioxidantes como cualquier sustancia, que, a bajas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, disminuyen significativamente la oxidación del mismo. Esta definición, también aplica a aquellos antioxidantes que interaccionan con radicales libres dentro de nuestro cuerpo o cuando se utilizan como aditivos alimentarios. Además, los antioxidantes siguen algún tipo de mecanismo de acción, de acuerdo al tipo de oxidante, y estos pueden ser: secuestro de radicales libres del medio, quelación de iones metálicos, inhibición de enzimas que producen radicales libres, activación de enzimas endógenas, prevención de peroxidación de lípidos, prevención de daño al ADN y prevención de modificación de proteínas<sup>41</sup>.

En un sentido más amplio un antioxidante es “cualquier sustancia que elimine directamente Especies Reactivas de Oxígeno (**ERO**), permita de forma indirecta regular el aumento de las defensas antioxidantes o inhiba la formación de (**ERO**)<sup>42</sup>. Por lo que un compuesto se considera como antioxidante de acuerdo a la capacidad de secuestrar un radical y formar un nuevo radical, que sea estable a través del enlace hidrógeno intermolecular en la oxidación posterior<sup>40</sup>.

Ahora bien, la investigación en antioxidantes ha tenido un desarrollo considerable en los últimos años y ha aportado mayor información de los radicales libres, el estrés oxidativo, así como sus efectos. Por consiguiente, un exceso de radicales libres puede ocasionar un desequilibrio entre antioxidantes/radicales, y causar estrés oxidativo, que conduce a diversas enfermedades<sup>41</sup>.

Los antioxidantes endógenos se agrupan en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Con respecto a los antioxidantes enzimáticos se dividen en defensas enzimáticas primarias y secundarias. La defensa enzimática primaria evita la formación o neutraliza radicales libres a

través de tres enzimas: glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa. Por su parte la defensa enzimática secundaria incluye al glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ambas enzimas tienen la función de dar soporte a otros antioxidantes endógenos. Ahora bien, existen varios antioxidantes endógenos no enzimáticos, a saber, vitaminas, cofactores enzimáticos, compuestos nitrogenados y péptidos<sup>42</sup>. Si bien el sistema antioxidante endógeno cumple su propósito, el hombre depende de varios tipos de antioxidantes presentes en la dieta para así poder equilibrar la concentración de radicales libres<sup>43</sup>.

Los antioxidantes exógenos los cuales pueden ser: vitaminas, flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, minerales y compuestos organosulfurados. Por consiguiente, las principales fuentes de estos compuestos provienen de frutas y verduras. En adelante, existe otra fuente de antioxidantes exógenos, que está constituida por suplementos dietéticos que proveen nutrientes que no están presentes en la dieta. Estos complementos alimenticios, pueden contener vitamina A, vitaminas C y E, licopeno, luteína, ubiquinona, glutatión, polifenoles, resveratrol y N-acetilcisteína<sup>44</sup>.

### I.3.1 Compuestos con efecto antioxidante en plantas

Los antioxidantes abarcan diferentes compuestos que pueden interferir con los ciclos oxidativos para inhibir o retardar el daño oxidativo. Existen compuestos con actividad antioxidante entre estos: vitaminas, carotenoides y polifenoles.

Las vitaminas C y E son nombres genéricos del ácido ascórbico y tocoferoles, la vitamina C es el antioxidante hidrofílico más importante porque es efectivo en la eliminación de radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, así como oxígeno singlete. Su estructura tiene cuatro grupos hidroxilo que pueden donar hidrógeno a un sistema antioxidante. La vitamina E actúa como antioxidante por medio de un mecanismo de donación de electrones y otro de aceptación de rotura de cadena.

En igual forma, al menos sesenta carotenoides provienen de frutas y vegetales que son consumidos por el ser humano. Los carotenos ( $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno) y los hidroxicarotenoides (xantofilas y luteína), están presentes en la dieta diaria y son inhibidores efectivos de oxígeno singlete y secuestradores de (ERO)<sup>45</sup>. El  $\beta$ -caroteno es considerado uno de los antioxidantes más poderosos contra el oxígeno singlete y la inhibición de la oxidación en lípidos. Por otro lado, el licopeno es el inhibidor de oxígeno singlete más efectivo de los carotenoides y también

destaca su capacidad de atrapar radicales peroxilo ( $HOO\cdot$ ). Las xantofilas son carotenoides oxigenados y se encuentran por lo general como pigmentos amarillos en las hojas.

Los polifenoles están presentes en la mayoría de las plantas, por lo que forman parte integral de la dieta humana. Cerca de 800 estructuras fenólicas están dispersas en el reino de las plantas, mismas que son ingeridas en los alimentos. Estos compuestos fenólicos pueden ser simples, de peso molecular bajo hasta compuestos complejos y polifenoles derivados<sup>46</sup>. A finales del siglo XX el interés en compuestos fenólicos incrementó por su capacidad antioxidante y eliminación de radicales libres. Los principales grupos de polifenoles son flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos<sup>47,48</sup>. (Figura I.8).

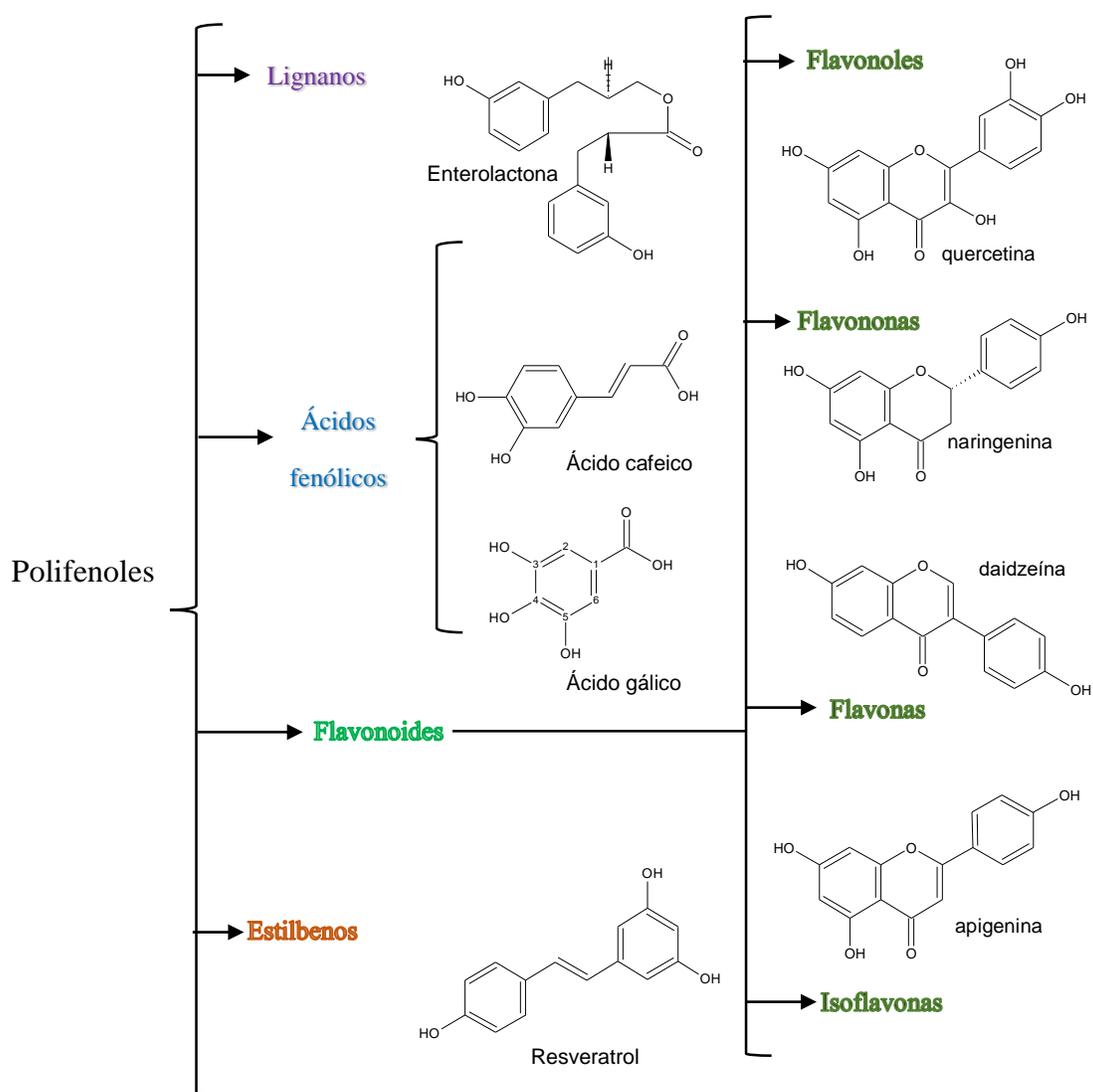


Figura I.8 Clasificación y estructura química de los polifenoles<sup>48</sup>.

Los flavonoides son pigmentos vegetales con abundancia en la naturaleza que a su vez se dividen en subclases siendo las más representativas las flavonas, flavononas, flavonoles, catequinas, antocianidas e isoflavonas. La estructura general de los flavonoides incluye un esqueleto C<sub>15</sub> (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sup>49</sup>. Los ácidos fenólicos se dividen en dos categorías según su estructura, a saber, derivados del ácido benzoico (compuestos con un anillo de benceno unido a grupo carboxílico) y derivados del ácido cinámico<sup>45</sup>.

Otra clase de compuestos fenólicos que muestran dos anillos aromáticos unidos entre sí por un puente de etano y existen en forma monomérica y oligomérica son los estilbenos. Por último, los lignanos son un grupo de compuestos fenólicos que están presentes en gran cantidad en semillas<sup>50</sup>. En consecuencia, a pesar de que frutas y vegetales contienen antioxidantes y son importantes para mitigar radicales libres y evitar el estrés oxidativo, cabe mencionar que su biodisponibilidad y el acceso a estos pueden ser limitados<sup>42</sup>.

### I.3.2 Antioxidantes sintéticos

Derivado de lo anterior se han desarrollado antioxidantes de origen sintético para ser agregados a los alimentos con el objetivo de prevenir la oxidación y prolongar su vida útil, principalmente ácidos grasos; todos estos actúan debido a la presencia de compuestos fenólicos. La tert-butilhidroquinona (TBHQ) tiene la función de estabilizar y conservar la frescura, el valor nutritivo, el sabor y el color de alimentos de origen animal. Además, el galato de octilo se considera seguro para utilizarse como aditivo en los alimentos. Por su parte, el BHT (Butilhidroxitolueno) y el BHA (Butilhidroxianisol) son de los antioxidantes de mayor uso, el BHT es insoluble en agua y soluble en aceites; se emplea para preservar aceites y lubricantes de origen vegetal, productos alimenticios, por ejemplo, cereales, grasas comestibles, arroz y productos de confitería<sup>51</sup>.

Por último, la industria química produce diversos antioxidantes sintéticos, pero es preciso obtener nuevos compuestos de origen natural que sean más seguros ya que los anteriormente mencionados pueden originar problemas de salud (52, 53).

### I.3.3 Aplicaciones

En cuanto a antioxidantes se refiere estos pueden ser naturales o sintéticos. Se emplean principalmente en alimentos, puesto que se han realizado estudios en plantas y algunas son una buena fuente de estos. La adición de estos evita que los alimentos se vuelvan rancios y por

consiguiente mitiguen la oxidación. Por lo general, los antioxidantes naturales actúan como agentes reductores al terminar la reacción en cadena de radicales libres y además evitan malos olores y sabores<sup>54</sup>.

Asimismo, los extractos derivados de productos naturales se han empleado por su actividad antioxidante en el biodiesel. Tal es el caso del biodiesel de soja ya que la adición de extractos de orégano, romero y albahaca aumentó la estabilidad oxidativa debido al contenido de polifenoles complejos y dímeros de lignano tales como el ácido rosmarínico<sup>55</sup>.

Otra posible aplicación que aún está en investigaciones es la utilización de antioxidantes naturales como estabilizadores de polímeros. Sin embargo, una gran variedad de compuestos ha sido añadida a polímeros para mejorar su estabilidad, los mejores prospectos son los carotenoides, flavonoides, fenoles naturales y compuestos fenólicos como el lignano<sup>56</sup>.

Entonces, la industria alimentaria, cosmética y terapéutica utilizan antioxidantes, entre estos lo de origen natural son una alternativa prometedora en lugar de los sintéticos, gracias a su compatibilidad con la ingesta dietética y sin efectos negativos en el cuerpo humano. En resumen, muchos antioxidantes se han identificado, procedentes de fuentes vegetales, como radicales libres o captadores de oxígeno activo<sup>54</sup>.

#### I.3.4 Análisis de actividad antioxidante

En cuanto actividad antioxidante, existen diversos ensayos *in vitro* para evaluarla a fin de establecer su utilidad en alimentos y en el cuerpo humano, entre otros. En general estos métodos se subdividen en dos categorías; la primera se basa en la transferencia de átomos de hidrógeno y que mide la capacidad de extinción de radicales libres, en ensayos como, Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC); por sus siglas en inglés, Parámetro Antioxidante de Atrapamiento de Radicales Total (TRAP), la inhibición de la oxidación inducida de lipoproteínas de baja densidad (DLD) y el ensayo de capacidad de eliminación de oxirradical total.

La segunda categoría mide la capacidad en la transferencia de sólo un electrón para reducir cualquier compuesto entre ellos metales, carbonilos y radicales, que producen un color, por ejemplo, el ensayo de la Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC), el ensayo de Poder Antioxidante Reductor de ion Férrico (FRAP) y el ensayo de captación del radical 2,2'-difetil-1-picrilhidracilo (DPPH). En tanto, los ensayos de la eliminación de radicales

superóxido, peróxido de hidrógeno y oxígeno singlete, solo evalúan la capacidad de eliminación de oxidantes<sup>57</sup>.

Incluso, los métodos empleados en la cuantificación de actividad antioxidante total, implican Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y que con algunos reactivos forman un complejo de color que se detecta espectrofotométricamente en diferentes longitudes de onda, por ejemplo: 520 nm para el ensayo (DPPH), 734 nm para el ensayo (TEAC) y 593 nm para el ensayo (FRAP). También, puede medirse por detección fluorométrica, tal es el caso del ensayo ORAC en una longitud de excitación de 540 nm y una de emisión de 545 nm<sup>45</sup>.

Hoy en día, se cuenta con diversos ensayos cada uno con un objetivo específico, y por consiguiente algunos de estos emplean antioxidantes sintéticos, como control positivo, para comparar la actividad antioxidante de fracciones de extractos de plantas, bebidas, alimentos, compuestos aislados, etc.

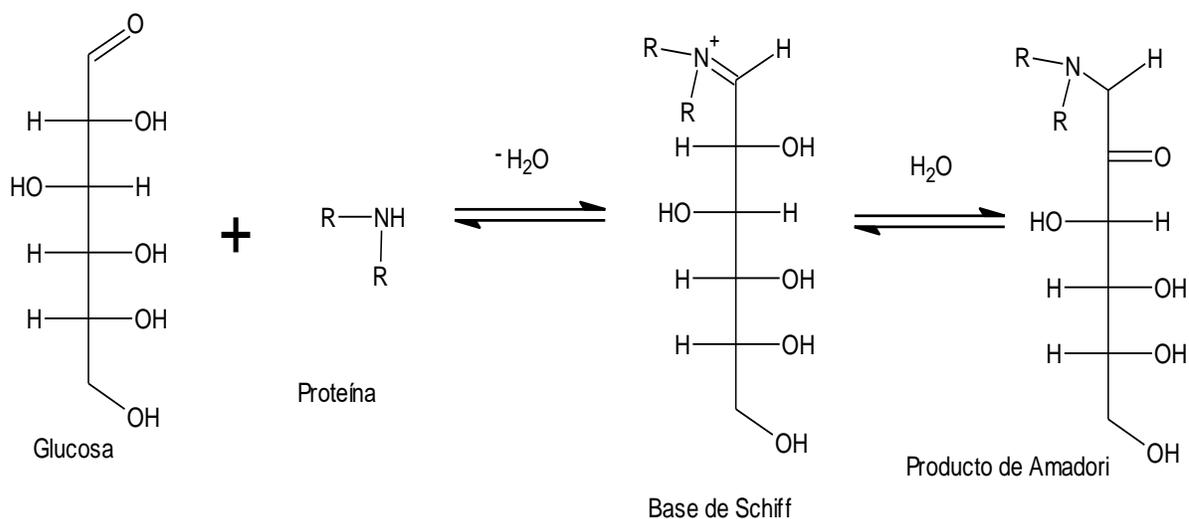
#### I.4 Productos finales de glicación avanzada (AGEs)

Un marcador reconocido del envejecimiento es la modificación de proteínas por azúcares, dicho proceso es llamado glicación. La glucosa además de ser la principal fuente de energía, también es responsable de las principales complicaciones de la diabetes mellitus, por la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés). Los (AGEs) se forman a partir de una reacción de glicación no enzimática entre los grupos carbonilo de azúcares reductores y grupos amino en proteínas<sup>58</sup>.

Asimismo, estudios señalan que un aumento en las concentraciones de glucosa en pacientes con diabetes está relacionado con la hiperglucemia, que es uno de los mecanismos que puede causar daño micro y macro-vascular, debido a la formación y acumulación de (AGEs).

La producción de (AGEs) ocurre a partir de la reacción de Maillard, descrita por el químico Louis-Camille Maillard a principios del siglo XX, que consiste en una reacción de glucosilación no enzimática entre un grupo carbonilo de azúcar reductor y una amina primaria. La formación de estos grupos complejos se puede dividir en tres estados, el primer estado inicia cuando los grupos aminos de una biomolécula reaccionan con un azúcar reductor de forma no enzimática, lo cual forma un producto denominado base de Schiff, que a su vez, por medio de una transposición, formará compuestos más estables, mejor conocidos como productos de Amadori

(tal como la fructosamina o cetoamina), esto puede ocurrir en pocos días y solo hasta este punto, la reacción es reversible<sup>59</sup> (Figura I.9).



*Figura I.9 Reacción de Maillard<sup>60</sup>.*

En el segundo estado, los productos de Amadori, dependen del (pH) o de diferentes temperaturas. Si el pH es menor o igual a 7 se mantiene una enolización en la que los productos de Amadori se transforman a furfural o hidroximetilfurfural, mientras que en una escala de pH mayor a 7 y temperaturas menores, el proceso de enolización da lugar a la reacción de Strecker, donde los productos están presentes como deshidroreductonas y reductonas, que después conducen a formar aldehídos y alfa-amino cetonas. Sin embargo, si el pH es mayor que 7 y la temperatura muestra un aumento, se favorece la producción de glioxal, metilglioxal y diacetilo<sup>60</sup>.

Al final, por medio de diferentes modificaciones moleculares; condensación, deshidrogenación, reorganización, isomerización<sup>61</sup>, forman compuestos conocidos como (AGEs), de una estructura compleja e irreversible, dicho proceso puede tardar semanas o meses. La formación de (AGEs), tiene otros mecanismos, ejemplo de ellos: la autooxidación de la glucosa y la vía de los polioles, etc. En nuestros días, compuestos como la pirralina, pentosidina (Figura I.10) y la N-ε-carboximetil-lisina (CML), se han caracterizado como (AGEs), donde CML es el de mayor estudio<sup>58</sup>. Por consiguiente, cada vez es más frecuente que los consumidores presten mayor atención a los alimentos que consumen, tomando en cuenta además de color y sabor, el contenido nutricional de los mismos, su calidad e inocuidad.

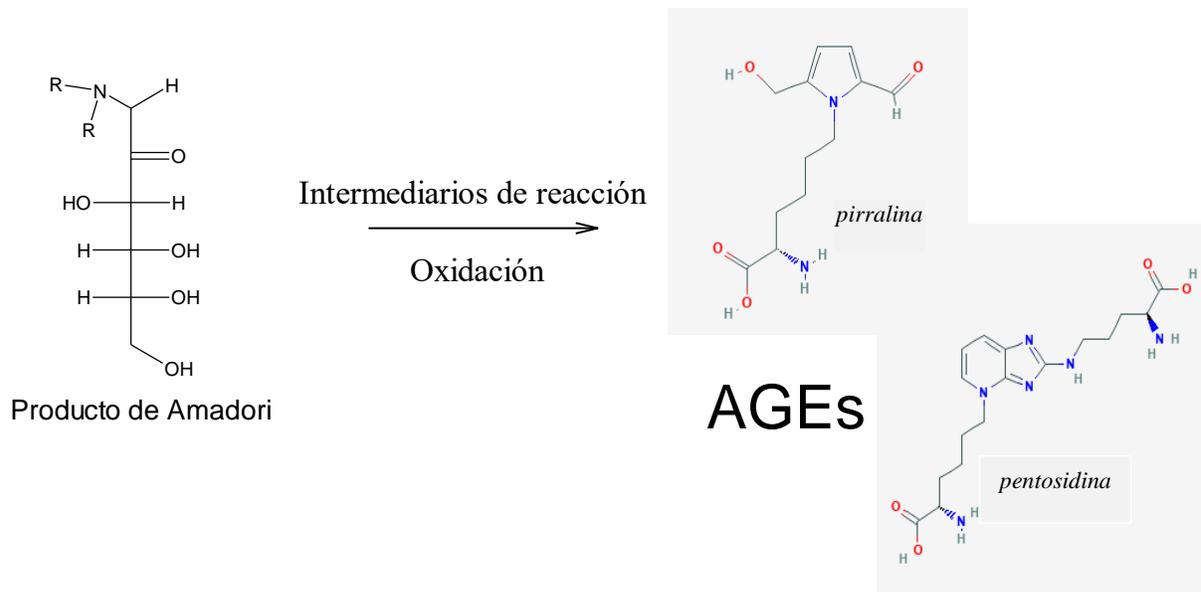


Figura I.10. Productos finales de glicación avanzada (AGEs).

