



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad
de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE
LA ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA A PARTIR DE
Cordia morelosana y *Calea zacatechichi*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA:

M. F. DIANA ELIZABETH GILES RIVAS

DIRECTORES DE TESIS

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO

DRA. ANGELICA BERENICE AGUILAR GUADARRAMA



CENTRO DE
INVESTIGACIONES QUÍMICAS

CUERNAVACA, MORELOS

2020

M. F. DIANA ELIZABETH GILES RIVAS
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
PRESENTE

Por este conducto le informo que Consejo Interno de Posgrado en la sesión ordinaria del 12 de febrero de 2020 le asignó jurado para revisar y presentar la defensa oral de la tesis titulada:

**"Obtención de los compuestos responsables de la actividad antidiabética a partir de
Cordia morelosana y *Calea zacatechichi*"**

Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez	PRESIDENTE
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	SECRETARIO
Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio	VOCAL 1
Dr. Julio César Rivera Leyva	VOCAL 2
Dra. Irene Perea Arango	VOCAL 3
Dr. Germán Bernal Fernández	VOCAL 4
Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa	VOCAL 5

De acuerdo al Artículo 101° (Reglamento General de Posgrado). - *Será requisito previo al examen de grado, que los integrantes de la Comisión Revisora, emitan su voto y opinión favorables en términos de que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente. Lo cual no compromete el dictamen de la evaluación de examen.*

Asimismo, le recuerdo que es responsabilidad de usted enviar los respectivos ejemplares a su comité sinodal y dar seguimiento a las correspondientes revisiones para poder concluir este importante proceso.

Sin más por el momento, me despido de usted, no sin antes felicitarla por estar próxima a obtener el título de Doctora en Farmacia.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia



DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA
JEFE DE POSGRADO



C.c.p. Dra. Natividad Sara García Jiménez, Dr. Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Jaime Gómez Zamudio, Dr. Julio César Rivera Leyva, Dra. Irene Perea. Dr. Germán Bernal y Dr. Alexandre Cardoso.

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, edificio 61 ala C 2° piso, Tel. (777) 329 79 86, 329 7000, Ext. 7986/ doctoradofarmacia@uaem.mx

**UA
EM**

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y a la Facultad de Farmacia, por la infraestructura y por la formación académica brindada durante los estudios del Doctorado en Farmacia.

Al Centro de Investigaciones Químicas, IICBA, por la infraestructura a través de LANEM proyecto apoyado por CONACyT y la formación académica brindada durante mi estancia en el desarrollo del proyecto de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada con número 412758.

Al Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-Xochitepec) y al Dr. Guillermo Ramírez Ávila por su colaboración y dirección para llevar a cabo las evaluaciones de inhibición de enzimas α -glucosidasas; por su aportación, dirección académica y fortalecimiento personal.

Al Dr. Gabriel Navarrete Vázquez y a la Dra. Blanca Iris Colín Lozano por su colaboración en la realización del acoplamiento molecular, por su dirección académica y siempre excelente disposición para compartir sus conocimientos.

Al Dr. Julio César Almanza Pérez de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, por su colaboración para llevar a cabo el ensayo de expresión de PPARs, por sus aportaciones académicas y apoyo continuo en los proyectos de posgrado.

Al Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio, del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Por ser parte del desarrollo de este proyecto con su continua participación dentro del comité tutorial; gracias por sus comentarios y aportaciones académicas.

A los directores de tesis, el Dr. Samuel Enoch Estrada Soto y la Dra. Angelica Berenice Aguilar Guadarrama, por recibirme en su laboratorio y grupo de trabajo, por toda su valiosa dirección para que este proyecto se llevara a cabo. También, por brindarme siempre su apoyo ante toda circunstancia, por su paciencia, dedicación y motivación personal; les agradezco por ser parte y hacerme parte, de este ámbito científico y por fomentar en la búsqueda de mi desarrollo personal.

A los miembros revisores de tesis por su tiempo invertido, comentarios, correcciones y aportaciones para enriquecer este proyecto.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURA Y SIGLAS.....	1
LISTA DE TABLAS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE GRÁFICAS.....	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. MARCO TEÓRICO.....	13
2.1. Diabetes.....	13
2.2. Clasificación de la diabetes.....	13
2.3. Panorama actual de la diabetes en México.....	14
2.4. Hiperglucemia crónica.....	16
2.5. Complicaciones crónicas de la diabetes.....	17
2.6. Diagnóstico de la diabetes.....	18
2.7. Tratamiento antidiabético.....	19
2.8. Tratamiento farmacológico.....	20
2.9. La medicina tradicional en el tratamiento de la diabetes.....	22
2.10. Blancos terapéuticos en el estudio de la diabetes.....	22
2.11. Receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR).....	22
2.12. Blancos terapéuticos implicados en mejorar la acción de la insulina.....	24
2.13. Blancos terapéuticos implicados en la absorción y transporte de la glucosa.....	26

2.14.	Enzimas α -glucosidasas intestinales.....	26
2.15.	Familia de los co-transportadores de sodio/glucosa (SGLT).....	28
2.16.	Transportadores de glucosa (GLUT).....	28
2.17.	Antecedentes de la especie vegetal <i>Cordia morelosana</i>	30
2.18.	Género <i>Cordia</i>	30
2.19.	Uso de <i>C. morelosana</i> en la medicina tradicional.....	31
2.20.	Antecedentes químicos y farmacológicos de <i>C. morelosana</i>	31
2.21.	Antecedentes de la especie <i>Calea zacatechichi</i>	32
2.22.	Género <i>Calea</i>	32
2.23.	Usos en la medicina tradicional de <i>C. zacatechichi</i>	33
2.24.	Antecedentes químicos y farmacológicos de <i>C. zacatechichi</i>	33
3.	JUSTIFICACIÓN	34
4.	HIPÓTESIS	36
5.	OBJETIVO GENERAL	37
6.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
7.	METODOLOGÍA	38
7.1.	Obtención del material vegetal.....	38
7.2.	Preparación de la planta.....	38
7.3.	Obtención de los extractos.....	38
7.4.	Evaluaciones biológicas: <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	39
7.5.	Curva de tolerancia oral a glucosa (CTOG).....	39
7.6.	Determinación del efecto antidiabético en un modelo de diabetes experimental no insulino dependiente (NID).....	40

7.7.	Diabetización.....	40
7.8.	Ensayo antidiabético.....	41
7.9.	Ensayo de inhibición de enzimas α -glucosidasas.....	42
7.10.	Obtención del raspado intestinal.....	42
7.11.	Ensayo de inhibición.....	42
7.12.	Determinación del efecto sobre la expresión relativa de PPAR γ , PPAR α , GLUT-4 y FAPT.....	43
7.13.	Acoplamiento molecular sobre PPAR γ y PPAR α	44
7.14.	Estudio fitoquímico bio-dirigido de <i>C. morelosana</i>	45
7.15.	Cromatografía en columna.....	45
7.16.	Estudio fitoquímico de <i>C. zacatechichi</i>	50
7.17.	Elucidación estructural.....	52
7.18.	Análisis estadístico.....	53
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
8.1.	Determinación del potencial antidiabético del EECm.....	54
8.2.	Evaluación del efecto antihiper glucémico del EECm.....	55
8.3.	Evaluación del EECm sobre la actividad de enzimas α -glucosidasas.....	57
8.4.	Estudio fitoquímico de EECm.....	58
8.5.	Evaluación de las fracciones primarias.....	59
8.6.	Re-cromatografía y elucidación estructural de los metabolitos secundarios.....	62
8.7.	Rosmarinato de metilo y ácido rosmarínico.....	63
8.8.	Nicotiflorina.....	67
8.9.	1-O-metil-scyllo-inositol.....	69

8.10.	Determinación del efecto antidiabético e insulino sensibilizador de RM y AR: <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e <i>in silico</i>	71
8.11.	Evaluación del rosmarinato de metilo en un modelo de diabetes NID.....	71
8.12.	Evaluación del RM y AR sobre la expresión de PPAR γ , PPAR α , GLUT-4 y FAPT.....	72
8.13.	Acoplamiento molecular de AR y RM sobre PPAR γ y PPAR α	75
8.14.	Validación de acoplamiento molecular.....	75
8.15.	Validación de acoplamiento molecular sobre PPAR γ (PDB 1I7I).....	75
8.16.	Acoplamiento molecular del ácido rosmarínico sobre PPAR γ	76
8.17.	Acoplamiento molecular del rosmarinato de metilo sobre PPAR γ	77
8.18.	Validación de acoplamiento molecular sobre PPAR α (PDB 5HYK).....	79
8.19.	Acoplamiento molecular del ácido rosmarínico sobre PPAR α	80
8.20.	Acoplamiento molecular del rosmarinato de metilo sobre PPAR α	81
8.21.	Estudio fitoquímico del extracto metanólico de <i>C. zacatechichi</i> (EMCz).....	83
8.22.	Evaluación de las fracciones primarias de EMCz.....	84
8.23.	Cromatografía en columna de la fracción <i>n</i> -butanol de <i>C. zacatechichi</i>	84
9.	CONCLUSIONES	87
10.	PERSPECTIVAS	88
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
12.	ANEXOS	97

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

1D	1 dimensión
2D	2 dimensiones
ADA	Asociación Americana de Diabetes
AR	Ácido rosmarínico
ATP	Adenosín trifosfato
C	Carbono
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CD ₃ Cl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CTOG	Curva de Tolerancia Oral a Glucosa
DBD	Dominio de unión a ADN
DMEM	Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
ECV	Enfermedad cardiovascular
dL	decilitro
DPP-4	Dipeptidil peptidasa 4
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EE <i>Cm</i>	Extracto Etanólico de <i>Cordia morelosana</i>
E.E.M	Error Estándar de la Media
EM <i>Cz</i>	Extracto Metanólico de <i>Calea zacatechichi</i>
g	gramos
GHS	Glutación reducido
GIP	Péptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GLUT	Transportador de glucosa
h	horas
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina 1
IRS-2	Sustrato del receptor de insulina 2
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
J	Constante de acoplamiento
kg	kilogramo
LBD	Dominio de unión a ligando
mg	miligramo
MHz	Megahertz
mM	milimolar
mL	mililitro
NA	Nicotinamida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NID	No Insulino Dependiente

NF- κ B	Factor nuclear de transcripción kappa B
nm	nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
OGTT	Oral Glucosa Tolerance Test
PTP-1B	Proteína Fosfatasa de Tirosina 1B
PPAR	Receptores activados por el proliferador de peroxisoma
RM	Rosmarinato de metilo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RN	Receptores nucleares
SGLT 1	Transportador sodio/glucosa tipo 1
SGLT 2	Transportador sodio/glucosa tipo 2
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
μ L	microlitro
α	alfa
β	beta
γ	gamma

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Criterios diagnósticos de la diabetes.....	19
Tabla 2.	Fármacos para el tratamiento de la diabetes.....	20
Tabla 3.	Transportadores sodio/glucosa.....	28
Tabla 4.	Transportadores de glucosa GLUT.....	29
Tabla 5.	Cromatografía en columna del EEC <i>m</i>	46
Tabla 6.	Tipos de cromatografía.....	46
Tabla 7.	Cromatografía en columna de EEC <i>m</i>	59
Tabla 8.	Datos espectroscópicos, RM.....	64
Tabla 9.	Datos espectroscópicos, AR.....	65
Tabla 10.	Datos espectroscópicos, Nicotiflorina.....	68
Tabla 11.	Datos espectroscópicos, 1- <i>O</i> -metil- <i>scyllo</i> -inositol.....	70
Tabla 12.	Datos espectroscópicos, rutina.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Órganos afectados por las complicaciones de la DM2.....	18
Figura 2.	Tratamiento de la DM2.....	19
Figura 3.	<i>Cordia morelosana</i>	31
Figura 4.	<i>Calea zacatechichi</i>	33
Figura 5.	Obtención de los extractos de <i>C. morelosana</i> y <i>C. zacatechichi</i>	39
Figura 6.	Administración intraperitoneal en ratones.....	41
Figura 7.	Proceso de extracción líquido-líquido.....	50
Figura 8.	Precipitado color amarillo	51
Figura 9.	Visualización en 2D de tesaglitazar en la cavidad de PPAR γ ...	76
Figura 10.	Visualización en 2D del ácido rosmarínico en la cavidad de PPAR γ	77
Figura 11	Visualización en 2D del rosmarinato de metilo en la cavidad de PPAR γ	78
Figura 12.	Sobreposicionamiento en 3D de los compuestos AR y RM en la cavidad de PPAR γ	79
Figura 13.	Visualización en 2D del ácido 2-metil-2-[4-naftalen-1-il) fenoxi] propanoico en la cavidad de PPAR α	80
Figura 14.	Visualización en 2D del ácido rosmarínico en la cavidad de PPAR α	81
Figura 15.	Visualización en 2D del rosmarinato de metilo en la cavidad de PPAR α	82
Figura 16.	Sobreposicionamiento en 3D de los compuestos AR y RM en la cavidad de PPAR α	83

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Efecto antidiabético del <i>EECm</i>	54
Gráfica 2.	Efecto antihiper glucémico del <i>EECm</i> en una CTOG, sustrato glucosa.....	56
Gráfica 3.	Efecto antihiper glucémico del <i>EECm</i> en una CTOG, sustrato sacarosa.....	57
Gráfica 4.	Efecto del <i>EECm</i> sobre la actividad de enzimas α -glucosidasas.	58
Gráfica 5.	Efectos de las fracciones primarias sobre la actividad de enzimas α -glucosidasas.....	60
Gráfica 6.	Efecto de la F-II en la CTOG, sustrato sacarosa.....	61
Gráfica 7.	Efecto de la F-IV en la CTOG, sustrato sacarosa.....	61
Gráfica 8.	Efecto de la F-V en la CTOG, sustrato sacarosa.....	62
Gráfica 9.	Efecto antidiabético del RM.....	72
Gráfica 10.	Efectos de los compuestos AR y RM sobre la expresión de PPARs.....	74
Gráfica 11.	Efecto de las fracciones del EMC _z sobre la actividad de enzimas α -glucosidasas.....	84

RESUMEN

Cordia morelosana (Boraginaceae) es una planta que se conoce comúnmente como palo prieto, anacahuite, encinillo, entre otros. En la medicina tradicional de Morelos, se utilizan las hojas, flores y corteza para el tratamiento de la diarrea, inflamación de riñón, diabetes, dolor de pulmón, asma, tos y fiebre.

Calea zacatechichi (Asteraceae) es una planta que se conoce como hierba amargosa, prodigiosa, zacatexixi, entre otros. Las ramas y hojas son utilizadas en infusión dentro de la medicina tradicional para el tratamiento de cólicos biliares, dolor de estómago, diarrea, paludismo, diabetes, cólico de frío, calmar los nervios, curar el espanto, los corajes, amibiasis, falta de apetito, entre otros (Monroy y Castillo, 2007).

El objetivo del presente proyecto fue identificar, obtener y establecer el potencial modo de acción de los compuestos responsables de la actividad antidiabética, a partir del extracto etanólico de *Cordia morelosana* (EEC_m) y del extracto metanólico de *Calea zacatechichi* (EMC_z).

En primer lugar, se realizó el estudio de *C. morelosana*. En estudios preliminares, se determinó la actividad antidiabética en un modelo experimental de diabetes no insulino dependiente (NID) del EEC_m, donde el EEC_m mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) en la disminución de los niveles de glucosa en sangre, en ratones diabéticos. Posteriormente, se decidió evaluar el efecto del EEC_m mediante curvas de tolerancia oral a glucosa (CTOG), utilizando como sustrato glucosa y sacarosa. El EEC_m mostró efecto significativo ($p < 0.001$) y ($p < 0.05$) en la disminución de las curvas de variación porcentual de glucosa en sangre, a partir de la hora 0.5 y hasta la hora 3, posterior al tratamiento y, los resultados fueron comparados con el grupo control (vehículo). En el análisis de los resultados, la actividad mostrada por EEC_m en el modelo NID, podría estar relacionada con alguno de los modos de acción antidiabética más comunes: relacionados con la actividad postprandial después de la inhibición de las enzimas α -glucosidasas y/o los co-transportadores de glucosa (SGLT-2 o SGTL-1), relacionados con una acción antihiper glucémica; el segundo modo de acción relacionado con la promoción de la secreción de insulina, desde las células β del páncreas y, el tercer modo de acción relacionado con la sensibilización a la insulina (Ortiz et al., 2007). Para corroborar lo anterior, se determinó el potencial inhibitorio del EEC_m sobre la actividad

de enzimas α -glucosidasas, donde el EEC_m mostró un efecto inhibitorio del 55.6% a la concentración de 1 mg/ml, datos que correlacionaron con lo observado en la CTOG (sustrato sacarosa). Así, se determinó que uno de los mecanismos de acción podría estar involucrado con la inhibición de estas enzimas.

Por otro lado, con la finalidad de obtener los metabolitos responsables de la actividad antidiabética, se procedió al estudio fitoquímico bio-dirigido del EEC_m. Se llevó a cabo utilizando técnicas sucesivas de cromatografía y mediante un análisis estructural con experimentos de 1D y 2D de resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se identificaron 4 compuestos: rosmarinato de metilo (RM), ácido rosmarínico (AR), nicotiflorina y 1-*O*-metil-scyllo-inositol. Posteriormente, se evaluaron los compuestos RM y AR, los cuales fueron los metabolitos mayoritarios identificados en las fracciones derivadas del estudio fitoquímico.

Con la finalidad de determinar el potencial antidiabético de los compuestos, el RM se evaluó en un modelo NID, donde mostró efecto significativo ($p < 0.001$) en la disminución de los niveles de glucosa en sangre, el efecto hipoglucémico mostrado se mantuvo desde la hora 3 hasta la hora 7 del ensayo. Adicionalmente, con la finalidad de evaluar el potencial mecanismo de acción relacionado con la sensibilización de la insulina, se llevó a cabo el ensayo sobre la expresión de PPARs. En este ensayo el AR no mostró efecto y, el RM mostró efecto significativo en el aumento de la expresión de PPAR γ , PPAR α , GLUT-4 y FAPT. Se sabe que la activación de los PPARs es de gran relevancia en la búsqueda de compuestos antidiabéticos y contra la obesidad, esto debido a que incrementa la sensibilidad a la insulina y la disminución de la insulino resistencia. Finalmente, para explicar las posibles interacciones con PPAR γ y PPAR α , se hizo el acoplamiento molecular con el RM y AR. Se observaron interacciones relevantes con los aminoácidos clave para la activación de los PPARs, además de interacciones distintas al modo de unión convencional y, que han sido descritas en agonistas parciales del receptor PPAR γ .

Por otro lado, en estudios previos el EMC_z mostró efecto antihiper glucémico y antidiabético en ensayos de CTOG y en un modelo NID, respectivamente (Giles, 2014). Posteriormente, se decidió llevar a cabo el estudio fitoquímico en este extracto con la finalidad de conocer el contenido metabólico. El estudio fitoquímico del EMC_z condujo al aislamiento del compuesto rutina, el cual es un flavonoide glicosilado. Rutina es un compuesto que ha sido ampliamente descrito por poseer efecto sobre la inhibición de enzimas

α -glucosidasas intestinales, efecto en la disminución de la gluconeogénesis y aumento de la captación de glucosa, a través secreción de insulina desde las células β del páncreas.

También, rutina mostró efectos antioxidantes, efectos cardioprotectores y efectos antihiper glucémicos en un modelo *in vivo* de ratas diabéticas-STZ; donde también, disminuyó los niveles de hemoglobina glicosilada (Ahmad et al., 2017).

ABSTRACT

Cordia morelosana (Boraginaceae) is a medicinal plant commonly known as palo Prieto, anacahuite, encinillo, among others. An infusion of leaves, flowers and bark are used in traditional medicine to treat diarrhoea, kidney inflammation, diabetes, lung pain, bronchitis, asthma, hoarseness, cough and fever.

Calea zacatechichi (Asteraceae) is a medicinal plant commonly known as hierba amargosa, prodigiosa, zacatexixi, among others. An infusion of branches and leaves are used for treatment of biliary colic, stomach pain, diarrhoea, malaria, diabetes, calm the nerves, amebiasis, among others (Monroy y Castillo, 2007).

The aim of current project was to identify, obtain and establish the potential mode of action of isolated compounds responsible of antidiabetic activity; from ethanolic extract of *C. morelosana* (EECm) and, methanolic extract of *C. zacatechichi* (MECz).

First, the study of *C. morelosana* was carried out. In preliminary studies, the antidiabetic activity (NID experimental model) of EECm was determined. A significant antidiabetic activity ($p < 0.05$) compared with the control was produced by EECm. Thus, the effect of EECm by oral glucose tolerance test (OGTT) was evaluated, using glucose and sucrose as substrate. The EECm showed a significant effect ($p < 0.001$) and, ($p < 0.05$), respectively, in the reduction of the percentage blood glucose variation curve, from 5 hour to 3 hours of the test. The results were compared with the vehicle. In the analysis of the results, the activity showed by EECm in the NID model could be related to some of the most common antidiabetic mode of action: related to postprandial activity, after the α -glucosidases inhibition and/or glucose transporters (SGLT-2 or SGLT-1), mode of action related with antihyperglycemic action; the second mode of action related to the promotion of insulin secretion, from β cells and, third mode of action related to insulin sensitization (Ortiz-Andrade, 2007). To corroborate the above, the inhibitory α -glucosidases activity was determined. EECm showed an inhibitory effect by 55.6%. This data was accord with the effect showed in OGTT (sucrose substrate). Thus, it was determined that the inhibition of α -glucosidases enzymes could be one of action mechanism involved.

On the other hand, in order to obtain the metabolites, responsible of antidiabetic activities, the phytochemical bio-guided study was conducted by successive chromatographic technics, and isolated compounds were characterized by 1D and 2D-NMR experiments. The bio-guided isolation allowed to obtain four known compounds described as rosmarinic acid (RA), methyl rosmarinate (MR), nicotiflorin and 1-*O*-methyl-*scyllo*-inositol. On the other hand, MR showed significant antidiabetic on NID model ($p < 0.001$) and antihyperglycemic activities, and overexpression of PPAR γ , PPAR α , GLUT-4 and FAPT better than control. Docking studies were conducted with PPAR γ and PPAR α , showing interesting binding mode profile on those targets.

On the other hand, in preliminary studies, the MEC $_z$ showed an antihyperglycemic and antidiabetic activity, in OGTT and NID diabetes model, respectively. Phytochemical study of MEC $_z$ led to isolation of flavonoid glycoside compound identified as rutin. Rutin has been described as having effects on the α -glucosidases inhibition, decreased gluconeogenesis, increased glucose uptake, through insulin secretion from β cells. It also has antioxidant effects, cardioprotective and antihyperglycemic effects in the *in vivo* model of STZ diabetic rats, where also decreased the glycosylated haemoglobin levels (Ahmad, 2017).

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una de las mayores emergencias sanitarias mundiales de salud del siglo XXI. Está entre las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y, junto con las tres principales enfermedades no transmisibles (ENT): enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades respiratorias, representa más del 80 % de todas las muertes prematuras por ENT. Cada año más y más personas viven con esta condición, la cual puede desencadenar complicaciones crónicas a lo largo de su vida (FID, 2019). Actualmente, se estima que 12.8 millones de mexicanos tienen un diagnóstico médico de diabetes tipo 2 (DM2) y, a nivel mundial, hay 463 millones de personas de entre 20-79 años (OMS, 2019).

Por otro lado, el tratamiento actual de la DM2 busca disminuir la morbilidad y mortalidad del paciente, por lo tanto, se requiere un control individualizado de glucemia, sin episodios de hipoglucemia y, mediante educación diabética adecuada, con cambios en el estilo de vida y el adecuado tratamiento farmacológico.

La presencia de hiperglucemia en los pacientes con DM2 ha sido el principal factor descrito para el desarrollo de las complicaciones en la diabetes, tales como: nefropatía, enfermedad cardiovascular, retinopatía, neuropatía y enfermedades vasculares (Barquera et al., 2013) y, pese al considerable progreso en el tratamiento de la diabetes con agentes antidiabéticos orales, continua la búsqueda de nuevos fármacos debido a que los medicamentos existentes poseen diversas limitaciones (Arumugam et al., 2013). La mayoría de estos fármacos tienen una serie de efectos adversos, por lo tanto, la búsqueda de agentes antidiabéticos más efectivos y seguros sigue siendo un desafío y es una de las importantes áreas de la investigación científica (Patel et al., 2012). En este sentido, se ha renovado el interés en el uso de medicamentos a base de plantas para el tratamiento de diferentes enfermedades. Así, las plantas utilizadas en la medicina tradicional han comenzado a ser una fuente alternativa popular en los regímenes terapéuticos, especialmente cuando se acompañan de sus evidencias científicas o su relevancia clínica (Chukwuma et al., 2019). Desde la antigüedad, las plantas medicinales han proporcionado valiosos agentes terapéuticos tanto en la medicina tradicional como en la moderna. Existen alrededor de 200 compuestos puros obtenidos de plantas y reportados por tener efecto sobre la disminución de los niveles de glucosa en sangre (Patel et al., 2012). Los productos naturales han sido la

principal fuente de compuestos químicos diversos que sirven de modelos para el diseño, síntesis y semisíntesis de nuevas moléculas con actividad biológica y, los materiales de partida en el desarrollo farmacéutico (Avendaño, 2010).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Diabetes

La diabetes mellitus se define como un desorden metabólico caracterizado por la presencia de hiperglucemia crónica, debido a defectos en la secreción o en la acción de la insulina o ambos (ADA, 2019).

2.2. Clasificación de la diabetes

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA) la diabetes se clasifica dentro de cuatro categorías principales:

- A. Diabetes tipo 1 (DM1)**, es una de las enfermedades autoinmunitarias más comunes y es producida por la destrucción de las células β productoras de insulina, localizadas en los islotes de Langerhans del páncreas (Balderas, 2015). La destrucción de las células β conduce a una deficiencia absoluta de insulina. Este tipo de diabetes se presenta comúnmente en niños y adolescentes, pero puede aparecer en cualquier edad (Gil et al., 2010) y, representa del 5-10 % de todos los casos de diabetes.

- B. Diabetes tipo 2 (DM2)**, es un trastorno metabólico multifactorial que se caracteriza por dos alteraciones: a) resistencia a la insulina, la cual se define como la incapacidad de la insulina para suprimir la producción hepática de glucosa y estimular la captación periférica de glucosa por el músculo y b) el compromiso de la función de la célula β pancreática, en la que la secreción de insulina es insuficiente para compensar dicha resistencia. El resultado es la presencia de hiperglucemia crónica, la cual es la característica principal de los pacientes diabéticos (Bastarrachea et al., 2008). Por otro lado, el riesgo de desarrollar DM2 incrementa con la edad, la presencia de obesidad y la disminución en la actividad física (estilo de vida sedentario) (ADA, 2019). Aunque no se conoce con certeza las causas de la DM2, existe desde luego un componente genético en su desarrollo. En efecto, se calcula que entre 45 y 80 % de las personas con DM2 tienen por lo menos a un progenitor con diabetes, además de antecedentes familiares significativos relacionados con el padecimiento (Balderas,

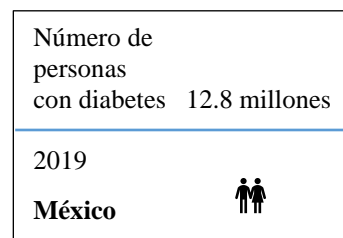
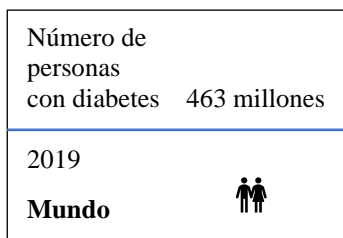
2015). Este tipo de diabetes es responsable del 90-95 % de todos los casos alrededor del mundo.

C. Diabetes gestacional (DMG), es un padecimiento caracterizado por la presencia de intolerancia a la glucosa con diversos grados de severidad, con inicio o que se diagnóstica por primera vez durante el embarazo (ADA, 2019). La prevalencia de la DMG a nivel mundial se ha estimado en 7 % de todos los embarazos, resultando en más de 200 mil casos anuales (IMSS, 2016).

D. Otros tipos de diabetes, las cuales son menos frecuentes y son formas secundarias a enfermedades endócrinas, enfermedades pancreáticas, debido al uso de fármacos como los corticoides y como resultado de a una alteración genética específica, como son la diabetes monogénica (FID, 2019).

2.3. Panorama actual de la diabetes en México

La diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI y en un reto de salud global. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que a nivel mundial el número de personas que viven con diabetes ha aumentado, en el 2019 fueron 463 millones de personas con diabetes de entre 20-79 años y en México 12.8 millones. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (FID), Estados Unidos, México, Canadá, Haití y Jamaica, son en ese orden, los países con mayor número de personas con diabetes (FID, 2019).



Los aumentos en la prevalencia de la DM2 se ha debido a cambios en el estilo de vida de la población, los cuales son poco saludables y altamente prevalentes en niños, adolescentes y adultos mexicanos, dichos cambios han sido principalmente en el patrón alimentario y el sedentarismo, lo que predispone a la obesidad y a la resistencia a la insulina (Pérez et al., 2009). Como bien se sabe, la obesidad está ampliamente relacionada con un incremento de riesgo para desarrollar diabetes. Adicionalmente, la inflamación crónica asociada con la obesidad induce insulino resistencia y la disminución de las células β en pacientes diabéticos (Hadi et al., 2016).

La diabetes es una enfermedad crónica de causas múltiples. En su etapa inicial no produce síntomas, cuando es detectada tardíamente y no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como: infarto al corazón, ceguera, falla renal, amputación de extremidades inferiores y muerte prematura (Hernández y cols., 2013). En México, la diabetes ocupó el segundo lugar en muertes por ENT. El número de personas que murieron por diabetes en el 2017 fue de 106.52 millones, afectando tanto a hombres como mujeres (INEGI, 2019).

Actualmente, el desafío para la sociedad y los sistemas de salud es enorme, debido al costo económico y la pérdida de la calidad de vida para quienes padecen diabetes y sus familias, así como por los importantes recursos que requiere el sistema público de salud para su atención. Por lo tanto, las estrategias de prevención implementadas a escala poblacional en países con elevado riesgo que logren modificar estilos de vida, en particular la dieta, actividad física, entre otros; pueden ser altamente efectivas al reducir la aparición de la diabetes y retrasar la progresión de esta. México tiene condiciones de alto riesgo, por lo que se han impulsado políticas intersectoriales relacionadas con la salud alimentaria y con ello contribuir para combatir uno de los más importantes factores de riesgo, la obesidad (Hernández y cols., 2013).

2.4. Hiperglucemia crónica

La alteración de la secreción de insulina y de su acción, conduce a la acumulación de glucosa en la sangre (hiperglucemia), con diversos efectos adversos en la salud. Las características clínicas de la hiperglucemia en la DM2 incluyen: la excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, cambios en la visión y fatiga. Estos síntomas ocurren repentinamente, pero a menudo son menos notables y los pacientes con DM2 pueden desconocer su enfermedad durante varios años hasta que desarrollan otras complicaciones (Abdullah et al., 2014).

Por otro lado, en lo que refiere a la investigación sobre DM2, se han desarrollado diversas líneas que pretenden explicar los mecanismos fisiopatológicos en esta enfermedad y sus complicaciones. Se ha señalado de manera consistente a la hiperglucemia crónica como la condición fisiológica responsable del desarrollo de las complicaciones del paciente diabético, a través de diversos mecanismos bioquímicos que llevan a procesos como son el estrés oxidativo y la inflamación crónica. El estrés oxidativo es un proceso caracterizado por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) o especies reactivas con respecto a los antioxidantes a favor de los primeros con implicaciones en la homeostasis celular, tisular y sistémico (Rosado y Mendoza, 2007).

Como se mencionó antes, la hiperglucemia crónica es un prerrequisito para el desarrollo de las complicaciones de la diabetes, la hiperglucemia induce a la activación de vías metabólicas como: la vía de los polioles, vía de las hexosaminas y la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Singh et al., 2013). En los tejidos que toman libremente la glucosa de la sangre, es decir, que no requieren la insulina para su captación y que contienen la enzima aldosa reductasa (riñón, tejido nervioso, tejido vascular y cristalino), el flujo de este monosacárido al interior de las células está limitado en condiciones de normoglucemia, tanto por las concentraciones intracelulares, como por su poca afinidad a la enzima. Sin embargo, cuando se presenta la hiperglucemia por la deficiencia de insulina, el metabolismo de la glucosa se desvía de las vías insulino dependientes a las vías no insulino dependientes, provocando una sobre carga de sustratos (hexosas fosfato y triosas fosfato) en estas últimas,

constituyendo la vía del sorbitol o de los polioles como la ruta preferencial no insulino dependiente. La vía de los polioles o del sorbitol es una cascada de reacciones químicas en las cuales se obtiene fructosa a partir de glucosa, pasando por el sorbitol, donde la enzima aldosa reductasa tiene un papel importante en este proceso. La activación de esta vía conlleva a la disminución de los niveles de NADPH, de glutatión reducido (GHS) y de miyo inositol, lo cual tiene efectos adversos sobre el metabolismo celular, daño en tejidos, alteración de mecanismos antioxidantes, entre otros. Esto ocurre en los tejidos en los cuales son los que esencialmente aparecen las complicaciones crónicas de la diabetes (Cruz et al., 2011).

2.5. Complicaciones crónicas de la diabetes

Como se mencionó en la sección anterior, existen diversas evidencias que apoyan el planteamiento de que la hiperglucemia crónica constituye uno de los factores causales más importantes en la patogenia de las complicaciones crónicas de la diabetes. Numerosos estudios sugieren que cuando se logra obtener un control metabólico óptimo se puede evitar o, al menos, detener la progresión de las complicaciones micro y macro vasculares de esta enfermedad. Las complicaciones de la DM2 incluyen: enfermedad cardiovascular (ECV), nefropatía, retinopatía y neuropatía. De no controlarse adecuadamente, cualquier tipo de diabetes puede ir generando complicaciones que afectan a distintas partes del organismo (Figura 1), lo que resulta en hospitalizaciones frecuentes y muerte prematura (FID, 2019).

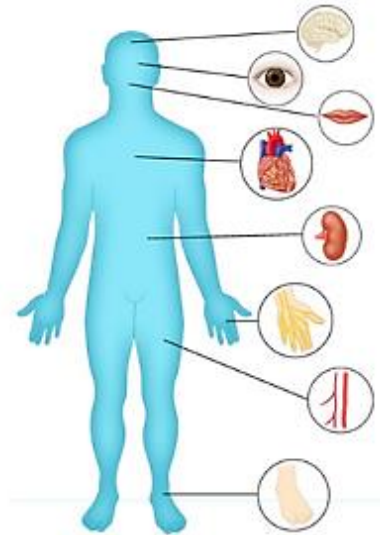


Figura 1. Órganos afectados por las complicaciones de la DM2.

Las complicaciones diabéticas se pueden dividir en complicaciones *agudas* y *crónicas*:

- Las *complicaciones agudas* incluyen: hipoglucemia, cetoacidosis diabética, estado hiperosmolar hiperglucémico, coma diabético hiperglucémico, convulsiones, pérdida de conciencia o infecciones.
- Las *complicaciones microvasculares crónicas* son: la nefropatía, la neuropatía y la retinopatía, mientras que,
- Las *complicaciones macrovasculares crónicas* son: la enfermedad coronaria que conduce a la angina o el infarto de miocardio, enfermedad arterial periférica que contribuye al accidente cerebrovascular, la encefalopatía y el pie diabético.

2.6. Diagnóstico de la diabetes

Los criterios diagnósticos de la diabetes se resumen en la siguiente tabla (Tabla 1) (ADA, 2019).

Tabla 1. Criterios diagnósticos de la diabetes.

