



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICA

Cuantificación y análisis de la actividad antioxidante de
Ipomoea arborescens utilizando métodos espectrométricos.

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
ANDREA LIZBETH CORTÉS NORIEGA

DIRECTOR: DR. SAMUEL HERNÁNDEZ ANZALDO
CODIRECTORA: DRA. YASMI REYES ORTEGA

ABRIL, 2023.



ÍNDICE

RESUMEN.	1
INTRODUCCIÓN.	2
ANTECEDENTES.	5
Generalidades de <i>Ipomoea arborescens</i>	5
Obtención de extractos de cazahuate de distinta polaridad.	8
Evaluación de la capacidad antioxidante en sistemas vegetales.....	9
Ventajas y limitantes del ensayo de IC_{50}	11
Técnicas analíticas para el análisis de actividad antioxidante.	12
Espectroscopía de UV/Vis.	12
Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	14
JUSTIFICACIÓN.	16
HIPÓTESIS.	17
OBJETIVOS.	17
General.	17
Específicos.	17
MATERIALES Y MÉTODOS.	18
Equipos y reactivos.	18
Metodología.	20
Colecta y tratamiento de hojas de <i>I. arborescens</i>	21
Obtención de extractos de cazahuate de distinta polaridad.	22
Estudios por UV/Vis.	23
Estudios por RMN.	25
Análisis de actividad antioxidante.	27
Espectrofotometría con UV/Vis.	27
Espectrometría de RMN	28
RESULTADOS.	29
Obtención de extractos de cazahuate de distinta polaridad.	29
Estudios por UV/Vis.	31
Estudios por RMN.	36

DISCUSIÓN.	39
Obtención de extractos de cazahuate de distinta polaridad.	39
Estudios por UV/Vis y por RMN.	40
CONCLUSIONES.	44
BIBLIOGRAFÍA.	45

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Daño celular causado por el estrés oxidativo. Elaboración propia.	3
Figura 2. Mecanismo de acción de antioxidante fenólico (Olivero-David, 2011).	3
Figura 3. <i>Ipomoea arborescens</i> (Cazahuate). Izquierda: Flor del cazahuate. Central: Hojas sanas de cazahuate recolectadas. Derecha: Ejemplar del cazahuate.	5
Figura 4. Algunos compuestos bioactivos encontrados de especies pertenecientes al género <i>Ipomoea</i> : A) Erginina (alcaloide de ergolina), B) Calistergina B3 (alcaloide nortropano), C) Ácido cafeico (compuesto fenólicos), D) Actinidol (norisoprenoide) E) Peonidina (flavonoide), F) Taraxerol (triterpeno).	8
Figura 5. Reacción del DPPH con agente antioxidante (Alam et al., 2012).	10
Figura 6. Espectro electromagnético (Owen, T., 2000).	13
Figura 7. Espín de núcleos de hidrógeno en las líneas de un campo magnético. Izquierda: Núcleos sin un campo magnético. Derecha: Núcleos con un campo magnético aplicado.	15
Figura 8. Metodología seguida para el análisis de la actividad antioxidante de <i>I. arborescens</i>	20
Figura 9. Selección y deshidratación de hojas de <i>I. arborescens</i> . Izquierda: Hojas jóvenes de cazahuate. Derecha: Hojas deshidratadas en horno de calentamiento.	22
Figura 10. Izquierda: Extracto crudo F0. Derecha: Extracto F1 con clorofilas removidas.	29
Figura 11. Izquierda: Comparación del cambio de color de DPPH 0.02 Mm con hojas deshidratadas de cazahuate en un tiempo menor a 5 minutos. Derecha: Comparación del cambio de color de DPPH 0.02 mM ante la fase F1 en un tiempo menor a 5 minutos.	30
Figura 12. Gráfico resultante de la relación de las concentraciones obtenidas de la fase F1 y el porcentaje de inhibición del radical libre del DPPH que logró la misma.	32

Figura 13. Gráfico resultante de la relación de las concentraciones obtenidas de la fase F2 y el porcentaje de inhibición del radical libre del DPPH que logró la misma.	33
Figura 14. Gráfico resultante de la relación de las concentraciones obtenidas de la fase F3 y el porcentaje de inhibición del radical libre del DPPH que logró la misma.	33
Figura 15. Tubos de cuarzo con las muestras a analizar. De izquierda a derecha: 1) Muestra de extracto de cacahuete en metanol deuterado. 2) DPPH 0.0129337 molar preparado con metanol deuterado. 3) y 4) Reacciones del DPPH deuterado con el extracto de cacahuete a distintos volúmenes.	36
Figura 16. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la reacción entre el DPPH y F1D, durante 10 minutos, cada minuto (de arriba hacia abajo).	37
Figura 17. Espectros obtenidos detallados en la región de 7-8 ppm. En rojo se presenta el espectro obtenido de la disolución de DPPH con metanol deuterado 0.0129337 M. En verde se presenta el espectro del extracto de cacahuete con metanol deuterado. En azul se muestra el espectro obtenido en la reacción de la mezcla entre DPPH y extracto de cacahuete.	38

ANEXO I. Espectros obtenidos con UV/Vis.

Figura suplementaria 1. Espectros obtenidos en la fase orgánica F1 en los ensayos EVol1 (etiquetados como A) y EVol2 (etiquetados como B).	50
Figura suplementaria 2. Espectros obtenidos en la fase orgánica concentrada F1 en los ensayos EVol3 (etiquetados como A) y EVol4 (etiquetados como B).	50
Figura suplementaria 3. Espectros obtenidos en la fase orgánica F2 en los ensayos EVol1 (etiquetados como A) y EVol2 (etiquetados como B).	51
Figura suplementaria 4. Espectros obtenidos en la fase orgánica concentrada F2 en los ensayos EVol3 (etiquetados como A) y EVol4 (etiquetados como B).	51
Figura suplementaria 5. Espectros obtenidos en la fase orgánica F3 en los ensayos EVol1 (etiquetados como A) y EVol2 (etiquetados como B).	52

Figura suplementaria 6. Espectros obtenidos en la fase orgánica concentrada F3 en los ensayos EVol3 (etiquetados como A) y EVol4 (etiquetados como B).....	52
--	----

ANEXO II. Espectros obtenidos de RMN

Figura suplementaria 1. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la molécula 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).	53
Figura suplementaria 2. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para el extracto en metanol deuterado de las hojas del cazahuate.....	54
Figura suplementaria 3. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la reacción entre el DPPH y F1D (tiempo inicial, tiempo de mezcla a 1 min).55	
Figura suplementaria 4. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la reacción entre el DPPH y F1D (tiempo final a 10 min).	56
Figura suplementaria 5. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la reacción entre el DPPH y F1D (Durante 10 minutos, cada minuto).	57

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Antecedentes de estudios del género <i>Ipomoea</i>	6
Tabla 2. Capacidad de extracción de disolventes utilizados.	9
Tabla 3. Equipos empleados en la metodología.....	18
Tabla 4. Reactivos empleados en la metodología.	19
Tabla 5. Pesos totales registrados de la recolección de materia seca del muestreo de hojas de <i>I. arborescens</i>	21
Tabla 6. Ensayos de actividad antirradicalaria con DPPH en distintas proporciones y concentraciones con las tres fases orgánicas. Complemento en Anexo IV.	24
Tabla 7. Pesos de los viales antes y después de la deshidratación de cada lote de los tres extractos.	25
Tabla 8. Ensayos realizados con la finalidad de determinar una reacción en un tiempo conveniente para introducirla en el equipo. Los experimentos siguientes se realizaron considerando las concentraciones de muestra número 3*.	26
Tabla 9. Primera medición. Concentración de DPPH: 0.0129337 molar. En donde: DPPH corresponde la muestra que contiene DPPH; F1D corresponde a la muestra que contiene extracto de cazahuate con metanol deuterado; E3 corresponde al ensayo antirradicalario seleccionado anteriormente (Tabla 8).	26
Tabla 10. Segunda medición. Concentración de DPPH: 0.0129337 molar. En donde: DPPH corresponde la muestra que contiene DPPH; F1D corresponde a la muestra que contiene extracto de cazahuate con metanol deuterado; E3 corresponde al ensayo antirradicalario seleccionado anteriormente (Tabla 8).	27
Tabla 11. Volúmenes finales obtenidos de cada extracto orgánico.....	30
Tabla 12. Absorbancias obtenidas en 516 nm en los cuatro ensayos realizados.	31
Tabla 13. Porcentajes de captación de radicales obtenidos para cada fase orgánica.	31

Tabla 14. Porcentajes de inhibición del DPPH obtenidos para cada fase orgánica.	32
Tabla 15. Comparativos de parámetros IC_{50} de especies de <i>Ipomoea</i> reportados en la literatura con los IC_{50} obtenidos en este trabajo (*) ordenados en forma ascendente.....	43

ANEXO IV. TRATAMIENTO DE DATOS.

Tabla suplementaria 1. Tratamiento de datos obtenidos a partir de la extracción de las fases orgánicas.....	61
---	----

ANEXOS.

ANEXO I. Espectros obtenidos con UV/Vis..... 50

Figura suplementaria 1. Espectros obtenidos en la fase orgánica F1 en los ensayos EVol1 (etiquetados como A) y EVol2 (etiquetados como B). 50

Figura suplementaria 2. Espectros obtenidos en la fase orgánica concentrada F1 en los ensayos EVol3 (etiquetados como A) y EVol4 (etiquetados como B). 50

Figura suplementaria 3. Espectros obtenidos en la fase orgánica F2 en los ensayos EVol1 (etiquetados como A) y EVol2 (etiquetados como B). 51

Figura suplementaria 4. Espectros obtenidos en la fase orgánica concentrada F2 en los ensayos EVol3 (etiquetados como A) y EVol4 (etiquetados como B). 51

Figura suplementaria 5. Espectros obtenidos en la fase orgánica F3 en los ensayos EVol1 (etiquetados como A) y EVol2 (etiquetados como B). 52

Figura suplementaria 6. Espectros obtenidos en la fase orgánica concentrada F3 en los ensayos EVol3 (etiquetados como A) y EVol4 (etiquetados como B). 52

ANEXO II. Espectros obtenidos de RMN 53

Figura suplementaria 1. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la molécula 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). 53

Figura suplementaria 2. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para el extracto en metanol deuterado de las hojas del cacahuate. 54

Figura suplementaria 3. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la reacción entre el DPPH y F1D (tiempo inicial, tiempo de mezcla a 1 min). 55

Figura suplementaria 4. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la reacción entre el DPPH y F1D (tiempo final a 10 min). 56

Figura suplementaria 5. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la reacción entre el DPPH y F1D (Durante 10 minutos, cada minuto). 57

ANEXO III. ABREVIATURAS. 58

ANEXO IV. TRATAMIENTO DE DATOS.	59
Tabla suplementaria 1. Tratamiento de datos obtenidos a partir de la extracción de las fases orgánicas.....	59

Cuantificación y análisis de la actividad antioxidante de *Ipomoea arborescens* utilizando métodos espectrométricos.

RESUMEN.

De acuerdo a la IUPAC, la definición universal de oxidación es un proceso en el que un átomo dentro de una “entidad molecular” aumenta su estado de oxidación. Entre los productos que pueden surgir a partir de estas reacciones pueden encontrarse moléculas muy inestables denominadas especies reactivas de oxígeno (ERO), que al entrar en contacto con células pueden causar estrés oxidativo. Los agentes antioxidantes son sustancias o moléculas que tienen la capacidad de suprimir el efecto dañino que pueden causar los agentes oxidantes al poseer afinidad para interaccionar con radicales libres dadas sus características de agentes reductores.

Muchas plantas tienen la capacidad innata de sintetizar una amplia gama de metabolitos antioxidantes capaces de disminuir el daño oxidativo inducido por ERO. La extracción eficaz y la evaluación adecuada de los antioxidantes de plantas medicinales son cruciales para explorar las posibles fuentes de estas sustancias y promover su aplicación en diversas áreas como la alimenticia y la de salud.

Ipomoea arborescens es una planta nativa de México que cuenta con pocos estudios referentes a su fitoquímica y potencial antioxidante; por lo cual, el objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antioxidante de tres distintas fases orgánicas extraídas a partir de hojas de *I. arborescens* deshidratadas empleando espectroscopía de UV/Vis y espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de hidrógeno, mediante el método de actividad de eliminación de radicales libres del DPPH.

INTRODUCCIÓN.

Cotidianamente ocurren gran número de reacciones bioquímicas dentro de las células, las cuales son la fuerza motriz que sustentan la vida (Carocho, 2013). El oxígeno juega un papel muy importante en estas reacciones, ya que la mayoría de los procesos en los organismos aerobios tienen lugar en presencia del mismo; sin embargo, este elemento puede derivar efectos secundarios como la oxidación, la cual conduce al daño celular (Kumar, 2017).

La oxidación es un proceso electroquímico por el cual un ion o molécula pierde uno o varios electrones, siendo uno de los productos derivados de esta reacción moléculas muy inestables, denominadas especies reactivas de oxígeno (ERO) (Lozada, 2009; Mahmoudi, 2021). Es común que varios agentes oxidantes, aunque es importante señalar que no todos, sean moléculas que contengan oxígeno con uno o más números de electrones desapareados, debido a características como su reactividad y electronegativo.

De forma exógena, los ERO ingresan al cuerpo a partir de diversas fuentes como la contaminación, la ingesta de bebidas alcohólicas, alimentos poco saludables, cigarrillo, y exposición al sol; aunque menos frecuente, de manera endógena estas especies se pueden producir a partir de procesos celulares como el estallido respiratorio (Block, 2002; Kumar, 2017). Los cuatro tipos principales de componentes celulares susceptibles de ser dañados por los radicales libres son los lípidos (peroxidación de ácidos grasos insaturados en las membranas), las proteínas (desnaturalización), los carbohidratos y los ácidos nucleicos (Blokhina, 2003).

Las células cuentan con mecanismos capaces de contrarrestar el efecto nocivo del oxígeno y derivados. El conjunto de mecanismos de defensa es conocido como sistema antioxidante, encargado de mantener el equilibrio de las reacciones de óxido reducción y sobrevivencia celular (Kumar, 2017). El estrés oxidativo es un estado que surge a partir de un desequilibrio entre las ERO y los antioxidantes naturales del organismo (Figura 1) (Mahmoudi, 2021). El equilibrio entre la producción y la neutralización de ERO por parte de los antioxidantes, es muy

delicado, y si este tiende a la sobreproducción de ERO, las células empiezan a sufrir las consecuencias del estrés oxidativo, siendo capaces de alterar la fisiología normal del organismo y causar enfermedades letales como el cáncer, el Alzheimer, la diabetes, etc. (Wiernsperger, 2003; Mehla, 2021).



Figura 1. Daño celular causado por el estrés oxidativo. Elaboración propia.

Los agentes antioxidantes que forman parte del sistema anteriormente mencionado, son sustancias que reducen el efecto de los oxidantes al interactuar como un agente reductor del radical libre, uniéndose con estas moléculas y disminuyendo su efecto negativo. El antioxidante cede un electrón, oxidándose y transformándose en un radical libre débil no tóxico (Figura 2). Los antioxidantes se clasifican en endógenos; es decir, que son sintetizados por las mismas células; y exógenos, los cuales ingresan a través de la dieta (Mayor-Oxilia, 2010; Kumar et al., 2017).

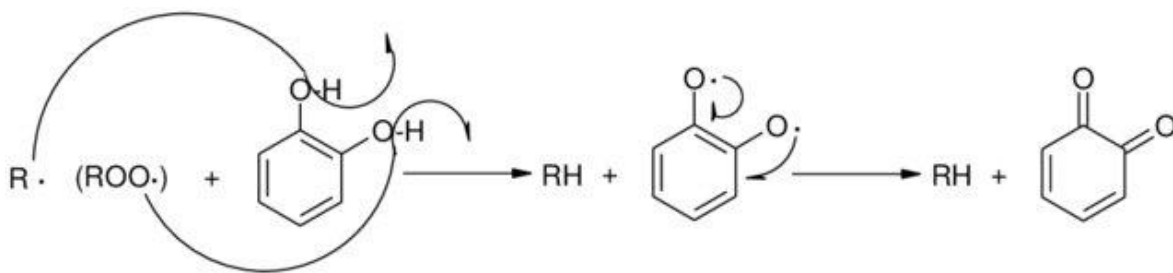


Figura 2. Mecanismo de acción de antioxidante fenólico (Olivero-David, 2011)

En los tejidos vegetales, muchos compuestos fenólicos son antioxidantes potenciales: los flavonoides, los taninos y los precursores de la lignina pueden funcionar como compuestos secuestrantes de ERO (Blokhina, 2003). Los antioxidantes provenientes de plantas han generado interés en los últimos años, siendo aplicados en diferentes campos e industrias como farmacéutica y alimentaria. Muchos de estos compuestos pueden comparar su potencial antioxidante con los productos antioxidantes sintéticos de mayor uso como el 2-terbutil-hidroxitolueno (BHT) (Mesa-Vanegas, 2010). Los estudios fitoquímicos y fisicoquímicos aplicados en el estudio de metabolitos de plantas, abren una nueva ventana a la generación conocimientos y posibles aplicaciones biotecnológicas, así como la confirmación o descarte de los usos de estas plantas en la medicina tradicional.