En relación al punto anterior, la principal fuente de (AGEs) son los alimentos, por lo que ciertos factores permiten su formación, entre estos el contenido de proteínas, carbohidratos, agua, grasas y algunos elementos minerales. Además, la temperatura, tiempos de reacción, concentración, presencia de humedad y pH, pueden influir en la generación de (AGEs).

Asimismo, la peroxidación lipídica tiene la capacidad de producir compuestos dicarbonílicos, por la reacción de Maillard y luego formar (AGEs). Un claro ejemplo de esta reacción se encuentra por lo general en alimentos con grandes cantidades de grasa. De igual manera, los procesos de cocción: asado, al vapor, horneado, y freído; tienen injerencia en la formación de (AGEs)<sup>60</sup>.

En consecuencia, los alimentos con gran cantidad de grasas o proteínas; como las carnes a la parrilla contienen (AGEs), que además de aumentar el riesgo de padecer enfermedades como la diabetes<sup>62</sup>, pueden ayudar a que se acumulen (AGEs) de carácter exógeno en el organismo.

Ciertos compuestos tanto de origen natural como sintético han sido evaluados como inhibidores de (AGEs), algunos extractos de plantas han mostrado efectos en la generación de estos en años recientes. Este efecto se debe principalmente a la gran cantidad de antioxidantes fenólicos que albergan, sí bien los radicales libres están relacionados con la formación de (AGEs) es preciso mencionar que los antioxidantes fenólicos pueden inhibir estos compuestos.

Uno de los primeros inhibidores de (AGEs) que se estudió fue la aminoguanidina, por su efecto en condiciones *in vivo* e *in vitro*. La estructura química de este compuesto contiene un grupo denominado guanidina que actúa como eliminador de alfa-carbonilos en la reacción de Maillard<sup>63</sup>. Sin embargo, este agente no ha sido usado en la clínica por su toxicidad a largo plazo y solo se emplea como control positivo en ensayos de laboratorio<sup>64</sup>.

## I.5 Polisacáridos

Los polisacáridos son moléculas de gran tamaño de origen natural, compuestos por subunidades conocidas como monosacáridos (por lo general más de diez), con un gran número de grupos hidroxilo libres, y que muestran actividad antioxidante (Figura I.11). Están enlazados por enlaces glucosídicos, la longitud de estos es variable o constante y difieren en cadenas lineales o ramificadas similar a los polímeros, con una masa molecular de miles e incluso hasta millones. Su mayor presencia está en diversas plantas, microorganismos, algas y otros<sup>65</sup>. El aislamiento y la obtención de compuestos puros de los polisacáridos dependen de su forma estructural. Las estructuras de polisacáridos provenientes de productos naturales son complejas y diferentes, sin embargo, a menudo glucano, fructano, xilano, manano, galactano, etc. son la base de su cadena principal, o por la unión repetida de varios monosacáridos. Además, estudios muestran que los polisacáridos cuentan con varias actividades biológicas con mayor peso en el sistema inmune, lo anterior ha despertado un mayor interés en sus funciones y aplicaciones<sup>66</sup>.

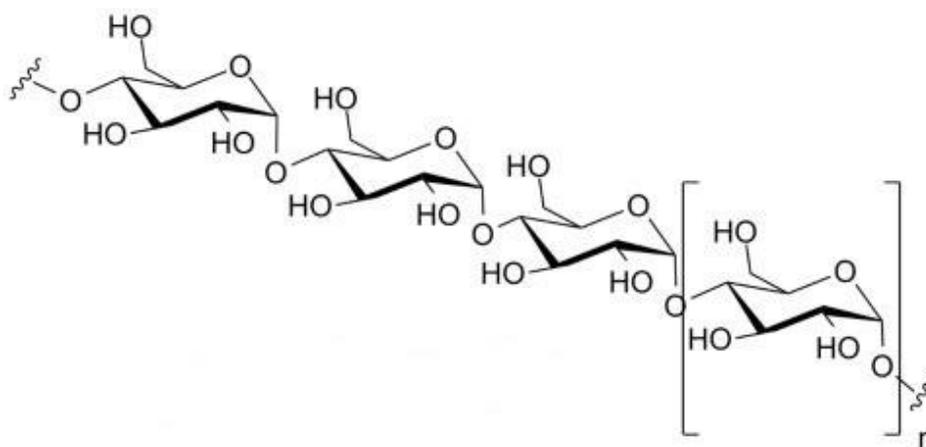


Figura I.11 Estructura de un polisacárido<sup>67</sup>.

En efecto, el aislamiento de polisacáridos de alimentos funcionales y medicinales ha captado la atención de estudios de carácter antioxidante, en fuentes alimenticias como frutas, verduras, cereales, hierbas, té, nueces, hongos, algas, productos de leche, vino, etc.

Incluso, estudios muestran que los polisacáridos provenientes de alimentos tienen un gran poder reductor y de eliminación de radicales libres *in vitro*. Su actividad antioxidante proviene de grupos funcionales como hidroxilo, carbonilo, carboxilo y amino<sup>68</sup>.

### I.5.1 Estudios en el género *Cucurbita*

Existen diversos estudios de polisacáridos en el género *Cucurbita* tanto en semillas, pulpa, frutos frescos, entre los que se encuentran los siguientes:

Wang y colaboradores aislaron un polisacárido a partir de semillas de calabaza *Cucurbita moschata* unido a una proteína. En cuanto a actividad antioxidante se refiere el polisacárido presentó actividad antioxidante moderada frente al radical DPPH y al radical OH. Asimismo, mostró evidencia de actividad inhibitoria contra la  $\alpha$ -amilasa y gran capacidad antibacteriana<sup>69</sup>.

Lu y colaboradores aislaron polisacáridos de pulpa seca de calabaza (*Cucurbita moschata*) con efecto hipoglucemiante. Dicho efecto se evaluó en ratones diabéticos, y sugieren el efecto potencial de los polisacáridos para el tratamiento de la diabetes mellitus<sup>70</sup>.

Song y colaboradores aislaron un polisacárido soluble en agua a partir de frutos maduros de calabaza (*Cucurbita pepo* Lady Godiva). Donde el estudio de RMN confirmó que L-Fructosa y D-Galactosa estaban en la posición alfa, mientras que la D-Glucosa estaba en la posición beta<sup>71</sup>.

Košťálová. y colaboradores estudiaron el aceite de semillas de (*Cucurbita pepo* L. var. *Styriaca*) y que representan una fuente conjunta de polisacáridos pécticos, por medio de varias etapas de extracción, los resultados de esta investigación sugieren que las fracciones de polisacárido de calabaza representan fibras dietéticas con alto contenido de pectina y propiedades antioxidantes benéficas, que pueden ser útiles en aplicaciones alimentarias funcionales<sup>72</sup>.

Nara y colaboradores evaluaron la actividad antioxidante de un polisacárido soluble en agua en frutos de calabaza (*Cucurbita máxima* Duchesne), donde la actividad de eliminación del radical DPPH y superóxido se incrementó en función del contenido total de azúcar. Además, mencionan la importancia de descubrir nuevos alimentos funcionales y el desarrollo de productos de calabaza procesados<sup>73</sup>.

Liang y colaboradores en su investigación evaluaron la capacidad de los polisacáridos extraídos de frutos de calabaza (*Cucurbita moschata*) para inhibir la formación de (AGEs), mostrando un mayor efecto que el control positivo de aminoguanidina. Por lo que sugieren que los

polisacáridos presentan un potencial terapéutico en la prevención y tratamiento de complicaciones relacionadas con la diabetes<sup>58</sup>.

## I.6 Métodos cromatográficos

A principios del siglo XX el botánico ruso Mikhail Tswett inventó la cromatografía empleando esta técnica en la separación de algunos pigmentos de plantas, tales como clorofilas y xantofilas, al hacer pasar estas soluciones por columnas de vidrio empacadas con carbonato de calcio en gránulos finos. Las especies separadas se identifican como bandas coloridas en la columna. Esto explica por qué el método se nombra así, del griego *chroma*, que significa color, y *graphein*, que significa escritura. Por su parte, la cromatografía es un método con amplia gama de usos en la separación, identificación y determinación de los compuestos químicos de mezclas complejas. La cromatografía se aplica en diversos sistemas y técnicas, y todos tienen en común el empleo de una fase estacionaria; que es fija en una columna o en una superficie plana, y una fase móvil; que se desplaza a través de la fase estacionaria acarreando una mezcla con presencia del analito, dicha fase puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico<sup>74</sup>. (Figura I.12).

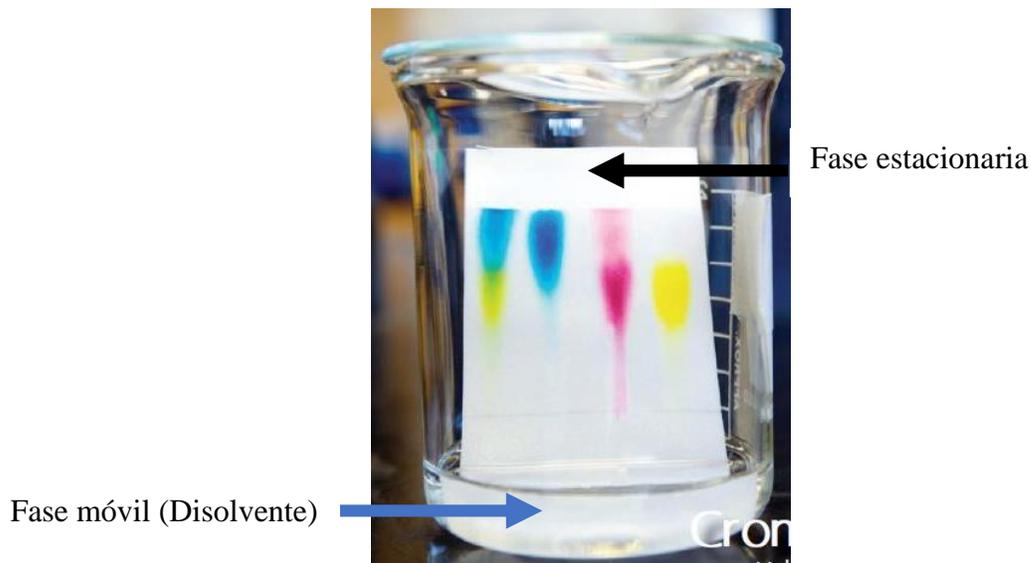


Figura I.12. Cromatografía de capa fina<sup>75</sup>.

En cromatografía existen diferentes fenómenos que se pueden distinguir según sea el caso: entre estos, adsorción, reparto, adsorción polar o intercambio iónico. También, es importante mencionar que el empleo de diversos métodos cromatográficos permite la separación y el análisis al mismo tiempo y aplica para mezclas sólidas, líquidas y gaseosas.

En cuanto absorbentes estos difieren de acuerdo al tipo de cromatografía que se emplea, para fines de esta investigación se hace uso de cromatografía en columna y en capa fina utilizando (silica gel) como absorbente. El gel de sílice, de fórmula química ( $\text{SiO}_2$ ), es un sólido blanco que puede hallarse pulverizado en diferentes números de mallas de acuerdo al tipo de cromatografía de interés. Los disolventes utilizados son de naturaleza variada y depende de los compuestos a separar y su polaridad, por lo que los disolventes polares son aquellos que facilitan el desplazamiento de sustancias absorbidas, en tanto que los no polares casi no las desplazan<sup>76</sup>.

### I.6.1 Cromatografía en capa fina

Esta técnica consiste en la separación e identificación de compuestos químicos al emplear un disolvente que avanza sobre una capa delgada de un adsorbente adecuado que esta adherido sobre una hoja de vidrio u otro material como el aluminio, con el propósito de dar soporte inerte a la capa<sup>77</sup>. (Figura I.12) El uso de esta técnica permite de manera sencilla explorar y controlar la separación de una mezcla, así como su seguimiento. Sin embargo, sí se cuenta con instrumentos de análisis es recomendable explorar por esta técnica al iniciar un estudio<sup>76</sup>.

### I.6.2 Cromatografía en columna

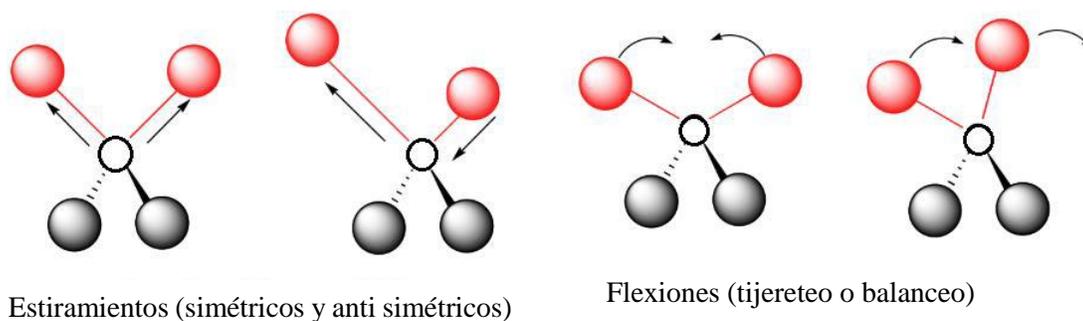
Este método emplea un eluente para llevar a cabo las separaciones de los componentes de una mezcla, que a su vez depende de la polaridad de los compuestos problema. La columna se empaca con silica gel y esta superficie comprende la fase estacionaria, el material de la columna puede ser vidrio o plástico, la fase móvil ocupa los espacios restantes entre las partículas del empaque. Al inicio, la muestra es depositada por la parte superior de la columna, después por medio de adiciones repetidas de disolvente, fuerza a los componentes de la mezcla a pasar por la columna<sup>74</sup>.

## I.7 Métodos espectroscópicos

La química orgánica es de gran ayuda para la determinación de estructuras orgánicas sobre todo en la obtención de compuestos de origen natural. Por su parte la espectroscopia de absorción mide la cantidad de luz que absorbe un compuesto en función de la longitud de onda. La mayoría de pruebas son de carácter no destructivo y así es posible realizar diferentes pruebas con menor pérdida de muestra.

### I.7.1 Espectrometría en el infrarrojo (IR)

Una región infrarroja comprende a las frecuencias que están debajo de la región visible y por encima de las frecuencias de microondas y de radar. Para especificar una posición de banda infrarroja, la longitud de onda ( $\lambda$ ) se mide en micrones, en tanto que los números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) es la unidad más común para especificar las absorciones de infrarrojo. Otro fenómeno importante comprende las vibraciones moleculares, por lo que si un enlace covalente se estira o comprime y después se libera, los átomos tenderán a vibrar, como se muestra en la Figura I.13.



*Figura I.13. Vibraciones típicas de los átomos<sup>105</sup>.*

Los enlaces más resistentes son más rígidos, lo que implica mayor fuerza para estirarlos o comprimirlos. Tal es el caso de los enlaces O-H que son más fuertes que los enlaces C-H, por lo que los enlaces O-H vibran a frecuencias altas. Los grupos de enlaces con energía de enlaces similares, su frecuencia disminuye con el incremento de las masas atómicas, mientras que enlaces que tienen átomos de masas similares, su frecuencia aumenta con la energía de enlace<sup>78</sup>.

Entonces un espectro infrarrojo representa la energía absorbida por una molécula como función de la frecuencia o de la longitud de onda. Con la finalidad de identificar compuestos orgánicos el espectro de infrarrojo se ha dividido en dos porciones, la región que comprende los  $4000 \text{ cm}^{-1}$  y  $1500 \text{ cm}^{-1}$  se emplea para identificar grupos funcionales, que se distingue por presentar bandas de absorción intensa. La región que va de los  $1500$  a  $200 \text{ cm}^{-1}$  mejor conocida como de huellas digitales, con patrones absorción característicos<sup>76</sup>.

La espectrometría en el infrarrojo es una herramienta muy diversa, que se divide en tres regiones espectrales, siendo la región del infrarrojo medio la de mayor uso y que se extiende de  $670$  hasta  $4000 \text{ cm}^{-1}$ . La región del infrarrojo cercano, comprende entre los  $4000$  y  $14000 \text{ cm}^{-1}$  y por último la región infrarroja lejana.

Los solventes más comunes que se utilizan en estudios espectroscópicos de (IR) para compuestos orgánicos son los siguientes: disulfuro de carbono, tetracloruro de carbono, tetracloroetileno, cloroformo, dimetilformamida, dioxano, ciclohexano, benceno, etc.

Por su parte, el agua y los alcoholes no se recomiendan como solventes para espectrometría en el infrarrojo; tal es el caso del agua; ya que manifiesta bandas de absorción en la región (IR). Además, el agua y los alcoholes atacan a los haluros de metales alcalinos, los cuales son compuestos utilizados en las ventanas de las cubetas. De igual manera, cuando la cantidad de muestra líquida es pequeña y no se dispone del solvente apropiado, por lo general se obtiene el espectro del líquido puro<sup>79</sup>.

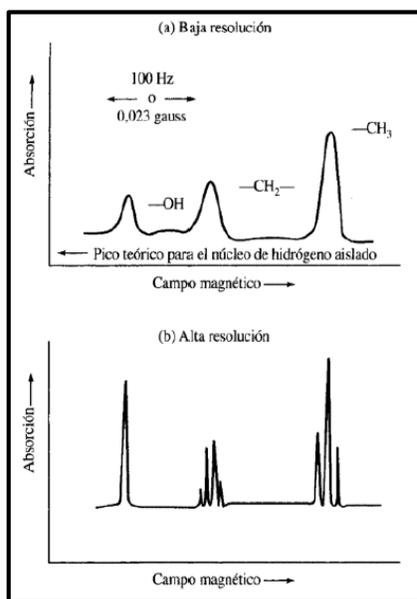
### I.7.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear se basa en medir la absorción de la radiación electromagnética en la región de radiofrecuencias, de alrededor de 4 a 900 MHz. Desde sus inicios, los químicos se percataron de que el entorno molecular influía en la absorción de radiofrecuencia, por parte de un núcleo en un campo magnético y así poder relacionarlo con la estructura molecular. Esto ha generado un gran auge, que ha influido notablemente en el avance de la química orgánica, de la química inorgánica y de la bioquímica. Los espectrofotómetros que se utilizan en la actualidad son los de onda continua, de impulsos o de transformada de Fourier y a la fecha este último es quien predomina en instrumentos en el mercado.

Existen varios tipos de espectros de RMN, que dependen de acuerdo al tipo de instrumento empleado, tipo de núcleo, estado de la muestra, el entorno del núcleo del analito y del uso de datos. No obstante, la mayoría de espectros de RMN se clasifican como de línea ancha o de alta resolución. Los espectros de línea ancha son aquellos en los que la anchura de la banda de la fuente de líneas es tan grande que oscurece la estructura fina debido al entorno químico. Por lo que los espectros de RMN de alta resolución son los más empleados y se obtienen de instrumentos capaces de distinguir las diferencias más pequeñas, de 0.01 ppm o menos. (Figura I.14)<sup>80</sup>.

En particular la RMN, proporciona información estructural y estereoquímica de gran interés en un espacio de tiempo muy reducido. Se trata de una prueba no destructiva que estudia el comportamiento de ciertos núcleos atómicos en presencia de un campo magnético externo. El campo magnético aplicado produce un desdoblamiento de los niveles de energía del spin

nuclear, de modo que pueden inducirse transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética adecuada. RMN constituye una herramienta fundamental en análisis cualitativo y cuantitativo superando a gran escala a los métodos tradicionales. Por otra parte, cabe mencionar que los estudios de RMN han llegado a tener la resonancia de dos dimensiones, la cual conjunta en un solo espectro la resonancia de  $^1\text{H}$  Y  $^{13}\text{C}$ , logrando así una información conjunta de gran utilidad en la determinación de estructuras químicas<sup>76</sup>.



*Figura I.14. Espectros de RMN del Etanol a 60 MHz con baja y alta resolución.*

Los espectros de RMN en dos dimensiones que existen son variados tanto homonucleares y heteronucleares, los primeros corresponden principalmente a COSY (Correlation Spectroscopy) y NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). Por su parte el espectro (COSY, por sus siglas en inglés) permite obtener correlaciones cruzadas entre señales que corresponden a protones acoplados. Mientras que el espectro (NOESY, por sus siglas en inglés), hace posible observar correlaciones cruzadas entre protones cercanos en el espacio cuya intensidad facilita información sobre la distancia que los separa<sup>81</sup>.

Las interacciones heteronucleares corresponden a HMQC (Hetero Nuclear Multiple Quantum Coherence) y HMBC (Hetero Multiple Bond Correlation). El experimento (HMQC, por sus siglas en inglés) proporciona un procedimiento con una sensibilidad alta para la determinación de las correlaciones de desplazamiento protón-carbono de un enlace.

En relación al experimento (HMBC, por sus siglas en inglés) provee información sobre interacciones de acoplamiento  $^1\text{H}$  de largo alcance con núcleos de  $^{13}\text{C}$ , que también es un experimento conocido como “inverso” similar al experimento HMQC<sup>82</sup>. Por ello quizá los experimentos de HMBC son los más utilizados para la elucidación de estructuras moleculares orgánicas complejas y la técnica más popular para corregir cambios químicos heteronucleares de enlace múltiple, que además puede abarcar carbonos cuaternarios, proporcionando una forma de vincular fragmentos moleculares en una estructura completa<sup>83</sup>. Por último, la Resonancia Magnética Nuclear tiene diversas aplicaciones entre ellas: la caracterización de compuestos químicos, establecimiento de equilibrios químicos, cinéticas químicas, cuantificación de mezclas, control de calidad, análisis conformacional y estereoquímico, entre otros<sup>84</sup>.

