



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA
QUÍMICA E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS

“Efecto de los triterpenos aislados de la
Origanum majorana sobre la glicación de las
proteínas”

PROYECTO DE TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO INDUSTRIAL

PRESENTA

Liliana Yadira García Romero

ASESOR: Dra. Rosa Martha Pérez Gutiérrez



México, D.F. 2015



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO ACADÉMICO



T-007-15

México, D. F., 03 de febrero del 2015.

A la C. Pasante:
LILIANA YADIRA GARCÍA ROMERO

Boleta:
2008320924

Carrera:
IQI

Generación:
2009-2013

Mediante el presente se hace de su conocimiento que este Departamento acepta que la C. **Dra. Rosa Martha Pérez Gutiérrez**, sea orientadora en el tema que propone usted desarrollar como prueba escrita en la opción **Tesis Individual**, con el título y contenido siguiente:

"Efectos de los triterpenos aislados de la *Origanum majorana* sobre la glicación de las proteínas"

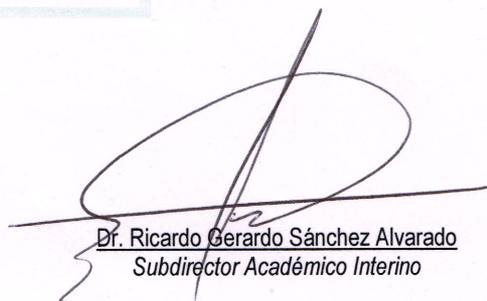
Resumen.
Introducción.
I.- Antecedentes.
II.- Material y métodos.
III.- Resultados.
Conclusiones.
Bibliografía.

Se concede un plazo máximo de un año, a partir de esta fecha, para presentarlo a revisión por el Jurado asignado.


Ing. María de Lourdes Carmen Ruiz Centeno
Presidente de la Academia de
Química Orgánica y Polímeros.


Dra. Rosa Martha Pérez Gutiérrez
Directora de Tesis
Ced. Prof. 172006


Lic. Guillermo Alberto de la Torre Arteaga
Jefe del Departamento de Evaluación y
Seguimiento Académico


Dr. Ricardo Gerardo Sánchez Alvarado
Subdirector Académico Interino



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO ACADÉMICO



T-007-15

México, D. F., 22 de junio del 2015.

A la C. Pasante:
LILIANA YADIRA GARCÍA ROMERO
PRESENTE

Boleta:
2008320924

Carrera:
IQI

Generación:
2009-2013

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

“Efectos de los triterpenos aislados de la *Origanum majorana* sobre la glicación de las proteínas”

encontramos que el citado Trabajo 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

Dra. Rosa Martha Pérez Gutiérrez
Presidente

Dr. Eloy Vázquez Labastida
Secretario

Ing. José María Mota Flores
1er. Vocal

Dr. Sergio Odín Flores Valle
2º Vocal

Ing. María de Lourdes Carmen Ruiz Centeno
3er. Vocal

c.c.p.- Expediente
GATA/rcr

El desarrollo de la investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas (ESIQIE) con colaboración del Centro de nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional.

Quiero dedicar esta tesis a mi mamá, por su apoyo en cada momento de mis estudios, por demostrarme que no importa lo difícil que puede ser la vida siempre se puede luchar para seguir adelante, por todo su amor y comprensión.

Agradecimientos

A dios por darme la vida que he tenido y permitirme cumplir una meta más.

A mis padres por su apoyo incondicional en cada momento de mi educación, creer en mí y estar al pendiente de mis necesidades, junto a mis hermanos que a pesar de sus criticas me hicieron salir adelante a su manera particular, gracias.

A mi tía Cira por darme tanto apoyo, brindarme alojo y sustento cuando era necesario, así como a mi tío y mis primas por darme tantas palabras de aliento.

A mis amigos y compañeros por preguntar cada día como estoy y cómo voy en mis proyectos así como animarme en cada momento.

A mi directora de tesis Dr. Rosa Martha por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo y a todos los sinodales por su tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

A todos muchas gracias.

“La Derrota tiene algo positivo, nunca es definitiva. En cambio la victoria tiene algo negativo, jamás es definitiva.”

José Saramago

“Estoy solo y desarmado, asustado y sin experiencia, pero me acompaña la razón”

John Grisham

“Cada hombre debe tener derecho a elegir su destino”

Bob Marley

“El fracaso es, a veces , más fructífero que el éxito”

Henry Ford

“Hay quienes se consideran perfectos, pero es sólo porque exigen menos de sí mismos”

Hermann Hesse

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍDICE DE TABLAS	15
Resumen	16
Introducción.....	17
Justificación.....	18
Objetivo general	18
Objetivo específico	18
CAPITULO 1. Antecedentes.....	19
1.1 Diabetes.....	20
1.1.1 Estadística de diabetes	20
1.1.2 Patología de la Diabetes Mellitus	21
1.1.3 Clasificación de la Diabetes Mellitus	22
1.1.3.1 Diabetes Mellitus insulino dependiente (DMNID) Tipo1.....	22
1.1.3.2 Diabetes Mellitus no insulino dependiente (DMNID) Tipo 2.....	22
1.1.3.3 Diabetes Mellitus gestacional	22
1.1.3.3 Diabetes asociad a otros procesos.....	22
1.1.4 Complicaciones de la Diabetes Mellitus.....	23
1.2 Hiperglucemia.....	23
1.3 Glicación de las proteínas (AGE).....	24
1.4 Antioxidantes	28
1.5 Origanum Majorana	29
1.5.1 Clasificación Taxonómica.....	29
1.5.2 Identificación y descripción	29
1.5.3 Química.....	30
1.5.4 Farmacología	31

1.5.5 Siembra y aprovechamiento.....	31
1.6 Extracción sólido líquido	32
1.6.1 Cromatografía	32
1.6.2 Cromatografía líquido-sólido	33
1.6.3 Cromatografía en placa fina.	33
1.7 Determinación de la estructura	34
1.7.1 Métodos espectroscópicos.....	34
1.7.2 Espectroscopia infrarroja.....	34
1.7.3 Espectrometría de masas.	35
1.7.4 Espectroscopia de resonancia Magnética Nuclear.....	36
1.8 MALDI-TOF MS	37
1.8 Formulas estructurales	38
1.8.1 Formulas lineoangulares	38
1.8.2 Estereoquímica	39
1.8.3 Quiralidad.....	39
1.8.4 Proyecciones de Fischer.	40
CAPITULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS	41
2.1 Desarrollo experimental	42
2.3 Materia prima.....	43
2.4 Material de laboratorio	43
2.5 Reactivos y disolventes	43
2.6 Equipos.....	43
2.7 Inhibición de glicación de las proteínas in vitro.....	43
2.8 Actividad antioxidante en vitro	44
2.9 Actividad antioxidante en placa fina.....	44

2.10 Extracción de la hoja de mejorana.....	45
2.11 Biofraccionamiento de los triterpenos con actividad antiglicación	45
2.11.1 Cromatografía en placa fina	45
2.11.2 Cromatografía en columna.....	46
CAPITLO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	47
3.1 Biofraccionamiento del <i>Origanum majorana</i> (Me).....	48
3.2 Resultados de actividad anti-AGE en vitro.....	53
3.3 Resultado de actividad antioxidante	54
3.4 Determinación de las estructuras.	55
3.5 MALDI-TOF	61
Conclusiones.....	64
Bibliografía	65
ANEXOS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Mecanismo de reacción de glicación o glicosilación no-enzimática. La combinación de la glucosa y las proteínas ocurre sin la intervención de enzimas, depende directamente de las concentraciones de glucosa	22
Figura 1.2	<i>Origanum majorana</i>	25
Figura 1.3	Mapa de distribución de especies de <i>Origanum majorana</i> con base en la información del herbario virtual de la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO)	27
Figura 1.4	Vibración molecular: cuando el enlace entre átomos se alarga o se comprime, y a continuación se deja en libertad, la molécula vibra	30
Figura 1.5	Orientaciones del espín nuclear, en ausencia y presencia de un campo magnético.	32
Figura 2.1	Diagrama de desarrollo experimental	37
Figura 3.1	Biofraccionamiento inicial del extracto de <i>Origanum majorana</i> ; los compuestos Me ₅ Me ₈ y Me ₉ mostraron actividad anti AGE's	43
Figura 3.3	Biofraccionamiento de la fracción Me ₈ de las hojas de <i>Origanum majorana</i> obteniendo las fracciones con características antiglicación y antioxidante Me ₈₆₃₂₃₄ y Me ₈₆₃₂₃₄₁	45
Figura 3.4	Biofraccionamiento de la fracción Me ₉ de las hojas de <i>Origanum majorana</i> obteniendo las fracciones con características antiglicación y antioxidante Me ₉₂₁₁₁₁₁₁ y Me ₉₂₁₂₂₈₁	46
Figura 3.5	28-norlup-20(29)-ene-3 β ,17 β -diol	47
Figura 3.6	28-norlup-20(29)-ene-3 β ,17 β -diol en 3D	50

Figura 3.7	3 β ,6 β ,7 β -trihidroxy-20(29)lupene	51
Figura 3.8	3 β ,6 β ,7 β -trihidroxy-20(29)lupene en 3D	51
Figura 3.9	Ácido ursólico	52
Figura 3.10	Ácido ursólico en 3D	52
Figura 3.11	Lupeol	53
Figura 3.12	Lupeol en 3D	53
Figura 3.13	23-carboximetil,3 β ,15 α ,21 β ,28-tetrahidroxiursa-12-ene	54
Figura 3.14	23-carboximetil,3 β ,15 α ,21 β ,28-tetrahidroxiursa-12-ene	55
Figura 3.15	Resultado MALDI-TOF; Positivo (A) y BSA (B)	56
Figura 3.16	Resultado MALDI-TOF; BSA + glucosa (A) y BSA + glucosa + triterpeno (B)	57
ANEXOS		
Figura A.1	Espectro Ir de la fracción Me9212281 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majoran</i> denominado como: 28-nurlup-20 (29) eno-3 β , 17 β -diol (nourlupeno). ATR-cristal de seleniuro de zinc.	69
Figura A.2	Espectro ^1H RMN de la fracción Me9212281 con actividad antiAGEs de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como:28-nurlup-20 (29) eno-3 β , 17 β -diol (nourlupeno). Disolvente: CdCl ₃	70
Figura A.3	Espectro ^{13}C RMN de la fracción Me9212281 con actividad antiAGEs de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: 28-norlup-20 (29) eno-3 β , 17 β -diol (nourlupeno). Disolvente CdCl ₃ .	71

Figura A.4	Espectro de masas de la fracción Me9212281 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: 28-norlup-20 (29) eno-3 β , 17 β -diol (nourlupeno).	72
Figura A.5	Espectro IR de la fracción Me863241 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: 3 β , 6 β , 7 β -trihidroxi-20(29)-lupano. ATR-cristal de seleniuro de zinc.	73
Figura A.6	Espectro ^1H RMN de la fracción Me863241 con actividad antiAGEs de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: 3 β , 6 β , 7 β -trihidroxi-20(29)-lupano. Disolvente: CdCl_3	74
Figura A.7	Espectro ^{13}C RMN de la fracción Me863241 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: 3 β , 6 β , 7 β -trihidroxi-20(29)-lupano. Disolvente: CdCl_3	75
Figura A. 8	Espectro de masas de la fracción Me863241 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: 3 β , 6 β , 7 β -trihidroxi-20 (29)-lupano.	76
Figura A.9	Espectro IR de la fracción ME9211111111 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: ácido ursólico ATR-cristal de seleniuro de zinc.	77
Figura A. 10	Espectro ^1H RMN de la fracción Me9211111111 con actividad antiAGES de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: ácido ursólico. Disolvente: CdCl_3	78

Figura A. 11	Espectro ^{13}C RMN de la fracción Me921111111 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: ácido ursólico. Disolvente: CdCl_3	79
Figura A.12	Espectro de masas de la fracción Me921111111 con actividad anti AGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: ácido ursólico.	80
Figura A. 13	Espectro IR de la fracción Me863234 con actividad anti AGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: lupeol ATR-crista de seleniuro de zinc.	81
Figura A. 14	Espectro ^1H RMN de la fracción Me863234 con actividad antiAGEs de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: lupeol Disolvente: CdCl_3	82
Figura A. 15	Espectro ^{13}C RMN de la fracción Me863234 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: lupeol. Disolvente: CdCl_3	83
Figura A. 16	Espectro de masas de la fracción Me863234 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: lupeol	84
Figura A. 17	Espectro de masas de la fracción Me92111111 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: 23acetil, 3β , 15α , 21β , 28-tetrahidroxiursa-12-eno. ATR-cristal de seleniuro de zinc.	85
Figura A. 18	Espectro ^1H RMN de la fracción Me92111111 con actividad antiAGEs de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: 23acetil, 3β , 15α ,	86

	21 β , 28-tetrahidroxiursa-12-eno. Disolvente: CdCl ₃ .	
Figura A. 19	Espectro ³ C RMN de la fracción Me92111111 con actividad antiAGEs de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: 23acetil, 3 β , 15 α , 21 β , 28-tetrahidroxiursa-12-eno. Disolvente: CdCl ₃ .	87
Figura A. 20	Espectro ³ C RMN de la fracción Me92111111 con actividad antiAGEs de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: 23acetil, 3 β , 15 α , 21 β , 28-tetrahidroxiursa-12-eno. Disolvente: CdCl ₃ .	88
Figura A. 21	Espectro de masas de la fracción Me92111111 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de <i>Origanum majorana</i> y denominado como: 23acetil, 3 β , 15 α , 21 β , 28-tetrahidroxiursa-12-eno Disolvente: CdCl ₃ .	89

ÍDICE DE TABLAS

Tabla 3.1	Resultado de ensayo preliminar antiglicación y antioxidante de extracción de las hojas de <i>Origanum majorana</i> con diferentes disolventes	43
Tabla 3.2	Resultado de fracciones de la <i>Origanum majorana</i> con actividad anti-AGE's	48
Tabla 3.3	Resultados de fracciones de la <i>Origanum majorana</i> con actividad antioxidante.	49

Resumen

En el presente trabajo se aislaron los bioactivos responsables del efecto antioxidante y antiglicación a partir de las hojas de *Origanum majorana*, así como se determinó su estructura mediante el uso de la espectrometría. A partir de una extracción con metanol de las hojas secas de *Origanum majorana* se obtuvo un extracto verdoso al cual se le realizó un biofraccionamiento usando técnicas de cromatografía en placa fina y columna a todas las fracciones obtenidas se les realizaron pruebas de actividad antioxidante y antiglicación in vitro de esta manera se descartaron las fracciones que mostraron menor actividad. Se estimó el porcentaje de la inhibición de productos finales de glicación avanzada (AGEs) in vitro utilizando el método de albumina-glucosa obteniendo que todas las fracciones inhiben la formación de AGEs, siendo la de mayor porcentaje la fracción Me53153131 con un 79.75 % de inhibición. Se determinó la actividad antioxidante in vitro sobre el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), siendo la fracción Me863234 la de mayor porcentaje de actividad. A los compuestos puros se les realizaron análisis espectrofotométrico, tales como el espectro de infrarrojo, masas y resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , logrando identificar cinco diferentes triterpenos; 28-norlup-20(29)-ene-3 β , 17 β -diol,(1), 3 β ,6 β ,7 β -trihidroxy-20(29)lupene (2), ácido ursólico (3), lupeol (4), y 23-carboximetil,3 β ,15 α ,21 β ,28-tetrahidroxiursa-12-ene (5) los cuales en el sistema BSA-glucosa tuvieron valores de inhibición de AGEs de 73.69 %, 69.31 %, 69.19 %, 63.02 %, 46.42 %, respectivamente y mediante el ensayo de DPPH se obtuvieron valores de inhibición antioxidante de 92.45 %, 93.13 %, 92.71 %, 89.07 % y 92.20% respectivamente. En base a todo lo anterior las hojas de *Origanum majorana* puede ser una opción para el tratamiento de diversos problemas de salud tales como la diabetes mellitus.

Introducción

El número creciente de personas con obesidad y con ello la aparición de diabéticos tipo 2 debido a los diferentes estilos de vida que ha impactado en la salud social y económica del país, ya que durante el desarrollo de la enfermedad se generan problemas relacionadas a la alta concentración de glucosa en sangre (Almaguer, et.al., 2012). Los estudios revelan que algunas de las complicaciones son debido a la glicación de proteínas y al estrés oxidativo. Algunos tratamientos para la diabetes están basados en medicamentos como la metformina (Beisswenger, et al., 1999), que ayuda a disminuir el nivel de glucosa, estos tratamientos están acompañados por una dieta balanceada y ejercicio físico. Se ha demostrado que ciertos alimentos y productos naturales poseen compuestos que ayudan a controlar la diabetes (Instituto Mexicano del seguro Social IMSS, 2012).

La medicina natural se ha usado durante miles de años las infusiones de plantas y semillas, se han utilizado para aliviar dolores y enfermedades incluyendo recientemente la diabetes, entre ellas encontramos la mejorana ésta ha sido empleada en enfermedades, estomacales, respiratorias y nerviosas, entre otras aplicaciones (Universidad Autonoma de México, 2009), por ello se decidió estudiar si la mejorana, para determinar si es que posee características antioxidantes y antiglicación. Los productos de glicación avanzada (AGE) y el estrés oxidativo propician al desarrollo de enfermedades crónicas-degenerativas, por ello se requieren de productos que los inhiban, en una persona sana estos se generan y se acumulan con la edad, pero las personas diabéticas maximizan su aparición (Instituto Mexicano del seguro Social IMSS, 2012).

Justificación

Actualmente el creciente número de personas con diabéticos Tipo 1 y 2 un problema que afecta a todo el mundo, se trata de una enfermedad que se presenta principalmente por obesidad. El tratamiento médico incluye cambios en el estilo de vida y el uso de fármacos costosos obtenidos a través de procesos químicos, los cuales tienen efectos secundarios o tóxicos; por ello los pacientes han recurrido al uso de medicina natural o alternativa para el tratamiento o prevención de enfermedades.

La diabetes tiene como complicaciones enfermedades crónico degenerativas de las que se ha demostrado son causadas por el estrés oxidativo y la glicación de proteínas, entre otros factores, por ello se ha decidido estudiar las propiedades antioxidantes y antiglicación del *Origanum majorana*, a partir de un extracto de hexano, metanol y cloroformo, mediante pruebas in vitro.

Objetivo general

Obtener y cuantificar la actividad antioxidante y antiglicación (anti-AGE), para ayudar al tratamiento de la diabetes a partir de la *Origanum majorana*.

Objetivo específico

- Aislar los componentes con propiedades antioxidante y anti AGEs de las hojas de *Origanum majorana*.
- Purificar los bioactivos usando técnicas de cromatografía.
- Determinar la estructura de los compuestos aislados mediante el uso de espectrofotometría de infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

CAPITULO 1. Antecedentes

1.1 Diabetes

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad endocrino-metabólica caracterizada por elevados niveles de glucosa en sangre y orina, generados por la deficiencia en la secreción o la acción de la insulina causando la hiperglucemia. Uno de los factores de riesgo es la obesidad, así como el consumo de azúcares simples y el sedentarismo (Almaguer, et al., 2012).

La DM se encuentra entre una de las primeras causas de muerte en México, ya que afecta a un elevado porcentaje de nuestra población, principalmente aquellos que se encuentran en la etapa productiva. Por ello las instituciones de salud a nivel mundial y nacional, se ven preocupados por el crecimiento de la enfermedad, ya que causa pérdidas económicas por las consecuentes manifestaciones clínicas que se presentan durante la enfermedades entre las que se encuentran: pérdida de visión (que pueden llegar a la ceguera), afectación renal que precise de hemodiálisis y con el tiempo trasplante renal, enfermedades en el sistema nervioso (neuropatía), enfermedades del corazón, entre otras, todo esto debido al mal control de la DM (Federación Mexicana de Diabetes, A. C., 2003-2015) (Daroux, et al., 2010)

1.1.1 Estadística de diabetes

La diabetes se ha convertido en un reto de salud global, la Organización Mundial de Salud (OMS) indica que en 1995 había en el mundo 30 millones de personas con diabetes, algunos estudios arrojaron que 347 millones de personas viven con diabetes. Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes disminuye entre 5 y 10 años. La DM y sus principales factores de riesgo se han convertido en una emergencia de salud pública ya que es una enfermedad crónica-degenerativa que requiere de atención prolongada. En el comienzo de la enfermedad no causa ningún síntoma, por lo que se detecta cuando ésta ha empezado a causar estragos en la salud (Haffner, et al., 1990).

En los últimos 10 años en México se ha incrementado el número de personas que padecen diabetes. Los datos de la ENSANUT 2012 (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición), identifican a 6.4 millones de adultos mexicanos con diabetes, es decir 9.2% de ellos en México han sido diagnosticados con la enfermedad, a pesar de esto se estima que el total de personas con diabetes puede ser mayor, de acuerdo al escaso hábito de revisión médica de la población en el país (Federación Mexicana de Diabetes, A. C., 2003-2015) (Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS, 2012).

Entre otros datos estadísticos se informa:

- 4 de cada 5 personas con diabetes viven en países de ingresos bajos y medios.
- La mitad de los fallecimientos atribuibles a la diabetes ocurre en personas con menos de 60 años.
- En México representa un gasto de 3,430 millones de dólares al año en su atención y complicaciones.
- La diabetes Tipo 2 representa el 90% de los casos, debido a un peso corporal excesivo e inactividad física.

1.1.2 Patología de la Diabetes Mellitus

La DM se manifiesta a través de un conjunto de anormalidades bioquímicas, fisiológicas y anatómicas que se generan en los islotes de Langerhans del páncreas, en estos islotes se sintetiza y segrega la insulina, misma que controla los niveles de glucosa en la sangre; es una enfermedad endocrino-metabólica que se genera por un déficit en la secreción de insulina de las células Beta del páncreas (Kaneto, et al., 1999), lo que altera la homeostasis de la glucosa secundaria; se caracteriza por elevados niveles de glucosa en sangre o hiperglucemia. Cabe hacer mención que la insulina es una hormona que le ayuda al cuerpo a usar la glucosa como energía. (American Diabetes Association, 1995-2015)

1.1.3 Clasificación de la Diabetes Mellitus

Según la Asociación Americana de Diabetes (ADA) clasifica la Diabetes Mellitus en:

- Diabetes Mellitus insulino dependiente (DMID) Tipo 1.
- Diabetes Mellitus no insulino dependiente (DMNID) Tipo 2.
- Diabetes Mellitus asociada a otros procesos.
- Diabetes Mellitus gestacional.

1.1.3.1 Diabetes Mellitus insulino dependiente (DMID) Tipo 1

La DMID es una enfermedad autoinmune que se caracteriza y manifiesta cuando el sistema metabólico ataca a las células beta del páncreas, ésta ocasiona que el páncreas produzca poca insulina o deje de producirla. Se diagnostica en niños y adultos jóvenes, para su control se requiere tratamiento con insulina, de lo contrario, se corre el riesgo de caer en coma diabético (Garvey, et al., 1985).

1.1.3.2 Diabetes Mellitus no insulino dependiente (DMNID) Tipo 2

La mayoría de las personas diagnosticadas presentan este tipo de diabetes, en ella se sigue produciendo insulina, pero el cuerpo no es capaz de utilizarla, se denomina como resistencia a la insulina: por lo general este tipo de diabetes se desarrolla con el tiempo. La mayoría de las personas diagnosticadas tienen sobrepeso, el aumento de la grasa le dificulta al cuerpo el uso de la insulina de manera correcta. Se puede presentar también en personas delgadas y es más común en los ancianos (Biblioteca Nacional de Medicina de los EE. UU., 2013) (Instituto Mexicano del seguro Social IMSS, 2012).

1.1.3.3 Diabetes Mellitus gestacional

Se caracteriza por el incremento de los niveles de glucosa en la sangre en mujeres durante el embarazo. Normalmente desaparece después del parto pero puede persistir diagnosticándose como DMNID.

1.1.3.3 Diabetes asociada a otros procesos

- Defectos genéticos en la función de las células beta.

- Patología pancreática como: pancreatitis aguda y crónica, hemocromatosis, etc.
- Endocrinopatías.
- Fármacos o tóxicos que pueden producir síntomas secundario diabetes si no se controlan correctamente, entre ellos: corticoides, interferón alfa, etc.
- Agentes infecciosos.
- Y algunas enfermedades como el Síndrome de Down.

1.1.4 Complicaciones de la Diabetes Mellitus.

Las complicaciones se pueden clasificar entre agudas y crónicas (Singh, et al., 2013).

Complicaciones agudas:

- Hiperglucemia severa.
- Cetoacidosis.
- Coma hiperosmolar
- Visión borrosa.

Complicaciones crónicas:

- Retinopatía diabética.
- Padecimientos cardiovasculares, como ataques al corazón o accidentes cerebro vascular.
- Enfermedad isquémica del miocardio.
- Neuropatía periférica.
- Microangiopatias.
- Pie diabético.

1.2 Hiperglucemia

La hiperglucemia se caracteriza por el alto nivel de azúcar en la sangre. El alto nivel de glucemia aparece cuando el organismo no cuenta con la suficiente cantidad de insulina o cuando la cantidad de insulina es muy escasa. La

hiperglucemia también se presenta cuando el organismo no puede utilizar la insulina adecuada. (Campuzano-Maya & Latorre-Sierra., 2010) (Cuestas, 2001)

Entre las causas de hiperglucemia se encuentran:

- Diabetes tipo 1, si no se ha inyectado la cantidad suficiente de insulina.
- Diabetes tipo 2, el organismo cuenta con la cantidad suficiente de insulina, pero no es tan eficaz como debería serlo.
- Comer más de lo planeado o no realizar actividad física.

1.3 Glicación de las proteínas (AGE)

Los productos finales de la glicación avanzada o AGE son complejos grupos de compuestos, se forman cuando se reducen los grupos carbonilos y azúcares, a partir de una reacción no enzimática con los grupos amino libres.

La formación de AGE's se produce de manera espontánea en los tejidos humanos y en la circulación como parte del metabolismo normal, se acumulan durante el resto de la vida hasta el envejecimiento (Chiarelli, et al., 1999) (Gul, et al., 2009). El proceso de formación de AGE se acelera en condiciones de hiperglucemia (Gugliucci., 2000), por lo que se encuentra relacionado a enfermedades de la DM como aterosclerosis, insuficiencia renal crónica, la enfermedad de Alzheimer (Miranda & Outeiro, 2010), envejecimiento prematuro, entre otras enfermedades crónicas. Algunos estudios han revelado que los AGE's causan una serie de efectos adversos a nivel celular y de tejidos entre los que incluye la reducción de las actividades enzimáticas, la degradación de proteínas así como daños a los ácidos nucleicos (Jakus & Rietbrock., 2004) (Kasper & Funk, 2001) (Laakso, 1999).

