



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Coreopsis mutica*  
BIODIRIGIDO POR LA ACTIVIDAD SOBRE  $\alpha$ -  
GLUCOSIDASAS Y ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**L.F ITZEL BERENICE MORALES  
MONTESINOS**

**BAJO LA CO-DIRECCION DE:**

**DRA. ANGÉLICA BERENICE AGUILAR GUADARRAMA**

**DRA. LETICIA GONZÁLEZ MAYA**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**FECHA: MAYO 2020**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Consejo Interno de Posgrado



UAEM

Facultad  
de Farmacia  
Conocimiento al servicio de la salud

Cuernavaca, Morelos a 21 de febrero de 2020

Folio: FF/D/Sac/CIP/MF/016/2020

**L.F. ITZEL BERENICE MORALES MONTESINOS**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA**  
**P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis "Estudio fitoquímico de *Coreopsis mutica* biodirigido por la actividad sobre  $\alpha$ -glucosidasas y estudios de citotoxicidad"

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

**PRESIDENTE: Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez**

**SECRETARIO: Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza**

**VOCAL 1: Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez**

**VOCAL 2: Dra. Verónica Rodríguez López**

**VOCAL3: Dr. Ismael León Rivera**

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*  
*Una universidad de excelencia*

**DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA**  
**JEFATURA DE POSGRADO**

ccp: archivo Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez, Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza, Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez, Dra. Verónica Rodríguez López, Dr. Ismael León Rivera

mitv

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



El trabajo experimental desarrollado en el presente estudio fue realizado en los siguientes laboratorios.



**Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos y metabolitos aislados de *Coreopsis mutica* sobre  $\alpha$ -glucosidasas.**

Laboratorio 211 de Química de Productos Naturales del Centro de Investigaciones Químicas UAEM, en Cuernavaca, Morelos, México. Certificado bajo la NORMA ISO-9001-2008. Los equipos analíticos en esta investigación fueron adquiridos por proyectos financiados: “LANEM 251613” e “INFRAESTRUCTURA 244145” patrocinador CONACYT. Bajo la asesoría de la Dra. A. Berenice Aguilar Guadarrama.

**Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos y metabolitos de *Coreopsis mutica*.**

Laboratorio 7 de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Farmacia de la UAEM, bajo la asesoría de la Dra. Leticia González Maya.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**Prueba de tolerancia a sacarosa oral en ratas de los extractos de *Coreopsis mutica*.**

Unidad Especializada en Calidad de Alimentos y Productos Naturales (CAYPN) del Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología (CENITT). Bajo la asesoría de la Dra. María Gabriela Ávila Villarreal.



Agradezco el apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); (890096).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



### Agradecimientos

Han sido tantas las personas que ayudaron a que este proyecto fuera posible pero principalmente quiero agradecer a las Dra. A. Berenice Aguilar Guadarrama quien por más de 4 años me acepto en su laboratorio desde la licenciatura y confió en mis habilidades y me transmitió el amor a la ciencia. A la Dra. Leticia González Maya quien acepto unirse a este proyecto y quien me recibió en su laboratorio con mucho cariño y me apoyo de la mejor manera posible para concluir este proyecto.

Al centro de investigaciones químicas (CIQ) donde he recibido apoyo de todo tipo, a la Dra. María de los Ángeles Ramírez Cisneros, quien fue de gran apoyo para la realización de los ensayos de  $\alpha$ -glucosidasas.

A la Facultad de Farmacia donde me he formado desde hace 8 años y a todos los doctores que también fueron mis profesores durante esta etapa y que también colaboraron en este proyecto, a los integrantes de mi comité tutorial, la Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza, Dra. Berenice Aguilar Guadarrama, Dra. Leticia González Maya y el Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez quienes me ayudaron a crecer como estudiante y me dieron los mejores consejos y retrospectivas para este proyecto durante estos dos años.

A los integrantes de mi jurado la Dra. Sara García Jiménez, la Dra. Jessica Sánchez Carranza, Dra. Yolanda Ríos Gómez, Dra. Verónica Rodríguez López y al Dr. Ismael León Rivera quienes se tomaron el tiempo para revisar y realizar sugerencias a este escrito.

A la Dra. Ávila Villareal me abrió las puertas para realizar los experimentos *in vivo* y con quien desde hace ya 4 años he tenido la oportunidad de trabajar en varias ocasiones y también a la Q.F.B Guadalupe Yañez Ibarra quien fue un gran apoyo para el desarrollo de los experimentos con toda su ayuda y paciencia durante toda mi estancia, a Yusbi y Salvador quienes también me recibieron con mucho cariño, Candy, Pablo, Valeria, y todos los integrantes de CAYPN.

A mis compañeros del laboratorio 211, especialmente Mónica Díaz, quien fue mi acompañante y buena amiga durante todo este viaje de dos años, a mi amigo Ihtiel Benítez con quien he compartido muchos momentos desde hace ya 8 años, M.F Diana Giles, Fernanda, y a los alumnos del servicio social los cuales también colaboraron en la realización de este proyecto.

A todos mis compañeros del laboratorio 7 de la Facultad de Farmacia especialmente a María José y Diana Iris quienes fueron de gran apoyo cuando ingrese al laboratorio y me hicieron sentir bienvenida.

A mis padres quienes siempre me han apoyado y han confiado en mí y en mis capacidades.

A mi mejor amigo y confidente Satish Savaliya quien a pesar de estar muy lejos fue de gran apoyo durante todo este tiempo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



“उसे सही करने की कोशिश मत करो जो भी तुम्हारी जिंदगी में आए, अपने आप को इस तरह ढालो की चाहे तुम्हारी जिंदगी में कुछ भी हो तुम ठीक रहो”

सद्गुरु

*“Don't try to fix whatever comes in your life. Fix yourself in such a way that whatever comes, you will be fine”*

*Sadhguru.*

*“No intentes arreglar lo que llega a tu vida. Arréglate a ti mismo de tal manera, que lo que llegue, estará bien”*

*Sadhguru*



## 1. Tabla de contenido

ABREVIATURAS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE GRÁFICAS .....	XIV
<b>1 ABSTRACT.....</b>	<b>16</b>
<b>2. RESUMEN .....</b>	<b>17</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>4. ANTECEDENTES .....</b>	<b>20</b>
4.1 Género <i>Coreopsis</i> .....	20
4.2 <i>Coreopsis mutica</i> .....	21
4.3 Distribución .....	21
4.4 Usos medicinales .....	22
4.5 Mecanismo de digestión de carbohidratos.....	22
4.6 Absorción de carbohidratos .....	25
4.7 Biosíntesis y liberación de insulina en células beta-pancreáticas .....	27
4.8 Señalización de la insulina.....	28
4.9 Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina .....	30
4.10 Diabetes Mellitus.....	32
4.11 Mecanismo de acción de fármacos convencionales usados en el tratamiento de diabetes	33
4.12 $\alpha$ -glucosidasas .....	34
4.13 Maltasa glucoamilasa .....	35
4.14 Sacarasa isomaltasa.....	37
4.15 $\alpha$ -amilasa.....	38
4.16 Inhibidores de $\alpha$ glucosidasas .....	40
4.17 Mecanismo de acción de inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas.....	41
4.18 Metabolitos identificados en <i>Coreopsis mutica</i> .....	43
4.19 Metabolitos inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas .....	44
4.20 Metabolitos identificados en otras especies de <i>Coreopsis</i> .....	46
4.21 Seguridad del uso de plantas medicinales .....	48
4.22 Efecto sinérgico de las plantas medicinales .....	49



<b>5.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>52</b>
<b>9.</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>53</b>
9.1	Obtención de los extractos orgánicos de <i>C. mutica</i> .....	53
9.2	Metodología general .....	53
9.3	Ensayo de inhibición sobre $\alpha$ -glucosidasas .....	54
9.4	Citotoxicidad .....	55
9.5	Curvas de tolerancia a sacarosa .....	56
9.6	Análisis estadístico.....	58
<b>10.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
10.1	Bipartición del extracto hidroalcohólico .....	60
10.2	Cromatografía de la fracción butanólica obtenida de la bipartición del extracto hidroalcohólico de <i>C. mutica</i> .....	60
10.3	Cromatografía de la fracción 60-72 obtenida de la cromatografía de la fracción butanólica .....	62
10.4	Cromatografía de la fracción diclorometánica obtenida de la bipartición del extracto hidroalcohólico de <i>Coreopsis mutica</i> .....	64
10.5	Purificación de la fracción 18-35 obtenida de la cromatografía del extracto butanólico. 65	
10.6	Extracción en Fase Solida .....	66
10.7	Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>Coreopsis mutica</i> .....	67
10.8	Recromatografía de la fracción 97 de la cromatografía del extracto metanólico.....	69
10.9	Recromatografía de la fracción 3-16 obtenida de la recromatografía de la fracción 97 del extracto metanólico. ....	70
10.10	Fraccionamiento del extracto acetónico.....	71
10.11	Recromatografía de la fracción 51-73 obtenida de la cromatografía del extracto acetónico de <i>C. mutica</i> .....	73
10.12	Recromatografía de la fracción 36-73 de la recromatografía de la fracción 51-73 del extracto acetónico de <i>C. mutica</i> . ....	74
10.13	Fraccionamiento del extracto hexánico de <i>Coreopsis mutica</i> .....	75