### I.7.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV/VIS)

La espectroscopia UV/VIS es una técnica que se basa en la absorción de luz por una muestra y dependiendo de la cantidad de luz y longitud de onda, se puede obtener información valiosa de estas. Para ello, la muestra se ilumina con rayos electromagnéticos de varias longitudes de onda en los rangos visible (VIS, es decir a diferentes colores) y adyacentes (UV, es decir ultravioleta) incluyendo parte de la región infrarroja inferior (IR cercano) del espectro.

Por otro lado, la espectroscopia UV/VIS generalmente se aplica a compuestos orgánicos, e inorgánicos o complejos en soluciones, aunque también se pueden analizar materiales sólidos. Los espectros UV/VIS son útiles para mediciones cuantitativas de un compuesto en específico. De igual forma, la concentración de un analito puede ser determinada midiendo la absorbancia a una longitud de onda característica<sup>85</sup>.

La relación entre la absorbancia y la concentración mejor conocida como la ley de Lambert-Beer se describe mediante la siguiente ecuación:

$$A = -\log_{10} \left( \frac{I}{I_0} \right) = \varepsilon * c * d$$

Donde:

A: es la absorbancia de la solución

I: intensidad de transmisión

$I_0$ : intensidad de la luz incidente a una determinada longitud de onda

$\varepsilon$ : es la capacidad de absorción molar (L/mol cm)

$c$ : concentración de la muestra (mol/L).

$d$ : longitud de ruta a través de la muestra (cm).

Es conveniente mencionar que para obtener resultados de medición óptimos y cumplir con la Ley de Lambert-Beer, la absorbancia debe estar en el rango lineal del instrumento a utilizar.

La región del espectro electromagnético cubierta por la mayoría de los espectrofotómetros es 200 a 400 nm, región mejor conocida como ultravioleta cercana. De modo que a longitudes más cortas que 200 nm requieren instrumentación especial que es poco usual en este tipo de espectrofotómetros. La mayoría de espectrofotómetros visibles cubre la región que va de los 400 nm (violeta) a 700 nm (rojo)<sup>86</sup>, tal y como se muestra en la Figura I.15.

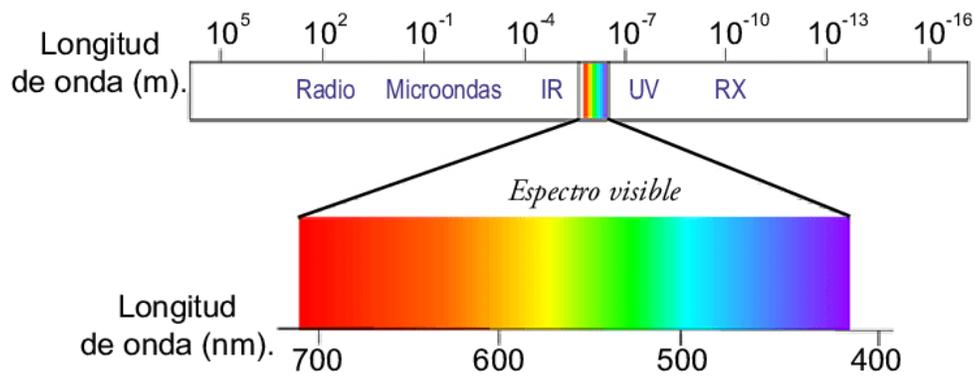


Figura I.15. Espectro electromagnético<sup>87</sup>.

## Capítulo II

### Material y métodos

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas conforme a la siguiente metodología (Figura II.1)

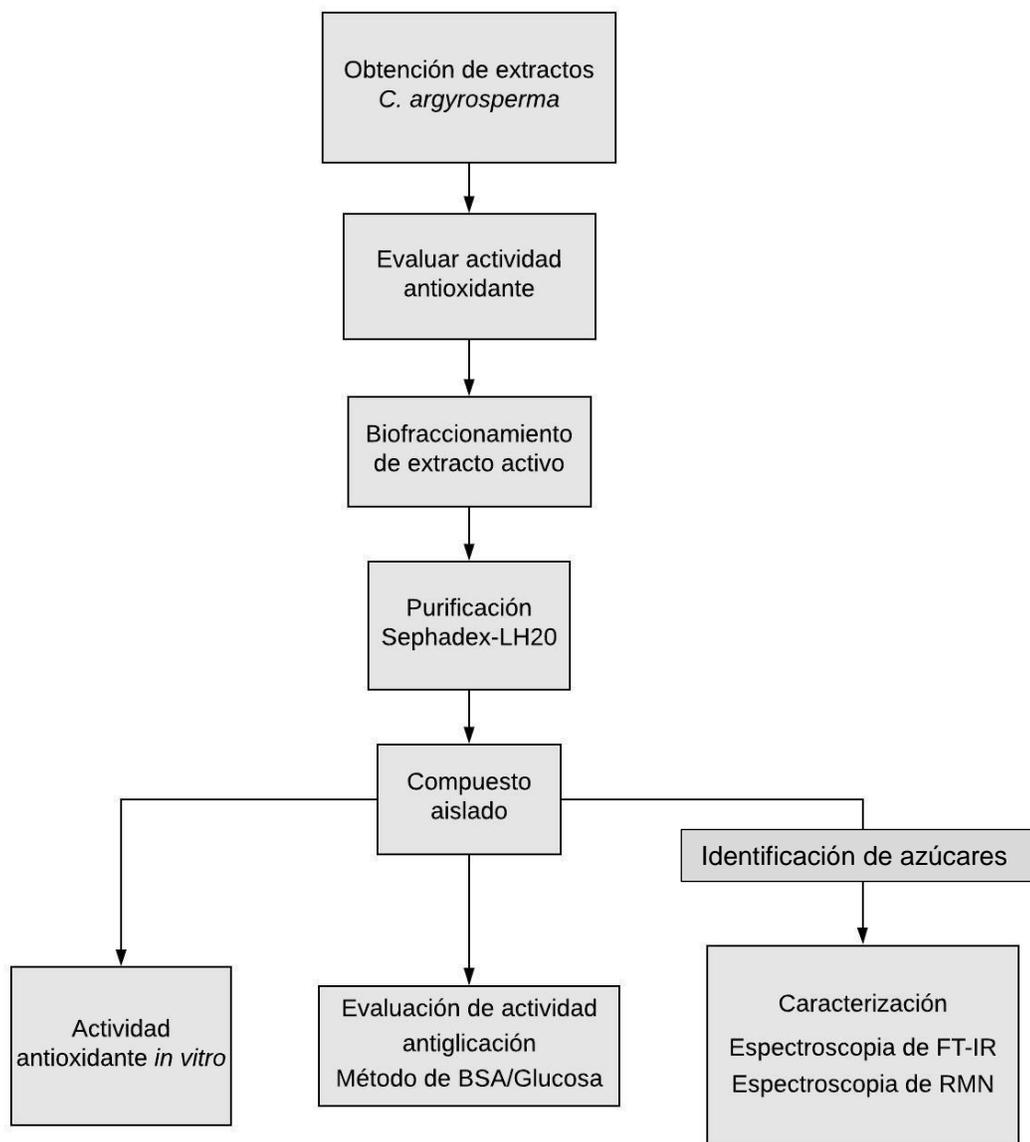


Figura II.1 Metodología del trabajo realizado.

## II.1 Reactivos y disolventes

Los reactivos se enlistan de acuerdo al proceso realizado en cada etapa de la experimentación (Tabla II.1)

Tabla II.1. Reactivos y disolventes.

<b>Obtención de extractos</b>	Hexano
	Acetato de etilo
	Metanol
<b>Prueba preliminar</b>	$\beta$ -caroteno
	Ácido oleico
	Cloroformo
	Radical DPPH
	Ácido ascórbico
<b>Biofraccionamiento</b>	Etanol, acetona, agua destilada, Cloruro de metileno
	Sephadex LH-20, Silica gel( Malla 250-240, Merck)
<b>Identificación de azúcares</b>	Ácido sulfúrico
	Butanol
	Ácido acético
	Isopropanol
	Arabinosa, Galactosa, Ribosa, Ramnosa
	Manosa, Glucosa, Xilosa, Maltosa.
	Inositol, Rafinosa Sacarosa, Fructosa
	Peryodato de sodio
	Permanganato de potasio
<b>Actividad antioxidante</b>	Radical ABTS(+)
	Persulfato de potasio
	Solución buffer pH=7.4
	Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2 ácido carboxílico)
	Sulfato ferroso
	Peróxido de hidrógeno
	Ácido salicílico
	Solución buffer pH=7.0
	Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódica
	Metionina
	Nitroazul de tetrazolio (NBT)
	Riboflavina
	Metionina
<b>Actividad anti-glicación</b>	Albúmina de Suero Bovino (BSA)
	Azida de sodio
	Glucosa
	Aminoguanidina
	Fluoresceína

## II.2 Materiales

- Cromatofolios TLC de silica gel
- Papel filtro Whatman
- Vasos de precipitado
- Espátulas
- Tubos capilares
- Viales de plástico de 2.5 ml
- Tubos de ensayo
- Embudos
- Atomizador de 50 ml
- Charolas de plástico
- Gradillas

## II.3 Equipo

- Espectrofotómetro (UV-Vis) Shimadzu-1800
- Rota vapor Yamato (Re400)
- Agitador Vortex
- Balanza analítica BBI31 (Boeco Germany)
- Lámpara UV
- Fluorómetro (Barnstead Turner)
- Espectrofotómetro BioTek
- Espectrómetro Brucker AV-400
- Parrilla con agitador magnético
- Termómetro
- Incubadora Thermolyne
- Estufa
- Micropipetas de 20 a 200  $\mu\text{l}$  y de 100 a 1000  $\mu\text{l}$
- Cámara cromatográfica.



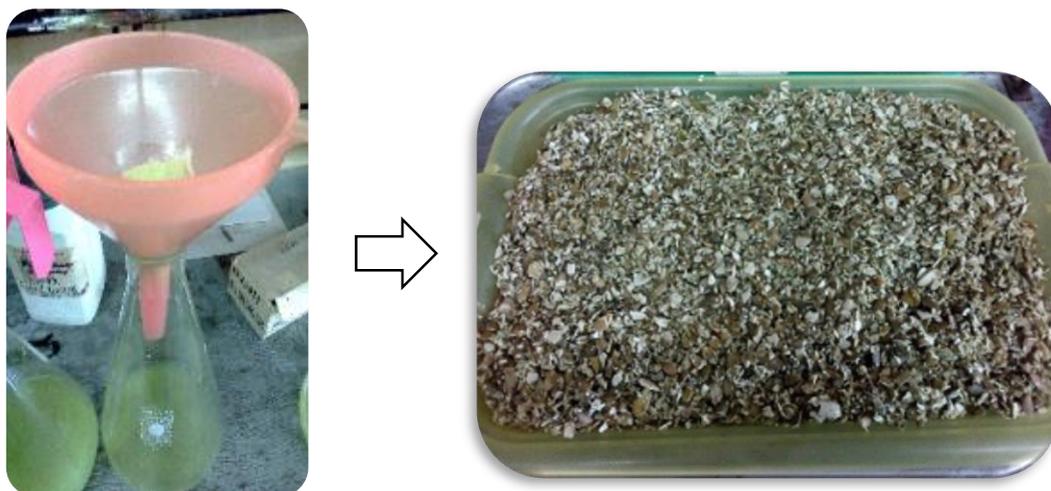
## II.4 Preparación de extractos

Las semillas se maceraron diez días con disolventes de diferente polaridad (Hexano, acetato de etilo y metanol), las cuales se agregaron en un garrafón de 45 L con los disolventes empleados, dicho proceso se repitió consecutivamente (Figura II.3).



*Figura II.3 Extracción por maceración.*

Posteriormente, cada a uno de los extractos obtenidos se filtraron y las semillas se secaron a temperatura ambiente antes de continuar con el siguiente disolvente (Figura II.4). Por último, cada extracto se concentró a sequedad con un Rotavapor (Yamato Re400), de acuerdo a la (Figura II.5).



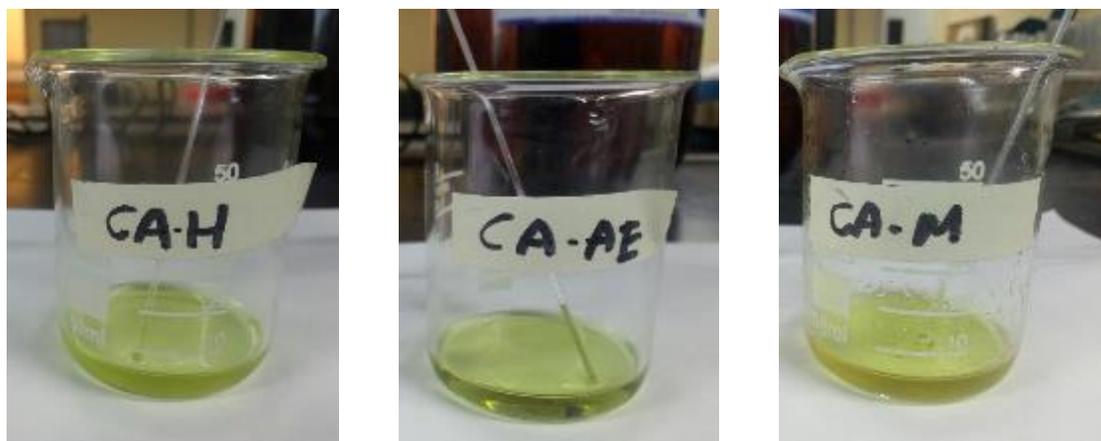
*Figura II.4. Filtración del extracto y secado de semillas.*



*Figura II.5. Rotavapor utilizado para la concentración de los extractos.*

### II.5 Prueba preliminar de efecto antioxidante en *C. argyrosperma*.

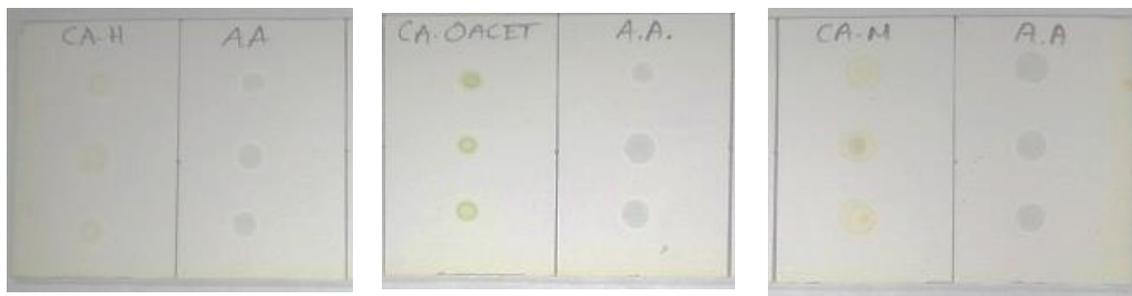
Mediante el método de la decoloración por  $\beta$ -caroteno fue posible determinar cuál de los extractos tenían efecto antioxidante. Los extractos obtenidos se clasificaron como sigue: extracto de hexano (CA-H), extracto de acetato de etilo (CA-AE) y extracto de metanol (CA-M) (Figura II.6).



*Figura II.6 Disolución de extractos de *C. argyrosperma*.*

Posteriormente una pequeña cantidad del residuo obtenido de cada extracto se disolvió en cloroformo y con tubos capilares se colocaron en placas de capa fina impregnadas con gel de sílice (Figura II.7), después se roció una solución que contenía (ácido oleico- $\beta$ -caroteno disuelto en cloroformo) sobre los cromatogramas y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente (Figura II.8).

Después de atomizar una solución de DPPH al 0.2% los cromatogramas fueron expuestos a luz por 45 min, lo cual se representó en la Figura II.8. El ácido ascórbico (AA) se empleó como control positivo para esta prueba.



*Figura II.7..Cromatogramas con muestra en placas de (TLC).*



*Figura II.8. Rociado de cromatogramas.*

## II.6 Biofraccionamiento del polisacárido

El extracto de metanol (CA-M) se obtuvo en forma de goma color verde (280 g), que se fraccionó de acuerdo a las siguientes etapas:

1. Se agregó agua destilada a CA-M y en una parrilla se calentó a 65°C, durante 30 minutos, manteniendo agitación vigorosa.
2. Posteriormente se dejó reposar a temperatura ambiente, durante 45 minutos.
3. Finalmente, el extracto soluble en agua se centrifugó, y el precipitado se le identificó como (CA-M1). Figura II.9

Por medio de cromatografía en capa fina se realizó la búsqueda de una fase móvil que permitiera la separación de los metabolitos presentes en CA-M1, el procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la Figura II.10.

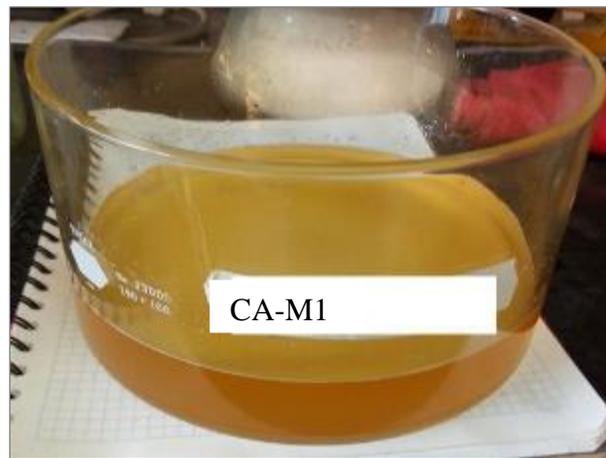
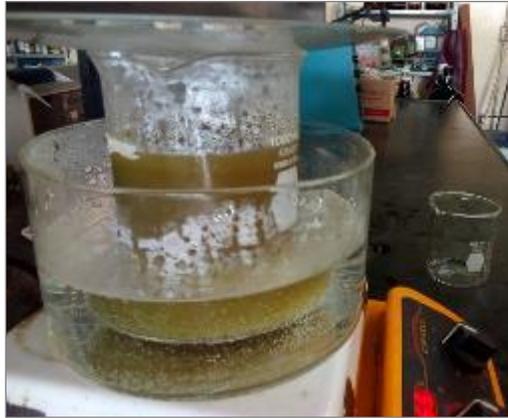


Figura II.9 Proceso para la obtención de CA-M1.

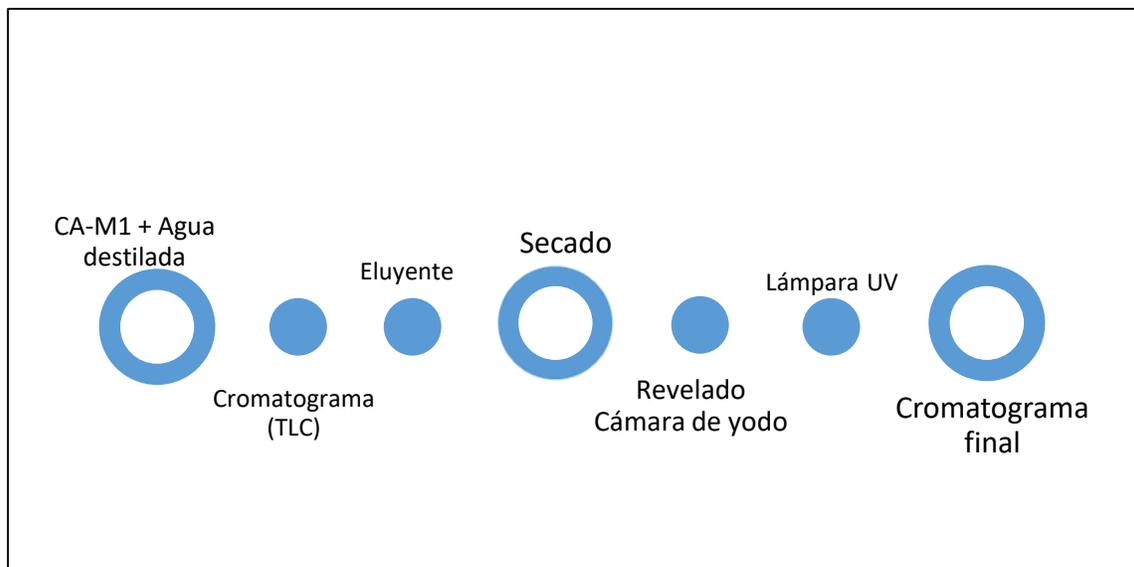


Figura II.10. Cromatografía en capa fina.