Se tiene el caso del género *Ipomoea*, género que engloba a plantas con características particulares que cuenta con alrededor de 500 a 600 especies, de las cuales muchas de estas se usan alrededor del mundo desde tiempos ancestrales para combatir diferentes enfermedades y padecimientos, reportándose en la literatura como tratamiento para desórdenes intestinales como problemas de inflamación, diarreas, espasmos, así como en afecciones en la piel, analgésico y contra la picadura de alacrán (Oropeza Guerrero, 2012; Ramos Castro, 2016). Especies como *I. batatas* han sido ampliamente estudiadas mediante métodos químicos y fisicoquímicos (Shekhar, 2015; Zengin, 2017; Manphae, 2022). Por otro lado, la especie *I. arborescens* cuentan con pocos trabajos enfocados al estudio de su composición fitoquímica y capacidad antioxidante: Perez-Amador y colaboradores (1983) trabajó con aceites esenciales provenientes de semillas de *I. arborescens*. León (2006) estudió el contenido glucosídico de resina de las raíces de *I. arborescens*. Estos trabajos son de gran importancia como antecedentes del estudio del cazahuate, sin embargo, no se encontraron fuentes bibliográficas referentes al estudio de la actividad antioxidante del mismo.

ANTECEDENTES.

Generalidades de *Ipomoea arborescens*.

Ipomoea arborescens, también conocido como casahuate o cazahuate de monte, es una planta originaria de México perteneciente a la familia Convolvulaceae (Austin & Huáman, 1996). Estas plantas se caracterizan por ser árboles que crecen de 5 a 15 m de altura, con troncos de hasta 50 cm de diámetro y de corteza de color claro. De láminas foliares enteras que miden de 9 a 19 cm de largo, 6 a 9 cm de ancho, con 12 a 18 nervios laterales a cada lado de la nervadura central, ovadas a lanceoladas, a menudo la superficie es de color verde grisáceo en oposición al verde claro de la superficie superior de la hoja, escasamente pubescente (Figura 4). Cuenta con inflorescencias terminales o axilares, cada cima consta de 1 (o rara vez 2) flores de color blanco con tubo verdoso, las regiones interplicales crema, la garganta rojiza o morado por dentro. Habita en bosques espinosos abiertos, sabanas de robles y bosques caducifolios secos. Esta especie crece en altitudes de 50 a 1800 m y generalmente florece y fructifica entre noviembre y abril (McPherson, 1981).

Tradicionalmente algunas comunidades utilizan partes de esta planta como la corteza contra las picaduras de serpientes y escorpiones, así como para prevenir la caída del cabello. También, la infusión de las hojas se usa como antiinflamatorio y para tratar el *dolor* de estómago (León, 2006).



Figura 3. *Ipomoea arborescens* (Cazahuate). Izquierda: Flor del cazahuate. Central: Hojas sanas de cazahuate recolectadas. Derecha: Ejemplar del cazahuate.

En la actualidad se cuentan con muy pocas investigaciones que determinen el contenido de metabolitos y biomoléculas presentes en esta especie, así como su posible actividad antioxidante. Sin embargo, estudios previos referentes a la fitoquímica y usos de otras plantas pertenecientes al género *Ipomoea* pueden proporcionar importantes referencias en esta investigación (Tabla 1).

Tabla 1. Antecedentes de estudios del género *Ipomoea*.

Autor y año	Referente	Aportación
Emendörfer y colaboradores (2005).	<i>I. pes caprae</i>	Tratamiento contra la inflamación, desórdenes gastrointestinales y se emplea como agente analgésico
Maurya & Srivastava (2009).	Género <i>Ipomoea</i>	Se registra presente el alcaloide lisergol, al cual se le atribuyen propiedades hipotensivas, analgésicas, psicotrópicas; también usado para sintetizar cabergolina, sustancia empleada en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.
Rosas-Ramírez y colaboradores (2011)	<i>I. batatas</i>	Se reporta actividad antioxidante.
Meira y colaboradores (2012)	Género <i>Ipomoea</i>	Se recopilan características atribuidas al género <i>Ipomoea</i> como propiedades antimicrobianas, analgésicas,

		espasmolíticas, espasmogénicas, hipotensivas, psicóticas y anticancerígenas. Así también, metabolitos secundarios aislados e identificados: alcaloides tipo ergolina, indol y nortropano, compuestos fenólicos, flavonoides, antocianos, glicolípidos, lignanos, triterpenos, cumarinas, isoprenoides, diterpenos, isocumarinas y benzenoides.
Paz (2012)	<i>I. murucoides</i>	Se elaboraron extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos, probando la actividad insecticida y la presencia de alcaloides a los que les atribuye disminución en actividad antioxidante.

Asimismo, se han encontrado una importante cantidad de compuestos biológicamente activos propios de este género como los alcaloides de ergolina, alcaloides de indolizidina, alcaloides de nortropano, compuestos fenólicos, cumarinas, norisoprenoides, diterpenos, flavonoides y antocianósidos, glicolípidos, lignanos y triterpenos (Figura 3) (Meira, 2012).

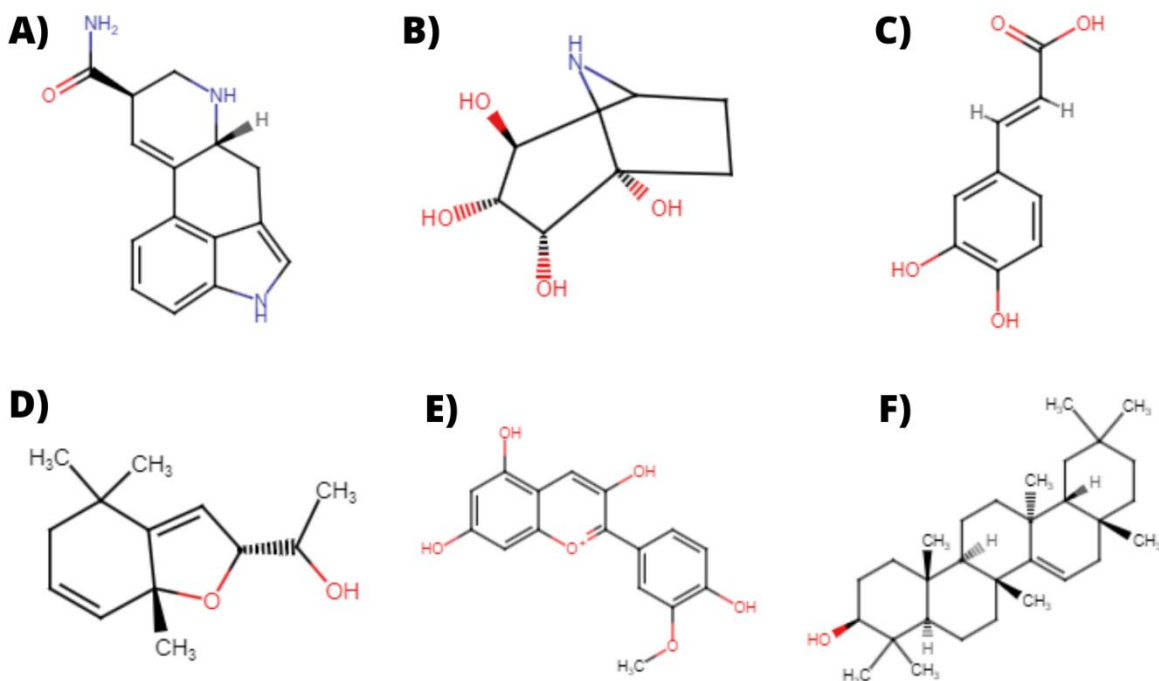


Figura 4. Algunos compuestos bioactivos encontrados de especies pertenecientes al género *Ipomoea*: A) Erginina (alcaloide de ergolina), B) Calistergina B3 (alcaloide nortropano), C) Ácido cafeico (compuesto fenólicos), D) Actinidol (norisoprenoide) E) Peonidina (flavonoide), F) Taraxerol (triterpeno).

Obtención de extractos de cacahuete de distinta polaridad.

Para seleccionar los disolventes a utilizar en un proceso de extracción de componentes orgánicos en plantas es importante considerar factores como la polaridad, la solubilidad, el costo, entre otros. Los disolventes comúnmente utilizados en la extracción de plantas medicinales son disolventes polares (ejemplo, agua, alcoholes), polares intermedios (ejemplo, acetona, diclorometano) y no polares (ejemplo, n-hexano, éter, cloroformo); por otro lado, los alcoholes (EtOH y MeOH) son disolventes universales en la extracción por disolventes para la investigación fitoquímica (Abubakar, 2020)

Para realizar una extracción líquido-líquido es ideal seleccionar dos disolventes no miscibles para que de esta forma el compuesto a extraer sea soluble en disolvente orgánico, pero no en agua para facilitar la separación. Algunas de las características de los disolventes utilizado en el presente trabajo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Capacidad de extracción de disolventes utilizados.

Disolvente	Polaridad	Capacidad de extracción
n-Hexano	0.009	Solvente no polar. Extrae compuestos como alcaloides, terpenoides, cumarinas y ácidos grasos.
Cloroformo	0.259	Solvente no polar. Extrae compuestos como terpenoides, flavonoides, grasas y aceites.
Metanol	0.762	De naturaleza polar, miscible con agua. Afín a compuestos polares.

Evaluación de la capacidad antioxidante en sistemas vegetales.

Las plantas tienen una capacidad innata para sintetizar una amplia gama de metabolitos antioxidantes no enzimáticos capaces de atenuar el daño oxidativo inducido por ERO. Estas moléculas exhiben una amplia gama de efectos biológicos, que incluyen antiinflamatorios, antienviejecimiento y anticancerígenos. La extracción eficaz y la evaluación adecuada de los antioxidantes de plantas medicinales son cruciales para explorar las posibles fuentes de estas sustancias y promover la aplicación en alimentos funcionales, productos farmacéuticos y aditivos alimentarios (Kasote et al., 2015; Xu et al., 2017)

El proceso de extracción es de vital importancia para realizar este trabajo. Muchos factores intervienen en la eficiencia de la extracción, como el tipo y la concentración

del disolvente, la temperatura, el tiempo y el pH al que se realiza. El solvente es uno de los factores más influyentes. Su selección se basa en la naturaleza química y la polaridad de los compuestos antioxidantes a extraer. La mayoría de los compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas son antioxidantes hidrosolubles. Los disolventes polares, como agua, etanol, metanol, propanol, acetona y sus mezclas acuosas, se utilizan ampliamente para la extracción. Los métodos de extracción convencionales son principalmente el baño de agua caliente, la maceración y la extracción Soxhlet (Xu et al., 2017).

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas. Para profundizar en la medición de las capacidades antioxidantes de los extractos de productos naturales, se han desarrollado diferentes tipos de ensayos de evaluación. Aquellos que involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción se les conoce como ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) (Tovar, 2013). Entre estos encontramos los ensayos con el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. La actividad captadora de radicales libres de los compuestos antioxidantes se expresa como valor de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) que, aterrizado al estudio de capacidad antioxidante, es la concentración inhibitoria o cantidad necesaria de una sustancia para disminuir el número de radicales DPPH en un 50% (Echavarría et al., 2016). La reacción se representa de la siguiente manera:

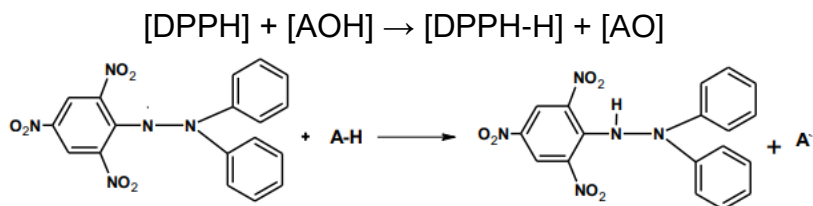


Figura 5. Reacción del DPPH con agente antioxidante (Alam et al., 2012).

Ventajas y limitantes del ensayo de IC_{50} .

La evaluación de la actividad antioxidante aplicando el ensayo DPPH implica el uso de un método rápido, simple, económico y ampliamente utilizado. Es elegible para cuantificar antioxidantes en sistemas biológicos complejos, ya sea con muestras sólidas o líquidas (Kedare S.B., 2011)

Es el único método entre aquellos destinados a medir el potencial antioxidante en el que se puede realizar la reacción entre la muestra a analizar y el DPPH en metanol/agua, facilitando el estudio de compuestos antioxidantes solubles en estos disolventes. La principal ventaja de este método es que permite que el DPPH reaccione con toda la muestra el tiempo suficiente dado en el método, permitiendo que el DPPH reaccione lentamente incluso con antioxidantes débiles (Prakash, 2001). El método DPPH se puede utilizar en solventes orgánicos acuosos y no polares y se puede usar para examinar antioxidantes tanto hidrofílicos como lipofílicos.

Metodológicamente existen factores y situaciones que generen incertidumbre en la obtención de resultados precisos y exactos. En muchas ocasiones esta confiabilidad está sujeta a diversas causas que van desde la calidad del instrumento de medición y las condiciones ambientales presentes al momento de realizar ensayos experimentales, hasta la habilidad del operador que los realiza.

Referente al uso de la espectrofotometría como método de medición en un ensayo de actividad antirradicalaria, se puede mencionar la incertidumbre espectrofotométrica, también conocida como error fotométrico o ruido, la cual consiste en fluctuaciones aleatorias que ocurren con el tiempo ocasionadas generalmente por el disparo de fotones.

Por otro lado, se puede presentar variaciones en la relación lineal entre las constantes de velocidad con el DPPH al utilizar disolventes polares próticos (como etanol y metanol), ya que estos aceleran fuertemente la reacción entre DPPH y fenoles por un mecanismo de transferencia de electrones llamado SPLET, cambiando así el orden de reactividad con respecto a su actividad antioxidante real.

Los resultados dependen del tiempo y las condiciones de la reacción, así como de la estequiometría y la concentración del compuesto de prueba, lo que a menudo arroja resultados inconsistentes (Amorati et al., 2015).

Otro obstáculo que se puede presentar para lograr la mayor precisión en los resultados obtenidos a partir de este tipo de ensayos está relacionado a la concentración de las disoluciones a medir. A mayores concentraciones de 0,01 M, la distancia promedio entre las especies responsables de la absorción disminuye, pudiendo afectar la distribución de cargas de sus vecinas. Esta interacción, puede ser capaz de alterar la habilidad de las especies para absorber en una longitud de onda de radiación. Debido a que la extensión de la interacción depende de la concentración, la ocurrencia de este fenómeno provoca desviaciones de la relación lineal entre absorbancia y concentración (Arévalo Hidalgo, 2006)

Técnicas analíticas para el análisis de actividad antioxidante.

Espectroscopía de UV/Vis.

La espectroscopía UV-Vis fue uno de los primeros métodos físicos que se aplicaron al análisis cuantitativo y en la actualidad la técnica es muy utilizada en este tipo de análisis, aunque en la determinación de estructuras es superada por otras técnicas, como espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear (Mota, 2008).

Esta técnica se basa en el proceso de absorción por las moléculas de la radiación ultravioleta-visible entre 190 nm y 780 nm (Lourenco et al., 2012) Esta radiación comprende sólo una pequeña parte del espectro electromagnético (Figura 6) y su energía asociada se define de la siguiente manera:

$$E = h \nu$$

Donde:

E= Energía (en julios)

h= Constante de Planck (6.626×10^{-34} J s)

ν = Frecuencia (en segundos).

Cuando la luz es absorbida por una molécula se origina una promoción electrónica, desde un estado energético basal o fundamental (E_1) a un estado de mayor energía (E_2) y solo se absorberá la energía que permita la promoción al estado de mayor energía. La absorción que presenta una molécula a distintas longitudes de onda se le conoce como espectro de absorción y constituye la señal de identidad de dicha molécula (Skoog, 2001).

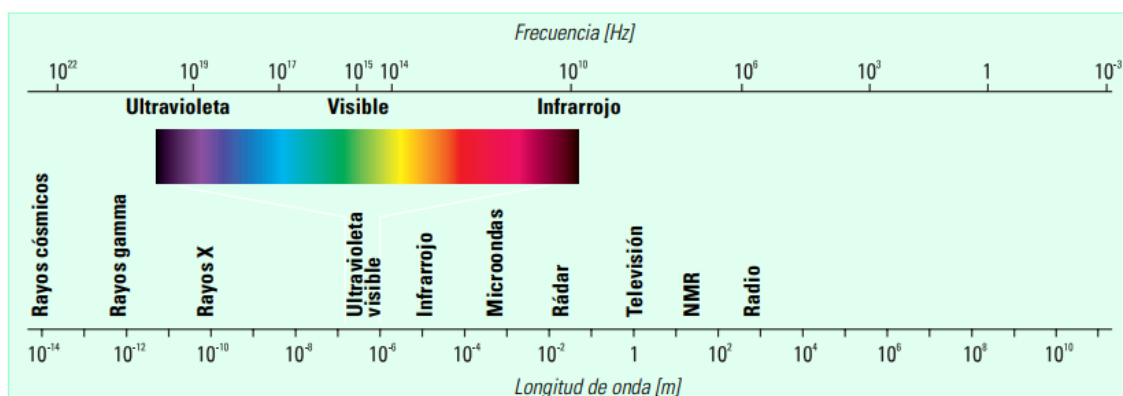


Figura 6. Espectro electromagnético (Owen, T., 2000).