Se diagnostica diabetes cuando se cumplen uno o más de los siguientes criterios:	Se diagnostica como: alteración de la tolerancia a la glucosa, cuando se cumplen ambos criterios:	Se diagnóstica como: alteración de la glucemia en ayunas, cuando se cumplen ambos criterios:
Glucosa plasmática en ayunas ≥ 7.0 mmol/l (126 mg/dl)	Glucosa plasmática en ayunas < 7.0 mmol/l (126 mg/dl)	Glucosa plasmática en ayunas 6.1-6.9 mmol/l (110-125 mg/dl)
Glucosa plasmática posterior a 2 horas de haber ingerido (vía oral) una carga de glucosa de 75 g ≥ 1.1 mmol/l (200 mg/dl)	Glucosa plasmática posterior a 2 horas de haber ingerido (vía oral) una carga de glucosa de 75 g 7.8-11.1 mmol/l (140-200 mg/dl)	Glucosa plasmática posterior a 2 horas de haber ingerido (vía oral) una carga de glucosa de 75 g < 7.8 mmol/l (140 mg/dl)
Nivel de glucosa al azar > 11.1 mmol/l (200 mg/dl) o La HbA1C ≥ 48 mmol/mol (equivalente a 6.5 %)		

2.7. Tratamiento antidiabético

El tratamiento de la diabetes DM2 representa un área de continua evolución, ya que de manera constante emergen nuevas formas terapéuticas. El tratamiento de la DM2 se ha centrado en aspectos básicos (Figura 2) como la educación al paciente, el tratamiento médico nutricional, la actividad física (factores que atenúan la resistencia a la insulina y corrigen la hiperglucemia en algunos pacientes), así como, los fármacos para los pacientes cuya hiperglucemia no se revierte a pesar de haber incorporado dichos cambios de estilo de vida (Feinglos et al., 2008). El objetivo del tratamiento antidiabético es disminuir la hiperglucemia para prevenir o reducir al mínimo las complicaciones relacionadas con la enfermedad (Balderas, 2015).



Figura 2. Tratamiento de la DM2.

2.8. Tratamiento farmacológico

En los pacientes con DM2 en los cuales las intervenciones en el estilo de vida no han sido suficiente o ha sido contra indicado debido a la presencia de comorbilidades, el tratamiento farmacológico es el siguiente paso para prevenir y controlar el progreso de la enfermedad. A continuación, se describen los diferentes tipos de fármacos utilizados en el tratamiento de la DM2 (Tabla 2) y, se mencionan los principales efectos adversos con los cuales han sido relacionados (Rodríguez et al., 2017).

Tabla 2. Fármacos para el tratamiento de la diabetes

Mecanismo de acción principal		Fármacos	Efectos adversos
Secretagogos de insulina	Estimulan la secreción de la insulina desde las células β del páncreas, se unen y bloquean canales de potasio, dependientes de ATP, despolarizando la membrana y favoreciendo la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, para posteriormente liberara los gránulos de insulina	Sulfonilureas: Tolbutamina Glibenclamida Clorpropamida Glipizida Glinidas: Nateglinida Repaglinida	Hipoglucemia Aumento de peso Aumento en la frecuencia de infecciones de las vías respiratorias
Sensibilizadores de insulina	Promueven la disminución hepática de glucosa, incrementan la sensibilidad periférica a insulina, inhiben la absorción intestinal de glucosa e incrementan la recaptura de glucosa por el musculoquelético	Biguanidas: Metformina Buformina Fenformina	Intolerancia gastrointestinal Cefalea Acidosis láctica Deficiencia de vitamina B12
	Son agonistas selectivos del receptor activado por un proliferador de peroxisomas (PPAR γ), con efectos en la diferenciación de adipocitos, captura y almacenamiento de ácidos grasos. Disminuyen la resistencia a la insulina y aumentan la respuesta a la insulina endógena. Aumentan la expresión de genes involucrados en la adipogénesis y la oxidación	Tiazolidindionas: Rosiglitazona Pioglitazona	Falla cardiaca congestiva Incidencia en fracturas

	de ácidos grasos e interfirieren con la expresión y liberación de mediadores de la resistencia a la insulina en el tejido adiposos.		
Inhibidores de α -glucosidasas	Inhibición competitiva de las enzimas α -glucosidasas presentes en el borde en cepillo intestinal, retardan la digestión de carbohidratos complejos. Disminuyen la absorción de glucosa postprandial.	Acarbosa Miglitol	Flatulencia Dolor abdominal Diarrea Reacciones alérgicas Síndrome de absorción intestinal deficiente
Inhibidores de la enzima Dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4)	Son análogos peptídicos que inhiben la enzima DPP-4 (degrada las incretinas) y ejercen acción sobre las hormonas llamadas incretinas, prolongando la vida media de estas hormonas.	Sitagliptina Vildagliptina Saxagliptina Linagliptina	Cefalea
Análogos del péptido similar al glucagón GLP-1	Los análogos del GLP-1 disminuyen la secreción de glucagón durante la hiperglucemia y la ingestión de alimentos.	Exenatida Liraglutida	Efectos gastrointestinales Cefalea
Inhibidor del transportador de sodio-glucosa de tipo 2 (SGLT-2)	Suprimen el mecanismo de co-transporte de sodio-glucosa de tipo 2, en los túbulos renales proximales, reduciendo la reabsorción de glucosa filtrada.	Canagliflozina Dapagliflozina	Infecciones de las vías urinarias Hipotensión Mareo Deshidratación

Adicionalmente, dado el incremento del número de fármacos para el tratamiento de la diabetes, es necesario evaluar la función precisa de cada uno de ellos, así como su beneficio y seguridad. Sin duda el mejor tratamiento farmacológico es aquel bien tolerado, que tenga pocas contraindicaciones de uso y que sea efectivo a corto y largo plazo. A pesar de estas medidas farmacológicas, los cambios importantes en el estilo de vida, como la dieta adecuada y ejercicio, son todavía aspectos esenciales para el tratamiento de los pacientes diabéticos (Balderas, 2015).

2.9. La medicina tradicional en el tratamiento de la diabetes

Hoy en día, se ha renovado el interés en el tratamiento contra diferentes enfermedades utilizando medicamentos a base de plantas, ya que generalmente se describen como menos tóxicas y, por otro lado, la OMS también ha recomendado la evaluación de la eficacia de las plantas dado que nos hemos encontrado con panoramas terapéuticos donde carecemos de medicamentos modernos seguros. En la medicina tradicional, la diabetes se trata con dieta, ejercicio físico y plantas medicinales. Por otro lado, los derivados de las plantas con propiedades hipoglucémicas se han utilizado en la medicina tradicional y en los sistemas de salud alrededor del mundo, desde tiempos muy remotos. En este sentido, más de 1200 plantas se utilizan en todo el mundo para controlar la diabetes y aproximadamente 30 % de las plantas antidiabéticas de uso tradicional, han sido farmacológica y químicamente investigadas.

El conocimiento tradicional de las plantas medicinales apunta hacia su investigación y el descubrimiento de nuevos medicamentos, debido a su gran potencial para combatir diversas enfermedades como la diabetes (Sonal et al., 2018), además, las plantas medicinales continúan teniendo parte importante en el tratamiento de la diabetes en países en desarrollo, donde muchas de las personas no tienen acceso a las terapias antidiabéticas convencionales, mientras que en países desarrollados ha habido un resurgimiento en el interés por su uso.

Algunas de las plantas con potencial antidiabético más estudiado y comúnmente utilizadas son: *Momordica charantia* (Melón amargo), *Pterocarpus marsupium* (Kino indio), *Trigonella foenum-graecum* (Fenogreco) (Patel et al., 2012), *Allium cepa* (cebolla), *Allium sativum* (ajo), *Aloe vera*, *Cinnamomum tamala*, *Coccinia indica*, *Gymnema sylvestre* (Gurmar), *Ocinum sanctum*, Panax (asiático) Ginseng and *Syzigium cumini* (Hosseyini et al., 2012).

2.10. Blancos terapéuticos en el estudio de la diabetes

2.11. Receptores activados por el proliferador del peroxisoma (PPARs)

Los receptores nucleares (RN) constituyen una familia de proteínas que funcionan como reguladores transcripcionales (positivos o negativos) de numerosos genes involucrados en

importantes funciones fisiológicas, incluyendo el control del desarrollo embrionario, diferenciación celular y en mantener la homeostasis metabólica.

Todos los miembros nucleares comparten una organización estructural común que, para efectos de simplicidad, puede dividirse en tres regiones o dominios funcionales:

- a. Una región N-terminal (dominio A/B), que varían en secuencia y longitud entre los diferentes miembros y contiene determinantes estructurales para la interacción con la maquinaria de transcripción basal y la regulación de su actividad.
- b. Una región muy conservada (dominio C, que también se conoce como DBD por las siglas del término en inglés Dominio de Unión a DNA), implicada en la unión a ADN a nivel de los elementos genéticos específicos localizados en la región reguladora de cada diana.
- c. Región moderadamente conservada a la cual se fija el ligando (o fármaco) de cada receptor (dominio de unión a ligando o LBD por sus siglas en inglés) (Sandoval et al., 2009).

Los receptores activados por el proliferador del peroxisoma (PPAR) son factores de transcripción activados por ligando que pertenecen a la superfamilia de RN, regulan la expresión de numerosos genes diana a través de su unión a elementos de secuencia específicos presentes en la región reguladora de tales genes. Se conocen tres isoformas de este tipo de receptor: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) and PPAR γ (NR1C3).

PPAR α se expresa principalmente en tejidos metabólicamente activos como el hígado, riñón, músculo esquelético y tejido adiposo marrón (Brunmeir and Xu, 2018), pero también se ha encontrado en el corazón, monocitos, endotelio vascular y células de músculo liso. Aunque se han identificado muchas moléculas activadoras de PPAR α , algunos de los ligandos naturales de PPAR α son los ácidos grasos insaturados, fosfolípidos, leucotrienos B₄, mientras que los ligandos sintéticos son los fibratos (clorfibrato, fenofibrato y bezafibrato) (Gross et al., 2016).

PPAR γ se expresa en el tejido adiposo marrón, colón y células inmunes. Está involucrado en la diferenciación de células adiposas, metabolismo de lípidos, en el control de genes involucrados en la homeostasis de glucosa, incluyendo el aumento de la expresión del transportador de glucosa tipo 4 GLUT-4. Además, PPAR γ controla la expresión de numerosos factores secretados por el tejido adiposo, tales como adiponectina, resistina, leptina y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), con influencia en la sensibilidad a la insulina (Ahmadian et al., 2013). PPAR γ también regula la expresión de genes implicados en la respuesta a la insulina, incluyendo el receptor de insulina y los sustratos del receptor de insulina (IRS-1, IRS-2), los cuales son necesarios para el ingreso celular de la glucosa estimulada por la insulina y mediada por el transportador de glucosa GLUT-4 (Sandoval et al., 2009). Existen dos isoformas: PPAR γ 1 que se expresa en varios tejidos y PPAR γ 2 que se expresa en tejido adiposo, pero puede expresarse en otros tejidos bajo determinadas condiciones fisiológicas (Ahmadian et al., 2013).

2.12. Blancos implicados en mejorar la acción de la insulina

Se han identificado novedosos blancos terapéuticos y han sido explorados por sus efectos en la mejora de la acción de la insulina en tejidos blanco. Estos promueven el catabolismo de carbohidratos y lípidos, disminuyen la producción de glucosa endógena e incrementan la neogénesis de las células β pancreáticas y la secreción de insulina dependiente de glucosa. Algunos de esos blancos terapéuticos se mencionan a continuación (Jain and Saraf, 2010):

- *Acetil-CoA carboxilasa 2 (ACAC2)*. Esta enzima participa en la regulación de la biosíntesis de los ácidos grasos y su oxidación. La hipótesis lipogénica de la DM2, plantea que las células acumulan ácidos grasos porque su capacidad de oxidarlos de forma eficiente está disminuida. La acumulación de lípidos resultante daría lugar a la insulino resistencia (Rodríguez et al., 2013).
- *Quinasa Kappa beta I (IKK)*. Un factor de transcripción muy importante es el factor nuclear Kapa B (NF-KB, por sus siglas en ingles), ya que está involucrado en la activación de los genes que participan en la respuesta inflamatoria y en el proceso de la apoptosis. En las células el NF-KB está en el citoplasma asociado a una familia de

proteínas inhibitorias llamadas, por sus siglas en inglés, IKBs. Para que el NF-KB sea activo se requiere degradar las proteínas inhibitorias mediante una fosforilación que llevan a cabo las quinasas conocidas como IKK, con lo cual el NF-KB se traslada al núcleo de la célula y puede ejercer su papel regulador. En la composición de estas quinasas IKK participan tres subunidades, donde IKK alfa e IKK beta son muy similares, ya que tienen dominios estructurales idénticos. Las dos quinasas, activan el factor de transcripción nuclear NF-KB, pero responden a diferentes inductores biológicos (Salamanca, 1999). La IKK β responde a las citosinas de la respuesta inflamatoria, tales como: factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleucina 1 (IL1) y activa la expresión de genes anti apoptóticos. Como sabemos, TNF α tiene efectos inhibitorios sobre la vía de señalización de la insulina y la diferenciación de adipocitos. Se ha reportado que IKK β puede ser una de las principales quinasas involucradas en la inhibición del mecanismo de señalización de la insulina, en respuesta a la obesidad o aumento de grasa (Jain and Saraf, 2010).

- *Dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4)*. En la DM2 se han documentado algunos factores etiopatogénicos como el aumento en la producción de glucosa, el incremento de la resistencia periférica a la insulina y un deterioro progresivo en la función y masa celular beta. Esta reducción se ha atribuido a un proceso acelerado de apoptosis, en el que han incluido factores como la glucotoxicidad, lipotoxicidad, citocinas proinflamatorias, leptina y depósitos amiloide. En periodos tempranos de la enfermedad pudiera existir reversibilidad de este proceso, con intervenciones que preserven la función de las células β , como el tratamiento con insulina en pacientes de reciente diagnóstico, con tiazolidindionas, a las cuales se les ha atribuido un efecto anti apoptótico y, en forma más reciente, los inhibidores de DPP-4, los cuales en estudios preclínicos promovieron la proliferación, neogénesis e inhibición de la apoptosis en las células β . La DPP-4 es una enzima que degrada a las hormonas incretinas. Las incretinas son un conjunto de entero hormonas capaces de incrementar la secreción de insulina de manera glucosa-dependiente, se caracterizan, además, por muchas otras propiedades fisiológicas importantes. Dentro de esta familia, en especial el péptido similar al glucagón tipo 1.

- *Péptido similar al glucagón (GLP-1)* y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) son actualmente los miembros mejor conocidos y más relevantes del grupo. El GLP-1 es producido en las células L del intestino a partir de proglucagón y tiene un efecto secretagogo de la insulina y un efecto sobre su biosíntesis; inhibe la secreción de glucagón y reduce la secreción hepática de glucosa, reduce la velocidad de vaciamiento gástrico, el apetito y la ingesta calórica. La vida media de GLP-1 y GIP son sumamente cortas, lo que hace poco práctico su uso terapéutico en la DM2. En efecto, ambos péptidos se inactivan en pocos minutos por la enzima DPP-4. De este modo, para el desarrollo de una terapia eficaz basada en las incretinas como blanco farmacológico, se han empleado estrategias en el desarrollo de análogos de GLP-1, que sean resistentes a la degradación por parte de la DPP-4 y estrategias en el desarrollo de inhibidores de la DPP-4 (Di Girolamo y cols., 2008).
- *Proteína fosfatasa de tirosina PTP1B*. Es una enzima intracelular específicamente implicada en la regulación negativa de la señalización de la insulina (Bastarrachea, et al., 2008). La enzima PTP1-1B cataliza la desfosforilación de tirosina en el receptor de insulina, induciendo una disminución en la incorporación de glucosa en el tejido muscular y adiposo, alteraciones a nivel metabólico y es considerado como un blanco terapéutico prometedor para el tratamiento de la diabetes, obesidad y también cáncer (Jiang et al., 2012).

2.13. Blancos implicados en la absorción y transporte de la glucosa

2.14. Enzimas α -glucosidasas intestinales

En individuos sanos, la secreción de insulina y glucagón ocurre de forma sincronizada e invertida, lo que permite mantener los valores de glucosa plasmática estables en el periodo interprandial. A los pocos minutos de ingerir alimentos, se produce un aumento en la secreción de glucagón y, con ello, su estímulo sobre la producción hepática de glucosa. Este aumento de los niveles plasmáticos de insulina estimula además la captación de glucosa por los tejidos periféricos. De esta forma se evita que la glucosa postprandial aumente por encima

de 140 mg/dL, manteniendo la glucemia estable, dentro de un rango estrecho. Sin embargo, en situaciones de prediabetes y en fases iniciales de DM2, se produce una pérdida de la primera fase de secreción de insulina tras la ingesta de alimento que resulta en hiperglucemia postprandial (elevación de los niveles de glucosa en sangre, posterior a la ingesta de alimentos). El carácter progresivo de la DM2 hace que, con el tiempo, se produzca también la pérdida del control de la glucemia en ayunas. La hiperglucemia basal y postprandial contribuyen, en mayor o menor medida, a la carga hiperglucémica total. Se ha sugerido que las fluctuaciones hiperglucémicas pueden contribuir al desarrollo de complicaciones crónicas de la diabetes, debido al estrés oxidativo e incremento de especies reactivas de oxígeno. También, las fluctuaciones hiperglucémicas postprandiales afectan más al estrés oxidativo que la hiperglucemia mantenida y, la asociación entre aumento del estrés oxidativo y las citoquinas proinflamatorias durante la crisis hiperglucémica. Otros autores han evidenciado que el impacto de la hiperglucemia sobre la apoptosis de células endoteliales es más pronunciado en las células expuestas a una hiperglucemia intermitente. También se ha confirmado el impacto de la hiperglucemia postprandial sobre los niveles plasmáticos de distintas moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intracelular, vascular y E-selectina y, estos cambios han sido relacionados con el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV).

En la actualidad, algunas de las estrategias terapéuticas para controlar la hiperglucemia postprandial incluyen el uso combinado de fármacos como: glinidas, inhibidores DPP-4, agonistas GLP-1, inhibidores SGLT-2 e inhibidores de enzimas α -glucosidasas (Pinés et al., 2018).

Los inhibidores de enzimas α -glucosidasas actúan como inhibidores competitivos de estas enzimas, las cuales se encuentran en el borde de cepillo del intestino delgado. Su función es hidrolizar los oligosacáridos, trisacáridos y disacáridos a glucosa y otros monosacáridos, a nivel intestinal. De esta forma, los inhibidores de α -glucosidasas tiene un papel en la disminución de los niveles de glucosa absorbida o la glucosa postprandial (Hiyoshi et al., 2019). La inhibición de estas enzimas es uno de los caminos utilizados en la terapéutica de la diabetes junto con el uso de otros fármacos para obtener resultados más eficaces (Taslimi and Gulçin, 2017).

2.15. Familia de los co-transportadores de Sodio/Glucosa (SGLT)

Este sistema se denomina por sus siglas en inglés Sodium/Glucose Transporters como SGLT, del cual se conocen 6 isoformas (SGLT1-6) (Tabla 3), los cuales utilizan el transporte del Na⁺ a favor de su gradiente de concentración para generar una corriente electroquímica que produce cambios conformacionales necesarios para la translocación de la glucosa a través de la membrana plasmática. En el epitelio intestinal y epitelio de los túbulos contorneados proximal y distal existen sistemas de co-transporte de glucosa acoplados a Na⁺ que permiten la absorción rápida de esta molécula desde el íleo hacia el sistema portal y además de la reabsorción de la glucosa filtrada en el glomérulo nuevamente al torrente circulatorio (Valmore et al., 2007).

Tabla 3. Transportadores sodio/glucosa

<i>Transportadores sodio/glucosa</i>	<i>Reabsorción de</i>	<i>Se encuentra en</i>
<i>SGLT-1</i>	Glucosa, Galactosa	Células intestinales
<i>SGLT-2</i>	Glucosa	Corteza renal En menor grado en íleo
<i>SGLT-3</i>	Este tiene baja afinidad por la glucosa, pero actúa como glucosensor en neuronas y tejido muscular	Riñón SNC Músculo esquelético
<i>SGLT-4</i>	Glucosa	Riñón Intestino
<i>SGLT-5</i>	No se conoce el sustrato	Riñón Intestino
<i>SGLT-6</i>	Homología con el SGLT-1	

2.16. Transportadores de glucosa (GLUT)

El transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática de las células representa uno de los eventos más importantes del transporte de nutrientes, ya que la glucosa tiene un papel central en el metabolismo y la homeostasis celular. El ingreso de la glucosa a las células

se lleva a cabo mediante los dos tipos de proteínas acarreadoras: los SGLT y los sistemas facilitadores del transporte de glucosa (GLUT). Los GLUT se expresan en todas las células del organismo, constituyendo el principal mecanismo de entrada de glucosa a todas las células. Los transportadores GLUT son glicoproteínas cuya masa molecular fluctúa entre 45 y 55 kDa, es una estructura transmembranal conectada entre sí por asas hidrofílicas; la primera asa es externa y en algunos GLUT presenta un sitio de glicosilación. Tiene sus grupos amino y carboxilo terminales del lado citosólico de la membrana. Su selectividad a la glucosa está determinada por una serie de secuencias de aminoácidos altamente conservada. Estos transportadores facilitan la entrada de glucosa a favor de su gradiente de concentración. Hasta la fecha, se han reportado 14 miembros de esta gran familia de proteínas acarreadoras, y en la siguiente tabla se mencionan los 6 principales GLUT (Tabla 4) (Castrejón et al., 2007).

Tabla 4. Transportadores de glucosa GLUT

GLUT	Localización	
Familia clase I		
GLUT 1	Eritrocito Cerebro Tejido adiposo Retina Riñón	-De alta afinidad, en tejidos que utilizan como combustible a la glucosa. -Transportador basal de glucosa, concentración intracelular estable.
GLUT 2	Hígado Células β Riñón Intestino	-Transporta glucosa dependiendo de la concentración, actúa como un glucosensor en las células. -Transportador bidireccional, tejido a sangre o viceversa (hígado y riñón) -Puede transportar fructosa
GLUT 3	Cerebro	-Junto con GLUT-1, mantienen el nivel basal de glucosa en neuronas y placenta.
GLUT 4	Músculo estriado Músculo cardíaco Adipocito	-En condiciones basales está internalizado en vesículas en el citosol que responde a: la actividad física o a la insulina -Participa en el mecanismo de regulación del metabolismo de glucosa, cuando está en altas concentraciones en sangre.
Familia clase II		
GLUT 5	Intestino Eritrocitos Riñón Espermatozoides	-Específico para el transporte de fructosa, desde el lumen a la célula intestinal. -Transporte en el músculo, por su capacidad de utilizar la fructosa para la glucólisis y la síntesis de glucógeno de manera independiente al GLUT 1 y 4

	Músculo Adipocito	
GLUT 6		-Se ha especulado que es un co-transportador anión/glucosa -De baja afinidad

2.17. Antecedentes de la especie vegetal *Cordia morelosana*

2.18. Género *Cordia*

Cordia es un género de árboles y arbustos con flores, pertenecientes a la familia Boraginaceae. El género *Cordia* está constituido por más de 300 especies nativas de América, distribuidas ampliamente en África, México, Centroamérica, Sudamérica, Pakistán, Nigeria, Ghana e India. Las especies del género *Cordia* han sido utilizadas para tratar diferentes dolencias en los diversos sistemas de medicina tradicional (Oza and Kulkarni, 2017). Algunas de sus aplicaciones etnofarmacológicas son: antimicrobianas, antiinflamatorias, antihelmínticas, analgésicas, diuréticas, para el tratamiento del sistema digestivo, sistema respiratorio, urogenital y sistema cardiovascular (Matias et al., 2015). La mayoría de las especies del género *Cordia* se utilizan para el tratamiento tradicional de heridas, forúnculos, tumores, gota, úlceras, como purificadores de sangre y febrífuga. La decocción de las hojas de varias especies, se utilizan para el tratamiento de gripe, fiebre, tos, resfriado, asma, calambres menstruales, disentería, diarrea, dolor de cabeza, mordedura de serpiente y como tónico. La corteza se usa como astringente y estimulante hepático. La raíz se usa para curar la tuberculosis, la bronquitis y malaria. Externamente, se prepara una cataplasma a partir de las hojas para tratar la migraña, la inflamación y las heridas. Los frutos de las plantas del género *Cordia* son muy mucilaginosos y son utilizados como demulcentes y como purificador de la sangre, enfermedad del bazo, riñón y pulmón. Algunas de las especies más utilizadas en los sistemas de la medicina Ayurveda, Unani y Siddha son: *C. dichotoma*, *C. latifolia*, *C. macleodii*, *C. myxa*, *C. rothii* y *C. obliqua*. Por otro lado, los principales metabolitos aislados del género *Cordia* incluyen: terpenos, triterpenos, polisacáridos, ácidos grasos, flavonoides, entre otros (Oza and Kulkarni, 2017).

Cordia morelosana, es un árbol de 2 a 4 metros de altura con corteza negra; hojas alargadas, ásperas en su cara inferior y presenta grupos de flores blancas (Figura 3).



Figura 3. *Cordia morelosana*.

2.19. Usos de *Cordia morelosana* en la medicina tradicional

C. morelosana se conoce comúnmente en el estado de Morelos como: Anacahuite, cáscara de anacahuite, encinillo, palo de anacahuite, palo prieto, entre otros. Se utiliza en la medicina tradicional morelense sola o en combinación con otras especies para el tratamiento de enfermedades respiratorias, diarrea, inflamación de riñón, diabetes, dolor de pulmón, bronquitis, asma, ronquera, tos y fiebre (Monroy y Castillo, 2007).

2.20. Antecedentes químicos y farmacológicos de *Cordia morelosana*

A la fecha, no existen estudios químicos reportados para esta especie. Se han aislado diferentes tipos de compuestos químicos de otras especies del mismo género, tales como: alliodorina, aislado de *C. alliodora*; cordiaquinona A, aislado de *C. Corymbosa*; ácido rosmarínico, aislado de *C. americana*, *C. dentate*, *C. dichotoma*, *C. latifolia* y *C. verbenaceae*; rosmarinato de metilo, aislado de *C. rufescens* y *C. dichotoma* de donde también se aisló el cafeato de metilo; α -humuleno, aislado de *C. globosa* y *C. verbenaceae*; quercetina, aislada de *C. dichotoma*, *C. macleodii* y *C. multispicata*; estigmasterol, aislado

de *C. exaltata* y *C. rufescens*; ácido linoleico, aislado de *C. boissieri*, *C. dichotoma*, *C. macleodii*, *C. rothi* y *C. myxa*; cordiarimida A, aislado de *C. globifera*, entre otros.

Por otro lado, en un estudio previo se evaluó el efecto antihiper glucémico del extracto etanólico de *C. morelosana* (EECm) mediante curvas de tolerancia a glucosa, utilizando como sustrato glucosa y sacarosa (2 g/kg). El EECm mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) en la disminución de los niveles de glucosa en sangre y fue comparado con el grupo vehículo utilizado. Se utilizó acarbosa (5 mg/kg) y glibenclamida (3 mg/kg), como controles (Giles 2011).

2.21. Antecedentes de la especie *Calea zacatechichi*

2.22. Género *Calea*

El género *Calea* está constituido por alrededor de 125 especies (Asteraceae), distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de América. Las especies del género *Calea* incluyen hierbas perennes, a veces con xilopodio leñoso, raíces tuberosas, subarbustos, arbustos o árboles pequeños. Las flores aparecen como inflorescencias solitarias, llamadas capitula.

Las especies de este género han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes padecimientos, por ejemplo: *C. integrifolia* se usa como hipoglucemiante, *C. montana* se utiliza para el tratamiento de infecciones en la piel (cataplasma hecho con las hojas de la planta), *C. serrata*, se utiliza para el tratamiento de úlceras, problemas con el hígado, enfermedades de la piel de humanos y animales, *C. uniflora* se utiliza como antiinflamatorio, analgésico, tratamiento de hematomas, como antiséptico, reumatismo, tratamiento de infecciones urinarias y gripe (Aguilar et al., 2017).

Calea zacatechichi. Pertenece a la familia Asteraceae, es un arbusto frágil de 1 a 3 metros de alto, a veces leñosos en su base, con el follaje copiosamente resinoso, con hojas arrugadas en su cara superior y cubiertas de pelos en el interior (Figura 4). Comúnmente se conoce en el estado de Morelos como: hierba del becerro, hierba amargosa, prodigiosa, zacatexixi, entre otros (Monroy y Castillo, 2007).



Figura 4. *Calea zacatechichi*.

2.23. Usos en la medicina tradicional de *Calea zacatechichi*

Las ramas y hojas en infusión, se utiliza para aliviar cólicos biliares, dolor de estómago, diarrea, paludismo, diabetes, cólico de frío, calmar los nervios, curar el espanto, los corajes, amibiasis, falta de apetito, entre otros (Monroy y Castillo, 2007).

2.24. Antecedentes químicos y farmacológicos de *Calea zacatechichi*

De *C. zacatechichi* se han aislado diferentes tipos de compuestos químicos como: caleina (A-F), zexbrevina (Quijano et al., 1979), caleaolactonas (C, D y E), compuestos tipo germacranólidos (Wu et al., 2010) y compuestos tipo flavonoide como 4, 5-dihidroxi-7-metoxiflavona (Aguilar et al., 2017).

De acuerdo con lo reportado en la literatura, se han evaluado extractos acuosos y etanólicos de *C. zacatechichi*, y se le han atribuido efectos biológicos como: efecto antinociceptivo, antidiarreico (Salaga et al., 2015), antimicrobiano y antiinflamatorio (Venegas et al., 2002). En un estudio previo, el extracto metanólico de *C. zacatechichi* mostró efecto antihiper glucémico en curvas de tolerancia oral a glucosa y efecto antidiabético en un modelo *in vivo* de diabetes experimental. Además, en un ensayo *in vitro*, el extracto metanólico de *C. zacatechichi* mostró el 65 % de inhibición de la actividad de enzimas α -glucosidasas intestinales, a una concentración de 1 mg/ml (Giles, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

La DM2 es una condición metabólica crónica que se caracteriza por la hiperglucemia, la resistencia a la insulina y el deterioro progresivo del funcionamiento de las células pancreáticas beta. Adicionalmente, la DM2 se asocia con comorbilidades y complicaciones como la obesidad, hipertensión y ECV (FMD, 2019).

Actualmente, la diabetes genera un panorama complicado en materia de salud pública en México, dado que es una enfermedad de avance progresivo e irreversible y que, por su naturaleza, requiere de tratamientos integrales, con la participación de diferentes profesionales de la salud. En México, la diabetes ocupa el segundo lugar como causa de mortalidad, aunado al impacto social, económico y médico que representa esta enfermedad crónica y de alta prevalencia (INEGI, 2019).

En el tratamiento de la diabetes, la reducción de la hiperglucemia es el principal objetivo, pero la reducción de la presión arterial y el peso, así como el control de la dislipidemia, también son importantes para minimizar el riesgo de complicaciones en los pacientes con DM2. No obstante la disponibilidad de una amplia variedad de medicamentos antidiabéticos, sólo del 50 al 60 % de los pacientes en México alcanza sus metas de control glucémico, por lo cual es importante evaluar el impacto de las terapias actuales y las nuevas terapias disponibles (FMD, 2019).

En el tratamiento de la DM2, los agentes antidiabéticos orales desempeñan un papel fundamental en el control de esta. Existen diversas razones para el mal control de la DM2, incluyendo la eficacia del medicamento, los efectos adversos, el acceso a los medicamentos, la baja adherencia y la falta de cambios de estilo de vida (Surapon, 2015).

Por otro lado, las plantas medicinales han sido utilizadas por la humanidad desde su origen para aliviar dolencias y para el mantenimiento de la salud en general (Surendran et al., 2014). En este contexto, México es un país privilegiado en cuanto a biodiversidad y donde solo un pequeño porcentaje de especies vegetales con uso medicinal han sido exploradas, por lo que es importante generar investigación científica que permita explorar el potencial farmacológico de las plantas medicinales, extractos o principios activos aislados de las mismas (Schlaepfer et al., 2010).

Derivado de lo anterior, *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi* son dos plantas que se utilizan en la medicina tradicional de Morelos y, son candidatos idóneos para la búsqueda de metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas en blancos terapéuticos implicados en la diabetes.

4. HIPÓTESIS

Los metabolitos aislados de las especies vegetales *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi* tendrán efecto antidiabético a través de los efectos antihiper glucémico y de la sensibilización de la insulina.

5. OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio fitoquímico de *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi*, para identificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antidiabética.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar los metabolitos secundarios de *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi* presentes en los extractos alcohólicos.
- Evaluar el efecto inhibitorio sobre la actividad de enzimas α -glucosidasas de las fracciones obtenidas de *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi*.
- Caracterizar los metabolitos aislados utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Determinar el efecto biológico de los compuestos aislados sobre la actividad de los receptores PPARs.
- Determinar el potencial antidiabético de algunos de los compuestos aislados en un modelo experimental de diabetes no insulino dependiente.

7. METODOLOGÍA

7.1. Obtención del material vegetal

Las especies vegetales *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi* fueron identificadas y recolectadas en el estado de Morelos, por la Dra. Patricia Castillo España del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), UAEM.

Cordia morelosana se recolectó en marzo del año 2015, en el Corredor Biológico Chichinautzin, Morelos. El número de voucher establecido para *Cordia morelosana* es 19011.

7.2. Preparación de la planta

Para este proyecto se utilizaron las partes aéreas de ambas especies vegetales, las cuales fueron secadas bajo la sombra a temperatura ambiente y trituradas en un molino para obtener el material vegetal seco y molido.

7.3. Obtención de los extractos

El proceso de extracción para ambas especies vegetales se llevó a cabo vía maceración exhaustiva, se utilizaron disolventes orgánicos en gradiente de polaridad (*n*-hexano, diclorometano, metanol y etanol). El tiempo de maceración fue de 72 horas y se hizo por triplicado (Figura 5). Se utilizó un rotaevaporador marca BUCHI-R11 a presión reducida y temperatura controlada para eliminar todo el disolvente. Posteriormente, cada extracto se secó por completo bajo flujo de aire constante y, así, poder determinar el peso total de cada extracto.

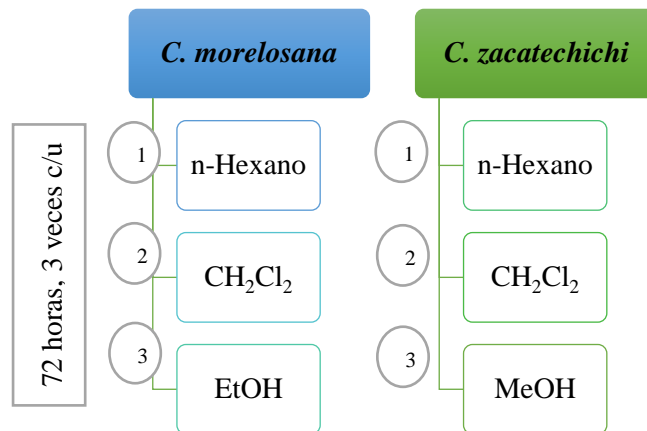


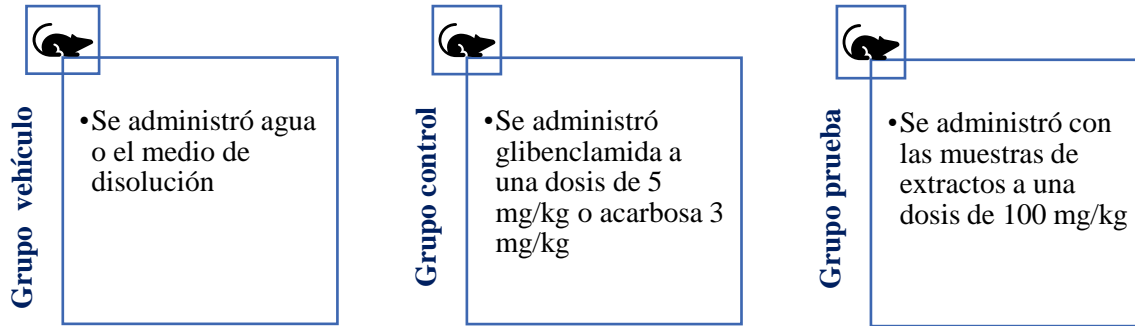
Figura 5. Obtención de los extractos de *C. morelosana* y *C. zacatechichi*

7.4. Evaluaciones biológicas: *in vitro* e *in vivo*

Para el desarrollo experimental del presente trabajo se utilizaron ratones macho cepa CD1 y ratas macho cepa Wistar, los cuales fueron adquiridos en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Todos los animales fueron tratados según las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA).