10.14	Ensayo de inhibición de enzimas $\alpha$ -glucosidasas de los extractos obtenidos de <i>C. mutica</i>	76
<b>11.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>77</b>
11.1	Caracterización espectroscópica por $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido de luteolina	77
11.2	Caracterización espectroscópica por $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de ácido cafeico	86
11.3	Caracterización espectroscópica por RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de cafeato de bornilo	90
11.4	Caracterización espectroscópica por $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de cumarato de bornilo	95
11.5	Caracterización espectroscópica por $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de ferulato de bornilo	98
11.6	Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas de los compuestos aislados de <i>C. mutica</i>	100
11.7	Ensayo de citotoxicidad	103
11.8	Viabilidad celular	105
11.8.1	IHH	105
11.8.2	HEK 293	110
11.8.3	HDF (Origen fibroblastos dérmicos humanos)	114
11.9	Curvas de tolerancia a sacarosa	116
11.10	Determinación de $\text{IC}_{50}$ de los compuestos sobre $\alpha$ -glucosidasas	120
11.11	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)	121
<b>12.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>132</b>
12.1	Conclusiones parciales	132
<b>13.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>133</b>
<b>14.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>134</b>
<b>15.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>150</b>



### ABREVIATURAS

**<sup>13</sup>C**-Carbono 13

**<sup>1</sup>H**-Proton

**ABC**- Área bajo la curva

**Akt**- Proteína cinasa B, PKB

**AMPK**- Proteína quinasa activada

**AngII**- Angiotensina II

**ANOVA**-Análisis de la varianza

**Aps**-Ácido aspártico

**Arg**- Arginina

**BALB/c**- Bagg Albino

**CAP**-Proteína activadora por catabolitos

**Cb1**- Receptor cannabinoide tipo 1.

**CC**- Cromatografía en columna

**CC<sub>50</sub>**-Concentracion citotóxica media.

**CCF**- Cromatografía en capa fina

**CDCl<sub>3</sub>**-Cloroformo deuterado

**CG-EM**- Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

**CtMGAM**- Dominio carboxilo terminal de maltasa glucoamilasa

**CtSI**- Dominio carboxilo terminal de sacarasa isomaltasa

**CTSO**-Curva de tolerancia a sacarosa oral

**d**- señal doble

**dd**-señal doble de doble

**ddd**- señal doble de doble de doble

**EE**- Error estándar

**EFS**- Extracción en fase solida

**ELISA**- Enzimo inmunoanálisis de adsorción

**Fx**- Fracción

**Gab-1**- Proteína de unión asociada a GRB2

**GC**- Cromatografía de gases

**GH31**- glucósido hidrolasa 31

**GLUT13**- Transportador de glucosa 13

**GLUT2**-Transportador de glucosa 2

**GLUT5**- Transportador de glucosa 5

**GOD-POD**- Glucosa oxidasa y peroxidasa

**Grb**- Proteína de unión al receptor de insulina.

**GRB2**- Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento.

**HDF**- fibroblastos dérmicos humanos

**HEK293**- células embrionarias de riñón humano.

**HPLC**- Cromatografía líquida de alta presión

**Hz**- Hertz

**IC<sub>50</sub>**-Concentracion inhibitoria media máxima.

**INS**- Gen de insulina

**IRS1**- Sustrato 1 del receptor de insulina

**IRS4**- Sustrato 4 del receptor de insulina



**J-** Constante de acoplamiento

**JNK-** Quinasas c-Jun N-terminal

**Log-** logaritmo

**m-** señal múltiple

**MafA-** Homólogo celular de la proteína oncogénica V-MAF.

**MGAM-**Maltasa glucoamilasa

**MHz-** Mega Hertz

**mTOR-** Diana de rapamicina en células de mamífero

**MTT-** Bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio.

**NeuroD1-**Diferenciación neurogénica 1

**NIST-** National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Estándares y) Tecnología

**NtMGAM-** Dominio amino terminal de maltasa glucoamilasa

**NtSI-** Dominio amino terminal de sacarasa isomaltasa

**PC1/3-** Enzima de procesamiento de insulina

**PC2-** Enzima prohormona convertasa 2

**PDX1-** Promotor de insulina 1

**PI3K-** Fosfatidilinositol 3-cinasa

**PKC-**Proteína quinasa C

**PTEN-** Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.

**RMN-** Resonancia magnética nuclear

**RPMI-** Medio Roswell Park Memorial Institute

**s-** señal simple

**SD-** Desviación estándar

**SEM-** Error estándar de la media

**Ser-** Serina

**SFA-** Ácidos grasos saturados

**SGLT1-**Tansportadores sodio-glucosa

**SI-** Sacarosa isomaltasa

**SIRP-** Proteína reguladora de señal

**Thr-**Treonina

**TL-** Tubo de carga

**TMD-** Dominio transmembranal

**TMS-** Tetrametilsilano

**TPA-**12-*O*-tetradecanocilforbol-13-acetato

**Tyr-** Tirosina

**TZD-**Tiazolidindionas

**UDG-** Universidad de Guadalajara



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Coreopsis mutica</i> Jardín botánico de San Francisco (Stan Shebs, 2009)	21
Figura 2. Distribución de variedades de <i>Coreopsis mutica</i> . var <i>microcephala</i> (■), var <i>multiligata</i> (Z), var <i>carosifolia</i> (○), var <i>subvillosa</i> (l), var <i>subvillosa-carosifolia</i> (m), <i>holotricha</i> (X), <i>mutica</i> (p), var <i>leptomera</i> (V). (Crawford, 1981)	22
Figura 3. Digestión de carbohidratos (Holmes, 1971)	24
Figura 4 Mecanismo de absorción intestinal de glucosa (Sanders, 2015)	26
Figura 5 Biosíntesis de insulina en la célula $\beta$ pancreática. (Demirbilek et al., 2017)	27
<b>Figura 6</b> Vía de señalización de la insulina (De Meys, 2000)	29
<b>Figura 7</b> Resistencia a la insulina y disfunción de células $\beta$ . (Riddy et al., 2018)	31
Figura 8. 10 principales causas de muerte en 2016 y porcentaje de cambio; 2005-2016, todas las edades. Estimaciones de Salud Global 2016; Muertes por causa, edad, sexo, por país y por región, 2000-2016. Ginebra, OMS.	33
Figura 9 Sitio de acción de fármacos orales usados en el tratamiento de diabetes (Govil & Singh, 2018)	34
Figura 10 Representación esquemática de la hidrólisis de oligosacáridos a azúcares simples por $\alpha$ -glucosidasas. (Hooton et al., 2015)	35
<b>Figura 11</b> Representación esquemática lineal de los dominios estructurales NtMGAM y CtMGAM (Sim et al., 2008a).	36
Figura 12 Representación esquemática lineal de la organización de dominios de SI y su actividad hidrolítica (Jones et al., 2011).	38
Figura 13 Digestión de almidón por $\alpha$ amilasa y $\alpha$ glucosidasas (Ren et al., 2011).	39
Figura 14 Esquema que muestra a) Las etapas finales de la hidrólisis del almidón catalizadas por MGAM; b) Acarbosa se une a $\alpha$ -glucosidasa (MGAM), inhibiendo competitivamente la enzima (Rosak & Mertes, 2012).	41
Figura 15 Sitio activo de $\alpha$ -glucosidasa (Jhong et al., 2015).	42
Figura 16 Acoplamiento molecular de acarbosa (verde) con el sitio activo de $\alpha$ -glucosidasa; b) interacciones hidrofóbicas entre acarbosa y $\alpha$ -glucosidasa (azul) (Jhong et al., 2015).	43
Figura 17 Esquema de la metodología general.	58
Figura 18 Espectro de los acoplamientos meta y orto de 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina.	78
Figura 19 Espectro del acoplamiento orto en el anillo A de 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina.	79
Figura 20 Espectro del acoplamiento del protón anomérico 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina.	80
Figura 21 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido de Luteolina (1)	81
Figura 22 Estructura del flavonoide luteolina glucosilado en diferentes posiciones. A) Luteolina B) Glucósido	84
Figura 23 Ácido cafeico (2)	86
Figura 24 Espectro de los acoplamientos vinílico y orto de ácido cafeico.	88
Figura 25 Espectro de los acoplamientos vinílico y orto de cafeato de bornilo.	91
Figura 26 Acoplamiento de los protones en el anillo biciclo de cafeato de bornilo	91
Figura 27 Acoplamiento de los protones en el anillo biciclo.	92
Figura 28 Cafeato de bornilo (4)	93
Figura 29 Cumarato de bornilo (3)	97
Figura 30 Ferulato de Bornilo (5)	99