A principios de 1908, algunos estudios destacaron la reacción entre azúcares y grupos amino proteínico fue señalada por Ling y Malting (Ling & Malting., 1908) en 1908, siendo esta el responsable del cambio de color durante la cocción de los alimentos, en 1912 el químico L. Maillard (Maillard., 1912) analizó la reacción de

diferentes aminoácidos con la glucosa confirmando la hipótesis de Ling y Maltin. En 1929, Amadori (Amadori., 1929), identifica un compuesto altamente estable como una Base de Schiff (BS), compuesto formado durante la incubación de la glucosa con aminas aromáticas. Kuhn y Weygand (Kuhn & Weygand., 1937) en 1937 caracterizando dicho compuesto reveló que era la 1-amino-1-desoxi-2-cetosa o producto de Amadori (AP) ya que la hidrólisis ácida no correspondía a la de una BS. Hodge (Hodge., 1953) en 1953 describió la reacción de Maillard la cual inicia con la formación de una BS, y mediante la trasposición de Amadori generar un AP, con el tiempo se degrada dando lugar a los productos finales de la reacción de Maillard.

En 1968, Rhbar (Rahbar, 1968) descubre una variante de la hemoglobina al estudiar a las personas con DM. Se demostró que dicha variante se debía a la formación de APs. Sobre los residuos Lys de hemoglobina, conocida actualmente como hemoglobina glicada (HbA1c), la cual llevó a cuestionarse sobre la fisiopatología de la reacción de Maillard in vivo, proceso conocido actualmente como glicación proteica (GP) o AGE.

La formación de AGE puede ocurrir a través de tres mecanismos bioquímicos: la glicación, la vía de los polioles y glucoxidación. La glicación o reacción de Maillard es un proceso no enzimático que consiste en la reacción de condensación del grupo carbonilo de aldehídos del azúcar, con el extremo N-terminal o amino libre de la proteína. La formación de productos de Maillard comienza con la reacción de los grupos amino de las proteínas, particularmente los grupos amino de la cadena lateral de lisina, arginina e histidina, con carbohidratos reductores que incluyen a la glucosa, fructosa, triosa y sus correspondientes derivados fosforilados. Que en el caso de la glucosa conduce en horas a la formación reversible de una base de Schiff (BS) (reacción entre el grupo amino de la lisina y el carbonilo de la glucosa). Esta base de Schiff se transforma en un compuesto más estable, una cetoamina o fructosamina conocida como producto de Amadori (AP), lo que ocurre en días. Después, a través de subsecuentes re arreglos

moleculares, que incluyen reacciones de deshidratación, condensación, oxidación y ciclación; procesos que llevan semanas o meses, se forma un grupo heterogéneo de productos fluorescentes y café oscuro, llamados productos finales de glicación avanzada (AGEs) un compuesto estable, virtualmente irreversible, la modificación sólo desaparece con la proteína (Palace & Vlassara, 2002) (N.Ahmed & Thornally., 2007) (Monner, et al., 2005).

La vía de los polioles, es enzimática la glucosa se transforma por aldosa reductosa o sorbitol (presente en tejidos como los nervios, retina, paredes vasculares y glomérulo) que utiliza sustratos como la glucosa o galactosa, en productos intermediarios que después de la unión a una proteína, se convierte en un AGE (Ramasamy, et al., 2011) (Estelrich, 2008).

La vía de glucoxidación se basa en el estrés oxidativo, por la oxidación de la glucosa que conduce a la formación de glioxal, metilglioxal y 3-desoxiglucosona. Estos azúcares oxidados son extremadamente inestables y pueden reaccionar rápidamente con diferentes proteínas para formar AGE (Lo, et al., 1994).

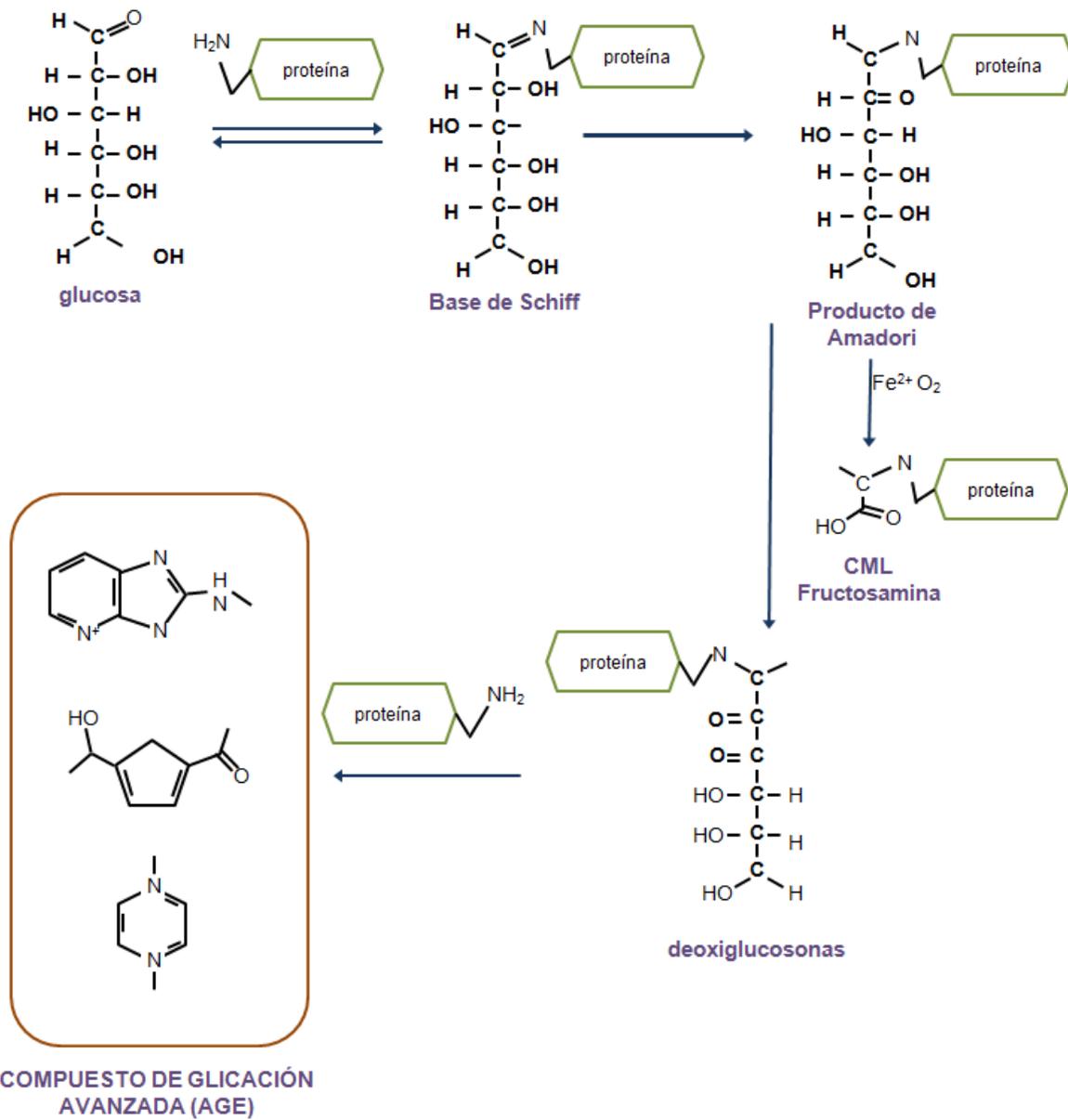


Figura 1.1 Mecanismo de reacción de glicación o glicosilación no-enzimática. La combinación de la glucosa y las proteínas ocurre sin la intervención de enzimas, depende directamente de las concentraciones de glucosa.

1.4 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que actúan antes o durante la reacción de la cadena de los radicales libres (O_2^- , $HO\cdot$, $RO\cdot$, $NO\cdot$, etc.) (Rufino, et al., 2009) inhibiendo en cualquiera de sus etapas; iniciación, propagación, terminación, descomposición o en subsecuente oxidación de los productos (Cardoso, et al., 2005). Por otro lado, encontramos a los prooxidantes los cuales son altamente reactivos con los radicales libres o a especies reactivas de oxígeno, presentes dentro del sistema biológicos, los encontramos tanto en los alimentos como en los sistemas biológicos (Baynes, 1991).

El proceso de auto-oxidación en los sistemas vivos se lleva a cabo en las moléculas biológicas claves produciendo muchas enfermedades degenerativas. Un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes en el organismo genera estrés oxidativo, con el cual se desarrollan enfermedades crónicas como diabetes, arteriosclerosis, algunas formas de anemia, cáncer, artritis reumatoide entre otras (Tapia, et al., 2004). Las protecciones causadas por los antioxidantes son biosintetizados por el organismo o bien por ingestión:

Bio-sintetizados

- Antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutasa, catalasa, tioredoxina-reductasa, sulfoxi-metionina-reductasa, etc.
- Antioxidantes no-enzimáticos, como glutatión, ácido úrico, ácido dihidrolipóico, metalotioneína, ubiquinol, etc.

Ingeridos

Vitaminas-antioxidantes, como ácido ascórbico, alfa-tocoferol y beta-caroteno (o pro-vitamina A), carotenoides (luteína, zaxantina y licopeno), flavonoides, etc. El interés por los antioxidantes naturales ha aumentado en los últimos años ya que ofrecen mayor seguridad durante su consumo, existe una variedad de agentes fitoquímicos con una eficiencia antioxidante elevada y el consumo de ciertos

agentes fitoquímicos pueden afectar de manera positiva la patología de enfermedades crónicas así como el proceso de envejecimiento, siendo más seguros que los compuestos sintéticos (Dorman, et al., 2003) (David, et al., 2004).

1.5 Origanum Majorana

1.5.1 Clasificación Taxonómica

Nombre común: mejorana, mayorana, orégano mayor, almoradijo, amárasco.

Reino: Plantae

Familia: Labiate; lamiaceae

Género: Organum

Phylum: Euphyta

División: Angiospermae

Clase: Dicotyledones

Orden: Tubiflorae

(Ramiro Fonnegra & Silvia Luz Jiménez, 2007).

1.5.2 Identificación y descripción

Es una hierba de 30 a 60 cm de altura. Las hojas son un poco alargadas y tienen la punta cubierta de una fina vellosidad su tamaño es de 5 a 25 mm de largo por 7 mm de ancho. Con las flores en colores rosa o morado pálido y están agrupadas en espigas. Originaria de Europa, norte de África y suroeste de Asia, habita en climas cálidos, semiseco y templado entre los 420 a los 2300 msnm (metros sobre el nivel del mar) sensible a las heladas y a la sequía, su recolección se realiza en verano. Planta cultivada en huertos familiares, asociada a terrenos de cultivo, bosque tropical perennifolio, matorral xerófilo y pastizal. Despide un fuerte y agradable olor, cálido y amargo, que recuerda al aroma cítrico y al pino (Basurto, 1982).



Figura 1.2 *Origanum majorana*

1.5.3 Química.

Las partes aéreas de *Origanum majorana* está constituido del aceite esencial por los monoterpenos car-3-ene, caran-trans-4-ol, carvacrol, carvona, 1-8-cineol, para-cimeno y para-cimeno, beta-farneseno, geraniol, su acetato, menta-1-3-dieno, cis y trans-mentenol, cis-trans-l-etoxi-2-para-menteno, mentol, mirceno, acetato de nerol, alfa- y beta-pineno, cis y tras-piperitol, sabieneno, terpinen-4-okm su acetato, alfa y gama-terpineno, alfa-terpineol, terpinoleno, acetato de alfa-terpinil y cis y trans-4-epoxi-tujano; los sequiterpenos cariofileno, aromandreno, bicilogermacreno, alfa y gama-elemeno, alfa-copaeno, alfa-humuleno, eldeno y cariofileno; y el lignano anetol otros componentes de las partes aéreas incluyen los favonoides cosmosiín, diosmetín, glucósido de luteolín, rutín, vitexin y orientín; los compuestos fenílicos arbutín, el derivado metilado, hidroquinona y el éter monometílico y el lignano ácido rosmarínico Las hojas contienen los glucósidos de los ácidos hidroxibenzoico, salicílico, siríngico y vainíllico, y los ácidos cafeico y cumárico. Del polen se han obtenido los flavonoides cosmosín y glucurónidos de diosmetín (Lukovnikova, 1965) (Mossa, et al., 1984) (Taskinen, 1975).

1.5.4 Farmacología

Un extracto acuoso de partes aéreas presentó actividad antiviral frente a los virus de la enfermedad de New Castle, y el virus Herpes simplex (Hermann & Kucera, 1967)

La evaluación de la actividad antibiótica del aceite esencial, mostró actividad antibacteriana y antifúngica. Las especies bacterianas que respondieron positivamente fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*. Varias especies de hongos fitopatógenos tuvieron respuesta antifúngica positiva con el aceite esencia. (Conner & Beuchat, 1984). El aceite esencial también ha mostrado actividad depresora del sistema nervioso central en modelos experimentales con ratones tratados por la vía intraperitoneal, y con peces dorados por vía externa (El-Keltawi, et al., 1980). Un extracto acuoso preparado con inflorescencias terminales presentó una débil actividad antagonista de la anafilaxis por medio de una sustancia de reacción lenta (Singh, et al., 2013).

Un extracto obtenido con éter de petróleo preparado con hojas mostró fuerte actividad antioxidante a la concentración de 0.1%, al igual que un extracto metanólico de hojas evaluado a una concentración de 0.2%. (Muñoz, et al., 2001). El extracto acuoso preparado a partir de una muestra comercial de las partes aéreas, mostró actividad antimutagénica a la concentración de 50 mg, frente a la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* sometida a tratamiento mutagénico con TRP-P-2. (Rácz, et al., 1978)

1.5.5 Siembra y aprovechamiento

La temperatura ideal para el desarrollo de la planta está entre 15 y 20 °C. La mejorana debe permanecer en lugar soleado. Para la siembra, se ponen las semillas en la superficie del abono. Para que germine, el suelo debe estar húmedo, no mojado. Cuando las plantas muestran buena estabilidad se trasplantan a botes. Pasan por un proceso de aclimatación de diez a 15 días antes de trasplantarse a la zona de cultivo definitiva.

En la cosecha se aprovecha las hojas y los extremos floridos. Las hojas se desecan y las puntas con flores se reúnen en pequeños manojos que se cuelgan en lugares aireados, a la sombra. Las hojas se conservan en sacos de tela o papel; las flores en recipientes de vidrio o porcelana (Ángeles, et al., 2005).

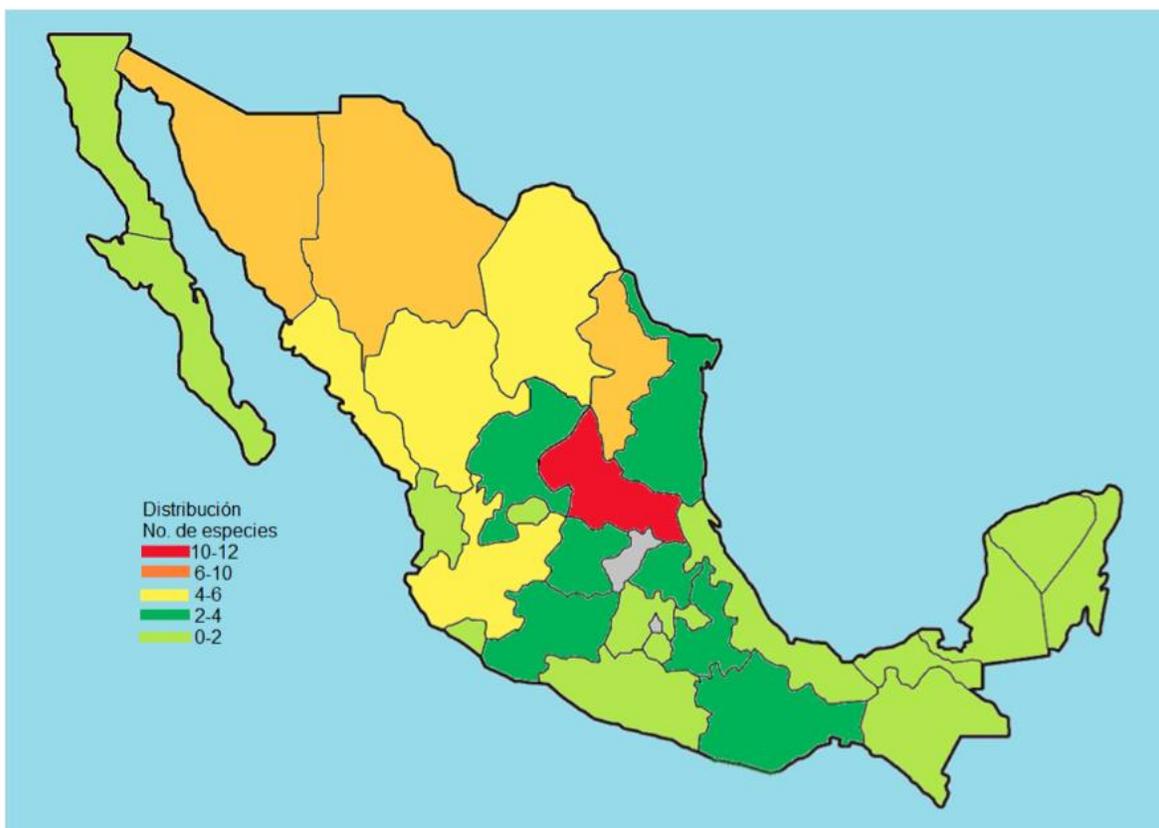


Figura 1.3 Mapa de distribución de especies de *Origanum majorana* con base en la información del herbario virtual de la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO)

1.6 Extracción sólido líquido

La extracción sólido líquido es una operación básica en la cual se separan uno o varios compuestos solubles contenidos en un sólido inerte mediante el uso de un disolvente adecuado.

1.6.1 Cromatografía

Se utiliza para la separación de los compuestos que forman una mezcla permitiendo que la mezcla entre en contacto con dos fases una se denomina fase estacionaria y la otra fase móvil.

El fenómeno de la cromatografía se lleva a cabo cuando la mezcla a separar se deposita según sus componentes sobre la fase estacionaria, mientras la fase móvil desplaza los componentes de la mezcla ya que estos pueden fijarse a la fase estacionaria fuertemente haciendo que la velocidad de desplazamiento sea lenta o por el contrario el componente no tenga una mayor retención y su velocidad sea mayor, como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

Existen diferentes tipos de cromatografías que dependen de la naturaleza de sus fases para este trabajo solo se mencionara una o dos de sus variantes (Harris, 2001) (Daniel & Carl, 2003).

1.6.2 Cromatografía líquido-sólido

La fase estacionaria está constituida por un sólido polar poroso y que esta finamente granulada al disminuir el tamaño de las partículas, el número de centros activos por unidad es mayor. La fase móvil está constituida por la mezcla eluida con un disolvente o mezcla de disolventes los cuales deben ser mezclados según su polaridad (Daniel & Carl, 2003).

1.6.3 Cromatografía en placa fina.

Se basa en la cromatografía sólido-líquido en el cual se verá el recorrido de la fase móvil en una pequeña placa la cual puede ser de vidrio, aluminio u otros soporte que contendrá la fase estacionaria.

La elución de cualquier tipo de cromatografía se pueden emplear los siguientes disolventes o mezclas de ellos, metanol, hexano, cloroformo, éter etílico, éter de petróleo, etanol, butanol, tetracloruro, vasos de precipitados, capilares, vidrio reloj, placa de aluminio con gel de sílice, cámara con vapor de yodo, lámpara de luz ultravioleta. (Harris, 2001)

1.7 Determinación de la estructura

1.7.1 Métodos espectroscópicos.

Uno de los estudios de los cuales se encarga la Química Orgánica es de la determinación de la estructura de los compuestos Orgánicos. Al aislar y purificar un compuesto a partir de un producto natural que debe caracterizar su estructura (Palop, 2006).

Hoy en día se cuentan con instrumentos que hacen la determinación de una estructura de una manera más rápida como es la espectroscopia además que de esta manera no se destruye las muestras, en caso de la espectrofotometría de masas se destruyen las muestras siendo éstas pequeñas cantidades de 2 a 3 mg.

La espectroscopia de absorción se basa en la medida de absorción de luz por un compuesto en función de su longitud de onda (Ramírez, et al., s.f.) (L.G., 20011).

1.7.2 Espectroscopia infrarroja

La región infrarroja se encuentra a longitudes de onda entre 8×10^{-5} cm y 1×10^{-2} cm. En espectroscopia se pueden identificar los diferentes grupos funcionales, debido a las vibraciones de los enlaces ya que cada uno vibra a diferentes frecuencias, por ejemplo los alcoholes OH absorben fuertemente de 3200 a 3600 cm^{-1} , el grupo cetónico C=O, a 1710 cm^{-1} , de esta forma se grafican y se pueden observar los grupos existentes en la muestra. Las vibraciones producidas por los grupos funcionales están caracterizadas por ser de estiramiento, flexión o deformación las cuales dependen del tipo de enlace, las vibraciones de cada compuestos son diferentes a menos de que sean el mismo y contengan las mismas vibraciones en la frecuencia denominada como huella dactilar en la región 600 a 1400 cm^{-1} , siendo la región que contiene el mayor número de vibraciones.

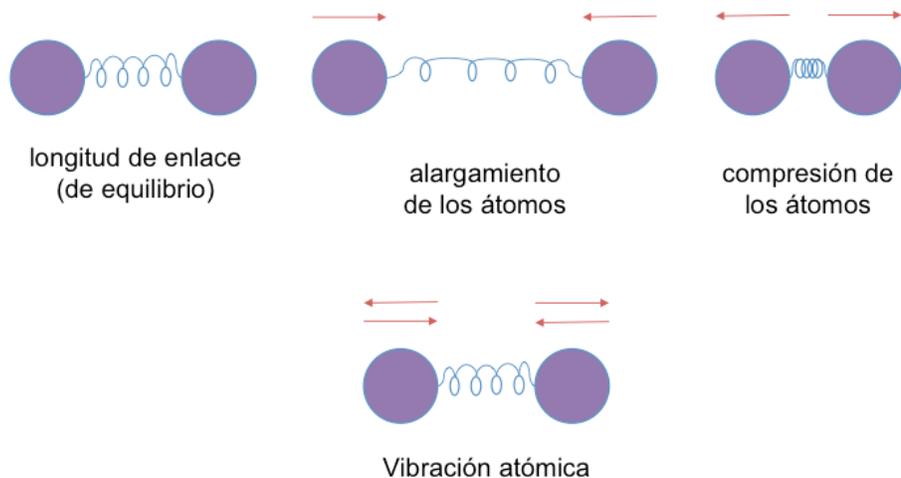


Figura 1.4 Vibración molecular, cuando el enlace entre átomos se alarga o se comprime, y a continuación se deja en libertad, la molécula vibra.

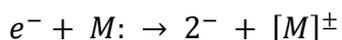
Las frecuencias de las vibraciones dependen de las masas, los átomos y de la conectividad de los enlaces, a partir de estas vibraciones se registran los espectros de infrarrojo. No todas las vibraciones se registran en el IR (infrarrojo) solo aquellas que cuentan con momento dipolar. La clave para que exista un momento dipolar permanente son las vibraciones de las moléculas que el punto de vibración no sea simétrico (Dyer, 1965) (Daniel & Carl, 2003).

1.7.3 Espectrometría de masas.

Con la espectrometría de masas, se proporciona la masa molecular e información sobre la fórmula molecular. En el espectrómetro se bombardean las moléculas con un haz de electrones (u otras partículas) de alta energía, lo cual las ioniza y rompe en muchos fragmentos, algunos de los cuales son iones positivos, la carga es 1^+ para la mayoría de los iones, por lo que m/z (relación masa/carga) simplemente representa las masas de los fragmentos y esta información se utiliza para reconstruir la molécula.

Los espectros de masas son empleados de dos maneras generales: para comprobar la identidad de dos compuestos, y ayudar a establecer la estructura de

una sustancia nueva. Al hacer incidir un electrón con una energía de 70 eV , éste tiene mucha más energía que la necesaria para ionizar una molécula. El impacto forma un catión-radical y rompe un enlace para dar lugar a dos especies: un radical y un catión del cual solo el catión será observado en el espectro de masas. La ruptura de enlaces tiende a formar los fragmentos más estables los cuales se forman de diferente manera dependiendo de la estructura de la molécula (L.G., 20011) (Daniel & Carl, 2003).



1.7.4 Espectroscopia de resonancia Magnética Nuclear

Tal como los electrones, se considera que ciertos átomos tienen núcleos con espín nuclear. El giro de estas partículas cargadas la circulación de carga-genera un momento magnético a lo largo del eje de giro, de modo que estos núcleos actúan como imanes de barra minúsculos.

Un núcleo esta en resonancia cuando es irradiado con fotones de radiofrecuencia que tienen la misma energía que la diferencia de energía que hay entre los estados de espín, de acuerdo a la mecánica cuántica se requiere que el momento magnético se alinee, bien en el mismo sentido o en el sentido contrario de campo magnético. Al estado de energía más bajo con el protón alineado con el campo se le conoce como estado de espín alfa y al estado de energía más alto con el protón alineado en contra del campo magnético externo se le conoce como estado de espín beta (Daniel & Carl, 2003) (Morrison & Boyd, 1976).

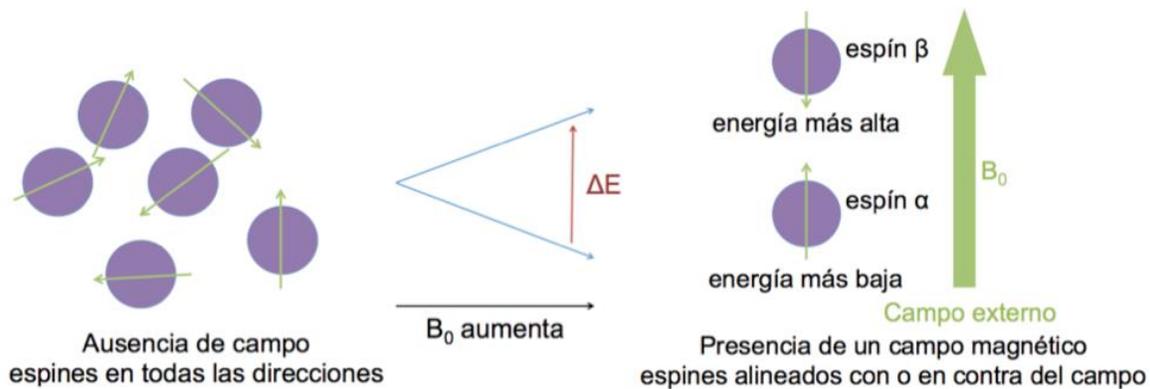


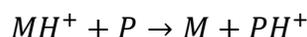
Figura 1.5 Orientaciones del espín nuclear, en ausencia y presencia de un campo magnético.

Cuando un núcleo está sometido a la combinación correcta de campo magnético y radiación electromagnética para producir el cambio en el espín, se dice que está en resonancia y la energía que emite es detectada por el espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN) (Morrison & Boyd, 1976).