7.5. Curva de tolerancia oral a glucosa (CTOG)

Para este ensayo se utilizaron ratones macho, normoglucémicos. Todos los animales fueron sometidos a un ayuno previo de 16 h, con libre acceso de agua. Posteriormente, antes de iniciar el ensayo se midieron los niveles de glucosa en sangre al tiempo cero (GLU₀) o glucosa basal. Se hizo una incisión en la vena de la cola de cada ratón y, se utilizó un glucómetro portátil Accucheck Performa para determinar el valor de glucosa en sangre. Posteriormente, se formaron tres grupos de experimentación (n=6):



Al iniciar el experimento, se administraron las muestras de cada grupo a evaluar a través de una administración vía oral, utilizando una sonda de alimentación gástrica y, 30 minutos después se administró una solución de glucosa o sacarosa a una dosis de 2 g/kg. Se determinaron los niveles de glucosa en sangre en tiempos establecidos (GLU_x): 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 horas. Los valores de variación de glucosa se calcularon utilizando la ecuación descrita por Ortiz Andrade (Ortiz-Andrade et al., 2005).

$$\% \text{ VG} = \frac{\text{GLU}_x - \text{GLU}_0}{\text{GLU}_0} \times 100$$

Donde % VG representa la diferencia aritmética entre los promedios de los niveles plasmáticos de glucosa al tiempo cero (GLU₀ o basal) de experimentación y los promedios de los niveles de glucosa sanguínea a los diferentes tiempos evaluados en el experimento (GLU_x).

7.6. Determinación del efecto antidiabético en un modelo de diabetes experimental no insulino dependiente (NID)

7.7. Diabetización

Para obtener el modelo experimental de diabetes NID se administró vía intraperitoneal (Figura 6) nicotinamida (lado derecho), la cual fue previamente disuelta en una solución salina isotónica a una dosis de 40 mg/kg. Posterior a 15 minutos, se administró

estreptozotocina (STZ) (lado izquierdo) a una dosis de 100 mg/kg, la cual fue previamente disuelta en un buffer frío de citratos pH 4.5.

Después de una semana de la inducción de la diabetes NID, se monitorearon los niveles de glucosa en sangre en cada uno de los animales. Los animales que presentaron niveles de glucosa plasmática mayores a 140 mg/dL fueron considerados para el estudio.

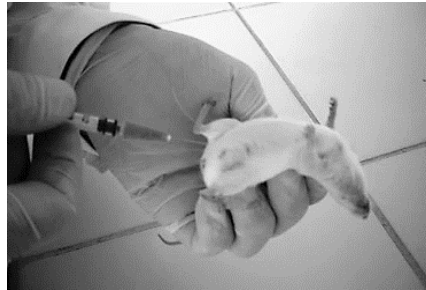
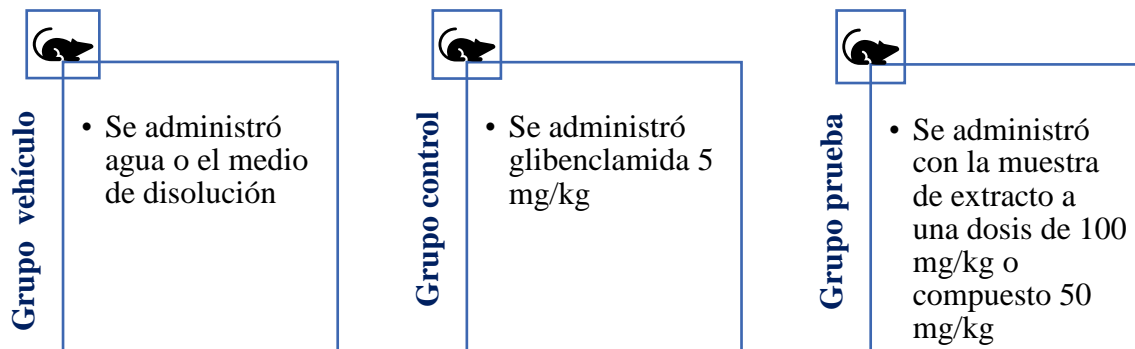


Figura 6. Administración intraperitoneal en ratones.

7.8. Ensayo antidiabético

Los animales fueron sometidos a un ayuno previo de 13 h, con libre acceso de agua. Previo al inicio del ensayo se midieron los niveles de glucosa en sangre a tiempo cero (GLU₀) o glucosa basal, la medición se llevó a cabo utilizando un glucómetro portátil. Posteriormente, se formaron tres grupos de experimentación (n=6):



Al iniciar el experimento se administraron vía oral las muestras de cada grupo a evaluar y, se determinaron los niveles de glucosa en sangre en tiempos establecidos (GLU_x): 1, 3, 5

y 7 horas. Los valores de variación de glucosa se calcularon utilizando la ecuación antes descrita en la sección 7.5.

7.9. Ensayo de inhibición de enzimas α -glucosidasas

7.10. Obtención del raspado intestinal

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical y, mediante una incisión abdominal, el intestino delgado fue removido y lavado con una solución de cloruro de sodio al 0.9 %, solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM a pH 7 y ampicilina (1 mg/mL). El tejido adiposo presente en el intestino fue removido y posteriormente se cortó longitudinalmente. El tejido libre de grasa se raspó por la parte interna (sobre una superficie de cristal en un baño de hielo) con la finalidad de obtener la mucosa intestinal. El material obtenido es homogenizado y almacenado en criotubos de 1.8 mL a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ramírez et al., 2012).

7.11. Ensayo de inhibición

Para medir la actividad de las enzimas α -glucosidasas, se utilizó almidón como sustrato, el cual se preparó con 125 mg/mL en una solución de fosfatos 0.1 M a pH 7. Posteriormente, las reacciones se llevan a cabo por cuadruplicado en tubos de ensayo y se evalúan las muestras de prueba a una concentración de 1 mg/mL, en presencia de la enzima. Cada reacción se inició con la adición de 50 μL de la enzima (raspado intestinal) y se incubaron en un termoblock durante 10 minutos, a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de 10 minutos se detuvieron las reacciones con la adición de 2 μL de acarbosa, en un baño de hielo.

Finalmente, la determinación de glucosa liberada se mide utilizando un kit comercial de glucosa oxidasa (Glucosa GOD-PAD) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello se utilizaron microplacas de 96 pozos, que fueron leídas a una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro.

7.12. Determinación del efecto sobre la expresión relativa de PPAR γ , PPAR α , GLUT-4 y FAPT

Se utilizaron células de fibroblastos 3T3-L1 (9×10^5 células por pozo), las células fueron sembradas en una placa de 6 pozos (Corning Incorporated) en medio DMEM adicionado con 25 mM de glucosa, 10 % de suero fetal bovino (v/v), 1 mM de piruvato sódico, 2 mM de glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y gentamicina; bajo una atmósfera humidificada al 5 % de CO₂, a 37 °C. Después de dos días de confluencia, las células se diferenciaron fenotípicamente a adipocitos con 0.5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina, 0.25 μ M de acetato de dexametasona y 0.8 μ M de insulina, durante 48 horas y seguidas de 48 horas de insulina sola. El medio de cultivo sin insulina fue reemplazado cada dos días durante 8 días de diferenciación. Posteriormente, las células fueron tratadas durante 24 horas con 10 μ g/mL de los compuestos, para determinar el efecto sobre la expresión de los PPARs, GLUT-4 y FAPT.

Posteriormente, el ARN fue aislado de las células de cultivo, utilizando el reactivo de aislamiento TriPure (Invitrogen). La absorbancia fue medida a 260 y 280 nm para cada muestra de ARN y la relación de absorbancia fue de 1.9 ± 0.2 . Para confirmar la integridad del ARN, se corrió 1 μ g en gel de agarosa. El ARN fue revelado con bromuro de etidio y visualizado utilizando el Imagen Gel-Logic 212 Pro (Kodak/Caaresream). Después, 2 μ g de ARN total fue transcrito inversamente usando el ImProm II reverse transcription system (Promega, USA); la reacción (20 μ L) fue incubada en un termociclador (BioProducts, USA) bajo el siguiente programa de ciclos: incubación a 25 °C durante 5 minutos, hasta 42 °C durante 55 minutos. La enzima fue inactivada a 70 °C, durante 15 minutos. Finalmente, las muestras fueron enfriadas a 4 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se tomó un volumen 1/10 de cada reacción que fue amplificada, utilizando SYBR Green Master Mix (Roche Molecular Biochemicals, Germany), con 0.5 mM de cebadores personalizados de **PPAR γ** (F-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG; R-GCCACCTCTTTGCTCTGCTC; Gene Bank NM_011146.1), **PPAR α** (F-ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC; R-GGCCTTGACCTTGTTTCATGT, Gene Bank NM_011144), **GLUT-4** (F-GATTCTGCTGCCCTTCTGTC; R-ATTGGACGCTCTCTCTCCAA; Gene Bank

NM_009204.2), así como la enzima de iniciación rápida, buffer para PCR y 3.5 nM de $MgCl_2$, en un volumen final de 10 μL . Las reacciones fueron medidas en un Rotor-Gene de tiempo real (Corbett Life Science). Los PCR fueron llevados a cabo usando las siguientes condiciones de ciclos: pre-incubación y desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos. El umbral de ciclos (Ct) fue medido usando tubos separados y por duplicado. La identidad y pureza de los productos de ampliación fueron analizados al inicio de la amplificación siguiendo las condiciones del kit SYBER Green, tal cual lo indica la compañía (Roche Molecular Biochemicals). Para asegurar la calidad de las mediciones, cada ensayo incluyó un control negativo para cada gen. La cantidad de ARNm de cada adipocito fue normalizado de acuerdo con la cantidad de ARNm ribosomal que codifica para la proteína 36B4 (F-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT; R-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT; Gene Bank NM_007475.2).

Los valores de ΔCt fueron calculados en cada muestra de cada gen de interés como se menciona a continuación: Ct gen de interés – Ct gen de referencia (β -actina como el gen de referencia, el cual se mantuvo estable durante todo el experimento). Los cambios relativos en los niveles de expresión de un gen en específico ($\Delta\Delta Ct$) fueron calculados como ΔCt del grupo de prueba menos ΔCt del grupo control y entonces presentado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

7.13. Acoplamiento molecular sobre PPAR γ y PPAR α

El acoplamiento molecular es una herramienta útil para predecir el modo de unión de una molécula con una diana biológica. Por tal motivo, se determinó el posible modo de unión del ácido rosmarínico y el rosmarinato de metilo sobre PPAR α/γ . Las estructuras cristalizadas de estas proteínas fueron obtenidas de la base de datos Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), bajo los códigos de identificación 5HYK y 117I. Estas proteínas se prepararon en el programa computacional MOE, en el que se minimizó su energía y se ionizó a los ligandos. Los cálculos de acoplamiento fueron realizados con el programa AutoDock, versión 4.2. el programa AutoDock realiza un acoplamiento automatizado del ligando semiflexible con el sitio de unión rígido de la proteína. El programa

conlleva varias corridas del experimento (100), donde cada corrida proporciona una predicción del modo de unión. Todas las moléculas de agua y los ligandos cristalográficos fueron removidas de la estructura, además todos los átomos de hidrógeno fueron añadidos. Para todos los ligandos y proteínas, fueron asignadas las cargas de Gasteiger y los átomos no polares fueron escondidos. Todas las torsiones fueron consideradas para moverse durante el acoplamiento.

El programa auxiliar AutoGrid generó los mapas electrostáticos del grid. Cada grid fue centrado sobre las coordenadas cristalográficas de ligando cristalográfico. Las dimensiones del grid fueron 50 x 50 x 50 Å y 60 x 60 x 60 Å para PPAR α/γ , respectivamente, con un espacio de grid de 0.375 Å. El algoritmo Genético Lamarckiano fue aplicado para la búsqueda usando parámetros ya establecidos. Después del acoplamiento, los resultados fueron reagrupados en grupos con RMSD de 0.5-2 Å. Se utilizaron MOE 2018.01 y Pymol 1.7.4 para la visualización.

7.14. Estudio fitoquímico bio-dirigido de *C. morelosana*

Con base en los antecedentes y el estudio previo del extracto etanólico de *Cordia morelosana* (EECm), se seleccionó este extracto para llevar a cabo el estudio fitoquímico. Se pesaron 49.41 g del extracto para la preparación de la muestra, la cual fue adsorbida con gel de sílice, añadiendo gota a gota diclorometano (CH_2Cl_2), hasta obtener la incorporación total de la muestra con la sílice.

7.15. Cromatografía en Columna (CC)

Una vez adsorbida la muestra en la sílice, se aplicó en una columna de vidrio para cromatografía. La columna fue previamente empacada con gel de sílice 60 (Macherey-Nagel) y CH_2Cl_2 . Posteriormente, se añadió la fase móvil (CH_2Cl_2 , 100 %) para ir obteniendo fracciones de 250 mL, la fase móvil consistió en gradientes con disolventes (de polaridad ascendente) (Tabla 5), donde se utilizaron diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH). Una vez obtenidas las fracciones, estas se colocaron en un

ratoaevaporador con presión reducida y temperatura controlada para eliminar el disolvente y, posteriormente, secar completamente con aire cada una de las fracciones obtenidas.

Tabla 5. Cromatografía en columna del EECm.

Disolventes	Proporción (%)	Fracciones obtenidas
CH ₂ Cl ₂	100	1-20
AcOEt	100	21-39
AcOEt:MeOH	95:5	40-54
AcOEt:MeOH	90:10	55-76
AcOEt:MeOH	85:15	77-98
AcOEt:MeOH	80:20	99-114
AcOEt:MeOH	70:30	115-128
AcOEt:MeOH	60:40	129-141
AcOEt:MeOH	50:50	142-154
MeOH	100	155-170

CH₂Cl₂ = Diclorometano AcOEt = Acetato de Etilo MeOH = Metanol

El proceso de separación fue monitoreado utilizando cromatografía en capa fina (CCF) con cromatoplasmas de gel de sílice 60, base de aluminio (Macherey-Nagel, UV₂₅₄). Las fracciones que mostraron similitud cromatográfica fueron reunidas y, posteriormente se seleccionaron algunas de ellas para continuar con el proceso de separación mediante diversos procesos de re-cromatografía (Tabla 6), y/o para ser analizadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno (¹H) y carbono trece (¹³C).

Tabla 6. Tipos de cromatografía

Cromatografía en columna	Cromatografía en capa fina	Cromatografía radial	Sistema de Vacío para Extracción en Fase Sólida (SVEFS)
Fase estacionaria: gel de sílice 60	Fase estacionaria: cromatoplasma gel de sílice 60, UV ₂₅₄ , base de aluminio	Fase estacionaria: yeso y gel de sílice 60 PF ₂₅₄ .	Fase estacionaria: cartuchos gel de sílice, C18
Fase móvil: mezcla de disolventes en polaridad ascendente	Fase móvil: mezcla de disolventes en polaridad ascendente	Fase móvil: mezcla de disolventes en polaridad ascendente,	Fase móvil: mezcla de disolventes (acuosa y orgánica)

Derivado de lo anterior, se obtuvieron en total 170 fracciones las cuales se reunieron en cinco grupos principales a los que se les asignaron las siguientes claves: FI, FII, FIII, FIV y FV, de acuerdo con lo observado en CCF.

De manera inicial, estos cinco grupos de fracciones fueron seleccionados para determinar su efecto inhibitorio sobre la actividad de enzimas α -glucosidasas y, así, dar dirección al estudio fitoquímico con base en la actividad biológica mostrada. De este modo, se seleccionaron las fracciones que mostraron mayor actividad en el ensayo de inhibición de enzimas α -glucosidasas y, posterior a diferentes procesos de re-cromatografía se identificaron los siguientes metabolitos secundarios:

Rosmarinato de metilo y ácido rosmarínico, estos compuestos se obtuvieron mediante CC del grupo de fracciones con clave FII, ambos compuestos fueron identificados en las fracciones eluídas con AcOEt: MeOH (proporción 95:5 %), principalmente. Se obtuvo un total de 111 mg del rosmarinato de metilo y 33 mg de ácido rosmarínico, los compuestos se observaron como un polvo color beige-marrón. Los datos espectroscópicos obtenidos mediante el análisis de RMN ^1H y ^{13}C son los siguientes:

Rosmarinato de Metilo (RM). ^1H -RMN (700 MHz, DMSO- d_6 , espectro 1a) δ 7.48 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.06 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2), 7.01 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6), 6.77 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.64 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.64 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.50 (1H, dd, $J = 8.0, 2.1$ Hz, H-6'), 6.26 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.11 (1H, dd, $J = 7.8, 5.1$ Hz, H-8'), 3.63 (3H, s, -OCH₃), 2.97 (1H, dd, 14.3, 5.0 Hz, H-7'), 2.93 (1H, dd, 14.3, 7.8 Hz, H-7').

^{13}C -RMN (175 MHz, DMSO- d_6 , espectro 1b), δ 170.0 (C-9'), 165.9 (C-9), 148.8 (C-4), 146.4 (C-7), 145.6 (C-3), 145.0 (C-3'), 144.2 (C-4'), 126.7 (C-1'), 125.3 (C-1), 121.8 (C-6), 120.1 (C-6'), 116.7 (C-2'), 115.8 (C-5), 115.5 (C-5'), 114.9 (C-8), 112.9 (C-2), 72.8 (C-8'), 52.0 (-OCH₃), 36.2 (C-7'), 36.2 (C-7').

Ácido rosmarínico (AR). $^1\text{H RMN}$ (200 MHz, CD_3OD , espectro 2a) δ 6.74 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 6.24 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.14 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-6), 5.97 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 5.94 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2'), 5.98 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 5.80 (1H, dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, H-6), 5.46 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 4.36 (1H, dd, $J = 8.2, 4.5$ Hz, H-8'), 2.30 (1H, dd, 14.4, 4.5 Hz, H-7'), 2.18 (1H, dd, 14.3, 8.3 Hz, H-7').

$^{13}\text{C RMN}$ (50 MHz, CD_3OD , espectro 2b), δ 174.1 (C-9'), 168.0 (C-9), 149.7 (C-4), 147.6 (C-7), 146.8 (C-3), 146.1 (C-3'), 145.2 (C-4'), 129.5 (C-1'), 127.7 (C-1), 123.1 (C-6), 121.8 (C-6'), 117.6 (C-2'), 116.5 (C-5), 116.3 (C-5'), 115.2 (C-8), 114.5 (C-2), 75 (C-8'), 38 (C-7'), 38 (C-7').

Nicotiflorina, este compuesto se obtuvo por precipitación espontánea durante la evaporación del disolvente de las fracciones primarias derivadas de la CC del EECm (incluida las fracciones del grupo FIII), las fracciones fueron eluidas con un sistema de mediana polaridad (AcOEt: MeOH, en proporción 90:10 %). El precipitado se observó como un sólido color amarillo. Al ser analizado mediante CCF, absorbía luz UV y posterior a la aplicación de sulfato cérico amoniacal reveló como una mancha color amarillo intenso (color característico que sugiere la presencia de un compuesto tipo flavonoide), junto con una mancha color marrón. Posteriormente, se intentó obtener el compuesto puro al ser sometido a una re-cromatografía con el Sistema de Vacío para Extracción en Fase Sólida (SVEFS), utilizando Agua: MeOH como fase de elusión. En total, se obtuvieron 150 mg del precipitado color amarillo, el cual se analizó mediante RMN ^1H y ^{13}C . Los datos espectroscópicos obtenidos son los siguientes:

Nicotiflorina. $^1\text{H RMN}$ (200 MHz, CD_3OD , espectro 3a) δ 12.23 (1H, s, H-5), 8.04 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', H-6'), 6.88 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', H-5'), 6.35 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.09 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1'), 4.55 (1H, s, $J = 1.3$ Hz, H-1''), 1.14 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6''').

$^{13}\text{C RMN}$ (50 MHz, CD_3OD , espectro 3b), δ 158.3 (C-2), 135.6 (C-3), 179.3 (C-4), 162.8 (C-5), 99.2 (C-6), 165.8 (C-7), 95.0 (C-8), 159.3 (C-9), 105.5 (C-10), 123.7 (C-1'), 132.4 (C-2', C-6'), 116.2 (C-3', C-5'), 161.3 (C-4'), 104.8 (C-1''), 75.7 (C-2''), 78.1 (C-3''), 71.8

(C-4''), 77.1 (C-5''), 68.6 (C-6''), 102.4 (C-1'''), 72.0 (C-2'''), 72.3 (C-3'''), 73.9 (C-4'''), 69.5 (C-5'''), 17.9 (C-6''').

1-*O*-metil-*scyllo*-inositol, este compuesto se obtuvo como un precipitado color blanco presente en las fracciones FIV y FV, derivadas de la CC del EECm. Las fracciones fueron obtenidas en un sistema de elución de mayor polaridad, constituido por AcOEt: MeOH (proporción 50:50 %). Los datos espectroscópicos obtenidos son los siguientes:

1-*O*-metil-*scyllo*-inositol. ¹H RMN (400 MHz, D₂O, espectro 4a) δ 3.56 (3H, s), 3.41-3.23 (5H, m), 3.09 (1H, t, *J* = 9.4 Hz).

¹³C RMN (100 MHz, D₂O, espectro 4b), δ 59.74 (-OCH₃), 73.39 (C-5, C-3), 73.31 (C-4), 72.82 (C-4), 83.29 (C-1).

7.16. Estudio Fitoquímico de *Calea zacatechichi*

El extracto metanólico de *Calea zacatechichi* (EMCz) fue sometido a un proceso de extracción líquido-líquido (bipartición). A un total de 36.4 g del extracto se hizo la bipartición (por triplicado), utilizando los siguientes disolventes: *n*-hexano, CH₂Cl₂, AcOEt y *n*-butanol, en orden consecutivo y, recuperando la fase acuosa (Figura 7).

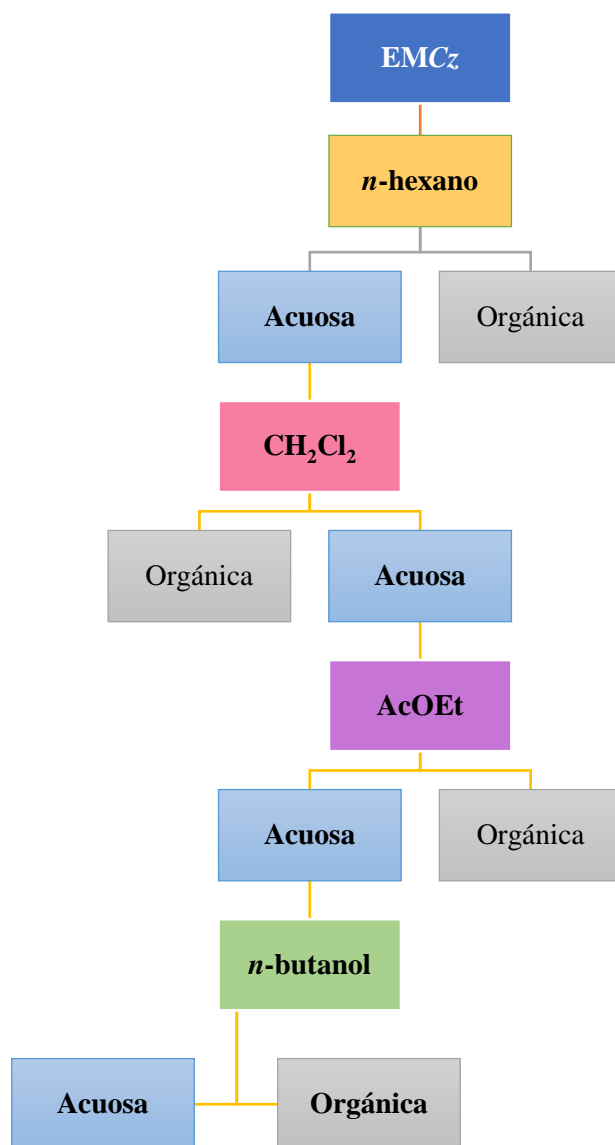


Figura 7. Proceso de extracción líquido-líquido.

Las fracciones obtenidas se secaron y se pesaron para llevar a cabo las evaluaciones biológicas correspondientes y ser sometidas a procesos de re-cromatografía para la obtención, identificación y aislamiento de los metabolitos secundarios.

Se tomaron 8.15 g de la fracción obtenida con *n*-butanol, la cual se aplicó en una columna empacada con gel de sílice flash como fase estacionaria y se utilizó una mezcla de disolventes en polaridad ascendente para la fase móvil (AcOEt: MeOH). Posteriormente, el proceso de separación fue monitoreado mediante CCF. Resultado de lo anterior, se obtuvieron en total 67 fracciones y, durante el proceso de evaporación de las fracciones, se observó en la esfera la presencia de un precipitado color amarillo. Este precipitado estuvo presente en mayor cantidad en las fracciones y, al ser monitoreadas mediante CCF se observaron como manchas color amarillo, al ser reveladas con sulfato cérico amoniacal (Figura 8). Las manchas amarillas en la CCF es una de las características cualitativas que indican la posible presencia de un compuesto tipo flavonoide, los cuales se caracterizan por un color amarillo intenso.



Figura 8. a) Precipitado color amarillo, b) CCF de las fracciones obtenidas, sistema de elusión AcOEt: MeOH 7:3.

Posteriormente, se seleccionaron algunas de las fracciones derivadas de la CC de la fracción obtenida con *n*-butanol, para llevar a cabo una cromatografía radial (CR) y, así, poder identificar el o los compuestos presentes en el precipitado.

Se aplicaron 200 mg en el disco de CR (1 mm de espesor) para ser eluida con una fase móvil constituida por CH₂Cl₂: MeOH, en proporción 8:2 %. Se obtuvieron fracciones de 5 mL y cada fracción fue monitoreada mediante CCF.

Al final del proceso, se obtuvieron en total 36 fracciones, de las cuales 10 de ellas mostraron la presencia del precipitado color amarillo, pero no en su forma pura. Adicionalmente, se realizaron diversos lavados (con acetona) al precipitado, con la finalidad de intentar obtener un precipitado más limpio. Posteriormente, se seleccionó una de las fracciones la cual fue asignada con la clave CR-9 para su análisis en RMN ¹H y ¹³C.

Después del análisis mediante RMN, se identificó al compuesto rutina, los datos espectroscópicos obtenidos son los siguientes:

Rutina. ¹H RMN (200 MHz, CD₃OD, espectro 5a) δ 7.67 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.63 (1H, dd, *J* = 2.2 Hz, *J* = 8.3 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 5.11 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''), 4.52 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H-1'''), 1.12 (1H, d, *J* = 6.1 Hz, H-6''').

¹³C RMN (50 MHz, CD₃OD) δ 157.1 (C-2), 134.2 (C-3), 178 (C-4), 157.9 (C-5), 164.6 (C-7), 93.4 (C-8), 164.2 (C-9), 122.7 (C-1'), 114.6 (C-2'), 114.4 (C-3'), 148.4 (C-4'), 116.3 (C-5'), 122.1 (C-6'), 101.0 (C-1''), 74.3 (C-2''), 76.7 (C-3''), 72.5 (C-4''), 75.8 (C-5''), 67.1 (C-6''), 103.3 (C-1'''), 70.0 (C-2'''), 70.7 (C-3'''), 70.8 (C-4'''), 68.3 (C-5'''), 16.4 (C-6''').

7.17. Elucidación estructural

La determinación estructural de los metabolitos secundarios se efectuó a través del análisis de los experimentos de RMN (¹H) y carbono trece (¹³C). Los experimentos se adquirieron en los equipos Varian® de 400 MHz y Mercury 200 MHz para ¹H y 100 MHz, 50 MHz para ¹³C, respectivamente. Las muestras (aproximadamente 30 mg) fueron disueltas en 750 µL de cada disolvente deuterado: CDCl₃, CD₃OD, DMSO-*d*₆, principalmente.

7.18. Análisis estadístico

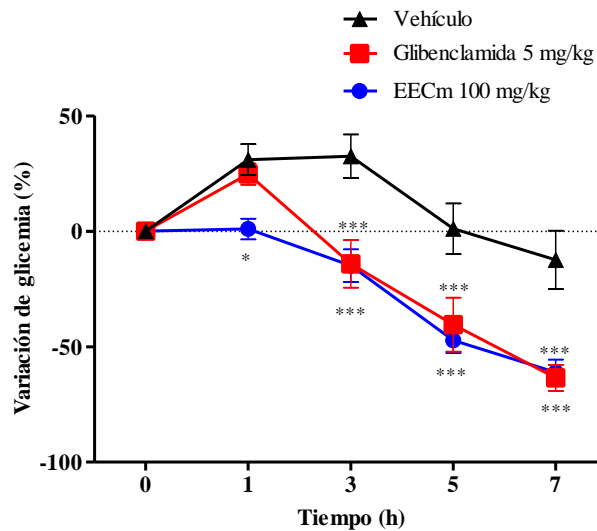
Los resultados se analizaron a través del programa estadístico GraphPad Prisma 6 para el cálculo de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos y se identificaron con el siguiente signo (*). Cada dato fue presentado como la media \pm E.E.M, para un grupo de 6 ($n=6$).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Determinación del potencial antidiabético del *EECm*.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar el potencial antidiabético del *EECm*, de la cual se han descrito sus usos en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos, incluyendo diabetes (Monroy y Castillo, 2007). Además, se llevó a cabo el estudio fitoquímico bio-dirigido para obtener e identificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antidiabética y, así, establecer el potencial modo de acción de los compuestos químicos obtenidos.

Se determinó el efecto antidiabético en un modelo experimental NID, en ratones. Como se muestra en la Gráfica 1, el *EECm* provocó una disminución significativa ($p < 0.05$) de los niveles de glucosa en sangre en ratones diabéticos, en comparación con el grupo vehículo, el efecto se observó desde la primera hora post administración y observándose un efecto aumentado durante las siguientes horas del ensayo. Además, el efecto observado por parte del *EECm*, fue similar al efecto mostrado con el grupo control, donde se utilizó glibenclamida (5 mg/kg), el cual es un fármaco secretagogo de insulina y que es utilizado en la terapéutica de la DM2.



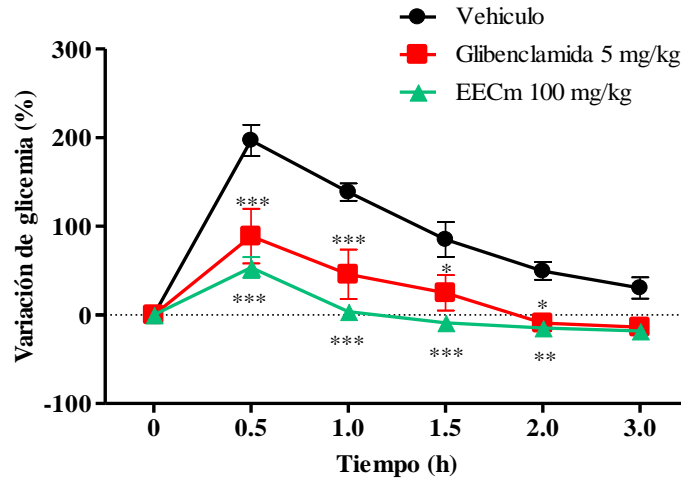
Gráfica 1. Efecto antidiabético del *EECm*. Los resultados se expresan como el promedio \pm E.E.M. (n=6). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparado con el vehículo.

En el análisis de los resultados de esta evaluación, la actividad mostrada por el *EECm* podría estar relacionada con alguno de los modos de acción antidiabética más comunes: uno relacionado con la actividad postprandial después de la inhibición de las enzimas α -glucosidasas y/o los co-transportadores de glucosa (SGLT-2 o SGLT-1), relacionados con una acción antihiper glucémica; el segundo modo de acción relacionado con la promoción de la secreción de insulina, desde las células β del páncreas y el tercer modo de acción relacionado con la sensibilización a la insulina (Ortiz et al., 2007).

Por consiguiente, se decidió llevar a cabo los ensayos a través de curvas de tolerancia oral a glucosa (CTOG) (utilizando como sustratos glucosa o sacarosa), para corroborar la participación de alguno de estos posibles mecanismos de acción.

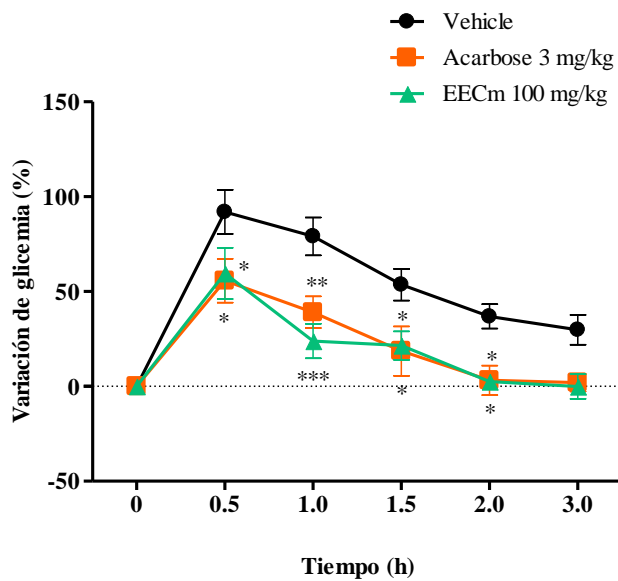
8.2. Evaluación del efecto antihiper glucémico del *EECm*.

En la Gráfica 2, se muestra el efecto antihiper glucémico del *EECm*, el cual se evaluó a una dosis de 100 mg/kg. Después de una administración oral de glucosa (2 g/kg), el *EECm* indujo una disminución significativa ($p < 0.001$) en la variación porcentual de la glucosa en sangre, a partir de la hora 0.5 hasta la hora 3 del ensayo y, el efecto fue comparado con el grupo vehículo que se utilizó. Desde el punto de vista de análisis, se conoce que las acciones para el control de la hiper glucemia postprandial están relacionados con mecanismos de acción pancreáticos y/o extra pancreáticos, como el aumento de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, la supresión de glucosa hepática, la estimulación de secreción de insulina o debido a la regulación de la absorción de la glucosa desde la luz intestinal, llevada a cabo por los transportadores de glucosa y co-transportadores de glucosa (Ortiz et al., 2008).



Gráfica 2. Efecto antihiper glucémico del EECm en una CTOG, sustrato glucosa. Los resultados se expresan como el promedio \pm E.E.M. (n=6). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 comparado con el vehículo.

Con la finalidad de seguir evaluando el mecanismo de acción relacionado con el efecto antihiper glucémico postprandial, se llevó a cabo el ensayo de curva de tolerancia oral a glucosa, utilizando como sustrato sacarosa (2 g/kg). En la Gráfica 3, se muestra que el EECm indujo un efecto significativo en la disminución del pico hiper glucémico de la curva de variación porcentual de glucosa en sangre, desde la hora 0.5 y manteniéndose hasta la hora 3 del ensayo. El efecto fue comparado con el grupo vehículo. En este ensayo se evaluó como control a acarbosa (3 mg/kg), el cual es un inhibidor de enzimas α -glucosidasas; acarbosa se utiliza de forma adicional al tratamiento antidiabético oral, para contribuir como estrategia terapéutica en la disminución de los niveles de glucosa, sobre todo con efectos en la glucosa posterior a la ingesta de alimentos. Los inhibidores como acarbosa actúan en las enzimas α -glucosidasas, que se encuentran en la pared intestinal, las cuales son responsables de la hidrólisis de carbohidratos complejos para su posterior absorción (Taslimi and Gulçin, 2017), en consecuencia, hay un retraso en la absorción de glucosa, reduciendo la hiper glucemia postprandial y los picos de insulina (Fontana et al., 2011).

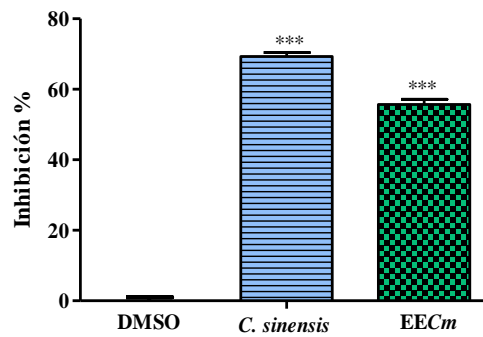


Gráfica 3. Efecto antihiper glucémico del EECm en una CTOG, sustrato sacarosa. Los resultados se expresan como el promedio \pm E.E.M. (n=6). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 comparado con el vehículo.

8.3. Evaluación del EECm sobre la actividad de enzimas α -glucosidasas.

Derivado de los resultados en la sección anterior, se decidió llevar a cabo la evaluación del EECm sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas, para saber si este es uno de los mecanismos de acción involucrados en la acción antihiper glucémica, debido a lo observado en el ensayo *in vivo*.

En la Gráfica 4, el EECm inhibió la actividad de las enzimas α -glucosidasas en un 55.6 % a una concentración de 1 mg/mL, en comparación con el control DMSO y, la inhibición fue similar a la producida por *Camelia sinensis*, extracto utilizado como control positivo (Ramírez et al., 2012). Estos resultados mostraron la relación entre la inhibición *in vitro* de la actividad de las enzimas α -glucosidasas y su probable participación en el ensayo a través de CTOG, en el que se utilizó sacarosa como sustrato y, donde el EECm mostró un efecto antihiper glucémico.