La absorción de radiación por los materiales sólidos está regida por la ley de Lambert-Beer. Esta ley menciona que entre mayor sea el número de moléculas capaces de absorber luz a una determinada longitud de onda, mayor será la medida de la absorción de luz (Pavia, 2001), es decir, la absorbancia es proporcional a la concentración de la molécula absorbente, expresándose de la siguiente forma:

$$\log(I_0/I) = A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Donde:

A= absorbancia

ϵ = absortividad molar

b= longitud del camino óptico

c = concentración molar

I_0 = intensidad de luz incidente sobre una celda de muestra

I = intensidad de luz transmitida por la muestra

El monitoreo del DPPH con un espectrómetro UV/Vis se ha convertido recientemente en el método más ampliamente utilizado debido a su simplicidad y precisión. Por lo general, la absorbancia de DPPH se mide a una longitud de onda de 515 a 520 nm (Kedare S.B., 2011). El color cambia de púrpura a amarillo seguido de la reducción del DPPH tras la absorción de hidrógeno de un antioxidante. Esta reacción es estequiométrica con respecto al número de átomos de hidrógeno absorbidos. Por lo tanto, el efecto antioxidante se puede evaluar fácilmente siguiendo la disminución de la absorción UV (Moon, 2009).

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La espectroscopía de RMN, se basa en la absorción de energía de radiación electromagnética por parte de núcleos atómicos que tienen un momento magnético diferente de 0, $I \neq 0$. Dicha absorción ocurre a frecuencias características que dependen del tipo de núcleo y del entorno molecular en que se encuentran y sólo tiene lugar en presencia de un campo magnético intenso.

Los momentos magnéticos de los distintos núcleos, en presencia de un campo magnético externo, se alinean respecto a dicho campo externo. Sólo cuando se les aplica un pulso de radiofrecuencia, perpendicular al campo magnético externo, se les aparta del estado de equilibrio y así se observa su vuelta al mismo y se detecta la señal que genera (Figura 7) (Rituerto, 2012).

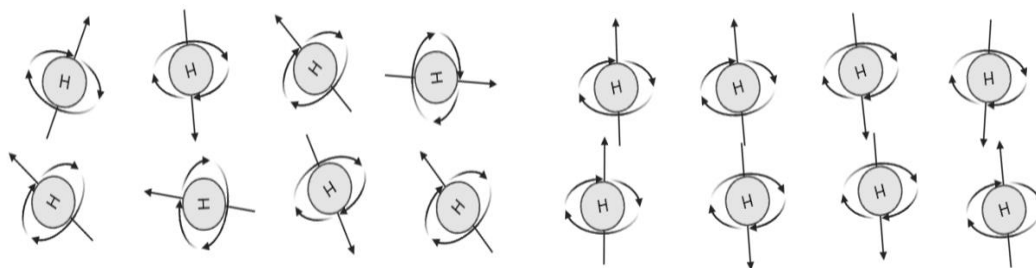


Figura 7. Espín de núcleos de hidrógeno en las líneas de un campo magnético.

Izquierda: Núcleos sin un campo magnético. Derecha: Núcleos con un campo magnético aplicado.

Por lo tanto, RMN proporciona espectros de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única; de tal forma que un espectro de RMN es una representación de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra. Para la determinación de la posición de la señal en el espectro, se define el desplazamiento químico (δ) que es una magnitud adimensional, característica del núcleo considerado y su entorno y es independiente de la frecuencia de medida y de la intensidad de campo magnético (García, 2018).

Dada la ventaja que proporciona la técnica de RMN de brindar la posibilidad de identificar grupos funcionales que intervienen en la señal de la inhibición del DPPH, esta se ha utilizado ampliamente en evaluaciones de actividad antioxidante.

JUSTIFICACIÓN.

El uso de las plantas tiene un papel de gran relevancia en la medicina tradicional. Diferentes asentamientos humanos y culturas cuentan con un conocimiento propio sobre los efectos curativos que las plantas nativas de esa región pueden presentar. En México existe una gran variedad de plantas que son usadas para tratar distintos padecimientos y malestares como dolor estomacal, fiebre, resfriados, diarrea, entre otros. A pesar de que este conocimiento empírico es muy valioso, mediante la aplicación del método científico, se puede llegar a determinar si los efectos curativos atribuidos al uso de plantas medicinales tienen un origen sustentable mediante el estudio de su fitoquímica, o proporcionan meramente un efecto placebo.

El estudio del género *Ipomoea* ha sido de gran interés en los últimos años debido a propiedades llamativas que se han reportado en la literatura como efecto hipoglucémico, anticonvulsivo, antibacteriano y potencial insecticida (Pichardo, 2004; Gómez Aguirre, 2005; Ramos Castro, 2016). Sin embargo, aún no se cuenta con la caracterización y los suficientes estudios fitoquímicos de todas las especies pertenecientes a este género de plantas, por lo tanto, en el presente trabajo de investigación se busca evaluar la actividad antioxidante de *I. arborescens* mediante la determinación del valor IC_{50} de tres extractos orgánicos obtenidos a partir de esta planta con el uso de UV/Vis y el ensayo de retención de radicales libres con DPPH.

HIPÓTESIS.

Las fases orgánicas obtenidas de las hojas de *Ipomoea arborescens* con disolventes de distintas polaridades son una fuente de metabolitos secundarios con actividad antioxidante que presentan distinta IC_{50} entre sí.

OBJETIVOS.

General.

Evaluar la actividad antioxidante de distintas fases orgánicas extraídas a partir de hojas de *Ipomoea arborescens* empleando técnicas espectroscópicas: UV/Vis y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de hidrógeno.

Específicos.

- Extraer fases orgánicas de *I. arborescens* haciendo uso de disolventes orgánicos de distintas polaridades.
- Determinar las metodologías para el aislamiento de las fases fenólicas, clorofilas, alcaloides y carotenos del cacahuate.
- Realizar los ensayos de captadores de radicales libres del DPPH.
- Realizar mediciones de resonancia magnética nuclear del extracto de metanol en interacción y sin presencia del radical libre DPPH.
- Analizar el desplazamiento químico de las señales emitidas por el extracto de cacahuate y realizar comparativos de acuerdo a las señales reportadas en la literatura.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos orgánicos mediante la prueba DPPH con la obtención del IC_{50} .
- Determinar mediante el uso de RMN el grupo de componentes naturales que intervienen en el efecto antioxidante del extracto metanólico del *I. arborescens*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Equipos y reactivos.

Durante el desarrollo del presente trabajo se hicieron uso de los siguientes equipos, materiales y reactivos (Tabla 3-4).

Tabla 3. Equipos empleados en la metodología.

EQUIPOS Y MATERIALES EMPLEADOS EN LA METODOLOGÍA		
EQUIPO	MARCA	CAPACIDAD
Balanza analítica	Ohaus Analytical Plus	0.00001 g
Horno de secado	SEV	0-300 C°
Parrilla de calentamiento con agitación magnética	Cimarec SP131015	0-540 C°
Resonancia magnética nuclear	Bruker de 500 MHz	ND
Equipo de UV/Vis	UV-3100 Beckman UV/Vis	ND

Tabla 4. Reactivos empleados en la metodología.

REACTIVOS EMPLEADOS EN LA METODOLOGÍA				
SUSTANCIA	FÓRMULA QUÍMICA	PESO MOLECULAR	PUREZA (%)	PROVEEDOR
Metanol	CH ₃ OH	32.04	99.9	Fermont
Hidróxido de sodio	NaOH	39.99	97.8	PRODUCTOS QUIMICOS MONTERREY, S.A. de C.V.
Hexano	C ₆ H ₁₄	86.18		
Cloroformo	CHCl ₃	119.38	99.8	Fermont
Agua destilada	H ₂ O	18.016	≥ 99%	Chispagua
Ácido clorhídrico	HCl	36.46	89%	Chemical Meyer S.A de C.V
DPPH	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	394.32	ND	SIGMA-ALRICH
Agua deuterada	D ₂ O	20.03	≥ 99%	SIGMA-ALRICH
Metanol deuterado	CD ₃ OD	36.07	≥ 99%	SIGMA-ALRICH

Metodología.

En la Figura 8 se muestra un diagrama que explica el plan de trabajo llevado a cabo en distintas etapas experimentales realizadas en el Laboratorio de Química Inorgánica, perteneciente al Instituto de Ciencias BUAP de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

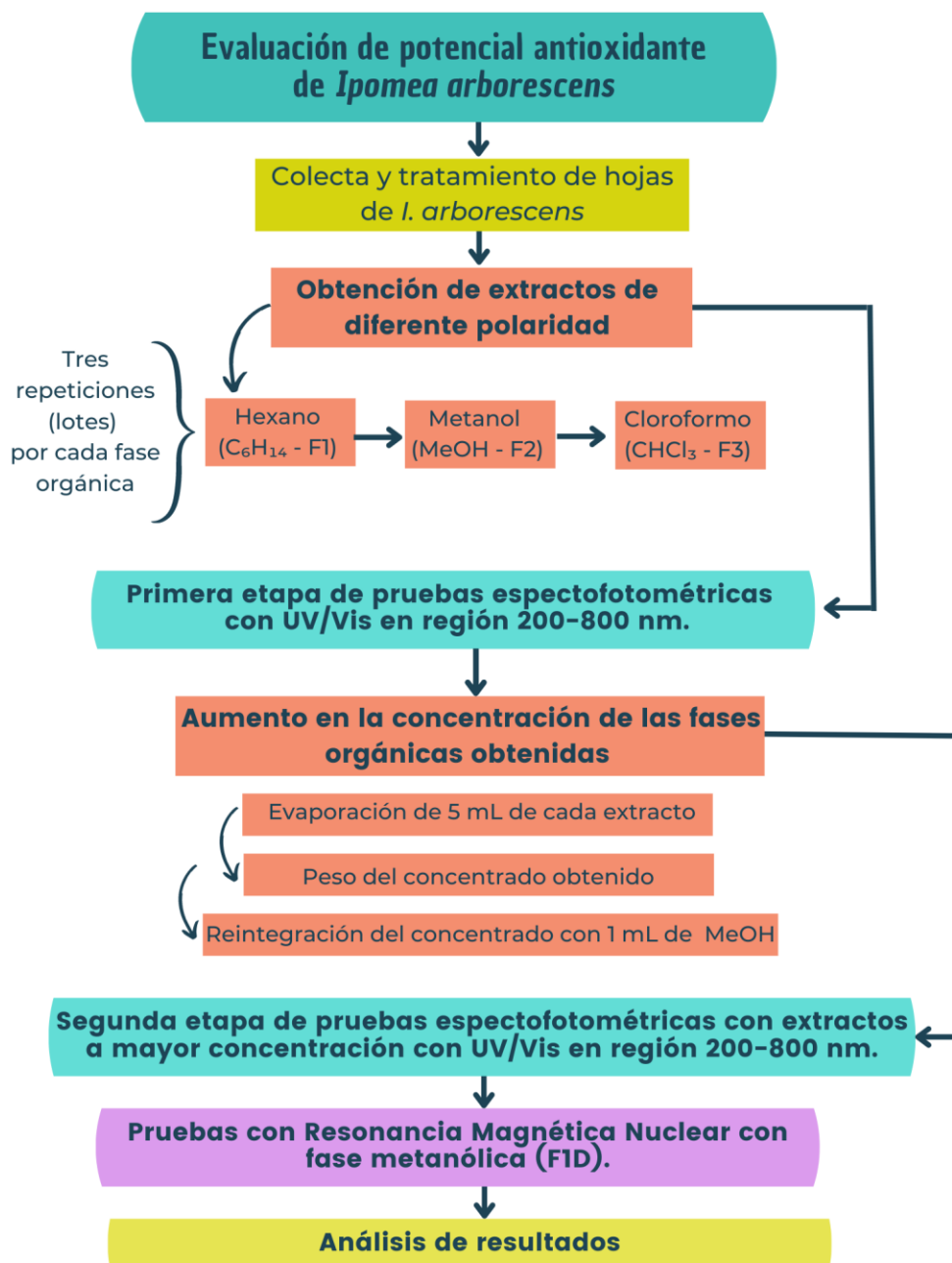


Figura 8. Metodología seguida para el análisis de la actividad antioxidante de *I. arborescens*.

Colecta y tratamiento de hojas de *I. arborescens*.

La recolección se realizó a lo largo del mes de marzo de 2022 en el cerro Yucunitzá, localizado al noroeste de Oaxaca, sobre la periferia de la Heroica ciudad de Huajuapán de León, Oaxaca, México, ubicado en las coordenadas 17°48'35"N 97°46'35"O. Se eligieron aquellos ejemplares que se mostraran sanos libres de parásitos o plagas. Se recolectaron sólo las hojas que tuvieran un aspecto maduro, sano y uniforme, con una coloración verde claro en la parte inferior de la hoja y verde grisáceo en su parte superior, sin manchas y con venaduras finas, utilizando tijeras. Se realizaron tres recolecciones en distintas fechas del mes de marzo, obteniendo las hojas de un ejemplar distinto en cada recolección y juntando un aproximando de entre 30 a 40 hojas por cada recolección.

Cada muestreo fue llevado al Laboratorio de Química Inorgánica del Instituto de Ciencia BUAP, en donde las hojas de *I. arborescens* fueron colocadas en una charola de aluminio y llevadas a deshidratación en el horno de secado entre 6 y 8 horas a 120°C (Figura 9). Una vez transcurrido este tiempo fueron trituradas manualmente y pesadas en la balanza analítica, reportando los pesos en la Tabla 5.

Tabla 5. Pesos totales registrados de la recolección de materia seca del muestreo de hojas de *I. arborescens*.

Número de lote	Peso de materia seca (g)
1	11.0348
2	10.6662
3	11.0958



Figura 9. Selección y deshidratación de hojas de *I. arborescens*. Izquierda: Hojas jóvenes de cazahuate. Derecha: Hojas deshidratadas en horno de calentamiento.

Obtención de extractos de cazahuate de distinta polaridad.

Para el presente trabajo la selección de disolventes se basó en la metodología seguida por Oropeza Guerrero (2012), en donde se obtienen extractos de *Ipomoea murucoides*.

Se realizó la primera extracción general utilizando MeOH (F0). En un vaso de precipitados se colocaron 10 g de las hojas trituradas de cazahuate junto con 50 mL de MeOH. Se maceraron las hojas por 15 minutos.

Se realizó una primera separación por decantación, dejando la parte sólida en el vaso de precipitados y pasando el extracto metanólico a otro. Posteriormente el extracto se filtró con gravedad para eliminar cualquier impureza utilizando papel filtro cualitativo grado 1 de 150 μm . Se agregaron 10 mL de HCl 1 M hasta alcanzar un pH de 2 (F1), que se determinó con tiras de medición de pH. Se añadió al extracto 25 mL de hexanos para realizar la separación de alcaloides (F2) y se dejó en reposo por 5 minutos. Al formarse dos fases inmiscibles se procedió a realizar separación líquido/líquido utilizando un embudo de separación. La fase F1 se basificó con NaOH hasta obtener un pH de 12 y posteriormente se extrajeron los alcaloides con

15 mL CHCl_3 (F3), obteniendo una nueva fase conformada por compuestos fenólicos. El procedimiento se realizó por triplicado.

Este proceso se llevó a cabo una temperatura ambiente (aproximadamente 27°C) en la ciudad de Puebla de Zaragoza, Puebla.

Estudios por UV/Vis.

Para el análisis de la actividad antioxidante se realizó una preparación de DPPH 0.02 mM en MeOH pesando 0.039 gr de DPPH, disolviéndolo en un volumen de 50 mL. Se guardó en el refrigerador en ausencia de luz. Para cada ensayo se utilizó preparación fresca diluyéndola en MeOH en una proporción 1:100.

Para realizar las mediciones con UV/Vis el procedimiento se dividió en dos etapas de acuerdo a la proporción de las fases orgánicas. Primeramente, se midieron los espectros de los tres extractos puros y de la preparación de DPPH 0.02 mM con espectrofotometría UV/Vis en una región comprendida entre 200-800 nm. Así también se realizaron dos ensayos de cuantificación de actividad antirradicalaria para cada uno de los tres extractos obtenidos en diferentes proporciones: con 0.02 mL y 0.1 mL de extracto, etiquetados como EVol1, EVol2 respectivamente. Las reacciones fueron llevadas a cabo con 3000 μL de DPPH 0.02 mM (Tabla 6).

La segunda etapa consistió en medir las mismas fases con una mayor concentración. Esto se realizó deshidratando 5 mL de cada uno de los lotes de las tres fases en viales mediante la deshidratación. Una vez obtenidos los concentrados finales los viales fueron pesados (antes y después de la deshidratación) (Tabla 7) para así, calcular la concentración por cada mililitro de muestra de cada lote perteneciente a las tres fases orgánicas (Tabla 6). Posteriormente los lotes se reintegraron añadiendo 1 mL de MeOH a cada vial y homogeneizando con ayuda de una micropipeta. Una vez reconstituidos se realizaron los ensayos de capacidad antirradicalaria en dos proporciones diferentes de extracto: con 0.02 y 0.05 mL, etiquetados como EVol3 y EVol4, respectivamente. Las reacciones fueron llevadas a cabo en presencia de 3000 μL de DPPH 0.02 mM. Para obtener la concentración de cada uno de los cuatro ensayos realizados para cada fase orgánica se multiplicó

la concentración por mililitro de los nueve lotes por la cantidad de extracto que utilizada (Tabla 6).