1.8 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas para el análisis de biomoléculas. La técnica persigue la obtención de un perfil proteico característico. Para ello, una pequeña cantidad de biomasa del extracto proteico, se deposita sobre una placa de acero y se recubre con una matriz. La matriz suele estar disuelta en una mezcla de disolventes que son una combinación de agua, etanol, metanol, acetonitrilo y ácido fuerte. Los disolventes de la matriz penetran en la pared celular permitiendo que las proteínas sean accesibles al análisis. Cuando los disolventes se evaporan de la suspensión celular, la matriz comienza a formar cristales, y también co-cristalizan las moléculas proteicas y otros componentes celulares que quedan incrustados en ella. Las matrices más comúnmente utilizadas son: α -ciano (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico), DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), ácido sinápico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) y ácido ferúlico (FerA, ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propil-2-enoico) (Welter y Morre, 2011). Una vez que ha tenido lugar la co-cristalización de la muestra con la matriz, la placa se introduce en un espectrómetro de masas, y la placa es irradiada con un láser UV (usualmente un

láser de N₂, 337 nm) lo que produce la ionización de la matriz cristalizada (M), y ésta a su vez genera la ionización de la molécula péptica (P) de la muestra por la cesión de protones.



Las moléculas peptídicas ionizadas migran a través de una región que posee un campo eléctrico constante, de manera que llegan al detector con un tiempo de vuelo que depende de su masa molecular y de su carga (*m/z*), y el detector interpreta la señal en forma de espectro. Una de las ventajas de esta técnica es que el perfil proteico obtenido no se ve afectado por las condiciones de cultivo de la cepa (medio, temperatura, tipo de atmósfera, y tiempo de incubación), ni por la fase de crecimiento en la que es recogida la biomasa. La comparación de los espectros de masas puede estar basada en diferentes criterios, por ejemplo, puede utilizarse como único parámetro la presencia/ausencia de picos del espectro o puede tenerse en cuenta también la altura de los picos (Garrigues, 2013) (Bruice, 2008).

1.8 Formulas estructurales

Los químicos orgánicos utilizan varias clases de fórmulas para representar los compuestos orgánicos. Algunas de estas fórmulas incluyen una notación específica que requiere una explicación. Las formulas estructurales indican qué átomos están enlazados a otros.

1.8.1 Formulas lineoangulares

Otra forma de representar las estructuras orgánicas es la fórmula lineoangular, algunas veces llamada estructura esquelética. En una formula lineoangular los enlaces están representados por líneas y los átomos de carbono vienen dados por los vértices o puntos de encuentro de dos líneas o el punto del principio o final de la línea en el caso de los extremos. Los átomos de nitrógeno, de oxígeno y los halógenos se escriben con su símbolo, pero los átomos de hidrógeno frecuentemente no se simbolizan a no ser que vayan unidos a elementos que se

han simbolizado. Se supone que cada átomo de carbono tiene los suficientes átomos de hidrógeno para que el total de sus enlaces sea cuatro (Bruice, 2008) (Wade Jr., 20011).

1.8.2 Estereoquímica

La estereoquímica es el estudio de las moléculas en tres dimensiones. Nadie puede entender la química orgánica, la bioquímica o la biología sin hacer uso de la estereoquímica. Los sistemas biológicos son muy selectivos y a menudo discriminan moléculas con diferencias estereoquímicas muy pequeñas.

La isomería es una propiedad de los compuestos químicos con igual fórmula molecular y de iguales proporciones relativas de los átomos que conforman su molécula, pero presentan estructuras químicas distintas, y por ende, diferentes propiedades. Los isómeros constitucionales difieren en su secuencia de enlaces ya que sus átomos están conectados de forma diferente. Los estereoisómeros tienen la misma secuencia de enlaces, pero difieren en la orientación de algunos de sus átomos en el espacio.

Podría parecer que las diferencias en la orientación espacial no son importantes, pero los estereoisómeros con frecuencia presentan diferencias considerables en sus propiedades físicas, químicas y biológicas. El descubrimiento de la estereoquímica tuvo una gran influencia en el desarrollo de la teoría estructural en la química orgánica. La estereoquímica permitió explicar por qué existían varios tipos de isómeros dependiendo la orientación espacial de los átomos, para una misma conectividad, e hizo que los científicos propusieran una geometría tetraédrica para el átomo de carbono (Bruice, 2008) (L.G., 20011)

1.8.3 Quiralidad

La quiralidad son imágenes especulares no superponibles (no son idénticos), término que deriva de la palabra griega cheir, que significa "mano". Cada objeto tiene una imagen especular, pero un objeto quiral tiene una imagen especular que

es diferente de la del objeto original. Los objetos que tienen la misma imagen especular que el objeto original se les denomina aquirales, es decir “no quirales”.

Se dice que dos moléculas son superponibles si se pueden poner una encima de la otra y la posición tridimensional de cada átomo de la molécula coincide con el átomo equivalente de la otra molécula. Las moléculas que son imágenes especulares no superponibles se conocen como enantiómeros (Bruice, 2008) (Bruice, 2008)

1.8.4 Proyecciones de Fischer.

Para dar a las moléculas con carbonos asimétricos una perspectiva tridimensional sobre el plano del papel, se han utilizado líneas de rayas y cuñas. Cuando las moléculas tienen varios átomos de carbono asimétricos. La representación tridimensional es laboriosa e incómoda; además, esta complicada representación hace que sea difícil ver las semejanzas y diferencias en los grupos de estereoisómeros, cuando se realiza una comparación.

Las proyecciones de Fischer parecen una cruz, con el átomo de carbono asimétrico en el punto de corte de las dos líneas. Las líneas horizontales corresponderían a cuñas, es decir, a enlaces que se dirigen hacia nosotros. Las líneas verticales equivaldrían a rayas discontinuas, es decir a enlaces que se alejarían de nosotros.

CAPITULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Desarrollo experimental

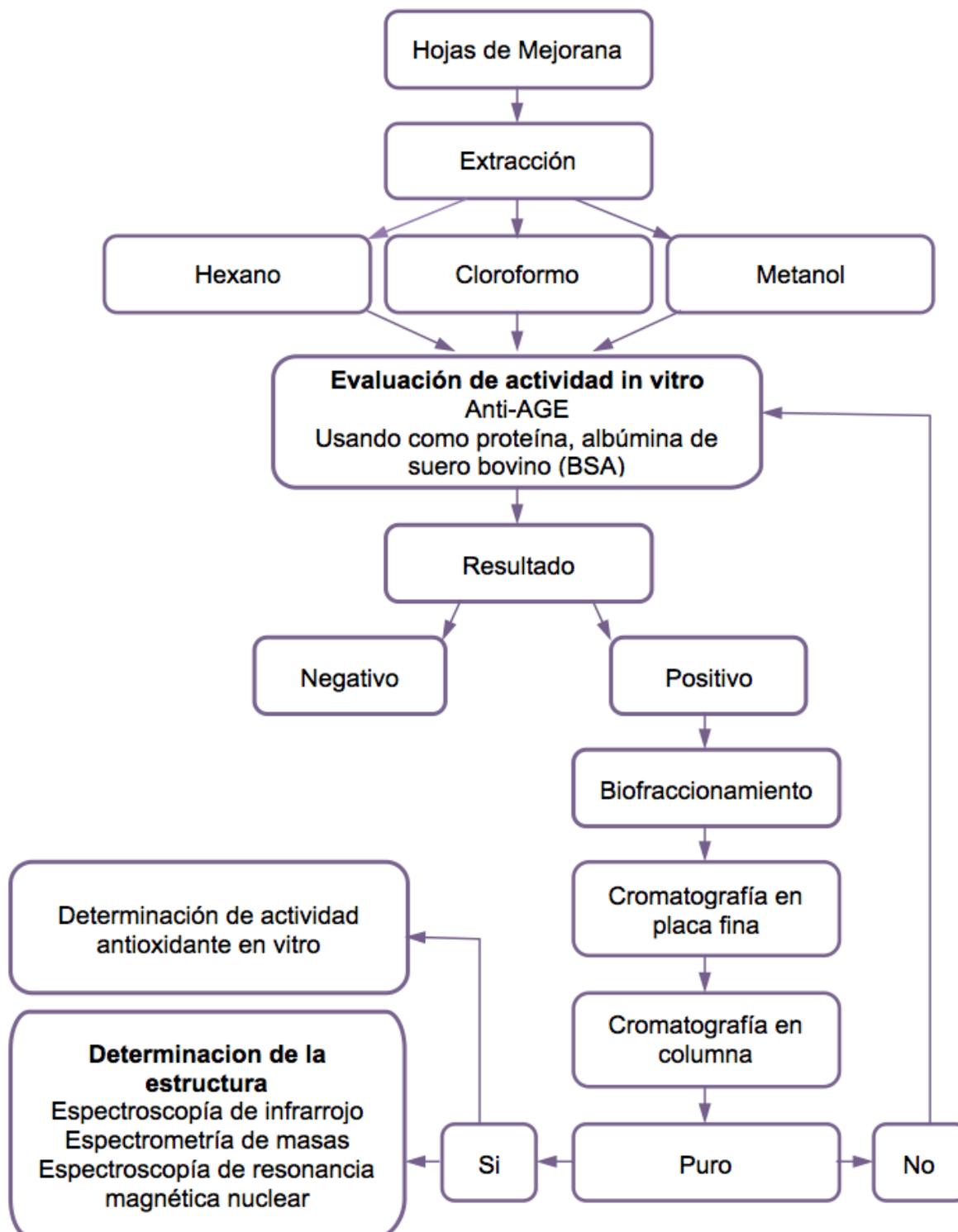


Figura 2.1 diagrama de desarrollo experimental

El desarrollo de la investigación se llevo a cabo en el Instituto Politécnico Nacional en la Escuela Superior de Ingeniería Química e industrias Extractivas en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales.

2.3 Materia prima

Hojas de *Origanum mejorana* secas en una estufa de corriente de aire (tecnológico) a la temperatura de 40 °C

2.4 Material de laboratorio

Material común de laboratorio, cristalería.

2.5 Reactivos y disolventes

Agua destilada, cloroformo, hexano, cloroformo, éter etílico, éter de petróleo, metano, etanol, acetona, aminoguanidina (0.442mg/ml), albúmina sérica bovina (BSA) (10mg/ml), glucosa (90mg/ml), azida 0.002%, DMSO (dimetilsulfóxido), buffer pH7, ácido ascórbico (0.1136mg/ml), DPPH solución en etanol (0.1260 mg/ml.)

2.6 Equipos

Rota vapor RE400 (YAMATO), espectrofluorómetro RF 5000 (SHIMADZU), espectrofotómetro GX FT-IR System (PERKINELMER), espectrómetro de RMN (VARIAN-MERCURY), espectrómetro de RMN 400 MHz (BRUKER), espectrómetro de masas (BRUKER), balanza analítica Beeco BBI-31, balanza granataria.

2.7 Inhibición de glicación de las proteínas in vitro

Se pesó 1 mg de extracto o compuesto a analizar se le adicionó DMSO (dimetil sulfóxido, solo para disolver muestras), 1ml de glucosa, 1 ml de proteína BSA (albúmina sérica bovina), 3 gotas de azida como antibacteriano, 2 ml de buffer pH 7 (Fosfato), se prepararon los controles los cuales se preparan de la misma forma con su respectiva variación el positivo tendrá 1ml de aminoguanidina (molécula capaz de inhibir la glicación de las proteínas), en lugar de la muestra, el negativo tendrá todo exceptuando la muestra y/o la aminoguanidina, se agitan en el vortex (Scientific Industries) y se dejan en incubación a 28 °C durante 15 días. Al concluir

el tiempo, se filtró 1ml y se diluyó en 10 ml en tubos para centrifuga. Se leyeron en un espectrofluorometro (RF 5000 SHIMADZU), a una longitud de onda de excitación de 370 nm y una de emisión de 440 nm. Con los resultados se calcula el % de inhibición con la siguiente ecuación (Lugardo, 2010)

$$\% \text{inhibición AGE} = \frac{\text{fluorecencia control} - \text{fluorecencia muestra}}{\text{fluorecencia control}} \times 100$$

2.8 Actividad antioxidante en vitro

Se pesó 1mg de muestra se disolvió con metanol, se colocó en un tubo de ensayo, previamente se preparó una solución 0.135 mM de radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) en metanol, a la muestra se le adicionó 1 ml de la solución anterior y se dejó reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 min. El ácido ascórbico es usado como referencia. Se registran los valores obtenidos en el espectrofotómetro UV a 517nm de absorbancia.

Con los resultados se calcula el % de inhibición de la siguiente manera.

$$\begin{aligned} & \% \text{ inhibición antioxidante} \\ & = \frac{\text{absorbancia DPPH}_{\text{metanol}} - \text{absorbancia antioxidante}}{\text{absorbancia DPPH}_{\text{metanol}}} \times 100 \end{aligned}$$

2.9 Actividad antioxidante en placa fina

Se basa en la detección de la capacidad antioxidante del compuesto sobre el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).

Se colocó en la placa de gel de sílice el compuesto a analizar se dejó secar y con ayuda de un frasco espray se le adicionó β -caroteno/ácido linoléico 0.025 mg/ml y 15 mg/ml en cloroformo, se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente, al término del tiempo se rocío con una solución de DPPH 0.2 % disuelto en metanol. Si el punto de aplicación del compuesto se torna de color amarillo se

considera que presenta actividad antioxidante el cambio de tonalidad puede tomar 5 minutos.

2.10 Extracción de la hoja de mejorana

Se secaron 10 kg de hojas de mejorana en estufa a 30 °C, se molió las hojas secas en un molino de mano. El polvo se colocó en un garrafón de vidrio Pyrex se agregaron 20 lt de metanol se reflujo durante 3 horas, terminado el tiempo se dejó macerar por 3 días posteriormente se filtró, este proceso se repitió nuevamente. Los extractos se reunieron y se destilaron en un rotovapor al vacío (RE 400). Se obtuvieron 110 g de un residuo de color verde oscuro, el cual se ha etiquetado con el código Me.

2.11 Biofraccionamiento de los triterpenos con actividad antiglicación

2.11.1 Cromatografía en placa fina

Se diluyó con cloroformo una muestra aproximadamente de 0.2 mg de la mezcla obtenida de la extracción, de esta dilución con un capilar se tomó parte de la dilución y se colocó en la parte inferior de una placa de sílice, se colocaron en diferentes vasos de precipitados los disolventes mencionados anteriormente y se colocó dentro la placa con la muestra, la cual se tapó con un vidrio reloj, al término del recorrido de la fase móvil en la placa se extrajo y se dejó secar, para revelarla en una cámara de yodo, por último se extrajo de la cámara y se observa bajo la luz ultravioleta. Se hizo el mismo procedimiento para cada disolvente y se seleccionó el disolvente con el cual se obtiene una mayor separación para proceder a la cromatografía en columna. Las cromatografías en placa fina, se repitieron durante la experimentación para encontrar mezclas de disolventes que nos ayudaran a separar y encontrar el compuesto con la características requeridas, hasta obtener un compuesto puro verificando que con diferentes mezclas de disolventes solo se observe una sola fase.

2.11.2 Cromatografía en columna

Es el método más utilizado para la separación de compuestos orgánicos a escala preparativa. La fase estacionaria se deposita en el interior de una columna, que termina con una placa porosa que impide su paso, la fase móvil recorre toda la columna separando cada fracción. Se formaron columnas de gel de sílice con tiras de polietileno de 8 a 4 cm de diámetro y de 30 a 85 cm de largo, dependió de la cantidad de compuesto a fraccionar. Se realizó la prueba de inhibición de glicación a cada fracción obtenida de la cromatografía en columna de esta manera se descartaba la fracción que no poseía la característica deseada. En sección de resultados se muestra el biofraccionamiento que se realizó en este trabajo.

CAPITLO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Biofraccionamiento del *Origanum majorana* (Me)

Se realizó un ensayo preliminar haciendo extracciones con metanol, cloroformo y hexano el efecto antioxidante y antiglicación se encontró en el extracto de metanol.

Tabla 3.1 Resultado de ensayo preliminar antiglicación y antioxidante de extracción de las hojas de *Origanum majorana* con diferentes disolventes

Actividad/ Extracto	Hexano <i>Origanum majorana</i>	Cloroformo <i>Origanum majorana</i>	Metanol <i>Origanum majorana</i>
Antioxidante	X	X	√
Antiglicación	X	X	√

Durante la prueba a cada extracto se determinó que el metanol extrajo el compuesto que contiene la mayor actividad de anti-AGE y antioxidante.

El extracto de metanol Me, se sometió a biofraccionamiento por la técnica de cromatografía en columna de gel de sílice, obteniendo 9 fracciones a las cuales se les realizó la prueba anti-AGEs para determinar su actividad.

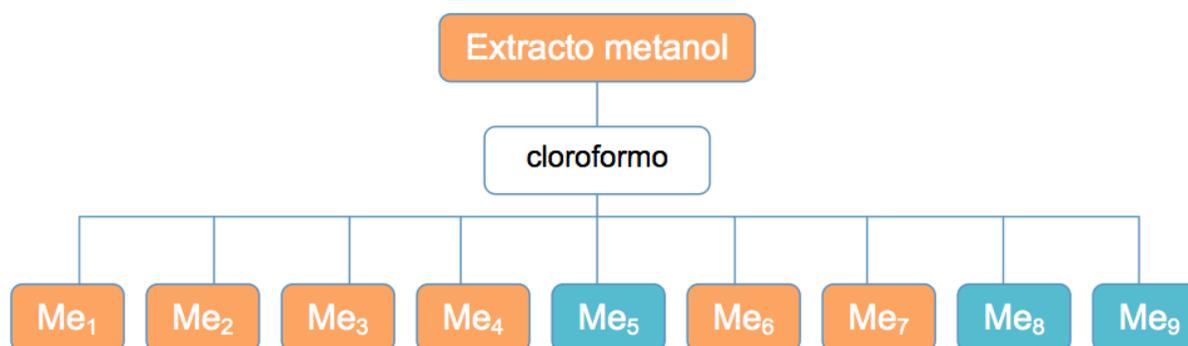


Figura 3.1 Biofraccionamiento inicial del extracto de *Origanum majorana*; los compuestos Me₅ Me₈ y Me₉ mostraron actividad anti AGE's

Se evaluó el potencial antiglicación a las 9 fracciones obteniendo como resultado que las fracciones Me₅, Me₈ y Me₉, reducen la formación de AGEs determinada por fluorometría. La aminoguanidina, un inhibidor conocido sirvió como control positivo de comparación.

A continuación se muestran los biofraccionamientos de cada fracción positiva, en cada diagrama se observan diferentes recuadros en colores distintos los cuales pueden mostrar:

- Las fracciones obtenidas de cada cromatografía en columna de la siguiente manera; Me₅₁-Me₅₇, indicando la obtención de 6 fracciones (5-1 a 5-7) a los cuales se les realiza la prueba de Inhibición de glicación en las proteínas.
- La fracción activa es la que resulto positiva después de la evaluación de actividad in vitro anti-AGE por ejemplo de las 7 fracciones mencionadas La que mostro actividad fue la Me₅₃.
- El sistema eluyente, el disolvente o la mezcla de disolventes que resulto con mayores fracciones durante el desarrollo de la cromatografía en placa para posteriormente ser utilizada en la cromatografía en columna.
- Los compuestos activos puros.

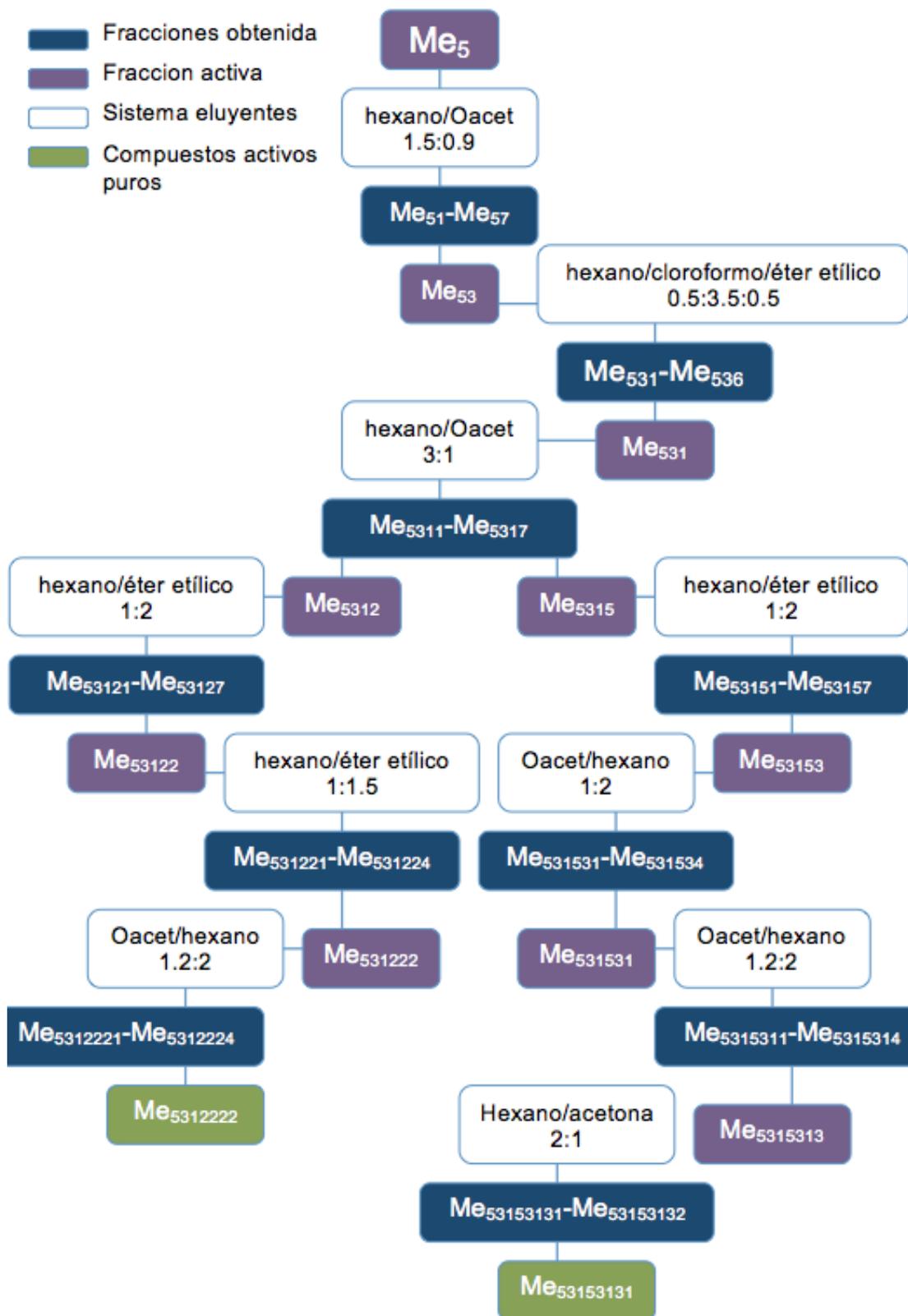


Figura 3.2 Biofraccionamiento de la fracción Me₅ de las hojas de *Origanum majorana* obteniendo las fracciones con características antiglicación y antioxidante Me₅₃₁₂₂₂ y Me₅₃₁₅₃₁₃₁.

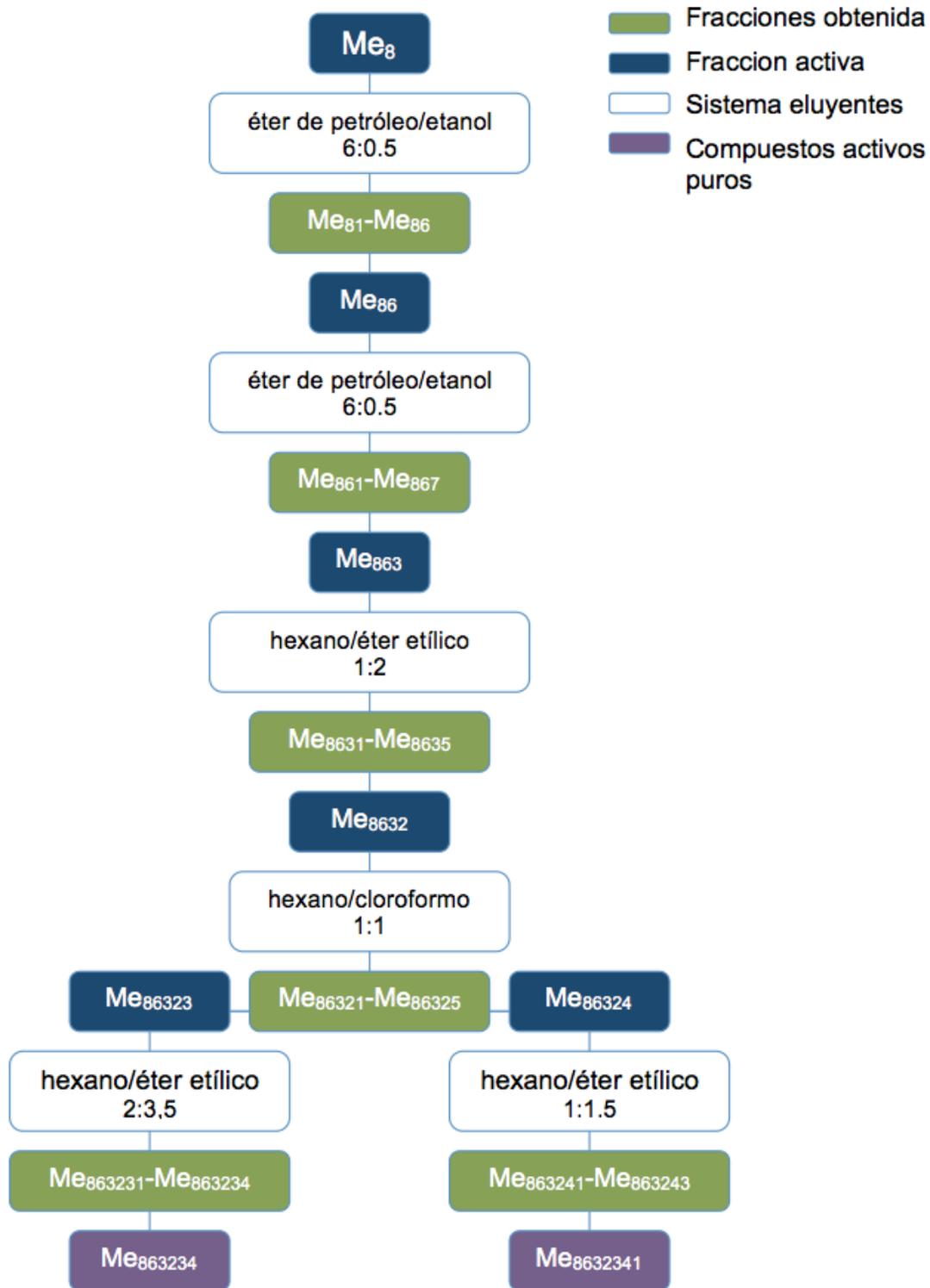


Figura 3.3 Biofraccionamiento de la fracción Me_8 de las hojas de *Origanum majorana* obteniendo las fracciones con características antiglicación y antioxidante Me_{863234} y $Me_{8632341}$

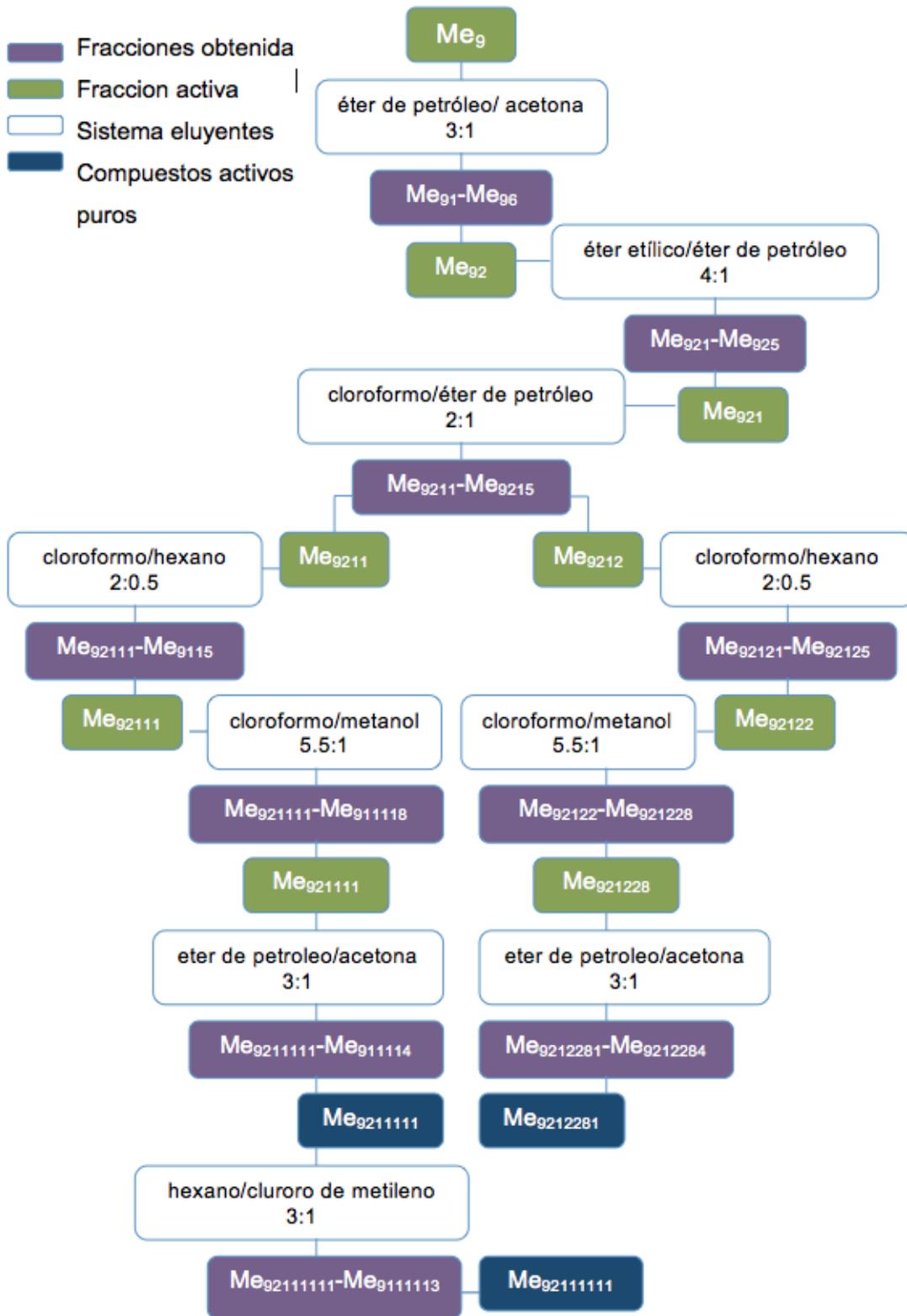


Figura 3.4 Biofraccionamiento de la fracción Me_9 de las hojas de *Origanum majorana* obteniendo las fracciones con características antiglicación y antioxidante $Me_{92111111}$, $Me_{92111111}$ y $Me_{9212281}$

El desarrollo del biofraccionamiento o purificación de la *Origanum majorana*, todo fue realizado mediante el uso de la cromatografía, obteniendo siete compuestos puros.