Gráfica 4. Efecto del *EECm* sobre la actividad de enzimas α -glucosidasas. Los resultados se expresan como el promedio \pm E.E.M. (n=5). ***p<0.001 comparado con DMSO.

Como se mencionó anteriormente, se ha sugerido que las fluctuaciones hiperglucémicas pueden contribuir al desarrollo de complicaciones crónicas de la diabetes, debido al estrés oxidativo e incremento de especies reactivas de oxígeno. En la actualidad, algunas de las estrategias terapéuticas para controlar la hiperglucemia postprandial incluyen el uso combinado de fármacos como: glinidas, inhibidores DPP-4, agonistas GLP-1, inhibidores SGLT-2 e inhibidores de enzimas α -glucosidasas (Pinés et al., 2018).

8.4. Estudio fitoquímico del *EECm*.

Posterior al análisis de los resultados anteriores y teniendo en cuenta que para *Cordia morelosana* no hay reportes sobre su constitución química, se decidió llevar a cabo el estudio fitoquímico bio-dirigido del *EECm*, con la finalidad de obtener e identificar los metabolitos secundarios responsables de las actividades biológicas observadas.

Resultado del estudio fitoquímico del *EECm*, se obtuvieron en total 170 fracciones que al ser monitoreadas mediante CCF se reunieron por similitud cromatográfica y se agruparon (Tabla 7).

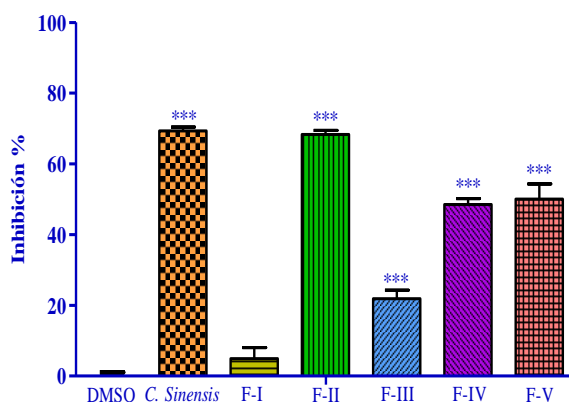
Tabla 7. Cromatografía en columna de EECm.

Disolventes	%	Fracciones	Grupos		
CH ₂ Cl ₂	100	1-20	(1-5)	(51-59)	(109-115)
AcOEt	100	21-39	(6-9)	(60)	(116-121)
AcOEt:MeOH	95:5	40-54	(10-15)	(61-63)	(122-128)
AcOEt:MeOH	90:10	55-76	(16-20)	(64-69)	(129-142)
AcOEt:MeOH	85:15	77-98	(21-24)	(70-77)	(143-145)
AcOEt:MeOH	80:20	99-114	(25-28)	(78-83)	(146-151)
AcOEt:MeOH	70:30	115-128	(29-34)	(84-88)	(152)
AcOEt:MeOH	60:40	129-141	(35-36)	(89-93)	(153-155)
AcOEt:MeOH	50:50	142-154	(37-39)	(94-97)	(156-162)
MeOH	100	155-170	(40-43)	(98-103)	(163-170)
			(44-50)	(104-108)	
CH ₂ Cl ₂ = Diclorometano			AcOEt = Acetato de Etilo		MeOH = Metanol

8.5. Evaluación de las fracciones primarias.

Posterior al fraccionamiento primario, se seleccionaron cinco grupos de fracciones por su contenido observado en CCF, a los cuales se les asignó la siguiente clave para su evaluación: **F-I** (10-15), **F-II** (29-34), **F-III** (78-83), **F-IV** (122-128) y **F-V** (153-155). Esto se llevó a cabo con la finalidad de bio-dirigir el estudio fitoquímico del EECm y, determinar el contenido metabólico en las fracciones primarias que mostraran mayor actividad biológica sobre los blancos terapéuticos seleccionados para este proyecto; además, para esclarecer los posibles mecanismos de acción involucrados en el potencial efecto antidiabético mostrado por el EECm.

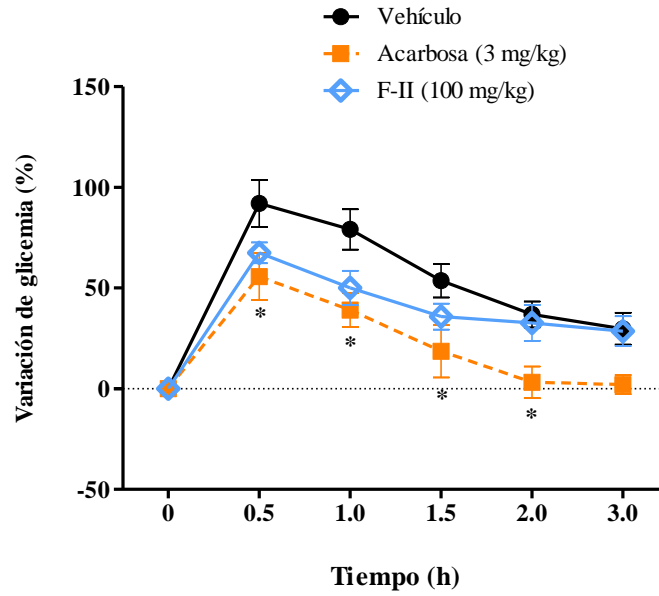
Se evaluaron las fracciones sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas a una concentración de 1 mg/mL. En la Gráfica 5, se puede observar que el grupo **F-II** fue la fracción más activa con un porcentaje de inhibición de 68.3 ± 1.19 %, seguida del grupo **F-V**, **F-IV**, **F-III** y **F-I**, con un porcentaje de inhibición de: 50 ± 4.3 %, 48.5 ± 1.7 %, 21.9 ± 2.4 % y 4.9 ± 3.2 %, respectivamente.



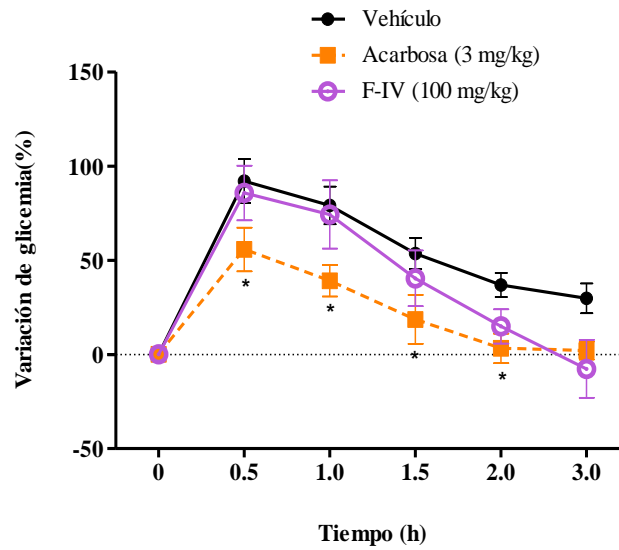
Gráfica 5. Efecto de las fracciones primarias sobre la actividad de enzimas α -glucosidasas. Los resultados se expresan como el promedio \pm E.E.M. (n=5). ***p<0.001 comparado con DMSO.

Derivado de lo anterior, adicionalmente se decidió evaluar el efecto de las fracciones más activas (grupo: **F-II**, **F-IV** y **F-V**) a una dosis de 100 mg/kg, en una CTOG, utilizando como sustrato sacarosa; para determinar su actividad en un modelo *in vivo*.

Los resultados se muestran en las gráficas 6, 7 y 8, donde se puede observar que F-II y F-IV no tuvieron efecto significativo en la disminución del pico hiperglucémico posterior a la ingesta del sustrato (sacarosa 2 g/kg). Cabe mencionar que la fracción F-II (de mediana polaridad) no fue completamente soluble en el vehículo utilizado (agua-tween 80 al 10 %) al momento de preparar la muestra, por lo cual puede influir en la dosis administrada y el efecto mostrado.

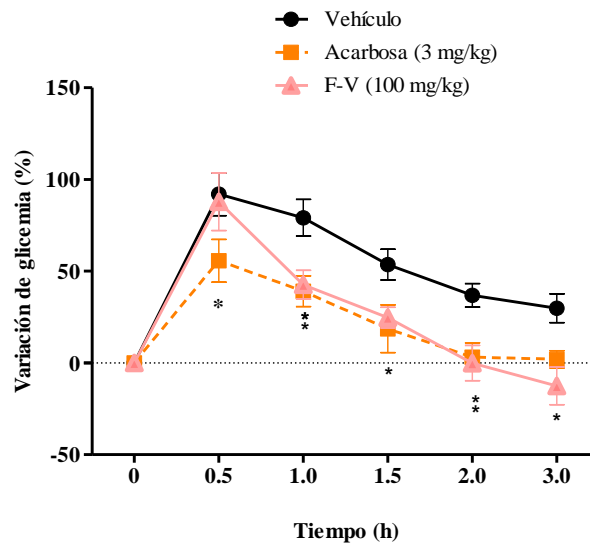


Gráfica 6. Efecto de F-II en la CTOG, sustrato sacarosa Los resultados se expresan como el promedio \pm E.E.M. (n=6). *p<0.05 comparado con el vehículo.



Gráfica 7. Efecto de F-IV en la CTOG, sustrato sacarosa Los resultados se expresan como el promedio \pm E.E.M. (n=6). *p<0.05 comparado con el vehículo.

En la gráfica 8, se evaluó la fracción F-V con la cual no hubo problemas de solubilidad, ya que se trataba de la reunión de fracciones de mayor polaridad. En este caso, la fracción F-V disminuyó los niveles de glucosa en sangre de manera significativa ($p < 0.05$) comparada con el vehículo utilizado. El efecto fue sostenido hasta la hora 3, llegando a valores por debajo de los niveles basales. De este modo, podemos inferir que la fracción F-V podría contener metabolitos secundarios cuyos mecanismos de acción no solo están en relación con las enzimas α -glucosidasas, sino también, con mecanismos de acción relacionados con la inhibición del transporte de glucosa y la secreción o sensibilización a insulina, favoreciendo el ingreso de glucosa dentro de las células.



Gráfica 8. Efecto de F-V en la CTOG, sustrato sacarosa. Los resultados se expresan como el promedio \pm E.E.M. (n=6). * $p < 0.05$ comparado con el vehículo

8.6. Elucidación estructural de los metabolitos secundarios.

Las fracciones primarias derivadas del estudio fitoquímico del EECm y, que mostraron mayor actividad en el ensayo *in vivo* e *in vitro*, fueron sometidas a sucesivos procesos de re-cromatografía (ver sección 7.15.), con la finalidad de obtener e identificar los metabolitos

secundarios presentes y, poder establecer su participación como probables responsables de la actividad biológica observada.

Después de los procesos de re-cromatografía, se seleccionaron y se enviaron diferentes muestras para su análisis a través de RMN de ^1H y ^{13}C . Los compuestos mayoritarios identificados fueron los siguientes:

8.7. Rosmarinato de metilo y ácido rosmarínico.

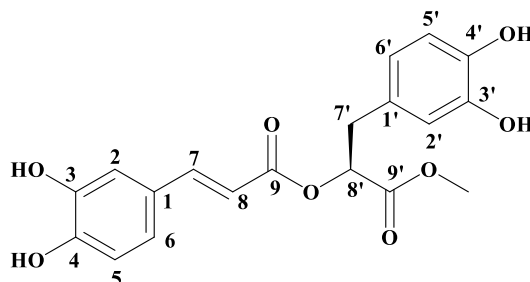
Los compuestos rosmarinato de metilo y el ácido rosmarínico, fueron obtenidos posterior a un proceso de re-cromatografía en columna, ambos compuestos se identificaron en la fracción que mostró mayor actividad en el ensayo *in vitro* de enzimas α -glucosidasas, la fracción **F-II**.

En el análisis de RMN ^1H (espectro 1a) y RMN ^{13}C (espectro 1b) para el compuesto rosmarinato de metilo se observaron señales en desplazamientos químicos entre 6 a 7 ppm para hidrógenos presentes sobre anillos aromáticos, se observaron dos señales dobles (d) en 7.48 ppm y 6.26 ppm, características de hidrógenos vinílicos con orientación *trans* por la constante de acoplamiento de 15.9 Hz. En un desplazamiento de 5.11 ppm, se observó una señal doble de doble (dd) con constantes de acoplamiento de 5.1 y 7.8 Hz que integro para un hidrógeno (HX) el cual tenía como vecinos a dos hidrógenos que están sobre un mismo átomo de carbono ($\text{C8}'$), en un desplazamiento de 2 a 3 ppm se observaron dos grupos de señales doble de doble (dd), con constantes de acoplamiento de 14.3, 5.0 para una y 14.3, 7.8 Hz para la otra. Adicionalmente, se observó una señal simple de mayor intensidad en 3.63 ppm, lo que indicó la presencia de tres hidrógenos y por el desplazamiento químico que presenta características de metilo base de oxígeno ($-\text{CH}_3$) y lo cual fue corroborado por su desplazamiento en RMN ^{13}C , de 52 ppm.

En el caso del ácido rosmarínico, se observaron señales parecidas permitiendo establecer que se trataba de una estructura similar, pero la ausencia de la señal en 3.63 ppm en el espectro de RMN ^1H (espectro 2a) y de 52 ppm en RMN ^{13}C (espectro 2b), lo que permitió establecer que se trataba del compuesto ácido rosmarínico.

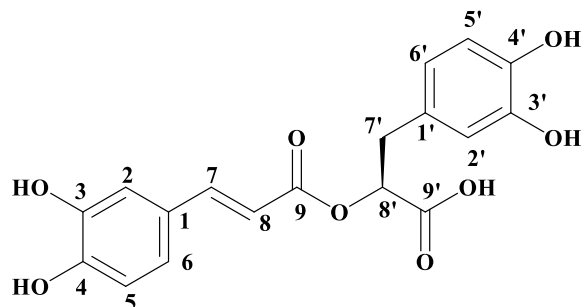
La elucidación estructural se hizo con base en las señales observadas en el análisis por RMN de ^{13}C y ^1H , los datos espectroscópicos fueron comparados con los reportados en la

literatura tanto para el rosmarinato de metilo como para el ácido rosmarínico (Tabla 8 y 9, respectivamente) (Kang et al., 2004).



Rosmarinato de metilo.

Tabla 8. Datos espectroscópicos, RM				
Rosmarinato de metilo (aislado de EECm) ¹ H-RMN (700 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) ¹³ C-RMN (175 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)			Rosmarinato de metilo (literatura) 400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄	
C	δ, integral, m, Cte.	¹³ C	δ, integral, m, Cte.	¹³ C
9'		170.0		173.0
9		165.9		169.1
4		148.8		150.6
7	7.48 (1H, d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	146.4	7.55 (1H, d, <i>J</i> = 16 Hz)	148.7
3		145.6		147.6
3'		145.0		147.0
4'		144.2		146.2
1'		126.7		129.6
1		125.3		128.4
6	7.01 (1H, dd, <i>J</i> = 2.0, 8.3 Hz)	121.8	6.95 (1H, dd, <i>J</i> = 2.1, 8.2 Hz)	124.0
6'	6.50 (1H, dd, <i>J</i> = 2.1, 8.0 Hz)	120.1	6.60 (1H, dd, <i>J</i> = 2.1, 8.1 Hz)	122.6
2'	6.64 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	116.7	6.70 (1H, d, <i>J</i> = 2.5 Hz)	118.3
5	6.77 (1H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	115.8	6.77 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	117.3
5'	6.64 (1H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz)	115.5	6.69 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	117.1
8	6.26 (1H, d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	114.9	6.26 (1H, d, <i>J</i> = 16 Hz)	116.0
2	7.06 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	112.9	7.04 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	114.9
8'	5.11 (1H, dd, <i>J</i> = 5.1, 7.8 Hz)	72.8	5.18 (1H, dd, <i>J</i> = 5.3, 7.5 Hz)	75.4
-CH ₃	3.63 (3H, s)	52	3.69 (3H, s)	53.5
7'	2.93 (1H, dd, <i>J</i> = 14.3, 5.0Hz)	36.2	3.03 (1H, dd, <i>J</i> = 14.4, 4.7 Hz)	38.7
	2.93 (1H, dd, <i>J</i> = 14.3, 7.8 Hz)		3.02 (1H, dd, <i>J</i> = 14.4, 6.9 Hz)	



Ácido rosmarínico

Tabla 9. Datos espectroscópicos, AR				
Ácido rosmarínico (aislado de EECm) ¹ H-RMN (200 MHz, CD ₃ OD) ¹³ C-RMN (50 MHz, CD ₃ OD)			Ácido rosmarínico (literatura) 400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄	
C	δ, integral, m, Cte.	¹³ C	δ, integral, m, Cte.	¹³ C
9'		174.1		174.3
9		168.0		169.2
4		149.7		150.5
7	6.74 (1H, d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	147.6	7.54 (1H, d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	148.5
3		146.8		147.6
3'		146.1		146.9
4'		145.2		146.1
1'		129.5		130.0
1		127.7		128.4
6	6.14 (1H, dd, <i>J</i> = 1.9, 8.2 Hz)	123.1	6.94 (1H, dd, <i>J</i> = 2.0, 8.3 Hz)	123.9
6'	5.80 (1H, dd, <i>J</i> = 1.9, 8. Hz)	121.8	6.60 (1H, dd, <i>J</i> = 2.1, 8.1 Hz)	122.6
2'	5.94 (1H, d, <i>J</i> = 1.7 Hz)	117.6	7.03 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	118.4
5	5.97 (1H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	116.5	6.77 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	117.3
5'	5.98 (1H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz)	116.3	6.69 (1H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	117.1
8	5.46 (1H, d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	115.2	6.26 (1H, d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	116.0
2	6.24 (1H, d, <i>J</i> = 1.8 Hz)	114.5	6.74 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	115.2
8'	4.36 (1H, dd, <i>J</i> = 4.5, 8.2 Hz)	75	5.17 (1H, dd, <i>J</i> = 4.3, 8.4 Hz)	75.4
7'	2.30 (1H, dd, <i>J</i> = 14.4, 4.5 Hz)	38	3.09 (1H, dd, <i>J</i> = 14.4, 4.3 Hz)	38.7
	2.18 (1H, dd, <i>J</i> = 14.3, 8.3 Hz)		3.09 (1H, dd, <i>J</i> = 14.3, 8.4 Hz)	

Por otro lado se hizo una amplia revisión bibliográfica y se encontró que tanto el compuesto AR como el RM, han sido aislados de otras especies vegetales del género *Cordia*

(Geller et al., 2010) y, principalmente, el AR es un componente característico de especies vegetales que pertenecen a la familia Lamiaceae, de donde se aisló por primera vez a partir de *Rosmarinus officinalis* L y característico también de la familia Boraginaceae, en donde se presenta en cantidades más altas. El AR ha sido identificado como uno de los componentes activos de diversas plantas medicinales como: *Salvia officinalis* (Salvia) *Thymus vulgaris* (Tomillo) (Petersen and Simmonds, 2003), *Cordia sebestena* (árbol, no me olvides) (Dai et al., 2010), *Cordia verbenacea* (Oza and Kulkarni, 2017), *Salvia miltiorrhiza* (Kang et al., 2004) y *Cordia dichotoma* de donde se ha aislado tanto el ácido rosmarínico como el rosmarinato de metilo (Oza and Kulkarni, 2017).

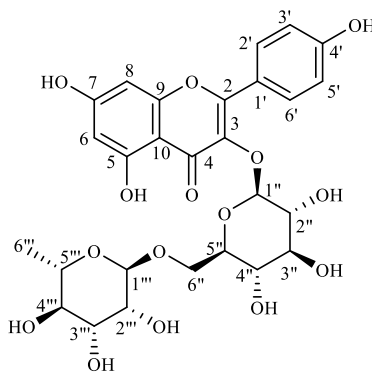
Diversos estudios han evaluado las actividades farmacológicas del ácido rosmarínico. Se ha descrito que el AR presenta una inhibición significativa de las enzimas α -glucosidasas (Kubínobá et al., 2013), lo que confirma el efecto mostrado por el EEC_m evaluado. También, el AR mostró una potente inhibición de la enzima DPP-4 y de PTP-1B en otro estudio. Adicionalmente, el AR ha sido identificado como un activador de la AMPK (Jayanthi et al., 2017). Por otro lado, tratamiento oral con 100 mg/kg del AR, durante 30 días, mejoró los niveles de glucosa en sangre, regulo las adipocinas y mejoro la sensibilidad a la insulina en ratas diabéticas (Jayanthi et al., 2014). Runtuwene et al. 2016, observaron que el AR redujo la hiperglucemia y mejoró la sensibilidad a la insulina, al aumentar la expresión del transportador de glucosa GLUT-4 y, Jayanthi y Subramanian (2014), informaron que el AR controla la glucosa en sangre regulando el transportador SGLT1 en la membrana intestinal. Por otro lado, el compuesto RM se describió por su efecto en la inhibición de enzimas α -glucosidasas, actividad antihiper glucémica e hipoglucémica (Ruíz-Vargas et al., 2019). Después de revisar estos antecedentes, las actividades descritas para estos compuestos pueden correlacionarse con los resultados observados en la evaluación de CTOG y el modelo de diabetes NID, lo que sugiere que los efectos antidiabéticos del EEC_m, podrían estar vinculados a más de un mecanismo acción y esto debido a la presencia del AR y del RM, como componentes mayoritarios. Por otro lado, los antecedentes farmacológicos son más escasos para el compuesto RM y casi no existen datos sobre su mecanismo de acción, por esta razón y debido a que se aisló en la fracción que presentó mayor actividad, se decidió evaluar su actividad antidiabética y su posible mecanismo de acción como

insulinosensibilizador, en un modelo de diabetes NID y en la expresión de PPARs. Los resultados se presentarán en un apartado más adelante.

8.8. Nicotiflorina.

Este compuesto se obtuvo por precipitación espontánea durante la evaporación del disolvente de las fracciones primarias, entre ellas el grupo de fracciones con clave FIII que se evaluó en el ensayo de inhibición de enzimas α -glucosidasas. Se obtuvieron 150 mg del precipitado color amarillo, el cual se analizó mediante RMN ^1H (espectro 3a) y RMN ^{13}C (espectro 3b). En el espectro de RMN ^1H se observaron varias señales en desplazamientos entre 6 a 8 ppm para los hidrógenos sobre anillos aromáticos correspondientes a los anillos del flavonoide, en la región con desplazamientos entre 3 a 5 ppm se evidenció la presencia de señales para hidrógenos de un fragmento glucosídico, donde además se observaron las señales características para dos hidrógenos anoméricos, lo cual indicó la presencia de dos unidades glucosídicas en la molécula, en 4.55 ppm con una constante de acoplamiento de 1.3 Hz y 5.09 ppm con constante de acoplamiento de 7.4 Hz. Mediante el análisis de RMN ^{13}C se confirmó la presencia de estas moléculas al observar las señales en 102.4 y 104.8 ppm, correspondientes a ramnosa y glucosa, respectivamente.

La elucidación estructural se hizo con base en las señales observadas en el análisis por RMN, los datos espectroscópicos fueron comparados con los reportados en la literatura (Tabla 10) (Ahmadian et al., 2017).



Nicotiflorina

Tabla 10. Datos espectroscópicos, Nicotiflorina				
Nicotiflorina (aislada de EECm)			Nicotiflorina (literatura)	
¹ H-RMN (200 MHz, CD ₃ OD)			¹ H-RMN (400 MHz, CD ₃ OD)	
¹³ C-RMN (50 MHz, CD ₃ OD)			¹³ C-RMN (100 MHz, CD ₃ OD)	
C	δ, integral, m, Cte.	¹³ C	δ, integral, m, Cte.	¹³ C
2	-	158.3	-	158.3
3	-	135.6	-	134.5
4	-	179.3	-	178.80
5	12.23 (1H, s)	162.8	-	161.7
6	6.18 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	99.2	6.21 (1H, d, <i>J</i> = 1.2 Hz)	99.98
7	-	165.8	-	165.8
8	6.35 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	95.0	6.40 (1H, d, <i>J</i> = 1.2 Hz)	94.95
9	-	159.3	-	158.3
10	-	105.5	-	104.8
1'	-	123.7	-	122.6
2', 6'	8.04 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz)	132.4	8.08 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz)	132.4
3', 5'	6.88 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	116.2	6.90 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz)	116.0
4'	-	161.3	-	160.4
1''	5.09 (1H, d, <i>J</i> = 7.4 Hz)	104.8	5.15 (1H, d, <i>J</i> = 7.5 Hz)	104.6
2''	-	75.7	-	75.7
3''	-	78.1	-	78.1
4''	-	71.8	-	71.4
5''	-	77.1	-	77.2
6''	-	68.6	-	68.5
1'''	4.55 (1H, d, <i>J</i> = 1.3 Hz)	102.4	4.54 (1H, bs)	102.2
2'''	-	72	-	72.1
3'''	-	72.3	-	72.2
4'''	-	73.9	-	73.8
5'''	-	69.5	-	69.7
6'''	1.14 (3H, d, <i>J</i> = 6.0 Hz)	17.9	1.14 (3H, d, <i>J</i> = 6.0 Hz)	17.9

Como se sabe, los compuestos tipo flavonoides constituyen un amplio grupo de compuestos presentes en diferentes especies vegetales, cuyas actividades biológicas han sido descritas ampliamente, entre ellas: como antioxidantes, antiinflamatorios, hepatoprotectores, analgésicos, antimicrobianos, anticancerígenos y antidiabéticos (Delgado et al., 2015).

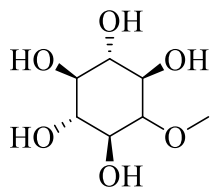
C. morelosana es una planta de la familia Boragináceas, al igual que *C. dichotoma*, de la cual se ha aislado el flavonoide nicotiflorina. *C. dichotoma* ha sido reportada por sus efectos hipoglucémicos y antihiperoglucémicos en modelos de evaluación *in vivo* (Jamkhande et al., 2013). El flavonoide nicotiflorina se ha reportado como un compuesto neuroprotector, antioxidante (El-Mostafa et al., 2014) e inhibidor de la actividad de enzimas α -glucosidasas (29.9 ± 5.56 %) (Ávila., 2017).

Por otro lado, aunque la fracción F-III, no tuvo un efecto relevante en el ensayo de inhibición de enzimas α -glucosidasas al compararlo con las otras fracciones evaluadas, se decidió analizar esta fracción desde el punto de vista cromatográfico, por su contenido observado en CCF y por la presencia del precipitado en las fracciones primarias.

8.9. 1-O-metil-scyllo-inositol.

Se obtuvo un precipitado color blanco (81 mg) a partir de la re-cromatografía en columna de las fracciones de mayor polaridad, incluidas F-IV y F-V, las cuales mostraron actividad en el ensayo de inhibición de enzimas α -glucosidasas y, FV en el ensayo *in vivo* de CTOG.

La elucidación estructural se hizo con base en las señales observadas en RMN ^1H (espectro 4a) y RMN ^{13}C (espectro 4b), los datos espectroscópicos fueron comparados con los reportados en la literatura (Tabla 11) (Sun et al., 2008).



1-*O*-metil-*scyllo*-inositol

Tabla 11. Datos espectroscópicos, 1- <i>O</i> -metil- <i>scyllo</i> -inositol			
1- <i>O</i> -metil- <i>scyllo</i> -inositol (literatura) (400 MHz, D ₂ O)		1- <i>O</i> -metil- <i>scyllo</i> -inositol (aislado de EECm) ¹ H-RMN (400 MHz, D ₂ O)	
δ, integral, m, Cte.	¹³ C	δ, integral, m, Cte.	¹³ C
3.62 (3H, s)	59.98	3.56 (3H, s)	59.74
3.47-3.30 (5H, m)	73.66, 73.57, 73.10	3.41-3.23 (5H, m)	73.39, 73.31, 72.82
3.15 (1H, t, <i>J</i> =9.3 Hz)	83.57	3.09 (1H, t, <i>J</i> =9.4 Hz)	83.29

En la revisión bibliográfica de especies vegetales del género *Cordia*, no se encontró reporte sobre el compuesto 1-*O*-metil-*scyllo*-inositol. Sin embargo, se han aislado una amplia variedad de isómeros de inositol en otras especies vegetales (familia Fabaceae) (Poongothai et al., 2013).

Existe un gran interés en este tipo de compuestos dado que, en particular, *myo*-inositol y *D-chiro*-inositol han sido descritos por poseer actividades como miméticos de insulina y ser eficientes en la disminución de la glucosa postprandial (Croze et al., 2013). El compuesto D-pinitol, otro isómero importante, se ha reportado por su actividad antidiabética (Sharma et al., 2014), mientras que el isómero *scyllo*-inositol posee potencial para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, interactuando directamente con el péptido amiloide, en las células beta del páncreas (Sun et al., 2008).

Como se pudo observar, el compuesto 1-*O*-metil-*scyllo*-inositol es uno de los compuestos que también podría contribuir de manera importante a la actividad antidiabética mostrada en el ensayo *in vitro* e *in vivo* por parte del EECm. Las fracciones F-IV y F-V, derivadas del estudio fitoquímico bio-dirigido del EECm, también mostraron actividad en el ensayo de inhibición de α -glucosidasas y la F-V en el ensayo *in vivo*.

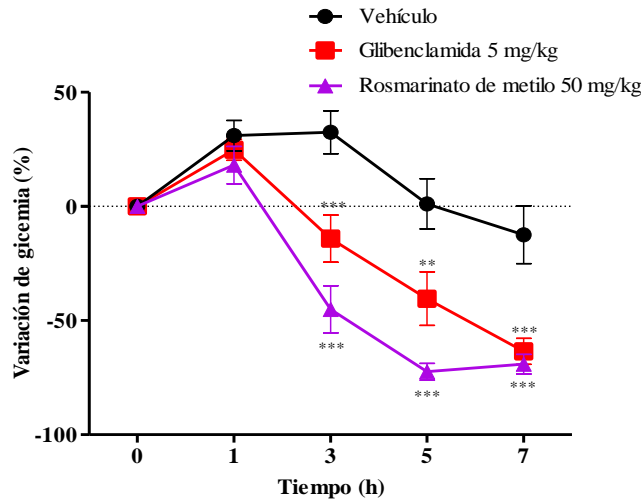
8.10. Determinación del efecto antidiabético e insulino sensibilizador de RM y AR: *in vivo*, *in vitro* e *in silico*

8.11. Evaluación del rosmarinato de metilo en un modelo de diabetes NID.

Como se mencionó anteriormente, con la finalidad de determinar el potencial antidiabético del compuesto RM, para el cual existen muy pocos reportes sobre su actividad farmacológica, se evaluó de forma inicial en el modelo de diabetes NID, en ratones.

En la Gráfica 9, el RM evaluado a una dosis de 50 mg/kg, indujo un efecto significativo ($p < 0.001$) en los niveles de glucosa plasmática, el efecto hipoglucémico se mantuvo desde la hora 3 hasta las 7 horas del ensayo y fue comparado con el vehículo. El efecto por parte del RM fue mejor comparado con el efecto mostrado por glibenclamida (5 mg/kg) utilizado como control.

Por otro lado, prestando atención a la curva observada y teniendo en cuenta la estructura química del RM, este podría comportarse como un profármaco (es un éster metílico del AR), ya que después de la administración puede ser metabolizado por esterasas para generar el ácido carboxílico libre. Este efecto podría deducirse dado que en la primera hora después de la administración, el RM no mostró efecto en la disminución de los niveles de glucosa en sangre, sino que se observó hasta la hora 3 del ensayo. La importante actividad antidiabética mostrada por RM podría estar relacionada con la acción antihiper glucémica promovida por la inhibición de las enzimas α -glucosidasas, según lo descrito por Ruíz-Vargas y cols. (2019), donde tuvo un 83 % de inhibición a 0.75 mM. Sin embargo, con la finalidad de evaluar la actividad del RM sobre un posible mecanismo de acción relacionado con la sensibilización de la insulina, se llevó a cabo el ensayo sobre la expresión de PPARs.



Gráfica 9. Efecto antidiabético del RM. Los resultados se expresan como el promedio \pm E.E.M. (n=6). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 comparado con el vehículo

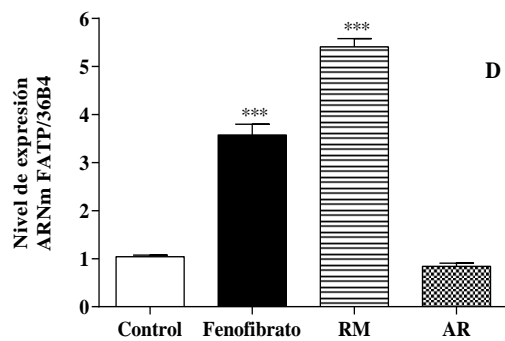
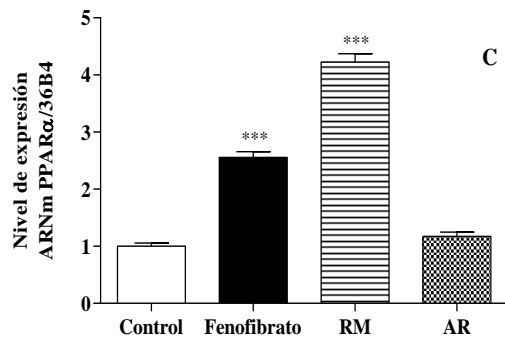
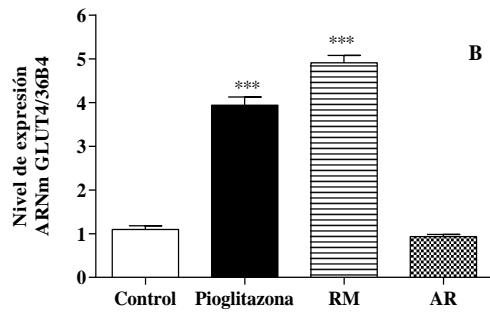
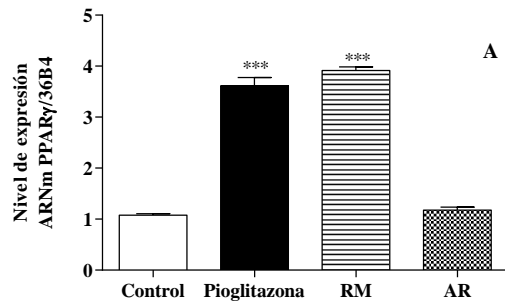
8.12. Evaluación de RM y el AR sobre la expresión PPAR γ , PPAR α GLUT-4 y FAPT.

En este ensayo se decidió evaluar los dos compuestos, RM y AR sobre la expresión de PPAR γ , PPAR α , GLUT-4 y FAPT. Células de fibroblastos 3T3-L1 ya diferenciadas a adipocitos fueron tratadas por 24 h con una concentración de 10 μ g/mL de cada compuesto. Posteriormente, se aisló el ARNm para medir la expresión de cada uno y los resultados generados se muestran en las siguientes gráficas 10 (A, B, C y D)

Mientras que el AR no mostró efecto sobre el incremento en la expresión los PPARs, el compuesto RM aumentó significativamente (aproximadamente 4 veces) la expresión relativa del ARNm de PPAR γ (gráfica 10 A), así como de su producto de activación GLUT-4 (Gráfica 10 B), siendo similar al efecto de pioglitazona, fármaco utilizado como control. El compuesto RM también mostró un incremento de la expresión del ARNm de PPAR α (Gráfica 10 C) y FAPT (aproximadamente 4 y 5 veces, respectivamente) (Gráfica 10 D). De este modo, podríamos afirmar que el compuesto RM puede activar directamente a los receptores nucleares PPAR γ y PPAR α , lo cual se puede inferir a través del aumento de la expresión de la proteína transportadora de glucosa, GLUT-4 inducida por la activación de

PPAR γ y la proteína transportadora de ácidos grasos FAPT, inducida por la activación de PPAR α . Los PPAR γ , PPAR α son expresados en diferentes tejidos blanco y cuyas funciones tienen un rol importante en la expresión de genes involucrados en la adipogénesis, metabolismo de lípidos, inflamación y la regulación de la homeostasis de glucosa (Wang et al., 2014). Su activación es de gran relevancia en la búsqueda y descubrimiento de compuestos antidiabéticos y contra la obesidad por incrementar la sensibilidad a la insulina y la disminución de la insulino resistencia (Mueller et al., 2008).