Tabla 6. Ensayos de actividad antirradicalaria con DPPH en distintas proporciones y concentraciones con las tres fases orgánicas. Complemento en Anexo IV.

Nombre del ensayo	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO F1			Volumen de extracto usado en cada ensayo (mL)	CONCENTRACIÓN FINAL EN LA CELDA EN ENSAYOS DE FASE F1			
	mg/mL				Concentración · Vol. usado en la reacción			
	F1L1	F1L2	F1L3		F1L1	F1L2	F1L3	PROMEDIO
EVol1	4.544	0.162	1.092	0.02	0.0908	0.0032	0.0218	0.04706
EVol2	4.544	0.162	1.092	0.1	0.4544	0.0162	0.1092	0.2353
EVol3	227.2	8.1	54.6	0.02	4.544	0.162	1.092	2.353
EVol4	227.2	8.1	54.6	0.05	11.36	0.405	2.73	5.8825
Peso de cada concentrado por lote (mg)					227.2	8.1	54.6	---
Nombre del ensayo	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO F1			Volumen de extracto usado en la reacción (mL)	CONCENTRACIÓN FINAL EN LA CELDA EN ENSAYOS DE FASE F2			
	mg/mL				Concentración · Vol. usado en la reacción			
	F2L1	F2L2	F2L3		F2L1	F2L2	F2L3	PROMEDIO
EVol1	0.392	0.012	0.148	0.02	0.0196	0.0006	0.0074	0.0196
EVol2	0.392	0.012	0.148	0.1	0.098	0.003	0.037	0.098
EVol3	9.8	0.3	3.7	0.02	0.196	0.006	0.074	0.196
EVol4	9.8	0.3	3.7	0.05	0.49	0.015	0.185	0.49
Peso de cada concentrado por lote (mg)					9.8	0.3	3.7	---
Nombre del ensayo	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO F1			Volumen de extracto usado en la reacción (mL)	CONCENTRACIÓN FINAL EN LA CELDA EN ENSAYOS DE FASE F3			
	mg/mL				Concentración · Vol. usado en la reacción			
	F3L1	F3L2	F3L3		F3L1	F3L2	F3L3	PROMEDIO
EVol1	0.98	1.086	0.766	0.02	0.0294	0.007	0.0198	0.031
EVol2	0.98	1.086	0.766	0.1	0.147	0.035	0.099	0.155
EVol3	14.7	16.3	3.5	0.02	0.294	0.07	0.198	0.31
EVol4	14.7	16.3	3.5	0.05	0.735	0.175	0.495	0.775
Peso de cada concentrado por lote (mg)					14.7	16.3	3.5	---

Tabla 7. Pesos de los viales antes y después de la deshidratación de cada lote de los tres extractos.

VIAL	PESO SIN SECAR (g)	PESO DESPUÉS DE SECAR (g)	PESO FINAL (g)	PESO FINAL (mg)
F1L1	8.7022	8.475	0.2272	227.2
F1L2	8.3624	8.3543	0.0081	8.1
F1L3	8.4083	8.3537	0.0546	54.6
F2L1	8.3979	8.3881	0.0098	9.8
F2L2	8.2106	8.2103	0.0003	0.3
F2L3	8.367	8.3633	0.0037	3.7
F3L1	8.4896	8.4749	0.0147	14.7
F3L2	8.3537	8.3374	0.0163	16.3
F3L3	8.3199	8.3164	0.0035	3.5

Estudios por RMN.

Para realizar el estudio por RMN se obtuvo un nuevo extracto metanólico de *I. arborescens* con metanol deuterado (F1D). Se maceró una muestra de hojas de cazahuate con metanol deuterado, se centrifugó y se filtró. Asimismo, se elaboró una disolución de DPPH con metanol deuterado 0.0129337 M.

Se realizó un ensayo para determinar las concentraciones óptimas de la muestra a analizar en el espectrómetro con el fin de obtener una reacción lenta entre el extracto F1D y el DPPH.

El ensayo se elaboró siguiendo las cantidades indicadas en la Tabla 8.

Tabla 8. Ensayos realizados con la finalidad de determinar una reacción en un tiempo conveniente para introducirla en el equipo. Los experimentos siguientes se realizaron considerando las concentraciones de muestra número 3*.

Ensayo	DPPH (μL)	Metanol deuterado. (μL)	F1D (μL)	Total (μL)	Tiempo de reacción aproximado.
E1	20	900	0	920	Indeterminado.
E2	20	900	20	940	Indeterminado.
E3*	20	900	60	980	30 min.
E4	20	900	100	1020	9 min.
E5	20	900	200	1120	Segundos.
E6	20	900	500	1420	Segundos.

Se realizaron dos mediciones de los espectros de hidrógeno con los siguientes parámetros (Tablas 9 y 10).

Tabla 9. Primera medición. Concentración de DPPH: 0.0129337 molar. En donde: DPPH corresponde la muestra que contiene DPPH; F1D corresponde a la muestra que contiene extracto de cacahuate con metanol deuterado; E3 corresponde al ensayo antirradicalario seleccionado anteriormente (Tabla 8).

N. Muestra	Nombre	Metanol (D)	DPPH	F1D	Total
1	DPPH	900	20	-	920
2	F1D	900	-	60	960
3	E3	900	20	60	980

Tabla 10. Segunda medición. Concentración de DPPH: 0.0129337 molar. En donde: DPPH corresponde la muestra que contiene DPPH; F1D corresponde a la muestra que contiene extracto de cazahuate con metanol deuterado; E3 corresponde al ensayo antirradicalario seleccionado anteriormente (Tabla 8).

N. Muestra	Nombre	Metanol (D)	DPPH	F1D	Total
1	DPPH	900	60	-	960
2	F1D	900	-	60	960
3	E3	900	60	60	1020

Análisis de actividad antioxidante.

Espectrofotometría con UV/Vis.

Se recolectaron los datos experimentales obtenidos de los ensayos de actividad antirradicalaria con espectrofotometría de UV/Vis. Se analizaron los espectros obtenidos, haciendo un monitoreo de la banda de absorción en el UV/Vis a $\lambda_{\max} = 516$ nm.

Haciendo uso de Excel se seleccionaron y ordenaron las absorbancias obtenidas en 516 nm de cada fase orgánica extraída en tres repeticiones (lotes), así como a la proporción extracto/DPPH usados en los experimentos.

Se calculó la concentración de los extractos orgánicos obtenidos en cada lote utilizando el peso de concentrado obtenido de cada extracción, así como los mililitros de disolvente utilizado en cada una (mg/mL).

A partir de las absorbancias plasmadas se obtuvo el porcentaje de inhibición haciendo uso de la fórmula (Nadri et al., 2014):

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) 100$$

Donde A_0 = Absorbancia del DPPH a 516 nm

A_1 = Absorbancia de cada lote a 516 nm.

Así también el porcentaje de captación de radicales (Kulisic et al., 2004).

$$\% \text{ de captación} = (A_0 - A_1 / A_0)$$

Donde A_0 = Absorbancia del DPPH en 516 nm

A_1 = Absorbancia de cada lote en 516 nm.

Una vez obtenido este porcentaje se procede a realizar gráficos de concentración vs % de inhibición, en donde se analizó si las tres repeticiones eran válidas para ser promediadas al tener valores semejantes entre sí. Se descartaron aquellos lotes que pudieran representar una diferencia significativa. Se promediaron entonces aquellos lotes de la misma fase con valores semejantes, posteriormente se graficó cada fase orgánica.

Finalmente, el parámetro de IC_{50} se obtuvo por intersección directa en el gráfico obtenido para cada experimento, la determinación se hizo en el software computacional OriginPro 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts.)

Espectrometría de RMN

Se analizaron cinco espectros en total (Anexo II). Primeramente, aquellos que caracterizaban los compuestos a estudiar, es decir, el espectro a 1H a temperatura ambiente para la molécula DPPH y para el extracto en metanol deuterado de las hojas del cacahuate. El análisis de los tres espectros restantes corresponde al comportamiento de la reacción entre DPPH y F1D en el tiempo inicial, al final del experimento y a lo largo de los 10 minutos del ensayo.

Los espectros resultantes fueron comparados con bandas de espectros obtenidos en este tipo de ensayos antirradicalarios, así como de compuestos vegetales reportados en la literatura ubicadas en las mismas regiones en las que se observaron las bandas obtenidas experimentalmente.

RESULTADOS.

Obtención de extractos de cazahuate de distinta polaridad.

Tres fases orgánicas fueron extraídas por triplicado a partir del extracto crudo obtenido de hojas de cazahuate de acuerdo a la polaridad de los compuestos que contienen utilizando disolventes orgánicos como metanol, hexano y cloroformo, así como reactivos ácido-básicos para precipitar algunos metabolitos como la clorofila (Figura 10).

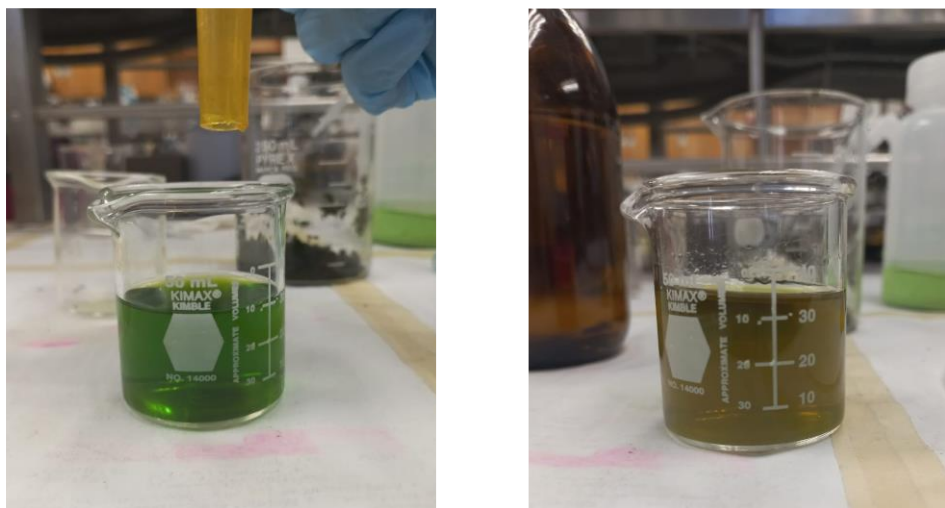


Figura 10. Izquierda: Extracto crudo F0. Derecha: Extracto F1 con clorofilas removidas.

Primero, se realizó un experimento rápido de colorimetría para observar el cambio físico del DPPH ante las hojas y extractos de cazahuate, obteniendo un efecto inmediato cambio de color del DPPH 0.02 mM en MeOH con las hojas de cazahuate deshidratadas y trituradas. Se observó que de las reacciones prueba con los tres distintos extractos, la fase F1 obtuvo el mejor viraje de color del DPPH en un tiempo menor a 5 minutos (Figura 11). Los volúmenes finales obtenidos son reportados en la Tabla 11.

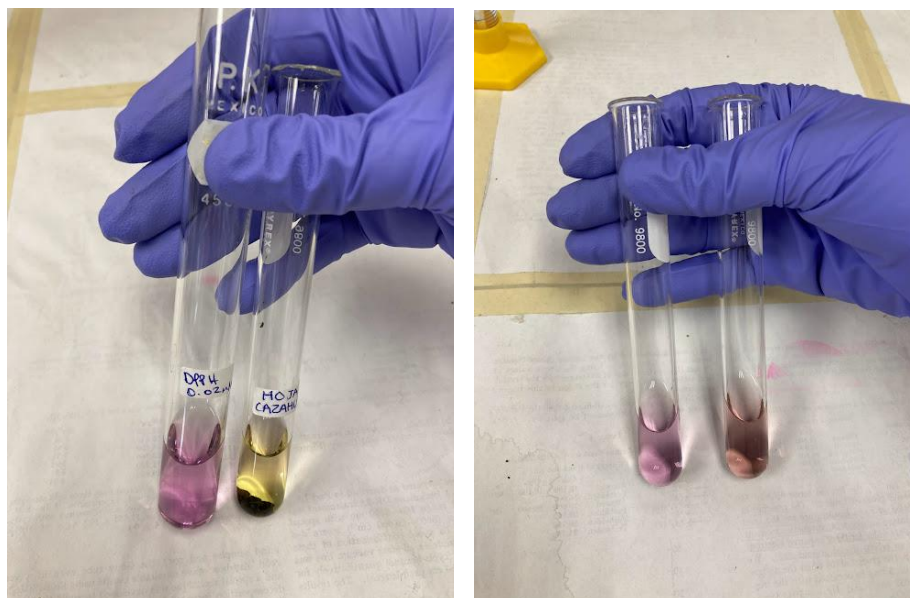


Figura 11. Izquierda: Comparación del cambio de color de DPPH 0.02 Mm con hojas deshidratadas de cazahuate en un tiempo menor a 5 minutos. Derecha: Comparación del cambio de color de DPPH 0.02 mM ante la fase F1 en un tiempo menor a 5 minutos.

Tabla 11. Volúmenes finales obtenidos de cada extracto orgánico.

Nombre de extracto	Disolvente utilizado	Volumen obtenido (mL)
F1	Metanol	50
F2	n-Hexano	25
F3	Cloroformo	15

Estudios por UV/Vis.

Se obtuvieron las concentraciones mediante cálculos estequiométricos utilizando los pesos obtenidos de cada lote de las tres fases deshidratadas, así como la cantidad de disolvente utilizado en el proceso de extracción (peso/volumen) (Tabla 6).

Tabla 12. Absorbancias obtenidas en 516 nm en los cuatro ensayos realizados.

Nombre del ensayo	ABSORBANCIA											
	F1				F2				F3			
	L1	L2	L3	PROMEDIO (L2-L3)	L1	L2	L3	PROMEDIO (L1-L2)	L1	L2	L3	PROMEDIO (L2-L3)
EVol1	0.0597	0.0029	0.0097	0.0063	0.2199	0.0115	0.2219	0.1157	0.2227	0.0098	0.1837	0.09675
EVol2	0.0621	0.0233	0.0513	0.0373	0.0963	0.0134	0.2169	0.05485	0.2654	0.0702	0.1929	0.13155
EVol3	0.0577	0.1488	0.156	0.1524	0.1092	0.1345	0.2075	0.12185	0.1469	0.1653	0.165	0.16515
EVol4	0.0713	0.1598	0.1701	0.16495	0.1187	0.1427	0.2232	0.1301	0.1798	0.1714	0.1619	0.16665

De igual forma se analizaron las absorbancias medidas en 516 nm de cada espectro resultante de las reacciones entre DPPH y las tres fases orgánicas a distintos volúmenes, tomando en cuenta que el volumen de DPPH usado en cada reacción en la cubeta espectrofotómetro fue estable, siendo de 3000 μ l (Tabla 12).

Utilizando las absorbancias a 516 nm y la absorbancia del DPPH obtenida a la misma longitud de onda se calcularon los porcentajes de captación de radicales y de inhibición del DPPH (Tabla 13-14).

Tabla 13. Porcentajes de captación de radicales obtenidos para cada fase orgánica.

PORCENTAJES DE CAPTACIÓN RADICALARIA			
NOMBRE DEL ENSAYO	PROMEDIO FASE F1	PROMEDIO FASE F2	PROMEDIO FASE F3
EVol1	3.098868667	74.32365962	47.58976881
EVol2	18.34727004	26.97983276	64.70732907
EVol3	74.96310871	59.81308411	81.23462863
EVol4	83.52188883	64.01869159	81.9724545

Tabla 14. Porcentajes de inhibición del DPPH obtenidos para cada fase orgánica.

PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DEL DPPH			
NOMBRE DEL ENSAYO	PROMEDIO FASE F1	PROMEDIO FASE F2	PROMEDIO FASE F3
EVol1	96.90113133	25.67634038	52.41023119
EVol2	81.65272996	73.02016724	35.29267093
EVol3	25.03689129	40.18691589	18.76537137
EVol4	16.47811117	35.98130841	18.0275455

De esta forma se construyeron gráficos que expresan la relación entre las concentraciones obtenidas de los extractos orgánicos y el porcentaje de eliminación del radical libre del DPPH logrado (Figuras 12-14)

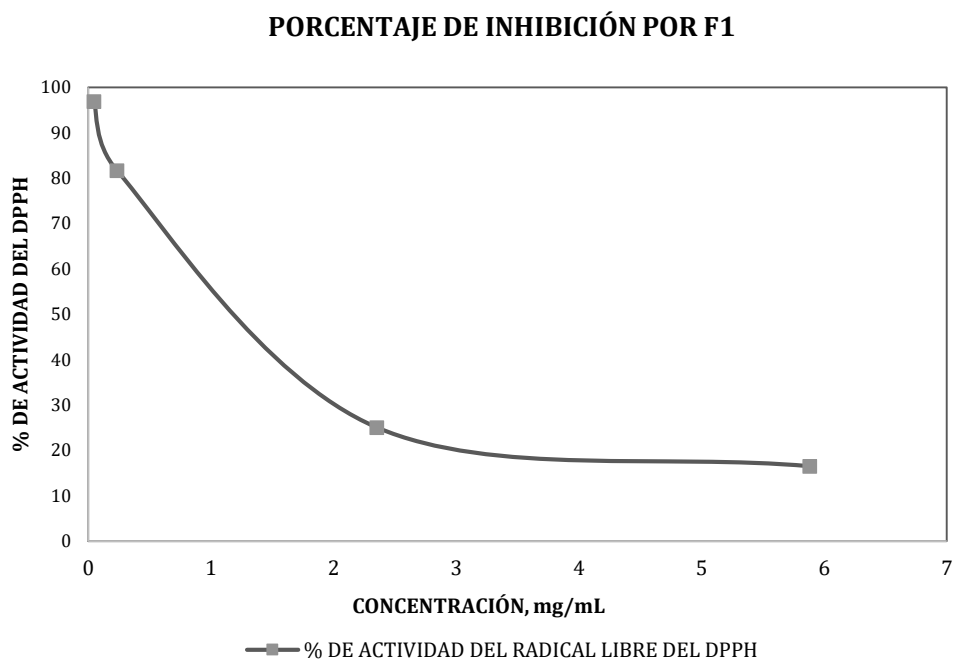


Figura 12. Gráfico resultante de la relación de las concentraciones obtenidas de la fase F1 y el porcentaje de inhibición del radical libre del DPPH que logró la misma.