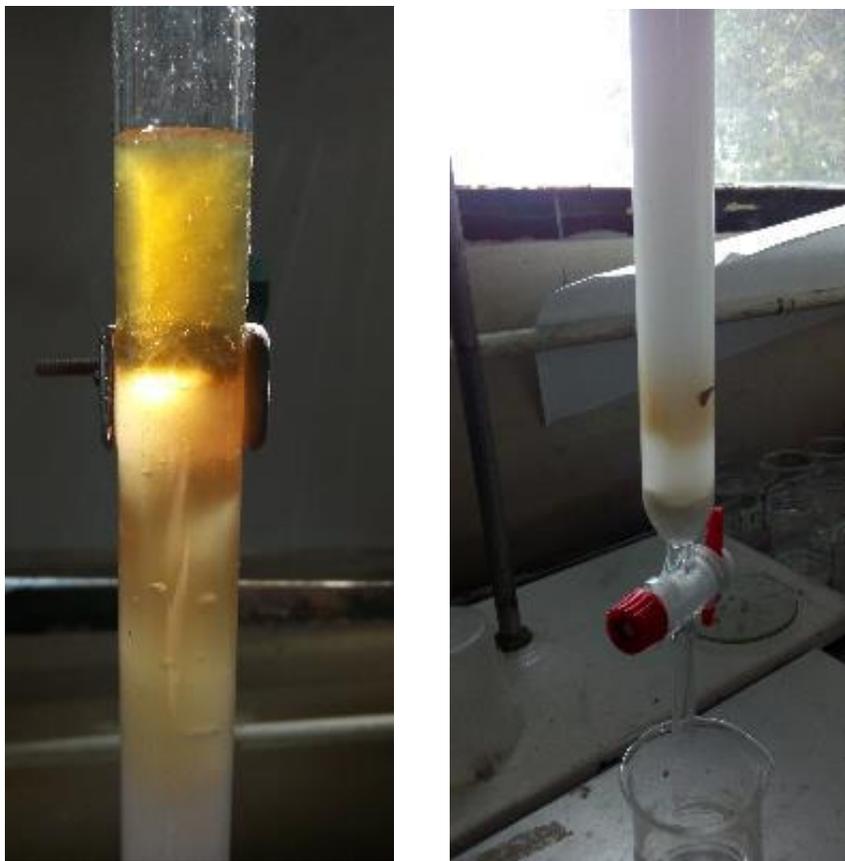
Después, se elaboraron columnas cilíndricas de polietileno de 5 cm de diámetro y 60 cm de largo, conforme a la Figura II.11. Posteriormente, se le colocó en la parte inferior de está un tapón de algodón para evitar la pérdida de silica y se empacaron con silica gel (Malla 250-420, Merck), hasta dejar un tercio de la columna libre, enseguida se agregó CA-M1 en solución.



*Figura II.11. Columna de cromatografía empacada con silica gel.*

Se corrió la columna con una mezcla de eluyente de Acetato de etilo/Metanol/Cloruro de metileno (0.5:1:0.25) y se obtuvieron seis subfracciones de la S1 a S6, seguido de la prueba de actividad antioxidante.

Posteriormente, la fracción S1 se volvió a separar por cromatografía en una columna de silica gel, usando como eluyente cloruro de metileno generando cuatro subfracciones S1-1 a S1-4, de las cuales la fracción S1-3 fue sometida a purificación en una columna de Sephadex LH20, con una mezcla de cloroformo/metanol incrementando la polaridad para obtener el polisacárido (PLS). Figura II.12

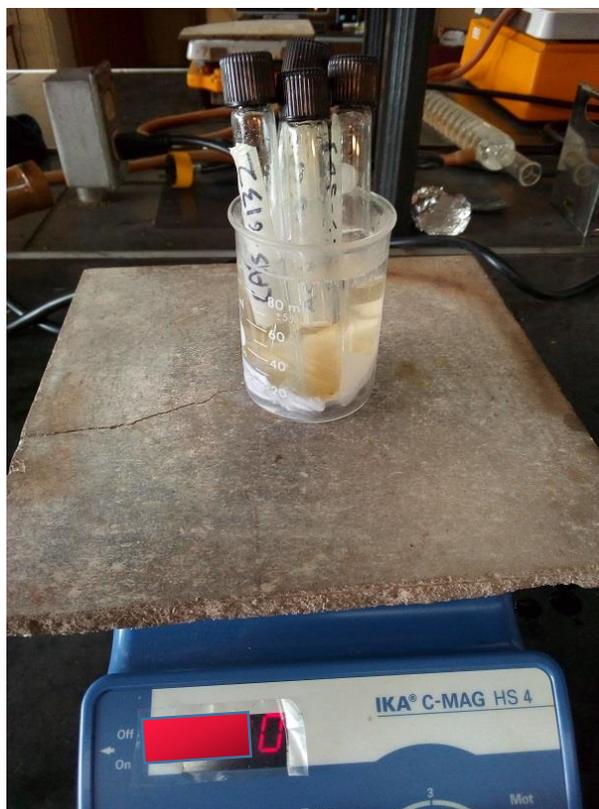


*Figura II.12. Columna de Sephadex LH20.*

## II.7 Hidrólisis ácida

Una vez obtenido PLS se procedió a efectuarle una hidrólisis ácida<sup>89</sup>, para ello se pesaron 40 mg y en un tubo de ensayo se adicionaron 2.5 ml de una disolución de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 2M, de inmediato se calentó a baño maría durante 6 hrs a una temperatura de 90 a 92°C. (Figura II.13).

Después, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se neutralizó con hidróxido de bario  $Ba(OH)_2$  a un pH=7 y se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos. Al sobrenadante se le agregaron 25 ml etanol absoluto para eliminar el exceso de ácido, calentado gradualmente en una parrilla a 45°C. Finalmente, la muestra de PLS hidrolizada se utilizó para identificar el contenido de azúcares usando una cromatografía en papel, para lo cual se prepararon los diferentes azúcares usados como estándar.



*Figura II.13. Hidrólisis ácida de PLS.*

## II.8 Cromatografía en papel

Reactivos necesarios para este ensayo:

1. Soluciones al 1% de diferentes azúcares: arabinosa, galactosa, ribosa, ramnosa, manosa, glucosa, xilosa, maltosa, inositol, rafinosa, sacarosa y fructosa. Para cada solución se pesaron 20 mg y se disolvieron en 2 ml de agua destilada.
2. Eluentes empleado: Se mezclaron las soluciones A y B para obtener 250 ml de mezcla.
  - A. Butanol/Ácido acético/Agua (4:1:5)
  - B. Isopropanol/Ácido acético/Agua (3:1:1)
3. Solución para revelar: Se mezclaron 80 ml de la solución A con 20 ml de la solución B.
  - 3.1 Solución A: Peryodato de sodio ( $\text{NaIO}_4$ ) al 2%.
    - Se pesaron 2g de  $\text{NaIO}_4$ , y se aforó a 100 ml con agua destilada.
  - 3.2 Solución B: 20 ml de Permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) al 1% disuelto en Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 2%.

Procedimiento para la cromatografía ascendente.

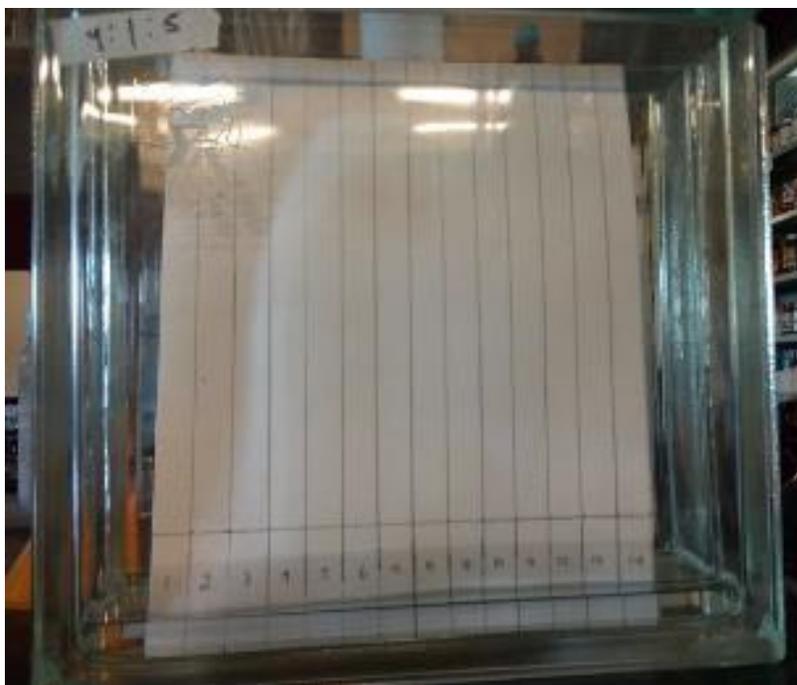
1. Se cortó el papel Whatman No. 1 en un cuadro de 28 cm x 28 cm y a 3 cm del margen de uno de los lados, se trazó con ayuda de un lápiz una línea transversal y se marcaron líneas verticales separadas entre sí por 2 cm de ancho. Realizado lo anterior, sobre cada punto se colocaron 5 gotas de las soluciones de azúcares utilizando tubos capilares para cada azúcar, incluyendo la muestra de PLS hidrolizada previamente. (Figura II.14).



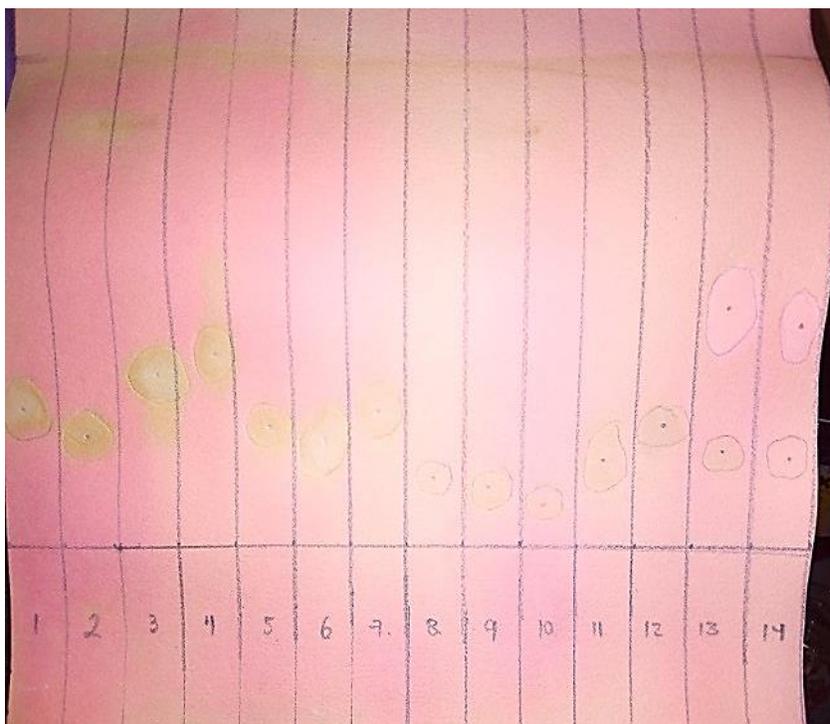
*Figura II.14 Preparación de cromatografía ascendente.*

2. En una cámara cromatográfica se colocaron 250 ml de la mezcla de eluyente preparada, se tapó y se dejó en estas condiciones durante 20 minutos para saturar la atmosfera interna. (Figura II.15), se introdujo el cromatograma doblando la parte superior y sosteniendo el dobléz de la parte superior con un hilo sujeto a la cámara cromatográfica.
3. Se dejó correr el disolvente durante varias horas, después, se retiró el papel de la cuba y se secó a temperatura ambiente.
4. Una vez seco el papel, se roció con un atomizador la solución reveladora y se dejó secar por 15 minutos (Figura II.16), después se introdujo en una estufa a 80°C durante otros 15 minutos más. Concluido lo anterior, se midió la distancia desde el origen hasta el frente del solvente, determinándose el Rf para los azúcares contenidos en PLS.

$$R_f = \frac{\text{Distancia desde el punto de partida al centro de la mancha}}{\text{Distancia desde el punto de partida hasta el frente del solvente}}$$



*Figura II.15. Cámara cromatográfica.*



*Figura II.16 Revelado de los estándares y PLS.*

## II.9 Espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) del compuesto aislado

El análisis del espectro de (FT-IR) fue realizado para caracterizar los grupos funcionales presentes en el compuesto aislado, PLS (3 mg), el espectro de infrarrojo fue obtenido en un Espectrómetro FT-IR (Perkin Elmer) en un rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  a 25°C.

## II.10 Estudio espectroscópico de Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ ) del compuesto aislado

El análisis de espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fue realizado en la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI-IPN).

Cien miligramos del compuesto puro aislado (PLS) se disolvieron en 1 ml de óxido de deuterio ( $\text{D}_2\text{O}$ ) y se colocó en un tubo de vidrio de 5 mm para ser introducido en el equipo de RMN y así determinar los espectros. Los datos de  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR y RMN en 2D se registraron en 600 MHz y 150 MHz, respectivamente, en un espectrómetro Bruker AV-400 empleando MS como estándar interno. Los cambios químicos de las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se expresaron como partes por millón (ppm) a 25 ° C.

## II.11 Análisis de UV-vis

El espectro UV del polisacárido (PLS) se evaluó con un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800) en la región de 200-400 nm y a temperatura ambiente para detectar la presencia de proteínas y ácidos nucleicos.

## II.12 Ensayos para evaluar la actividad antioxidante in vitro

### II.12.1 Ensayo de captación del radical DPPH (2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo).

#### Preparación de soluciones para ensayo DPPH

- DPPH (2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo) a 0.2 mM: Se pesó 1.97 mg del radical DPPH y se disolvió con alcohol etílico, aforándose a 25 ml.
- Disoluciones de polisacárido (20 mg/ml)

Se pesaron 6 mg de (PLS) y se disolvieron en 300  $\mu\text{l}$  de agua destilada hasta disolución completa, seguidamente se hicieron diluciones para obtener las concentraciones (10, 5 y 2.5 mg/ml de PLS) como se muestra en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Dilución seriada de (PLS) para ensayo DPPH.

No.de vial	Concentración (mg/ml)	Agua destilada (µl)	Volumen de solución (µl)	Factor de Dilución
<b>I</b>	10	200	200 µl de PLS a 20 mg/ml	1/2
<b>II</b>	5	200	200 µl de PLS a 10 mg/ml	
<b>III</b>	2.5	200	200 µl de PLS a 5 mg/ml	

Las soluciones de ácido ascórbico de 20 a 2.5 mg/ml se hicieron de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.

El método de captación del radical DPPH (2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo) fue estimada de acuerdo a Martínez<sup>91</sup>. Primero, 20 µl de solución de muestra (PLS; 2.5 a 20 mg/ml en agua destilada) y/o ácido ascórbico (2.5 a 20 mg/ml en agua destilada). Se añadieron a una placa de 96 pozos por duplicado y se mezclaron con 180 µl de solución de DPPH a 0.2 mM, la placa se incubó en la obscuridad y a temperatura ambiente por 30 minutos, los cambios en la absorbancia fueron medidos a 520 nm usando un espectrofotómetro BioTek, el ácido ascórbico se utilizó como estándar.

La actividad antioxidante fue expresada como el porcentaje de inhibición (I) y fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%I = 100 - \left( \frac{(\text{Abs Muestra} - \text{Abs Blanco}) * 100}{\text{Abs Control}} \right)$$

Donde:

%I = Porcentaje de inhibición

Abs Muestra = Absorbancia de la muestra/estándar

Abs Blanco = Absorbancia del Blanco

Abs Control = Absorbancia de la solución DPPH

## II.12.2 Captación del radical catiónico ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ABTS<sup>+</sup>

Preparación de soluciones para el ensayo de ABTS<sup>+</sup>.

- Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ABTS a 7 mM

Se pesaron 19.20 mg del ABTS y se disolvieron con 5 ml de etanol, la solución se tornó verde, una vez homogénea la disolución se protegió de la luz.

- Persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) a 2.45 mM.

Se pesaron 3.3 mg de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, y se disolvieron con 5 ml de agua destilada.

- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) a 0.1 mg/ml.

Se pesaron 10.3 mg de Trolox y se disolvió en una solución de metanol/agua (1:1) y se aforó a un volumen de 100 ml. La solución se almacenó en un lugar oscuro hasta su uso.

- Curva de calibración

A partir de la solución estándar de Trolox (0.1mg/ml), se hicieron diluciones para obtener las siguientes concentraciones 0.02, 0.04, 0.06, 0.08. Se calculó el volumen para cada disolución aplicando el principio de equivalencia, la realización de la curva siguió lo establecido en la Tabla II.3, cada dilución se aforó a un volumen final de 25ml.

*Tabla II.3. Concentración y volúmenes de Trolox.*

<b>No. de matraz</b>	<b>Concentración Trolox</b>	<b>Volumen Metanol/Agua (1:1)</b>	<b>Volumen de solución Trolox (0.1 mg/ml)</b>
<b>1</b>	0.02	20	5
<b>2</b>	0.04	15	10
<b>3</b>	0.06	10	15
<b>4</b>	0.08	5	20

- Disoluciones de muestra (PLS; 0.5 a 8 mg/ml).

Se pesaron 4 mg de (PLS) y se disolvieron en 500 µl de agua destilada hasta disolución completa, la solución de PLS (8 mg/ml), se reservó en un vial de 1.5 ml. Posteriormente mediante dilución seriada se obtuvieron las concentraciones de 4, 2, 1 y 0.5 mg/ml (Tabla II.4).

Tabla II.4. Dilución seriada de muestra para ensayo ABTS.

No.de vial	Concentración (mg/ml)	Agua destilada (µl)	Volumen de solución (µl)	Factor de Dilución
<b>I</b>	4	200	200 µl de PLS a 8 mg/ml	1/2
<b>II</b>	2	200	200 µl de PLS a 4 mg/ml	
<b>III</b>	1	200	200 µl de PLS a 2 mg/ml	
<b>IV</b>	0.5	200	200 µl de PLS a 1 mg/ml	

El ensayo ABTS se realizó de acuerdo al método de (Re y colaboradores<sup>92</sup>) con algunas modificaciones, el radical catiónico (ABTS<sup>+</sup>) fue producido por la reacción de una solución 7 mM de ABTS con persulfato de potasio (2.45 mM), dejando reposar la mezcla en la obscuridad a temperatura ambiente por 20 horas (Figura II.17).

Antes de su uso, la solución de (ABTS<sup>+</sup>) se ajustó a una absorbancia de 0.70±0.2 mediante una dilución con alcohol etílico a 734 nm de acuerdo a lo mostrado en la Tabla II.5.

Tabla II.5 Ajuste de absorbancia a 0.7±0.2.

Solución estable de ABTS <sup>+</sup> (ml)	Volumen de alcohol etílico (ml)	λ=734 nm Absorbancia
<b>0.3</b>	30	0.867
<b>0.6</b>	40	0.765
<b>1.0</b>	50	0.711

Después, 50 µl de solución de muestra diluida en serie a diferentes concentraciones (PLS; 0.5-8 mg/ml en agua destilada), fueron añadidos a 1 ml de solución diluida de ABTS<sup>+</sup> (0.70±0.02). La absorbancia se midió después de 7 min en un espectrofotómetro a 734 nm. De igual manera, la curva de calibración a diferentes concentraciones de Trolox (0.02 a 0.1 mg/ml), permitió medir la reducción en la absorbancia de la solución (ABTS<sup>+</sup>). El porcentaje de inhibición (I) del radical ABTS se calculó siguiendo la fórmula:

$$\%I = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100$$

Donde:

$A_0$  = Absorbancia del control

$A_1$  = Absorbancia de la muestra o estándar

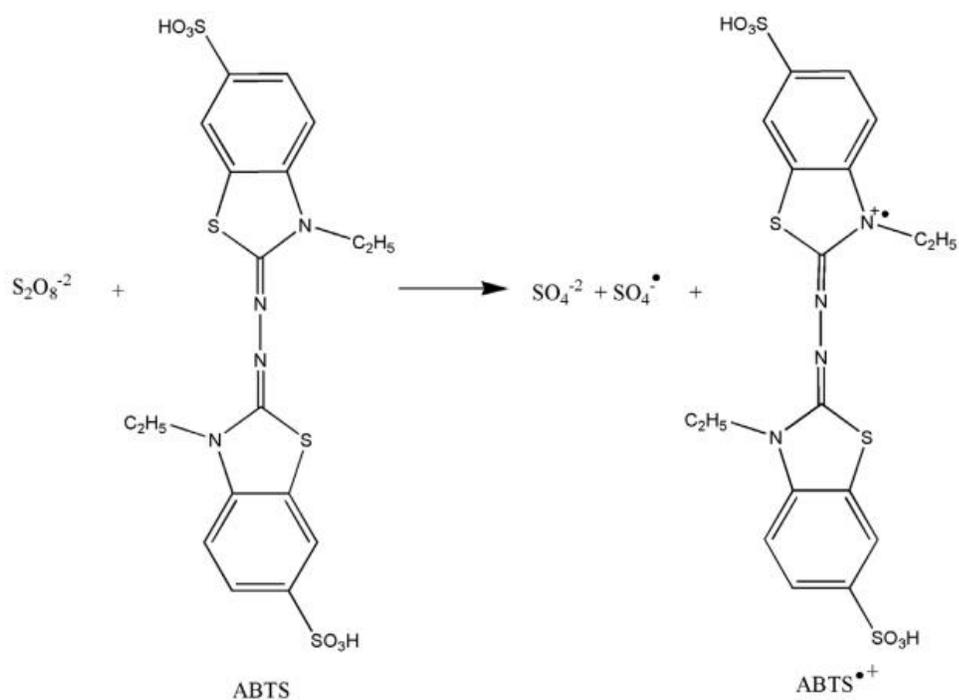


Figura II.17. Formación del radical cationico ABTS.

### II.12.3 Captación del radical hidroxilo

#### Preparación de soluciones

- (PLS; 0.5 a 8 mg/ml)

Se pesaron 80 mg de (PLS) se disolvieron en 10 ml de agua destilada hasta disolución completa, la solución de PLS (8 mg/ml), se reservó en un tubo de ensayo. Posteriormente mediante diluciones se obtuvieron las concentraciones de 4, 2, 1 y 0.5 mg/ml, como se indica en la Tabla II.6.