Adicionalmente, pese a que no se observó un efecto en el modelo *in vitro* por parte del AR en la expresión de PPARs, existen varios reportes donde se ha demostrado que en el tratamiento de ratas diabéticas HFD-STZ inducidas, se incrementó la expresión de GLUT-4 en el músculo esquelético (Jayanthi et al. 2017; Runtuwene et al., 2016), lo cual contribuye a una disminución de los niveles de glucosa en sangre (Alagawany et al., 2017). Por otro lado, diversos estudios han indicado que extractos de *Rosmarinus officinalis L.*, planta de la cual se obtuvo por primera vez el compuesto AR y otros compuestos fenólicos relacionados, regulan la actividad de PPAR γ , la diferenciación de adipocitos e inhiben la lipasa pancreática (Zheng et al., 2013).



Gráficas 10. A, B, C y D. Efecto de los compuestos AR y RM sobre la expresión de ARNm de PPARs. Los resultados representan el promedio \pm E.E.M (n=5), comparado con el control. ***p<0.001.

8.13. Acoplamiento molecular de AR y RM sobre PPAR γ y PPAR α

Con base en los ensayos experimentales *in vivo* (solo RM) e *in vitro*, se seleccionaron ambos compuestos para explicar las posibles interacciones con PPAR γ y PPAR α . Cada uno de los compuestos se acopló con los sitios catalíticos de PPAR γ y PPAR α , utilizando el programa Autodock 4.2.

8.14. Validación de acoplamiento molecular

La Validación fue llevada a cabo en AutoDock 4.2, con base en las interacciones importantes hechas por el ligando unido con los aminoácidos del sitio de unión, indicando que los parámetros de simulación de acoplamiento son buenos y reproducen esas interacciones entre la estructura de rayos X de los blancos planteados, tomando en cuenta los modos de unión en donde el RMSD se menor de 2 Å.

8.15. Validación de acoplamiento molecular sobre PPAR γ (PDB 1I7I)

De acuerdo con los resultados de la validación se observó que se conservan las interacciones cruciales del ligando co-cristalizado. Arrojando una energía de unión de -6.95 kcal/mol y un RMSD de 0.64 Å. Tesaglitazar (Figura 9) muestra interacciones de tipo puente de hidrógeno con His 449, His 323, Ser 289 y Tyr 473, además se observaron interacción con Ile 281.

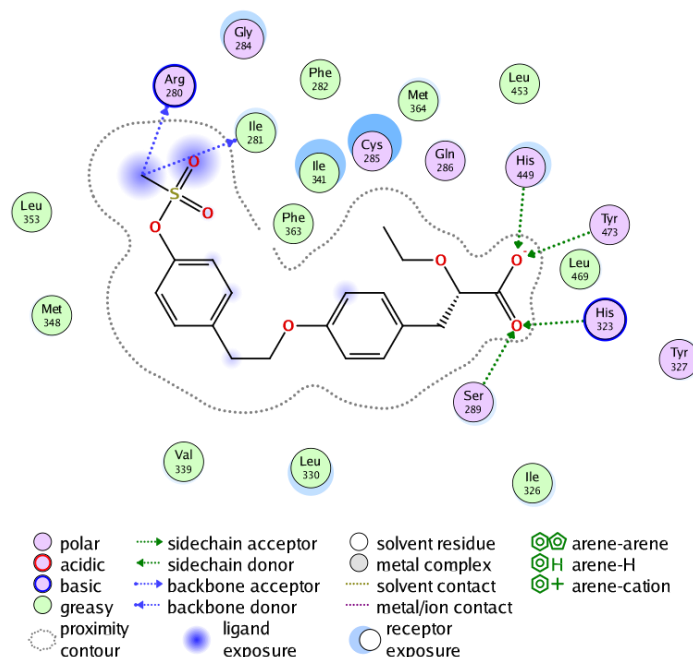


Figura 9. Visualización en dos dimensiones de Tesglitazar en la cavidad de PPAR γ , se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde).

8.16. Acoplamiento molecular del ácido rosmarínico sobre PPAR γ

Para la elección de éste confórmero, se tomó en cuenta la similitud espacial del ligando co-cristalizado. Este presentó una energía de unión de -4.53 kcal/mol.

En la Figura 10 se muestra al ácido rosmarínico en donde se exhiben las interacciones polares con los residuos de aminoácidos Cys 285, Lys 367, Gly284 y otra interacción con el aminoácido Ser 342. Cabe mencionar que este modo de unión es distinto al convencional y se ha descrito en agonistas parciales de este receptor (Bruning et al., 2007).

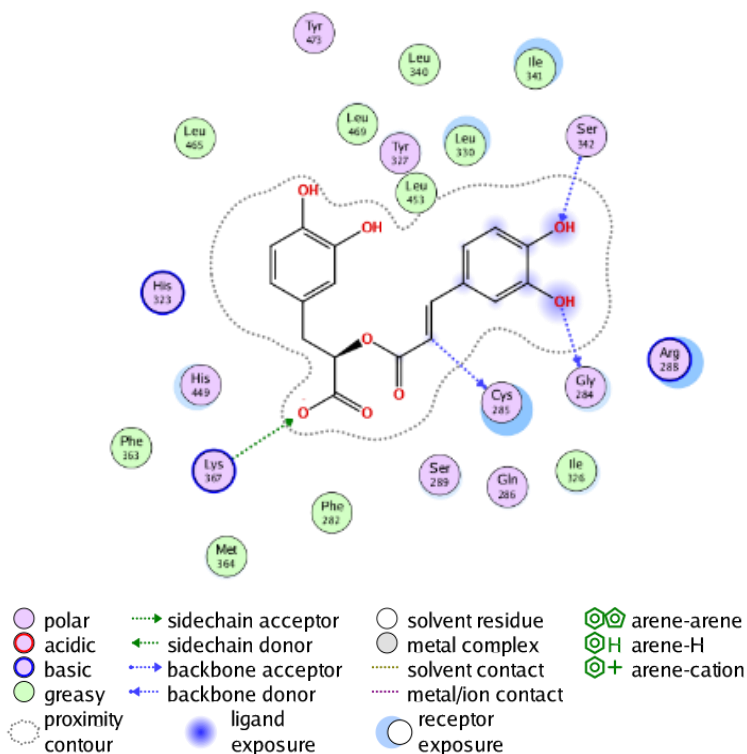


Figura 10. Visualización en dos dimensiones del ácido rosmarínico en la cavidad de PPAR γ , se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde).

8.17. Acoplamiento molecular del rosmarinato de metilo sobre PPAR γ

Se reagruparon los modos de unión con un RMSD=1.5 Å obteniendo un conformero. Este presentó una energía de unión de -4.53 kcal/mol. El RM mostró una interacción por puente de hidrógeno con Lys 263, además se observó otra interacción entre el carbonilo del éster y Glu 343. También, se observó una interacción π -catión entre el anillo aromático de la porción 3,4-(dihidroxifenil) acrililoilo y a la vez una interacción de puente de hidrógeno con Cys 285. Por otro lado, se predijo una interacción de doble puente de hidrógeno con Ser 342, la cual, como se mencionó anteriormente, es característica de los agonistas parciales de PPAR γ (Figura 11). Los agonistas parciales representan una ventaja sobre los agonistas totales, ya que los agonistas totales son relacionados con efectos adversos severos como: aumento de

peso, edema, cardiotoxicidad, fracturas óseas (Capelli et al., 2016) e incluso cáncer (Colín-Lozano et al., 2018).

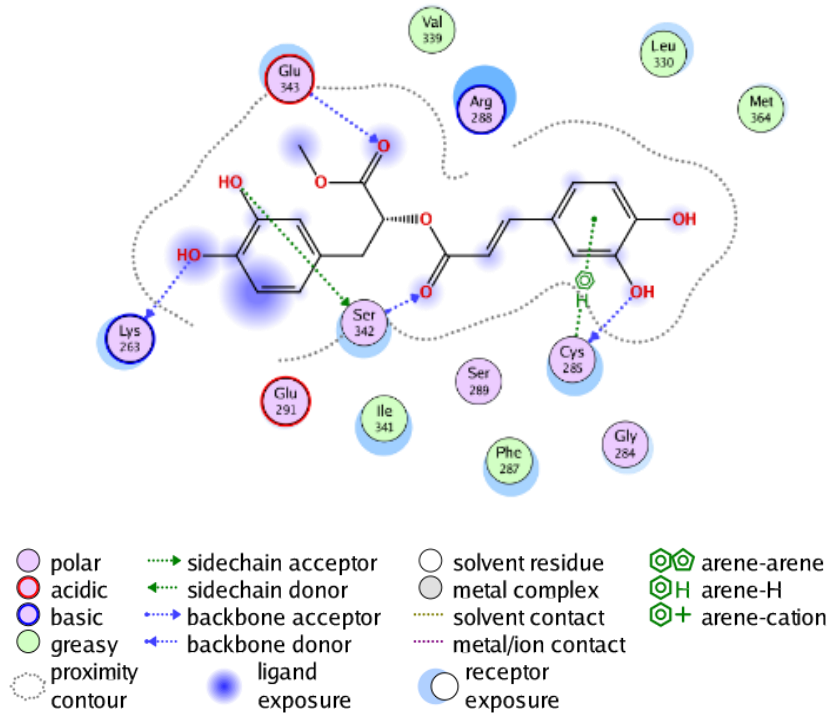


Figura 11. Visualización en dos dimensiones del rosmarinato de metilo en la cavidad de PPAR γ , se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde).

Como se pudo observar, el AR y RM mostraron un modo de unión característico de agonistas parciales, en donde se exhibió la formación de puente de hidrógeno con Ser 342 (de la cadena interna de la hoja β del receptor) y la interacción con Cys 285 (Figura 12). Es importante mencionar que se encuentra descrito que este modo de unión es independiente al tradicional (His 449, His 323, Ser 289 y Tyr 473), lo cual explica la actividad que se observó para el RM en el ensayo *in vitro* e *in vivo* donde el RM tuvo efecto significativo.

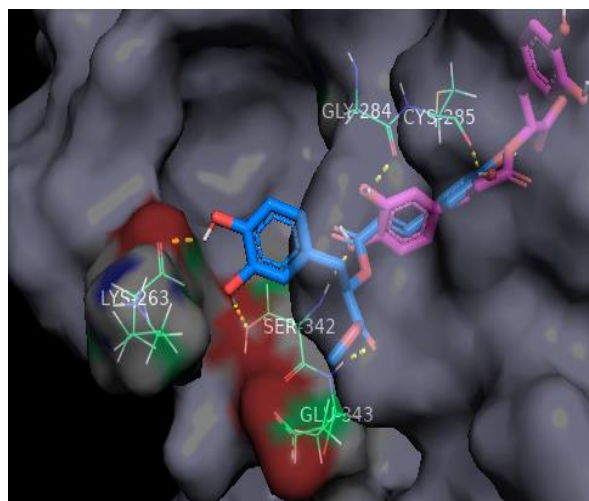


Figura 12. sobreposicionamiento en tres dimensiones de los compuestos ácido rosmarínico (magenta) y rosmarinato de metilo (azul) en donde se aprecian las interacciones en la cavidad de PPAR γ .

8.18. Validación de acoplamiento molecular sobre PPAR α (PDB 5HYK)

Se muestran los resultados de la validación en donde se observa que se conservan las interacciones importantes del ligando co-cristalizado (Figura 13). Arrojando una energía de unión -10.96 kcal/mol y un RMSD de 0.29 Å.

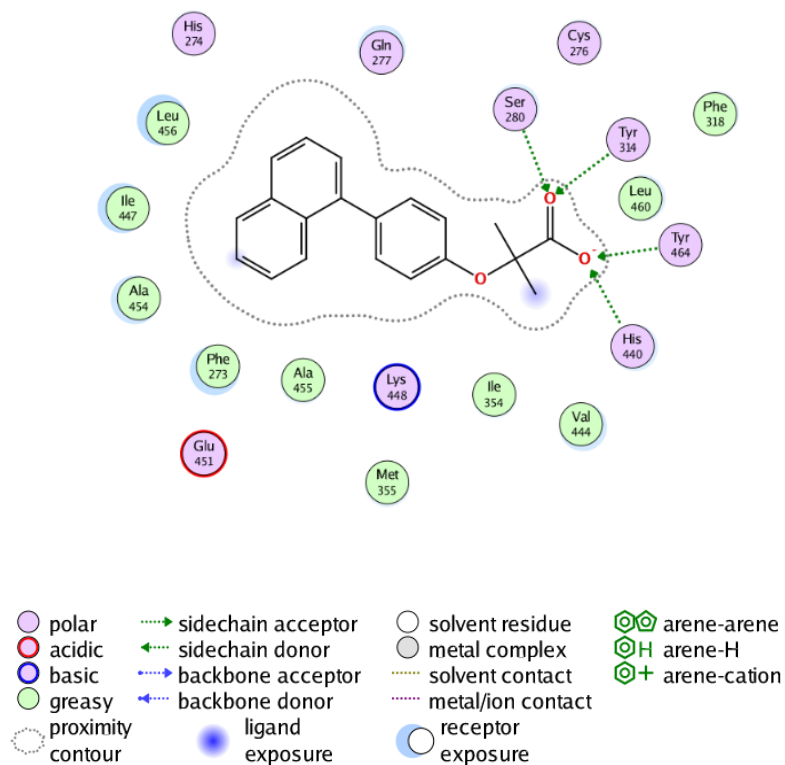


Figura 13. Visualización en dos dimensiones del ácido 2-metil-2-[4-naftalen-1-il] fenoxi] propanoico en la cavidad de PPAR α , se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde).

8.19. Acoplamiento molecular del ácido rosmarínico sobre PPAR α

Para la elección de éste conformero, se tomó en cuenta la similitud espacial del ligando co-cristalizado. Este presentó una energía de unión de -5.39 kcal/mol.

En la Figura 14, se muestra que el AR genera una red de interacciones de puente de hidrógeno con los aminoácidos Ser 280, Tyr 314, Tyr 464 e His 440, en el sitio de unión al ligando de PPAR α , estos aminoácidos son cruciales para la activación de este receptor.

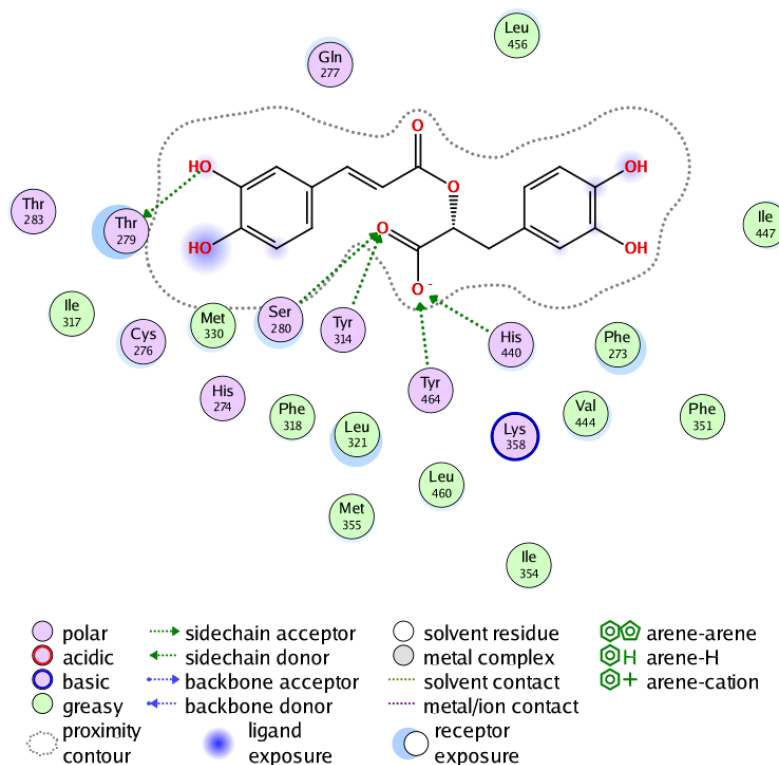


Figura 14. Visualización en dos dimensiones del ácido rosmarínico en la cavidad de PPAR α , se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde).

8.20. Acoplamiento molecular del rosmarinato de metilo sobre PPAR α

Para la elección de éste conformero, se tomó en cuenta la similitud espacial del ligando co-cristalizado. Este presentó un puntaje de -4.9 kcal/mol.

Para el RM se predijeron interacciones (Figura 15) de puente de hidrógeno con los aminoácidos Ser 280, Tyr 314 e His 440, aminoácidos cruciales para la activación de este receptor, además, se muestra una interacción con Phe 273 presente en el ligando co-cristalizado y una interacción con Thr 279, lo cual podría reforzar la interacción de este ligando con el sitio de unión y, por lo tanto, manifestar actividad biológica.

Estos resultados son relevantes para explicar a nivel molecular la actividad de RM en el ensayo *in vitro*, en el cual RM incremento la expresión relativa de este receptor y, en el ensayo *in vivo*, RM disminuyó los niveles de glucosa en sangre de manera significativa. Por otro lado, a pesar de que el AR no tuvo ningún efecto en la expresión de los receptores, *in vitro*, el estudio de acoplamiento mostro que el AR tiene interacciones con residuos de aminoácidos cruciales para la activación de los receptores.

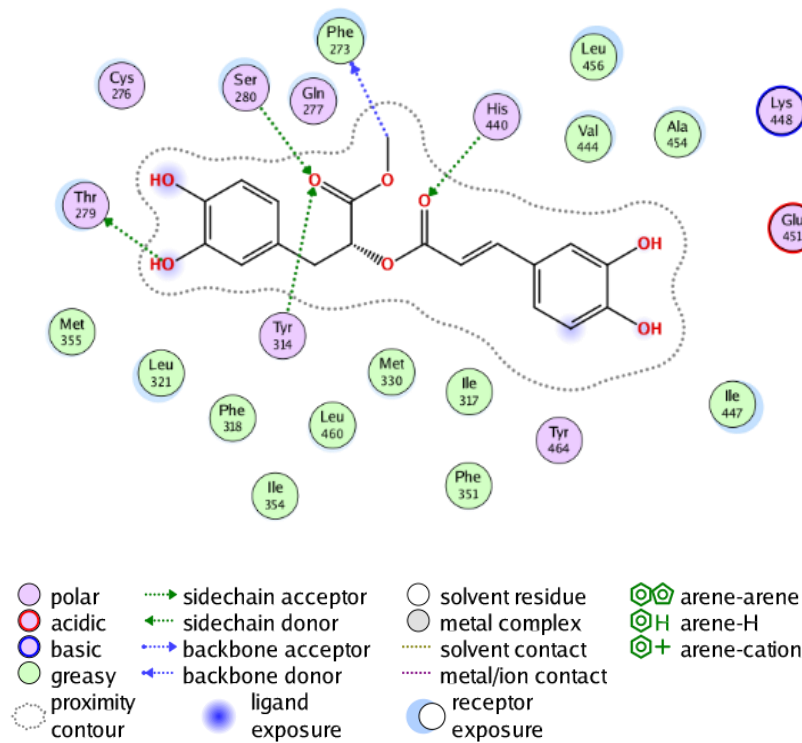


Figura 15. Visualización en dos dimensiones del rosmarinato de metilo en la cavidad de PPAR α , se aprecian las interacciones polares (punteadas en azul y verde).

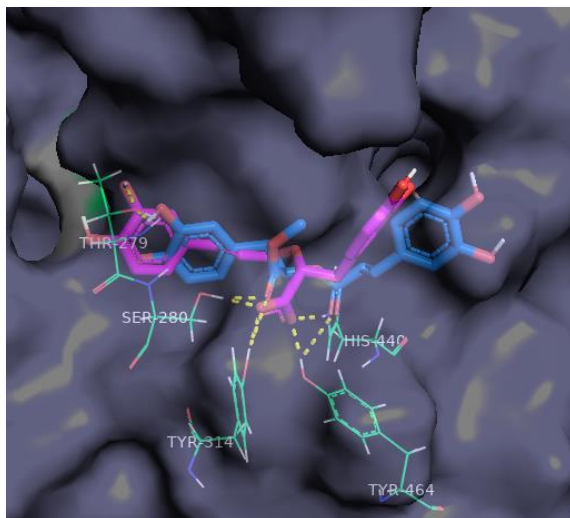


Figura 16. sobreposicionamiento en tres dimensiones de los compuestos ácido rosmarínico (magenta) y rosmarinato de metilo (azul) en donde se aprecian las interacciones en la cavidad de PPAR α .

8.21. Estudio fitoquímico del extracto metanólico de *Calea zacatechichi* (EMCz)

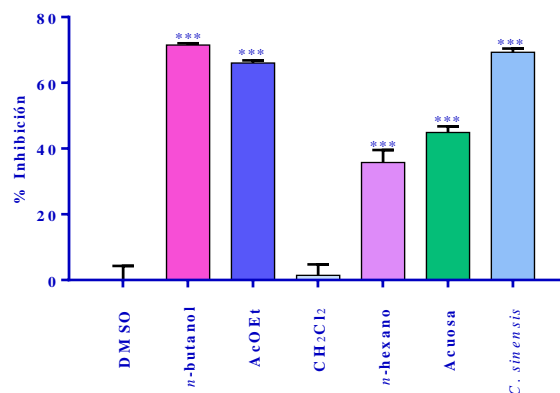
Como se mencionó en los antecedentes de este proyecto, un estudio previo del EMCz tuvo un 65 % de inhibición de la actividad de enzimas α -glucosidasas intestinales. Además, en un ensayo *in vivo*, mostro un efecto antihiper glucémico y antidiabético, al disminuir los niveles de glucosa en sangre de manera significativa ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente) (Giles, 2015). En el ensayo para determinar el efecto antihiper glucémico, se probaron los tres extractos obtenidos de *C. zacatechichi* y se definió que el extracto EMCz fue el más activo, comparado con los otros dos; por esta razón se decidió llevar a cabo el estudio fitoquímico y, poder identificar los metabolitos secundarios presentes en este extracto.

El EMCz fue sometido a un proceso inicial de extracción líquido-líquido (bipartición). A un total de 36.4 g de extracto se hizo la bipartición (por triplicado), utilizando los siguientes disolventes: *n*-hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt y *n*-butanol, en orden consecutivo. Derivado de lo anterior, se obtuvieron los siguientes pesos (g) para cada fracción: *n*-hexano (1.63 g), CH_2Cl_2 (1.08 g), AcOEt (2.01g), *n*-butanol (16.5 g) y la fracción acuosa (15.2 g).

8.22. Evaluación de las fracciones primarias de EMCz

Con la finalidad de determinar cuál de las fracciones primarias posee actividad en el ensayo de enzimas α -glucosidasas, se pesaron 10 mg de cada una y se evaluaron a una concentración de 1 mg/mL

Los resultados se muestran en la Gráfica 11, las fracciones que mostraron mayor porcentaje de inhibición son en orden descendente: *n*-butanol (77.5 ± 0.53 %), AcOEt (66.06 ± 0.78 %), acuosa (44.89 ± 1.86 %) y *n*-hexano (35.77 ± 3.77 %), comparadas con el DMSO.



Gráfica 11. Efecto de las fracciones de EMCz sobre la actividad de enzimas α -glucosidasas. Los resultados se expresan como el promedio \pm E.E.M. (n=5). ***p<0.001 comparado con DMSO.

Con este ensayo preliminar se decidió llevar a cabo el proceso de re-cromatografía en columna de la fracción más activa para determinar el contenido metabólico e identificar el o los compuestos responsables de la actividad.

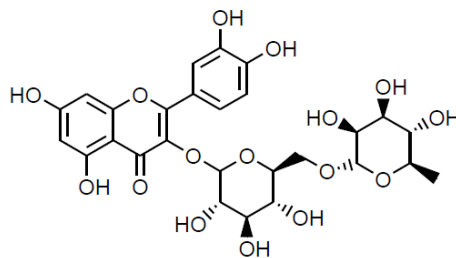
8.23. Elucidación estructural

Como se mencionó en la sección 7.16., se llevó a cabo una cromatografía en columna de la fracción obtenida con *n*-butanol, el proceso fue monitoreado mediante CCF y se notó que, durante el proceso de evaporación del disolvente, en la esfera había la presencia de un precipitado color amarillo (Figura 8). Posteriormente, fueron seleccionadas algunas de las

fracciones derivadas de esta CC, para llevar a cabo una cromatografía radial (CR) y, así, poder obtener e identificar el o los compuestos presentes en el precipitado.

Posterior a la CR, se seleccionó una de las fracciones que contenía el precipitado, de acuerdo con lo observado en CCF y se le asignó la clave CR-9 para su análisis mediante RMN de ^1H y ^{13}C .

En el análisis de RMN se observaron señales características de hidrógenos unidos a anillos aromáticos, en un desplazamiento químico de entre 6 a 8 ppm, además, se observaron señales que indican la presencia de un compuesto glicosídico en desplazamientos químicos entre 3 a 5 ppm y, una señal doble asignada como el hidrógeno anomérico característico de una unidad de β -D-glucosa en un desplazamiento químico de 5.11 ppm con constante de acoplamiento de 7.5 Hz; se observó otra señal doble en 4.52 ppm para un hidrógeno y, una señal doble en 1.12 ppm con una integración para tres hidrógenos ($-\text{CH}_3$), característica de una unidad de ramosa. Finalmente, se compararon los datos de RMN con los datos reportados en la literatura (Tabla 12) y se identificó el flavonoide rutina como uno de los componentes de la mezcla.



Rutina

Tabla 12. Datos espectroscópicos, Rutina.

	Rutina (500 MHz, DMSO- d_6) (δ , m, <i>J</i> , integral)		Rutina aislada de EMCz (200 MHz, CD $_3$ OD) (δ , m, <i>J</i> , integral)	
C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2		157.3		157.1
3		134.1		134.2
4		178.2		178.0
5		157.5		157.9
6	6.20, d, <i>J</i> =2.0 Hz, 1H	99.5	6.21, d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H	-

7		164.9		164.6
8	6.40, d, $J=2.0$ Hz, 1H	94.5	6.40, d, $J=2.1$ Hz, 1H	93.4
9		162.1		164.2
10		104.8		-
1'		122.5		122.7
2'	7.66, d, $J=2.0$ Hz, 1H	116.1	7.67, d, $J=2.0$ Hz, 1H	114.6
3'		145.6		144.4
4'		149.3		148.4
5'	6.86, d, $J=8.0$ Hz, 1H	117.1	6.88, d, $J=8.3$ Hz, 1H	116.3
6'	7.67, dd, $J=2.0, 8.0$ Hz, 1H	122.0	7.63, dd, $J=2.2, 8.3$ Hz, 1H	122.1
1''	5.41, d, $J=8.0$ Hz, 1H	101.6	5.11, d, $J=7.5$ Hz, 1H	101.0
2''		74.9		74.3
3''		77.3		76.7
4''		72.7		72.5
5''		76.7		75.8
6''		67.9		67.1
1'''	4.51, d, 1H	102.2	4.52, d, 1.4 Hz, 1H	103.3
2'''		70.8		70
3'''		71.2		70.7
4'''		71.4		70.8
5'''		69.1		68.3
6'''	0.80, d, $J=6.0$ Hz, 3H	18.6	1.12, d, $J=6.1$ Hz, 3H	16.4

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, se han descrito por su actividad como hipoglucémicos e inhibidores de enzimas α -glucosidasas. El compuesto rutina ha sido ampliamente descrito por poseer efectos sobre la inhibición de enzimas α -glucosidasas intestinales, disminución de la gluconeogénesis, aumento de la captación de glucosa, a través secreción de insulina desde las células β del páncreas. También posee efectos antioxidantes, efectos cardioprotectores y efectos antihiper glucémicos en modelo *in vivo* de ratas diabéticas STZ; donde también disminuyó los niveles de hemoglobina glicosilada (Ahmad et al., 2017). Rutina es un compuesto ampliamente descrito por sus actividades farmacológicas, por tal motivo, se decidió ya no llevar a cabo evaluaciones para determinar su efecto biológico; pero si es importante mencionar que estos antecedentes pudieron corroborar que la presencia de este flavonoide como componente mayoritario, de la fracción analizada, es uno de los metabolitos activos del EMC₇.

9. CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico de *C. morelosana* permitió el aislamiento de cuatro compuestos conocidos: ácido rosmarínico, rosmarinato de metilo, nicotiflorina y 1-*O*-metil-*scyllo*-inositol, identificados como los principales componentes del extracto etanólico (EEC_m); donde el ácido rosmarínico y el compuesto rosmarinato de metilo, participan como los principales agentes antidiabéticos bioactivos, relacionados con más de un blanco terapéutico dirigido al tratamiento de la DM2, tales como, la acción antihiper glucémica (por inhibición de enzimas α -glucosidasas y posible inhibición del transportador de glucosa), la sensibilización a la insulina producida por la probable activación o sobreexpresión de PPAR γ y GLUT-4 y, también es posible que puedan ser útiles en el tratamiento de la dislipidemia por sus efectos en la activación o sobreexpresión de PPAR α y FAPT.

El análisis fitoquímico de *C. zacatechichi* permitió el aislamiento del flavonoide rutina, como componente mayoritario de la fracción butanólica proveniente del EMC_z. Esta fracción tuvo el mayor porcentaje de rendimiento, posterior a la extracción líquido-líquido, por lo cual, la presencia de este flavonoide puede relacionarse ampliamente con las actividades biológicas demostradas previamente y corroboradas con lo reportado en la bibliografía científica.

10.PERSPECTIVAS

Levar a cabo estudios antidiabéticos subcrónicos de los extractos y compuestos activos para determinar sus efectos en mayor periodo de tiempo.

Eficientizar la obtención de los compuestos que mostraron actividad, con la finalidad de llevar a cabo más evaluaciones que permitan esclarecer todos los mecanismos de acción involucrados en el efecto antidiabético mostrado.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). Ppar signaling and metabolism: The good, the bad and the future. *Nature Medicine*, 19(5), 557–566. <https://doi.org/10.1038/nm.3159>

Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Gopi, M., Karthik, K., Malik, Y. S., & Dhama, K. (2017). Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Animal Health Research Reviews*, 18(2), 167–176. <https://doi.org/10.1017/s1466252317000081>

Almanza-Perez, J. C. (2010)“Glycine Regulates Inflammatory Markers Modifying the Energetic Balance through PPAR and UCP-2.” *Biomedicine and Pharmacotherapy* 64(8): 534–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2009.04.047>.

American Diabetes Association (ADA). (2019.)Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes. 42 (1). S90-S102.

Arumugam, G., Manjula, P., & Paari, N. (2013). A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. *Journal of Acute Disease*, 2(3), 196–200. [https://doi.org/10.1016/s2221-6189\(13\)60126-2](https://doi.org/10.1016/s2221-6189(13)60126-2)

Ávila-Villarreal, G.,González-Trujano, M.E., Carballo-Villalobos, A. I., Aguilar-Guadarrama, B., García-Jiménez, S., Giles-Rivas, D. E., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S. (2016). Anxiolytic-like effects and toxicological studies of *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray in experimental mice models. *J. Ethnopharmacol.* 192, 90-98. <https://doi: 10.1016/j.jep.2016.07.006>.

Balderas R. I. (2015). Dabetes, obesidad y síndrome metabólico. un abordaje multidisciplinario. Manual Moderno. 1º edición. 347 páginas. ISBN 978-607-448-483-0.

- Bruning, J. B., Chalmers, M. J., Prasad, S., Busby, S. A., Kamenecka, T. M., He, Y., ... Griffin, P. R. (2007). Partial Agonists Activate PPAR γ Using a Helix 12 Independent Mechanism. *Structure*, 15(10), 1258–1271. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.07.014>
- Brunmeir, R., & Xu, F. (2018). Functional regulation of PPARs through post-translational modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19061738>
- Capelli, D., Cerchia, C., Montanari, R., Loiodice, F., Tortorella, P., Laghezza, A., ... Lavecchia, A. (2016). Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode. *Scientific Reports*, 6(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep34792>
- Chukwuma, Chika Ifeanyi. (2019). “Medicinal Plants with Concomitant Anti-Diabetic and Anti-Hypertensive Effects as Potential Sources of Dual Acting Therapies against Diabetes and Hypertension: A Review.” *Journal of Ethnopharmacology* 235(October 2018): 329–60. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.024>
- Colín-Lozano, B., Estrada-Soto, S., Chávez-Silva, F., Gutiérrez-Hernández, A., Cerón-Romero, L., Giacomán-Martínez, A., Almanza-Pérez, J.C., Hernández-Núñez, E., Wang, Z., Xie, X., Cappiello, M., Balestri, F., Mura, U., Navarrete-Vazquez, G. (2018) Design, Synthesis and in Combo Antidiabetic Bioevaluation of Multitarget Phenylpropanoic Acids. *Molecules*. 23(2). <http://doi10.3390/molecules23020340>.
- Cruz Hernández, J., no Licea Puig, M. E., ar Hernández García, P., & is Yanes Quesada, M. (2011). Aldosa reductasa y proteína quinasa C en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 58(2), 102–107.
- Dar, Refaz Ahmad (2017). “Natural Product Medicines: A Literature Update.” *The Journal of Phytopharmacology* 6(6): 340–42. www.phytopharmajournal.com.

Federación Internacional de Diabetes (FID), 2019. Atlas de Diabetes. Novena edición. ISBN: 978-2-930229-87-4

Fontana Pereira, D., Cazarolli, L.H., Lavado, C., Mengatto, V., Figueiredo, M.S.R.B., Guedes, A., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R.M.B. (2011) Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition* 27, 1161–1167. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.01.008>

Geller, F., Schmidt, C., Göttert, M., Fronza, M., Schattel, V., Heinzmann, B., Werz, O., Flores, E.M.M., Merfort, I., Laufer, S. (2010) Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia americana*. *J. Ethnopharmacol.* 128, 561–566. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.062>

Gross, Barbara, Michal Pawlak, Philippe Lefebvre, and Bart Staels. (2017). “PPARs in Obesity-Induced T2DM, Dyslipidaemia and NAFLD.” *Nature Reviews Endocrinology* 13(1): 36–49. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2016.135>.

Hidalgo-Figueroa, S., Ramírez-Espinosa, J.J., Estrada-Soto, S., Almanza-Pérez, J.C., Román-Ramos, R., Alarcón-Aguilar, F.J., Hernández-Rosado, J. V., Moreno-Díaz, H., Díaz-Coutiño, D., Navarrete-Vázquez, G. (2013). Discovery of Thiazolidine-2,4-Dione/Biphenylcarbonitrile Hybrid as Dual PPAR α/γ Modulator with Antidiabetic Effect: In vitro, In Silico and In Vivo Approaches. *Chem. Biol. Drug Des.* 81, 474–483. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12102>

Huang, Y.N., Zhao, D.D., Gao, B., Zhong, K., Zhu, R.X., Zhang, Y., Xie, W.J., Jia, L.R., Gao, H. (2012). Anti-hyperglycemic effect of chebulagic acid from the fruits of *terminalia chebula* Retz. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 6320–6333. <https://doi.org/10.3390/ijms13056320>

Hiyoshi, T., Fujiwara, M., & Yao, Z. (2017). Postprandial hyperglycemia and postprandial

hypertriglyceridemia in type 2 diabetes. *Journal of Biomedical Research*, 33(1), 1–16.
<https://doi.org/10.7555/JBR.31.20160164>

Instituto Estatal de Estadística y Geografía (INEGI). Principales causas de moratilidad en México. Consulta en línea en noviembre 2019.

Jain, S., & Saraf, S. (2010). Type 2 diabetes mellitus - Its global prevalence and therapeutic strategies. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, Vol. 4, pp. 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2008.04.011>

Jayanthy, G., Roshana Devi, V., Ilango, K., & Subramanian, S. P. (2017). Rosmarinic Acid Mediates Mitochondrial Biogenesis in Insulin Resistant Skeletal Muscle Through Activation of AMPK. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(7), 1839–1848.
<https://doi.org/10.1002/jcb.25869>

Jayanthy, G., Subramanian, S. (2014). Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet - STZ induced experimental diabetes mellitus. *Biomed. Prev. Nutr.* 4, 431–437.
<https://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.03.006>

Matias, E. F. F., Alves, E. F., Silva, M. K. do N., Carvalho, V. R. de A., Coutinh, H. D. M., & da Costa, J. G. M. (2015). The genus *Cordia*: Botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25(5), 542–552.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.012>

Mootosamy, Anushka, and M. Fawzi Mahomoodally. (2014). “Ethnomedicinal Application of Native Remedies Used against Diabetes and Related Complications in Mauritius.” *Journal of Ethnopharmacology* 151(1): 413–44.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.069>.

Monroy Ortiz, C., Castillo España, P. (2007.) Plantas medicinales utilizadas en el Estado de Morelos. 2ª Edición. Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. 96, 273.

Mueller, M., Lukas, B., Novak, J., Simoncini, T., Genazzani, A. R., & Jungbauer, A. (2008). Oregano: A source for peroxisome proliferator-activated receptor γ antagonists. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11621–11630. <https://doi.org/10.1021/jf802298w>

Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. consulta en línea en octubre 2019.