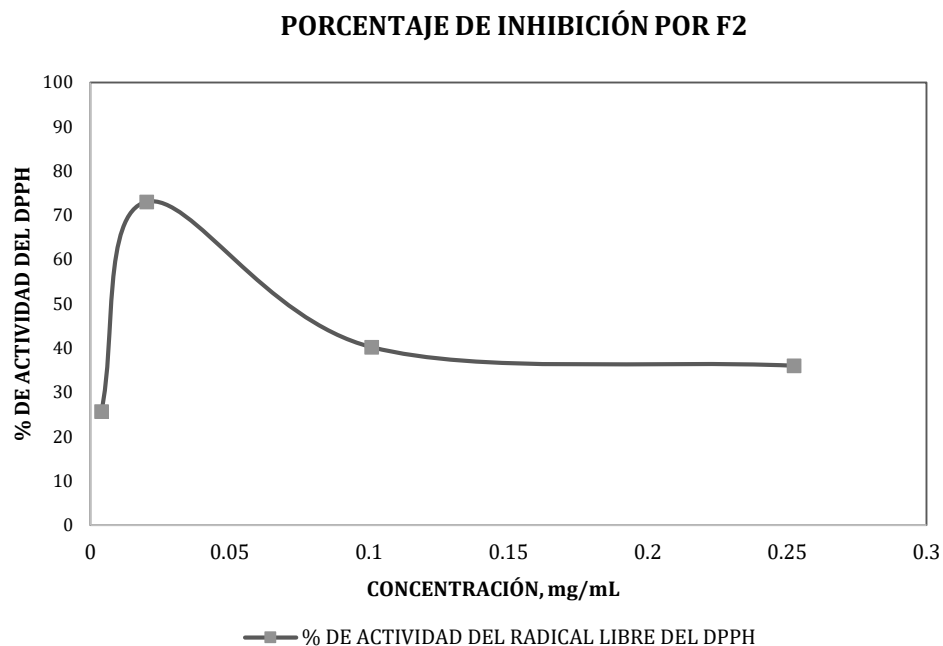


Figura 13. Gráfico resultante de la relación de las concentraciones obtenidas de la fase F2 y el porcentaje de inhibición del radical libre del DPPH que logró la misma.

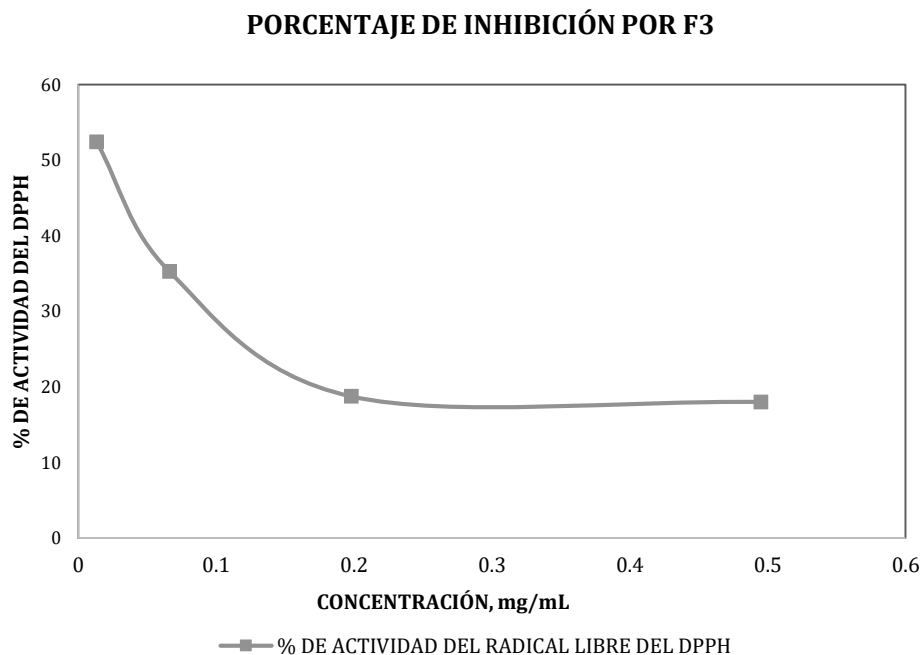


Figura 14. Gráfico resultante de la relación de las concentraciones obtenidas de la fase F3 y el porcentaje de inhibición del radical libre del DPPH que logró la misma.

La curva de inhibición construida para la fase F1 es aquella que muestra un mayor porcentaje de eliminación del DPPH obteniendo un máximo de 83.52% de captación radicalaria en una concentración de 5.88 mg/mL. Sin embargo, en contraste con esta, la fase F3 muestra resultados similares con concentraciones menores al alcanzar un máximo porcentaje de captación de radicales de 81.97% del DPPH en una concentración de 0.495 mg/mL con un porcentaje de inhibición máximo del 18.02%. Por otro lado, la fase orgánica F2 fue la que mostró un resultado menos satisfactorio al no presentar un comportamiento consistente como las anteriores fases, siendo el máximo porcentaje de captación de radicales 64.01% a una concentración de 0.25 mg/mL; asimismo se obtuvo un porcentaje de inhibición del 35.98% a la misma concentración.

Asimismo, se graficaron los espectros obtenidos con espectrometría UV-Vis medidos en los cuatro ensayos de capacidad antirradicalaria de cada fase orgánica para realizar la comparativa con el blanco, es decir, el DPPH 0.02 mM en un rango de 400-600 nm (Anexo I). En total se llevaron a cabo doce ensayos por cada fase al haber realizado triplicado en cada uno de los cuatro ensayos en donde la variable fue la concentración de las fases orgánicas usada en cada ensayo.

Los espectros obtenidos de los tres lotes de la fase F1 en los cuatro ensayos realizados fueron aquellos que mostraron una mayor reducción en la señal del DPPH a una longitud de onda de 516 nm, a la cual se registró la mayor señal de este último.

En el caso de la fase F2 siete de los doce ensayos tuvieron una reducción importante de la señal del DPPH en 516 nm, siendo el lote 1 y el lote 2 aquellos que mostraron una mejor inhibición del radical libre debido a una mayor concentración obtenida en estos lotes.

Los gráficos de los espectros de la fase F3 señalan que los lotes que mostraron una mejor reducción de la señal del DPPH fueron aquellos que tenían una mayor concentración (ensayos EVol3 y EVol4). Cabe señalar que en los ensayos EVol1 y EVol2 de esta fase se obtuvieron reducciones de la señal del DPPH en cuatro lotes, y aquellos dos que no lograron resultados satisfactorios eran espectros pertenecientes al lote 1.

Finalmente se obtuvo el valor de IC_{50} para las fases F1 y F3, las cuales obtuvieron un valor de 1.42 mg/mL y 0.0206 mg/mL respectivamente. Es importante señalar que no fue posible calcular el IC_{50} para la fase F2 debido a que esta no demostró resultados proporcionales entre sí que permitieran obtener este valor.

Estudios por RMN.

Todas las señales características el metanol deuterado fueron eliminadas durante el tratamiento de los resultados. El color de cada grafico (Anexo II) es característico de la muestra siendo verde para el extracto de cacahuate, morado para el DPPH, rojo para el inicio de la reacción entre DPPH y F1D, y azul al final de la medición. Todos los espectros tendrán la señal característica del tetrametilsilano como referente (Figura 15).

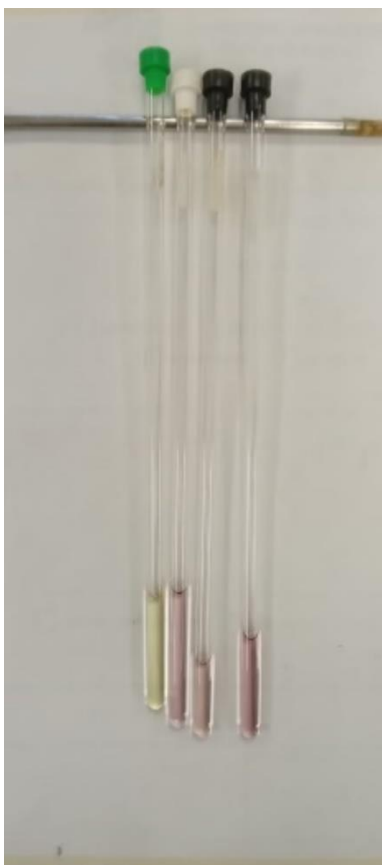


Figura 15. Tubos de cuarzo con las muestras a analizar. De izquierda a derecha:
1) Muestra de extracto de cacahuate en metanol deuterado. 2) DPPH 0.0129337 molar preparado con metanol deuterado. 3) y 4) Reacciones del DPPH deuterado con el extracto de cacahuate a distintos volúmenes.

Al aumentar la concentración del DPPH se pudo obtener un espectro más claro con las señales más características de sus anillos aromáticos evidentes en 7 a 8 partes por millón (Figura 16).

Referente al poder oxidativo del cacahuate los resultados indican que los compuestos responsables de este cambio se ubican entre 1 y 2 partes por millón correspondiente a aminoácidos y de 3 a 5.5 partes por millón una zona característica de azúcares y compuestos fenólicos (Kim et al., 2010).

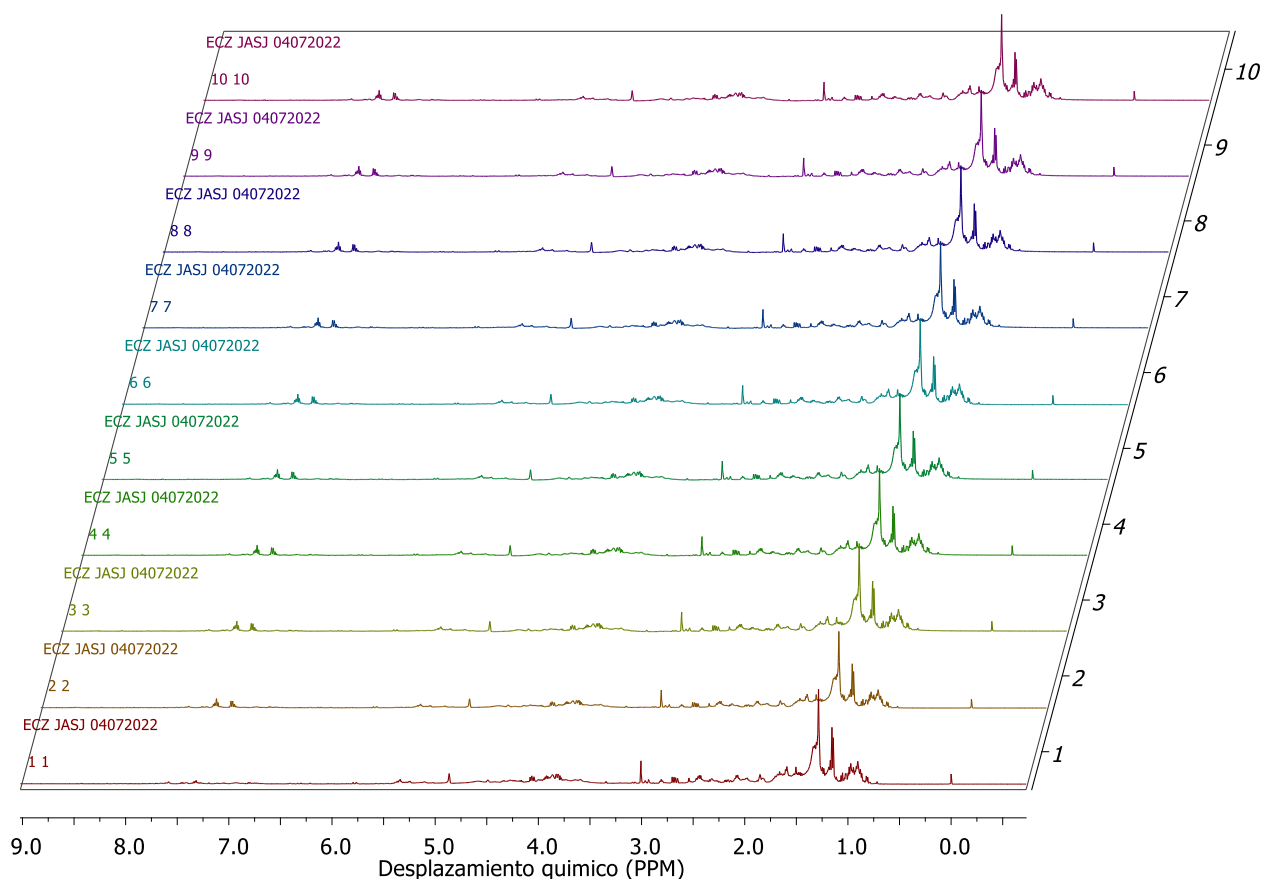


Figura 16. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la reacción entre el DPPH y F1D, durante 10 minutos, cada minuto (de arriba hacia abajo).

En la Figura 17 podemos apreciar en los espectros de RMN el cambio en la zona de los protones aromáticos (7-8 ppm), indicando que la interacción con el DPPH es más probable que se esté dando entre el electrón del radical libre y los componentes fenólicos. Dicho cambio se llevó a cabo después de 10 minutos de la mezcla entre los componentes.

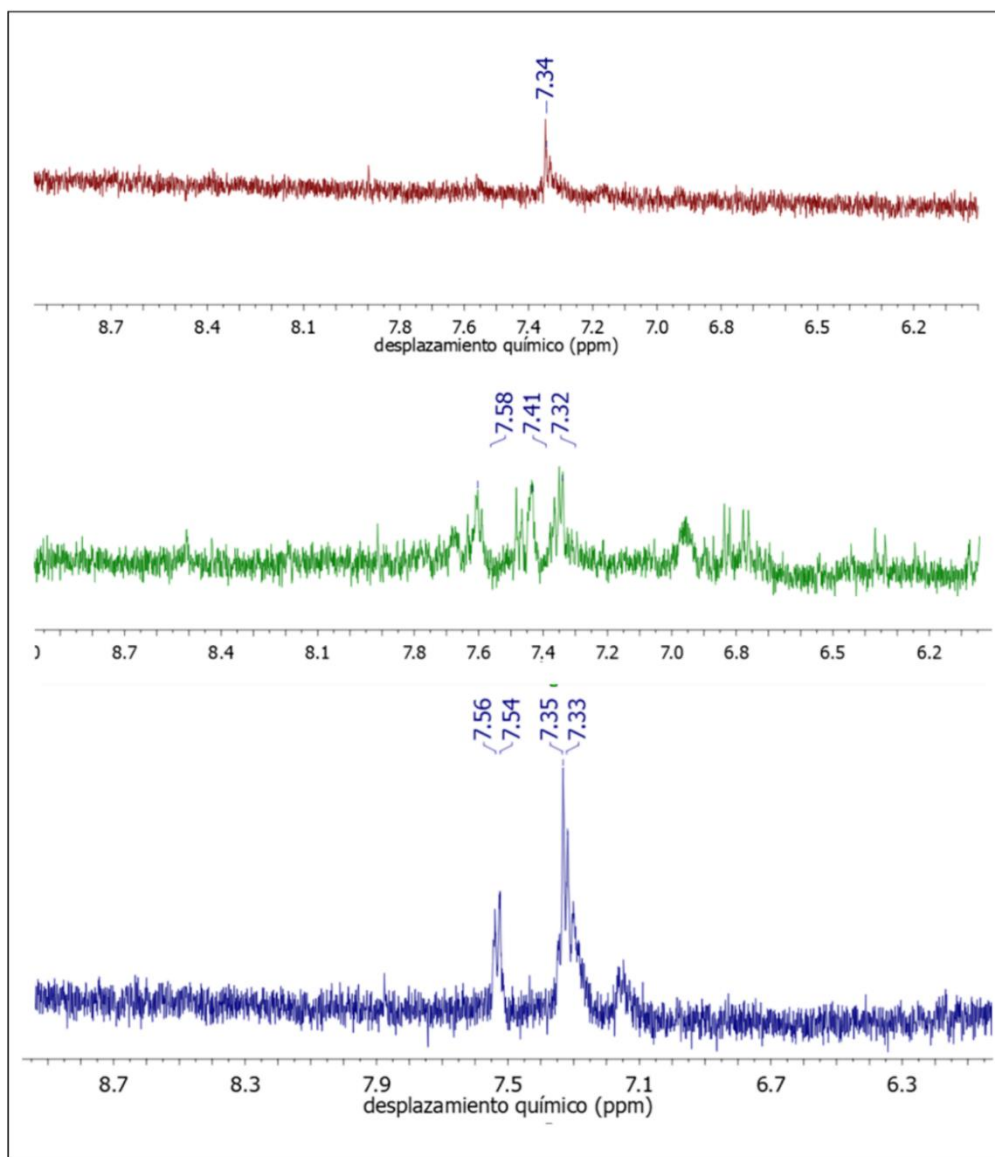


Figura 17. Espectros obtenidos detallados en la región de 7-8 ppm. En rojo se presenta el espectro obtenido de la disolución de DPPH con metanol deuterado 0.0129337 M. En verde se presenta el espectro del extracto de cacahuate con metanol deuterado. En azul se muestra el espectro obtenido en la reacción de la mezcla entre DPPH y extracto de cacahuate.