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Metabolitos identificados en <i>Coreopsis mutica</i> _____	43
Tabla 2 Metabolitos inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas _____	45
Tabla 3 Metabolitos con propiedades antidiabéticas identificadas dentro del género <i>Coreopsis</i> _____	46
Tabla 4 Total de fracciones analizadas por RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ _____	59
Tabla 5 Cromatografía de la fracción butanólica obtenida de la bipartición del extracto hidroalcohólico de <i>C. mutica</i> . _____	61
Tabla 6 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 60-72 obtenida de la cromatografía de la fracción butanólica de <i>C. mutica</i> _____	62
Tabla 7 Cromatografía de la fracción diclorometánica de la bipartición del extracto hidroalcohólico de <i>C. mutica</i> _____	64
Tabla 8 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 16-35 obtenida de la cromatografía de la fracción butanólica de <i>C. mutica</i> _____	65
Tabla 9 Sistemas utilizados en la extracción en fase sólida de la fracción 148-157 obtenida de la cromatografía del extracto diclorometánico de <i>C. mutica</i> _____	67
Tabla 10 Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de <i>C. mutica</i> . _____	67
Tabla 11 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 97 de la cromatografía del extracto metanólico de <i>C. mutica</i> _____	69
Tabla 12 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 3-16 obtenida de la recromatografía de la fracción 97 del extracto metanólico de <i>C. mutica</i> _____	70
Tabla 13 Fraccionamiento cromatográfico del extracto acetónico de <i>C. mutica</i> _____	71
Tabla 14 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 51-73 de la cromatografía del extracto acetónico de <i>C. mutica</i> _____	73
Tabla 15 Proceso cromatográfico de la fracción 36-73 obtenida de la recromatografía de la fracción 51-73 del extracto acetónico de <i>C. mutica</i> _____	75
Tabla 16 Comparación de los desplazamientos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido de luteolina. (B. Wang & Hu, 2013). _____	81
Tabla 17 Datos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de los compuestos I-V _____	84
Tabla 18 Comparación de los desplazamientos en RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de Ácido cafeico (2) Acetona 400 MHz (Jeong et al., 2011) _____	86
Tabla 19 Comparación de los desplazamientos en RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de Cafeato de bornilo (4) Acetona 400 MHz (Maldonado, Apan, & Pérez-Castorena, 1998) _____	93
Tabla 20 Comparación de los desplazamientos en RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de Cumarato de bornilo (3), $\text{CDCl}_3$ 200 MHz (Maldonado, Apan, & Pérez-Castorena, 1998). _____	97
Tabla 21 Comparación de los desplazamientos en RMN $^1\text{H}$ de ferulato de bornilo (5), $\text{CDCl}_3$ 200 MHz (Maldonado, Apan, & Pérez-Castorena, 1998). _____	99
Tabla 22 Actividad citotóxica de los extractos de <i>C. mutica</i> contra las líneas celulares IHH, HEK293 y HDF. ** _____	104
Tabla 23 Actividad citotóxica de los compuestos aislados de <i>C. mutica</i> contra las líneas celulares IHH, HEK293 y HDF** _____	104
Tabla 24 Metabolitos identificados por CG-EM de la fracción C-3FX5 _____	122



### LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1** Actividad inhibitoria de los extractos hidroalcohólico, hexánico, acetónico y metanólico de *C. mutica* sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas. [1000  $\mu\text{g/mL}$ ] cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE;  $n=8$  vs vehículo. Acarbosa y extracto acuoso de *Camellia sinensis* fueron usados como control positivo. Con un valor de  $***P < 0.0001$  determinado por un análisis estadístico de la prueba ANOVA, seguida de una prueba Dunnet. \_\_\_\_\_ 77
- Gráfica 2** Actividad inhibitoria de los metabolitos aislados de *C. mutica* sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas. [1000  $\mu\text{M}$ ] cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE;  $n=8$  vs vehículo. Acarbosa y quercetina son usados como control positivo. Con un valor de  $***P < 0.0001$   $**P < 0.001$  determinado por un análisis estadístico de la prueba ANOVA, seguida de una prueba Dunnet. \_ 101
- Gráfica 3** Actividad inhibitoria del extracto hidroalcohólico [1000  $\mu\text{g/mL}$ ] de *C. mutica* y luteolina-7-O- $\beta$ -glucopiranosido [1000  $\mu\text{M}$ ] sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas. Acarbosa y quercetina son usados como control positivo. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE;  $n=6$  vs vehículo. Con un valor de  $***P < 0.0001$  determinado por un análisis estadístico de la prueba ANOVA, seguida de una prueba Dunnet. \_\_\_\_\_ 102
- Gráfica 4** Actividad inhibitoria del extracto acetónico [1000  $\mu\text{g/mL}$ ] de *C. mutica*, Cumarato de bornilo y Cafeato de bornilo [1000  $\mu\text{M}$ ] sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas. Acarbosa y quercetina son usados como control positivo. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE;  $n=6$  vs vehículo. Con un valor de  $** P < 0.001$   $***P < 0.0001$  determinado por un análisis estadístico de la prueba ANOVA, seguida de una prueba Dunnet \_\_\_\_\_ 103
- Gráfica 5** Inhibición del crecimiento celular en la línea IHH tras 48 h de tratamiento con extractos de *C. mutica* por ensayo de MTT. [0.125, 1.25, 12.5, 125, 250  $\mu\text{g/mL}$ ]. Taxol fue usado como control positivo [0.25  $\mu\text{M}$ ]. DMSO fue usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD. \_\_\_\_\_ 106
- Gráfica 6** Inhibición del crecimiento celular en la línea IHH tras 48 h de tratamiento con los compuestos contenidos en los extractos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol fue usado como control positivo [0.25  $\mu\text{M}$ ]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD. \_\_\_\_\_ 107
- Gráfica 7** Inhibición del crecimiento celular en la línea IHH tras 48 h de tratamiento de los extractos y su metabolito mayoritario de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol fue usado como control positivo [0.25  $\mu\text{M}$ ]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD. \_\_\_\_\_ 108
- Gráfica 8** Inhibición del crecimiento celular en la línea IHH tras 48 h de tratamiento con los compuestos contenidos en el extracto acetónico de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol es usado como control positivo [0.25  $\mu\text{M}$ ]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD. \_\_\_\_\_ 109
- Gráfica 9.** Inhibición del crecimiento celular en la línea HEK293 tras 48 h de tratamiento de los extractos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol es usado como control positivo [0.25  $\mu\text{M}$ ]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD. \_\_\_\_\_ 111
- Gráfica 10.** Inhibición del crecimiento celular en la línea HEK293 tras 48 h de tratamiento de los metabolitos aislados de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol es usado como control positivo [0.25  $\mu\text{M}$ ]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD. \_\_\_\_\_ 112



Gráfica 11 Inhibición del crecimiento celular en la línea HEK293 tras 48 h de tratamiento de los extractos y metabolitos obtenidos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol es usado como control positivo [0.25  $\mu$ M]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD. 112

Gráfica 12. Inhibición del crecimiento celular en la línea HEK293 tras 48 h de tratamiento de los extractos y metabolitos obtenidos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol es usado como control positivo [0.25  $\mu$ M]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD. 113

Gráfica 13 Inhibición del crecimiento celular en la línea HEK293 tras 48 h de tratamiento de los extractos y metabolitos obtenidos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol fue usado como control positivo [0.25  $\mu$ M]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD. 114

Gráfica 14 Inhibición del crecimiento celular en la línea HDF tras 48 h de tratamiento de los extractos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol usado como control positivo [0.25  $\mu$ M]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD. 115

Gráfica 15 Inhibición del crecimiento celular en la línea HDF tras 48 h de tratamiento de los metabolitos aislados de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol fue usado como control positivo [0.25  $\mu$ M]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD. 116

**Gráfica 16** Curva de tolerancia a sacarosa oral (CTSO); área bajo la curva (ABC). Evaluación del extracto hidroalcohólico [100 mg/kg] de *C. mutica*. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6. \*\*\*p<0.001 vs vehículo. 117

Gráfica 17 Curva de tolerancia a sacarosa oral (CTSO); área bajo la curva (ABC). Evaluación del extracto metanólico [100 mg/kg] de *C. mutica*. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6. \*\*\*p<0.001 vs vehículo. 118

Gráfica 18 Curva de tolerancia a sacarosa; área bajo la curva (ABC). Evaluación del extracto acetónico [100 mg/kg] de *C. mutica*. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6. \*\*\*p<0.001 vs vehículo. 119

Gráfica 19 Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas y estimación de IC<sub>50</sub> de los compuestos más activos de *C. mutica*. 121



## 1 ABSTRACT

Type 2 is the most common diabetes in the population. In this type of diabetes, the inhibition of  $\alpha$ -glucosidases is a useful treatment to delay the absorption of glucose after meals. The aim of this research was to analyze on *in vitro* assays the anti-diabetic effects and cytotoxicity from extracts and isolated metabolites obtained from the aerial parts of *Coreopsis mutica*. The aerial parts were extracted with *n*-hexane, acetone, methanol and hydroalcoholic mixture (85:15). In the hydroalcoholic extract luteolin-7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside and caffeic acid, were identified as major compounds; while bornyl coumarate and  $\beta$ -sitosterol glucoside were isolated in the methanol extract; to other side bornyl caffeate and bornyl coumarate were obtained in the acetone extract; and finally bornyl ferulate was identified in hexane extract. The extracts had a significant effect on the inhibition of  $\alpha$ -glucosidases greater than 60%, while from the compounds just luteolin-7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside and bornyl caffeate shows the highest inhibition percent in this assay. On the other hand, the cytotoxicity in three non-cancer cell lines, HEK293, IHH and HDF was determined using the MTT assay where polar extracts (hydroalcoholic and methanolic) and their metabolites exhibited the least toxic effects; Nevertheless; extracts of lower polarity (acetone and hexane) and their metabolites shown to have a significant cytotoxic effect against all cell lines tested in this research. The  $IC_{50}$  from luteolin-7-*O*- $\beta$ -glucopyranoside and the bornyl caffeate was determined and compared with the  $CC_{50}$ .