Ortiz-Andrade, R. R., García-Jiménez, S., Castillo-España, P., Ramírez-Ávila, G., Villalobos-Molina, R., & Estrada-Soto, S. (2007). α -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An anti-hyperglycemic agent. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.002>

Ortiz-Andrade, R.R., Sánchez-Salgado, J.C., Navarrete-Vázquez, G., Webster, S.P., Binnie, M., García-Jiménez, S., León-Rivera, I., Cigarroa-Vázquez, P., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S. (2008). Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rat models and its implications on extra-pancreatic glucose regulation. *Diabetes, Obes. Metab.* 10, 1097–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00869.x>

Oza, M. J., & Kulkarni, Y. A. (2017). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Cordia* (Boraginaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(7), 755–789. <https://doi.org/10.1111/jphp.12715>

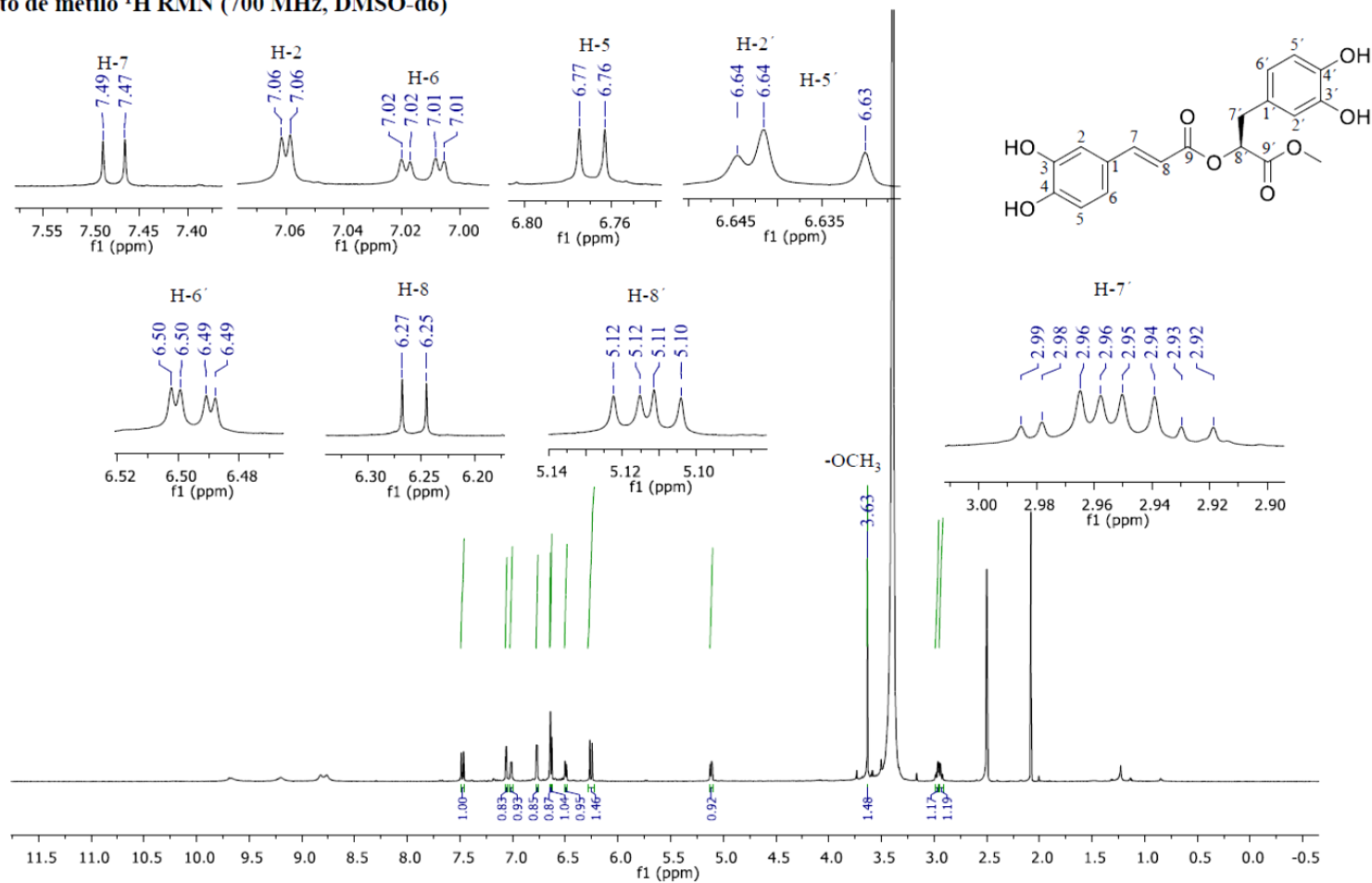
- Patel, D. K., Kumar, R., Laloo, D., & Hemalatha, S. (2012). Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol. 2, pp. 411–420. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60067-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60067-7)
- Petersen, M., & Simmonds, M. S. J. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121–125. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)
- Pinés Corrales, P. J., V. Bellido Castañeda, and F. J. Ampudia-Blasco. (2020). “Update on Postprandial Hyperglycaemia: The Pathophysiology, Prevalence, Consequences and Implications of Treating Diabetes.” *Revista Clinica Espanola* 220(1): 57–68.
- Ramírez, G., Zavala, M., Pérez, J., & Zamilpa, A. (2012). In vitro screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/701261>
- Runtuwene, J., Cheng, K. C., Asakawa, A., Amitani, H., Amitani, M., Morinaga, A., ... Inui, A. (2016). Rosmarinic acid ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity in diabetic rats, potentially by modulating the expression of PEPCK and GLUT4. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 2193–2202. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S108539>
- Ruiz-Vargas, J.A., Morales-Ferra, D.L., Ramírez-Ávila, G., Zamilpa, A., Negrete-León, E., Acevedo-Fernández, J.J., Peña-Rodríguez, L.M. (2019). α -Glucosidase inhibitory activity and in vivo antihyperglycemic effect of secondary metabolites from the leaf infusion of *Ocimum campechianum* mill. *J. Ethnopharmacol.* <http://doi:10.1016/j.jep.2019.112081>.

- Sonal, Narhe, Kshirsagar Sandip, and Patil Vishal. (2018). “Review on Medicinal Herbs Used for Diabetes.” *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 10(8): 224–28. www.ijpcr.com.
- Taslimi, P., & Gulçin, İ. (2017). Antidiabetic potential: in vitro inhibition effects of some natural phenolic compounds on α -glycosidase and α -amylase enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(10), 1–6. <https://doi.org/10.1002/jbt.21956>
- Wang, L., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Blunder, M., Liu, X., Malainer, C., ... Atanasov, A. G. (2014). Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): A review. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 73–89. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.018>

12. ANEXOS

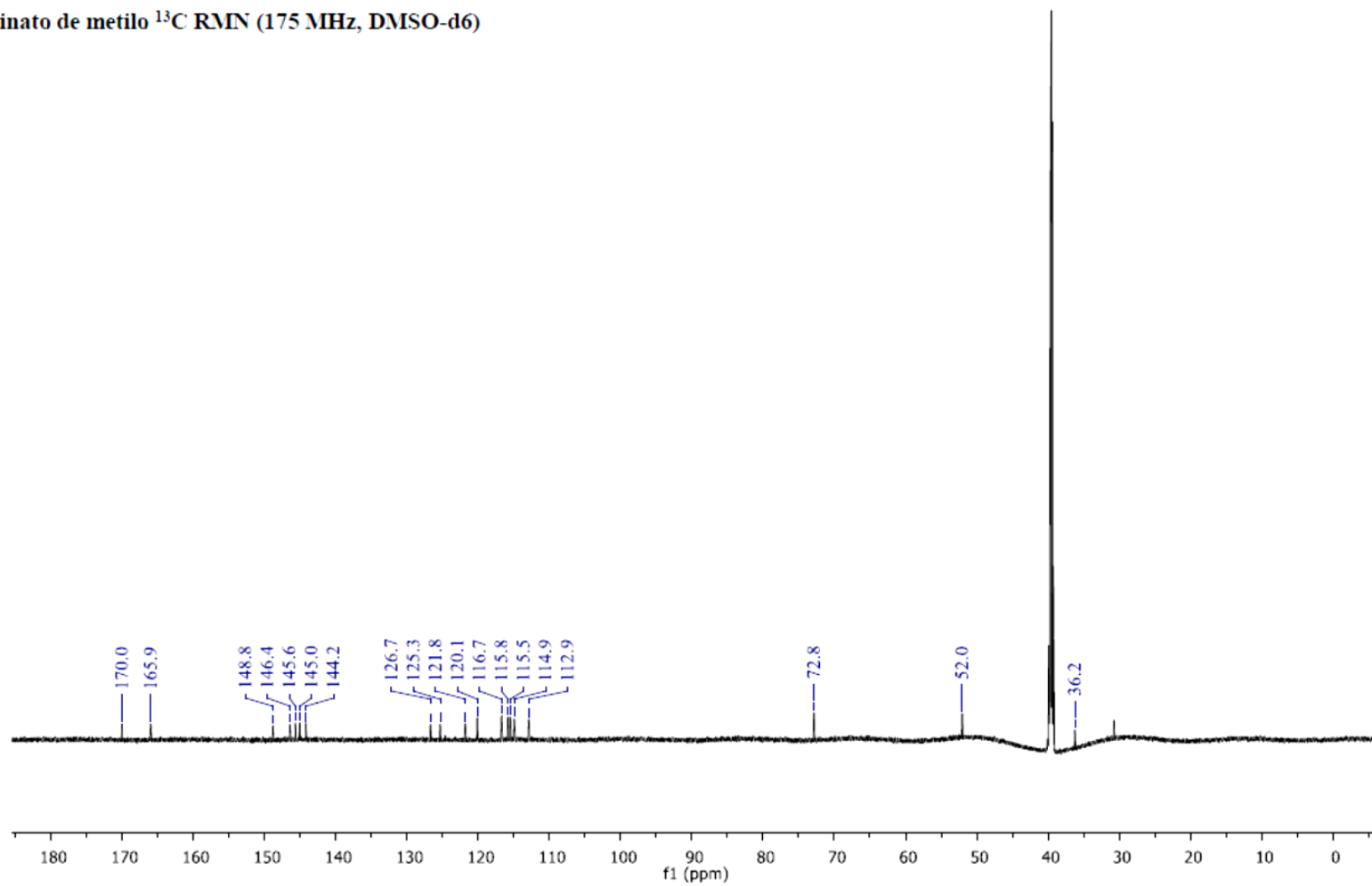
Espectro 1a^a

Rosmarinato de metilo ¹H RMN (700 MHz, DMSO-d₆)



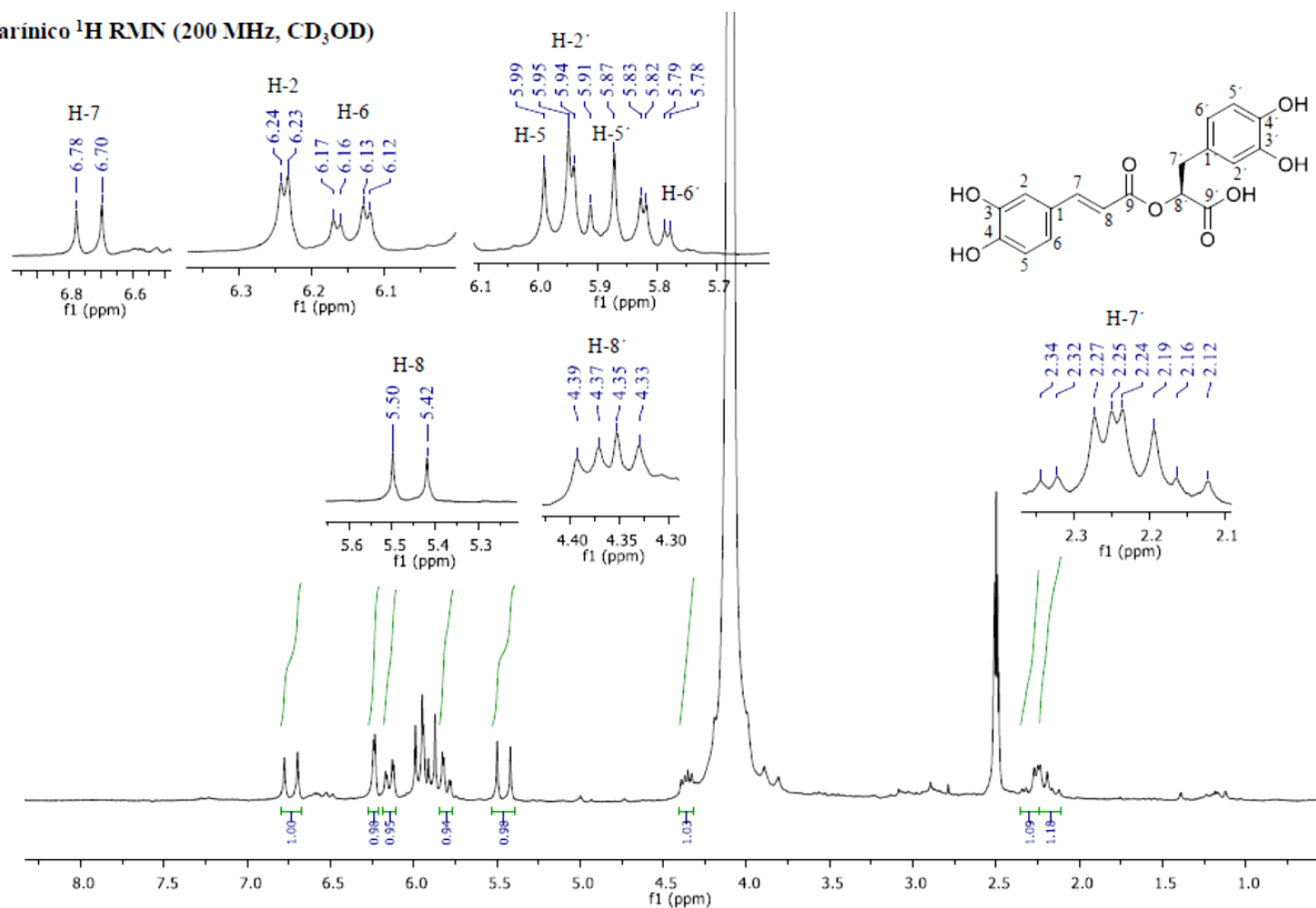
Espectro 1b

Rosmarinato de metilo ^{13}C RMN (175 MHz, DMSO-d₆)



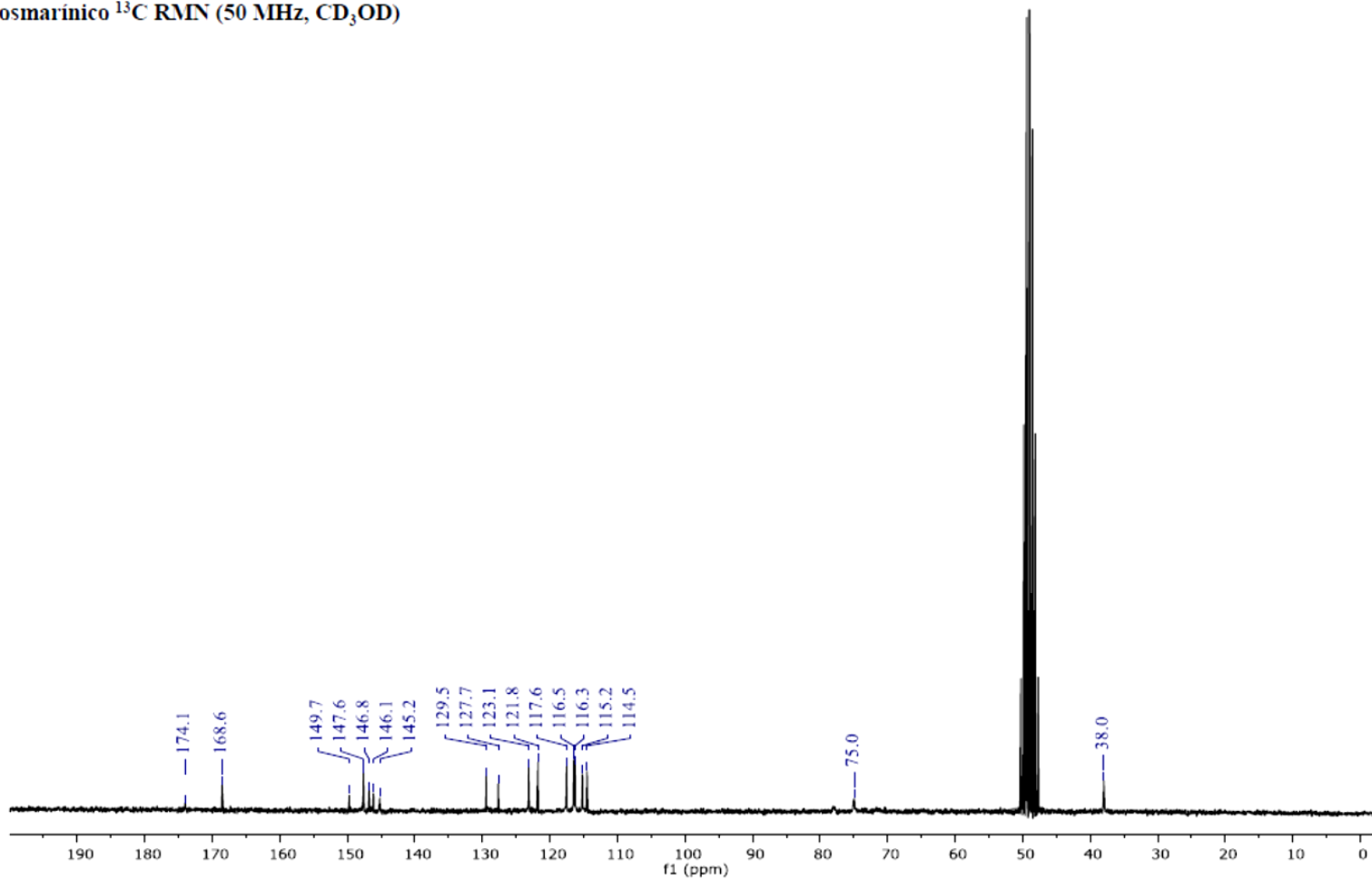
Espectro 2a

Ácido rosmarínico ^1H RMN (200 MHz, CD_3OD)



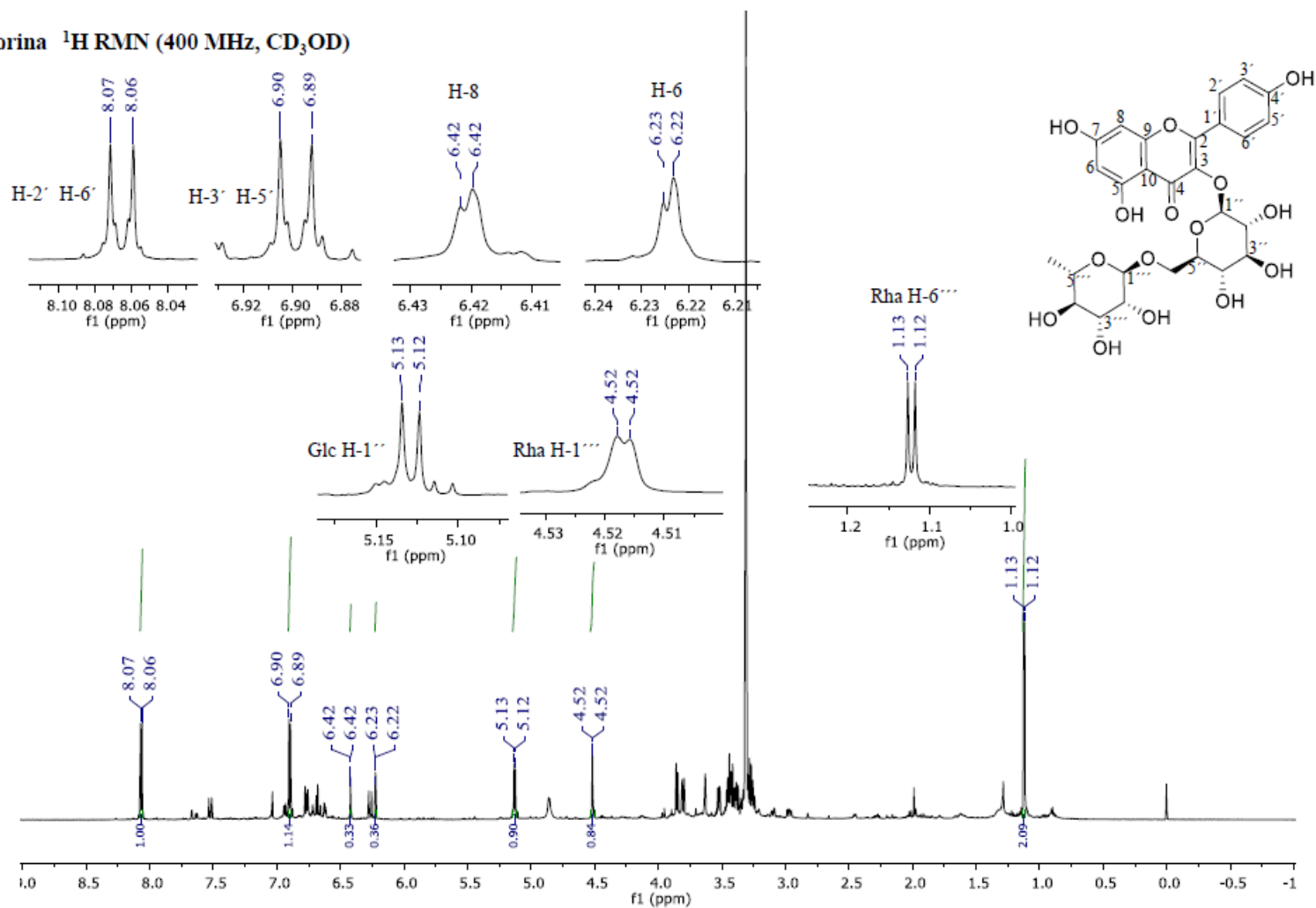
Espectro 2b

Ácido rosmarínico ^{13}C RMN (50 MHz, CD_3OD)



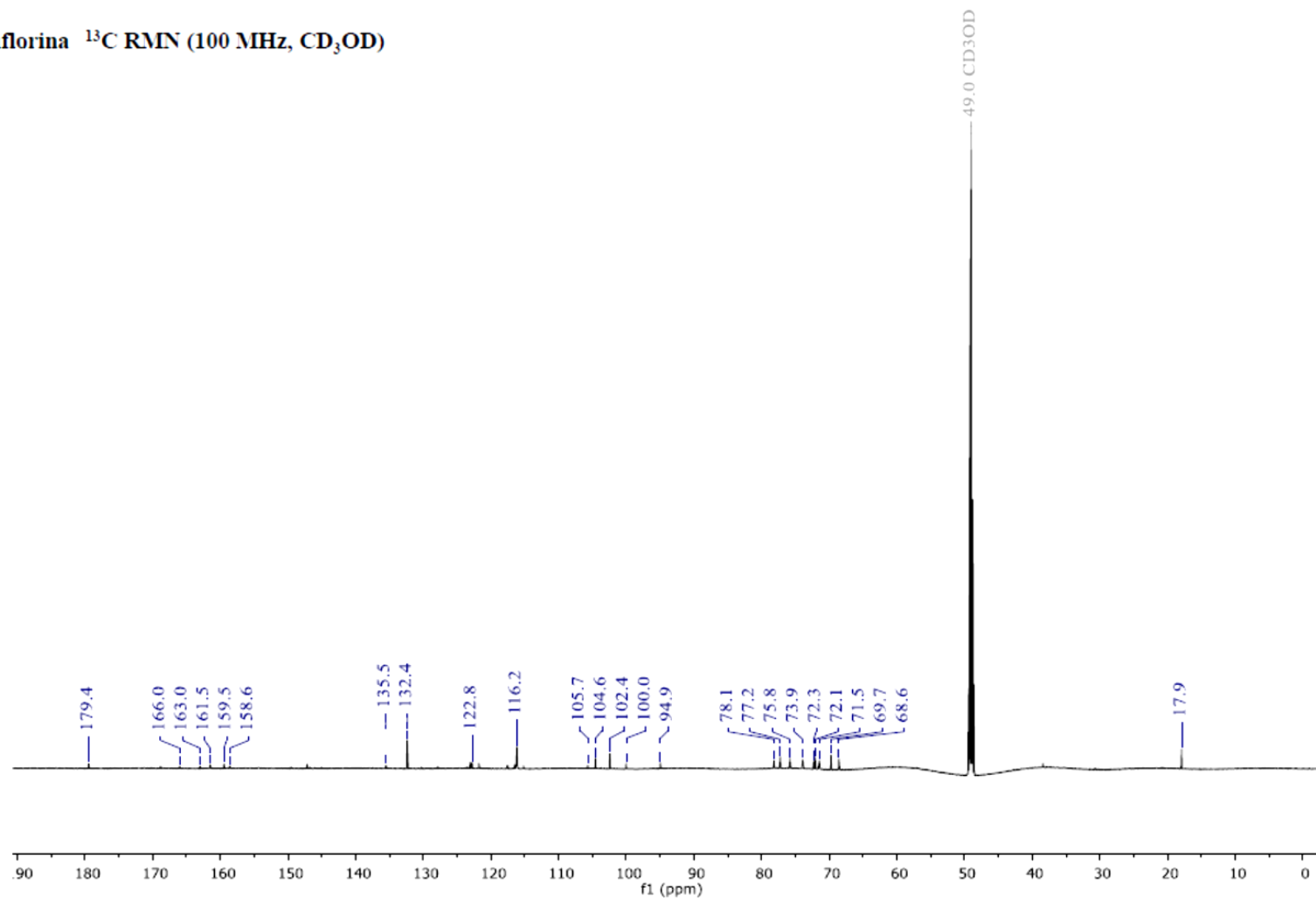
Espectro 3a

Nicotiflorina ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD)



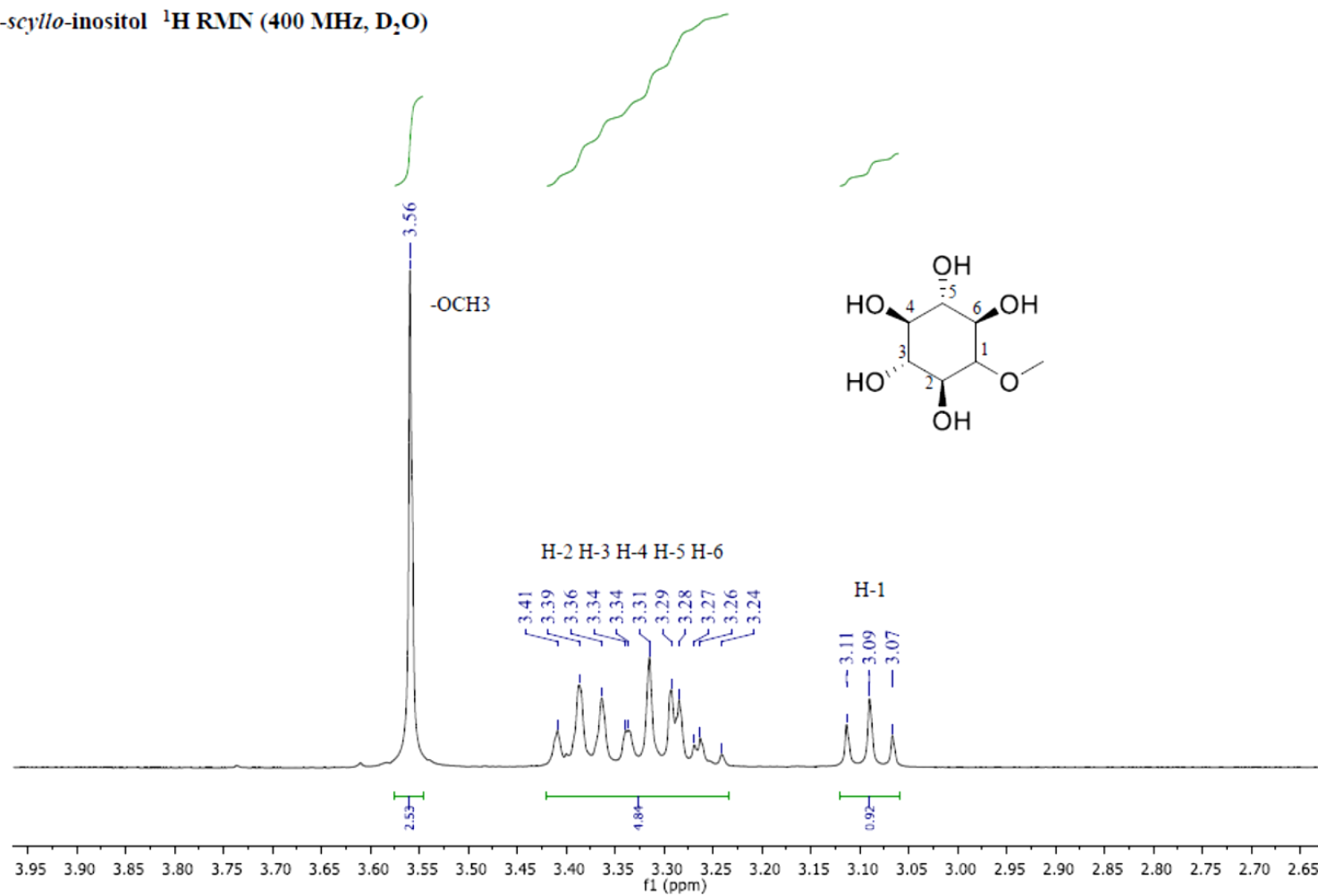
Espectro 3b

Nicotiflorina ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD)



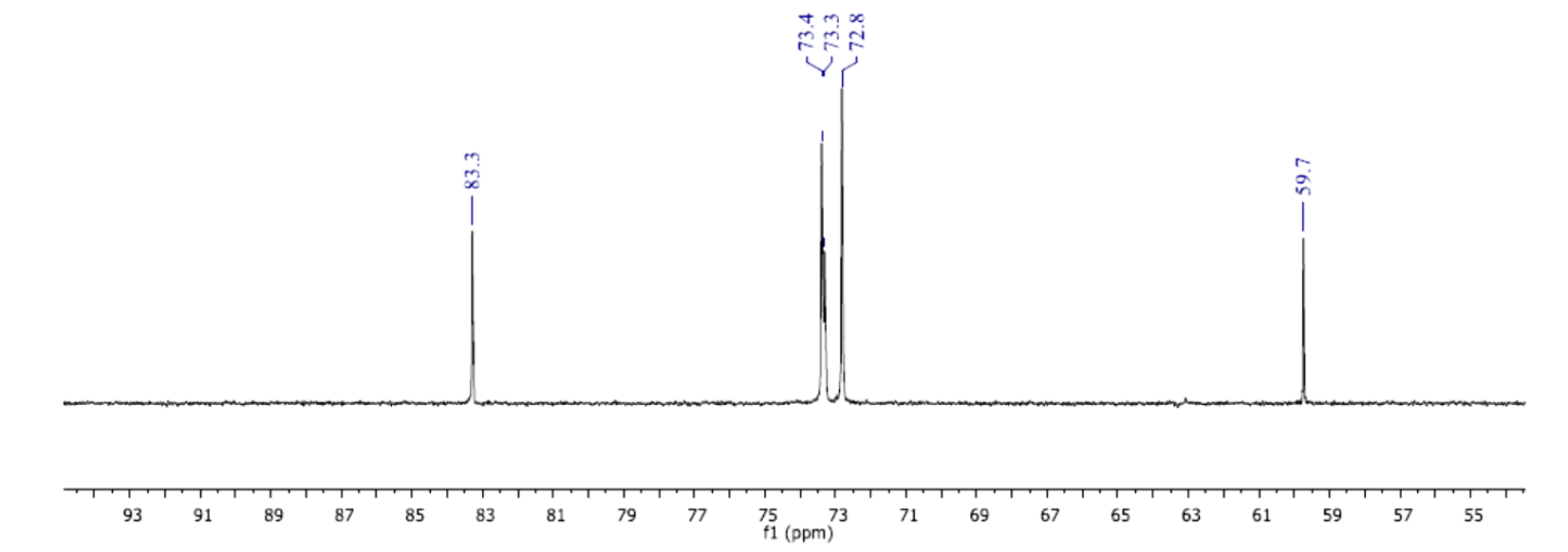
Espectro 4a

1-O-metil-*scyllo*-inositol ¹H RMN (400 MHz, D₂O)



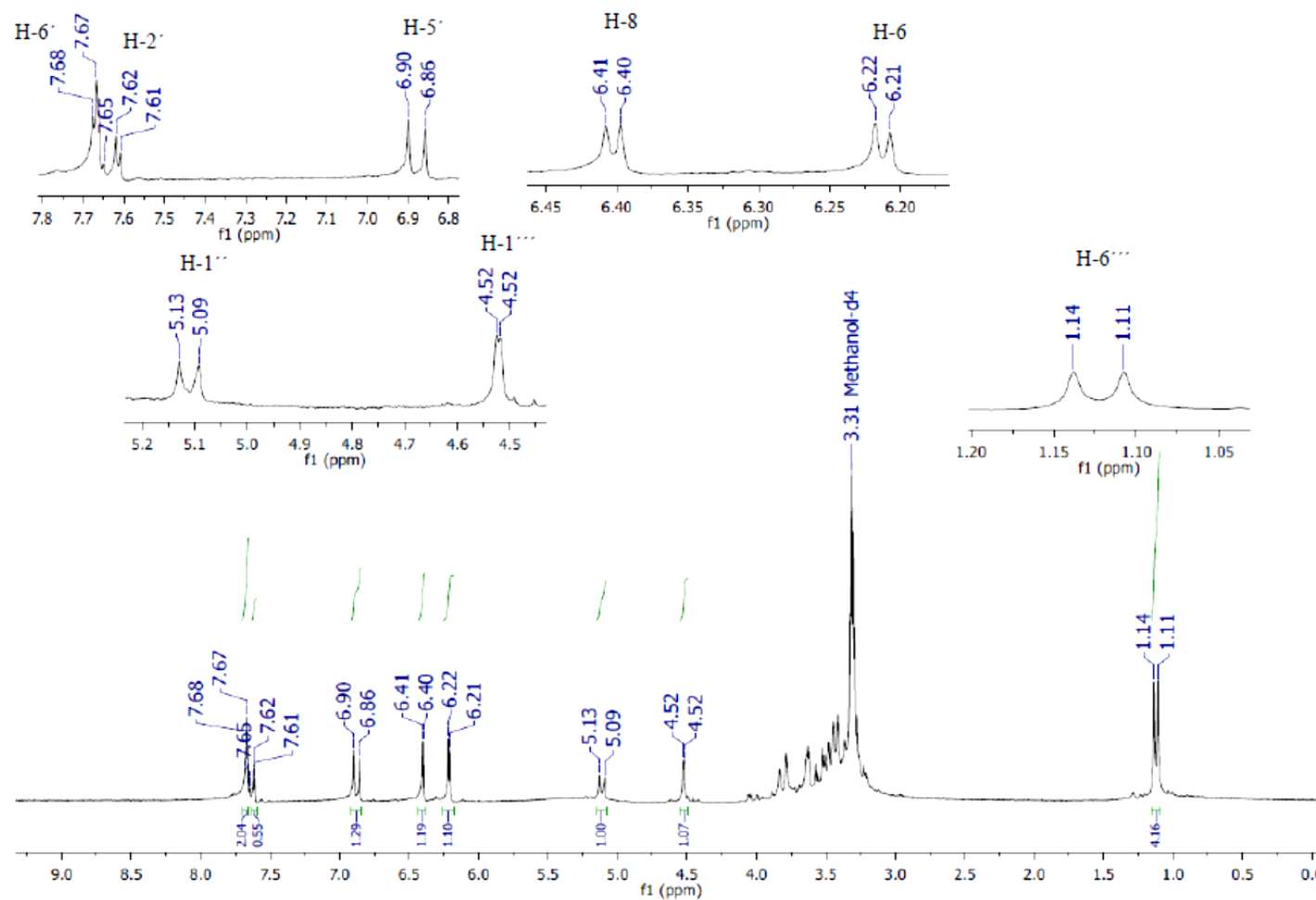
Espectro 4b

1-O-metil-*scyllo*-inositol ^{13}C RMN (100 MHz, D_2O)



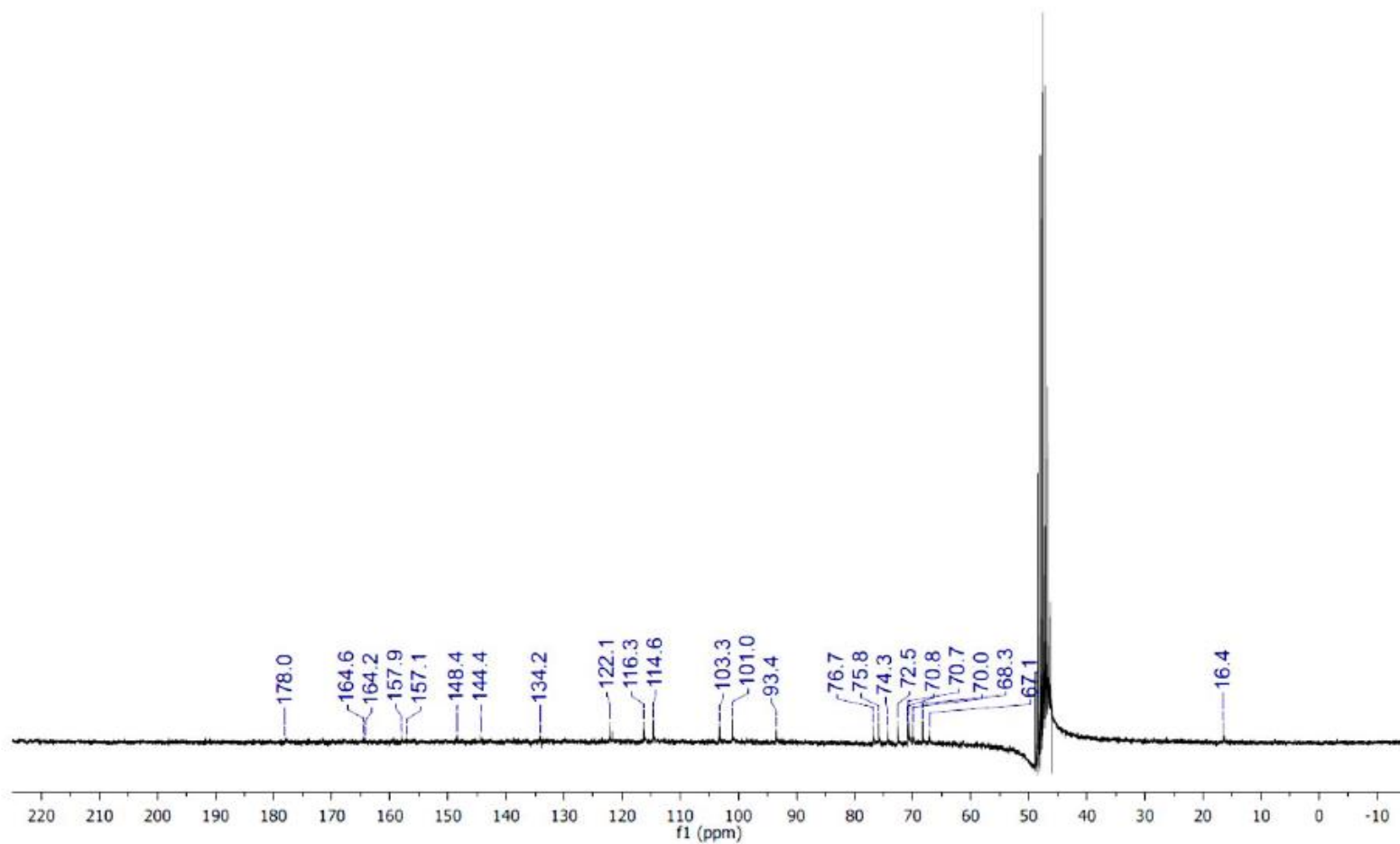
Espectro 5a

Rutina ^1H RMN (200 MHz, CD_3OD)



Espectro 5b

Rutina ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD)





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Antidiabetic effect of *Cordia morelosana*, chemical and pharmacological studies



Diana Giles-Rivas^{a,1}, Samuel Estrada-Soto^{a,*}, A. Berenice Aguilar-Guadarrama^{b,***}, Julio Almanza-Pérez^c, Sara García-Jiménez^a, Blanca Colín-Lozano^a, Gabriel Navarrete-Vázquez^a, Rafael Villalobos-Molina^d

^a Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

^b Centro de Investigaciones Químicas, ICQA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

^c Laboratorio de Farmacología, Depto. Ciencias de la Salud, D.C.B.S., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, México

^d Unidad de Biotecnología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlahuapanda, Eda. de México, México

ARTICLE INFO

Keywords

Cordia morelosana standley

Diabetes

PPAR γ

PPAR α

α -Glucosidases

Methyl rosmarinate

ABSTRACT

Ethnopharmacological importance: *Cordia morelosana*: Standley (Boraginaceae) is commonly used in folk medicine for the treatment of diarrhoea, kidney inflammation, diabetes, lung pain, bronchitis, asthma, hoarseness, cough and fever.