DISCUSIÓN.

Obtención de extractos de cazahuate de distinta polaridad.

Siguiendo la metodología propuesta por Oropeza Guerrero (2012), se utilizaron tres disolventes de distintas polaridades para realizar las extracciones: metanol, cloroformo y hexano (en orden decreciente de acuerdo a su polaridad). A lo largo de la etapa de extracción de fases orgánicas se utilizaron disolventes con un alto grado de pureza ya que, aunque generalmente los disolventes son inertes en la extracción, se ha demostrado que en algunas ocasiones presentan actividad que interviene en las propiedades extractivas y la selectividad del agente de extracción (García-Díaz, 2014). Sin embargo, es de interés tomar en cuenta para futuros trabajos la evaluación del efecto del uso de disolventes diluidos en el rendimiento de extracción de metabolitos como en la investigación realizada por Soto-García y colaboradores (2016) en donde se obtuvo un mejor rendimiento de extractos fenólicos de *P. durangensis* usando una mezcla de etanol-agua con 50% de etanol que aquellas disoluciones en donde el etanol se encontraba al 80% o al 20%. Es importante mencionar además que el uso de alcoholes como disolventes en procesos como la maceración es un método de extracción que alcanza altos rendimientos de obtención fenoles totales y antocianinas (Zhang, 2018), un factor importante a tomar en cuenta con relación a la fase F1, la cual alcanzó el mayor porcentaje captación de radicales libres.

Este proceso se realizó a temperatura ambiente, aproximadamente a 27°C. Aunque esta condición puede conllevar a una mayor inversión de tiempo, en comparación con metodologías en donde se aplica calor, es recomendable hacerlo a menores temperaturas para evitar la degradación de ciertos componentes volátiles como los flavonoides.

Otro factor importante a mencionar es la relación de los metabolitos obtenidos de las hojas deshidratadas de *I. arborescens* con relación a su periodo de maduración, de acuerdo a Oropeza Guerrero (2012), la recolección de hojas *I. murucoides* en su periodo de defoliación en el mes de noviembre podría significar una limitante en el estudio, ya que este proceso natural podría significar una colecta pobre, puesto que

la mayoría de las hojas alcanzan el punto de senescencia. Para este estudio se recolectaron hojas con un aspecto sano a lo largo del mes de marzo, época en la que la floración del cazahuate termina y donde se pueden encontrar hojas maduras y jóvenes en su follaje (Loera Casillas, 2016). Kacharava N. y colaboradores (2009) demostraron que la irradiación puede afectar el nivel de antioxidantes en el repollo y hojas de remolacha durante el pretratamiento antes de la extracción y Nantitanon W., y colaboradores (2010) señalan que el proceso y la etapa de madurez de la hoja de guayaba afectan su actividad antioxidante.

Estudios por UV/Vis y por RMN.

La fase orgánica F1 obtuvo el mayor porcentaje de reducción del DPPH en el ensayo de actividad antirradicalaria, obteniendo un máximo porcentaje captación radicalaria 83.52% y un porcentaje de inhibición de hasta de 16.47% con un IC_{50} de 1.42 mg/mL. Para esta fase se utilizó MeOH como disolvente de extracción, un alcohol de alta polaridad afín a compuesto fitoquímicos como las cumarinas, alcaloides, carbohidratos reductores, así como fenoles y/o taninos (Arias-Cedeño et al., 2022)

Como se mencionó anteriormente, se recurre con frecuencia a los disolventes alcohólicos para la investigación fitoquímica dada las ventajas de costos, rendimiento y facilidad de obtención. Así pues, el MeOH ha sido empleado en otras metodologías de extracción en el género *Ipomoea* para su determinar su capacidad antioxidante.

Para *I. batatas* se obtuvieron derivados del ácido caféico en fase metanólica provenientes de la raíz. Se reportó una destacable actividad antioxidante superior a la de estándares utilizados como el ácido gálico y el ácido ascórbico en la misma concentración molar (Dini et al., 2006). Con relación a la misma especie, (Hue et al., 2012) determinaron el IC_{50} de distintas variedades de *I. batatas*, obteniendo un IC_{50} de 0.3724 mg/ ml para el extracto metanólico de la variante Indon y un IC_{50} de 0.59761 mg/ ml para el extracto de la variante Biru Putih, siendo la primera la de mayor desempeño en la captación de radicales libres. Por otro lado, se comparó el potencial antioxidante del té de hojas de esta misma especie con el té verde, ampliamente conocido por ser un excelente antioxidante. Se obtuvo un porcentaje

de inhibición del extracto metanólico del 68% frente al radical libre DPPH, demostrando ser equivalente al obtenido con el té verde (Cervantes-Sierra et al., 2019).

Ambiga y colaboradores (2015) determinaron la actividad antioxidante de *I. carnea* en solución etanólica, estimando un valor de IC_{50} de 0.0994 mg/mL, sugiriendo que se requiere de una baja concentración para obtener un 50% de inhibición de DPPH (Tabla 15).

Se observa que la especie *Ipomoea* generalmente obtiene resultados satisfactorios en pruebas de inhibición antirradicalaria con extractos metanólicos; no obstante, es importante señalar que es difícil comparar resultados con exactitud debido a que en los trabajos mencionados se aplican diferentes condiciones de estudio y análisis.

Dada la eficacia de la fase F1 y la disposición de reactivos deuterados se decidió realizar el ensayo de capacidad antirradicalaria con DPPH con el extracto análogo en condiciones aptas para el análisis en RMN. La principal ventaja de este segundo análisis es la posibilidad de identificar que grupos funcionales son los que directamente intervienen en la señal de inhibición del DPPH. De esta forma se analizó que este cambio se da en la zona de los protones aromáticos (7-8 ppm), indicando que la interacción con el DPPH es más probable que se esté dando entre el electrón del radical libre y los componentes fenólicos.

La fase F2 careció de un comportamiento consistente a diferencia de las otras dos curvas de inhibición obtenidas, por lo cual, no fue posible calcular el IC_{50} de este extracto basado en el uso del hexano. Este presentó irregularidades principalmente en las primeras dos concentraciones menores aplicadas en los ensayos. Aunque no es posible determinar con exactitud la fuente del error, se infieren en algunas razones profundizadas en los antecedentes de este trabajo como la incertidumbre espectrofotométrica, la selección del disolvente, la calidad del instrumento de medición, las condiciones ambientales y la habilidad del operador que los realiza. Así también se sugiere que la falta de homogeneidad en la evaluación de esta fase puede deberse a que el blanco usando en la primera etapa de pruebas de UV/Vis (que es donde se presentan las irregularidades en el caso de la fase F2) fue evaluado en una disolución de MeOH y no en una de Hexanos, por lo que podría

haber una inconsistencia relacionada a la naturaleza de estos disolventes y su interacción con el DPPH.

Pese a las irregularidades presentadas se obtuvo un máximo porcentaje de captación radicalaria de 64.01% a una concentración de 0.25 mg/mL, el rendimiento menos satisfactorio obtenido en este estudio. Este resultado puede relacionarse con resultados reportados en la literatura, en donde generalmente el uso de n-hexano proporciona bajos porcentajes de inhibición de DPPH, tal es el caso del extracto de n-hexano con *I. leari* (Porwal et al., 2012).

La fase F3, en la cual se empleó CHCl_3 , obtuvo un porcentaje máximo de eliminación del radical libre del DPPH de 81.97% con un valor de IC_{50} de 0.0206 mg/mL. De acuerdo con la literatura, este extracto de origen no polar alberga componentes terpenoides y flavonoides de naturaleza lipídica que proporcionaron un buen rendimiento en la inhibición del DPPH. En la prueba de capacidad antirradicalaria llevada a cabo con el extracto clorofórmico de *I. leari* se obtuvo un valor de IC_{50} muy similar al anteriormente mencionado siendo de 0.02502 mg/mL. A pesar de que esta fase no fue estudiada en RMN en esta investigación, se encontró que los metabolitos recuperados con CHCl_3 en otras especies de *Ipomoea* están relacionados con otro tipo de compuestos fenólicos como los flavonoides; este grupo de compuestos juegan un papel importante en la actividad antioxidante de sistemas vegetales.

Estos tres tipos de extractos provenientes de otras especies de *Ipomoea* ya han sido aplicadas en pruebas *in vitro* e *in vivo* para evaluar propiedades de interés como propiedades anticancerígenas, antibacterianas y antifúngicas, entre otras.

En comparación con los antecedentes anteriormente mencionados, los parámetros IC_{50} resultantes de la fase F1 y F3 tienen valores muy cercanos a aquellos reportados en literatura, siendo el extracto F3 aquel con el mejor desempeño de inhibición del DPPH a una concentración menor. A pesar de que el IC_{50} de la fase F1 es mayor al de la mayoría de los otros parámetros reportados en literatura, se considera un buen valor en comparación con el parámetro IC_{50} obtenido de *I.*

murucoides, en donde Oropeza Guerrero (2012) concluye en su trabajo que la eficiencia antirradicalar del extracto metanólico de *I. murucoides* fue baja (Tabla 15).

Tabla 15. Comparativos de parámetros IC_{50} de especies de *Ipomoea* reportados en la literatura con los IC_{50} obtenidos en este trabajo (*) ordenados en forma ascendente.

Extractos del género <i>Ipomoea</i>	Disolvente	IC_{50} (mg/mL)
<i>I. arborescens</i>*	CHCl₃	0.0206
<i>I. leari</i>	CHCl ₃	0.02502
<i>I. carnea</i>	MeOH	0.0994
<i>I. batatas</i> var. <i>Indon</i>	MeOH	0.3724
<i>I. batatas</i> var. <i>Biru Putih</i>	MeOH	0.59761
<i>I. arborescens</i>*	MeOH	1.42
<i>I. murucoides</i>	MeOH	13663

A partir de este estudio se podría abrir el horizonte a futuras investigaciones para aprovechar el potencial antioxidante que *I. arborescens* presenta, en donde se implementen tecnologías con un mayor alcance de detección de metabolitos como la HPLC acoplado a masas, o incluso trabajos de investigación en donde se puedan aplicar estos extractos con la intervención de otras ramas del conocimiento como la microbiología, la medicina, la micología, e incluso la entomología. Asimismo, si es de interés seguir en la línea de investigación referente a la evaluación antioxidante de la planta, se pudieran aplicar otros tipos de ensayos que mediante diferentes tipos de principios propios de la naturaleza del radical que se use pueda integrar la información de este trabajo, como lo son el ensayo FRAP y el ensayo con ABTS.

CONCLUSIONES.

Basándonos en la literatura recuperada, así como en el conocimiento de la polaridad de determinados compuestos que generalmente se suelen aislar de especies vegetales, se diseñó una metodología adecuada a partir de la cual se pudieran extraer sustancias orgánicas propias del cazahuate. Estas fueron extraídas utilizando principalmente tres disolventes orgánicos: Metanol, hexano y cloroformo. Se observaron diferentes comportamientos en los ensayos de capacidad antirradicalaria realizados en el presente trabajo. De acuerdo a los espectros obtenidos de la fase F1 a través del uso de la técnica de RMN, se le atribuye su efecto inhibitorio del DPPH a la presencia de compuestos fenólicos y azúcares. F1 es la que presenta el mayor efecto de inhibición del radical libre del DPPH con un porcentaje de inhibición del DPPH del 16%, obteniendo un IC_{50} de 1.42 mg/mL. Asimismo, se obtuvo el IC_{50} de la fase F3, la cual logró una inhibición de hasta el 18.02%, con una IC_{50} de 0.0206 mg/mL, cantidad que nos indica una buena eficiencia respecto a la relación inhibición-concentración. A pesar de que esta fase no fue estudiada en RMN, es importante mencionar que de acuerdo a los resultados y a lo señalado en la revisión bibliográfica se sugiere que la especie cuenta con compuestos fenólicos a los que se les pueden atribuir esta capacidad antioxidante.

Dado que este es uno de los primeros estudios relacionados a la fitoquímica y composición de la *I. arborescens* es importante recalcar que podría ser un parteaguas para continuar con investigaciones referentes a esta planta, en donde se pudieran implementar el uso de otro tipo de técnicas analíticas que resuelvan las desventajas que se presentaron en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abubakar, A. R. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. . *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(1), 1-10.
- Ambiga, S. &. (2015). Evaluation of in vitro Antioxidant Activity of Ipomoea carnea Jacq. . *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. ISSN: 2319-7706 Volume 4 Number 5 (2015), 327-338.
- Amorati, R. &. (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. . *Free radical research*, 49(5), 633–649.
- Arévalo Hidalgo, A. G. (2006). EVALUACIÓN DE UN MÉTODO POR ESPECTROSCOPÍA. *Universidad De San Carlos De Guatemala*.
- Arias-Cedeño, Q. H.-E.-I.-M.-L. (2022). Caracterización fitoquímica y actividad antioxidante in vitro de extractos polares de frutos de Coccoloba uvifera L. *Revista Cubana de Química*, 34(2), 211–226.
- Block, G. D. (2002). Factors associated with oxidative stress in human populations. . *American journal of epidemiology*, 156(3), 274–285.
- Blokhina, O. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91 Spec No (2), 179–194. .
- Carocho, M. &. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. . *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 15-25.
- Cervantes-Sierra, R. B.C.Q. (2019). Evaluación de antioxidantes en el té de hojas de camote morado (Ipomoea batatas L.). *Revista Tecnología en Marcha*, 32(4), 51–59.

- Dini, I. T. (2006). New polyphenol derivative in Ipomoea batatas tubers and its antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8733–8737.
- Echavarría, A. D.-L.-d.-A. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales . *Revista Ciencia Unemi*, vol. 9, núm. 20, septiembre, 29-35.
- García, A. B. (2018). Aplicación de técnicas de resonancia magnética nuclear al estudio de miosistemas. *Universidad Complutense de Madrid*.
- García-Díaz, I. (2014). Estudio del sistema In(III)-H₂SO₄-líquido iónico PJMTH+HSO₄- mediante una tecnología avanzada de membranas líquidas. *Tesis para obtener el grado Máster. Universidad Rey Juan Carlos*. .
- Gómez Aguirre, Y. A. (2005). Establecimiento de un cultivo in vitro de ipomoea intrapilosa y evaluación de su actividad insecticida contra Trialeurodes vaporariorum. (*Tesis de Licenciatura*). *INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL*. .
- Hue, S. &. (2012). Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents in the leaves of different varieties of sweet potato (Ipomoea batatas). *Australian Journal of Crop Science*. 6, 375-380.
- Kacharava N, C. S. (2009). Effect of seed irradiation on the content of antioxidants in leaves of Kidney bean, Cabbage and Beet cultivars. . *Aust J Crop Sci* 3(3), 137-145.
- Kasote, D. M. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International journal of biological sciences*, 11(8), 982–991.
- Kedare S.B., S. R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 48, No. 4, 412-422.

- Kim, H. K. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature protocols*, 5(3), 536–549.
- Kumar, S. S. (2017). Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chinese Journal of Integrative Medicine*.
- León, I. M. (2006). Characterization of pentasaccharide glycosides from the roots of *Ipomoea arborescens*. . *Journal of natural products*, 69(6), 896–902.
- Loera Casillas, J. (2016). Biología reproductiva de *Ipomoea arborescens* (Convolvulaceae) en un bosque tropical caducifolio de Jalisco, México. *Biblioteca Digital UDG*.
- Lourenco, N. L. (2012). Bioreactor monitoring with Spectroscopy and chemometrics: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(4), 1211-1237.
- Lozada, S. M. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 17(3), 172–179. .
- Mahmoudi, S. D. (2021). Density functional theory studies of the antioxidants-a review. . *Journal of Molecular Modeling*, 27(9), 271.
- Manphae, A. S. (2022). Phytochemical contents and antioxidant activity of Thai sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) extracts. *Asian Journal of Plant Sciences*, 499–506.
- McPherson, G. (1981). Studies in *Ipomoea* (Convolvulaceae). The *Arborescens* group. . *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 527-545.
- Mehla, N. K. (2021). Applications of antioxidants: A review. *In Plant Antioxidants and Health*, 1–29.
- Meira, M. S. (2012). Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. . *Revista Brasileira de Farmacognosia: Orgao Oficial Da Sociedade Brasileira de Farmacognosia*, 22(3), 682–713.