From data obtained in this research we conclude that *Coreopsis mutica* has an important anti-hyperglycemic effect. However, additional studies with different models are suggested to confirm the toxicity.





## 2. RESUMEN

La diabetes tipo 2 es la más común en poblaciones que padecen esta enfermedad. En este tipo de diabetes, la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas es un tratamiento útil para retrasar la absorción de glucosa después de la ingesta de alimentos. El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos antidiabéticos y la citotoxicidad de los extractos y metabolitos identificados en las partes aéreas de *Coreopsis mutica* en modelos *in vitro*. Para ello sus partes aéreas se extrajeron con *n*-hexano, acetona, metanol y finalmente con una mezcla hidroalcohólica al 85%. En el extracto hidroalcohólico se identificó 7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina y ácido cafeico, mientras que en el extracto metanólico fueron obtenidos cumarato de bornilo y glucósido de  $\beta$ -sitosterol; en el extracto acetónico cafeato de bornilo y cumarato de bornilo y finalmente en el extracto hexánico ferulato de bornilo. Los extractos evaluados a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  tuvieron un efecto significativo sobre la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas (mayor de 60%), mientras que los compuestos evaluados a 1000  $\mu\text{M}$ , 7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina y el cafeato de bornilo fueron los que presentaron mayor porcentaje de inhibición. Por otro lado, se determinó la citotoxicidad en tres líneas celulares no cancerígenas; HEK293, IHH y HDF utilizando la técnica de MTT, en donde los extractos y metabolitos fueron evaluados a diferentes concentraciones, siendo los extractos de mayor polaridad (hidroalcohólico y metanólico) y sus metabolitos los que exhibieron menores efectos tóxicos; sin embargo; los extractos de menor polaridad (acetónico y hexánico) y sus metabolitos mostraron tener un efecto citotóxico significativo frente a todas las líneas celulares. Se determinó la  $\text{IC}_{50}$  de 7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina y del cafeato de bornilo y se comparó con la  $\text{CC}_{50}$ .



De los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación concluimos que *C. mutica* tiene un efecto anti-hiperglucemiante importante. Sin embargo; se sugieren estudios adicionales para confirmar la toxicidad.

### 3. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad de alta incidencia que afecta a la población de México y el mundo. Investigaciones etnobotánicas realizadas en México, reportan que la población utiliza de manera empírica entre 150 y 269 especies de plantas para el control de la diabetes mellitus (Alarcón et al., 1993). De estas, sólo pocos de los agentes responsables han sido aislados, sin embargo, en la mayoría de ellas también se pueden encontrar metabolitos que podrían ser tóxicos para la salud. Es por ello por lo que es necesario hacer un estudio exhaustivo de las plantas que se utilizan en la medicina popular para estos padecimientos. Las plantas utilizadas en la medicina tradicional como antidiabéticos proveen metabolitos con propiedades hipoglucemiantes, sin embargo, faltan estudios sobre la eficacia, seguridad y el mecanismo de acción de estos metabolitos.

Por otra parte, los tratamientos farmacológicos que se utilizan son variados y tienen como finalidad reducir los niveles de glucosa en sangre e incluir el control de las condiciones relacionadas con la enfermedad. Algunos de los fármacos de primera elección para el tratamiento de la diabetes tipo 2 son la metformina, glibenclamida, derivados de la meglitinida, tiazolidindionas e inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, estos últimos se usan en coadministración con otro fármaco antidiabético. Pese a que el uso de los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas ha sido controversial, pues se sabe que estos inhibidores no actúan de manera eficiente en monoterapia, y a diferencia de otros fármacos que causan hipoglucemia, este



riesgo se ve disminuido al usar inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas debido a que son inhibidores competitivos reversibles que retrasan la absorción de carbohidratos, lo que provoca una disminución en la glucosa postprandial. Sin embargo, en el uso de estos inhibidores han sido reportados efectos adversos que incluyen problemas gastrointestinales como; diarrea, flatulencias y en casos raros sangrado abdominal. Es por ello que, se buscan nuevas alternativas para descubrir compuestos que tengan las mismas propiedades como inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas. Muchos de los compuestos que han sido reportados por sus propiedades antidiabéticas son de origen natural, entre ellos sobresalen los flavonoides, de los cuales se conocen metabolitos específicos que son potentes inhibidores de estas enzimas y que se encuentran como componentes mayoritarios en las plantas del género *Coreopsis*. Las plantas de este género son utilizadas principalmente en la medicina tradicional China como antidiabéticas y existen varios reportes de su contenido metabólico. A pesar de que estas plantas han sido ampliamente estudiadas en China, son endémicas de América. En México se cuenta con pocos reportes sobre seguridad en su uso en la medicina tradicional y aunque no les han sido reportados efectos tóxicos, es muy importante evaluar su toxicidad.



#### 4. ANTECEDENTES

En la medicina tradicional China, especies pertenecientes al género *Coreopsis* han sido utilizadas a manera de infusión como anti-hiperglucémicas, sin embargo, también existen antecedentes de que son potentes antioxidantes y antibacterianos. En diferentes estudios fitoquímicos se han encontrado principalmente, metabolitos de tipo flavonoide, fenilpropanoide y poliacetilenos los cuales parecen ser los compuestos bioactivos, como por ejemplo en *Coreopsis tinctoria* (Lam et al., 2016). Entre los compuestos identificados se encuentra el ácido clorogénico, luteolina y quercetina que son reconocidos por sus propiedades anti-hiperglucemiantes. Por su parte epigenina y kaempferol también han sido encontrados en sus extractos metanólicos y poseen actividades hipoglucemiantes (Lan, Lin, y Zheng, 2014).

En otras especies de *Coreopsis* han sido encontrados compuestos, (como  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\beta$ -cariofileno, canfeno y acetato de bornilo), estos se han encontrado en los aceites esenciales de *C. barteri* y *C. grandiflora* (Menut et al., 1996), mientras que en los extractos acetónicos de *C. lanceolata*, han sido identificados en su mayoría compuestos fenólicos (Menut et al., 1996).

El estudio de las especies del género *Coreopsis* se ha enfocado en sus propiedades antidiabéticas, principalmente la especie *tinctoria*, en la que se han encontrado los metabolitos responsables de dicha actividad e incluso se ha analizado su mecanismo de acción por medio de la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas (Cai et al., 2016).

##### 4.1 Género *Coreopsis*

*Coreopsis* es un género de plantas perteneciente a la familia de las Asteráceas. Comprende 408 especies descritas y sólo 97 aceptadas. Sus flores son amarillas radiales y en menor



proporción bicolor, siendo su uso ornamental o como alimento de insectos. En general estas plantas son de 46-120 cm de alto, tienen flores radiales vistosas con brácteas involucradas en dos series distintas de 8 cada una. (D. J. Crawford y Mort, 2005).

#### 4.2 *Coreopsis mutica*

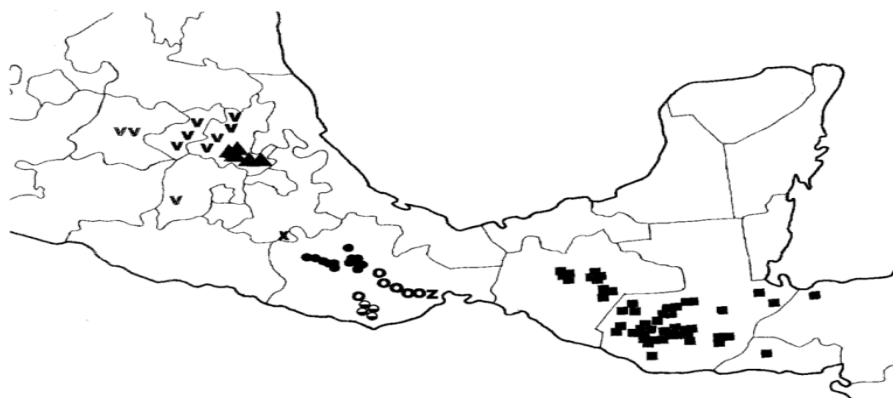


**Figura 1.** *Coreopsis mutica* Jardín botánico de San Francisco (Stan Shebs, 2009)

*Coreopsis mutica* es un arbusto de 1-2 m de alto, con flores amarillas vistosas. Crece de manera silvestre y se extiende desde el centro de México hasta el Salvador y Honduras, donde se le conoce con los nombres comunes de Nopala y manzanilla silvestre (Crawford, 1981) (**Figura 1**). Es una de las especies más complejas y variables en México, en estudios herbarios se han reconocidos siete variedades *var. leptomera*, *var. holotricha*, *var. subvillosa*, *var. microcephala*, *var. multilugata*, *var. carnosifolia* y *var. mutica* (Crawford, 1970).