Tabla II.6. Concentración y volúmenes de PLS.

No.de tubo	Concentración (mg/ml)	Agua destilada (ml)	Volumen de solución	Factor de dilución
I	4	5	5 ml de PLS a 8 mg/ml	1/2
II	2	5	5 ml de PLS a 4 mg/ml	
III	1	5	5 ml de PLS a 2 mg/ml	
IV	0.5	5	5 ml de PLS a 1 mg/ml	

- Sulfato ferroso (6 mM)

Se pesaron 83.7 mg de FeSO<sub>4</sub>, se disolvió con agua destilada, y se aforó a un volumen de 50 ml.

- Peróxido de hidrógeno (6 mM)

A partir de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30.3%, con una concentración de 0.89 M, se tomaron 340 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para obtener una solución de 6 mM y se aforo a un volumen de 50 ml con agua destilada.

- Ácido salicílico 6 mM

Se pesaron 41.4 mg de ácido salicílico y se disolvieron en (35 ml de alcohol etílico + 15 ml de agua destilada) se agitó hasta disolución completa y se reservó hasta su uso.

La captación del radical hidroxilo se determinó de acuerdo al método reportado por He<sup>93</sup>, se tomó 1 ml de solución de muestra diluida (PLS; 0.5-8 mg/ml) mezclándose con 1ml de FeSO<sub>4</sub> (6 mM), 0.5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mM) y 0.5 ml de (ácido salicílico (6 mM) en presencia de etanol). Los conjuntos de mezclas fueron incubadas a 37°C por 30 min.

Una vez realizado lo anterior, la absorbancia fue medida a 510 nm en un espectrofotómetro. El ácido ascórbico se usó como estándar. La captación del radical hidroxilo fue calculada mediante la ecuación:

$$(\%I) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right)$$

Donde:

$A_1$  = Absorbancia del la muestra

$A_0$  = Absorbancia del control

## II.12.4 Captación del radical superóxido

### Disoluciones para el ensayo

- (PLS; 0.5 a 8 mg/ml)

Se pesaron 16 mg de (PLS) y se disolvieron en 2000 µl de agua destilada hasta disolución completa, la solución de PLS (8 mg/ml), se reservó en un vial de 4 ml. Posteriormente mediante dilución seriada se obtuvieron las concentraciones de 4, 2, 1, hasta que se obtuvo PLS a 0.5 mg/ml, como se muestra en la Tabla II.7.

Tabla II.7. Concentración y volúmenes de PLS.

No.de vial	Concentración (mg/ml)	Volumen de agua destilada (µl)	Volumen de solución	Factor de dilución
<b>I</b>	4	1000	1000 µl de PLS a 8 mg/ml	1/2
<b>II</b>	2	1000	1000 µl de PLS a 4 mg/ml	
<b>III</b>	1	1000	1000 µl de PLS a 2 mg/ml	
<b>IV</b>	0.5	1000	1000 µl de PLS a 1 mg/ml	

➤ Solución buffer fosfato (50 mM, pH=7.0)

Para un volumen de 50 ml de solución se pesaron 387 mg de fosfato de sodio dibásico y 146 mg de fosfato de sodio monobásico, se disolvieron uno a uno en 40 ml de agua destilada, se ajustó el pH con un potenciómetro empleando soluciones de ácido clorhídrico al (1%) o hidróxido de sodio a la misma concentración., finalmente se aforó a 50 ml con agua destilada.

La preparación de las demás soluciones se realizó conforme a lo indicado en la Tabla II.8, además fue necesario realizar diluciones (1/10 y 1/100) para EDTA disódica y Riboflavina puesto que la concentración requerida fue de 0.02 mM para ambas soluciones.

Tabla II.8. Preparación de soluciones.

Compuesto químico	Peso molecular	Concentración	Volumen final (ml)	Peso (mg)
<b>EDTA disodica</b>	372.24	2 mM	10	7.5
<b>Metionina</b>	149.2	130 mM	10	193.96
<b>NBT</b>	817.64	0.75 mM	10	6.2
<b>Riboflavina</b>	376.36	2 mM	10	7.6

La captación del radical superóxido fue establecida de acuerdo al método reportado por Yuan<sup>94</sup>. Para tal propósito 200µl de solución de muestra diluida (PLS; 0.5-8 mg/ml) fueron añadidos a la solución de reacción que incluyó buffer fosfato (1.5 ml, 50 mM, pH 7.0), EDTA disodica (300 µl, 0.02 mM), metionina (300 µl, 130 mM), NBT (300 µl, 0.75 mM), riboflavina (300 µl, 0.02 mM) y por ultimo 500 µl de agua purificada.

Después, las mezclas de reacción se incubaron en un cuarto oscuro por 30 min a temperatura ambiente y la absorbancia de las muestras se midió a 560 nm usando un espectrofotómetro. El ácido ascórbico se usó como estándar y el porcentaje de captación del radical superóxido se evaluó de acuerdo a la ecuación:

$$(\%I) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) * 100$$

Donde:

$A_1$  = Absorbancia del la muestra/estándar

$A_0$  = Absorbancia del control

## II.13 Ensayo de inhibición en productos finales de glicación avanzada (AGEs) *in vitro*.

### II.13.1 Glicación por el método de BSA

#### Preparación de soluciones.

➤ BSA (10 mg/ml)

Se pesaron 250 mg de BSA y se disolvieron en 25 ml de agua destilada lentamente para evitar la presencia de espuma.

➤ Buffer fosfato pH=7.4

Para un volumen de 50 ml de solución se pesaron 1.01 g de fosfato de sodio dibásico y 170 mg de fosfato de sodio monobásico, se disolvieron uno a uno en 40 ml de agua destilada, se ajustó el pH con un potenciómetro empleando soluciones de ácido clorhídrico al (1%) o hidróxido de sodio a la misma concentración., finalmente se aforó a 50 ml con agua destilada.

➤ Glucosa 0.5 M

Se pesaron 2.252 g de glucosa y se disolvieron en 25 ml de agua destilada hasta disolución completa.

➤ Azida de sodio (0.02%)

Se pesaron 5mg de azida de sodio y se disolvieron en 25 ml de agua destilada, una vez homogenizado se reservó hasta su uso.

➤ PLS (0.5, 1, 2 y 4 mg/ml)

Se pesaron 40 mg de (PLS) y se disolvieron en 10 ml de agua destilada hasta disolución completa, la solución de PLS (4 mg/ml), se reservó en un tubo de ensayo. Después, mediante dilución seriada se obtuvieron las concentraciones de 2, 1 y 0.5 mg/ml, como se muestra en la Tabla II.9.

*Tabla II.9. Concentración y volúmenes de PLS.*

No.de vial	Concentración (mg/ml)	Volumen de agua destilada (ml)	Volumen de solución	Factor de Dilución
<b>I</b>	2	4	4ml de PLS a 4 mg/ml	1/2
<b>II</b>	1	4	4 ml de PLS a 2 mg/ml	
<b>III</b>	0.5	4	4 mL de PLS a 1 mg/ml	

Para realizar el ensayo se tomó 1 ml de (BSA) con una concentración de (10 mg/ml) en buffer de fosfato pH=7.4, se mezcló con 1 ml de 0.5 M de glucosa y fueron incubados a 37°C por cuatro semanas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de PLS (0.5, 1, 2 y 4 mg/ml), la aminoguanidina (AG, 1 mg/ml) se empleó como estándar. También a cada solución de prueba se adicionó azida de sodio (0.02%) para mantener una condición aséptica. Después, del tiempo de incubación la intensidad fluorescente fue medida en un espectrofluorómetro a una longitud de onda de emisión de 450 nm y 350 de excitación respectivamente<sup>95</sup>. El efecto anti-glicación de (PLS) y de la (AG) fue medido por el cálculo del porcentaje de inhibición y se comparó con la glucosa de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = 1 - \frac{\text{Fluorescencia de la solución BSA/Glucosa/(PLS o AG)}}{\text{Fluorescencia de la solución BSA/Glucosa}} * 100$$

## Capítulo III

### Resultados y discusión

#### III.1 Obtención de extractos

Los extractos se obtuvieron por maceración empleando 5 kg de semillas de *C. argyrosperma*, una vez llevados a sequedad, se determinó el rendimiento expresado en (% m/m) tal y como se ejemplifica en la Figura III.1. Los extractos mostraron una consistencia semisólida de color verde y un olor característico. El rendimiento aumenta con la duración de la extracción en un cierto intervalo de tiempo, así como la relación de solvente a sólido.

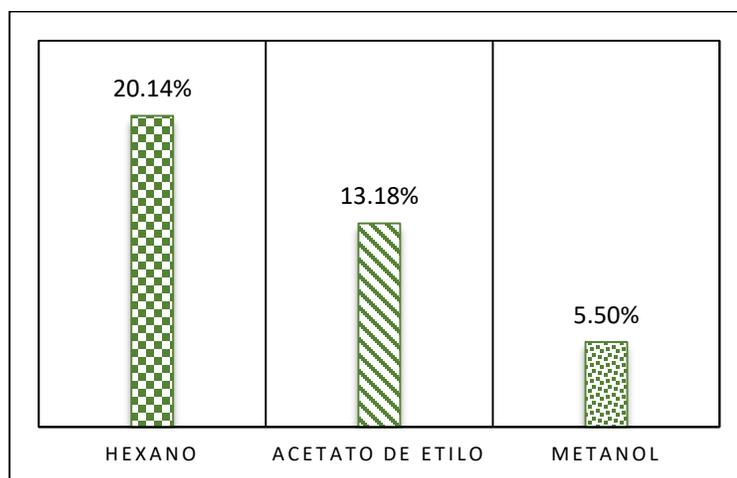
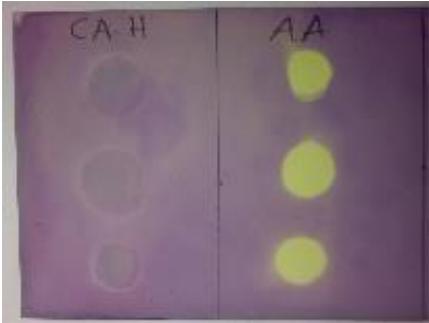
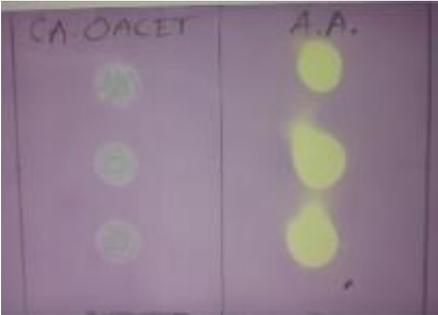
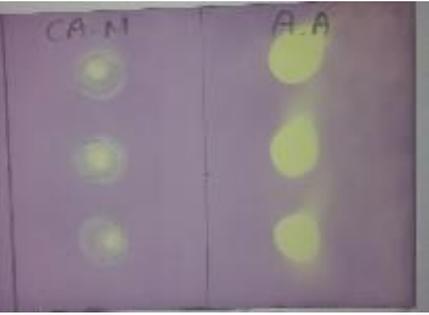


Figura III.1 Porcentaje de Rendimiento de los extractos.

#### III.2 Actividad antioxidante en *C. argyrosperma*

En la actualidad existe un gran interés en compuestos bioactivos de origen natural como una alternativa en la prevención de enfermedades, principalmente aquellos que sean capaces de inhibir radicales libres.

Por ello se determinó si los extractos de hexano (CA-H), acetato de etilo (CA-AE) y metanol (CA-M) presentaban actividad antioxidante mediante el ensayo de decoloración de  $\beta$ -caroteno. De acuerdo a la Figura III.2 solamente el extracto metanólico (CA-M) mostró actividad antioxidante debido a la coloración amarilla que se presenta sobre el fondo color violeta (Solución DPPH al 0.2 %), lo cual indica prueba positiva de efecto antioxidante. Dicho efecto se comparó con el ácido ascórbico que se utilizó como control positivo para esta prueba.

Extracto	Resultado
<p style="text-align: center;">CA-H</p> 	NEGATIVO
<p style="text-align: center;">CA-AE</p> 	NEGATIVO
<p style="text-align: center;">CA-M</p> 	POSITIVO

*Figura III.2 Prueba de actividad antioxidante.*

Una vez identificado el extracto con efecto antioxidante se continuó con el proceso de aislamiento y purificación del o los bioactivos causantes de este efecto, mediante el procedimiento descrito en la parte experimental, obteniéndose 800 mg del compuesto aislado.

### III.3 Identificación de azúcares presentes en PLS

Se realizó hidrólisis al polisacárido con la finalidad de obtener monómeros, seguido de una cromatografía en papel que, al ser revelada, se identificaron los azúcares mediante manchas amarillas sobre un fondo color rosa y se determinaron los Rf para cada estándar y la muestra de polisacárido, de ello se pudo inferir que los Rf calculados de galactosa y glucosa, son cercanos a la muestra de polisacárido con un Rf=0.213, (Tabla III.1). Si bien, esta prueba es cualitativa, permitió identificar los azúcares presentes en PLS, lo cual se confirmó con un análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

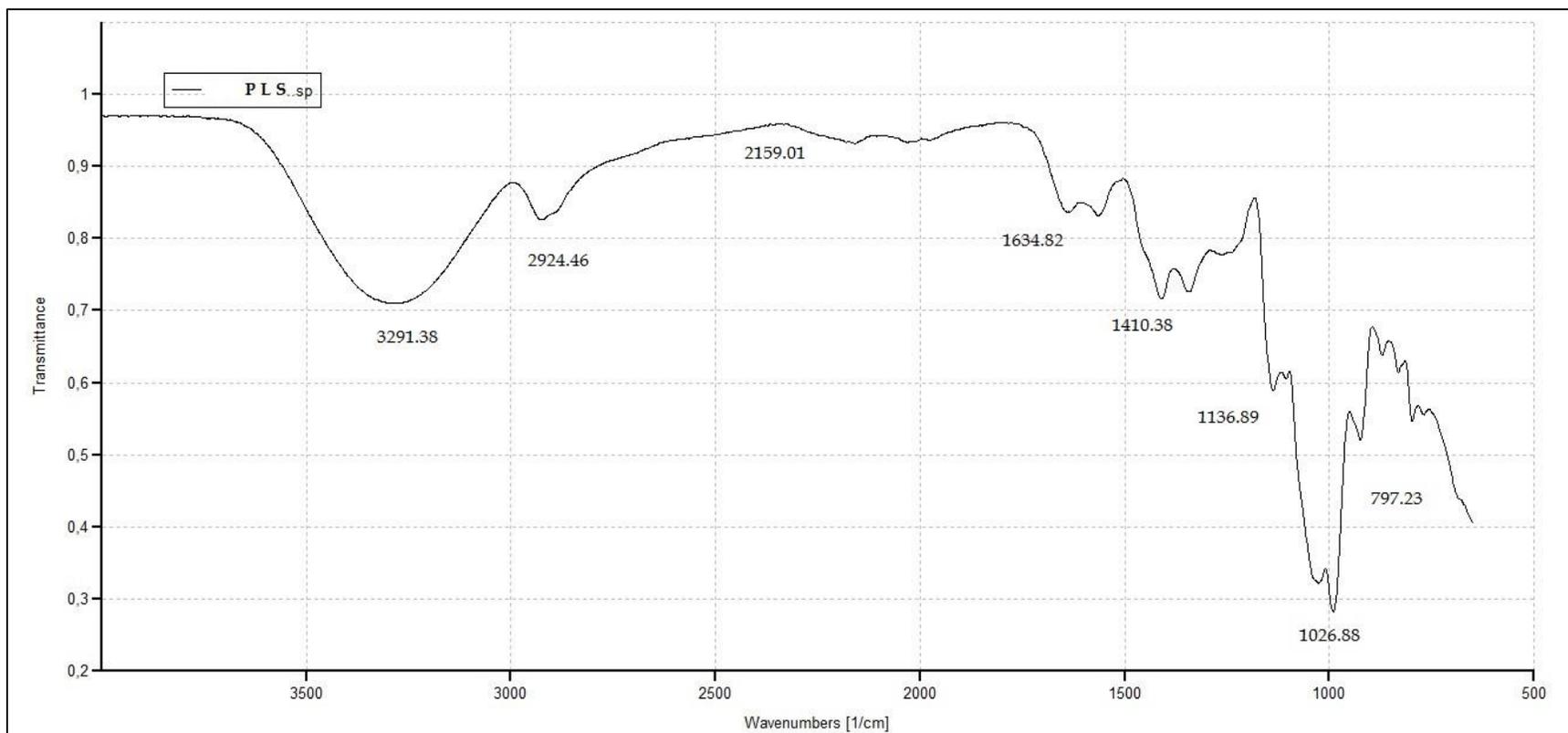
*Tabla III.1 Relación de frentes (Rf).*

No.	Muestra	Rf	No.	Muestra	Rf
1	Arabinosa	0.277	8	Maltosa	0.178
2	Galactosa	0.228	9	Inositol	0.139
3	Ribosa	0.347	10	Rafinosa	0.119
4	Ramnosa	0.386	11	Sacarosa	0.168
5	Manosa	0.248	12	Fructosa	0.257
6	Glucosa	0.218	13	Polisacárido	0.213
7	Xilosa	0.277	14	Polisacárido	0.213

### III.4 Caracterización del polisacárido

#### III.4.1 Análisis del espectro FT-IR

El espectro de FT-IR (Figura III.3) mostró picos de absorción característicos de un polisacárido, para las vibraciones de estiramiento C-H (2923 a 2931  $\text{cm}^{-1}$ ) y los picos de absorción débiles de 1400 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  <sup>(96)</sup>. Además, exhibió un pico intenso en 3265 a 3291  $\text{cm}^{-1}$  que se atribuyó a las vibraciones de estiramiento del grupo hidroxilo. Los picos complejos que oscilaron entre 1200 y 1021  $\text{cm}^{-1}$  fueron debido a la vibración de la banda glicosídica C – O – C. <sup>(97)</sup>. Especialmente, las adsorciones a 1121, 1026 y 1023  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyeron a los picos característicos de un enlace  $\beta$ -pirano <sup>(98)</sup>. La fuerte absorción característica a 917  $\text{cm}^{-1}$  sugirió la abundancia de enlaces  $\beta$ -glicosídicos en el compuesto, y el pico débil a 851  $\text{cm}^{-1}$  confirmó la existencia de un enlace glucosídico <sup>(99)</sup>.



*Figura III.3 Espectro de FT-IR del polisacárido.*

Asimismo, PLS mostró señales a 1634, 1410 y 1596  $\text{cm}^{-1}$  que se relacionaron con la absorción del grupo carboxílico desprotonado. Por tanto, el compuesto aislado contiene grupos funcionales de un polisacárido.

La Figura III.4 muestra el espectro de IR de un polisacárido aislado de calabaza que contiene bandas de absorción que sugieren las vibraciones de estiramiento (C-C) y (C-O-C) a 1018, 1107 y 1110  $\text{cm}^{-1}$ . En adición, una banda a 913  $\text{cm}^{-1}$  asignada al modo de deformación del enlace  $\beta$ -glucosídico correspondiente a (C<sub>1</sub>-H) y otra banda a (833  $\text{cm}^{-1}$ ) correspondiente al modo de deformación del enlace  $\alpha$ -glucosídico y la intensidad más alta de la banda (OH) a 3242  $\text{cm}^{-1}$ .

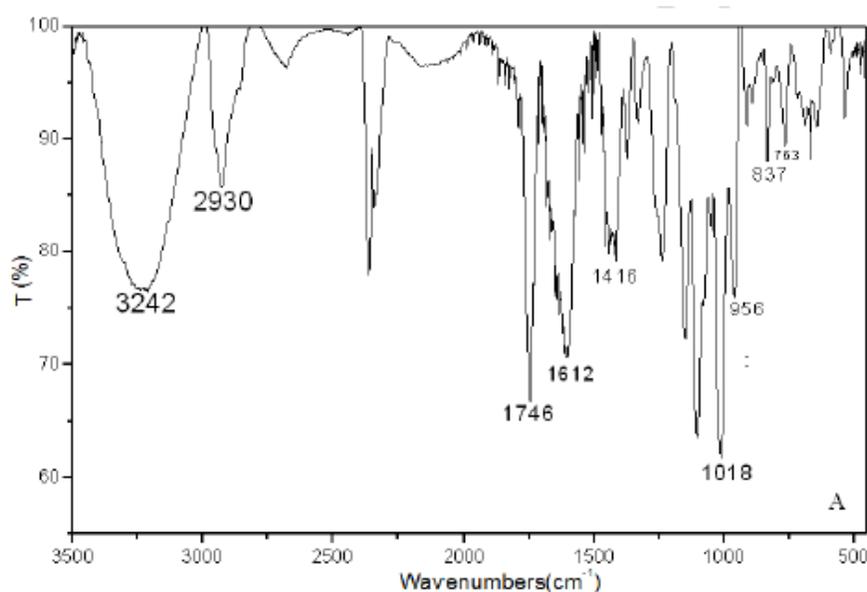


Figura III.4. Espectro de IR de un polisacárido aislado de calabaza<sup>100</sup>.