- Mesa-Vanegas, A. M.-V. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. . *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(2), 13–26. .
- Moon, J.-K. &. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655–1666.
- Mota, G. (2008). Fotodegradación de productos plásticos elaborados con polietileno lineal de baja densidad. *Tesis de Doctorado Interinstitucional en Ciencia y Tecnología. Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.* , 135.
- Nantitanon W., Y. S. (2010). Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT-Food Sci Technol* 43, 1095-1103.
- Olivero-David, R. (2011). Digestibilidad de los compuestos termooxidados y su influencia sobre la defensa antioxidante intestinal en rata. Efectos del ayuno y grado de alteración del aceite de fritura. . *Universidad de Alcalá*.
- Oropeza Guerrero, M. P. (2012). “Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de *Ipomoea murucoides* (casahuate)”. (*Tesis de Licenciatura*). *UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA*. .
- Pavia, D. L. (2001). *Introduction to spectroscopy*. Cengage learning.
- Perez-Amador, M., Garcia-Argaez, A., Alcantara, S., Garcia-Jimenez, F., & Collera, O. (1983). Comparative study of seed oils of convolvulaceae. Analysis of seed oils of *ipomoea murucoides* and *ipomoea arborescens*. *Phyton (Buenos Aires)* 43(1), 103-108.
- Pichardo, M. (2004). Efecto de algunos reguladores del crecimiento vegetal en la inducción a callogénesis en *Ipomoea murucoides* (Convolvulaceae) y su potencial insecticida. *Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UAEM*.
- Porwal, O. S. (2012). ANTIOXIDANT ACTIVITY OF IPOMOEA LEARI. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(5).

- Prakash, A. (2001). Antioxidant activity. *Med Lab Anal Prog.* 2001;19(2), 1-6.
- Ramos Castro, G. E. (2016). Análisis fitoquímico de *Ipomoea murucoides*. (*Tesis de Licenciatura*). *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Rituerto, E. L. (2012). La resonancia magnética nuclear como herramienta en el estudio y control del proceso de vinificación . *Universidad de La Rioja*.
- Shekhar, S. M. (2015). Comparative analysis of phytochemicals and nutrient availability in two contrasting cultivars of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Food Chemistry*, 173, 957–965.
- Skoog, H. y. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. 5ª Ed. Mc Graw Hill.
- Soto-García, M. &-C. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas Ciencia y Tecnología*, 1-8.
- Wiernsperger, N. (2003). Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab.* 29, 579–585.
- Xu, D. P. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International journal of molecular sciences*, 18(1),, 96.
- Zengin, G. L. (2017). Chemical characterization, antioxidant properties, anti-inflammatory activity, and enzyme inhibition of *Ipomoea batatas* L. leaf extracts. . *International Journal of Food Properties*, 1–13.
- Zhang, Q. W. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. . *Chinese medicine*, 13, 20.

ANEXO I. Espectros obtenidos con UV/Vis.

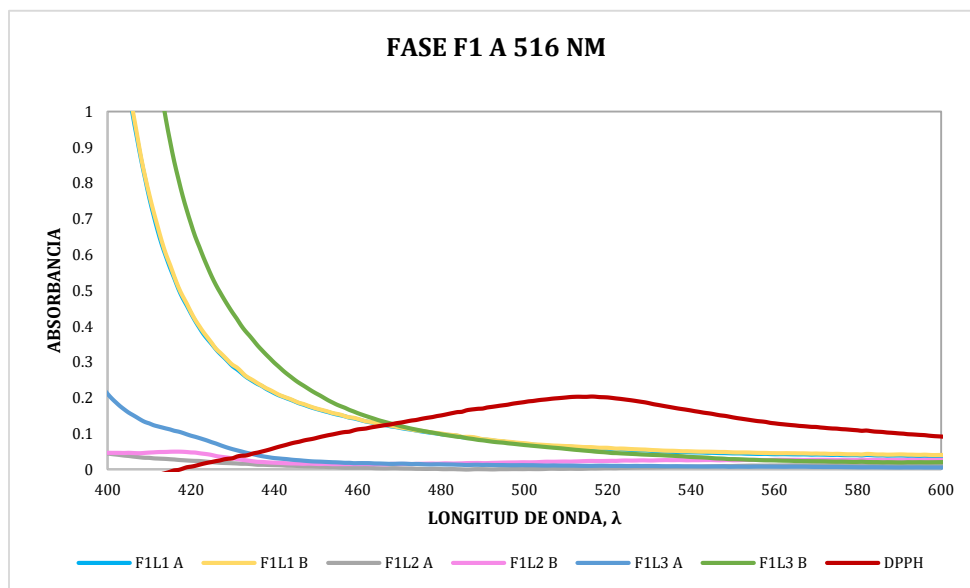


Figura suplementaria 1. Espectros obtenidos en la fase orgánica F1 en los ensayos EVol1 (etiquetados como A) y EVol2 (etiquetados como B).

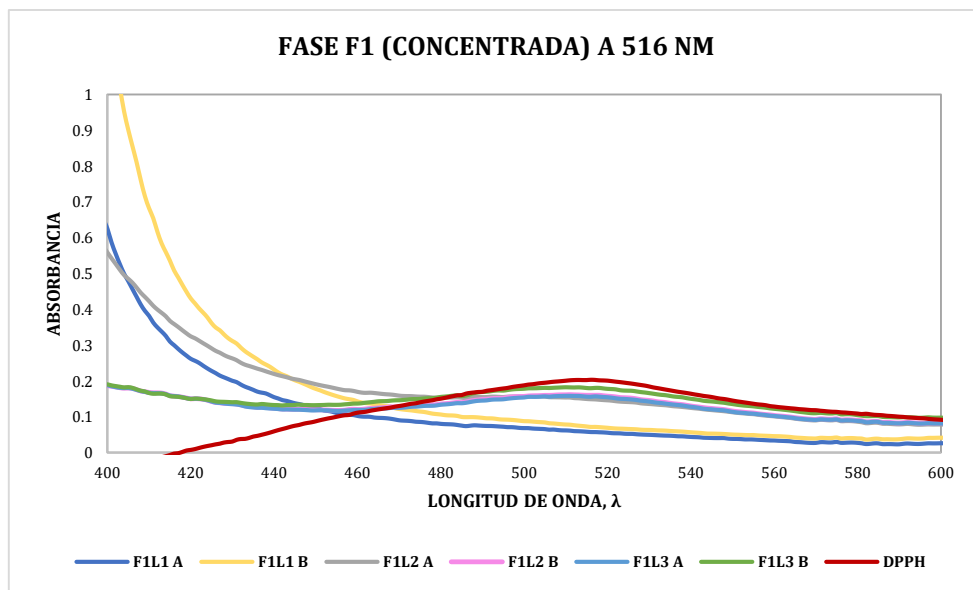


Figura suplementaria 2. Espectros obtenidos en la fase orgánica concentrada F1 en los ensayos EVol3 (etiquetados como A) y EVol4 (etiquetados como B).

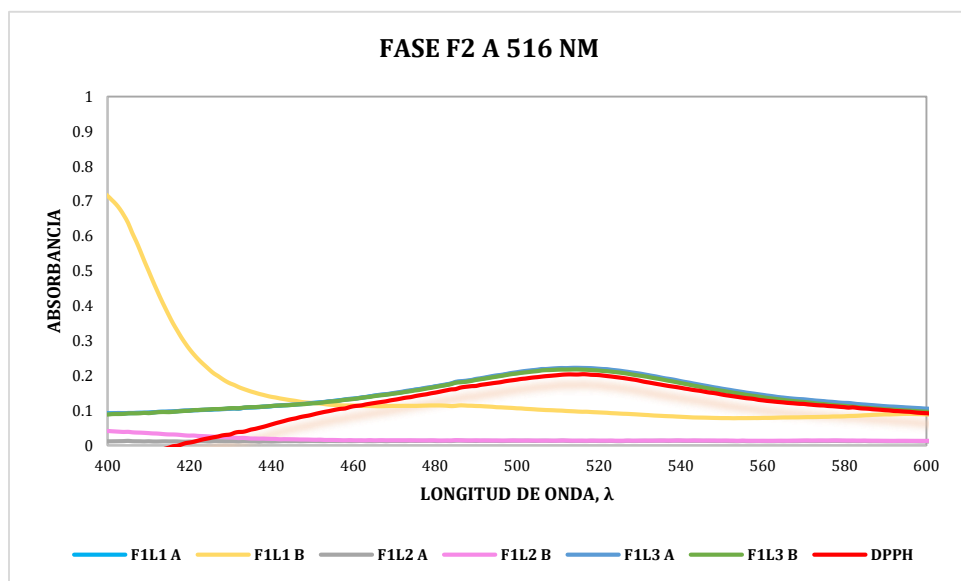


Figura suplementaria 3. Espectros obtenidos en la fase orgánica F2 en los ensayos EVol1 (etiquetados como A) y EVol2 (etiquetados como B).

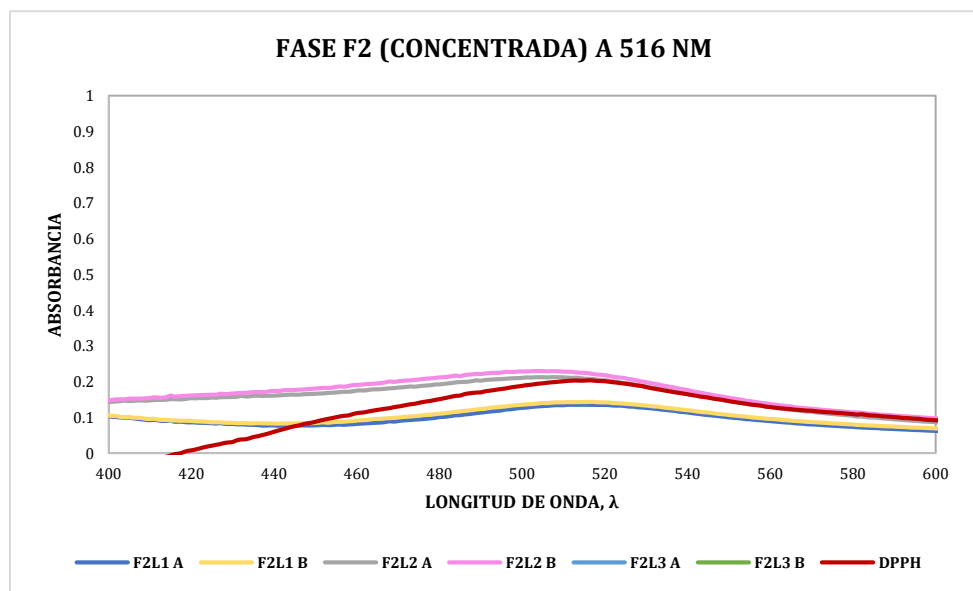


Figura suplementaria 4. Espectros obtenidos en la fase orgánica concentrada F2 en los ensayos EVol3 (etiquetados como A) y EVol4 (etiquetados como B).

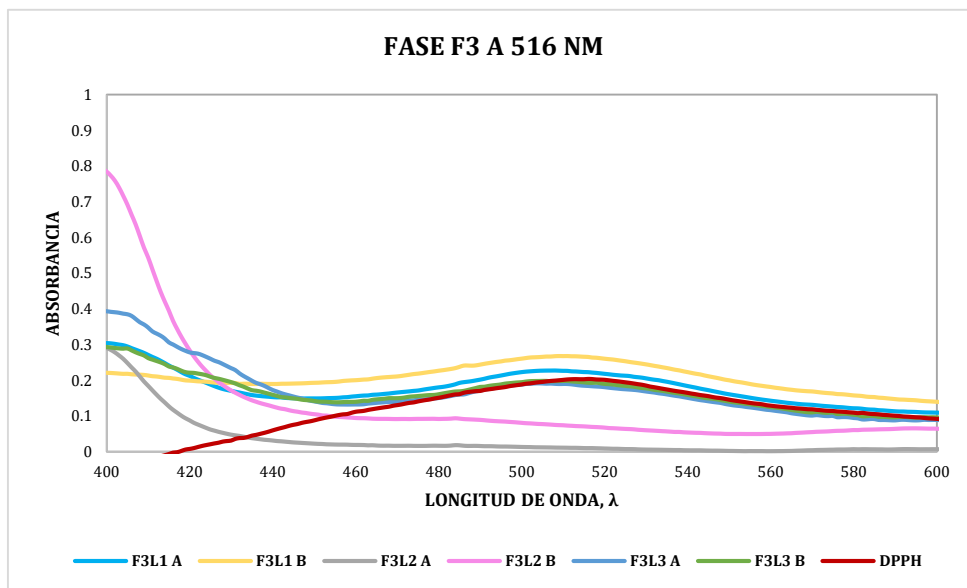


Figura suplementaria 5. Espectros obtenidos en la fase orgánica F3 en los ensayos EVol1 (etiquetados como A) y EVol2 (etiquetados como B).

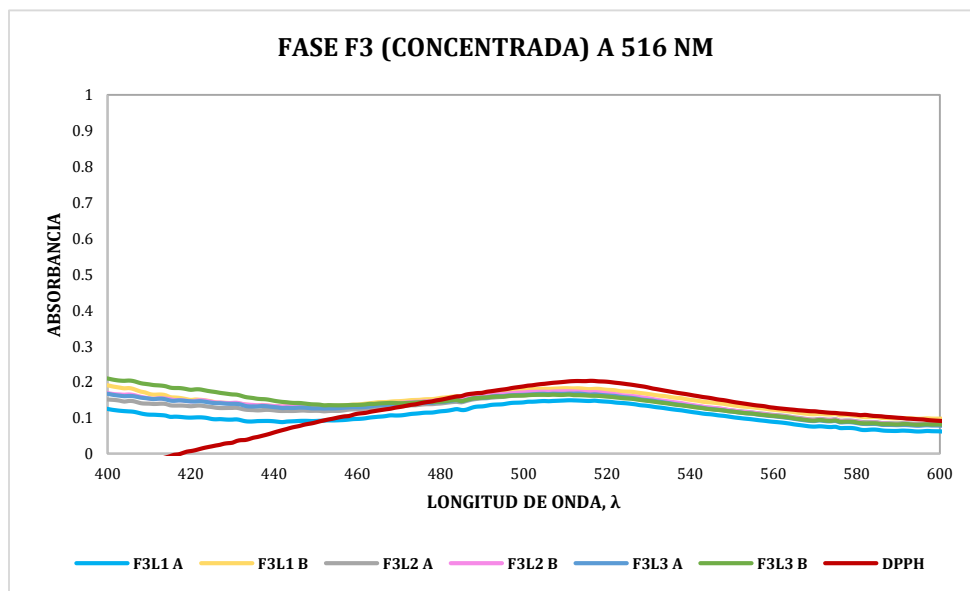


Figura suplementaria 6. Espectros obtenidos en la fase orgánica concentrada F3 en los ensayos EVol3 (etiquetados como A) y EVol4 (etiquetados como B).

ANEXO II. Espectros obtenidos de RMN

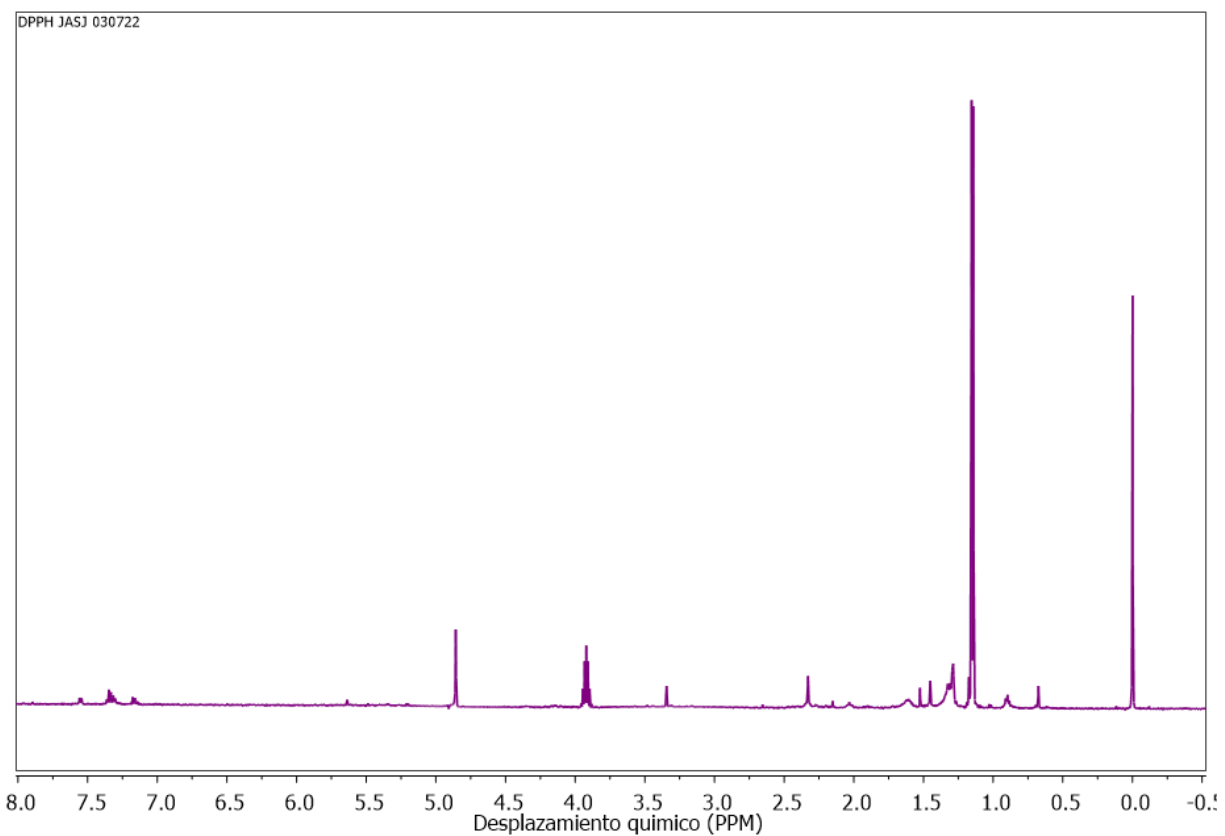


Figura suplementaria 1. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la molécula 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