Aim: Current work was conducted to develop a bio-guided isolation of antidiabetic compounds from ethanolic extract of *Cordia morelosana* (EECm).

Material and methods: The phytochemical bio-guided study was conducted by successive chromatographic techniques, and isolated compounds were characterized by 1D and 2D-NMR experiments. The *in vivo* antihyperglycemic and antidiabetic activities of EECm (100 mg/kg), and methyl rosmarinate (MR, 50 mg/kg) were determined on normoglycemic and diabetic murine models. Additionally, the *in vitro* activity was conducted to determine α -glucosidase inhibitory effect, and PPARs, GLUT4 and FATP expression on 3T3-L1 cells by RT-PCR. Acute and sub-chronic toxicological studies for EECm were conducted on rats, following the OECD guidelines (No. 420 and 407).

Results: EECm promotes significant α -glucosidase inhibition (55.6%) at 1 mg/kg respect to the control. Also, EECm (100 mg/kg) showed significant antihyperglycemic effect on oral glucose tolerance test (OGTT), and in non-insulin dependent type 2 diabetes (NIDDM) model, had antidiabetic activity ($p < 0.001$) compared to controls. The bio-guided isolation allowed to obtain four known compounds described as rosmarinic acid (RA), methyl rosmarinate (MR), nicotiflorine and 1-O-methyl-scyllo-inositol. On the other hand, MR showed significant antidiabetic and antihyperglycemic activities ($p < 0.05$), and overexpression of PPAR γ , PPAR α , GLUT-4 and FATP than control. Docking studies were conducted with PPAR γ and PPAR α , showing interesting binding mode profile on those targets. Finally, EECm displayed a LD₅₀ > 2000 mg/kg and sub-chronic toxicological study reveals no toxic signs in animals tested compared to control.

Conclusion: EECm showed significant antihyperglycemic and antidiabetic actions being RA and MR the main antidiabetic metabolites.

1. Introduction

Type 2 Diabetes mellitus (DM2) is characterized by hyperglycemia with unusual carbohydrate, fat, and protein metabolism resulting from defective pancreatic β -cells or insulin deficiency/action. This chronic hyperglycemic circumstance is associated with long-term damage,

dysfunction, and organ failure, particularly the nerves, eyes, blood vessels, heart, and kidney (Balakrishnan et al., 2018).

For the treatment of DM2 several oral antidiabetic drugs exist, which are classified according to their biological effect as: insulin secretagogue (sulfonylureas, meglitinides, and DPP-4 inhibitors), insulin sensitizer (biguanides and thiazolidinediones), antihyperglycemic

* Corresponding author.

** Corresponding author.

Email addresses: enoch@uaem.mx (S. Estrada-Soto), bogular@uaem.mx (A.B. Aguilar-Guadarrama).

¹ Taken in part from the PhD Thesis of Diana Giles-Rivas.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112543>

Received 2 October 2019; Received in revised form 14 December 2019; Accepted 1 January 2020

Available online 07 January 2020

0378-8741/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

(acarbose), and inhibitor of glucose recapture (gliflozine), among others (Chaudhury et al., 2017). In latter classification, one of the effective treatment strategies is to induce postprandial antihyperglycemic action by α -glucosidases inhibition (as an efficient adjuvant in DM2 therapeutics), and/or most important is to induce the insulin sensitization through Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) agonism. Thus, the α -glucosidases inhibitors can reduce postprandial hyperglycemia, preventing impaired glucose tolerance, improving lipid metabolism and reducing oxidative stress indirectly. However, the efficacy of α -glucosidases inhibitors in prediabetes treatment is not favourable. Results from recent clinical trials have shown that acarbose, a powerful α -glucosidase inhibitor, reduced the risk of diabetes by only 25% and had limited effects on the associated complications (Delorme and Chiasson, 2005). Recent research strategies also explore targeting the nuclear receptors (NRs), such as PPARs that are representative members of this large superfamily of NRs, which consist of three isotopes: PPAR α , PPAR β/δ , and PPAR γ acting as sensors of the cellular metabolic states (Brunmeir and Xu, 2018). A broad variety of natural compounds has been found to bind and activate PPAR proteins, and have been investigated as attractive therapeutic targets for DM2 (Shen and Lu, 2013).

The genus *Cordia* encompasses about 250 species; the majority are tree- or shrub-sized and native to the Americas (Matias et al., 2015), and is distributed worldwide in warmer regions (Geller et al., 2010). *Cordia morelosana* Standley (Boraginaceae), is a tree of 2–4 m high, with black bark and groups of white flowers; known as anacahuite, encinillo or palo prieto, which is commonly used in folk medicine for the treatment of diarrhoea, kidney inflammation, diabetes, lung pain, bronchitis, asthma, hoarseness, cough and fever (Monroy-Ortiz and Castillo-España, 2007). To date, there has not been data published about chemical composition. The aim of the present work was to develop a bio-guided isolation of antidiabetic compounds from ethanolic extract of *Cordia morelosana* (EECm) in order to obtain potential drugs in the treatment of DM2.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Streptozotocin (STZ), nicotinamide (NA), glibenclamide, glucose, sucrose and solvents for NMR spectra acquisition were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Acarbose and other reagents were purchased from local distributors.

A Variant Inova Unity 400 spectrometer equipped with 5 mm multinuclear inverse detection probe was used to obtain 1D and 2D-NMR experiments.

2.2. Plant material and preparation of EECm

Cordia morelosana Stand I. (Boraginaceae) was collected and identified by Dr. Patricia Castillo-España in March 2005 in the "Corredor Biológico Ajusco-Chichinautzin", Morelos, México. A specimen was deposited at the Biodiversity and Conservation Research Centre Herbarium (HUMO), Autonomous University of Morelos State, Cuernavaca, Morelos with a voucher number 19011. Aerial parts of *C. morelosana* (4 kg) was dried, powdered and extracted for 72 h in ethanol (three times). After filtration, the solvent was eliminated under reduced pressure below 40 °C until dryness to give 70.62 g of the extract.

2.3. Phytochemical analysis

EECm (49.4 g) was subjected to open column chromatography (CC) using silica gel 60 (0.063–0.200) Merck[®]; dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc) and methanol (MeOH) gradient were used as mobile phase. From this process, 170 fractions were obtained and

pooled in five groups (F–I to F–V) according to the thin layer chromatography analysis. Then, the most active FII (68.3 ± 1.2% of α -glucosidases inhibition) fraction was subjected to several purification processes until obtain Rosmarinic acid (RA) and Methyl rosmarinate (MR). On the other hand, from FIII (21.9 ± 2.4% of α -glucosidases inhibition) and FIV (48.5 ± 1.7 of α -glucosidases inhibition) allowed the isolation of Nicotiflorin, and 1-O-methyl-scyllo-inositol, respectively. All of them were identified by the analysis of spectroscopic data and compared with those reported in the literature.

2.4. Animals

Six-week-old CD1 mice (25–30 g) were provided by Faculty of Medicine animal facilities, from Autonomous University of State of Morelos. On the other hand, adult male Wistar and Sprague Dawley rats (200–250 g) were obtained from the Biomedicine Unit, FES Iztacala, National Autonomous University of Mexico. The animals were kept at constant laboratory conditions (12 h light/dark cycle, 25 ± 2 °C, and 45–65% humidity). Experiments were carried out in accordance with Mexican Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (SAGARPA-NOM-062-ZOO-1999), based on US National Institutes of Health Publication No. 85-23, revised 1985. Before antidiabetic and OGTT experimentation, animals were deprived of food for 13 h but allowed free access to water.

2.5. In vivo assays

2.5.1. Oral glucose and sucrose tolerance tests

Fasted normoglycemic mice were divided into three groups (n=6): vehicle group was administered with saline solution (s.s. 0.9% NaCl), reference drug glibenclamide group (5 mg/kg), or acarbose group (3 mg/kg) were used as positive controls, and EECm group received 100 mg/kg of the extract. 30 min after administration of test samples, a dose of 2 g/kg of glucose or sucrose solution was administered to each animal. Blood samples were collected from caudal vein at 0 (fasting blood glucose), 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 h after administration. The percentage variation of glycemia was determined in relation to glucose blood level at 0 h, according to the equation: % variation of glycemia = [(G_x-G₀)/G₀] × 100, where G₀ was the initial glycemia values, and G_x was the glycemia values at 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3 h, respectively, as described (Ortiz-Andrade et al., 2007).

2.5.2. Anti-diabetic effect

2.5.2.1. Experimental non-insulin-dependent diabetes (NIDDM) model. NIDDM mice model was induced in overnight fasted mice by a single injection of 100 mg/kg of streptozotocin dissolved in citrate buffer (pH 4.5), 15 min after the i.p. administration of 40 mg/kg of nicotinamide. Hyperglycemia was established by the higher plasma glucose concentration, determined by commercial glucometer (Accu-Check, Performa). Animals with blood glucose (GLU) concentrations higher than 140 mg/kg were selected for the assay. The NIDDM mice were separated into three groups (each, n=6 animals), vehicle group was orally administered with s.s. 0.9% NaCl, reference drug glibenclamide group (5 mg/kg) was used as positive control, and third group test received EECm (100 mg/kg) or 50 mg/kg of MR. Blood samples were collected from caudal vein at 0 (fasting blood glucose), 1, 3, 5 and 7 h after administration. The percentage variation of glycemia was determined in relation to glucose blood level at 0 h, according to the equation mentioned above.

2.5.3. Acute and sub-chronic oral toxicity

The experiment was conducted in accordance with the recommendation of the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) 420 (Acute Oral Toxicity), and 407 (Repeated Dose 28-day Oral Toxicity), with some modifications.

For acute toxicity, male Wistar rats were used. Before experiments,

all animals were fasted 16 h. To determine acute toxicity, animals (250–300 g) were orally administered with gradual doses (5, 50, 300, and 2000 mg/kg body weight) of the EECm, and observed for 14 days after single dose administration. All deaths and signs of toxicity were recorded during the experiment.

In sub-chronic assays, two independent groups of six animals (rats, $n=6$) were used. Vehicle group was orally administered by gavage, using a cannula, with s.s. 0.9% NaCl and the treated group received an oral single dose of EECm (100 mg/kg) daily, for 28 days. During assay, all animals were kept under observation to identify any signs of toxicity, and individual weights were determined. At day 29 animals were anesthetized, and blood samples were collected by cardiac puncture into clean tubes without heparin, and centrifuged (CIVEQ) at 4000 g for 10 min. Serum was carefully separated and stored frozen until required for analysis. Level of cholesterol, glucose, triglycerides, very low-density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) were determined. After that, rats were sacrificed by cervical dislocation to obtain kidney, liver and heart from all animals in vehicle and treated groups. Then, relative organs' weight was determined at the end of assays (29 days). The relative organ weight was calculated as follows: [organ weight/body weight] \times 100.

2.5.4. Histopathological analysis

All animals were subjected to gross necropsy and careful macroscopic observed. Tissue samples were collected from liver, kidney and heart and then were immersed in 10% formaldehyde in sodium phosphate buffer (50 mM), at pH 7.4. Tissue sample were processed separately in a Histokinette 200 apparatus (Reichert Jung, Germany). The sections were paraffin-embedded, cut into 5 μ m slices and stained with hematoxylin-eosin; slices were examined under light microscope.

2.6. In vitro assays

2.6.1. Inhibition of the α -glucosidases activity

Glucosidases inhibition assays were performed in quadruplicate as previously reported (Ramírez et al., 2012). Corn starch substrate (12.5 mg/mL) in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0) in a final volume of 250 μ L was digested by crude enzyme, derived from a homogenate of Sprague Dawley rats' intestinal mucosa. Substrate was premixed with *C. morelosana* extract and Fractions (F-I to F-V) at a concentration of 1 mg/mL, and the reaction was started by addition of 50 μ L of crude enzyme. Then, the mixture was incubated at 37 °C for 10 min, and reaction was stopped by acarbose and ice incubation and released glucose was quantified by a glucose-oxidase based clinical reagent (SPINREACT), following manufacturer's directions.

2.6.2. Relative expression of PPAR γ , PPAR α , GLUT-4 and FAPT

To determine the effect of RA and MR on PPAR γ , PPAR α , GLUT-4 and FAPT expression, *in vitro* assay was developed as described (Hidalgo-Figueroa et al., 2013; Almanza-Perez et al., 2010). 3T3-L1 cells (ATCC, 9×10^5 cells per well) were cultured in 6-well plates in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 25 mM glucose, 10% fetal bovine serum (v/v), 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 0.1 mM nonessential amino acids, and gentamicin, in a 5% CO₂ humidified atmosphere, at 37 °C. After 2 days of confluence, the cells were differentiated to the adipocyte phenotype with 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.25 mM dexamethasone acetate, and 80 mM bovine insulin, for 48 h, followed by insulin alone for another 48 h. The adipocytes were treated 24 h with 10 μ g/ml of compounds to determine the effect on PPAR γ , PPAR α , GLUT-4, and FAPT expression. RNA was isolated from cultured cells and 2 μ g of total RNA were reverse-transcribed in a thermocycler. The enzyme was inactivated and finally samples were cooled. Each reverse-transcribed reaction was amplified with SYBR Green master mix containing 0.5 mM of

customized primers for PPAR γ , PPAR α , FAPT and GLUT-4. PCR was conducted and the threshold cycles (C_t) were measured in separate tubes in duplicate. The Δ C_t values were calculated in every sample for each gene of interest. Relative changes in the expression's level of one specific gene ($\Delta\Delta$ C_t) were calculated as described (Hidalgo-Figueroa et al., 2013).

2.7. In silico assay

2.7.1. Molecular docking with PPAR α and PPAR γ receptors

The docking analysis of RA and MR were carried out by means of the AutoDock, v4.2 program. The crystal structures of PPAR γ and PPAR α , were recovered from the Protein Data Bank (PDB) with the ID: 1171 and 5HYK, respectively.

The program performs several runs (100) in each docking experiment. Each run provides one predicted binding mode. All water molecules and every co-crystal ligands were removed from the crystallographic structure and all hydrogen atoms were added. For all ligands and proteins, Gasteiger charges were assigned and non-polar hydrogen atoms were merged. All torsions could rotate during docking. The auxiliary program AutoGrid generated the lattice map. Each grid centred at the crystallographic coordinates of the co-crystallographic ligand, with dimensions of 50 \times 50 \times 50 Å and 60 \times 60 \times 60 Å for PPAR α/γ , respectively (point's separation: 0.375 Å). The search was carried out with the Lamarckian genetic Algorithm using default parameters; The number of docking runs was 100. After molecular docking, all results were clustered into groups with root mean square deviation (RMSD) from 0.5 to 2 Å. MOE 2018.01, and Pymol version 1.3 were used for visualization.

2.7.2. Docking validation

The docking protocols were validated by AutoDock 4.2, based on the important interactions made by the co-crystallographic ligand with the amino acids of binding site. The RMSD obtained was less than 2.0 Å, in both cases. This value specifies that the parameters for docking simulations agree in reproducing the orientation and the conformation in the X-ray crystal coordinates of enzyme and receptors.

2.8. Statistical analysis

Data are represented as mean \pm standard error of mean (S.E.M). Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test or Student's *t*-test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Antidiabetic effect of EECm on experimental NDD model

EECm (100 mg/kg) provokes decrease of blood glucose concentration in diabetic mice compared to control group ($p < 0.05$); this effect was significant from the first h and increased during the next hours after treatment ($p < 0.001$). Also, the effect was similar to induced by glibenclamide (5 mg/kg), used as positive control (Figs. 1 and 2).

3.2. Antihyperglycemic effects of EECm over OGTT on normoglycemic mice using glucose and sucrose as substrate

After an oral glucose load (Fig. 2), EECm (100 mg/kg) induced significant decrease in the percentage variation of glycemia, from 0.5 to 3 h ($p < 0.001$) than control group. The blood glucose level lowering effect of EECm was comparable to that produced by glibenclamide (5 mg/kg). On the other hand, Fig. 3 shows that EECm (100 mg/kg) provoked a significant reducing of hyperglycemic peak and area under the curve of OGTT when was used sucrose as substrate. The decrease of the percentage variation of glycemia is similar to acarbose (3 mg/kg).

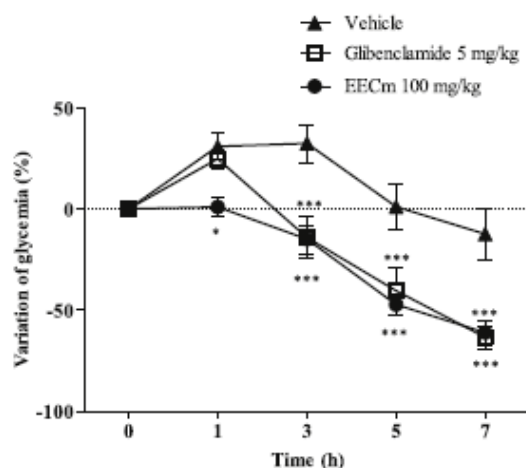


Fig. 1. Effect of EECm on blood glucose levels in NIDDM model. Each plot represents the means \pm S.E.M. for $n = 6$. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

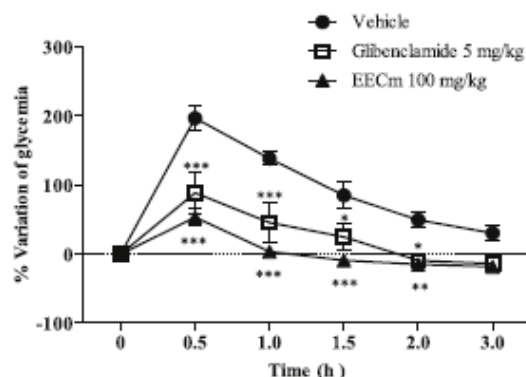


Fig. 2. Effect of EECm in OGTT on blood glucose levels after a single oral load of glucose (2 g/kg). Each plot represents the means \pm S.E.M. for $n = 6$. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

3.3. In vitro α -glucosidases inhibition of EECm

EECm induced a significant intestinal α -glucosidases inhibition (55.1%) at 1 mg/kg, comparable to that showed by *Camellia sinensis* (green tea hydro-alcoholic extract) used as positive control (Fig. 4).

3.4. Bio-guided fractionation of EECm using in vitro α -glucosidases inhibition

EECm was subjected to a chromatographic column process. From this, five primary groups of fractions were obtained (F-I to F-V) and evaluated on α -glucosidases activity (Fig. 5). F-II was the most active fraction (68.3 \pm 1.2% of inhibition), which after several chromatographic processes allowed the isolation and identification of two phenolic acid derivatives, Rosmarinic acid RA (33 mg) and Methyl rosmarinate MR (111 mg). On the other hand, from less active F-III (21.9 \pm 2.4% of inhibition) and F-IV (48.5 \pm 1.7 of inhibition) fractions, Kaempferol-3-O- β -rutinoside (Nicotiflorin), a flavonoid, was isolated by spontaneous precipitation (150 mg) as yellow powder,

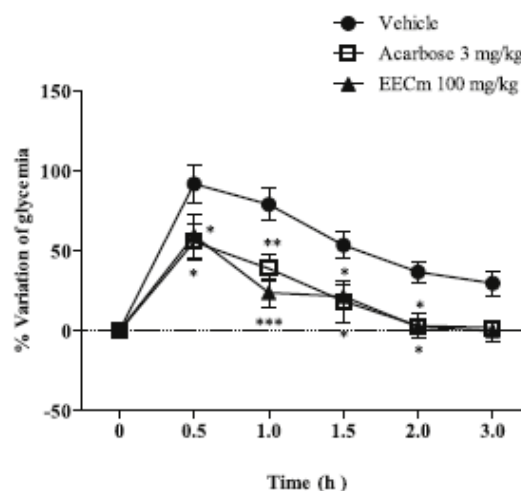


Fig. 3. Effect of EECm in OGTT on blood glucose levels after a single oral load of sucrose (2 g/kg). Each plot represents the means \pm S.E.M. for $n = 6$. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

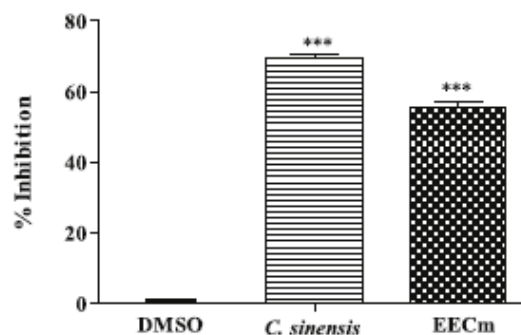


Fig. 4. Effect of EECm extract in the in vitro α -glucosidases inhibition. The results represent the mean \pm S.E.M $n = 5$, *** $p < 0.001$ vs. DMSO.

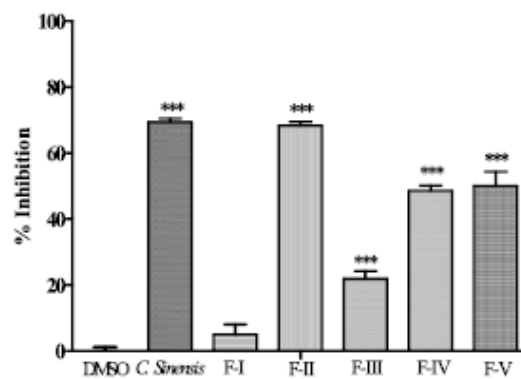


Fig. 5. Effect of primary groups of fractions in the in vitro α -glucosidases inhibition. Results represent the mean \pm S.E.M $n = 5$, *** $p < 0.001$ vs. DMSO.

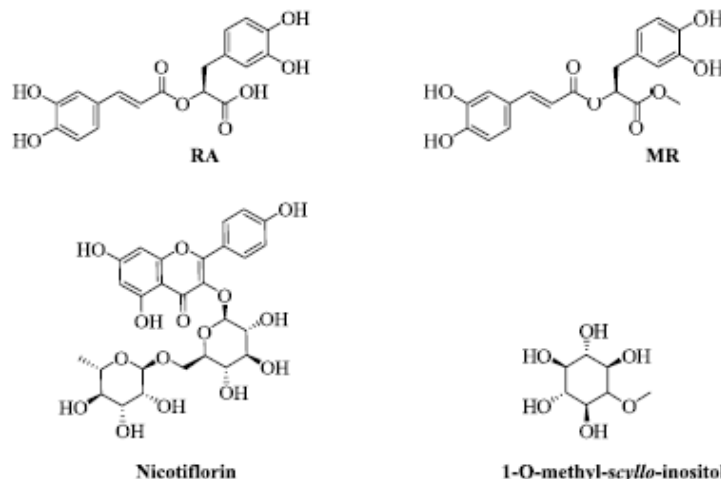


Fig. 6. Structures of isolated compounds from EECm.

meanwhile an inositol compound that was characterized as 1-O-methyl-scyllo-inositol (4) was isolated as a white solid (81 mg) (Fig. 6).

3.5. MR antidiabetic effect

MR (50 mg/kg) induced significant decrease ($p < 0.001$) in plasma glucose levels in NIDD mice model, the hypoglycemic effect was sustained from 3 to 7 h (Fig. 7), and was better than glibenclamide (5 mg/kg).

3.6. PPAR α , FAPT and GLUT-4 expression induced by AR and MR in 3T3-L1

MR significantly increased (about 4-fold) the relative expression for PPAR γ and GLUT-4 mRNAs, similar to pioglitazone and provoked a high of PPAR α and FAPT mRNA expression (about 4 and 5-fold, respectively). In contrast, no change in relative expressions for PPAR α ,

GLUT-4 and FAPT was observed with RA (Fig. 8).

3.7. Docking analysis of RA and MR with PPAR γ

Fig. 9 (A) exhibits the interactions of RA with PPAR γ residues through hydrogen bonds with Ser342, Gly284, Cys285 and Lys367, showing a binding energy of -4.53 kcal/mol. It is important to note that the interaction with Ser342 has been described as characteristic of PPAR γ partial agonist (Bruning et al., 2007). On the other hand, Fig. 9 (B) shows MR hydrogen bond interaction with Lys263, and an interaction between ester of carbonyl group with Glu343. Similarly, MR showed π -cation interaction between aromatic ring [3,4-(dihydroxyphenyl) acryloyl portion], and at the same time a hydrogen bond with Cys285. Also, a dual hydrogen bond interaction was predicted with Ser342, showing a binding energy of -4.73 kcal/mol. 3D binding model for RA and MR (Fig. 10) shows crucial interactions for PPAR γ activity.

Fig. 11A shows interactions between RA with PPAR α by hydrogen bonds with residues Ser280, Tyr314 and His440, showing a binding free energy of -5.39 kcal/mol. These amino acids are part of the network of hydrogen-bonding residues involved in the activation of the receptor. Also, MR (Fig. 11 B) displays a binding energy of -4.9 kcal/mol, presenting hydrogen bonds with Ser280, Tyr314 and His440. Additionally, an interaction with Phe273 was also observed in the co-crystallized ligand, as well as the interaction with Thr279, which could improve the contact of this ligand with PPAR α binding site, and thus manifesting biological activity.

3D binding model for RA and MR (Fig. 12) shows crucial interactions for PPAR α activity.

3.8. Blood biochemical parameters, relative organ weight, body weight and histopathological analysis after sub-chronic toxicity study

Serum concentrations of glucose, lipid profile and transaminases were not modified compared with vehicle group (Fig. 13). Moreover, body weight in treated and untreated animals showed not changed after treatment period (Fig. 14), and the relative organ weights (organ to body weight ratio) of treated animals did not indicate changes, compared with vehicle (Fig. 15). Finally, the detailed histopathological observation and analysis of organs showed that renal cortex and medulla were without apparent alterations; however, glomerular

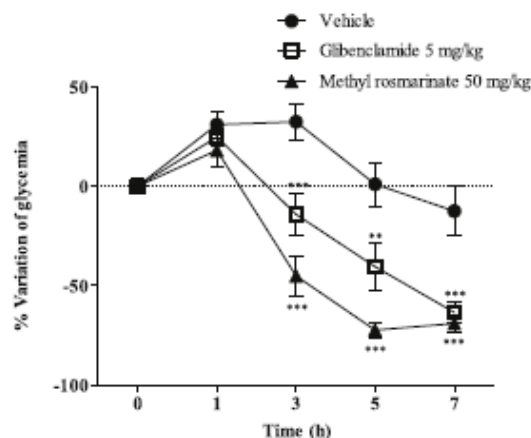


Fig. 7. Effect of MR on blood glucose levels in NIDD model. Each plot represents the means \pm S.E.M. for $n = 6$. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ compared with Vehicle.

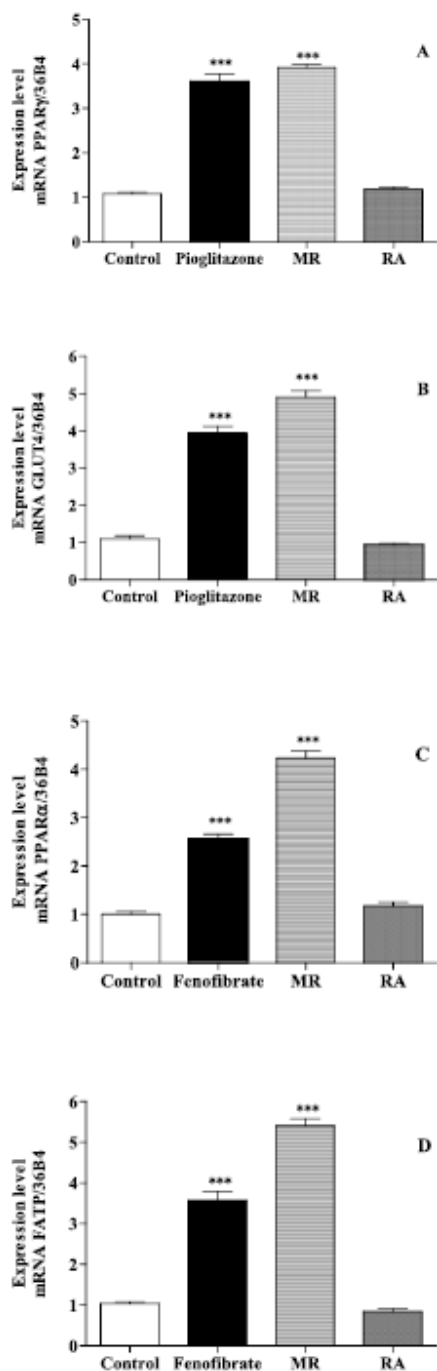


Fig. 8. Effect of MR and RA on PPARs, GLUT-4 and FATP mRNA expression on 3T3-L1 cells. Results represent the mean \pm S.E.M. (n=6) compared with Control group.

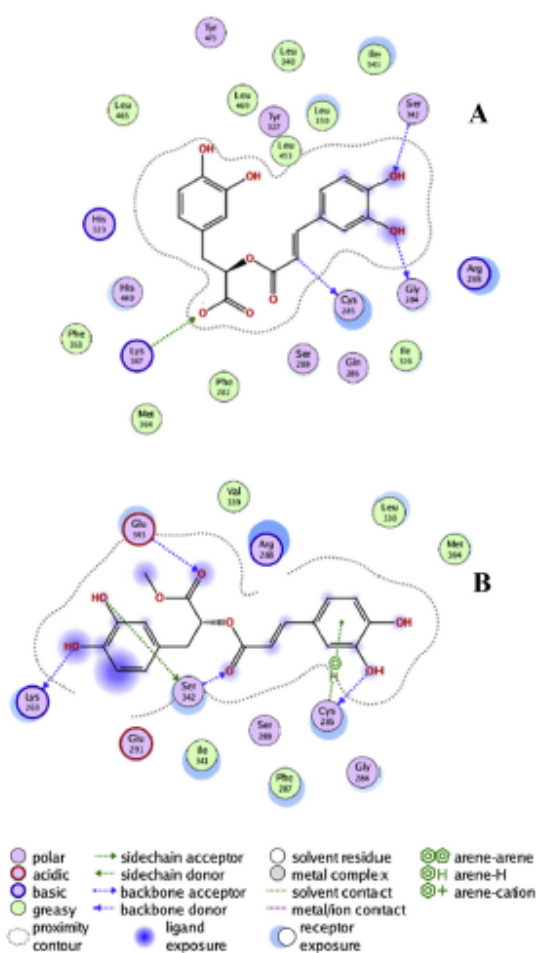


Fig. 9. 2D binding model of RA (A) and MR (B), respectively, into the active site of PPAR γ .

mesangial congestion is evident in vehicle (16a) and treated (16b) group. Fig. 16c and d represent longitudinal cardiac muscle fibers, without alterations or damage in both vehicle and treated groups. Meanwhile, Fig. 16e and f, show liver with conserved cytoarchitecture. However, microscopic observation allowed to detect perivascular inflammatory infiltrate, chronic perivascular inflammation, and both with lymphocyte predominance.

4. Discussion

The aim of current study was to determine the potential antidiabetic effect of *C. morelosana*, a medicinal plant, which is commonly used in Mexican folk medicine for the treatment of diarrhoea, kidney inflammation, lung pain, bronchitis, asthma, hoarseness, cough, fever and diabetes (Monroy-Ortiz and Castillo-España, 2007). Also, to isolate and describe some of the secondary metabolites responsible of the antidiabetic action, and to establish the potential mode of action of the isolated compound MR. It is important to mention that there are not any antidiabetic pharmacological and chemical previous studies concerning to *C. morelosana*.