3.2 Resultados de actividad anti-AGE en vitro

En cada fracción se determinó el efecto anti-AGE en vitro, comparando los resultados con los controles, positivo (aminoguanidina) y negativo. Los extractos de cloroformo y hexano de la *Origanum majorana* no tuvieron las propiedades anti-AGEs. En la tabla 3.2 se muestra el valor de la fluorescencia y su porcentaje de inhibición el cual fue obtenido aplicando la siguiente ecuación.

$$\% \text{inhibición AGE} = \frac{\text{fluorecencia control} - \text{flurecencia muestra}}{\text{fuorecencia control}} \times 100$$

Tabla 3.2 Resultado de fracciones de la *Origanum majorana* con actividad anti-AGE's

Fracción	Fluorescencia (nm)	Porcentaje de inhibición (%)
Me5312222	26.131	74.74
Me53153131	20.947	79.75
Me863234	38.254	63.02
Me863241	31.75	69.31
Me92111111	55.433	46.42
Me9212281	27.218	73.69
Me9211111111	31.907	69.16
Positivo (control: aminoguanidina)	103.464	
Negativo	165.41	

El porcentaje de inhibición de cada fracción es elevado lo cual nos indica que la formación de AGE es mínima lo que ayudaría a controlar los efectos negativos de la formación de AGE's en el organismo.

3.3 Resultado de actividad antioxidante

En cada etapa del biofraccionamiento se detectó el efecto antioxidante en placa fina. A los compuestos puros se les realizó la prueba de antioxidante in vitro. En la Tabla 3.3 se muestra el valor de la absorbancia UV y el cual fue obtenido aplicando la siguiente ecuación.

% inhibición antioxidante

$$= \frac{\text{absorbancia DPPH}_{\text{metanol}} - \text{absorbancia antioxidante}}{\text{absorbancia DPPH}_{\text{metanol}}} \times 100$$

Tabla 3.3 Resultados de fracciones de la *Origanum majorana* con actividad antioxidante.

Fracción	Absorbancia	Porcentaje de inhibición (%)
Me5312222	0.084	92.88
Me53153131	0.091	92.29
Me863234	0.129	89.07
Me863241	0.081	93.13
Me92111111	0.092	92.20
Me9212281	0.089	92.45
Me9211111111	0.086	92.71
Acido ascórbico	0.0997	
Control (DPPH)	1.1803	

Se comprueba que los compuestos son antioxidantes naturales los cuales ayudaran a mantener al cuerpo en equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes manteniendo al paciente sano.

3.4 Determinación de las estructuras.

Se determinaron las estructuras de cinco compuestos con actividad antiAGEs aislados del extracto de metanol de las hojas de *Origanum majorana* por técnicas espectroscópicas de IR, ^1H RMN, ^{13}C RMN y espectrometría de masas. Los espectros obtenidos de cada compuesto se muestran en la sección de ANEXOS.

El compuesto Me9212281 se obtuvo como un polvo de color blanco amorfo, se identificó por medio de una revisión en la literatura como 28-norlup-20(29)-ene-3 β , 17 β -diol el cual fue previamente aislado de la *Melaleuca leucadendron*, (Lee., 1998) (Vagi, et al., 2005) (Amman, et al., 1982) (Reynolds, et al., 1986).

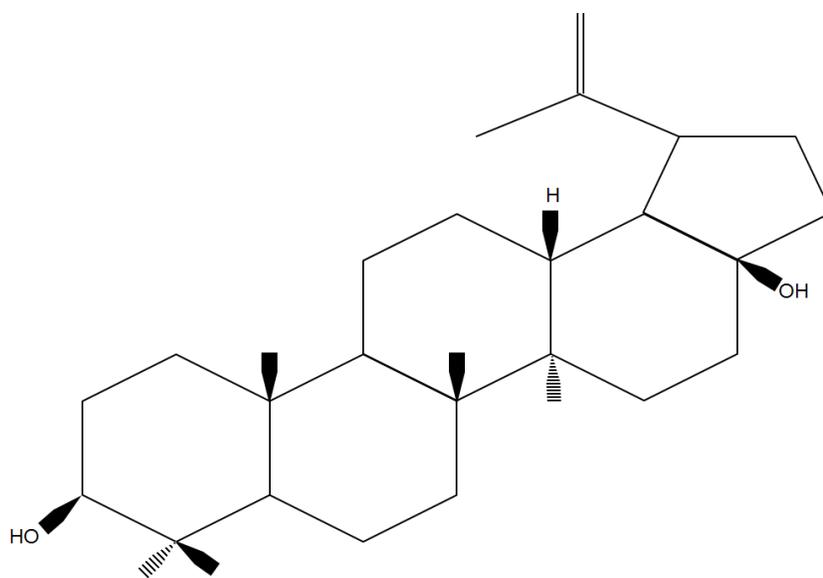


Figura 3.5 28-norlup-20(29)-ene-3 β , 17 β -diol

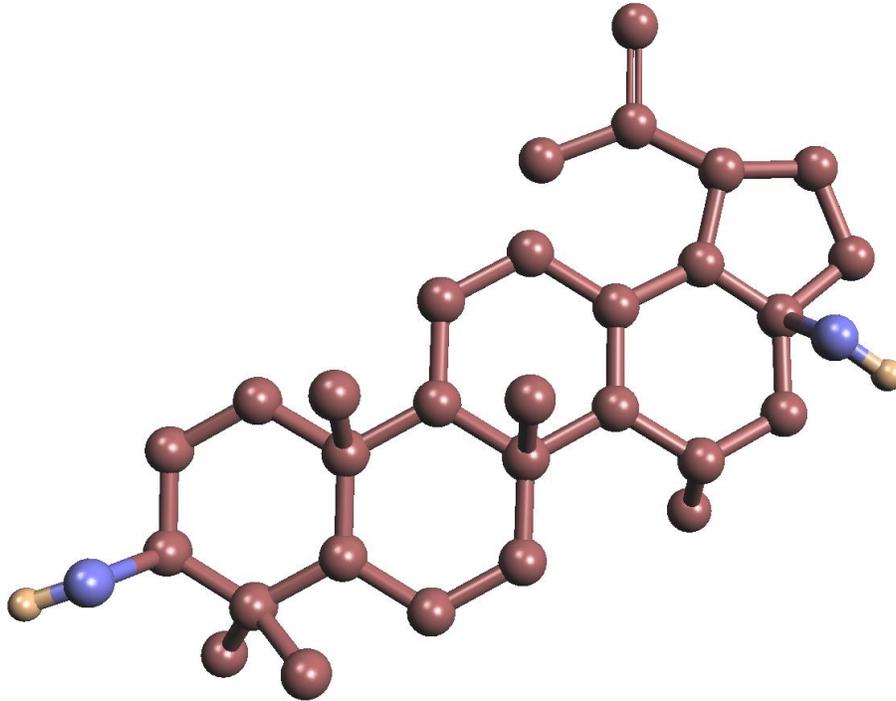


Figura 3.6 28-norlup-20(29)-ene-3 β , 17 β -diol en 3D

El compuesto Me363241 fue identificado como 3 β ,6 β ,7 β -trihidroxy-20(29)lupene el cual fue previamente aislado y caracterizado de la planta *Rhoipetela chiliantha* (Jiang, et al., 1995) (Vagi, et al., 2005).

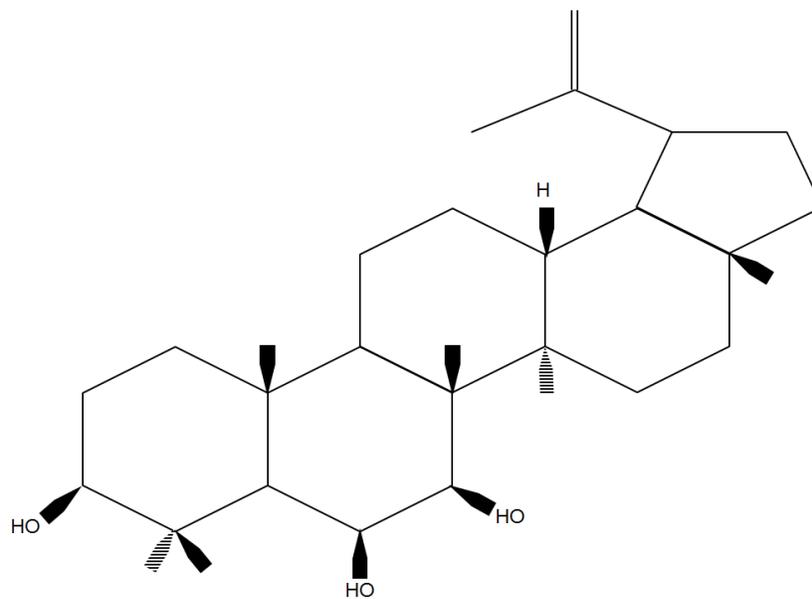


Figura 3.7 3 β ,6 β ,7 β -trihidroxy-20(29)lupene

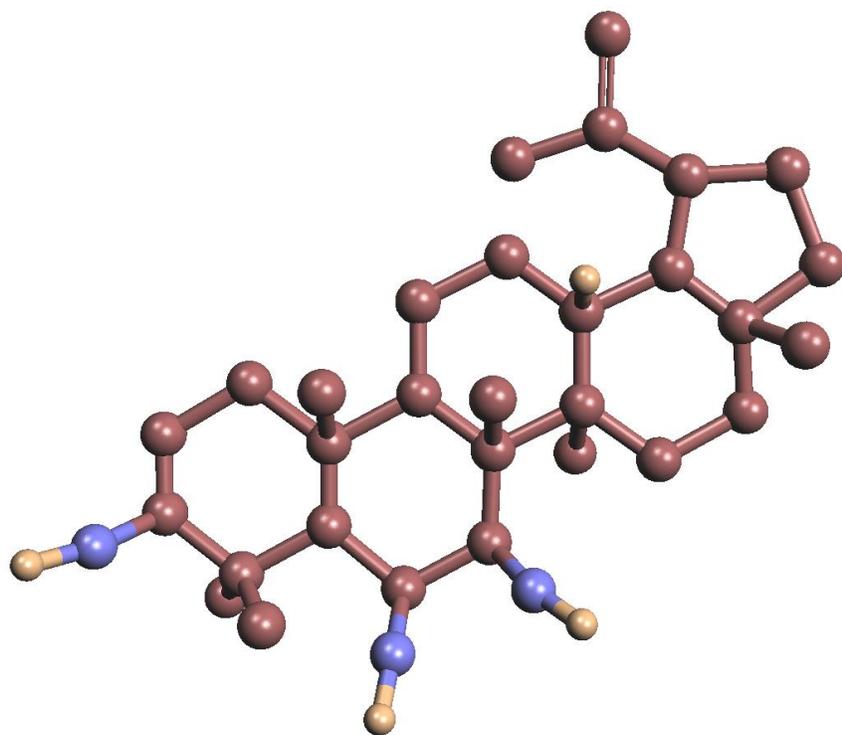


Figura 3.8 3 β ,6 β ,7 β -trihidroxy-20(29)lupene en 3D

El compuesto Me921111111 fue identificado como ácido ursólico el cual es un atenuante de la glicación por medio de la disminución del estrés oxidativo, este triterpeno también fue obtenido con anterioridad a partir de una extracción de etanol de la *Origanum majorana* (Yin, 2012) (Vagi, et al., 2005)

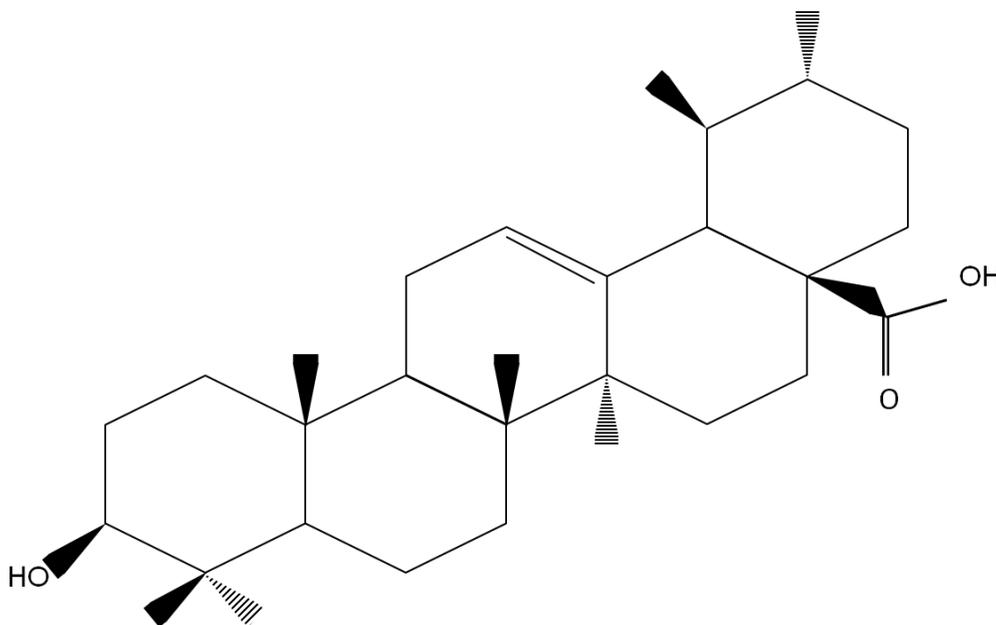


Figura 3.9 Ácido ursólico

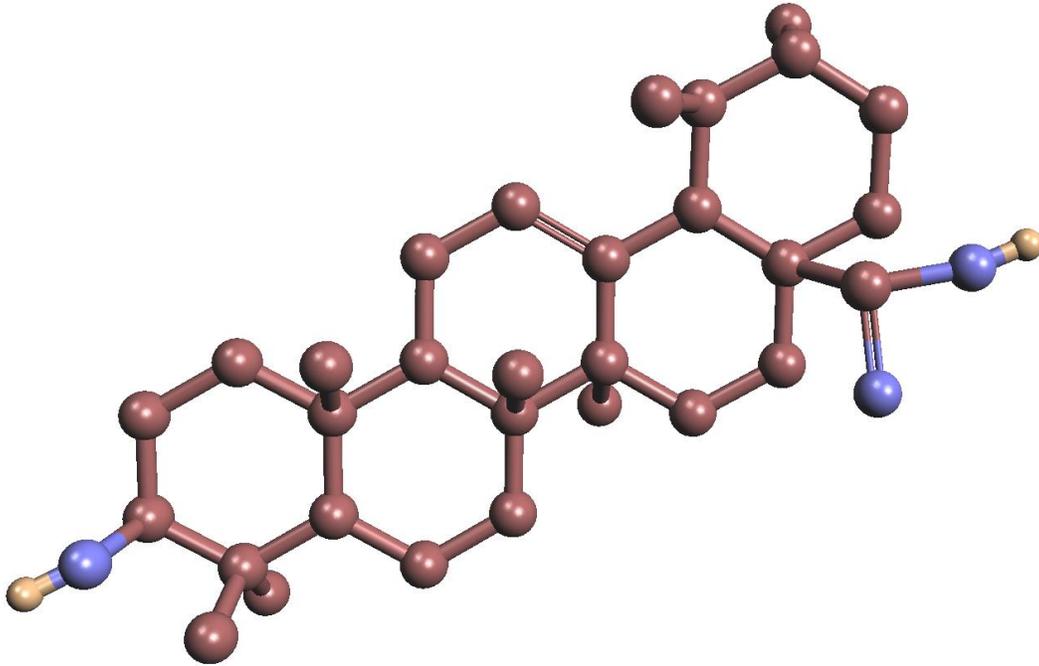


Figura 3.10 Ácido ursólico

El compuesto Me863234 fue identificado como lupeol, causa una disminución de hemoglobina glucosilada, glucosa sérica, óxido nítrico con un incremento de insulina en el suero. También incrementa los niveles de las enzimas antioxidantes, disminuyendo el nivel del ácido tiobarbitúrico el cual es una especie de oxígeno reactivo (Gupta, et al., 2012).

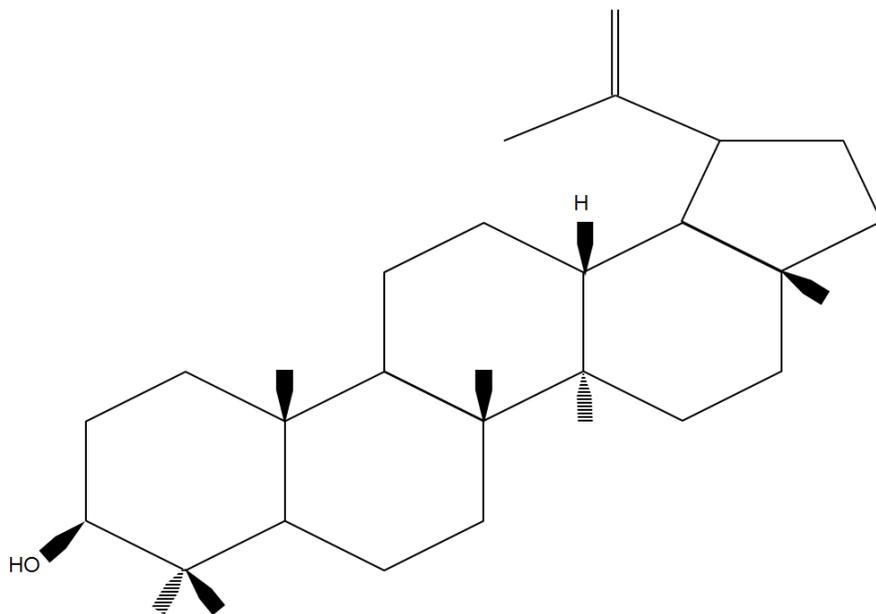


Figura 3.11 Lupeol

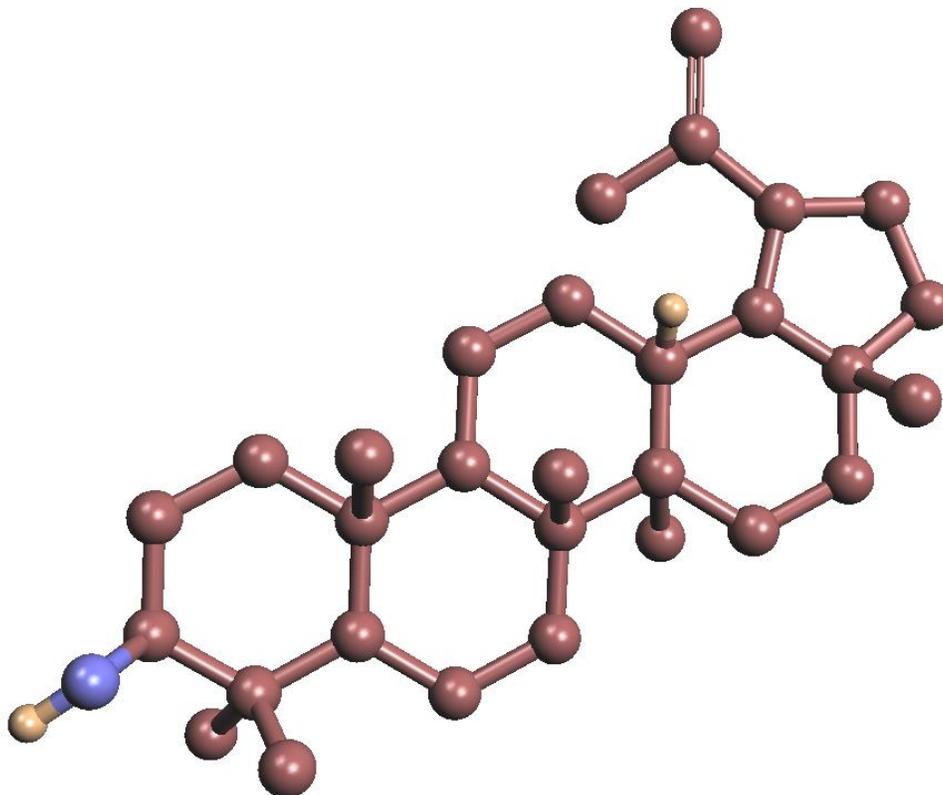


Figura 3.12 Lupeol en 3D

El compuesto Me92111111, fue aislado como una goma incolora, presenta actividad anti-glicación y antioxidante. La fórmula molecular fue establecida como $C_{13}H_{50}O_6$ de acuerdo a HRESI-MS, m/z 518.4077 [M]⁺ (calc. Para $C_{13}H_{50}O_6$ 518.3607). El espectro de IR contiene señales típicas del grupo hidróxilo (3457 cm^{-1}) y grupo carbonilo (1732 cm^{-1}) y un doble enlace (1640 cm^{-1}). El espectro de ^{13}C RNM en el espectro de transferencia de polarización (DPT), indica la presencia de 31 átomos carbono, asignados a siete grupos metilo, ocho metilenos incluyendo un hidróxilmetilo, nueve metilenos incluyendo un olefínico y siete carbonos cuaternarios incluyendo un carbonilo. Considerando los datos de los espectros de ^{13}C y ^1H RNM del compuesto Me92111111 son característicos de un triterpeno del tipo ursano. El doble enlace se localiza entre el C-12 y C13 porque H-15, H-18 y H19 en el espectro HMBC mostraron correlación con el carbono cuaternario olefínico (δ_c 118.08, C-12), también H-9 y H-18 están correlacionados a un metil olefínico (δ_c 118.08, C-12) confirmando además la ubicación del doble enlace. La ubicación del grupo hidroxilo en el C-3 se determinó a través de un

experimento HMBC en la que H-3 exhibió 2J y correlaciona con C-2 (δ_c 25.16) y C-4 (δ_c 37.41), con C-1 (δ_c 33.72), C-5 (δ_c 49.97) y C-24 (δ_c 28.24). La correlación entre el H-15 (δ_c 4.19) con el C-8 (δ_c 41.50), C-17 (δ_c 42.7) y C-27 (δ_c 13.14), y también entre el H₂-16 (δ_H 1.52/1.95) y H₃-27 (δ_H 1.05) con el C-15 (δ_c 68.21), indica que el segundo grupo hidroxilo se encuentra en C-15. Las configuraciones de los grupo hidroxilo en C-3 y C-15 fueron asignados como β y α -orientaciones respectivamente, debido a las constantes de acoplamiento trans-diaxial de H-3 ($J=11.5$ Hz) y H-15 ($J=10.7$ Hz). Además en los experimentos de NOESY del compuesto Me92111111 mostro señales de correlación entre el δ_H 3.4 (H-3), 1.3 (H-5) con δ_H 4.19 (H-15) y 1.13 (H₃26) confirmando la α - y β -orientacion del H-3 y H-15. Los espectros de 1H y ^{13}C RMN mostraron un grupo hidroximetileno en δ_H 3.86,3.34 (ambos con d , $J=11$ Hz, H-28) y 65.91 en C-28. La localización del grupo hidróxilo restante se determinó en el C-12 sobre la base del H-21 y H-22[21]. axial-axial y axial ecuatorial respectivamente. El espectro de masas del compuesto Me92111111 confirmo la estructura de Δ^{12} -ursene con la fragmentación típica retro-Diels_alder (RDA) del anillo C (m/z 248). Por lo tanto se concluyó que el compuesto Me92111111 es 23-carboximetil, 3β , 15α , 21β , 28-tetrahidroxiursa-12-ene.