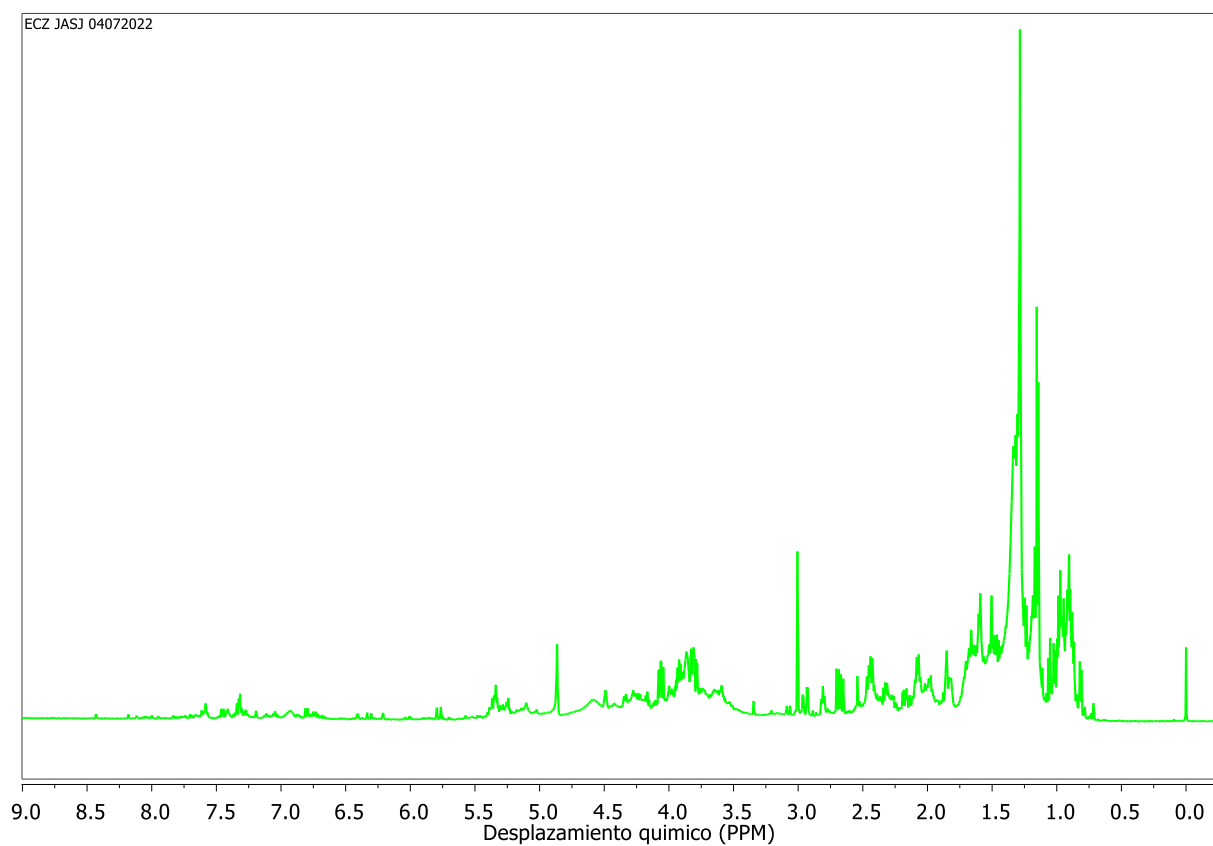


Figura suplementaria 2. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para el extracto en metanol deuterado de las hojas del cazahuate.

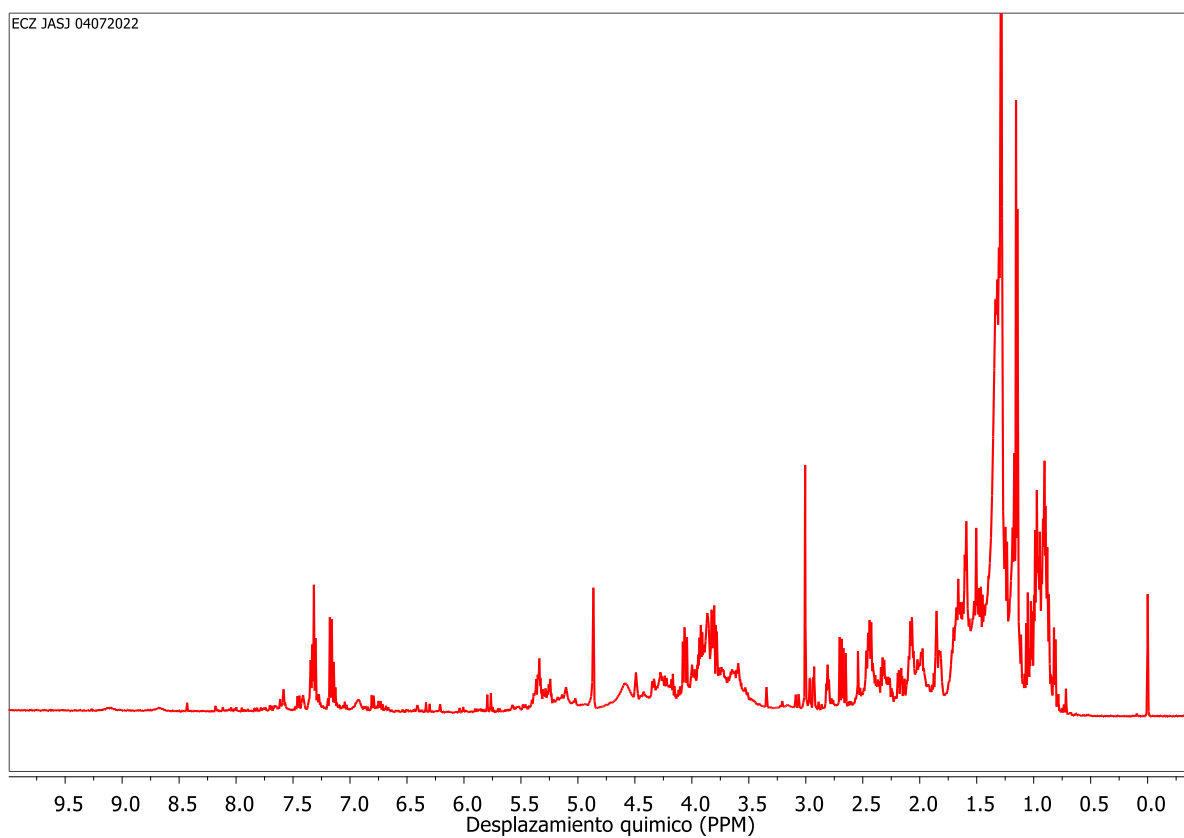


Figura suplementaria 3. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la reacción entre el DPPH y F1D (tiempo inicial, tiempo de mezcla a 1 min).

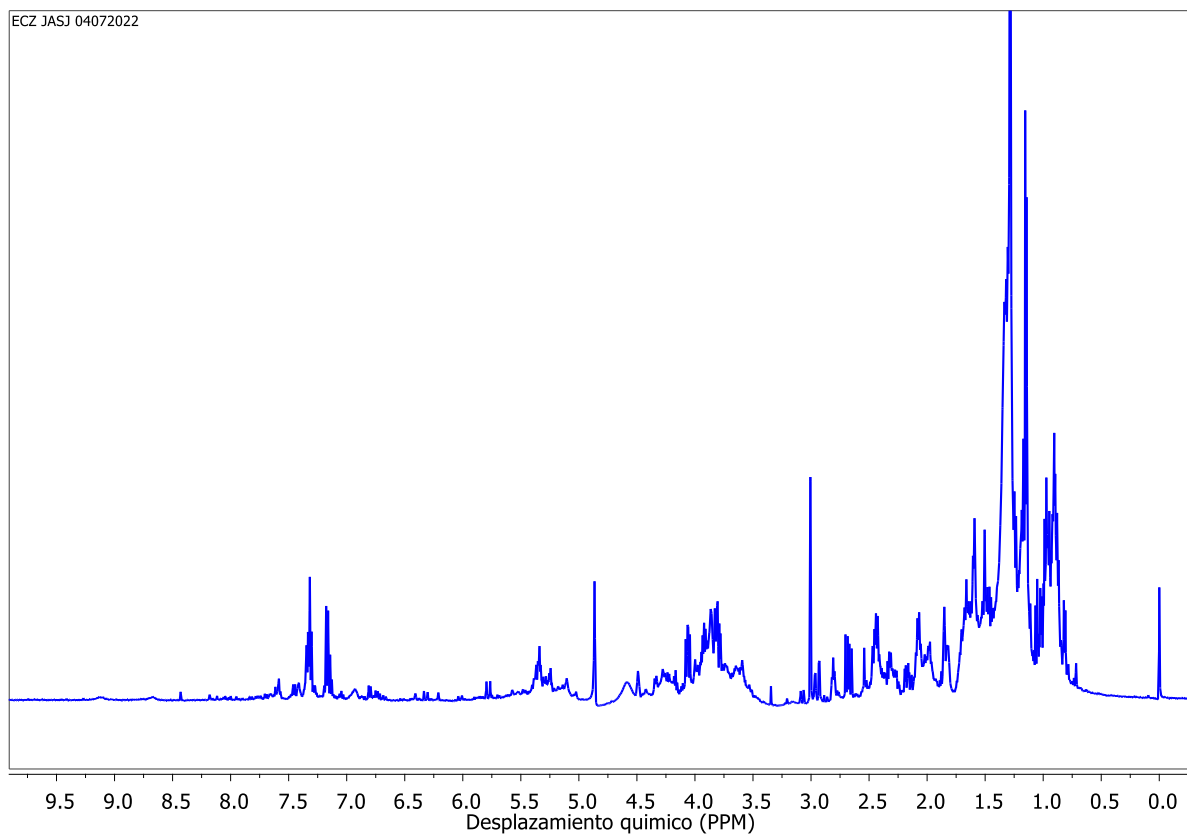


Figura suplementaria 4. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la reacción entre el DPPH y F1D (tiempo final a 10 min).

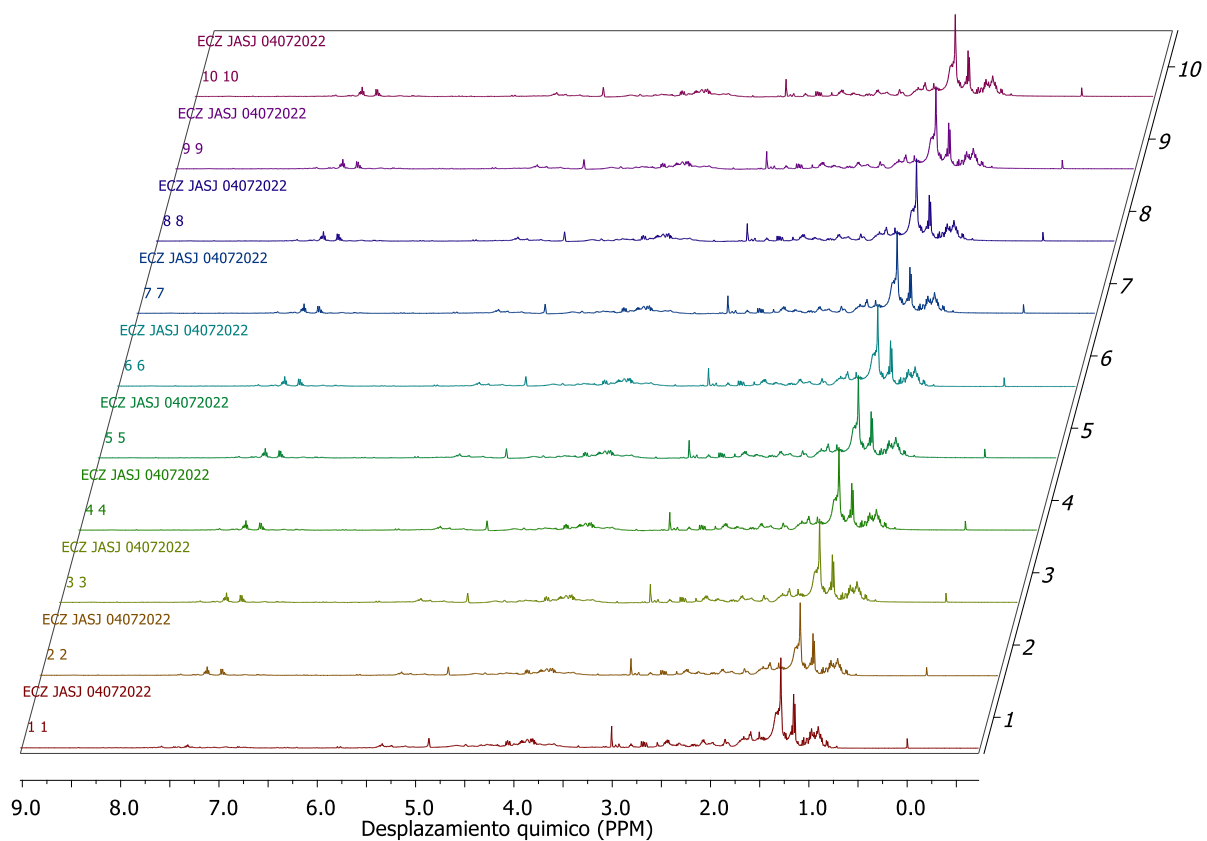


Figura suplementaria 5. Espectros obtenidos de RMN ^1H a temperatura ambiente para la reacción entre el DPPH y F1D (Durante 10 minutos, cada minuto).

ANEXO III. ABREVIATURAS.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

ERO: Especies Reactivas del Oxígeno.

EVOL1: Ensayo con Volumen 1 (0.02 mL de extracto)

EVOL2: Ensayo con Volumen 2 (0.1 mL de extracto)

EVOL3: Ensayo con Volumen 3 (0.02 mL de extracto)

EVOL4: Ensayo con Volumen 4 (0.05 mL de extracto)

F0: Fase orgánica cruda.

F1: Fase orgánica metanólica.

F1D: Fase orgánica metanólica con metanol deuterado.

F2: Fase orgánica extraída con hexano.

F3: Fase orgánica extraída con cloroformo.

H: Hora.

M: Mol.

mM: Milimol.

nm: Nanómetros.

ppm: Partes por millón.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

ANEXO IV. TRATAMIENTO DE DATOS.

Tabla suplementaria 1. Tratamiento de datos obtenidos a partir de la extracción de las fases orgánicas.

Nombre del ensayo	Volumen de disolvente (mL)	CONCENTRACIÓN F1			Volumen de extracto usado en cada ensayo (mL)	CONCENTRACIÓN FINAL EN LA CELDA			
		mg/mL				Concentración · mL usados en la reacción			
		F1L1	F1L2	F1L3		F1L1	F1L2	F1L3	PROMEDIO
EVol1	50	4.54	0.162	1.092	0.02	0.0908	0.0032	0.0218	0.04706
EVol2	50	4.54	0.162	1.092	0.1	0.4544	0.0162	0.1092	0.2353
EVol3	1	227.2	8.1	54.6	0.02	4.544	0.162	1.092	2.353
EVol4	1	227.2	8.1	54.6	0.05	11.36	0.405	2.73	5.8825
Peso de cada concentrado (mg)		227.2	8.1	54.6					
Nombre del ensayo	Volumen de disolvente (mL)	CONCENTRACIÓN F2			Volumen de extracto usado en cada ensayo (mL)	CONCENTRACIÓN FINAL EN LA CELDA			
		mg/mL				Concentración · mL usados en la reacción			
		F2L1	F2L2	F2L3		F2L1	F2L2	F2L3	PROMEDIO
EVol1	25	0.392	0.012	0.148	0.02	0.0196	0.0006	0.0074	0.0196
EVol2	25	0.392	0.012	0.148	0.1	0.098	0.003	0.037	0.098
EVol3	1	9.8	0.3	3.7	0.02	0.196	0.006	0.074	0.196
EVol4	1	9.8	0.3	3.7	0.05	0.49	0.015	0.185	0.49
Peso de cada concentrado (mg)		9.8	0.3	3.7					
Nombre del ensayo	Volumen de disolvente (mL)	CONCENTRACIÓN F3			Volumen de extracto usado en cada ensayo (mL)	CONCENTRACIÓN FINAL EN LA CELDA			
		mg/mL				Concentración · mL usados en la reacción			
		F3L1	F3L2	F3L3		F3L1	F3L2	F3L3	PROMEDIO
EVol1	15	0.98	1.086	0.2333	0.02	0.0294	0.007	0.0198	0.031
EVol2	15	0.98	1.086	0.2333	0.1	0.147	0.035	0.099	0.155
EVol3	1	14.7	16.3	3.5	0.02	0.294	0.07	0.198	0.31
EVol4	1	14.7	16.3	3.5	0.05	0.735	0.175	0.495	0.775
Peso de cada concentrado (mg)		14.7	16.3	3.5					