### III.4.2 Análisis del espectro de RMN del polisacárido

El espectro de <sup>1</sup>H RMN muestra las señales típicas de polisacáridos principalmente en el rango de 3.0 a 6.0 ppm y para <sup>13</sup>C RMN en el rango de 60.0-110.0 ppm. Las señales de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se han resumido en la Tabla III.2 y cada desplazamiento químico corresponde a  $\delta$  en ppm. El polisacárido aislado mostró señales para cuatro protones anoméricos en  $\delta_{\text{H}}$  5.27,  $\delta_{\text{H}}$  5.08,  $\delta_{\text{H}}$  4.79 y  $\delta_{\text{H}}$  4.78 en el espectro de <sup>1</sup>H RMN indicando que el compuesto aislado está compuesto principalmente por cuatro tipos de azúcares (Figura III.5). Los otros desplazamientos químicos indican que las posiciones de todos los residuos de azúcar se acumularon en el campo de 3.3–3.8 ppm para C-2 a C-6. Las señales de carbono anoméricas de las unidades A, B, C y D fueron

detectables a  $\delta_C$  103.65,  $\delta_C$  98.90,  $\delta_C$  98.21 y  $\delta_C$  91.96, respectivamente, así como también apareció otro carbono no anomérico desde  $\delta_C$  61.00 a  $\delta_C$  81.16.

Tabla III.2. Cambio químico de las señales de los espectros RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$ .

Residuo	Enlace glucosídico	Cambio	Desplazamientos químicos, $\delta$ (ppm)					
			H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
A	$\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-Galp	C	103.65	73.82	81.37	68.31	73.82	61.03
		H	4.79	3.60	3.69	3.94	3.63	3.99
B	$\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D Galp(1 $\rightarrow$	C	98.90	72.62	74.24	72.60	72.12	69.32
		H	4.78	3.88	4.01	3.99	4.04	3.72
C	$\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-Glcp	C	98.21	71.20	73.78	76.14	71.09	61.23
		H	5.20	3.57	3.73	3.60	3.88	3.77/ 3.60
D	Glcp- $\alpha$ reducida	C	91.96	69.52	73.81	69.21	71.21	60.40
		H	5.23	3.52	3.71	3.34	3.88	3.92/ 3.76

Las señales en  $^{13}C$  RMN del polisacárido se encuentran entre 90 y 103 ppm, manifestando que el compuesto aislado era de forma  $\alpha$  y  $\beta$  <sup>(101)</sup>. La señal de protones anoméricos en  $\delta_H$  4.79 y  $\delta_C$  103.65 revelaron que el compuesto aislado tiene una configuración de tipo  $\beta$  y las otras señales en  $\delta$  98.90,  $\delta_C$  98.21 y  $\delta_C$  91.96, revelaron que este compuesto mostraba una configuración de tipo  $\alpha$ , Figura III.6.

En el residuo A, las resonancias para H-1, H-2, H-3 y H-4 se asignaron a partir de las correlaciones en el espectro COSY. La resonancia H-5 se sugirió a partir de los picos cruzados para H-3/4 y H-4 / H-5 en el espectro NOESY. Tanto H-3 como H-5 y H-4 indican que A es un residuo de tipo Galactosa. En el espectro de  $^1H$  NMR, el centro anomérico se observa desde el singlete de H-1, así como las características  $J_{H-1, H-2} < 3$  Hz y las correlaciones H-1 / H-2 en el espectro NOESY indican que el residuo A tiene una configuración  $\alpha$ . Así, la combinación de estos datos, el residuo fue identificado como  $\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-Galp.

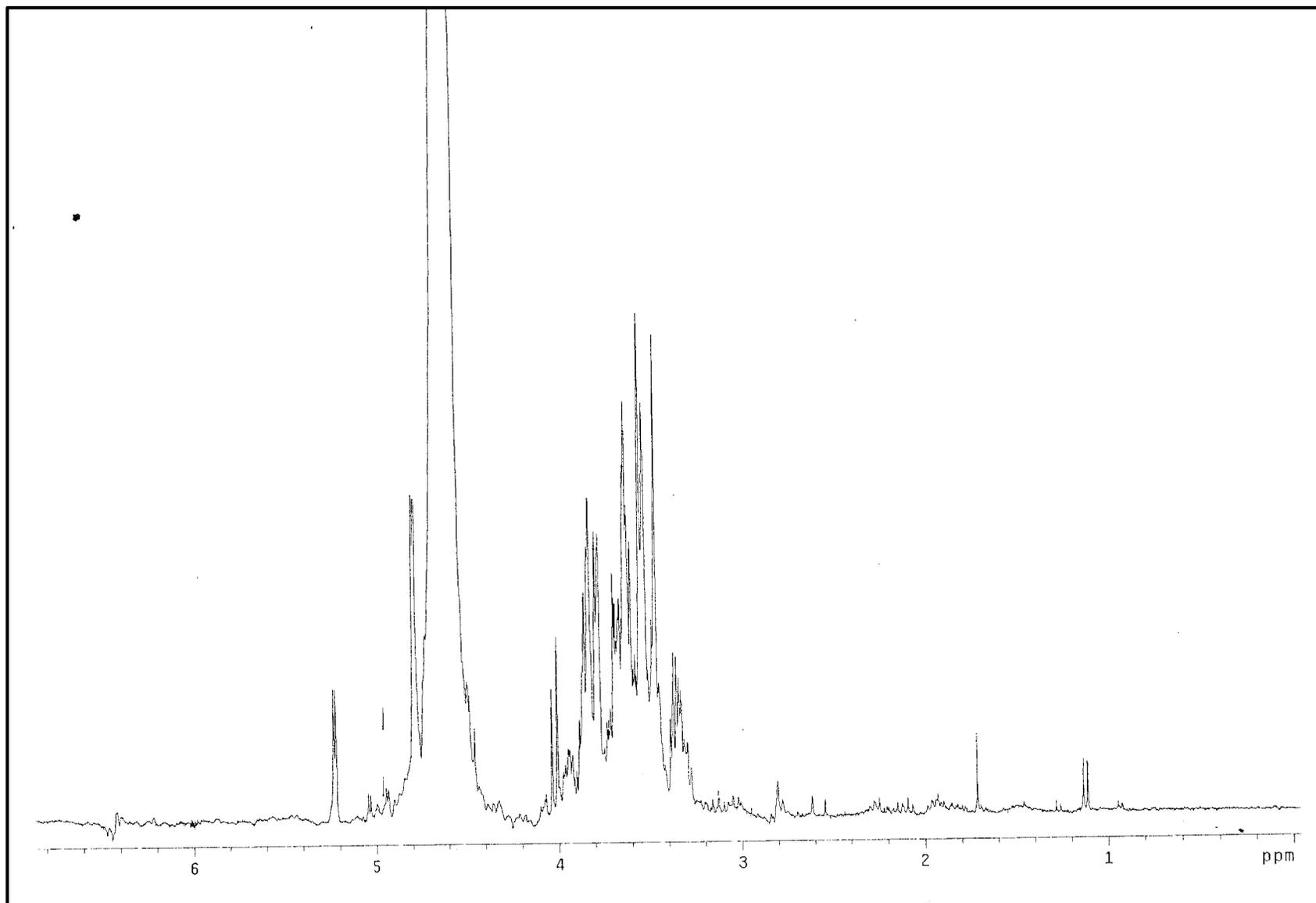


Figura III.5. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del polisacárido.

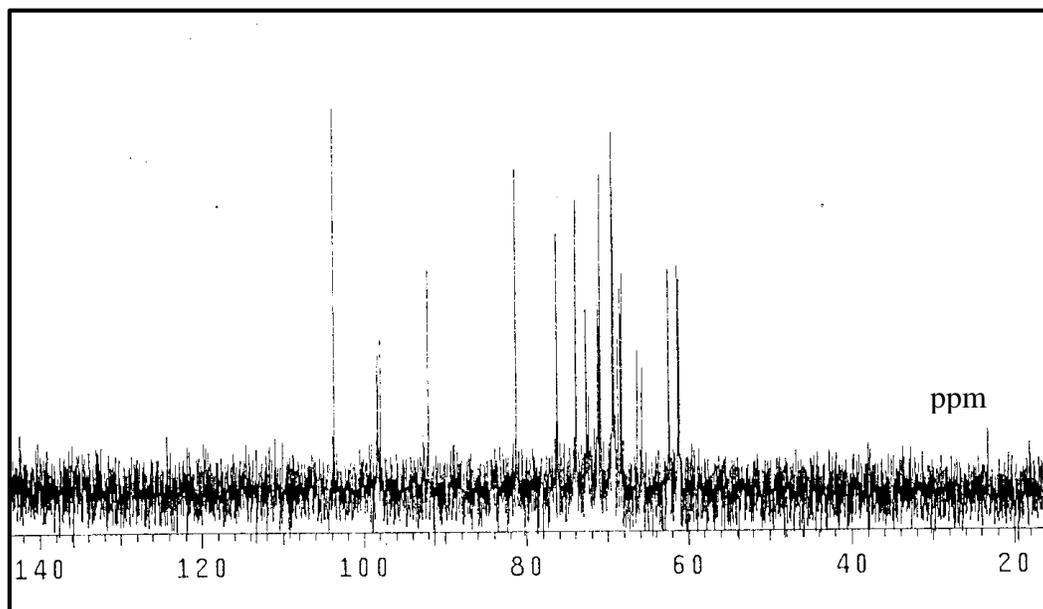


Figura III.6 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del polisacárido.

En el residuo B, las señales de protones anoméricos que aparecen en  $\delta_{\text{H}}$  4.79 indicaron una configuración  $\beta$ . Las resonancias entre H1 / C1 de este residuo se percibieron en  $\delta_{\text{H}}$  4.79 /  $\delta_{\text{C}}$  103.65. La observación del pico cruzado en  $\delta_{\text{H}}$  3.69 /  $\delta_{\text{C}}$  81.37 en la unidad B sugirió que estaba sustituido en C3, en comparación con C3 no sustituido que generalmente apareció en  $\delta_{\text{C}}$  71-73 (102,103). Por lo tanto, el residuo B se asignó como  $\rightarrow 3$ )- $\beta$  D-Galp- (1  $\rightarrow$ ).

Para el residuo C, el protón anomérico de la señal en  $\delta_{\text{H}}$  4.78 se correlacionó con la señal de los carbonos anoméricos en  $\delta_{\text{C}}$  98.21. Este resultado indicó que eran residuos de glucopiranososa con enlaces  $\alpha$ . En el espectro COSY, las señales de otros protones en diferentes posiciones de un azúcar configurado (H-2, H-3, H-4H-5, H-6 y H-6') se reconocieron de acuerdo con sus correlaciones (Figura III.9). Lo cual se confirmó a partir de la correlación heteronuclear de enlaces múltiples (HMBC) de los polisacáridos. Los cambios químicos de H-1, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6 y H-6' en el espectro COSY estaba en  $\delta_{\text{H}}$  5.20,  $\delta_{\text{H}}$  3.57,  $\delta_{\text{H}}$  3.73,  $\delta_{\text{H}}$  3.60,  $\delta_{\text{H}}$  3.88 y  $\delta_{\text{H}}$  3.77 /  $\delta_{\text{H}}$  3.60 debido a los picos cruzados de H-1 / H-2, H-2 / H-3, H-3 / H-4, H-4 / H-5, H-5 / H-6 y H-5 / H-6. (Figura III.9).

El desplazamiento hacia abajo de C4 en  $\delta_{\text{C}}$  76.14 en comparación con los datos de Zhang<sup>102</sup> demostraron la presencia de enlaces (1  $\rightarrow$  4), por lo que este residuo se identificó como  $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-Glcp).

Para el residuo D, la señal a  $\delta_C$  91.96 se atribuyó a la glucosa; Algunas otras señales de carbono anoméricas pueden atribuirse a diferentes configuraciones de glucosa y galactosa. Además, estos cambios han sido ampliamente estudiados; el desplazamiento del protón H-1 anomérico  $\alpha$  en  $\delta_H$  5.23 y el cambio del C-1 a  $\delta_C$  91.96 y el anómero  $\beta$  tiene un desplazamiento H-1 en  $\delta_H$  4.69 y el C-1 cambió a  $\delta_C$  96.53. Las correlaciones C-1 / H-1 en  $\delta_H$  5.23/  $\delta_C$  91.96, indicaron que el residuo D correspondía a Glcp libre en  $\alpha$ .

Para  $\alpha$ -Glcp reducida, las correlaciones en el espectro COSY (Figura III.8) fueron: H-1 / H-2 ( $\delta_H$  5.23 /  $\delta_H$  3.52), H2 / H-3 ( $\delta_H$  3.52 /  $\delta_H$  3.71), H 3 / H-4 ( $\delta_H$  3.71 /  $\delta_H$  3.34, H-4 / H-5 ( $\delta_H$  3.34 /  $\delta_H$  3.88), H-5 / H-6 ( $\delta_H$  3.88 /  $\delta_H$  3.92) y H-5 / H-6 ( $\delta_H$  3.88 /  $\delta_H$  3. Del análisis anterior los cuatro residuos de azúcar (A, B, C, y D), están unidos por enlaces glucosídicos en la configuración alfa y beta, por tanto, la Figura III.7 es una propuesta del polisacárido aislado de semillas de calabaza Cucurbita argyrosperma.

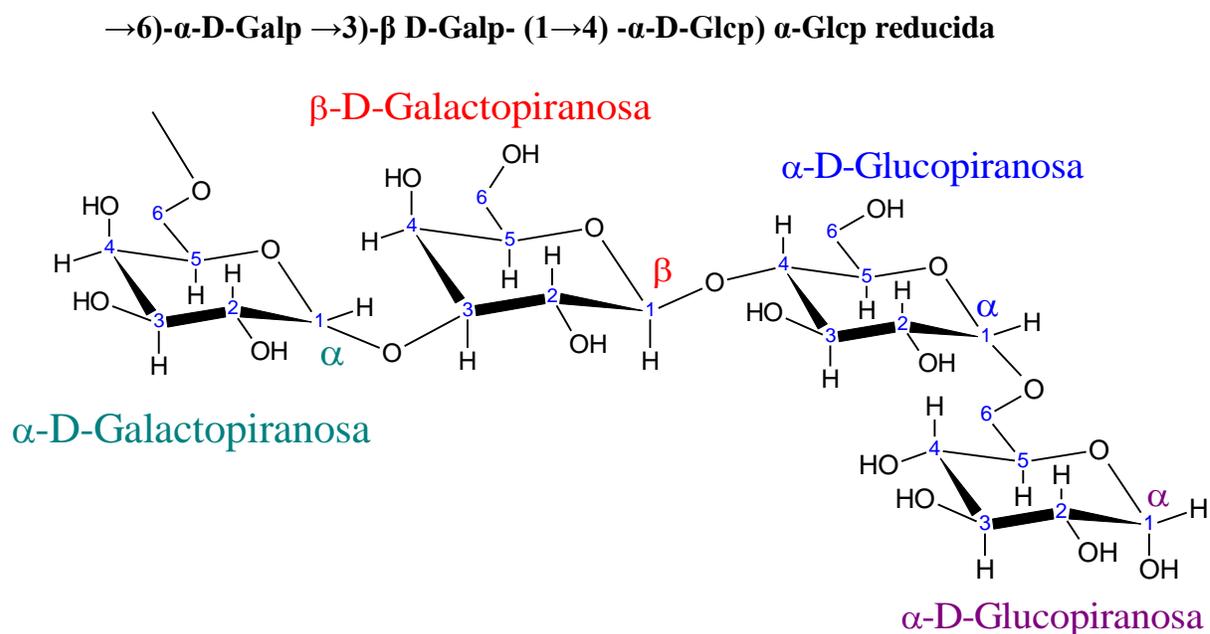


Figura III.7. Estructura propuesta del polisacárido de Cucurbita argyrosperma.

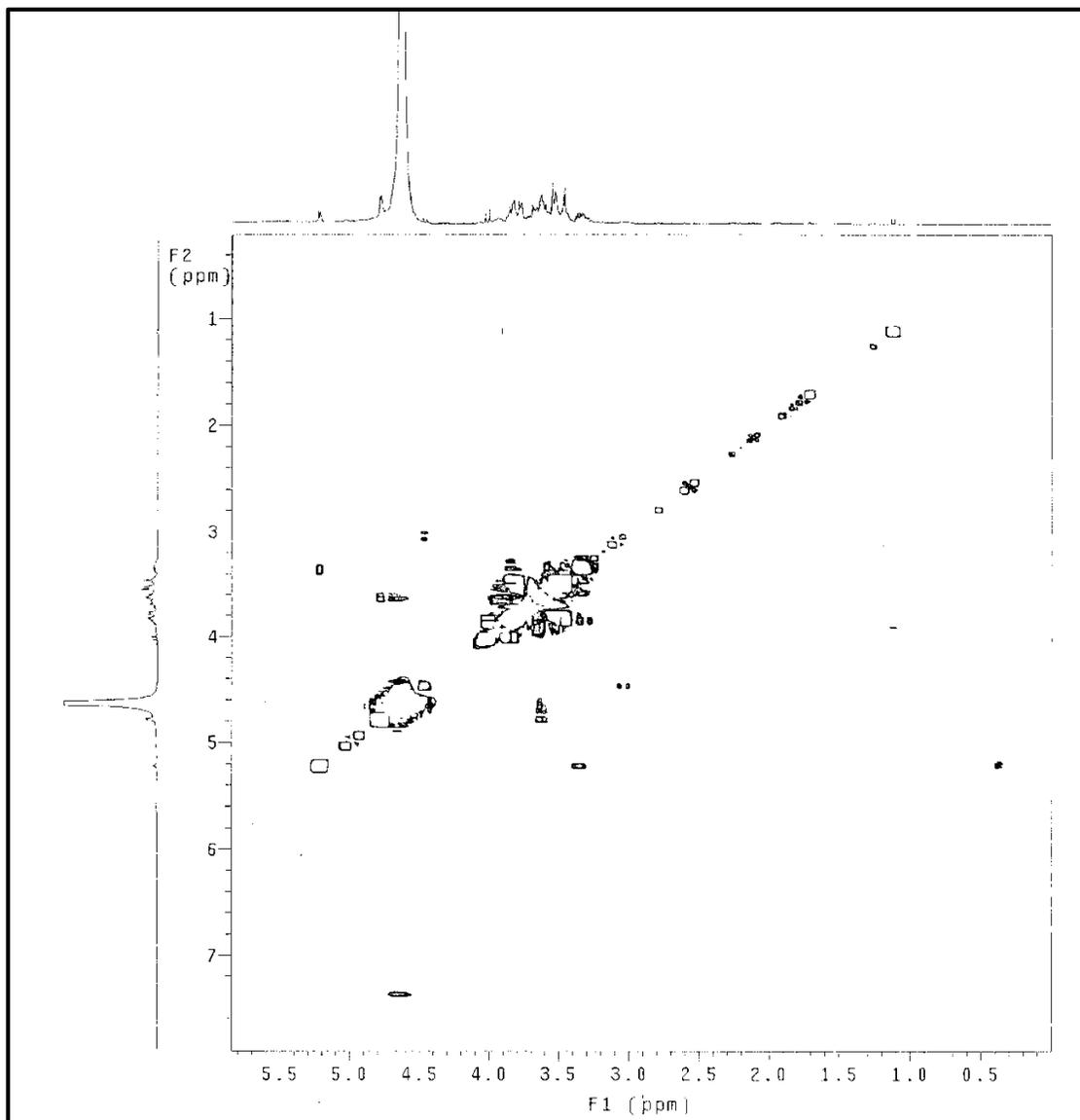


Figura III.8 Espectro COSY para PLS.

### III.4.3 Análisis del espectro UV

El espectro de ultravioleta entre 200 y 800 nm no mostró ningún pico, lo que permite inferir la ausencia de proteínas que pudieran estar unidas al polisacárido.

### III.5 Actividad antioxidante *in vitro*

#### III.5.1 Captación del radical DPPH por el polisacárido (PLS)

Se analizó la inhibición del radical estable DPPH, indicando que a medida que el radical DPPH capta un electrón en presencia de PLS, la absorción disminuye y por ende la decoloración cambiando de violeta a amarillo (Figura III.9), lo cual se relaciona estequiométricamente con los electrones, tal y como se muestra en la (Figura III.10)<sup>104</sup>.

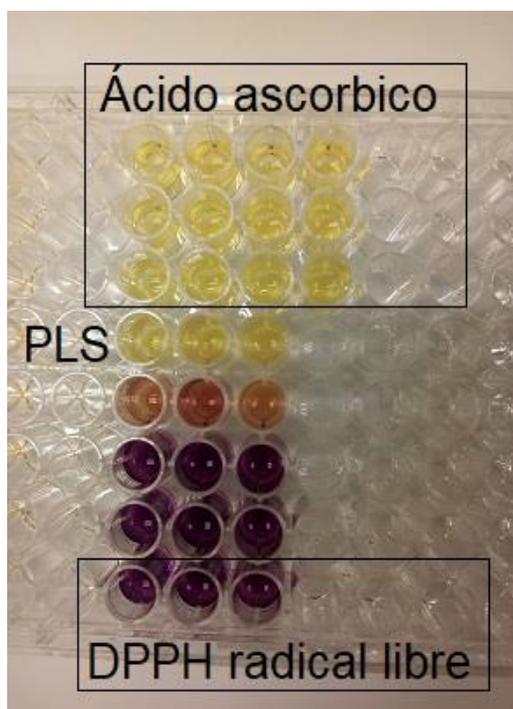


Figura III.9. Ensayo de la captación del radical DPPH.