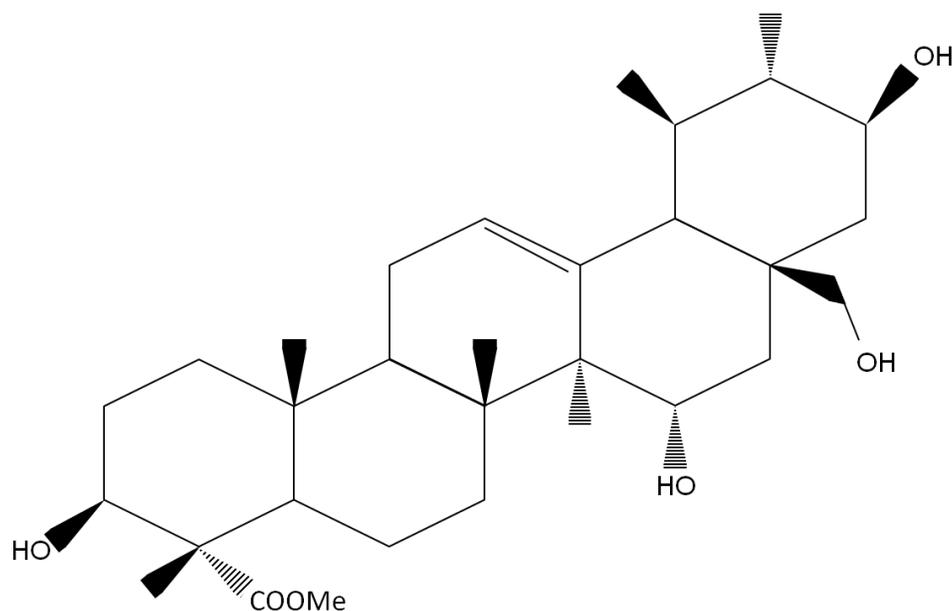


Figura 3.13 23-carboximetil, 3β , 15α , 21β , 28-tetrahidroxiursa-12-ene

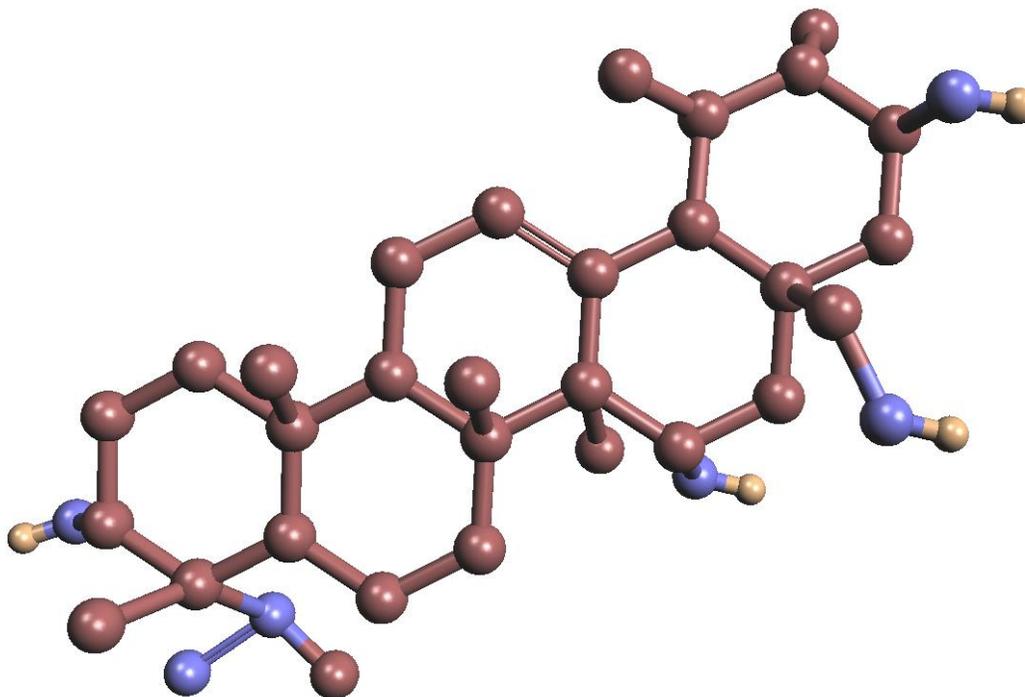


Figura 3.14 23-carboximetil, 3 β , 15 α , 21 β , 28-tetrahidroxieursa-12-ene en 3D

3.5 MALDI-TOF

Se obtuvieron los espectros MALDI-TOF de cada fase de la reacción de anti-AGEs (con ácido sinápico como estándar), las cuales son; BSA, Control Positivo (Aminoguanidina + BSA + glucosa), control negativo (BSA + glucosa) y la fracción Me 92111111 (BSA + glucosa + triterpeno), se observa los diferentes perfiles proteicos mostrando la degradación del BSA.

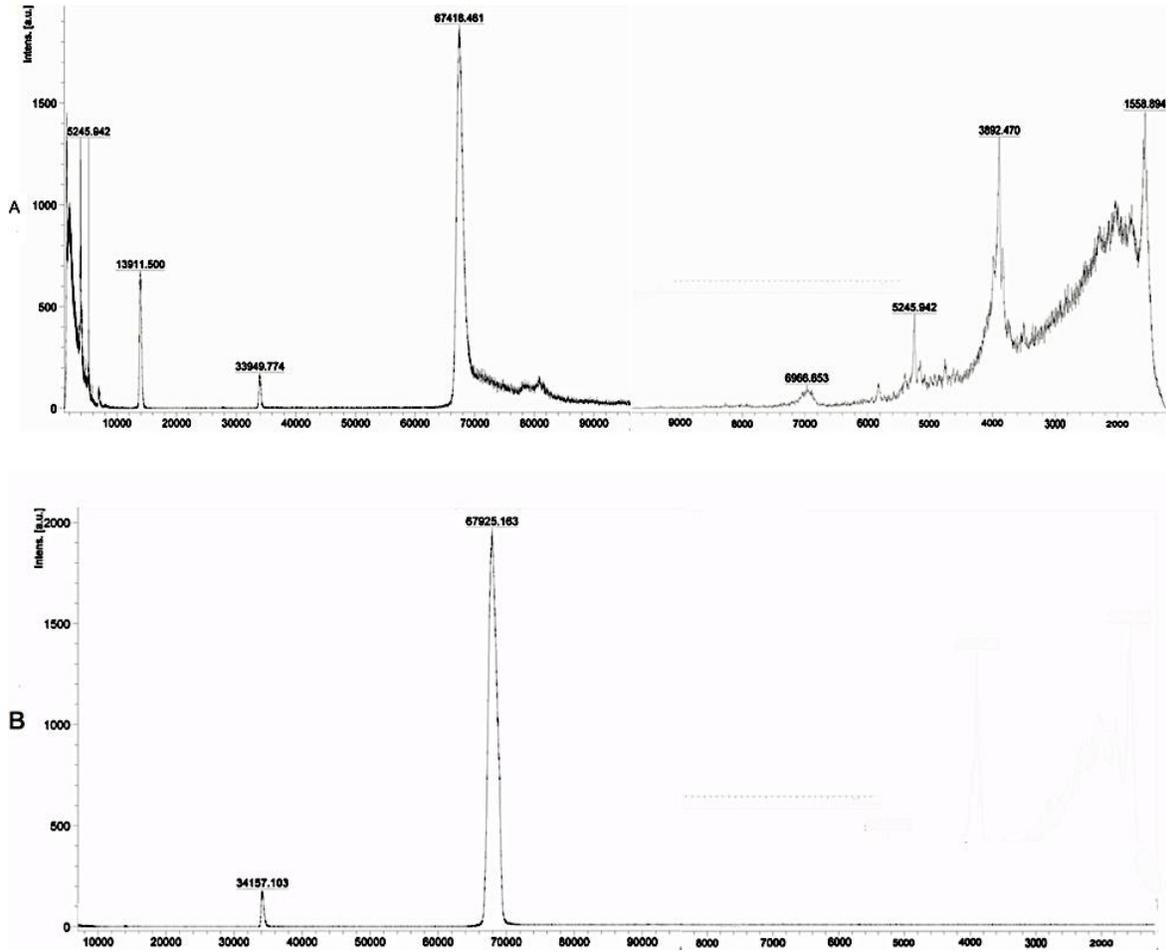


Figura 3.15 Resultado MALDI-TOF; Positivo (A) y BSA (B)

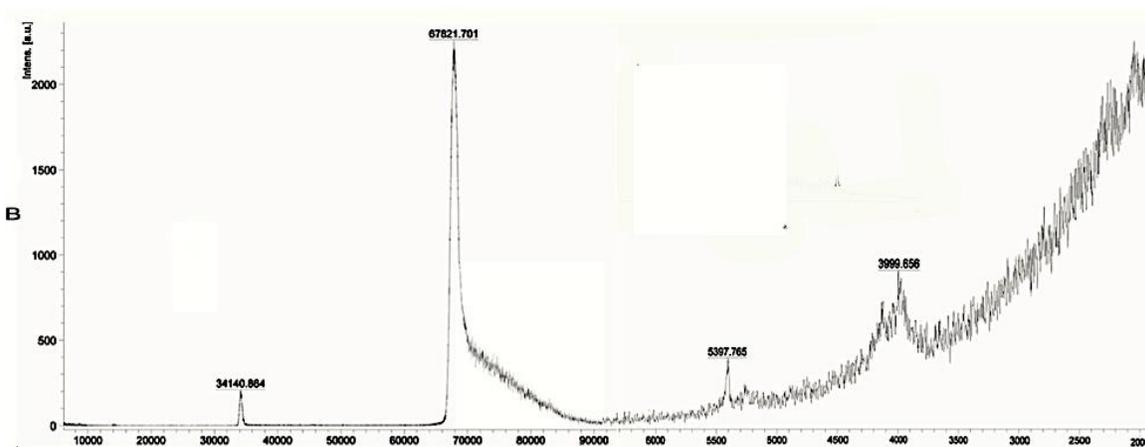
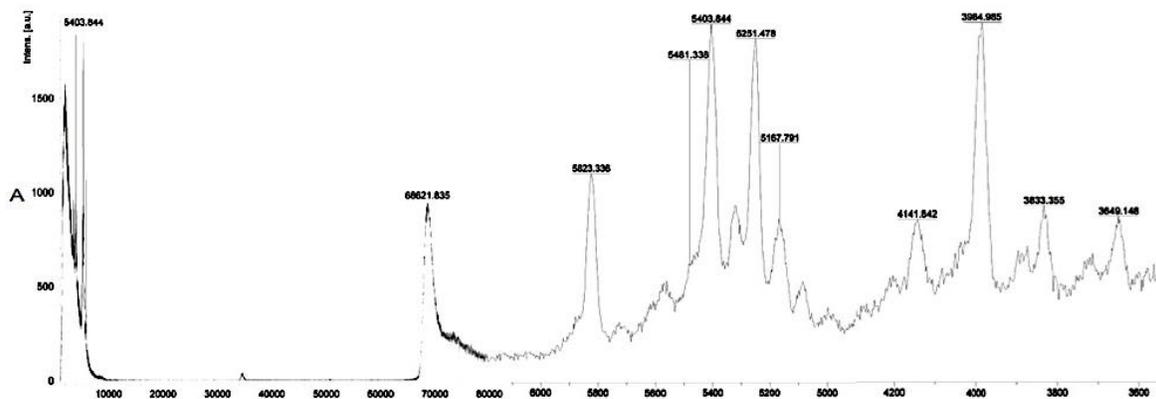


Figura 3.16 Resultado MALDI-TOF; BSA + glucosa (A) y BSA + glucosa + triterpeno (B)

Se observa como la proteína se fragmenta en mayor parte cuando se ve afectada por la glicación y como se fragmenta en menor proporción cuando se encuentra un anti un agente anti-AGE como la aminoguanidina, y el triterpeno Me92111111.

Conclusiones

Se aislaron cinco triterpenos con actividad anti-AGE a partir de las hojas de *Origanum mejorana*, los cuales mostraron de la misma manera actividad como antioxidantes, los cuales fueron denominados de la siguiente manera;

- Me9212281 como: 28-norlup-20 (29) eno-3 β , 17 β -diol (*nourlupeno*).
- Me363241 como: 3 β , 6 β , 7 β -trihidrox-20(29)-lupano (lupeno).
- Me92111111 como: 23carboximetil, 3 β , 15 α , 21 β , 28-tetrahidroxiursa-12-eno (ursano).
- Me863234 como: Lupeol.
- Me 9211111111: Ácido ursólico.

A los cuales se les determino la estructura mediante la interpretación de los espectros de FTIR, espectrometría de masas UHPLC-ESI, RMN-¹H y RMN¹³C.

Se comprobó la protección de la proteína (BSA) con aminoguanidina y con el triterpeno Me92111111, mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF por lo que se puede afirmar que el compuesto Me92111111 puede ser usado para el control de la DM como la Aminoguanidina.

Se comprobaron los efectos anti-AGE y anti oxidante de los compuestos aislados presentando la siguiente actividad en orden:

anti-AGE's: Me92111111 < Me863234 < Me9211111111 < Me863241 < Me9212281 < Me5312222 < Me53153131.

Antioxidante: Me863234 < Me92111111 < Me53153131 < Me9212281 < Me9211111111 < Me5312222 < Me863241.

Los triterpenos aislados a partir de las hojas de *Origanum mejorana* (Me), presentaron actividad antioxidante y anti-AGEs los cuales pueden ser usados para el tratamiento de la DM.

Bibliografía

1. Almaguer, A. y otros, 2012. Actualización sobre diabetes mellitus. *Correo Científico de Medicina*, 16(2).
2. American Diabetes Association, 1995-2015. *American Diabetes Association*. [En línea]
Available at: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/?loc=GlobalNavDB>
[Último acceso: 20 Junio 2014].
3. Amman, W., Richarz, R. & Wirthlin, T., 1982. ¹H and ¹³C chemical shifts and coupling constants of lupane.. *Organic Magnetic Resonance*, Volumen 20, pp. 260-265.
4. Ángeles, M., Juan, R. & Pastor, J., 2005. Morfología y anatomía de núculas de *Origanum L.* (Lamiacea) del suroeste de España. *Anales de biología*, Volumen 27, pp. 23-28.
5. Basurto, F., 1982. *Huertos familiares en dos comunidades nahuas de la sierra Norte de Puebla*. D. F., México: Universidad Autónoma de México.
6. Baynes, J. W., 1991. Role of Oxidative Stress in Development. *Diabetes*, 40(4), pp. 405-412.
7. Beisswenger, P. J. y otros, 1999. Metformin Reduces Systemic Methylglyoxal Levels in Type 2 Diabetes. *Diabetes care*, 48(1), pp. 198-202.
8. Biblioteca Nacional de Medicina de los EE. UU., 2013. *MedlinePlus Información de salud par austed*. [En línea]
Available at: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/nihinstitutes.html>
[Último acceso: 18 Junio 2014].
9. Bruice, P. Y., 2008. *Química orgánica*. s.l.:Pearson Educación.
10. Campuzano-Maya, G. & Latorre-Sierra., G., 2010. La HbA1c en el diagnóstico y en el manejo de la diabetes.. *Medicina y laboratorio*, 16(5-6), pp. 211-241.
11. Cardoso, C., Silva, H., Castro-Gamboa, I. & Bolzani, V. S., 2005. Nex Biflavonoid and Other Flavonoids from the Leaves of *Chimarrhis turbinata*

- and their Antioxidant Activity.. *Journal of Brazilian Chemical Society*, Volumen 16, pp. 1353-1359.
12. Castillo, D. C., Rejón, G. J. M., Rivera, R. C. & Quijano., L., 2008. 21 β -hidroxy- oleanane-type triterpenes from Hippocratea excels.. *phytochemistry*, 69(4), pp. 1057-1064.
 13. Chiarelli, F. y otros, 1999. Advanced glycation end products in children and adolescents with diabetes: Relation to glycemic control and early microvascular complications. *the journal of pediatrics*, 134(4), pp. 486-491.
 14. Conner, D. & Beuchat, L., 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, Volumen 29, pp. 429-434.
 15. Cuestas, G. A., 2001. *Determinación de la actividad hipoglucemiante de pharadendron iomentosum (DC) engelm, sobre un modelo de ratas diabéticas de experimentación.* Nuevo León: Tesis Magisterial de la Universidad Autónoma de Nuevo León..
 16. Daniel, J. P. & Carl, R. J., 2003. *Determinación de estructuras orgánicas.* Primera edición ed. Sevilla, España: Reverté, S. A.,.
 17. Daroux, M. y otros, 2010. Advanced Glycation end products: Implications for diabetics and non-diabetic nephropaties. *Elsevier Masson*, 36(1), pp. 1-10.
 18. David, J. M., Barreiros, A. L. B. S. & David., J. P., 2004. Antioxidante Phenylpropanoid Esters of Triterpens from Dioclea lasiphylla. *Articulo de investigación de la Universidad Federal de Bahía*, 42(1), pp. 36-38.
 19. Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. & Tikkanene, M. J., 2003. Caracterización de las propiedades antioxidantes de los extractos acuosos de Odourised de hierbas Lamiaceae seleccionados.. *Food Chemistry*, Volumen 83, pp. 255-262.
 20. Dyer, J., 1965. *Applications of absorption spectroscopy of organic compounds.* s.l.:Prentice Hall.
 21. El-Keltawi, N., Megalla, S. & Ross, S., 1980. Antimicrobial activity of some egyptian aromatic plants. *Herbal Pol*, 26(4), pp. 245-250.

22. Estelrich, M. A., 2008. *Estudio cinético de las reacciones entre piridoximina y compuestos carbonílicos de interés biológico y biomédico.* Palma de Mallorca, Illes Balears, España: Tesis Doctoral, Universitat de les illes Balears..
23. Federación Mexicana de Diabetes, A. C., 2003-2015. *Federación Mexicana de Diabetes, A. C.* [En línea]
Available at: <http://fmdiabetes.org.mx/category/diabetes-en-numeros/estadisticas-mexico/>
[Último acceso: 20 Junio 2014].
24. Garrigues, M. D. R., 2013. *Autenticación de cepas de la CECT mediante MALDI-TOF MS Y GC FAME.* València, España.: s.n.
25. Garvey, W. T. y otros, 1985. The Effect of Insulin Treatment on Insulin Secretion and Insulin Action in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*, Volumen 34, pp. 222-234.
26. Gugliucci., D. A., 2000. Glicación de proteínas: Rol protagónico de la Hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.. *Revista Medica de Uruguay*, 16(1), pp. 61-70.
27. Gul, A., Rhaman, M. A., Salim, A. & Simjee, S., 2009. Advanced glycation end products in senile diabetic and nondiabetic patients with cataract.. *Jurnal of Diabetes and Its Complicatons.*, 23(5), pp. 343-348.
28. Gupta, R. y otros, 2012. Evaluation of antidiabetic and antioxidant potential of lupeol in experimental hyperglycemia. *Natural Products Research*, Volumen 26, pp. 1125-1129.
29. Haffner, S. M. y otros, 1990. Incidence of Type 2 Diabetes in Mexican American Predicted by Fasting Insulin and Glucose Levels, Obesity, and Body-Fat Distribution.. *Diabetes*, 39(1), pp. 283-288.
30. Harris, D., 2001. *Análisis químico cuantitativo.* s.l.:Reverté.
31. Hermann, E. & Kucera, L. S., 1967. Antiviral substances in plants of the mint family (labiatae). *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine*, 124(3), pp. 874-878.

32. Hodge., J. E., 1953. Dehydrated foods: chemistry of browning reactions in model systems.. *J. Agric. Food Chem.*, p. 928.
33. Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS, 2012. *Guía de práctica clínica GPC, Diagnóstico y Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2.* México, D.F.: IMSS.
34. Jakus, V. & Rietbrock., N., 2004. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiological Research*, Volumen 53, pp. 131-142.
35. Jiang, Z., Tanaka, T. & I., K., 1995. A Lupane triterpene and two diterpene caffeates from *Rhoiptelea chiliantha*.. *Phytochemistry*, 40(4), pp. 1223-1226.
36. Kaneto, H. y otros, 1999. Beneficial Effects of Antioxidants in Diabetes Possible Protection of Pancreatic β -Cells Against Glucose Toxicity.. *Diabetes*, Volumen 48, pp. 2398-2406.
37. Kasper, M. & Funk, R. H. W., 2001. Age-related changes in cells and tissues due to advanced glycation end products (AGEs).. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 32(3), pp. 233-243.
38. Kuhn, R. & Weygand., F., 1937. The Amadori Rearrangement. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, p. 769.
39. L.G., W. J., 2001. *Química Orgánica*. México: Pearson.
40. Laakso, M., 1999. Hyperglycemia and Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 48(5), pp. 937-942.
41. Lee., C.-K., 1998. A new norlupene from the Leaves of *Melaleuca leucadendron*.. *Journal of Natural Products*, 16(3), pp. 375-376.
42. Ling, A. R. & Malting., J. J., 1908. *Journal of The Institute of Brewing*. Issue 14, p. 494.
43. Lo, T. W. C. y otros, 1994. Binding and Modification of Proteins by Methylglyoxal under Physiological Conditions.. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(51), pp. 32299-32305.
44. Lugardo, S., 2010. *Efecto de Bixa orellana, 16 especies y 21 chiles, utilizados en la comida tradicional mexicana, sobre la glucosilación no*

- enzimática de proteínas in vitro.*. Distrito Federal, México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
45. Lukovnikova, G., 1965. Some biologically active compounds of vegetables. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, Volumen 1, pp. 594-591.
 46. Maillard., L. C., 1912. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines per voie methodique. *C. R. Acad. Sci. Ser.*, pp. 66-154.
 47. Miranda, H. V. & Outeiro, T. F., 2010. The sour side of neurodegenerative disorders: the effects of protein glycation.. *The Journal of Pathology*, 221(1), pp. 13-25.
 48. Monner, V. M., Sell, D. R. & Genut., S., 2005. Glycation Products as Markers and Predictors of te Progression of Diabetic Complications. *Annals of te New York Academy of sciences.*, 1043(1), pp. 567-581.
 49. Morrison, R. T. & Boyd, R. N., 1976. *Química Orgánica*. México: Fondo Educativo Internacional..
 50. Mossa, J. S. y otros, 1984. Studies on Cns stimulant herbs of Saudi Arabia. *International Journal of Pharmaceutical sciences*, Volumen 44, pp. FIP84-Abstracts.
 51. Muñoz, O., Montes, M. & Wilkomirsky, T., 2001. *Plantas Medicinales de Uso en Chile. Química y Farmacología.*. Santiago, Chile.: Editorial Universitaria..
 52. N.Ahmed & Thornally., P. J., 2007. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications?.. *Duabetes, Obesity and Metabolism*, 9(3), pp. 233-245.
 53. Palace, H. & Vlassara, M. R., 2002. Diabetes and advanced glycation end products.. *Journal of Internal Medicine*, 251(2), pp. 87-101.
 54. Palop, J. A., 2006. *Tutorial para la interpretación de espectros de resonancia magnética nuclear de protón*. Pamplona, España.: Universidad de Navarra.
 55. Rácz, G., Bodon, J. & Tölglyesi, G., 1978. Determination of the mineral content of 41 medicinal plant species by chematonomical and biochemical observations.. *Herba Hung*, Volumen 17, pp. 43-54.

56. Rahbar, S., 1968. An abnormal haemoglobin in red cells of diabetics.. *Clin. Chim. Acta*, Volumen 22, p. 296.
57. Ramasamy, R., Yan, S. F. & Schmidt, A. M., 2011. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications.. *Annals of the New York academy of sciences.*, 1243(1), pp. 88-102.
58. Ramírez, C., Sánchez, M. & Del rio, P., s.f. *Compendio de espectros de Masas, Infrarrojo y RMN.* s.l.:Universidad Nacional Autónoma de México.
59. Ramiro Fonnegra, G. & Silvia Luz Jiménez, R., 2007. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Segunda edición ed. Colombia: Universidad de Antioquia.
60. Reynolds, W. y otros, 1986. Total assignment of ¹³C and ¹H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of ¹H chemical shifts in structural investigations of complex natural products.. *Tetrahedron*, Volumen 42, pp. 3419-3428.
61. Rufino, M. S. M., Fernandes, F. A. N., Alves, R. E. & Brito., E. S. d., 2009. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. *Food Chemistry*, Volumen 114, pp. 693-695.
62. Singh, R., Kaur, N., Kishore, L. & Gupta., G. K., 2013. Management of Diabetic Complications: A chemical constituents Based approach.. *Journal of Ethno-pharmacology*, 150(1), pp. 51-70.
63. Tan, K. C. B., Shiu, S. W. M., Wong, Y. & Tam., X., 2011. Serum advanced glycation end products (AGEs) are associated with insulin resistance. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, 27(5), pp. 488-492.
64. Tapia, A. y otros, 2004. Free radical scavengers and antioxidants from baccharis grisebachii.. *Journal of Ethno-pharmacology*, Volumen 95, pp. 155-161.
65. Taskinen, J., 1975. Composition of the essential oil of sweet marjoram obtained by distillation with steam and by extraction and distillation with alcohol water mixture. *Acta chemica scandinavica*, Volumen 28, pp. 637-638.

66. Universidad Autonoma de México, 2009. *Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana*.. [En línea]
Available at:
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=mejorana&id=7708>
[Último acceso: 16 Agosto 2014].
67. Vagi, E. y otros, 2005. Pheonolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with diferente solvents.. *Agricultural Food Chemistry*, Volumen 53, pp. 17-21.
68. Yin, M.-C., 2012. Anti-glycative potential of triterpenes: A mini-review.. *Bio Medicine*, 2(1), pp. 2-19.
69. Zhang, Z. y otros, 1999. New Saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*., 47(11), pp. 1515-1520.