#### 4.3 Distribución

La mayoría de las especies de *Coreopsis* son nativas del Norte, Centro y Sudamérica (Coombs, 2015), se extienden principalmente desde México central hacia el sureste, El Salvador y Honduras (**Figura 2**), sin embargo, algunas especies como *lanceolata* y *tinctoria* se pueden encontrar ampliamente distribuidas en China, principalmente en las regiones montañosas donde han sido adaptadas para su reproducción (J. Wang et al., 2016).



**Figura 2.** Distribución de variedades de *Coreopsis mutica*. var *microcephala*(■), var *multiligata* (Z), var *carnosifolia* (○), var *subvillosa* (l), var *subvillosa-carnosifolia*(m), *holotricha* (X), *mutica* (p), var *leptomera* (V). (Crawford, 1981)

#### 4.4 Usos medicinales

En la medicina tradicional China el uso de *Coreopsis* es como antioxidante y antihiperglucemiante, su uso es en forma de té a partir de las flores para prevenir enfermedades cardiovasculares y como antidiabético (Zhang et al., 2013); de igual manera, han sido reconocidas sus propiedades antiinflamatorias y antibacterianas (Gaspar et al., 2012).

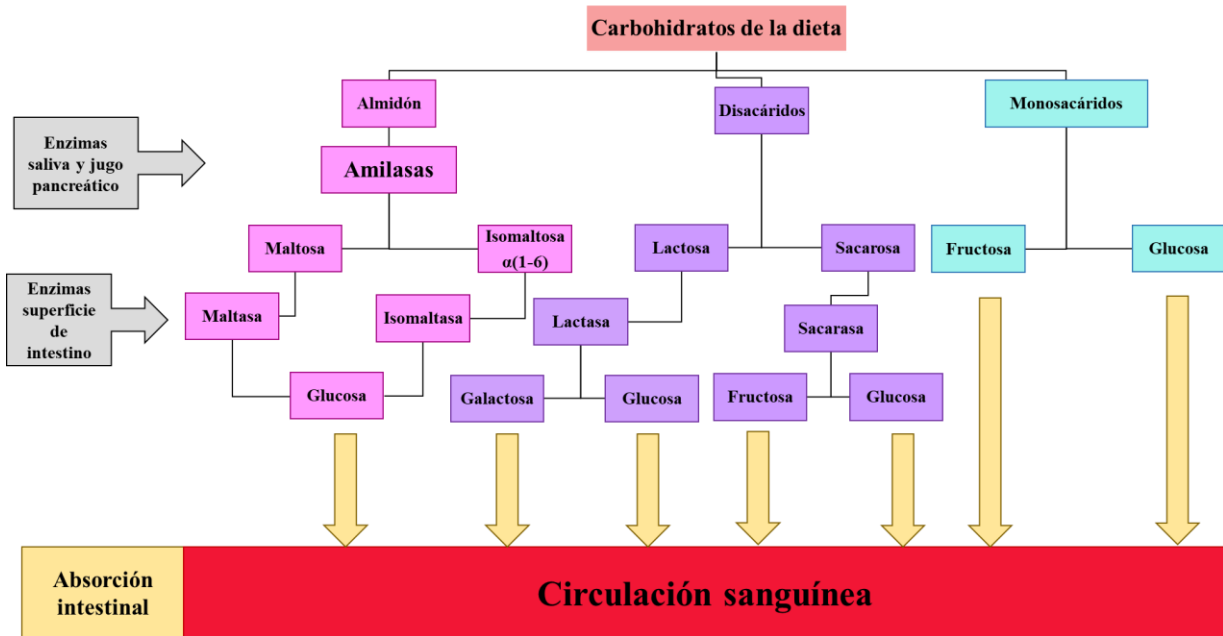
El estudio del género *Coreopsis* se ha enfocado a sus usos en la medicina tradicional, es decir, en sus propiedades antidiabéticas pues la gran mayoría de las especies dentro de este género son utilizadas para tratar la hiperglucemia (Cai et al., 2016).

#### 4.5 Mecanismo de digestión de carbohidratos

La glucosa es una fuente vital de energía para las células eucariotas y procariontas. Todas las células humanas utilizan glucosa para la producción de energía, el cerebro utiliza el 80% de la glucosa consumida en condiciones basales. Los carbohidratos que son consumidos en la dieta son digeridos y absorbidos como carbohidratos más simples. Durante la digestión los carbohidratos complejos son hidrolizados a monosacáridos para que estos puedan ser absorbidos en el torrente sanguíneo, este proceso de digestión ocurre en la boca y en el intestino (Grand y Levine, 2013)(Van Beers et al., 1995).



Los carbohidratos son hidrofílicos y requieren de una serie de reacciones para ser digeridos a monosacáridos. Estos últimos son absorbidos por el intestino delgado. Los carbohidratos se dividen en tres grupos principales, carbohidratos simples (monosacáridos), disacáridos y carbohidratos complejos (almidón, glicógeno y fibra). Los monosacáridos comunes incluyen glucosa, fructosa, galactosa, xilosa y ribosa. Los disacáridos son el producto de la condensación de dos monosacáridos y requieren hidrolisis para su separación al tiempo de la absorción. Algunos ejemplos incluyen lactosa (glucosa y galactosa), sacarosa (glucosa y fructosa) y maltosa (glucosa y glucosa). Los carbohidratos complejos incluyen almidón (amilosa y amilopectina), fibra, glicógeno (cadenas ramificadas de glucosa) y glucolípidos. El objetivo de la digestión de carbohidratos es romper todos los disacáridos y carbohidratos complejos a monosacáridos para su absorción (**Figura 3**). La digestión comienza en la boca con la amilasa salival liberada durante el proceso de masticado. La amilasa es sintetizada en las células serosas de las glándulas salivales, la amilasa hidroliza el almidón a maltasa y polisacáridos y es sensible al pH, y por tanto es inhibida en el ambiente ácido del estómago. Sólo el 5% del almidón es hidrolizado por la amilasa debido a su limitada exposición (Barrett, 2014).



**Figura 3.** Digestión de carbohidratos (Holmes, 1971)

La amilasa pancreática es liberada de las células acinares hacia el intestino delgado en conjunto con otras enzimas bajo los estímulos de la secretina y la colecistoquinina. La amilasa sólo puede hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,4 de los carbohidratos complejos y es incapaz de hidrolizar enlaces terminales o  $\alpha$ -1,6. El almidón es digerido en el intestino delgado en componentes simples derivados de amilopectina (maltosa, maltotriosa y  $\alpha$ -dextrinas).

Las enzimas del borde intestinal son sintetizadas en el retículo endoplasmático y glicosilados en el aparato de Golgi en el enterocito. Estas enzimas son dirigidas a la membrana apical donde son ancladas en la superficie por un segmento transmembranaral. Las enzimas ancladas son activadas después de una incisión en el residuo en el extremo *N*-terminal extracelular.

Los disacáridos están protegidos de la proteólisis por glucosilación y son encontrados en grandes concentraciones en la superficie del enterocito del intestino delgado proximal. Estas



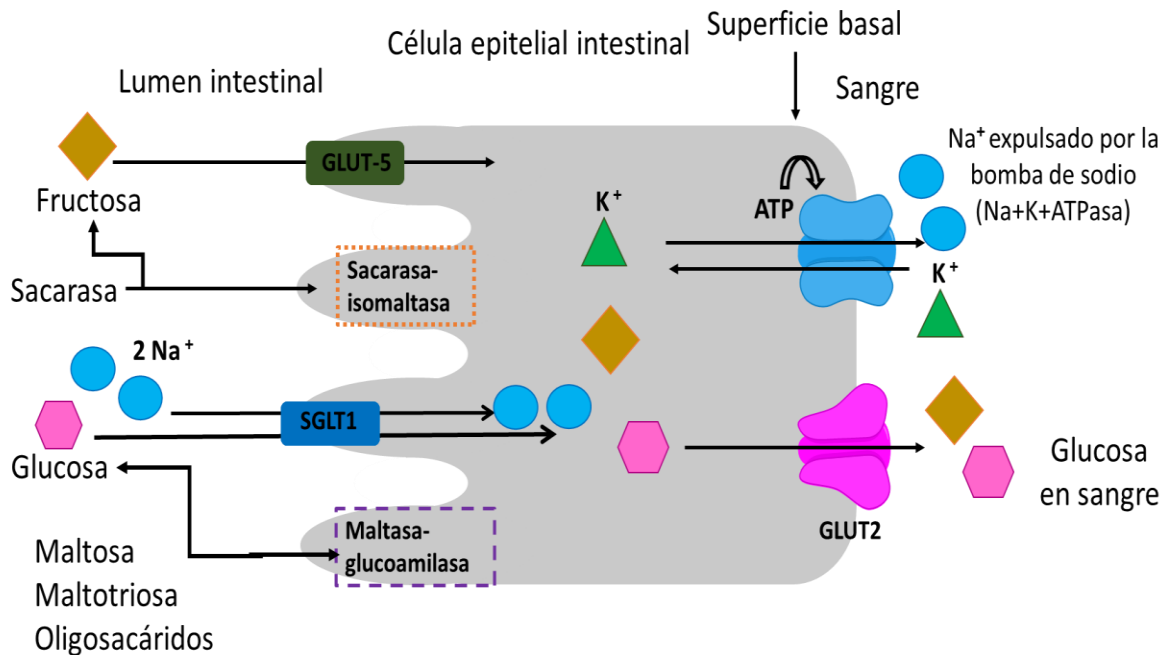


enzimas incluyen a la maltasa, sacarasa, trehalasa, lactasa e isomaltasa (Grand & Levine, 2013).