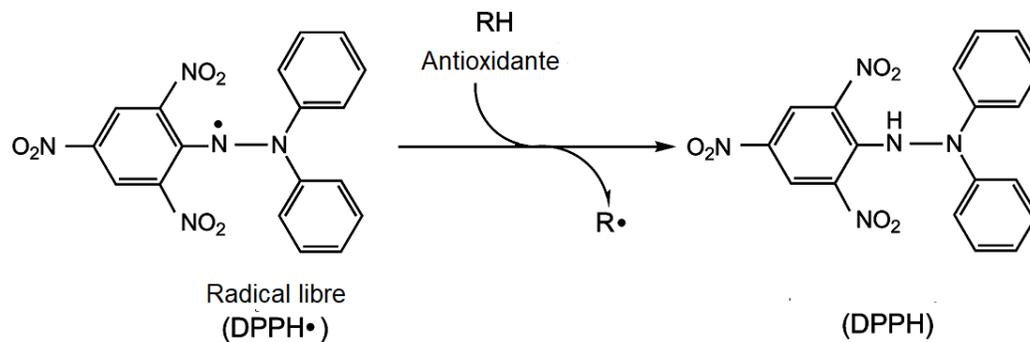
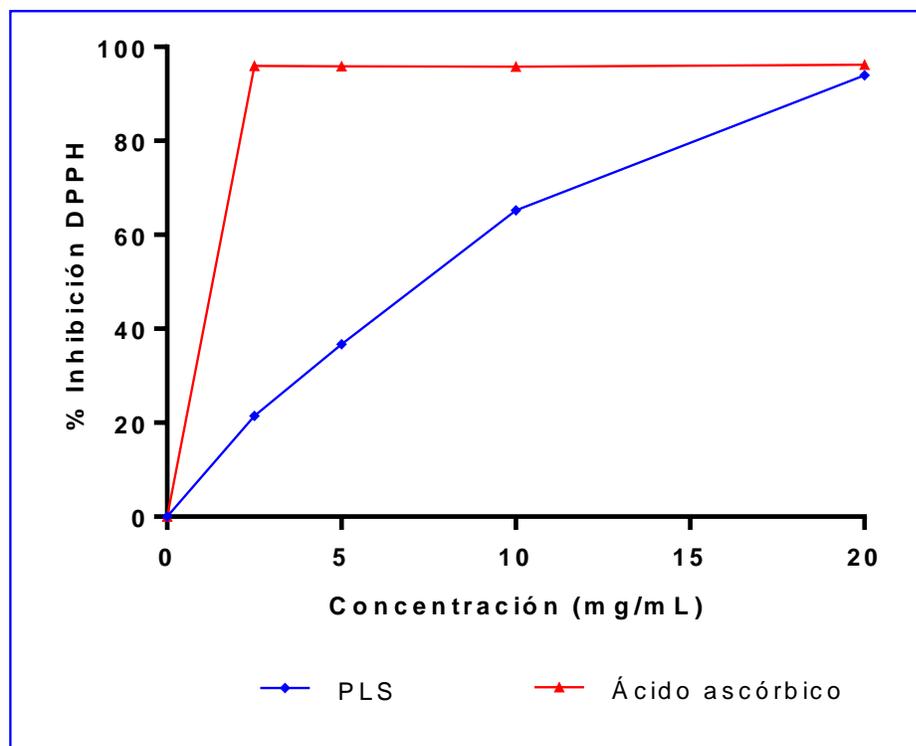


Figura III.10 Reacción entre el radical libre (DPPH•) y un antioxidante a la forma (DPPH)<sup>104</sup>.

La actividad de captación de radicales DPPH por PLS ejerció una inhibición del 93.98% y la del ácido ascórbico fue de 96.20% a una concentración de 20 mg/mL. El EC<sub>50</sub> de PLS fue de 6.446 mg/ml, mientras que el EC<sub>50</sub> del ácido ascórbico fue de 1.893 mg/ml. (Gráfica III.1)



Gráfica III.1. Actividad de captación de radicales DPPH.

### III.5.2 Captación del radical ABTS<sup>+</sup> por PLS

El radical catiónico ABTS<sup>+</sup> es ampliamente recomendado para la actividad antioxidante de compuestos naturales<sup>104</sup>. La habilidad de captación del radical ABTS<sup>+</sup> en PLS fue evaluada y comparada con Trolox como estándar, esta a su vez puede correlacionarse con la concentración. La Figura III.11 muestra que PLS captó al radical ABTS<sup>+</sup> a una concentración de 8 mg/ml, lo cual se reflejó en el cambio de coloración, mientras que el porcentaje de inhibición de este fue del 72.15%. (Gráfica III.2). En tanto que el estándar a una concentración de 0.1 mg/ml presentó un porcentaje de inhibición del 83.49% (Gráfica III.3). Por lo que, el EC<sub>50</sub> para PLS fue de 4.055 mg/ml y para Trolox con un valor de 0.05953 mg/ml, respectivamente.

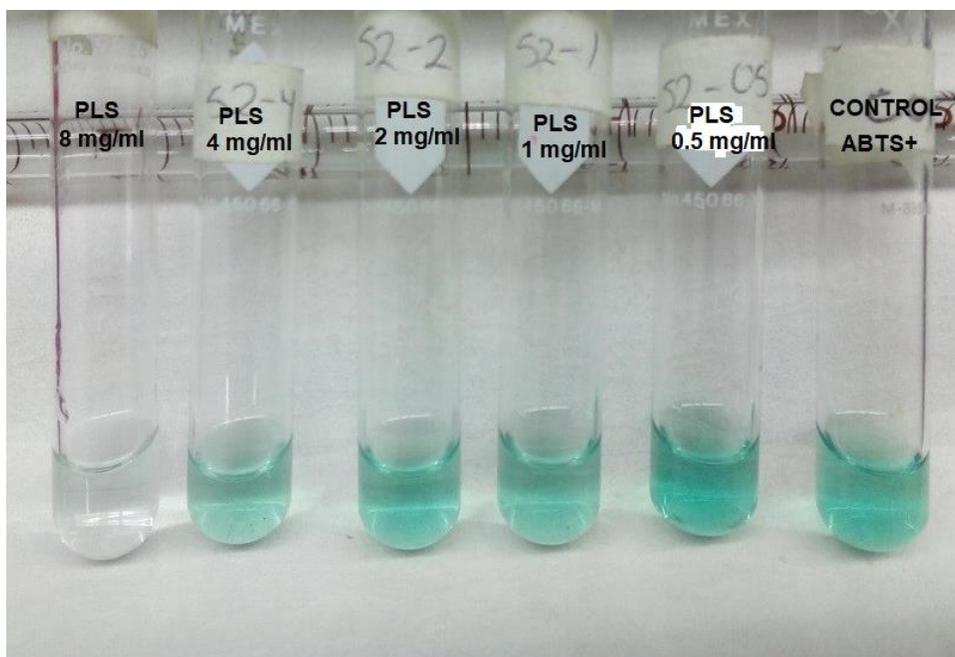
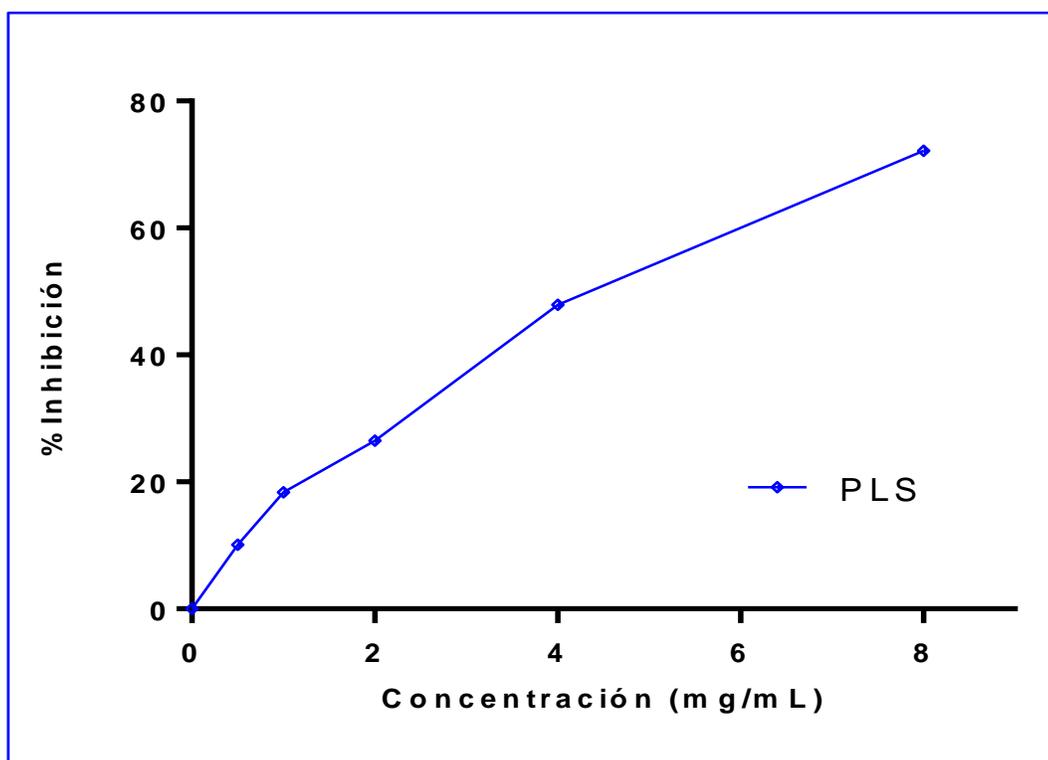
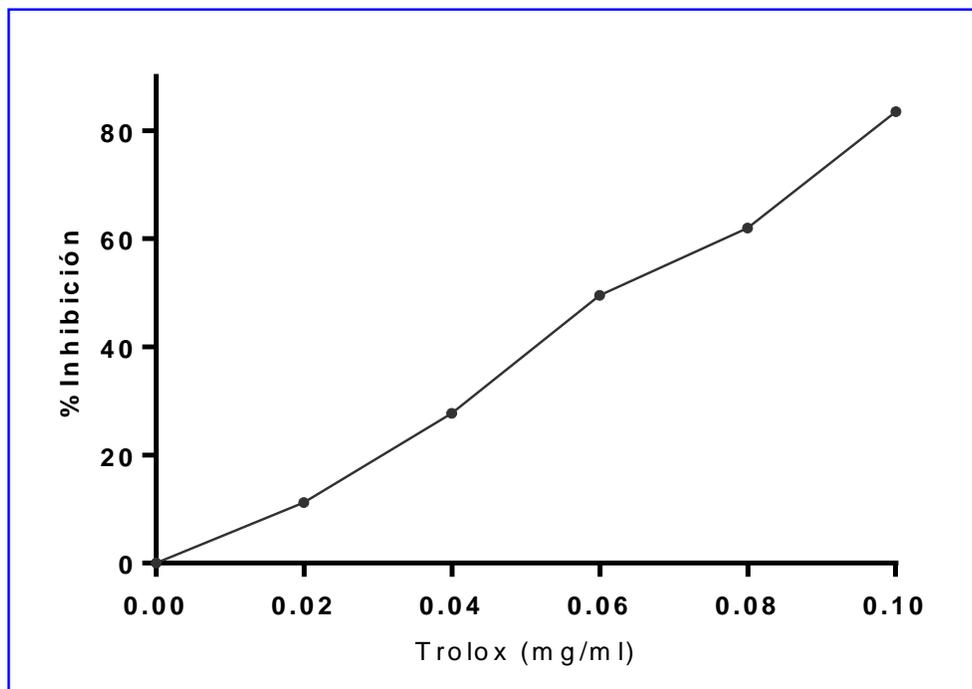


Figura III.11. Captación del radical ABTS a diferentes concentraciones de PLS.



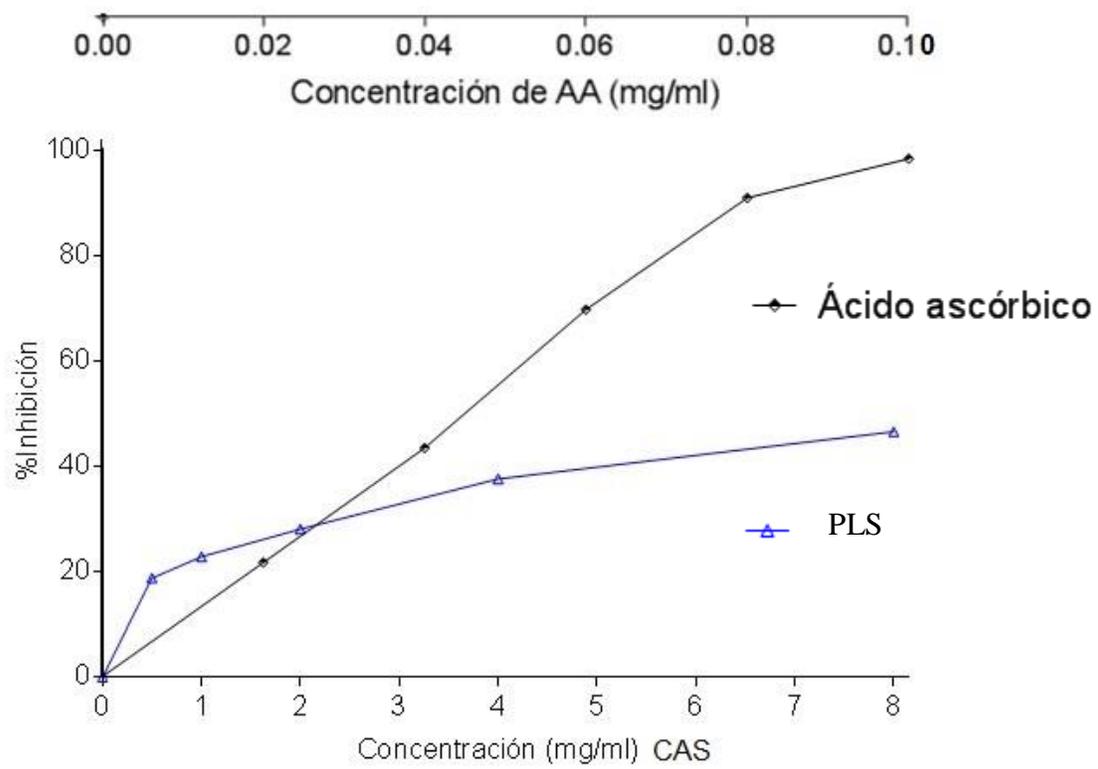
Grafica III.2. Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de PLS en la captación del radical ABTS<sup>+</sup>.



*Grafica III.3. Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de Trolox en la actividad de captación del radical ABTS<sup>+</sup>.*

### III.5.3 Captación del radical hidroxilo

Dentro de las especies reactivas de oxígeno (ERO), se encuentra el radical hidroxilo el cual es uno de los radicales libres de mayor actividad que atacan a moléculas biológicas y provocan reacciones en cadena. La captación del radical hidroxilo por PLS y del ácido ascórbico (AA) usado como estándar de referencia se muestra en la Grafica III.4. El EC<sub>50</sub> obtenido para PLS fue de 11.09 mg/ml comparado con el del AA fue de 0.0413 mg/ml. De igual forma, la Figura III.12 muestra el cambio de coloración de PLS a una concentración de 8 mg/ml, comparado con el control, que contenía la mezcla de reacción, pero sin PLS.



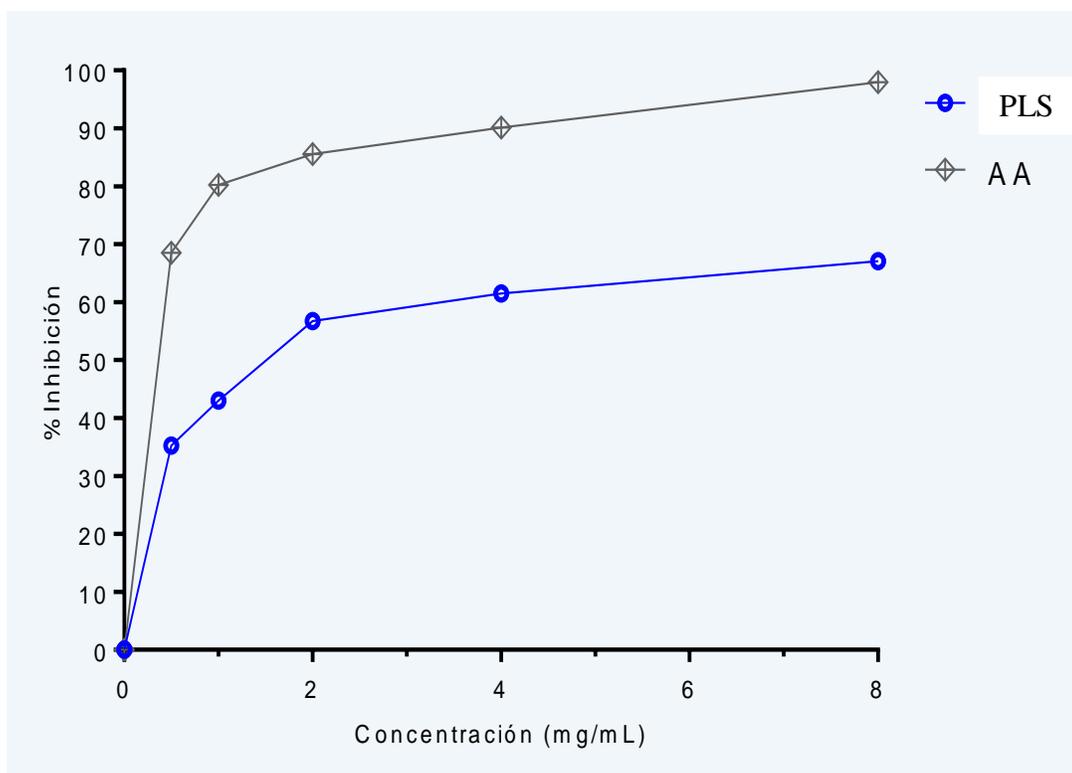
*Grafico III.4. Porcentaje de inhibición de PLS en la captación del radical hidroxilo.*



*Figura III.12. Captación del radical hidroxilo (PLS y control).*

### III.5.4 Captación del radical superóxido

La captación del radical superóxido fue utilizada para evaluar la habilidad que tiene PLS de captar al radical superóxido. Con un porcentaje de inhibición de 67.1% para PLS, el ácido ascórbico mostró un 97.7% de inhibición a una concentración de 8 mg/ml como se representa en la Grafica III.5. El  $EC_{50}$  para PLS fue de 1.575 mg/ml mientras que el  $EC_{50}$  del ascórbico fue de 0.1858 mg/ml.



*Grafica III.5. Porcentaje de inhibición de PLS en la captación del radical superóxido.*

### III.6 Actividad anti-glicación in vitro

También, se evaluó el efecto de PLS en la formación de (AGEs) por el método de BSA, los productos finales de glicación avanzada (AGEs), son un grupo de compuestos con características oxidantes que se acumulan con hiperglucemia crónica y contribuyen al desarrollo de las complicaciones diabéticas. Por ello, la inhibición de la formación de AGEs constituye un objetivo terapéutico atractivo para el tratamiento de la diabetes.

Los resultados muestran que el polisacárido aislado inhibió la formación de AGEs en el sistema de BSA/Glucosa, después de cuatro semanas de incubación, de acuerdo a lo presentado en la

Figura III.13, la inhibición se comparó con la aminoguanidina a una concentración de 1 mg/ml, bajo las mismas condiciones de reacción y duración de la misma.

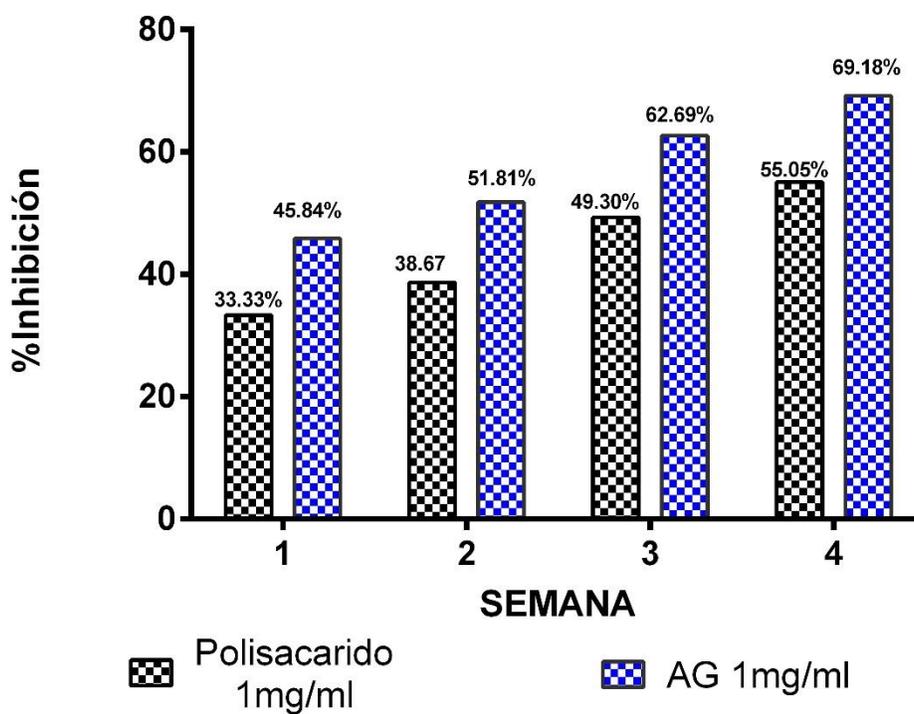


Figura III.13. Inhibición en la formación de AGEs por PLS.

## Conclusiones

Se obtuvo un extracto de metanol de las semillas de *C. argyrosperma* con propiedades antioxidantes y anti-glicación de la proteína BSA.

Al extracto de metanol se le hizo un biofraccionamiento por columnas cromatográficas para obtener un polisacárido con efecto antioxidante y anti-glicación.