ANEXOS

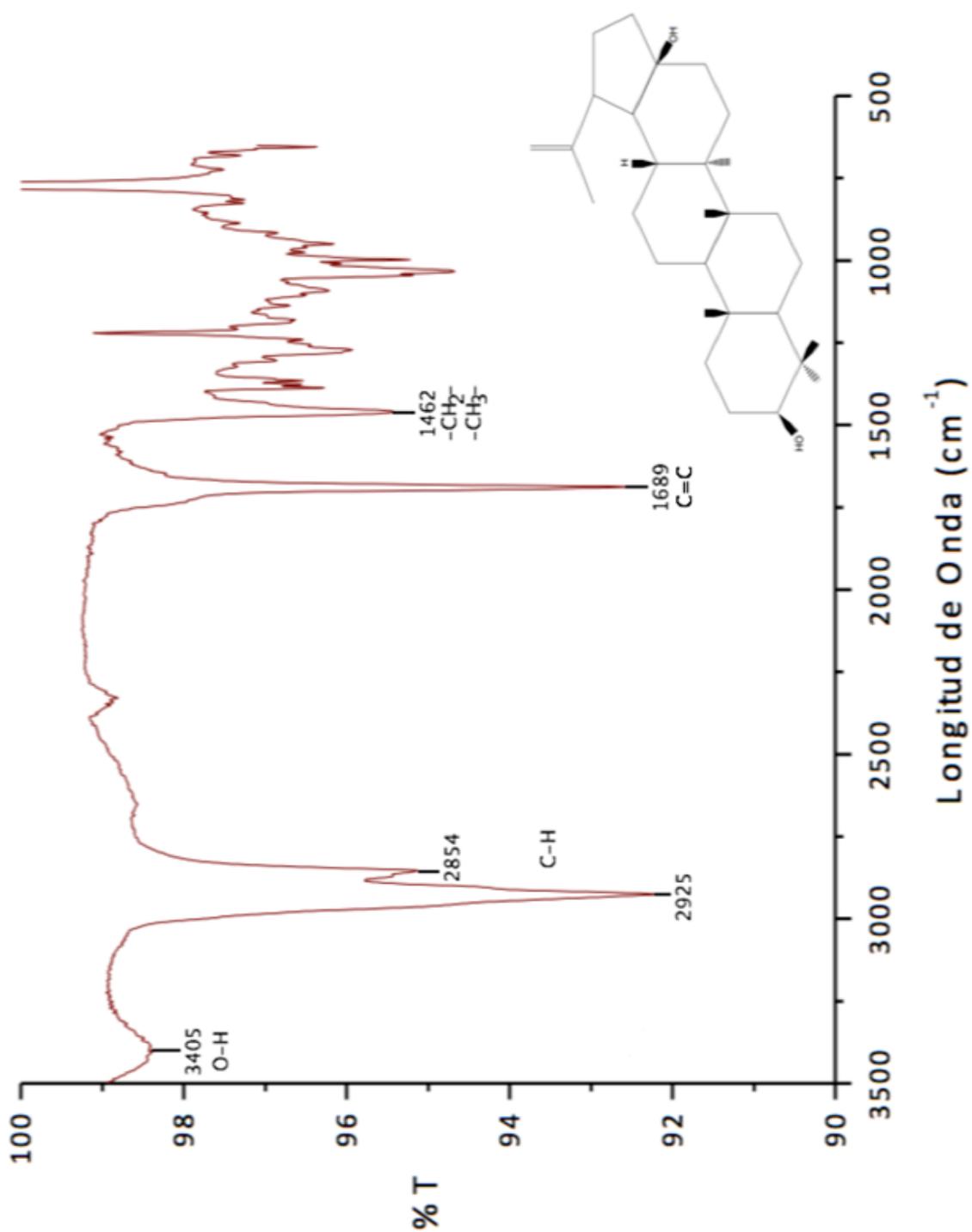


Figura A.1 Espectro Ir de la fracción Me9212281 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de *Origanum majoran* denominado como: 28-nurlup-20 (29) eno-3 β , 17 β -diol (nourlupeno). ATR-cristal de seleniuro de zinc.

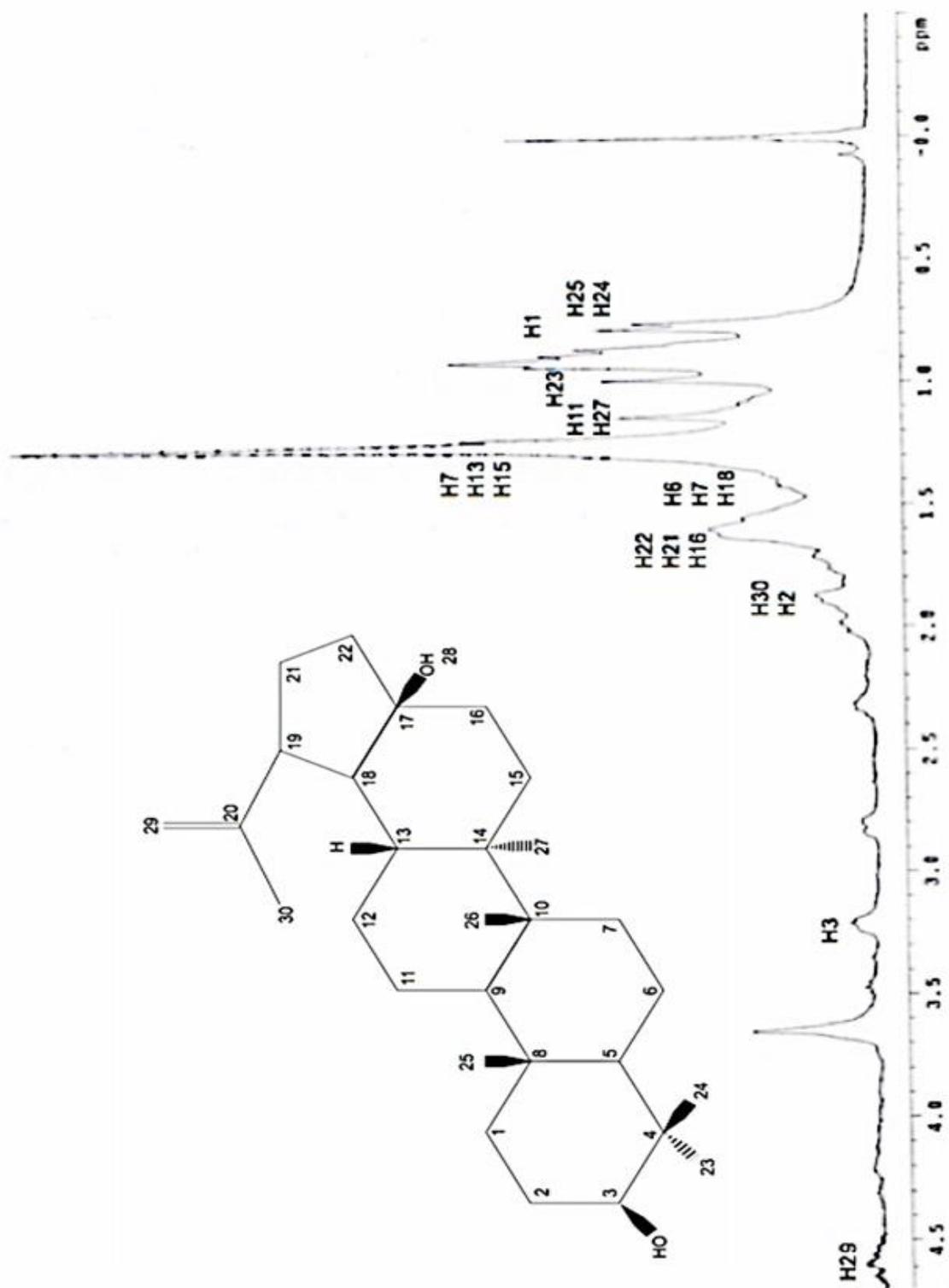


Figura A.2 Espectro ^1H RMN de la fracción Me9212281 con actividad antiAGEs de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como:28-nurlup-20 (29) eno-3 β , 17 β -diol (nourlupeno).
Disolvente: CDCl_3

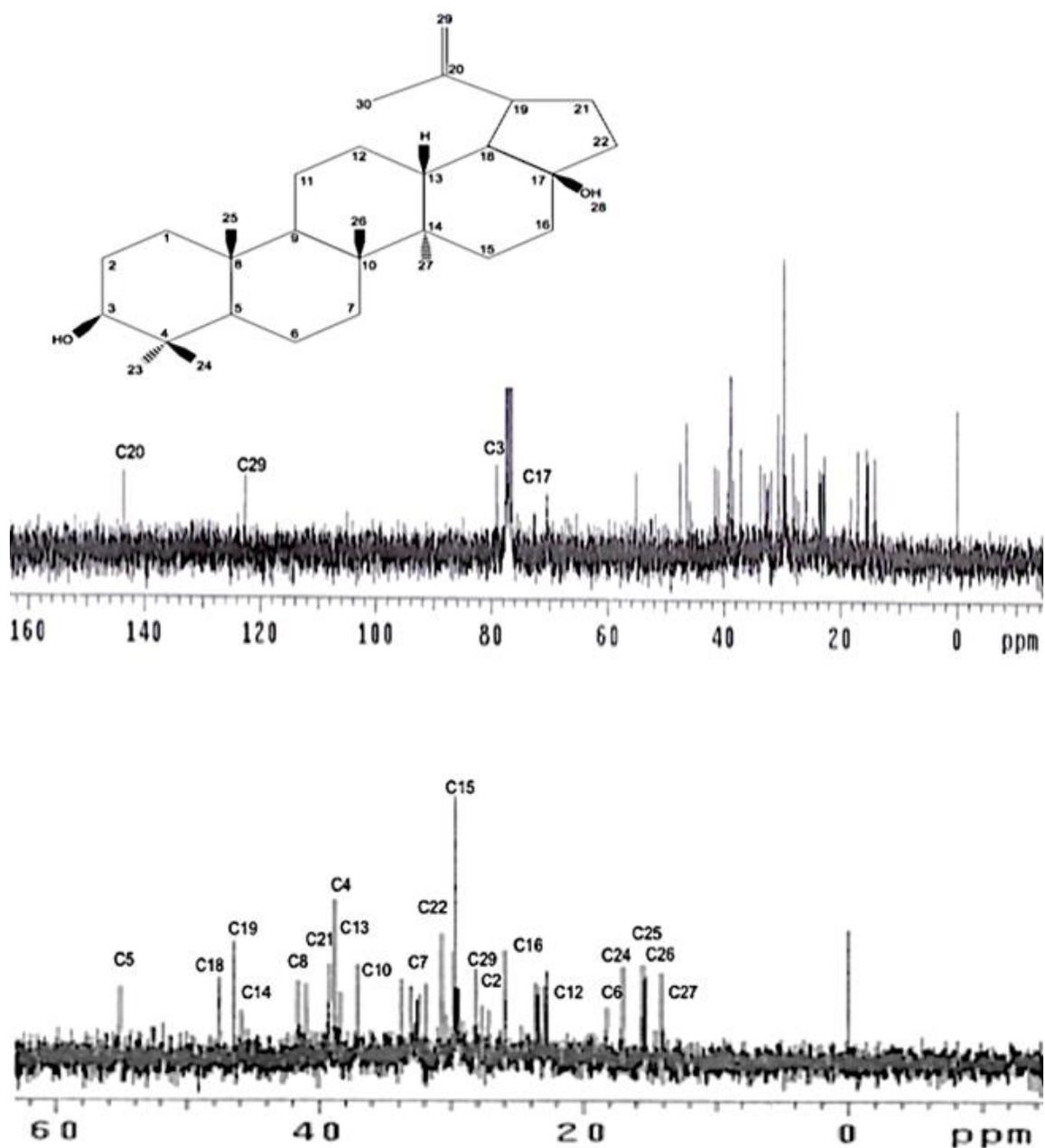


Figura A.3 Espectro ¹³C RMN de la fracción Me9212281 con actividad antiAGEs de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: 28-norlup-20 (29) eno-3β, 17β-diol (nourlupeno). Disolvente CdCl₃.

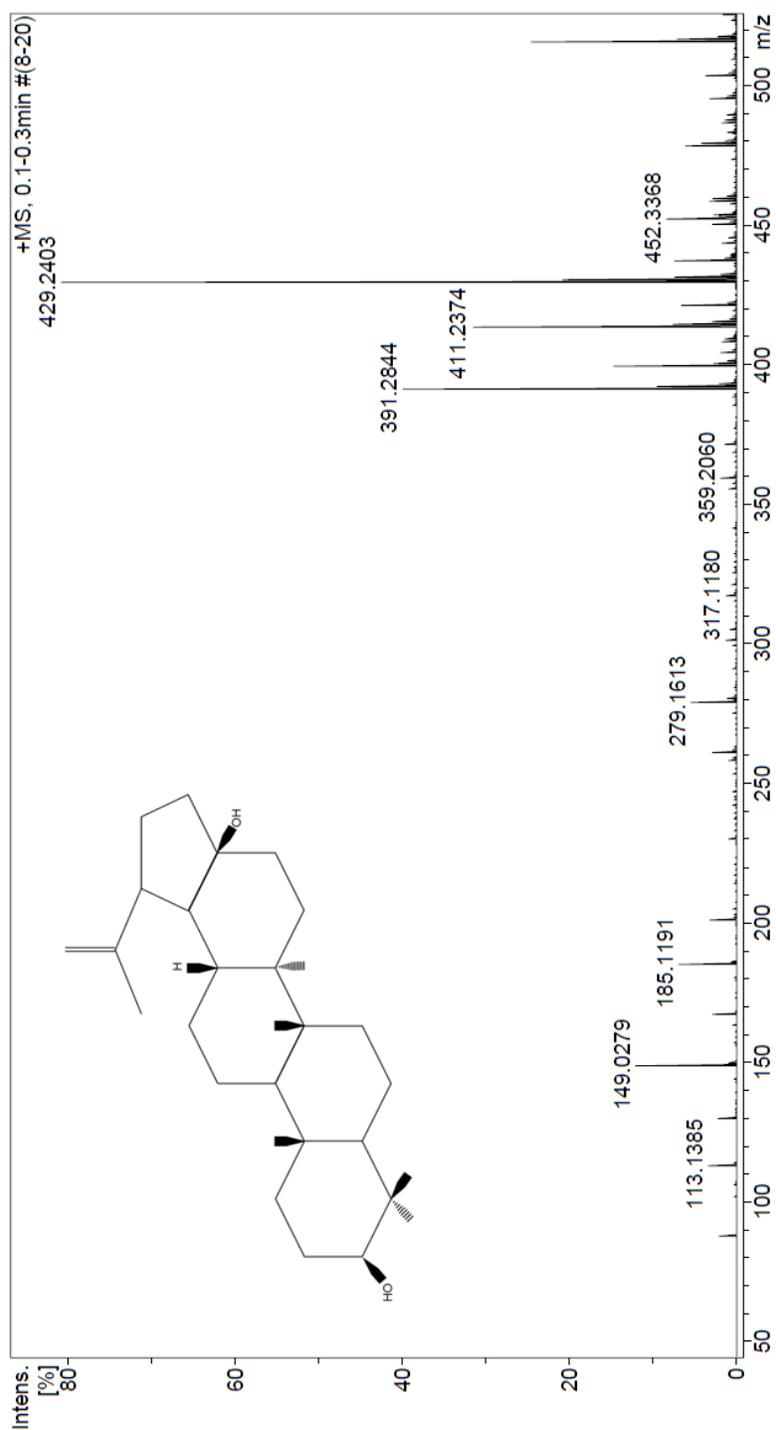


Figura A.4 Espectro de masas de la fracción Me9212281 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: 28-norlup-20 (29) eno-3 β , 17 β -diol (nourlupeno).

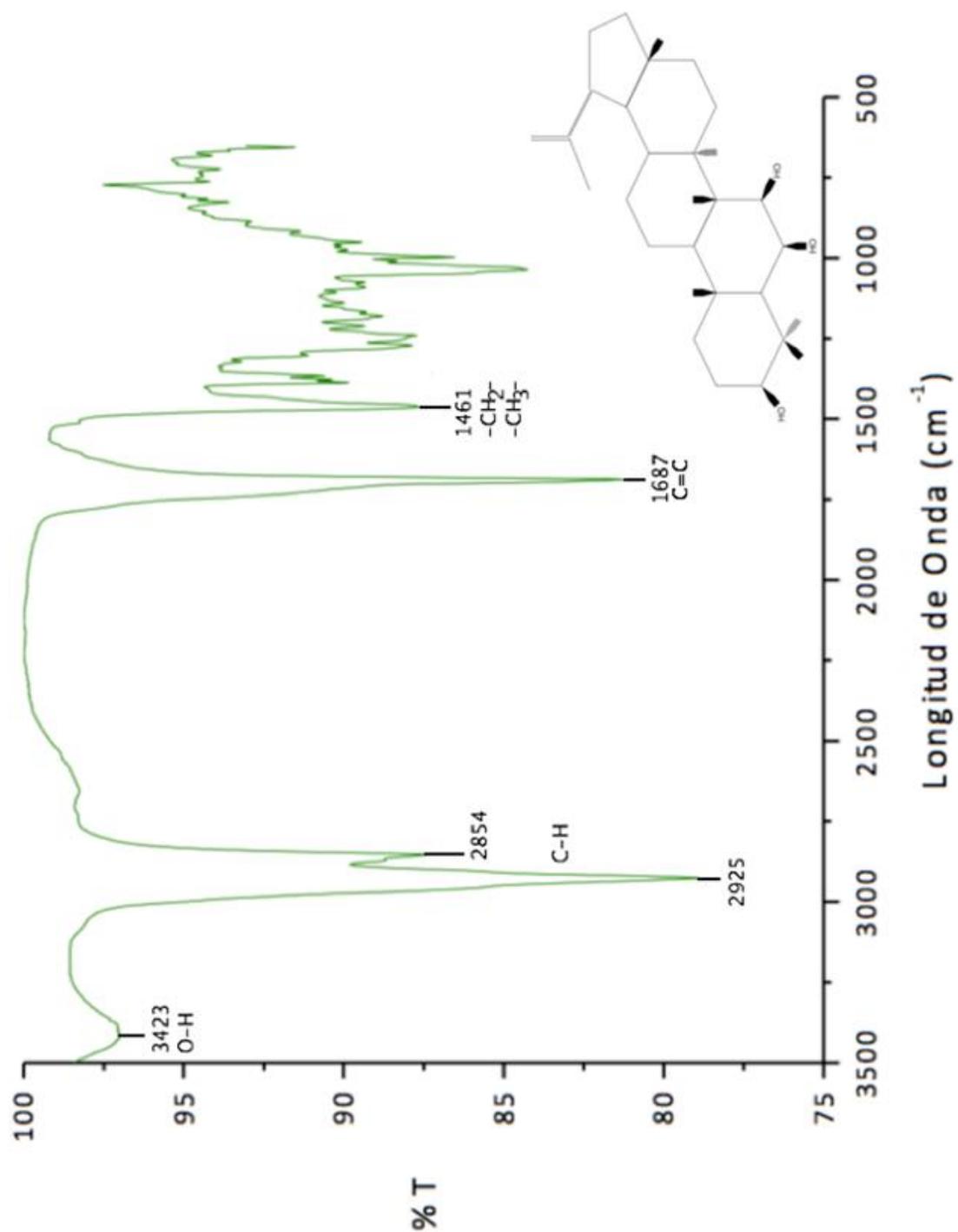


Figura A.5 espectro IR de la fracción Me863241 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: 3β, 6β, 7β-trihidroxi-20(29)-lupano. ATR-cristal de seleniuro de zinc.

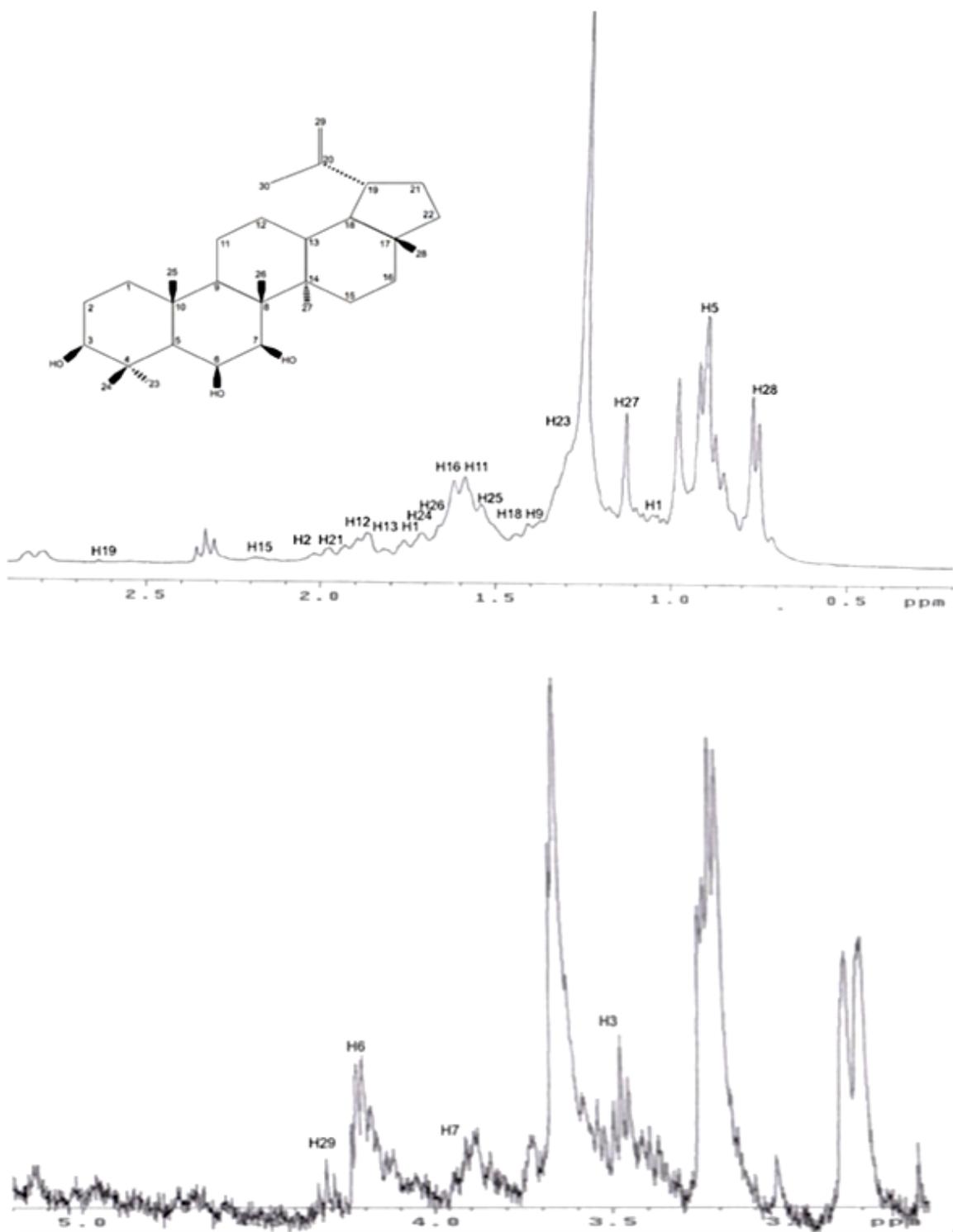
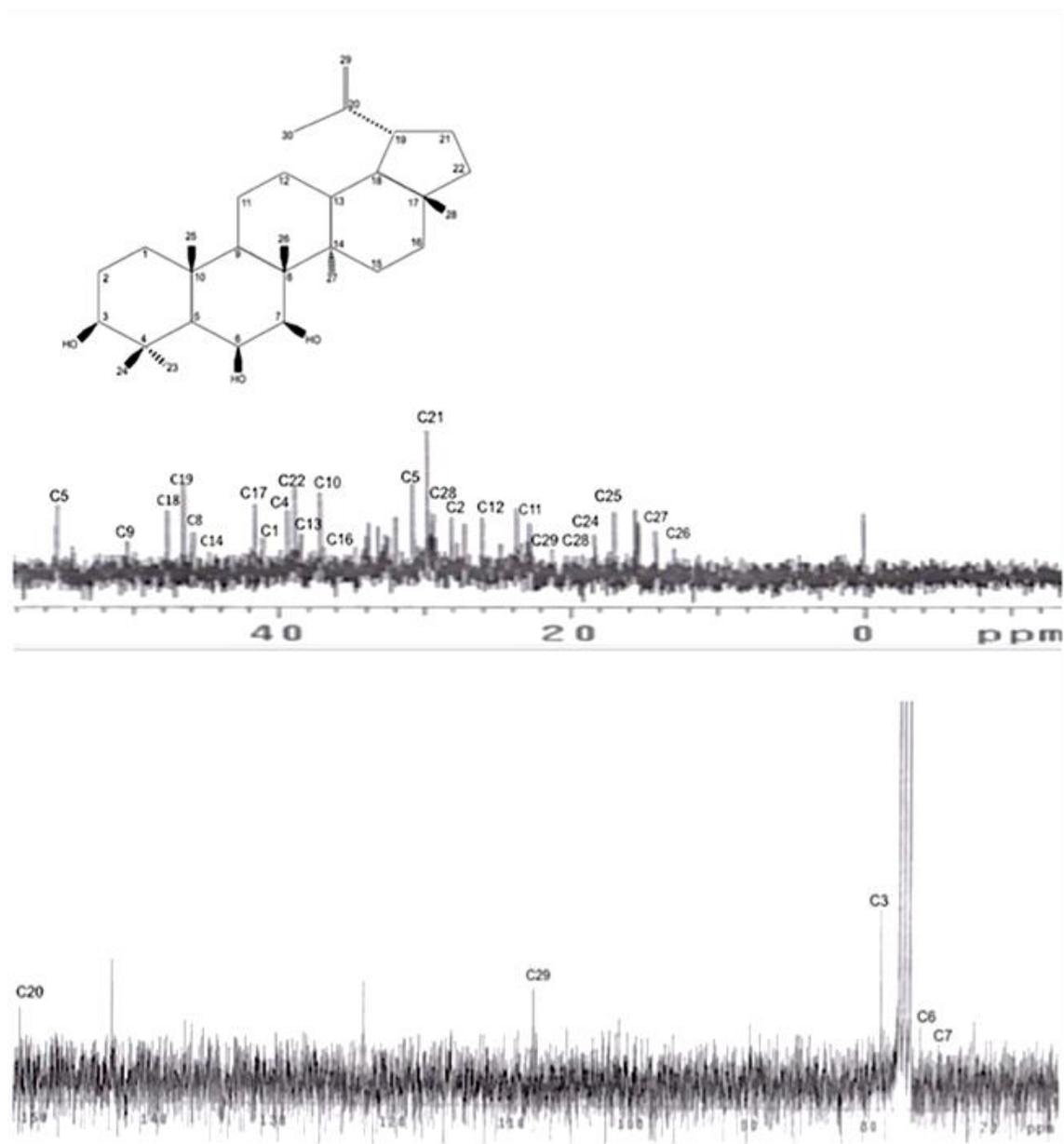


Figura A.6 Espectro ¹H RMN de la fracción Me863241 con actividad antiAGEs de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: 3β, 6β, 7β-trihidroxi-20(29)-lupano. Disolvente: CdCl₃



Figuraa A.7 Espectro ¹³C RMN de la fracción Me863241 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: 3β, 6β, 7β-trihidroxi-20(29)-lupano.
Disolvente: CdCl₃

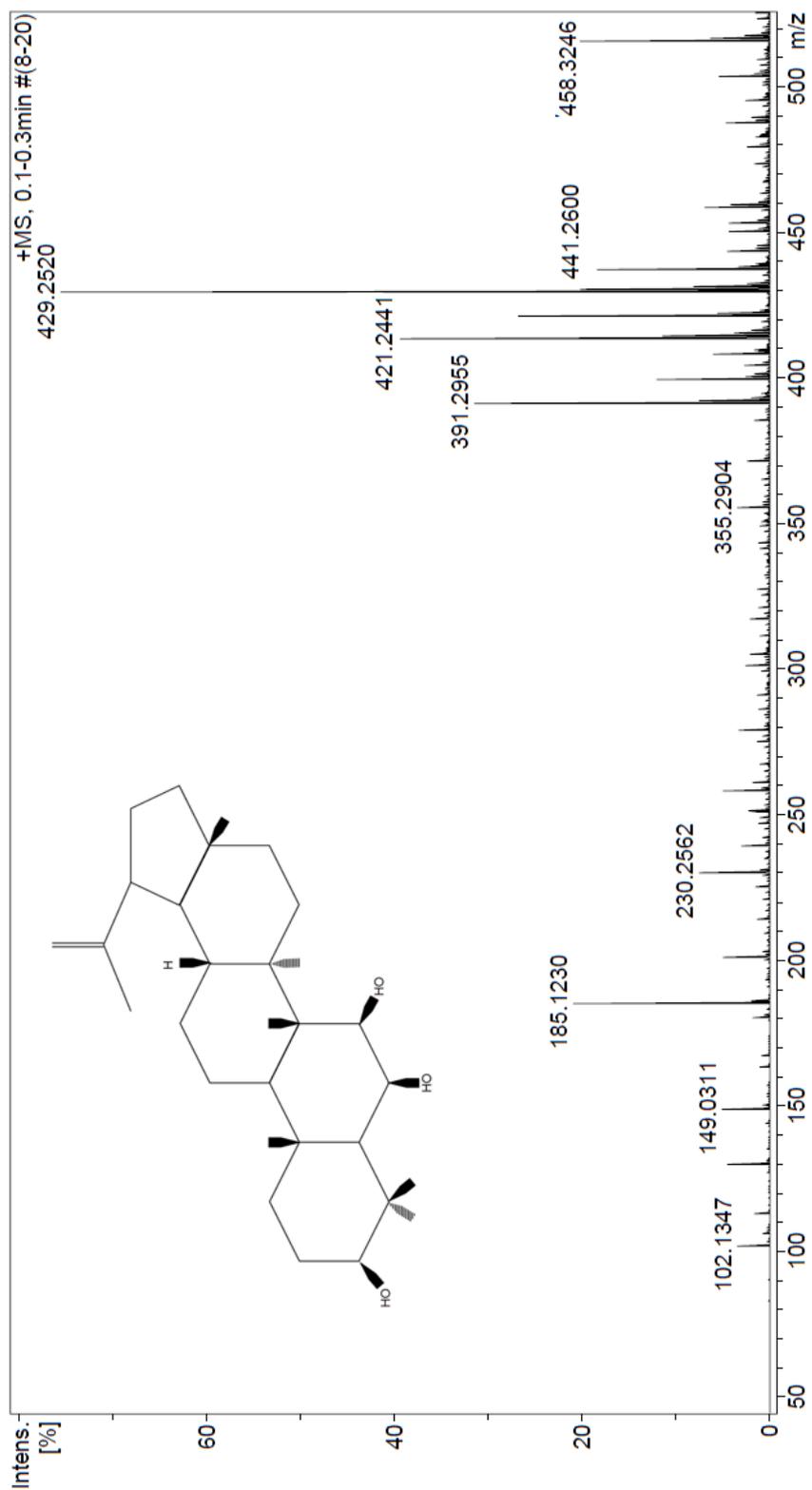


Figura A. 8 Espectro de masas de la fracción Me863241 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: 3β, 6β, 7β-trihidroxi-20(29)-lupano.