#### 4.6 Absorción de carbohidratos

Una vez que los carbohidratos son digeridos sus productos deben ser absorbidos y transportados a la circulación portal. Digestión y absorción están acopladas, con las enzimas localizadas con los transportes apropiados. La absorción de glucosa ocurre en el intestino delgado vía SGLT-1 (cotransportador sodio-glucosa). La absorción de la fructosa es completada vía el transportador GLUT5 por difusión facilitada. La glucosa y galactosa son transportados activamente desde el lumen intestinal por el transportador sodio-glucosa (SGLT1) localizado en el borde del cepillo intestinal. El transportador de glucosa es más abundante en el duodeno y el yeyuno, y es dirigido por el gradiente de sodio a través de la membrana celular apical, generado por la bomba de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPasa localizada en la membrana basolateral del enterocito. La bomba  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  ATPasa disminuye la concentración de sodio intracelular por transporte de  $3\text{Na}^+$  hacia afuera de la célula y  $2\text{K}^+$  dentro de la célula. El transportador SGLT-1 utiliza el gradiente de sodio, (dos iones  $\text{Na}^+$  se unen al transportador SGLT-1), el cual resulta en un cambio conformacional permitiendo subsecuentemente la unión de glucosa. Los dos iones  $\text{Na}^+$  y la molécula de glucosa son entonces transferidos al citoplasma de la membrana, seguido de otros cambios conformaciones que incluyen la rotación del receptor. La glucosa es liberada primero, seguida de los iones sodio. El sodio es transportado por gradiente de concentración y al mismo tiempo permite acarrear al transportador de glucosa contra el gradiente de concentración. El ion  $\text{Na}^+$  es subsecuentemente expulsado por la bomba de  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  ATPasa para mantener la acción del gradiente la cual puede ocurrir miles de veces por segundo.

Mucha de la glucosa transportada al interior de la célula pasa fuera de la célula en la superficie basolateral por difusión facilitada vía GLUT-2. Iones sodio, los aniones que acompañan a la glucosa, mantienen la iso-osmolaridad, sólo una pequeña porción de glucosa es utilizada por la célula (**Figura 4**) (Bryant et al., 2002; Navale & Paranjape, 2016).

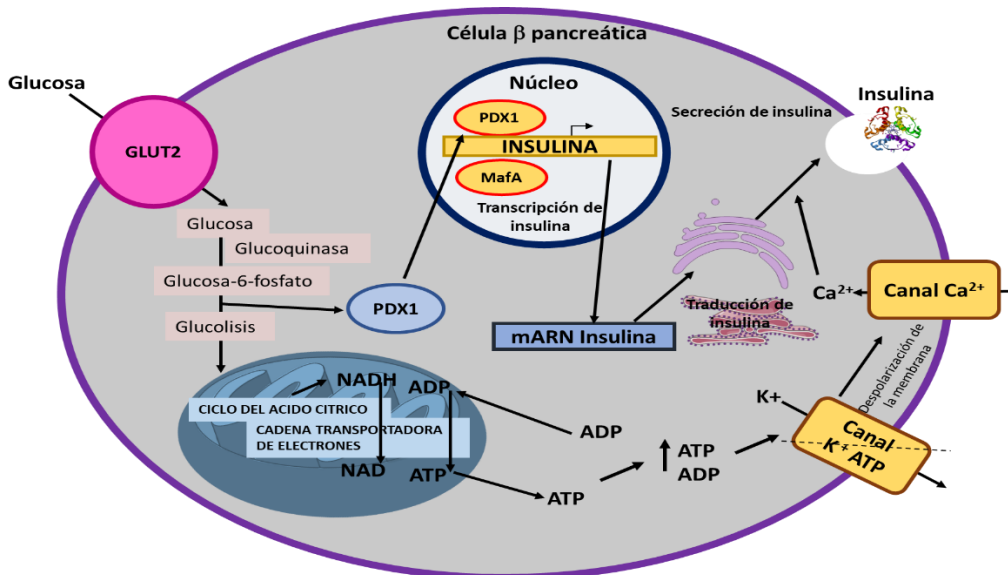


**Figura 4** Mecanismo de absorción intestinal de glucosa (Sanders, 2015)

La distribución de glucosa es llevada a cabo por una familia de transportadores (GLUTs) los cuales desplazan la glucosa a través de la superficie celular. Los transportadores GLUT están encargados del ingreso de los monosacáridos a todas las células del organismo. Se han identificado trece de ellos, enumerados desde GLUT1 hasta GLUT13 (Díaz Hernández et al., 2002).

#### 4.7 Biosíntesis y liberación de insulina en células beta-pancreáticas

Los humanos poseen un sólo gen de insulina (INS) ubicado en el cromosoma 11. La transcripción de este gen está controlada por elementos potenciadores “up stream” (corriente arriba del promotor) que se unen a factores de transcripción que incluyen IDX1 (PDX1), MafA y NeuroD1, junto con otros correguladores que se requieren en las células  $\beta$  pancreáticas para la expresión del gen contribuyendo así la regularización de INS en respuesta a la señalización de glucosa e insulina. Así como los factores de transcripción y correguladores son importantes para el control de la expresión de la insulina, otros componentes adicionales necesarios son el transportador de glucosa 2 (GLUT2) y la enzima de procesamiento de insulina PC1/3, los cuales mantienen la identidad de la célula.



**Figura 5** Biosíntesis de insulina en la célula  $\beta$  pancreática.(Demirbilek et al., 2017)

Insulina es traducida inicialmente como pre-proinsulina la cual es procesada a proinsulina en el retículo endoplásmico rugoso, donde es plegada y estabilizada a su configuración 3D. Después transita hacia el aparato de Golgi, la proinsulina correctamente plegada es ordenada



en gránulos secretores inmaduros, donde es procesado vía la prohormona convertasa PC1/3 y PC2, la cual escinde el C-péptido (Hutton, 1994).

Estos gránulos inmaduros transitan a través del aparato de Golgi, y su posterior gemación y maduración es controlada por una gran cantidad de proteínas reguladoras, la biosíntesis de insulina toma menos de 2 horas (Kebede et al., 2014).

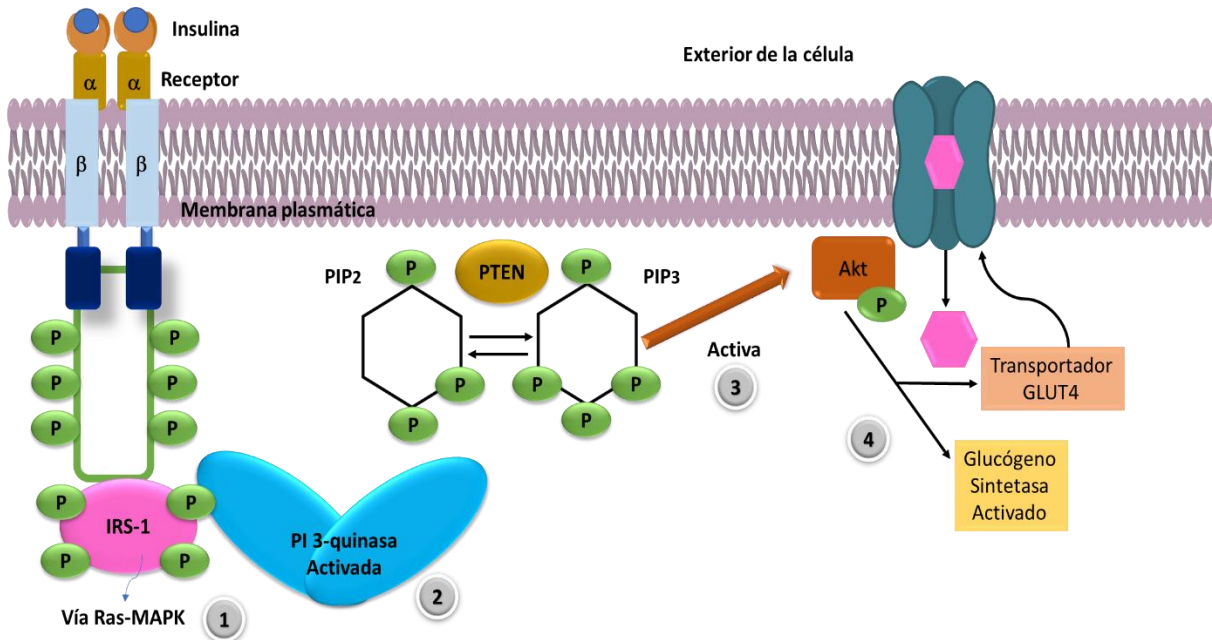
La mayoría de los gránulos de insulina se almacenan dentro del citoplasma de las células  $\beta$  a cierta distancia de la membrana celular, el resto se mueve a la periferia a lo largo de redes de microtúbulos de manera dependiente de AMPK. Finalmente, los gránulos secretores deben acoplarse a la membrana plasmática y estar químicamente preparados en respuesta a una señal intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rorsman & Renström, 2003) (**Figura 5**).