El polisacárido se caracterizó empleando técnicas espectroscópicas indicado que este contiene cuatro tipos de azúcares ( $\alpha$ -D-Galactopiranososa,  $\beta$ -D-Galactopiranososa,  $\alpha$ -D-Glucopiranososa y  $\alpha$ -D-Glucopiranososa libre) unidos entre sí por enlaces glucosídicos.

Se realizaron diferentes ensayos *in vitro* para estimar la capacidad antioxidante de PLS mostrando mejor efecto en la captación del radical DPPH, radical ABTS<sup>+</sup> y radical superóxido. Sin embargo, el radical hidroxilo, tuvo menor inhibición, debido a que es uno de los radicales libres más reactivo.

Además del efecto antioxidante, PLS mostró actividad para reducir la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), después de cuatro semanas de incubación.

Se aisló y caracterizó un polisacárido de las semillas de calabaza *C. argyrosperma* con actividad antioxidante y anti-glicación. Por lo tanto, las semillas son una fuente natural de antioxidantes, para ser empleadas en la generación de productos que puedan tener un impacto en diferentes padecimientos, tales como la diabetes.

9/9/2019

Gmail - RV: Track your co-authored submission to Biomedicine & Pharmacotherapy



JOSE A LEANDRO <tonylefa34@gmail.com>

---

## RV: Track your co-authored submission to Biomedicine & Pharmacotherapy

1 mensaje

---

Rosa Martha Pérez Gutiérrez <rmpeg01@hotmail.com>  
Para: JOSE A LEANDRO <tonylefa34@gmail.com>

27 de agosto de 2019, 16:58

---

**De:** Biomedicine & Pharmacotherapy <[Evisesupport@elsevier.com](mailto:Evisesupport@elsevier.com)>  
**Enviado:** martes, 23 de julio de 2019 01:26 p. m.  
**Para:** [mpg01@hotmail.com](mailto:mpg01@hotmail.com) <[mpg01@hotmail.com](mailto:mpg01@hotmail.com)>  
**Asunto:** Track your co-authored submission to Biomedicine & Pharmacotherapy

Dear Professor Leandro Felipe,

Submission no: BIOPHA\_2019\_3568

Submission title: Antioxidant polysaccharide from Cucurbita argyrosperma seeds inhibits glycation at multiple stages, pancreatic  $\beta$  INS 1 cells protects from oxidative damage and improved insulin resistance in C2C12 cells

Corresponding author: Dr Rosa Martha Pérez Pérez Gutiérrez

Listed co-author(s): Dr Efren Garcia Baez, Professor Jose Antonio Leandro Felipe, Dr Maria Fernanda Estrella Mendoza

Dr Pérez Gutiérrez has submitted a manuscript to Biomedicine & Pharmacotherapy and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

[http://www.evises.com/profile/api/navigate/BIOPHA?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite\\_email\\_coauthoroutreach07533322%23%2FBIOPHA%2Fsubmission%2FBIOPHA\\_2019\\_3568&email=rmpeg01@hotmail.com&firstName=Jose+Antonio&surname=Leandro+Felipe&country=Mexico&title=Professor](http://www.evises.com/profile/api/navigate/BIOPHA?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach07533322%23%2FBIOPHA%2Fsubmission%2FBIOPHA_2019_3568&email=rmpeg01@hotmail.com&firstName=Jose+Antonio&surname=Leandro+Felipe&country=Mexico&title=Professor)

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at: <https://service.elsevier.com>

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

Biomedicine & Pharmacotherapy

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can unsubscribe via this link:

[http://www.evises.com/co-author/#/BIOPHA/unsubscribe/rmpeg01@hotmail.com/uS4yc3CKQQuUPFPxKVUnrwJBo\\_kHcCRMctbb2KrMYsjLCv3I2EjrRHA6Z21wlcPFZ4BSUJDULCbMC5IIIGYeA](http://www.evises.com/co-author/#/BIOPHA/unsubscribe/rmpeg01@hotmail.com/uS4yc3CKQQuUPFPxKVUnrwJBo_kHcCRMctbb2KrMYsjLCv3I2EjrRHA6Z21wlcPFZ4BSUJDULCbMC5IIIGYeA)

Productividad

## Referencias

1. González J., et al. (2015). Empleo de antioxidantes en el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas. *Revista especializada en Ciencias de la salud*, 18(1), 16-21.
2. Ferreira I. C.R.F. Carochi M., (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
3. Saura S.C., (1998). Antioxidant Dietary Fiber Product: A New Concept and a Potential Food Ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4303-4306.
4. Morales P., Ferreira I.C.C.R., Carochi M., (2018). Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 107-120.
5. Lira, S.R., (1996). Calabazas de México. *Ciencias*, 42, (abril-junio), 52-55.
6. Smith, B.D., (1997). The initial domestication of Cucurbita pepo in the Americas 10,000 years ago. *Sci* 276, 932-934.
7. Lira, S.R., Villaseñor, J.L., Ortiz, E., (2002). A proposal for the conservation of the family Cucurbitaceae in México. *Biodiversity and Conservation*, 11, 1699-1720
8. Lira, S.R., Montes, H.S., (1992). Cucurbits (*Cucurbita spp.*) *Neglected crops: 1492 from a different perspective*.
9. Lira, R.S., (1995). Estudios Taxonómicos y Eco geográficos de las Cucurbitaceae Latinoamericanas de Importancia Económica. *Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Gene pools*. 9. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia.
10. Lira, S.R., Montes H.S., (1992). Cucúrbitas (*Cucurbita spp.*). En: Hernández B. J.E., y León, J., (Eds). *Cultivos Marginados, Otra Perspectiva de 1492*. FAO, 61-75. Recuperado de Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura Informe Nacional
11. Bukasov, S.M., (1981). *Las plantas cultivadas en México, Guatemala y Colombia*. Ed. Turrialba. Costa Rica. GATIE-GTZ, 386.
12. Ayvar, S.S., Mena, B.A., Dúran, R. J.A., Cruzaley, S.R., y Gómez, M. N.O., (2007). *La calabaza pipiana y su manejo integrado*. Iguala, Guerrero. México.
13. Recuperado de <https://foodandtravel.mx/wpcontent/uploads/2016/10/Calabaza-pipiana.jpg>
14. CONABIO. (2018). Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20832\\_especie.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20832_especie.pdf)  
Consultado el 7 de noviembre de 2018.
15. Recuperado de <https://fitochapingo.net/calabaza-pipian-chigua-cucurbita-argyrosperma/>

16. Pérez, G. R.M., (2016). Review of Cucurbita pepo (Pumpkin) its Phytochemistry and Pharmacology. *Medicinal Chemistry*, 6, 012-021.
17. Lim, T.K., Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 2, Fruits.
18. Carvalho, L. M.J., Smiderle, L.A. Z.M., Carvalho, J.L.V., Cardoso, F.S.N., y Koblitz, M.G.B., (2014). Assessment of carotenoids in pumpkins after different home cooking conditions. *Food Sci Technol*, 34, Campinas April/June.
19. Adedayo, O.R., Farombi, A.G., Oyekanmi, A.M., (2013). Proximate, mineral and antinutrient evaluation of pumpkin (Cucurbita pepo). *J Applied Chem*, 4, 25-28.
20. Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Ashraf, K.M., (2005). Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J. Agric. Food Chem*, 53, 9436-9445.
21. Sabudak, T., (2007). Fatty acid composition of seed and leaf oils of pumpkin. Walnut almond, maize, sunflower and melon. *Chem Nat Compounds*, 43, 465-467.
22. Stevenson, D.G., Eller, F.J., Wang, L., Jane, J.L., Wang, T., (2007). Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 cultivars. *J. Agric. Food Chem*, 55, 4005-4013.
23. Lira, S.R., Eguiarte, F.L., Montes, H.S., (2009). Proyecto Recopilación y análisis de la información existente de las especies de los géneros Cucurbita y Sechium que crecen y/o se cultivan en México. Informe final.
24. Lira, S.R., Sosa, G. L.J., Cabral, S.I.V., Téllez, V.O., (2018). Cucurbita argyrosperma (calabaza de castilla). Registros de presencia. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. (CONABIO) Ciudad de México, México.
25. Garza, O.S., Núñez, G.H.C., Serrano, E.A., Huez, L.M.A., y López, E.J., (2010). Comportamiento diferenciado de líneas, híbridos y criollos de calabaza arota (Cucurbita argyrosperma Huber) en primavera y otoño. *Biotecnia*, XII (3), 3-13.
26. Lü, J.M., Lin, P.H., Yai, P., Chen, C., (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14(4), 840-860.
27. Flora, S.J.S., (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2(4), 191-206.
28. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., y Chantra, N., (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 8, 118-126.
29. Pisochi, A.M., Pop, A., (2015). The role of antioxidants in the Chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.

30. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., y Bitto, A., (2017). Review article. Oxidative stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 17, Article ID 8416763. 13 páginas.
31. Wang, S., Lu, A., Zhang, L., Shen, M., Xu, T., Zhan, W., Jin, H., Zhan, Y., y Wang, W., (2017). Extraction and purification of pumpkin polysaccharides and their hypoglycemic effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 182-187.
32. AMD. Asociación Mexicana de Diabetes. Recuperado de: <http://amdiabetes.org/informacion-sobre-diabetes>. Consultado el 5 de marzo de 2019.
33. Ullah, A., Khan, A., y Khan, I., (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress- A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 547-553.
34. OECD (2017). Diabetes prevalence in Health at a Glance 2017: OECD Publishing, Paris. DOI: [https://dx.doi.org/10.1787/health\\_glance-2017-15-en](https://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2017-15-en) Consultado el 5 de diciembre de 2018.
35. INEGI (2017). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>. Consultado el 6 de diciembre de 2018
36. OMS (2018). Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/diabetes>. Consultado el 6 de marzo de 2019.
37. Gutteride, J.M.C., y Halliwell, B., (2010). Antioxidants: Molecules, medicine, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393, 561-564.
38. Coba, P., Mayacu, L.T., y Vidari, G., (2010). Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*, 11(1), 22-30.
39. Özen, T., y İbrahim, T., (2010). Antioxidant activities of *Sarcodon ibricatum* wildly grown in the Black Sea Region of Turkey. *Pharmacognosy Magazine*, 6 (22), 89-97.
40. Halliwell, B., (1990). How to Characterize a Biological Antioxidant? *Free Radial Research Communications*, 9(1), 1-32.
41. Carocho, M., Morales, P., y C.F.R., F.I., (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food & Technology*, 71, 107-120.
42. Khlebnikov, A.I., Schepetkin, I.A., Domina, N.G., Kirpotina, L.N., y Quinn, M.T., (2007). Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 15, 1749–1770.
43. Carocho, M., y C.F.R., F.I., (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy. Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.

44. Poljsak, B., Suput, D., y Milisav, I., (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants, *Oxidative and Medicine Cellular Longevity*, 2013, Article ID 956792, 11 pages.
45. Oroian, M., y Escriche, I., (2015). Antioxidants: Characterization. Natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
46. Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001–1043.
47. Oliveira, L. D. L. D., Carvalho, M. V. D., & Melo, L. (2014). Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. *Revista Ceres*, 61, 764–779.
48. Spencer, J. P., Abd El Mohsen, M. M., Minihaue, A. M., & Mathers, J. C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, 1, 12–22.
49. Andersen, Ø. M., & Jordheim, M. (2010). Chemistry of flavonoid-based colors in plants. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, 3, 547-614.
50. Landete, J. M. (2012). Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International*, 46(1), 410–424.
51. Delgado, A.E., Palacio, O., y Aperador, W., (2015). Efecto de Butil Hidroxitolueno (BHT) en la Estabilidad Oxidativa de un Lubricante a Base de Aceite de Ajonjolí. *Información tecnológica*, 26(4), 81-88.
52. Safer, A. M., Al-Nughamish, A. J. (1999). Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive butylated hydroxytoluene (BTH) in rats: An electron microscopical study. *Histol and Histopathol*, 14(2), 391-406.
53. Wichi, H. P., (1998). Enhanced tumor development by Butylated Hydroxyanisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and o esophageal *squamous epithelium*. *Food Chem. Toxicol*, 26(8), 717-723.
54. Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., Dhaka, N., (2013). Potential applications of antioxidants - A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7, 828—835.
55. Larson, R.A., Sharma B.K., Marley K.A., Kunwar B., Murali D., Scott J., (2017) Potential antioxidants for biodiesel from a softwood lignin pyrolyzate. *Industrial Crops and Products*, 109, 476-482.
56. Kirschweg B., Tátraaljai D., Földes E., Pukánszky B., (2017). Natural antioxidants as stabilizers for polymers. *Polymer Degradation and Stability*, XXX, (1-16).

57. Junqiao W., Shuzhen H., Shaoping N., Qiang Y., and Mingyong X., (2016). Reviews on Mechanisms of *in Vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharides. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 5692852, 13 páginas.
58. Wang X., Zhang L. S., Dong L.L., (2012). Inhibitory effect of polysaccharides from pumpkin on advanced glycation end-products formation and aldose reductase activity. *Food Chemistry*, 130, 821-825.
59. Luévano, C.C., Gómez, O.A., y Garay, S.M.E., (2017). Elaboración de dietas bajas en productos finales de glicación avanzada. *Revista de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD)*, 7, 57-65.
60. Wei, Q., Liu, T., y Sun, D.W., (2018). Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 34-45.
61. Oliveira, F. C. D., Coimbra, J. S. D. R., Oliveira, E. B. D., Zuñiga, A. D. G., y Rojas, E. E. G. (2016). Food protein-polysaccharide conjugates obtained via the Maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(7), 1108–1125.
62. Lin, R. Y., Choudhury, R. P., Cai, W., Lu, M., Fallon, J. T., Fisher, E. A., y col. (2003). Dietary glycotoxins promote diabetic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 168(2), 213–220.
63. Sharma, C., Kaur, A., Thind, S.S., Singh, B., y Raina, S., (2015). Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7561-7576.
64. Brownlee M., Vlassara H., Kooney A., Ulrich P. and Cerami A., (1986). Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science*, 232, 1629–1632.
65. Y. Yua, Mingyue S., Qianqian S., Jianhua X., (2018). Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydrate Polymers*, 183, 91-101.
66. Shi. L., (2016). Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 37-48.
67. Recuperado de <https://www.realmushrooms.com/polysaccharides-mushrooms-poor-quality-measurement/>. Consultado el 25 de marzo de 2019.
68. Li, H., Ding, F., Xiao, L., Shi, R., Wang, H., Han, W., y Huang, Z., (2017). Food- Derived Antioxidant Polysaccharides and Their Pharmacological Potential in Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*. 9(7), 778.

69. Wang, L., Liu, F., Wang, A., Yu, Z., y Xu, Y., (2017). Purification, characterization and bioactivity determination of a novel polysaccharide from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds. *Food Hydrocolloids*, 66, 357-364.
70. Wang, S., Lu, A., Zhang, L., Shen, M., Xu, T., Zhan, W., Jin, H., Zhang, Y., y Wang, Y., (2017). Extraction and purification of pumpkin polysaccharides and their hypoglycemic effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 182-187.
71. Song, Y., Li, J., Hu, X., Ni, Y., -y Li, Q., (2011). Structural Characterization of a polysaccharide isolated from (*Cucurbita pepo* Lady Godiva) pumpkins. *Macromolecular Research*, 19(11), 1172-1178.
72. Košťálová, Z., Hromádková, Z., y Ebringerová, A., (2010). Isolation and characterization of pectic polysaccharides from de seeded fruit of oil pumpkin (*Cucurbita pepo* L. var. *Styriaca*). *Industrial Crops and Products*, 31, 370-377.
73. Nora, K., Yamaguchi, A., Maeda, N., y Koga, H., (2009). Antioxidative activity of water soluble polysaccharide in pumpkin fruits (*Cucurbita máxima* Duchesne). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(6), 1416-1418.
74. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., y Crouch, S.R., (2001). *Química analítica*, 7ª edición. Mc. Graw Hill Editorial. México.
75. Recuperado de <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/la-ciencia-en-pocas-palabras/296-numero-34/534-cromatografia.html>. Consultado 29 de julio de 2019.
76. Arrazola, F., Ávila, J., Flores, R., Gómez, C., Hernández, S., y Hernández H., (2010). *Química orgánica experimental a escala semi-micro y fundamentos de espectroscopia*. México: Instituto Politécnico Nacional, 119-132
77. Smith, I., y Feinberg, J.G., (1979). *Cromatografía sobre papel y capa fina. Electroforesis*. Ed. ALHAMBRA S.A. España, 79-183.
78. Wade, L.G., Jr., (2011). *Química orgánica Volumen I*. Pearson educación. México.
79. Skoog, D.A., Holler, J.F., y Crouch, S.R., (2008). *Principios de análisis instrumental*. 6a edición. CENGAGE Learning Editions. México, 455-477.
80. Holler, J.F., Skoog, D.A., y Crouch, S.R., (2008). *Principios de análisis instrumental*. 6a edición. CENGAGE Learning Editions. México, 498-437.
81. Rico, M., (2011). Real Sociedad Española de Química. *Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución: una herramienta fundamental en Química y Biología Estructural*. *Anales de Química*, 107(1), 46-57.
82. Rahman, A-u., Wahab, A-t., y Choudhary, M.I., (2016). *Important 2D NMR Experiments. Solving Problems with NMR Spectroscopy*. Second edition. 265-386.

83. Furrer, J., (2012). A Comprehensive Discussion of HMBC Pulse Sequences, Part 1: The Classical HMBC. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 4(3), 101-127.
84. Recuperado de: <https://www.iquimica.unam.mx/labserv?id=177>. Consultado el 15 de mayo de 2019.
85. UV/VIS Spectrophotometry - Fundamentals and Applications. Mettler-Toledo Publication No. ME-30256131, septiembre 2015.
86. Brown, H., Iverson, B.L., Anslyn, E.V., Foote, C.S., (2016). *Organic Chemistry*, Eighth edition. *Cengage Learning. USA, 904-9059*.
87. Espectro electromagnético, recuperado de [https://www.researchgate.net/figure/Figura-158-Espectro-electromagnetico\\_fig55\\_272090105](https://www.researchgate.net/figure/Figura-158-Espectro-electromagnetico_fig55_272090105)
88. Pérez, R.M., Vargas, R., Martínez, F.J., García, E.V., y Hernández, B., (2003). Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudios sobre seis métodos de análisis. *Ars Pharmaceutica*, 44(1), 5-21.
89. Hong-Yan, Z., Guang-Tong, C., Guo-Liang, M., y Ji-Liang, X., (2015). Characterization of pumpkin polysaccharides and protective effects on streptozotocin-damaged islet cells. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(3), 199-207.
90. Rodríguez, A., J.A., (1987). Manual de prácticas de bioquímica. 4ª edición, (37-44). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey N.L. México.
91. Martínez, L.M., y Maestri, M.D., (2008). Oil chemical variation in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Argentina. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 110, 1183-1189.
92. Re, R.J., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
93. He, J., Xu, Y., Chen, H. y Sun P., (2016). Extraction Structural Characterization and Potential Antioxidant Activity of the Polysaccharides from four seaweeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1988), 1-17.
94. Yuan, J., Chen, S., Wang, L., Xu, T., Shi, X., Jing, Yi, Zhang, H., Huang, Y., Xu, Y., Li, D., Chen, J., y Xiong, Q., (2018). Preparation on purified fractions for polysaccharides from *Monetaria moneta*. Linnaeus and comparison their characteristics and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 342-349.
95. Hafsa, J., Mkadmini Hammi, K., Le Cerf, D., Limem, K., Majdoub H., y Charteddine, B., (2018). Characterization, antioxidant and antiglycation properties of polysaccharides extracted from the medicinal halophyte *Carpobrotus edulis* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 833-842.

96. Zhao, Z., Y., Huang, F., U., L., T., Dong, L., L., Liu, S., L., (2014). Functional groups and antioxidant activities of polysaccharides from five categories of tea. *Ind. Crops*, 58, 31-35.
97. Meng, M., Dai, C., Han, L., Chen, Y., & Wang, C. (2016). Isolation, purification, structural analysis and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Grifola Frondosa* fruiting body. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1134–1143.
98. Alzorqi, I., Sudheer, S., Lu, T., J., Manickam, S., (2017). Ultrasonically extracted  $\beta$ -D-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochem*, 35, 531-540.
99. Yu, R., G., Wang, L., Zhang, H., Zhou, C., X., Zhao, Y., (2004). Isolation, purification and identification of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia*, 75, 662-666.
100. Chen, L., Huang, G., (2018). Extraction, characterization and antioxidant activities of pumpkin polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118(A), 770-774.
101. He, T. B., Huang, Y. P., Huang, Y. W., Wang, X. J., Hu, J. M., & Sheng, J. (2018). Structural elucidation and antioxidant activity of an arabinogalactan from the leaves of *Moringa oleifera*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 126–133.
102. Zhang, A. Q., Deng, J. Y., Liu, X. Q., He, P. F., He, L., Zhang, F. M., et al. (2018). Structure and conformation of  $\alpha$ -glucan extracted from *Agaricus blazei Murill* by high-speed shearing homogenization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 558–564.
103. Glinel, K., Sauvage, J. P., Oulyadi, H., & Huguet, J. (2000). Determination of substituents distribution in carboxymethylpullulans by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 328(3), 343–354.
104. Moon, J.K., y Shibamoto, T., (2009). Antioxidants Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1655-1666.
105. Barraza, G., De la Rosa, G., Martínez, L, A, Castillo, M, A., Cotte, M.H., y Álvarez, P.E. (2013). La micro espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista Latinoamericana de Química*, 41(3), 125-148.