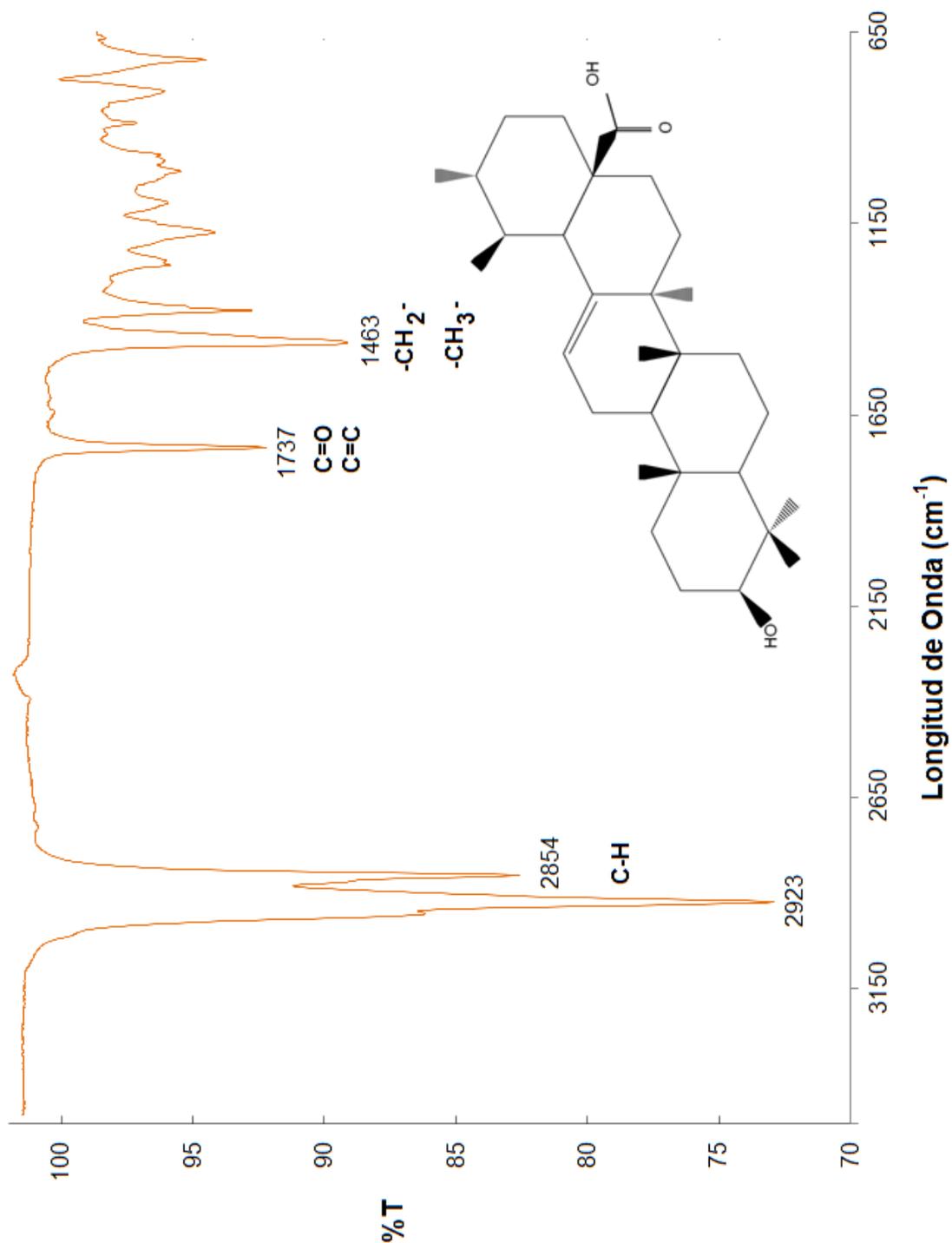


Figura A.9 Espectro Ir de la fracción ME9211111111 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: ácido ursólico ATR-cristal de seleniuro de zinc.

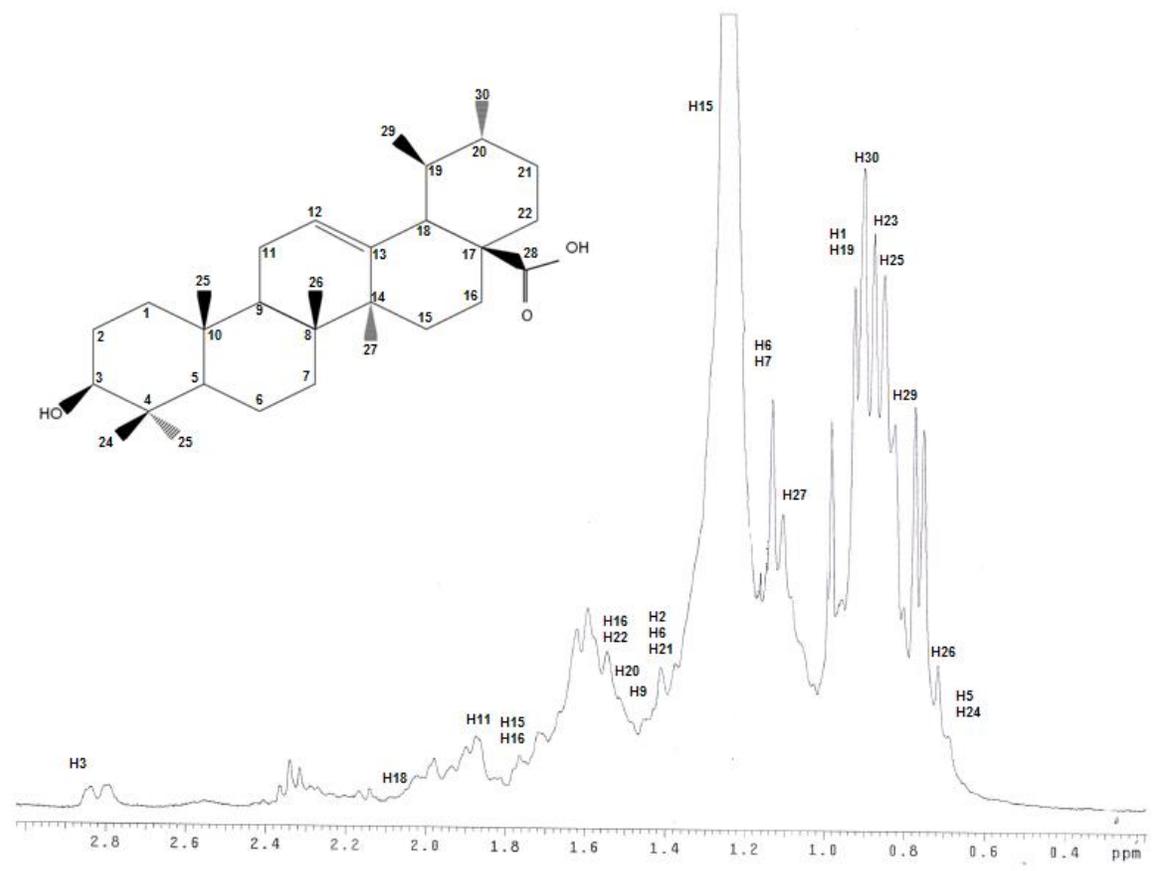
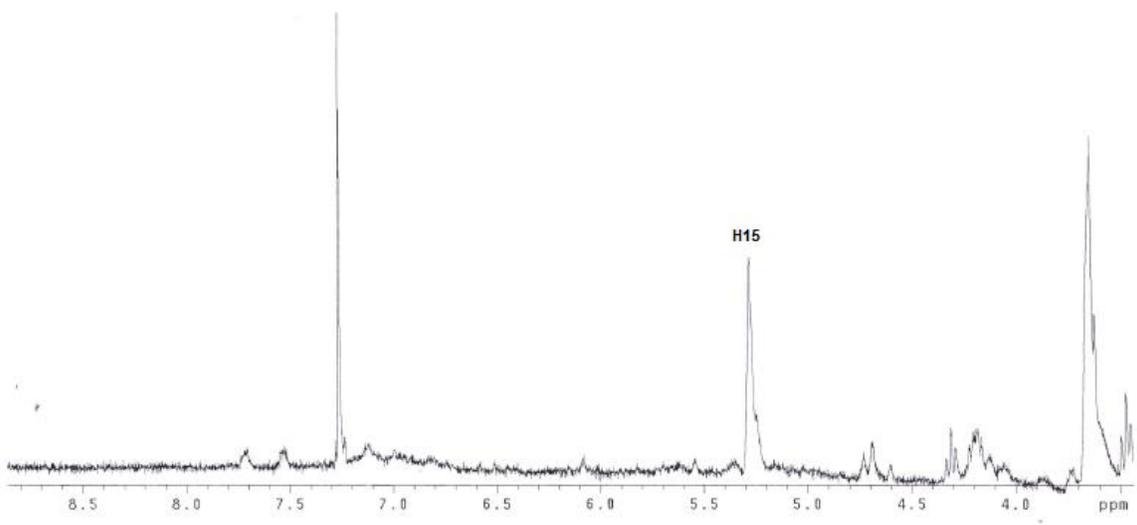


Figura A. 10 Espectro ^1H RMN de la fracción Me921111111 con actividad antiAGES de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: ácido ursólico.
Disolvente: CDCl_3

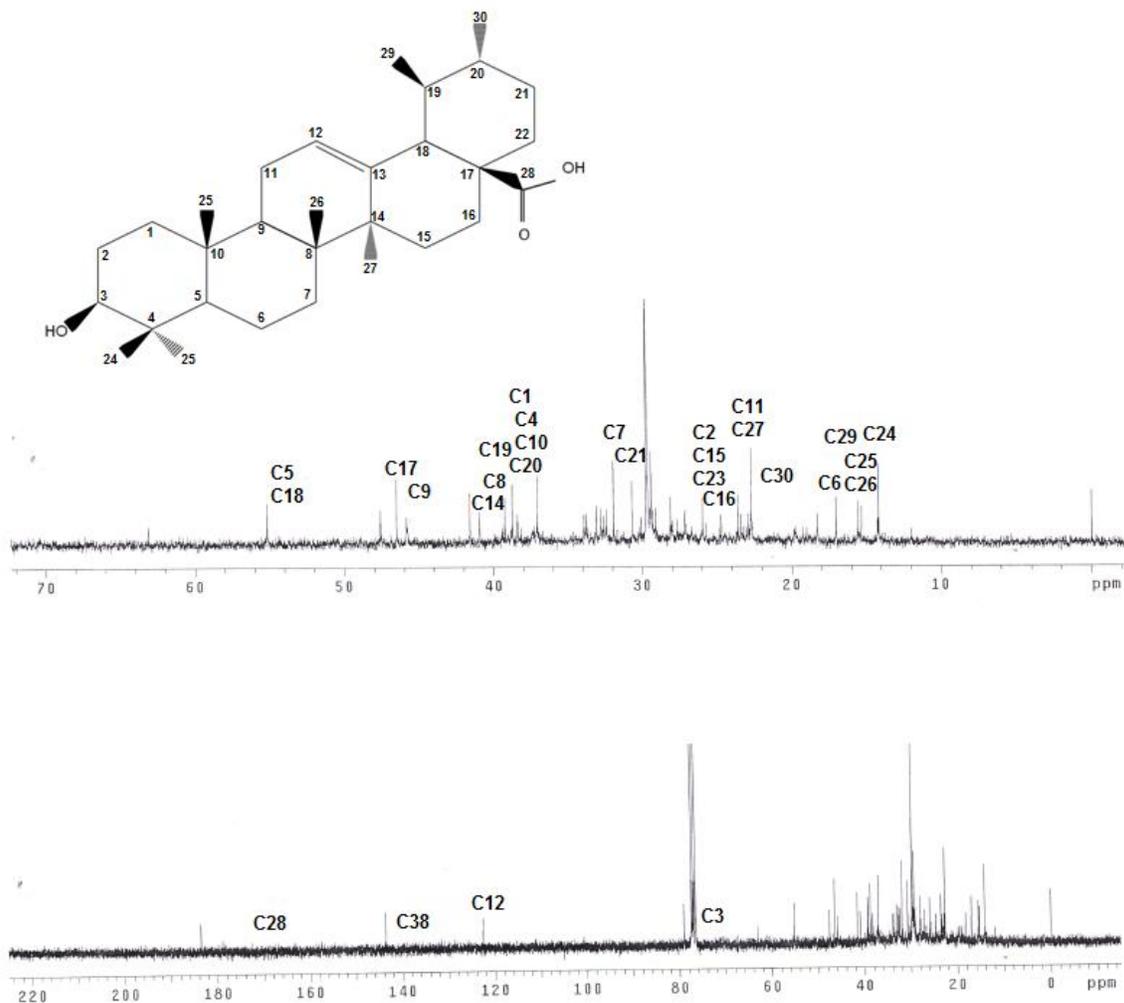


Figura A. 11 Espectro ^{13}C RMN de la fracción Me9211111111 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: ácido ursólico.
Disolvente: CDCl_3

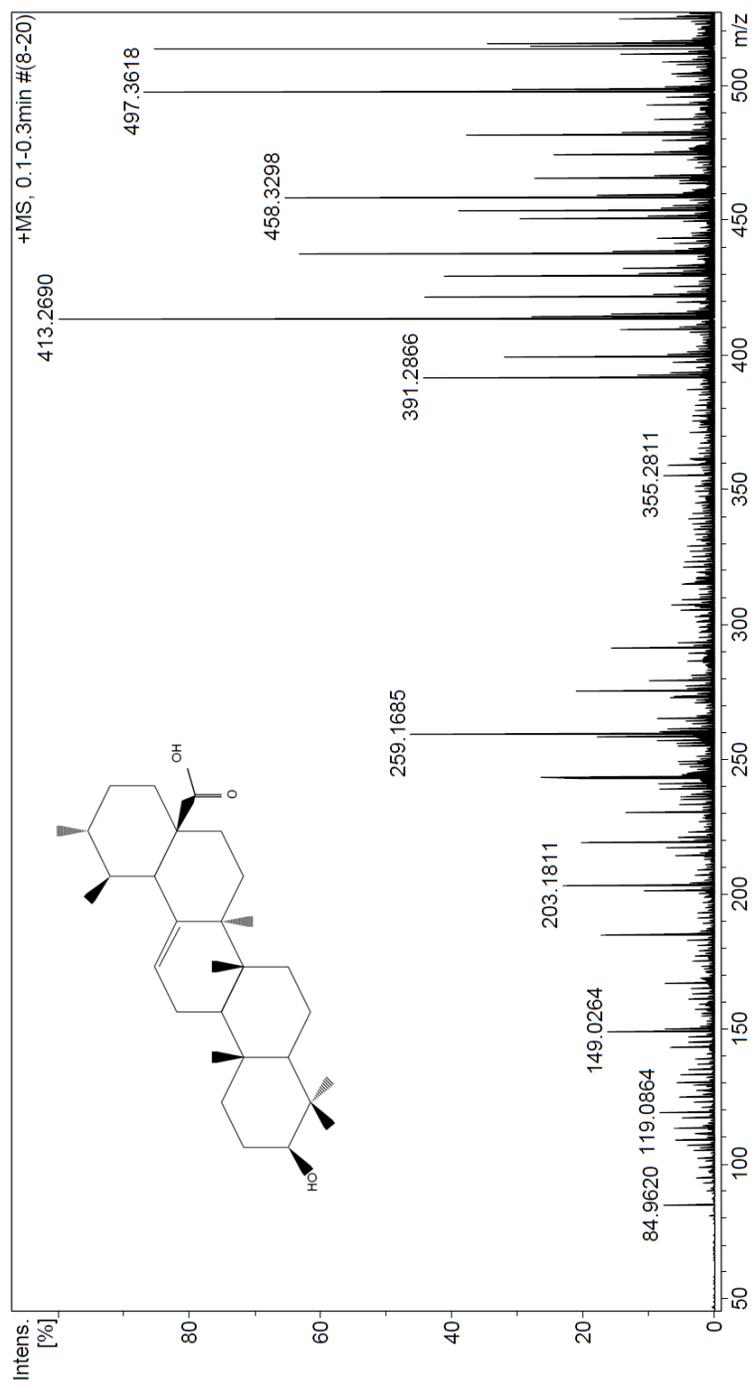


Figura A.12 Espectro de masas de la fracción Me921111111 con actividad anti AGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: ácido ursólico.

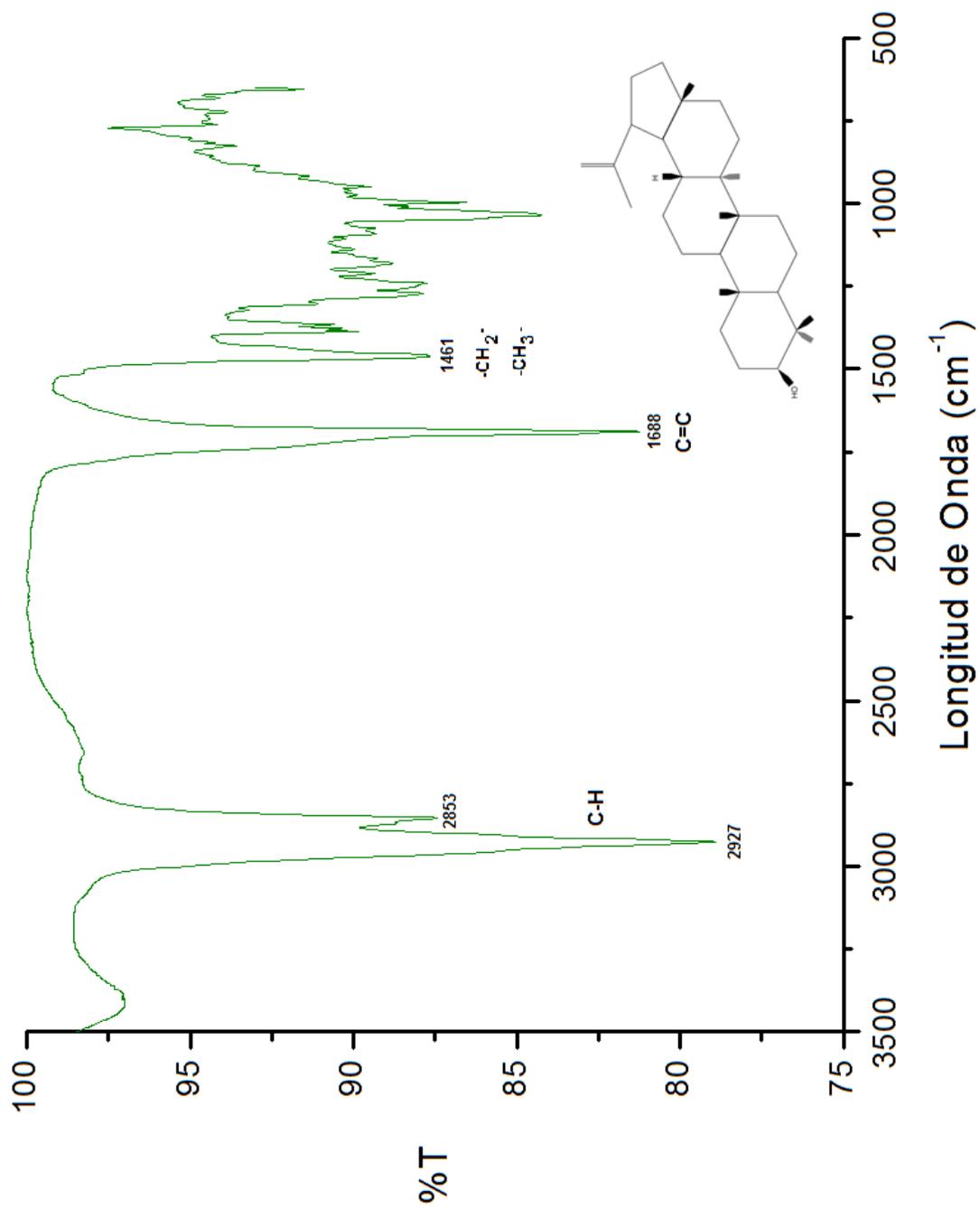


Figura A. 13 Espectro IR de la fracción Me863234 con actividad anti AGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: lupeol ATR-crista de seleniuro de zinc.

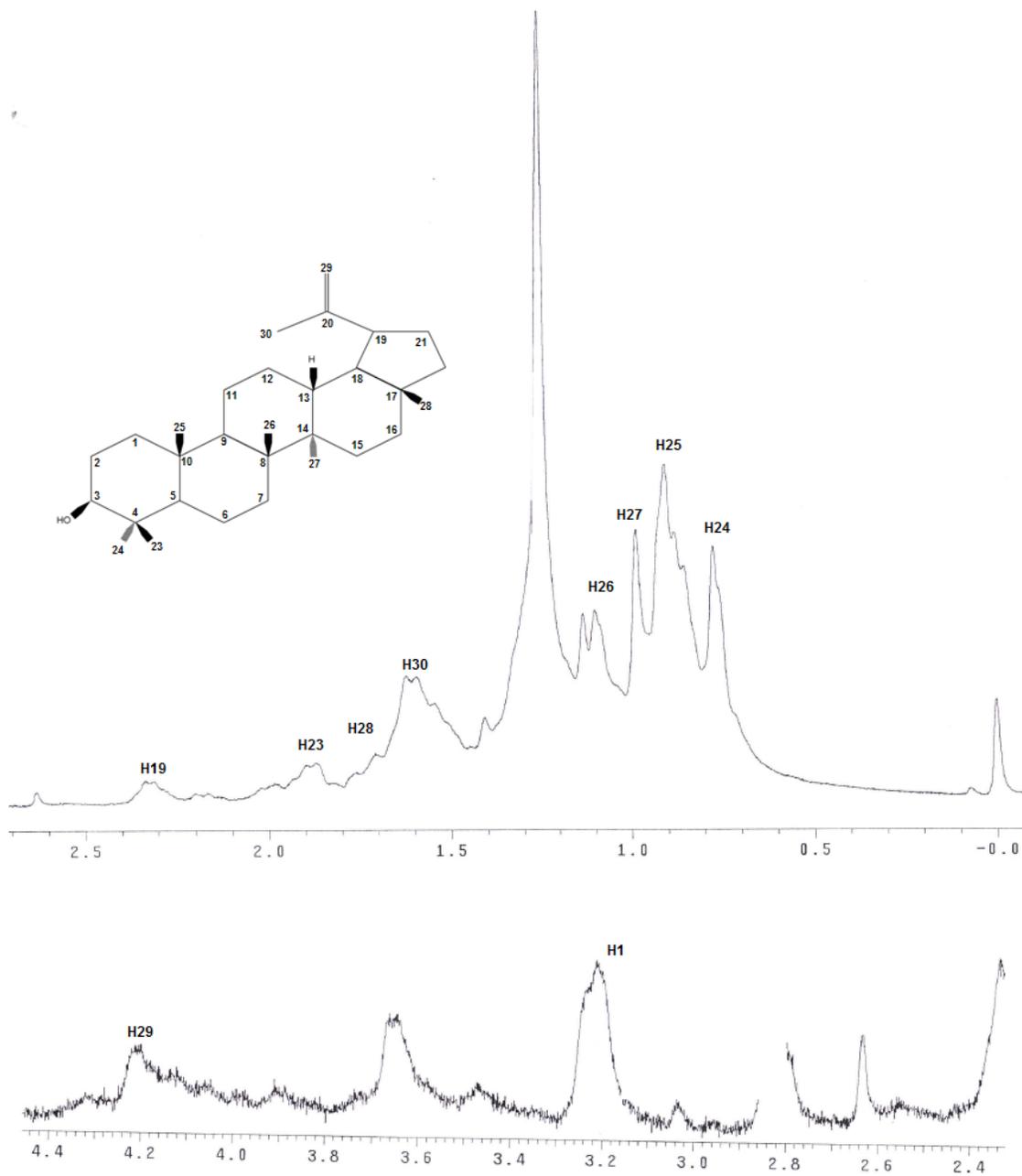


Figura A. 14 Espectro ¹H RMN de la fracción Me863234 con actividad antiAGEs de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: lupeol
Disolvente: CdCl₃