#### 4.8 Señalización de la insulina

La señalización de la insulina es iniciada a través de la unión y activación de su receptor de superficie celular y comienza una cascada de fosforilación y desfosforilación, la generación de un segundo mensajero, e interacciones proteína-proteína que resultan en eventos metabólicos diversos en casi todos los tejidos. El receptor de insulina consta en dos subunidades  $\alpha$  que se unen a la insulina y dos subunidades  $\beta$  catalíticamente activas que están unidas por disulfuro en un complejo  $\alpha_2\beta_2$  heterotetramérico (Tokarz et al., 2018).

La insulina se une a las subunidades  $\alpha$  extracelulares, activando el dominio intracelular de tirosina quinasa de la subunidad  $\beta$ . Una subunidad  $\beta$  del receptor fosforila a su compañero en residuos de tirosina específicos que pueden tener funciones distintas, como la estimulación de la asociación intermolecular de moléculas de señalización como Shc y Grb, IRS1 a IRS4, isoformas de proteínas adaptadoras de Shc y miembros de la familia SIRP (proteína

reguladora de señal), Gab-1, Cbl, CAP y APS82,83; estimulación de la mitogénesis; e internalización del receptor(Alberto et al., 2008).



**Figura 6** Vía de señalización de la insulina (De Meyts, 2000)

1. La insulina se une a su receptor, el receptor activado fosforila la proteína IRS-1 la cual conduce al reclutamiento de GRB2, activando la vía de RAS.
2. IRS-1 activa PI 3-quinasa, la cual cataliza la adición de un grupo fosfato a la membrana lipídica PIP2 para transformarse en PIP3, PTEN puede convertir PIP3 de vuelta a PIP2.
3. PIP3 se une a la proteína quinasa Akt, la cual es activada por otra proteína quinasa.
4. Akt cataliza la fosforilación de proteínas clave que conducen a un incremento de la actividad de glucógeno sintetasa y reclutamiento del transportador de glucosa, GLUT4, a la membrana.



#### 4.9 Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina

La diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por presentar una resistencia a la insulina, condición en la que las células no responden adecuadamente a la insulina. Esta señalización deficiente en insulina es causada por diferentes alteraciones, incluidas mutaciones y/o modificaciones postraduccionales en el receptor de insulina, IRS o en moléculas efectoras ubicadas “down stream” (corriente abajo). Las alteraciones más frecuentes de la resistencia a la insulina incluyen una disminución en el número de receptores y de su actividad catalítica, un aumento del estado de fosforilación de Ser/Thr en el receptor de insulina y el IRS, un aumento de la actividad fosfatasa Tyr, principalmente PTP-1B, que participa en la desfosforilación del receptor y del IRS, una disminución en PI3K y la actividad de Akt quinasas, así como defectos en la expresión y función de GLUT-4. Estas alteraciones reducen la absorción de glucosa en los tejidos musculares y adiposos y promueven alteraciones a nivel metabólico (Gutiérrez Rodelo et al., 2015) (**Figura 7**).

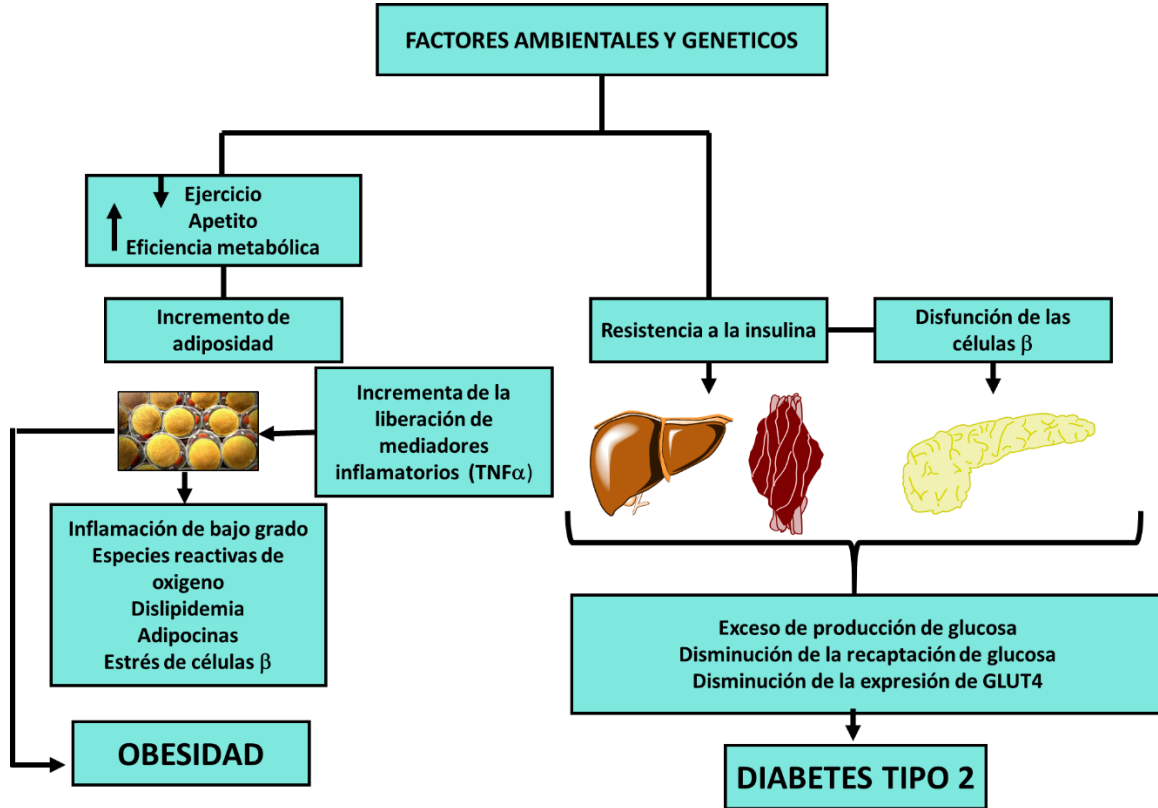


Figura 7 Resistencia a la insulina y disfunción de células  $\beta$ . (Riddy et al., 2018)

Un factor esencial que contribuye a la resistencia a la insulina es la hiperfosforilación Ser / Thr de las proteínas IRS. Ésta disminuye su fosforilación en Tyr y reduce su interacción con PI3K, alterando así la fosforilación y activación de la Akt quinasa. Además, se ha informado que la fosforilación del IRS en los residuos Ser / Thr acelera su degradación. Diferentes agentes, como las citocinas proinflamatorias, los ácidos grasos saturados (SFA), los aminoácidos, la endotelina 1, la angiotensina II (Ang II) y los estados de hiperinsulinemia, aumentan la actividad de las quinasas, como varias isoformas de PKC, estrés JNK quinasa, mTOR, proteína quinasa ribosómica S6 de 70 kDa, PKA y MAPK, que fosforilan IRS (Gutiérrez Rodelo et al., 2015).



#### 4.10 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es un grupo de desórdenes metabólicos que afectan a un gran número de personas en el mundo, es principalmente caracterizada por una hiperglucemia crónica resultado de un defecto en la acción de la insulina (Patel et al., 2012).