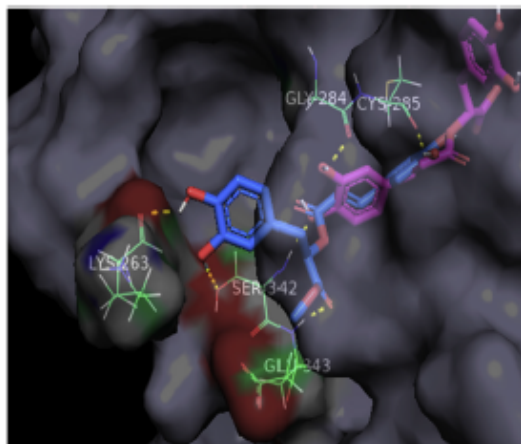


Fig. 10. 3D binding model of RA (magenta) and MR (blue) in the active site of PPAR γ . Amino acids are represented as lines. Dashed lines signify polar interactions. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

As described and due that *C. mordasana* is used in the folk medicine for the treatment of diabetes, we decided, firstly, to determine the potential antidiabetic activity of ethanolic extract of the plant on NIDD model. As expected, EECm (100 mg/kg) induced significant antidiabetic action on diabetic mice, comparable to positive control (glibenclamide). Activity showed by the extract could be related with three most common modes of antidiabetic action, one related with postprandial activity after α -glucosidases inhibition and/or glucose co-transporters (GLUT-2 or SGLT1) inhibition related with an anti-hyperglycemic action, a second one linked with insulin secretion, and the third one associated with insulin sensitization (Ortiz-Andrade et al., 2007, 2008; Chávez-Silva et al., 2018). Thus, in order to corroborate which one of them participates, we evaluated the extract in OGTT in normoglycemic mice to establish potential anti-hyperglycemic action. Therefore, EECm (100 mg/kg) shows significant anti-hyperglycemic effect after an oral load of glucose. In this framework, some actions to control postprandial hyperglycemia are related with pancreatic and/or extra pancreatic mechanisms, such as increment of insulin sensitivity in peripheral tissues, suppression of hepatic glucose output, insulin secretion, or due to glucose uptake regulation from intestinal lumen by glucose co-transporters inhibition (Ortiz-Andrade et al., 2008).

With the intention to keep exploring the mechanism of action related with the anti-hyperglycemic postprandial effect, we performed the OGTT after a single load of sucrose (2 g/kg). It was observed that the EECm induced a marked decrease in the hyperglycemic peak, and the effect was sustained throughout the 3 h of experimentation. The decrease of the percentage variation of glycemia is similar to acarbose (3 mg/kg), an α -glucosidases inhibitor used as anti-hyperglycemic agent in combination with oral antidiabetic drugs (metformin or glibenclamide), for the successful therapeutic strategy to control DM2 (Brunton, 2011). In this context, one of the therapeutic ways used for therapy of DM2 comprises the inhibition of enzymes, which can hydrolyse the polysaccharide molecules and convert them into monosaccharide units. This kind of enzymes are α -glucosidases (Tselimi and Gulçin, 2017). The glucosidases are located in the brush border of the small intestine and are required for the breakdown of carbohydrates before monosaccharide absorption. The α -glucosidases inhibitors delay the absorption of ingested carbohydrates, reducing the postprandial glycemia and insulin peaks (Fontana Pereira et al., 2011). Thus, control of postprandial glucose levels is critical in treatment of diabetic patients

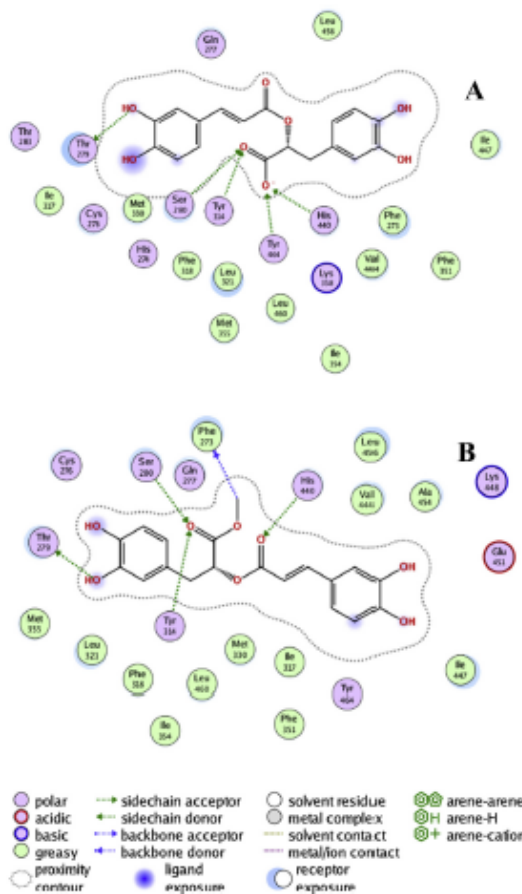


Fig. 11. 2D binding model of RA (A) and MR (B), respectively, into the active site of PPAR α .

as well as individuals with impaired glucose tolerance (Huang et al., 2012). Therefore, we focused into evaluate the effect of EECm on α -glucosidases activity to look for a possible mode of action as anti-hyperglycemic agent. To corroborate this hypothesis, EECm was examined to determine its ability to inhibit the intestinal α -glucosidases activity; the result showed that EECm significantly inhibited α -glucosidase activity by 55.6% at 1 mg/ml, and the inhibition was similar to that produced by *Camellia sinensis* used as positive control (Ramírez et al., 2012). Consequently, postprandial glucose, together with related hyperinsulinemia and lipidaemia, has been implicated in the development of chronic metabolic diseases like DM2 and cardiovascular diseases (Blask et al., 2012). In diabetes, the postprandial phase is characterized by a rapid and large increase in blood glucose levels, and the possibility that the postprandial "hyperglycemic spikes" may be relevant to the onset of cardiovascular complications has received great attention (Ceriello, 2005). Thus, development of anti-hyperglycemic agents could help in control of diabetes and related diseases.

After previous results, it was decided to do the bio-guided fractionation of the extract, which was subjected to a chromatographic column process to obtain RA, MR, Nicotiflorin and 1-O-methylscyllo-inositol. RA has already been found in the genus *Cordia* (Geller

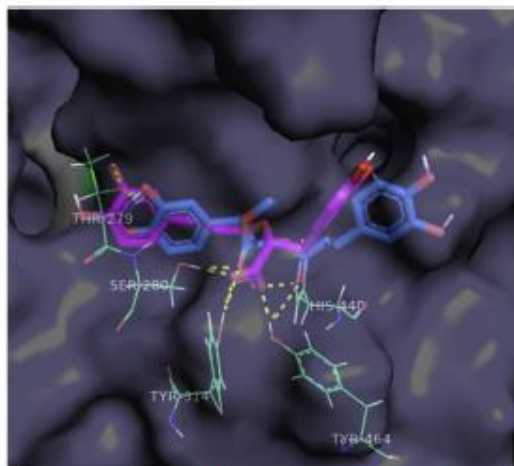


Fig. 12. 3D binding model of RA (magenta) and MR (blue) in the active site of PPAR α . Amino acids are represented as lines. Dashed lines signify polar interactions. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

et al., 2010) and is a characteristic constituent in members of the Lamiaceae (isolated for the first time from *Rosmarinus officinalis* L.), and Boraginaceae families where it occurs in higher amounts (Petersen and Simmonds, 2003). As described before, other species of the genus *Cordia* like *C. dichotoma*, and *C. sebestena* have been reported for antidiabetic activity in diabetic rats. In addition, MR has been isolated from *C. dichotoma* leaves and RA has been isolated from *C. Americana*, *C. dentata*, *C. dichotoma* and *C. verbenacea* (Oza and Kulkarni, 2017). Many studies have extensively evaluated the pharmacological activities of RA, particularly for antidiabetic properties. RA exhibits significant inhibition of α -glucosidases which confirms the effect showed by the EECm (Kubínová et al., 2014); also, RA showed a potent dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) and protein tyrosine phosphatase 1B inhibition. Additionally, RA has been identified as AMPK activator (Jayanthi et al., 2017). In other study, oral treatment with RA (100 mg/kg) for 30 days could restored the blood glucose level, regulated the circulating adipokines and improved insulin sensitivity, in diabetic rats (Jayanthi and Subramanian, 2014). Runtuwene et al. (2016) observed that RA reduced hyperglycemia and ameliorated insulin sensitivity by increasing glucose transporter type 4 (GLUT-4) expression, and Jayanthi and Subramanian (2014), reported that RA controls blood glucose by regulating SGLT1 in intestinal brush-border membrane. Moreover, MR was found to induce significant α -glucosidases inhibition, antihyperglycemic and hypoglycemic activities (Ruiz-Vargas et al., 2019; Moharram et al., 2012). Finally, regarding nicotiflorin (3) and 1-O-methyl-scyllo-inositol (4), there is no antidiabetic reports, with exception of a very modest α -glucosidases inhibition (Adhikari-Devkota et al., 2019). These antecedents may correlate with results observed in the OGTT and NIDD models, suggesting that the antidiabetic effects of EECm are linked to more than one mechanism, which includes the postprandial antihyperglycemic action and the insulin sensitization related with the presence of RA and MR mainly. However, there are few studies about the antidiabetic and antihyperglycemic activities of MR, and almost no data about its mechanism of action; for that reason, and because it was isolated from the most active fraction of the bio-guided study, it was decided to study its antidiabetic activity and its potential mechanism of action.

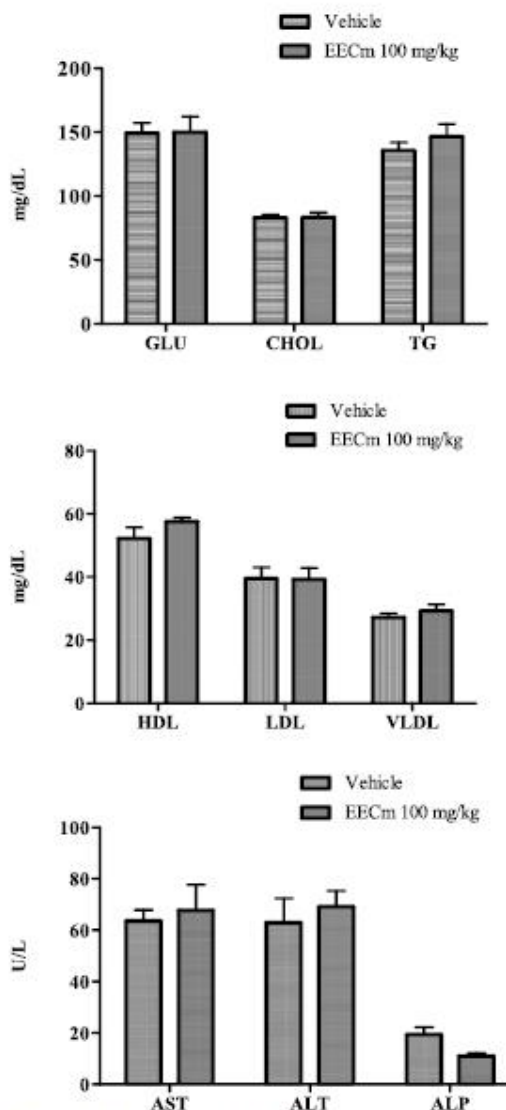


Fig. 13. Effect of EECm (100 mg/kg/day) in biochemical parameters after sub-chronic treatment. Results represent the mean \pm S.E.M n = 6, ***p < 0.001 vs control group.

4.1. Antidiabetic and insulin sensitization of RA and MR: in vivo, in vitro and in silico studies

As mentioned, MR could be one of the main bioactive compounds related with the antidiabetic and antihyperglycemic activities showed by EECm, in addition to RA. Thus, we decided to evaluate the antidiabetic activity of MR. As expected, MR (50 mg/kg) induced significant antidiabetic effect, which based on its structure, it could act as a prodrug (because it is a methyl ester of RA) that after administration it is metabolized by ester hydrolysis (esterases) to generate the free

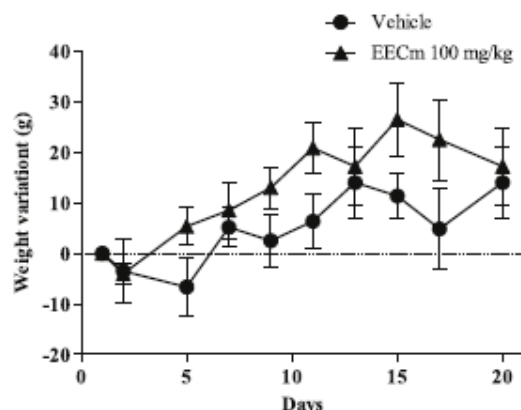


Fig. 14. Effect of EECm (100 mg/kg/day) in weight variation after sub-chronic treatment. Results represent the mean \pm S.E.M n = 6, ***p < 0.001 vs control group.

carboxylic acid. This effect can be deduced, since in the first hour after administration, MR did not show any effect in the decrease of glycemia, which was observed at 3 h post administration. The significant anti-diabetic activity showed by MR might be linked with the antihyperglycemic action promoted by α -glucosidases inhibition (83% of inhibition at 0.75 mM), as described by Ruiz-Vargas et al. (2019); however, we think that the main mechanism of action of the methyl ester is insulin sensitization. Thus, to investigate it, we evaluated the effect of main constituents isolated from EECm: RA and MR on PPARs, fatty acid transport protein (FATP), and GLUT-4 expression. It is well known that PPARs are members of the nuclear receptor family of ligand-activated transcription factors that bind to fatty acids (FA) and their metabolites. The three PPARs isotypes: PPAR α , PPAR γ and PPAR β/δ have different tissue distribution patterns and ligands specificities (Gross et al., 2017). PPAR α is the receptor for the fibrate class of lipid-lowering drugs, and PPAR γ is the receptor for the thiazolidinedione class of antidiabetic drugs. Therefore, the PPARs are FA-activated receptors that function as key regulators of glucose, lipid, and cholesterol metabolism (Xu et al., 2001). Results summarized in Fig. 8, show that MR significantly increased the relative expression for PPAR γ and GLUT-4 mRNAs, also induced high of PPAR α and FATP mRNA expression. We could asseverate that MR directly activated PPAR γ and PPAR α . These findings are relevant, since the PPARs control the expression of networks of genes involved in adipogenesis, lipid metabolism, inflammation and maintenance of metabolic homeostasis. While PPAR α has a crucial role in fatty acid oxidation in key metabolic tissues such as skeletal muscle, liver and heart; PPAR γ is most highly expressed in adipose tissue, where it is a master regulator of adipogenesis as well as a potent modulator of whole-body lipid metabolism and insulin sensitivity (Almadian et al., 2013). On the other hand, no change in relative expressions for PPARs, GLUT-4 and FATP was observed with RA.

Based on the *in vitro* assays, the RA and MR were selected to explain the experimental activities on PPAR γ and PPAR α binding mode. They were docked into the ligand binding site of the human PPAR γ (PDB ID: 1I7I) and PPAR α (PDB ID), using the program AutoDock 4.2. Docking protocols were validated by re-docking of co-crystal ligand tesglitazar in PPAR γ , and 2-methyl-2-[naphthalen-1-yl] phenoxy] propanoic acid in PPAR α . After re-docking, the RMSD obtained were 0.64 Å and 0.29 Å, respectively.

RA and MR showed a characteristic partial agonist binding mode, which highlights the interaction between hydrogen bond with Ser342

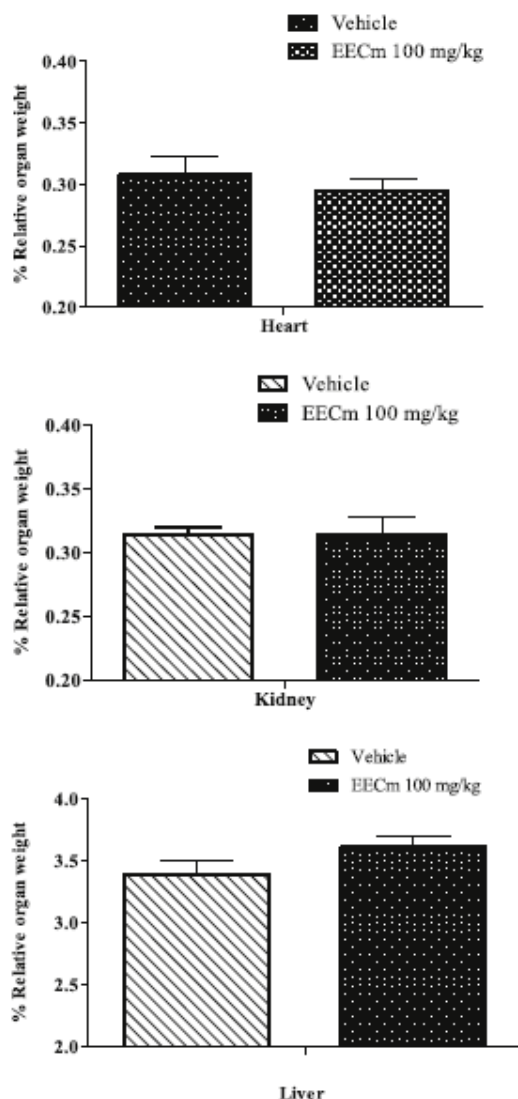


Fig. 15. Relative organ weights after EECm (100 mg/kg/day) sub-chronic treatment. Results represent the mean \pm S.E.M n = 6, ***p < 0.001 vs control group.

found on β sheet from PPAR γ receptor, and the interaction with Cys285. Partial agonists represent an advantage over full agonists, since these have been related to severe adverse effects such as weight gain, edema, congestive heart failure, bone fracture (Capelli et al., 2016), cardiotoxicity, and even cancer (Colin-Lozano et al., 2018). It is important to mention that is widely described that this mode of attachment is independent of the traditional one (His323, Ser289, His449, Tyr473). Interactions is clearly appreciated in 3D binding model between RA and MR with PPAR γ receptor. In addition, RA showed a binding free energy of -5.39 kcal/mol with PPAR α receptor, and the amino acids with it is interacted are part of the network of hydrogen-

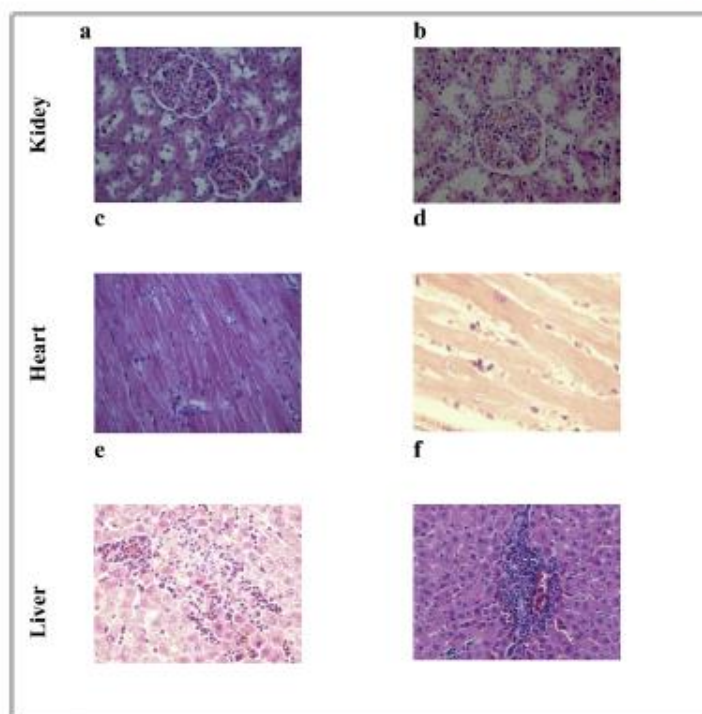


Fig. 16. Histopathological examination of organs: kidney, heart and liver. Letter a, c and e represent the vehicle group and b, d, f represent organs of treated group with EECm. (Hematoxylin & Eosin) 40X.

bonding residues involved in the activation of the receptor. On the other hand, MR displays a binding energy of -4.9 kcal/mol, presenting hydrogen bonds with Ser280, Tyr314 and His440. Additionally, an interaction with Phe273 was also observed in the co-crystallized ligand, as well as the interaction with Thr279, which could improve the contact of this ligand with PPAR α binding site, and thus manifesting biological important biological activity. 3D binding model for RA and MR shows crucial interactions for PPAR α activity. These results are relevant to explain, at the molecular level, the activity of MR in the *in vitro* assay; on the other hand, in *in vivo* assay MR decreased glucose levels in a significant manner, showing a greater effect compared with glibenclamide as control. Despite RA had no effect in PPARs expression *in vitro*, docking study showed the interactions with crucial amino acids residues for activation of receptors, which may be could indicates a potential agonism for PPAR's activation.

4.2. Toxicity

In the acute oral toxicity assay of the EECm no deaths and no other signs or symptoms of toxicity were observed. LD₅₀ of extract was estimated to be greater than 2000 mg/kg of body weight, classified as class 5, according to the Globally Harmonized System (GHS), which indicates that any test sample classified in this category is nontoxic based on OECD guideline 420, with relatively low acute toxicity, but that under certain circumstances it may pose a hazard to vulnerable populations. Furthermore, repeated oral administration of EECm (100 mg/kg/day) for 28 days did not produce characteristic signs of toxicity in the treated or vehicle groups (OECD guideline 407). There were no animal deaths in all experimental period. Moreover, serum concentrations of

biochemicals parameters such as glucose and lipid profile were not altered, which indicates that the subchronic treatment did not modify the energetic metabolism of the animals assayed. Likewise, liver marker enzymes of animals treated with EECm was not modified, denoting that there is no cellular damage or death, especially in liver, heart or muscle (Ávila-Villarreal et al., 2016). Results are in accord with those observed for body weight in treated and untreated animals, which were not changed after treatment period, and the relative organ weights (organ to body weight ratio) of treated animals did not indicate changes. Finally, the detailed histopathological observation and analysis of organs showed that renal cortex and medulla were without apparent alterations; however, glomerular mesangial congestion is evident in vehicle (16a) and treated (16b) group. Fig. 16c and d represent longitudinal cardiac muscle fibers, without alterations or damage in both vehicle and treated groups. Meanwhile, Fig. 16e and f, show liver with conserved cytoarchitecture. However, microscopic observation allowed to detect perivascular inflammatory infiltrate, chronic perivascular inflammation, and both with lymphocyte predominance. Damage observed in the liver and kidney was observed in both treated and untreated groups, which permits to discard that extract treatment is responsible for the damage found, but possible produced by vehicle used or for potential infections produced for a variety of viral, bacterial, parasitic and fungal agents. Frequently, these organisms cause no overt sign of disease; however, many of the natural pathogens of these laboratory animals may alter host physiology (Baker, 1998). Further experiments are necessary to corroborate such asseverations.

5. Conclusion

Phytochemical study of the *Cordia alliodora* showed four known compounds isolated: Rosmarinic acid, Methyl rosmarinate, Nicotiflorin and 1-O-methyl-scyllo-inositol, as the major constituents in the ethanolic extract (EEO), being rosmarinic acid and methyl rosmarinate the main bioactive antidiabetic agents accredited to the plant. This study provides scientific evidence of the efficacy and security in the use of *Cordia alliodora*, and the active compounds identified in the extract bound to more than one therapeutic target of DM2, which include anti-hyperglycemic action (by α -glucosidases and possible glucose transporter inhibition), and insulin sensitization (produced by potential PPAR γ and GLUT-4 activation and/or over expression) could be used as antidiabetic agents. Also, it is possible that MR could be useful for the treatment of dyslipidemia due to PPAR α and FATP overexpression in diabetes.

Declaration of competing interest

The authors have no conflict of interest to declare. Authors' contributions to the paper were as follows: study design and coordination: S. Estrada-Soto, B. Aguilar Guadarrama, D. Giles-Rivas; RT-PCR from 3T3-L1 cells studies: J. Almanza-Pérez and D. Giles-Rivas; preparation of the extracts and Phytochemical studies: S. Estrada-Soto, B. Aguilar Guadarrama, D. Giles-Rivas; *in vivo* studies: D. Giles-Rivas, S. Estrada-Soto and R. Villalobos-Molina; α -glucosidases inhibition determination: R. Villalobos-Molina, D. Giles-Rivas and S. Estrada-Soto; *In silico* studies: B. Colín-Lozano and G. Navarrete-Vázquez; preparation and writing of the manuscript: D. Giles-Rivas, S. Estrada-Soto and R. Villalobos-Molina; Finally, all authors contributed to the writing and revised the manuscript.

Acknowledgments

Authors are in debt with Dr. Patricia Castillo-España for providing the plant material and to Dr. Guillermo Ramírez-Ávila for the α -glucosidase evaluation. This work was supported by SEP-CONACYT (Proyecto de Ciencia Básica A1-S-13540). D. Giles-Rivas acknowledges the fellowship awarded by CONACYT (412758) to carry out graduate studies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112543>.

References

Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., Evans, R.M., 2013. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* 19, 557–566. <https://doi.org/10.1038/nm.3159>.

Adhikari-Devkota, A., Elbashedi, S.M.I., Watanabe, T., Devkota, H.P., 2019. Chemical constituents from the flowers of *Soraria mandarin* and their free radical scavenging and α -glucosidase inhibitory activities. *Nat. Prod. Res.* 33, 1670–1673. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1425856>.

Almanza-Pérez, J.C., Alarcón-Aguilar, F.J., Blancas-Flores, G., Campos-Sepulveda, A.E., Román-Ramos, R., García-Macelo, R., Cruz, M., 2010. Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2. *Biomed. Pharmacother.* 64, 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.04.047>.

Ávila-Villareal, G., González-Trajano, M.F., Caballo-Villalobos, A.I., Aguilar-Guadarrama, B., García-Jiménez, S., Giles-Rivas, D.E., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S., 2016. Anxiolytic-like effects and toxicological studies of *Brickellia coccinifolia* (Cass.) A. Gray in experimental mice models. *J. Ethnopharmacol.* 192, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.006>.

Baker, D.G., 1998. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 251–266.

Balukrishnan, B.R., Krishnasamy, K., Choi, K.C., 2018. Moringa concanensis Nimmo ameliorates hyperglycemia in STZ-L1 adipocytes by upregulating PPAR- γ /C/EBP- α via Akt signaling pathway and STZ-induced diabetic mice. *Biomed. Pharmacother.* 103, 719–728. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.047>.

Blaak, E.F., Antoine, J.M., Benton, D., Björnk, I., Bogaerts, L., Brouns, F., Diamant, M., Dye, L., Hühner, T., Holst, J.J., Jampouf, D.J., Laville, M., Lawton, C.I., Meloni, A., Nilsson, A., Normand, S., Rivellese, A.A., Theis, S., Torkov, S.S., Vinoy, S., 2012. Impact of postprandial glycemia on health and prevention of disease. *Obes. Rev.* 13, 923–984. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01011.x>.

Bruning, J.B., Chalmers, M.J., Prasad, S., Busby, S.A., Kamenicka, T.M., He, Y., Nentjes, K.W., Griffin, P.R., 2007. Partial agonists activate PPAR γ using a β 12 independent mechanism. *Structure* 15, 1258–1271. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.07.014>.

Brunser, R., Xu, F., 2018. Functional regulation of PPARs through post-translational modifications. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms19061738>.

Brunton, L.L., 2011. Goodman and Gilman's: the Pharmacological Basis of Therapeutics, eleventh ed. McGraw-Hill.

Capelli, D., Cerchia, C., Montanari, R., Loiodice, F., Tortomila, P., Iaghezza, A., Cervoni, L., Pochemi, G., Lovecchia, A., 2016. Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode. *Sci. Rep.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep34792>.

Cerullo, A., 2005. Perspectives in diabetes: postprandial hyperglycemia and diabetes complication—is it time to treat? *Diabetes* 54, 1–7.

Chaudhury, A., Duvoor, C., Dandi, V.S., Kraliet, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekawat, N.S., Montalea, M.T., Kufakoe, K., Saqqa, A., Beebe, A., Patel, N., Masham, C.K., Lohani, G.P., Mirza, W., 2017. Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. *Front. Endocrinol.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00006>.

Chávez-Silva, F., García-Romero, I., Arias-Durán, I., Navarrete-Vázquez, G., Almanza-Pérez, J., Román-Ramos, R., Ramírez-Ávila, G., Perna-Amago, I., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S., 2018. Antidiabetic effect of *Achillea millefolium* through multi-target interactions: α -glucosidase inhibition, insulin sensitization and insulin secretagogue activities. *J. Ethnopharmacol.* 212, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.005>.

Colín-Lozano, B., Estrada-Soto, S., Chávez-Silva, F., Gutiérrez-Hernández, A., Cerón-Romero, I., Giacoman-Martínez, A., Almanza-Pérez, J.C., Hernández-Núñez, E., Wang, Z., Xie, X., Cappello, M., Boletri, F., Mura, U., Navarrete-Vázquez, G., 2018. Design, synthesis and *in vitro* antidiabetic bioevaluation of multitarget phenylpropanoic acids. *Molecules* 23 (2). <https://doi.org/10.3390/molecules23020340>.

Deforme, S., Chissano, J.L., 2005. Acarbose in the prevention of cardiovascular disease in subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.11.005>.

Fontana Pereira, D., Casanelli, L.H., Lavado, C., Mengatto, V., Figueiredo, M.S.R.B., Guedes, A., Pizzolani, M.G., Silva, F.R.M.R., 2011. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition* 27, 1161–1167. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.01.008>.

Geller, F., Schmidt, C., Götzert, M., Fossas, M., Scharat, V., Heitzmann, R., Wenz, O., Flores, E.M.M., Merfort, I., Laufer, S., 2010. Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia alliodora*. *J. Ethnopharmacol.* 128, 561–566. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.062>.

Goss, B., Pawlak, M., Lefebvre, P., Staels, B., 2017. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidemia and NAFLD. *Nat. Rev. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.135>.

Hidalgo-Riquena, S., Ramírez-Espinoza, J.J., Estrada-Soto, S., Almanza-Pérez, J.C., Román-Ramos, R., Alarcón-Aguilar, F.J., Hernández-Rosado, J.V., Moreno-Díaz, H., Díaz-Gutiérrez, D., Navarrete-Vázquez, G., 2013. Discovery of thiazolidine-2,4-dione/biphenylcarboxamide hybrid as dual PPAR α/γ modulator with antidiabetic effect: *in vitro*, *in silico* and *in vivo* approaches. *Chem. Biol. Drug Des.* 81, 474–483. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12002>.

Huang, Y.N., Zhao, D.D., Guo, B., Zhong, K., Zhu, R.X., Zhang, Y., Xie, W.J., Jia, L.R., Guo, H., 2012. Anti-hyperglycemic effect of chebulagic acid from the fruits of *Terminalia chebula* Retz. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 6320–6333. <https://doi.org/10.3390/ijms13056320>.

Jayanthi, G., Roshana Devi, V., Ilango, K., Subramanian, S.P., 2017. Rosmarinic acid mediates mitochondrial biogenesis in insulin resistant skeletal muscle through activation of AMPK. *J. Cell. Biochem.* 118, 1839–1848. <https://doi.org/10.1002/jcb.25869>.

Jayanthi, G., Subramanian, S., 2014. Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet - STZ induced experimental diabetes mellitus. *Biomed. Prev. Nutr.* 4, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.biopnut.2014.03.006>.

Kubínová, R., Polžková, R., Navrátilová, A., Fassa, O., Hančíková, Z., Račinská, A., Čížek, A., Valentová, M., 2014. Antimicrobial and enzyme inhibitory activities of the constituents of *Plectranthus madagascariensis* (Poir.). *Benth. J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 29, 749–752. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.848204>.

Matias, E.F.F., Alves, E.F., Silva, M.K. do N., de A Carvalho, V.R., Coutinho, H.D.M., da Costa, J.G.M., 2015. The genus *Cordia*: botanical, ethno, chemical and pharmacological aspects. *Brazilian J. Pharmacogn.* 25, 542–552. <https://doi.org/10.1036/j.bjp.2015.05.012>.

Moharran, F.A., Marzouk, M.S., El-Shenawy, S.M., Gasm, A.H., El Kady, W.M., 2012. Polyphenolic profile and biological activity of *Salvia splendens* leaves. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 1678–1687.

Monroy-Ortiz, C., Castillo-España, P., 2007. Plantas medicinales utilizadas en el Estado de Morelos. 2^a Edición. Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México 96, 273.

Ortiz-Andrade, R.R., García-Jiménez, S., Castillo-España, P., Ramírez-Ávila, G., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S., 2007. α -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent. *J. Ethnopharmacol.* 109, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.002>.

Ortiz-Andrade, R.R., Sánchez-Salgado, J.C., Navarrete-Vázquez, G., Webster, S.P., Biniá, E.

- M., García-Jiménez, S., León-Rivera, I., Cigarroa-Vázquez, P., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S., 2008. Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rat models and its implications on extra-pancreatic glucose regulation. *Diabetes Obes. Metab.* 10, 1097–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00869.x>.
- Ota, M.J., Kulkarni, Y.A., 2017. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Gordia* (Boraginaceae). *J. Pharm. Pharmacol.* 69, 755–789. <https://doi.org/10.1111/jphp.12715>.
- Petersen, M., Simmonds, M.S.J., 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121–125. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7).
- Ramírez, G., Zavala, M., Pérez, J., Zamilpa, A., 2012. In vitro screening of medicinal plants used in México as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/701261>.
- Runtuwene, J., Cheng, K.C., Asakawa, A., Amitani, H., Amitani, M., Morinaga, A., Takimoto, Y., Kairupua, B.H.R., Inai, A., 2016. Rosmarinic acid ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity in diabetic rats, potentially by modulating the expression of PEPCK and GLUT4. *Drug Des. Dev. Ther.* 10, 2193–2202. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S108539>.
- Ruiz-Vargas, J.A., Morales-Ferna, D.L., Ramírez-Ávila, G., Zamilpa, A., Negrete-León, E., Acvedo-Fernández, J.J., Peña-Rodríguez, L.M., 2019. α -Glucosidase inhibitory activity and in vivo antihyperglycemic effect of secondary metabolites from the leaf infusion of *Orbium campochinam* mill. *J. Ethnopharmacol.* 243. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112081>.
- Shen, W., Lu, Y.H., 2013. Molecular docking of citrus flavonoids with some targets related to diabetes. *Bangladesh J. Pharmacol.* 8, 156–170. <https://doi.org/10.3329/bjpp.v8i2.14240>.
- Tadimi, P., Gulçin, I., 2017. Antidiabetic potential: in vitro inhibition effects of some natural phenolic compounds on α -glucosidase and α -amylase enzymes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 31, 1–6. <https://doi.org/10.1002/jbt.21956>.
- Xu, H.F., Lambert, M.H., Moosana, V.G., Plummer, K.D., Moore, L.R., Collins, J.L., Oplinger, J.A., Kiewer, S.A., Gampe, R.T., McKee, D.D., Moore, J.T., Willson, T.M., 2001. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13919–13924. <https://doi.org/10.1073/pnas.241410198>.



Nombre del alumno: Diana Elizabeth Giles Rivas

Título de la tesis: "Obtención de los compuestos responsables de la actividad antidiabética a partir de *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi*"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Irene Perea Arango

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):


Firma

6 marzo 2020
Fecha



Nombre del alumno: Diana Elizabeth Giles Rivas

Título de la tesis: "Obtención de los compuestos responsables de la actividad antidiabética a partir de *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi*"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Firma


Fecha



Nombre del alumno: Diana Elizabeth Giles Rivas

Título de la tesis: "Obtención de los compuestos responsables de la actividad antidiabética a partir de *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi*"

Grado a obtener:

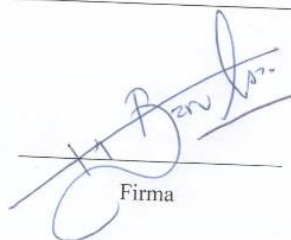
- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Germán Bernal Fernández

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Firma

Marzo 5 de 2008
Fecha



Nombre del alumno: Diana Elizabeth Giles Rivas

Título de la tesis: "Obtención de los compuestos responsables de la actividad antidiabética a partir de *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi*"

Grado a obtener:

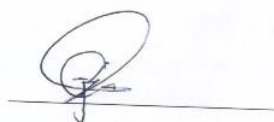
- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Julio César Rivera Leyva

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma

8/03/2020
Fecha



Nombre del alumno: Diana Elizabeth Giles Rivas

Título de la tesis: "Obtención de los compuestos responsables de la actividad antidiabética a partir de *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi*"

Grado a obtener:


- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma

2 de Marzo 2020
Fecha



Nombre del alumno: Diana Elizabeth Giles Rivas

Título de la tesis: “Obtención de los compuestos responsables de la actividad antidiabética a partir de *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi*”

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma

03 MARZO 2020

Fecha



Nombre del alumno: Diana Elizabeth Giles Rivas

Título de la tesis: "Obtención de los compuestos responsables de la actividad antidiabética a partir de *Cordia morelosana* y *Calea zacatechichi*"

Grado a obtener:


- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma

06/ Marzo/2020

Fecha