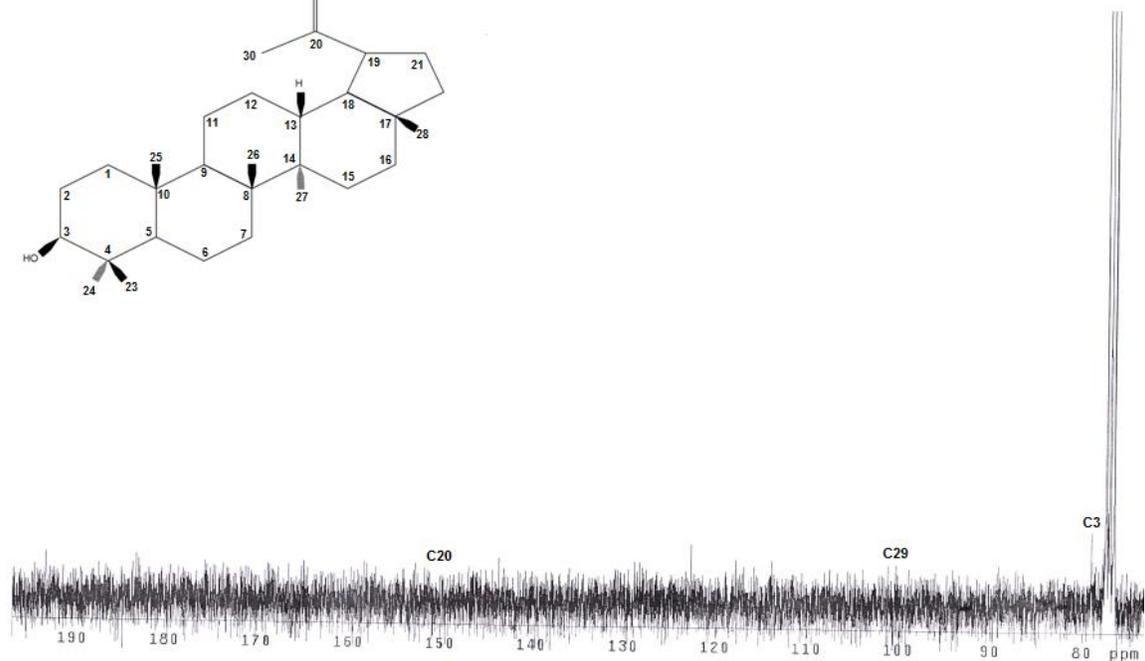
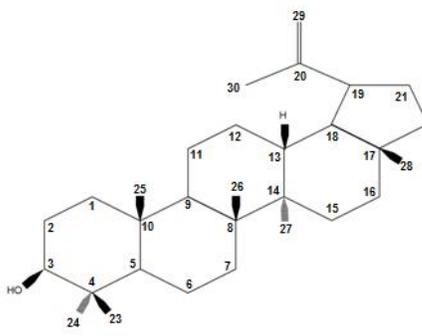
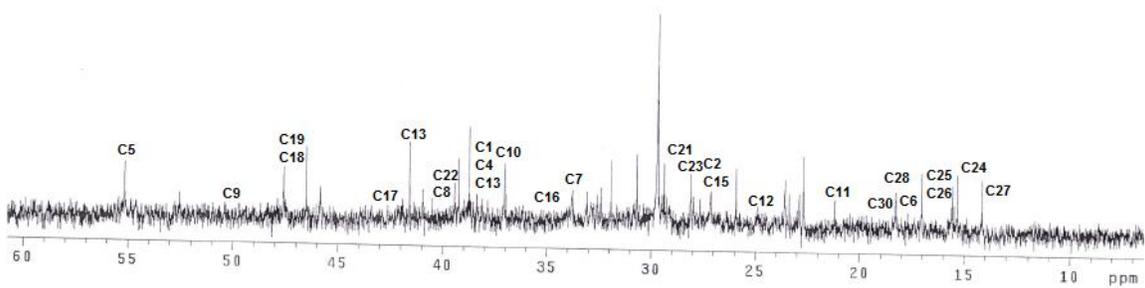


Figura A. 15 Espectro ^{13}C RMN de la fracción Me863234 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: lupeol.
Disolvente: CdCl_2

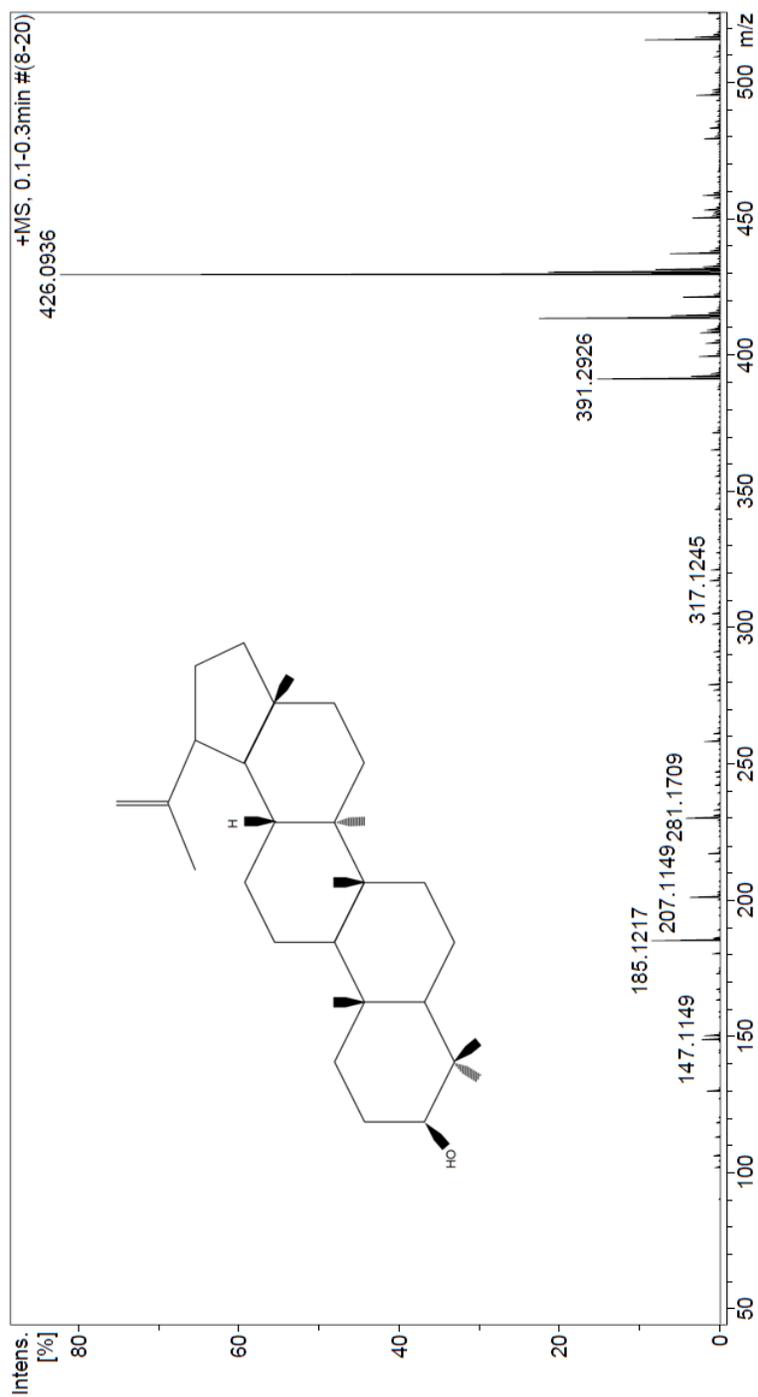


Figura A. 16 Espectro de masas de la fracción Me863234 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: lupeol

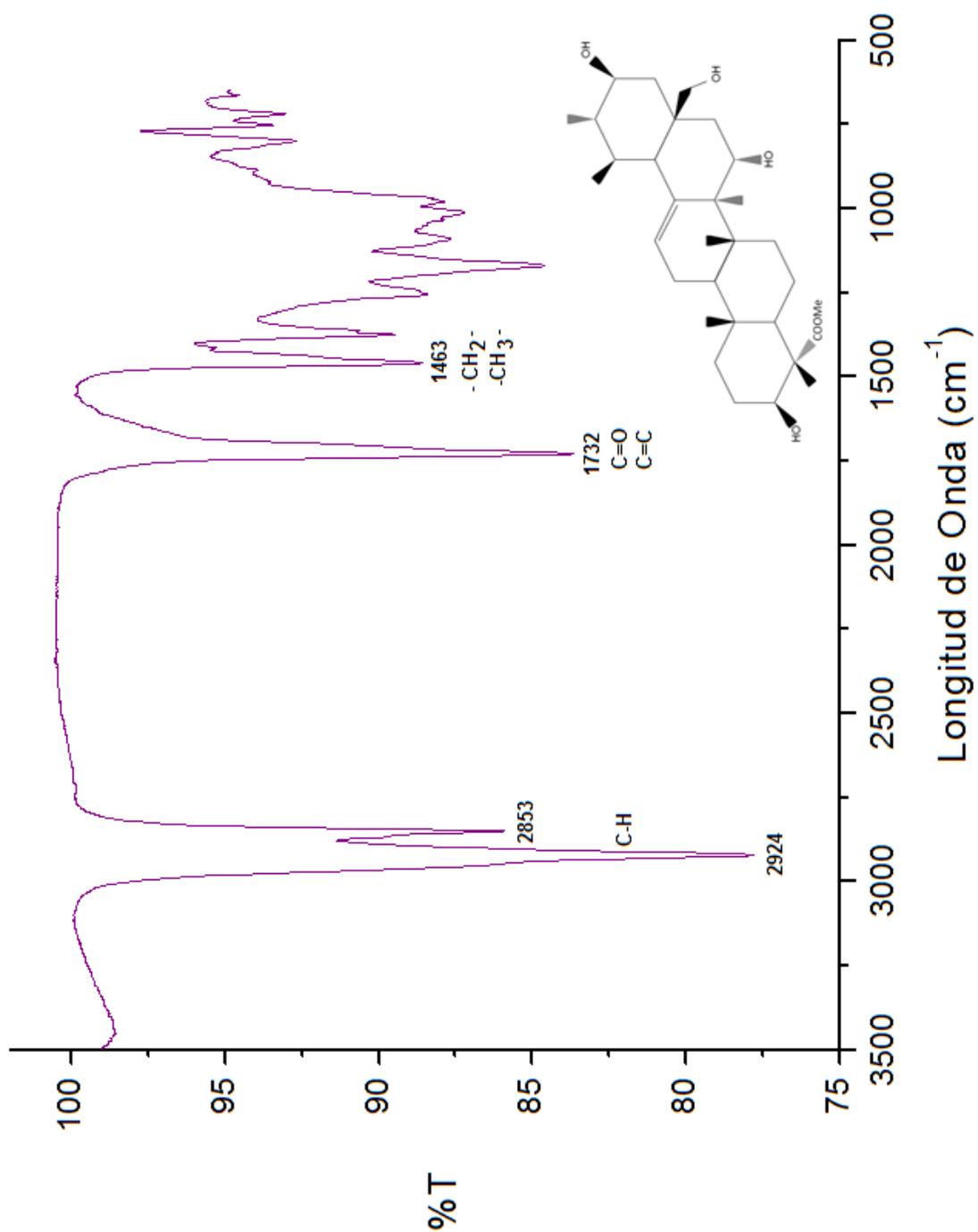


Figura A. 17 Espectro de masas de la fracción Me92111111 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: 23acetil, 3β, 15α, 21β, 28-tetrahydroxiursa-12-eno. ATR-cristal de seleniuro de zinc.

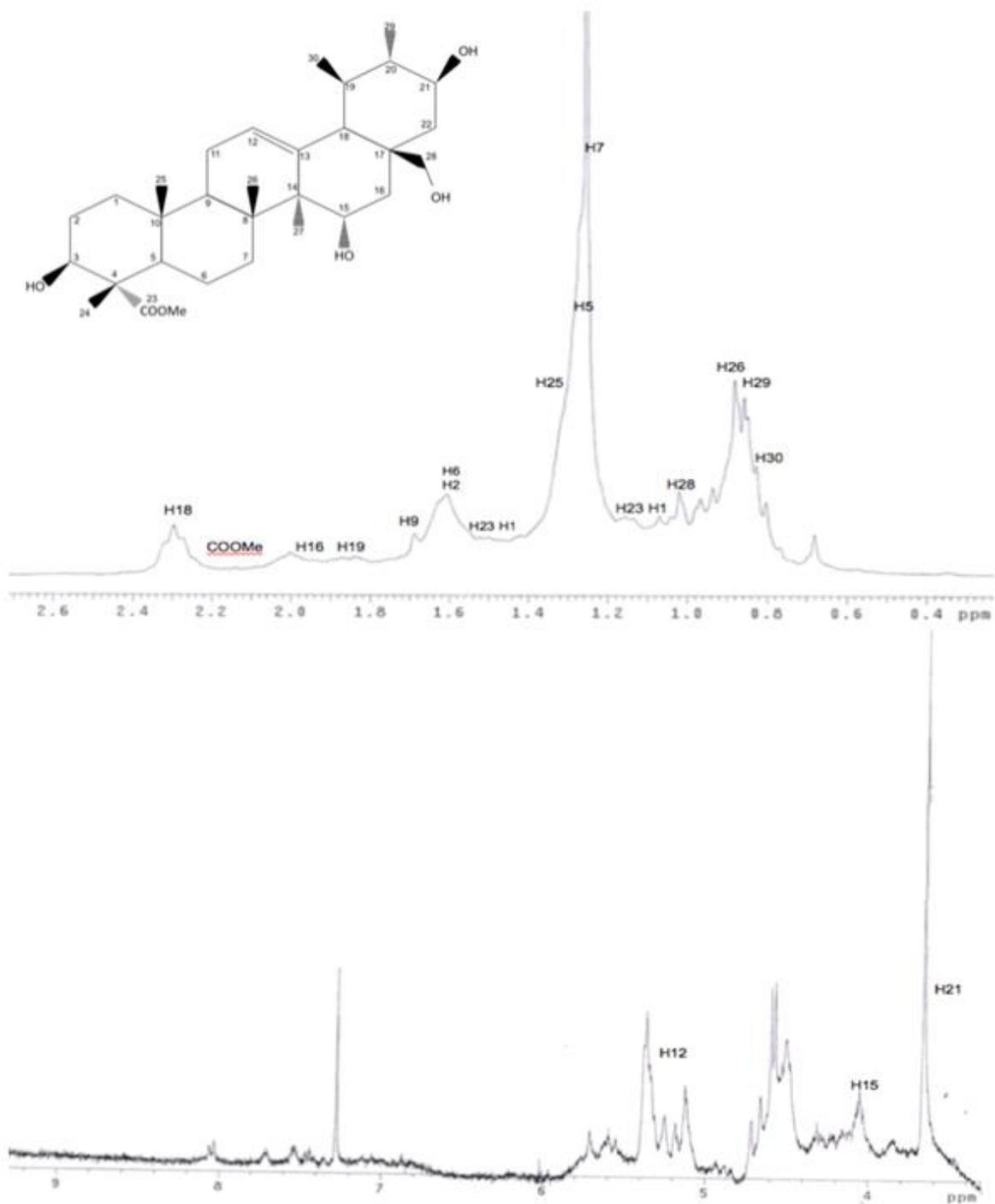


Figura A. 18 Espectro ^1H RMN de la fracción Me92111111 con actividad antiAGEs de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: 23acetil, 3β , 15α , 21β , 28-tetrahidroxiursa-12-eno. Disolvente: CDCl_3 .

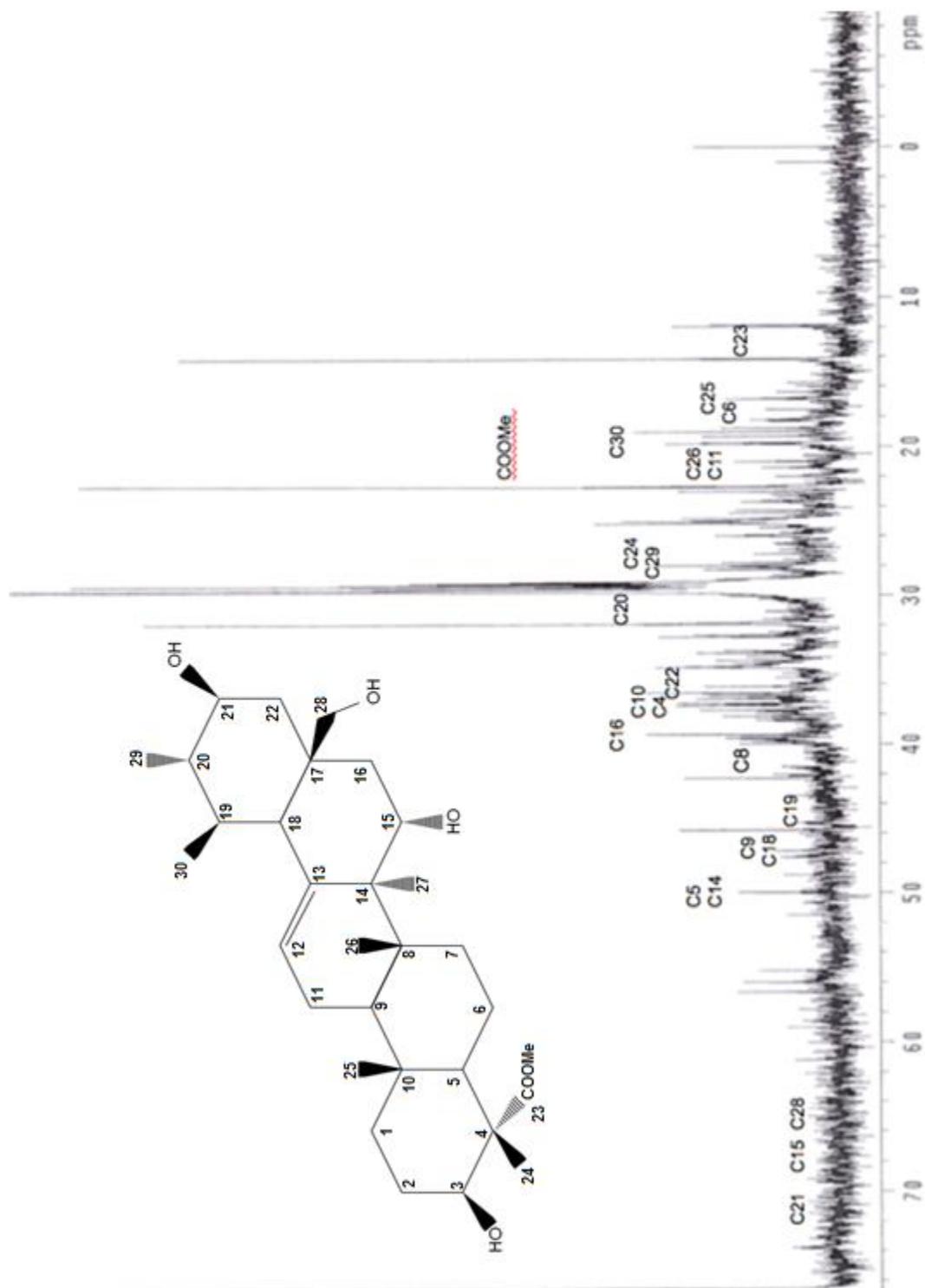


Figura A. 19 Espectro ^{13}C RMN de la fracción Me92111111 con actividad antiAGEs de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: 23acetil, 3β , 15α , 21β , 28-tetrahidroursa-12-eno. Disolvente: CdCl_3 .

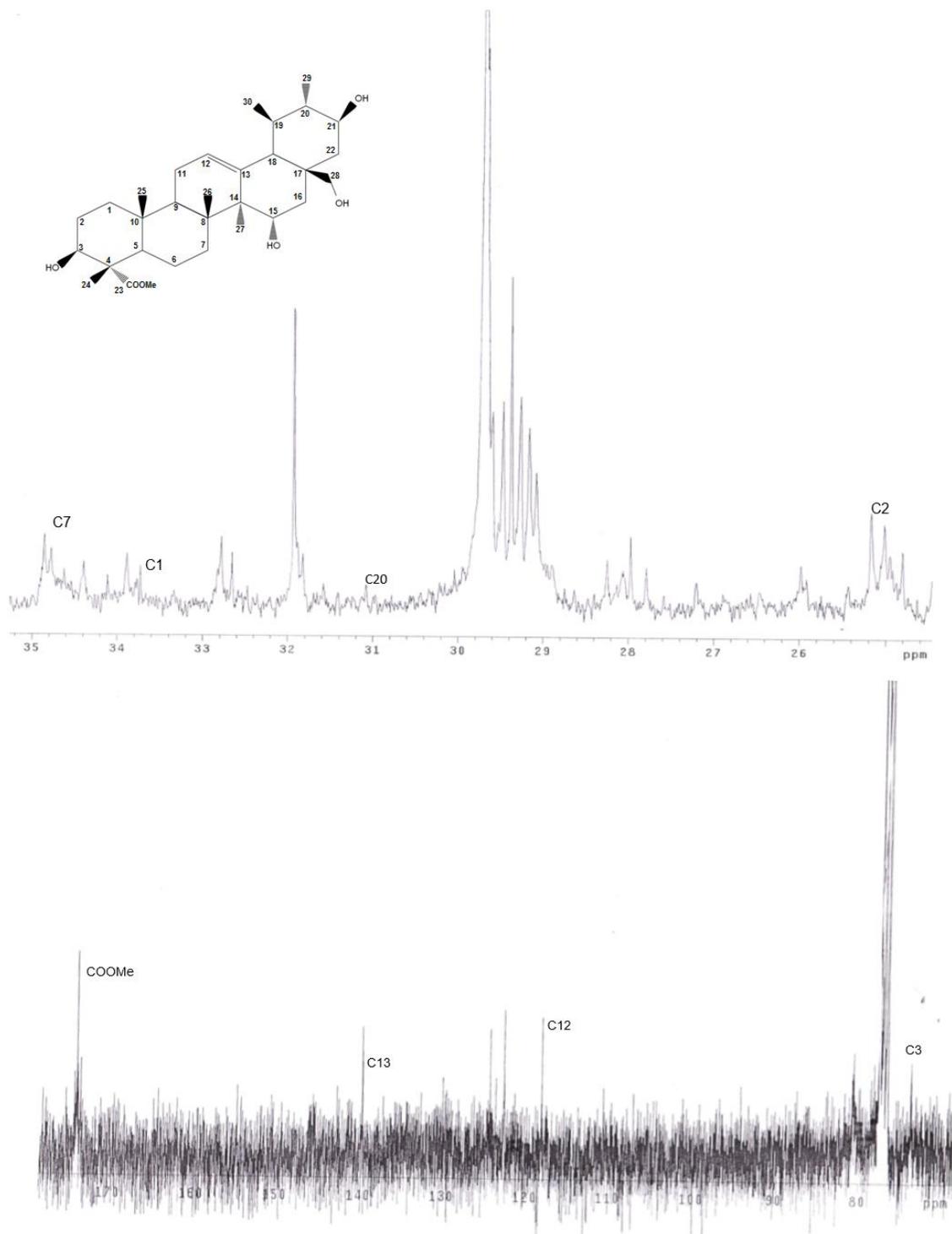


Figura A. 20 Espectro ¹³C RMN de la fracción Me9211111 con actividad antiAGEs de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: 23acetil, 3 β , 15 α , 21 β , 28-tetrahidroxursa-12-eno. Disolvente: CdCl₃.

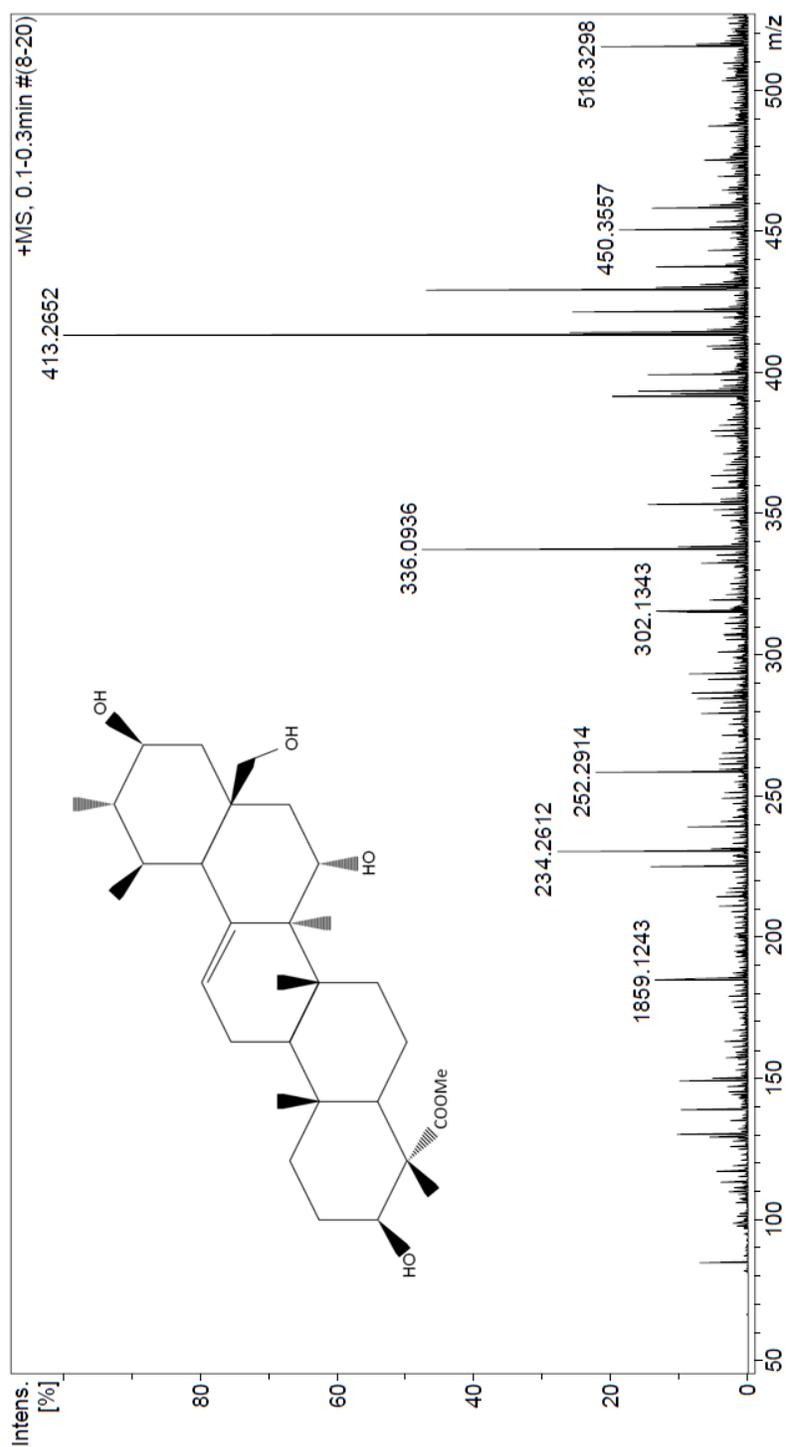


Figura A. 21 Espectro de masas de la fracción Me92111111 con actividad antiAGEs aislado de las hojas de *Origanum majorana* y denominado como: 23acetil, 3 β , 15 α , 21 β , 28-tetrahydroxiursa-12-eno
Disolvente: CdCl₃.