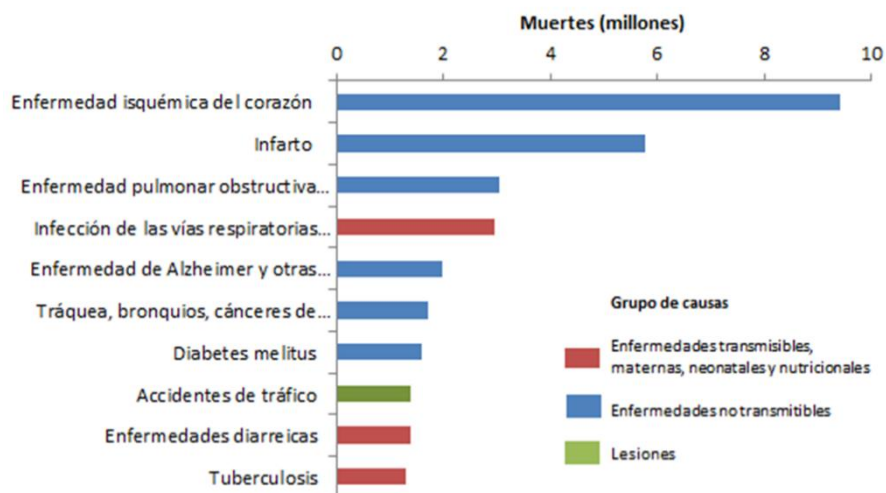
La diabetes tipo 2 es caracterizada por un aumento a la resistencia a la insulina y es causada por una combinación de factores genéticos relacionados además de factores como la obesidad, falta de ejercicio, estrés entre otros. Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 viven en un estado de hiperglucemia crónico debido a la progresión de la disfunción de las células beta pancreática y la resistencia a la insulina. Es posiblemente una de las enfermedades con mayor desarrollo de complicaciones micro y macro vasculares a nivel mundial (Fowler, 2008). Ha sido estimado que cerca de 592 millones de adultos se convertirán en pacientes diabéticos en el año 2035 debido al crecimiento poblacional, la urbanización, la alta prevalencia de la obesidad, y los altos estándares de vida que con llevan a una dieta rica en calorías. A pesar de que hay una gran variedad de fármacos disponibles en el mercado para tratar esta enfermedad muchos de ellos están fuera del alcance de la población y muchos otros tienen efectos adversos significativos (Patel et al., 2012).

La morbilidad asociada con diabetes es secundaria en comparación con el número de condiciones patológicas que se desarrollan e incluyen dislipidemias, neuropatías, desórdenes cerebrovasculares, insuficiencia renal y enfermedades coronarias del corazón (**Figura 8**).





### 10 principales causas de muerte en 2016



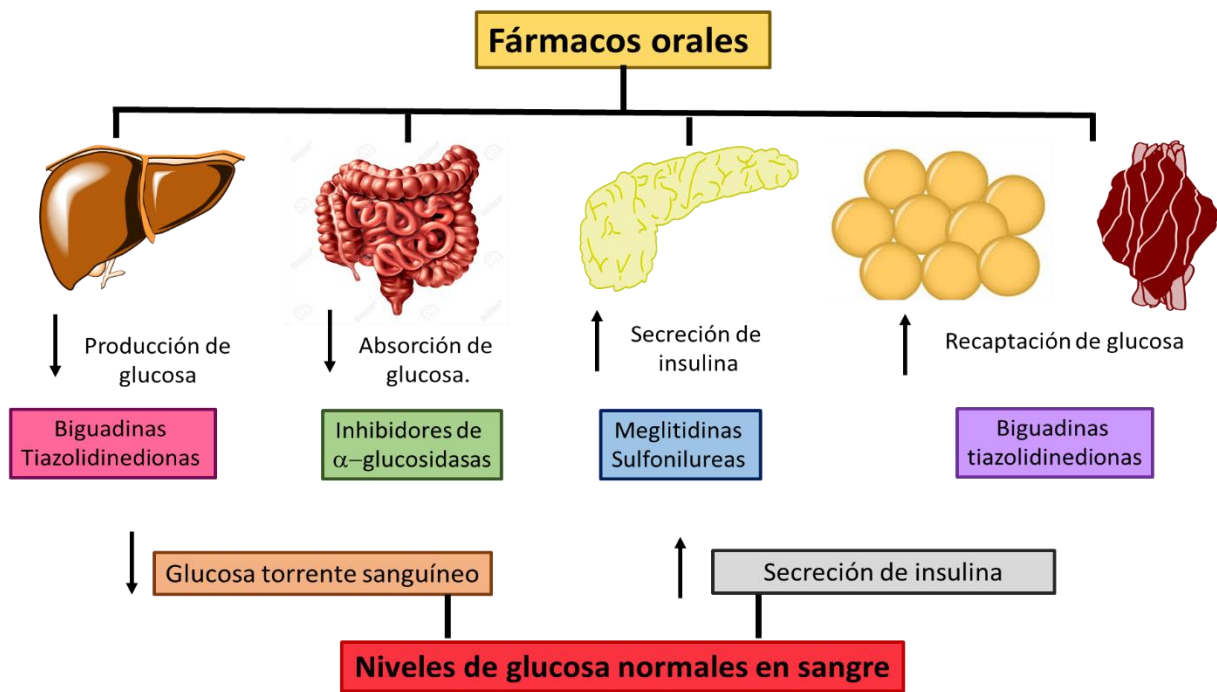
**Figura 8.** 10 principales causas de muerte en 2016 y porcentaje de cambio; 2005-2016, todas las edades. Estimaciones de Salud Global 2016; Muertes por causa, edad, sexo, por país y por región, 2000-2016. Ginebra, OMS.

#### 4.11 Mecanismo de acción de fármacos convencionales usados en el tratamiento de diabetes

La decisión sobre cuales medicamentos son las mejores depende de muchos factores incluyendo niveles de azúcar u otros problemas de salud del paciente.

Los agentes de hipoglucemia oral ejercen sus efectos reductores de glucosa a través de una variedad de mecanismos (**Figura 9**). Estos mecanismos de acción incluyen: reducción de la producción de glucosa hepática (metformina, una biguanida), aumento de la secreción de insulina por las células beta pancreáticas, (secretagogos de insulina), mejora de la sensibilidad a la insulina (metformina), e inhibición de la digestión y absorción de glucosa intestinal ( $\alpha$ -glucosidasas inhibidores) (Joseph & Jini, 2011). Sin embargo, el uso de estos medicamentos está limitado por el hecho de que tienen efectos secundarios adversos, como hipoglucemia potencial (p. Ej., sulfonilurea), aumento de peso (meglitinidas, sulfonilurea y

tiazolidindionas), molestias gastrointestinales (inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$  inhibidores de amilasa) y lactoacidosis (TZD y metformina) (Cheng & Fantus, 2005). Muchos fitoconstituyentes aislados de plantas tales como flavonoides, alcaloides, terpenoides, antocianinas, glicósidos y derivados fenólicos han demostrado ser inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas (S. Kumar et al., 2011).



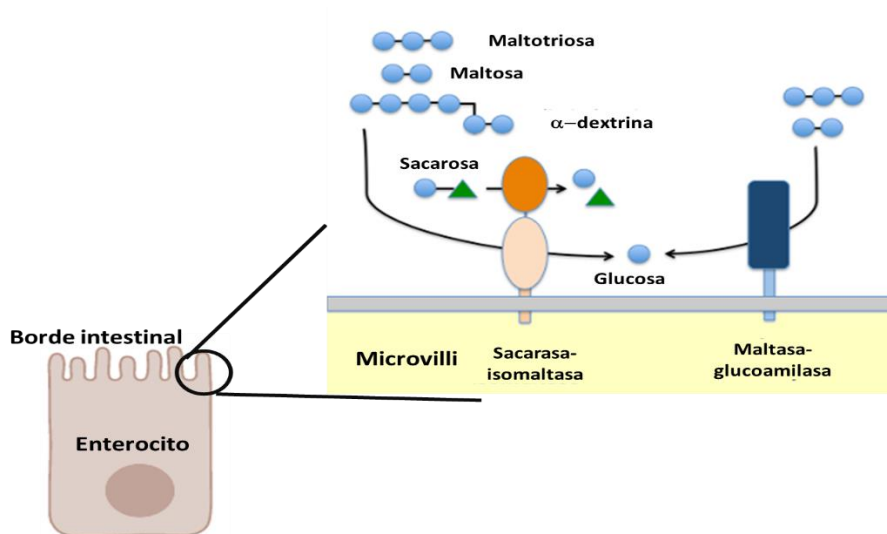
**Figura 9** Sitio de acción de fármacos orales usados en el tratamiento de diabetes (Govil & Singh, 2018)

#### 4.12 $\alpha$ -glucosidasas

Las  $\alpha$ -glucosidasas son enzimas que se encuentran en el borde del cepillo del intestino delgado, catalizan la exohidrólisis de enlaces 1,4  $\alpha$ -glucosídicos con liberación de  $\alpha$ -glucosa. Varios tipos de  $\alpha$ -glucosidasas están distribuidos en microorganismo, plantas, y tejido animal. Muchas  $\alpha$ -glucosidasas son capaces de hidrolizar no sólo  $\alpha$ -glucósidos y oligosacáridos sino también  $\alpha$ -glucanos tales como el almidón y el glicógeno.

Existen diferentes tipos de enzimas  $\alpha$ -glucosidasas, entre las que destacan  $\alpha$ -amilasa, sacarasa-isomaltasa, y maltasa glucoamilasa por su abundancia en el intestino delgado.

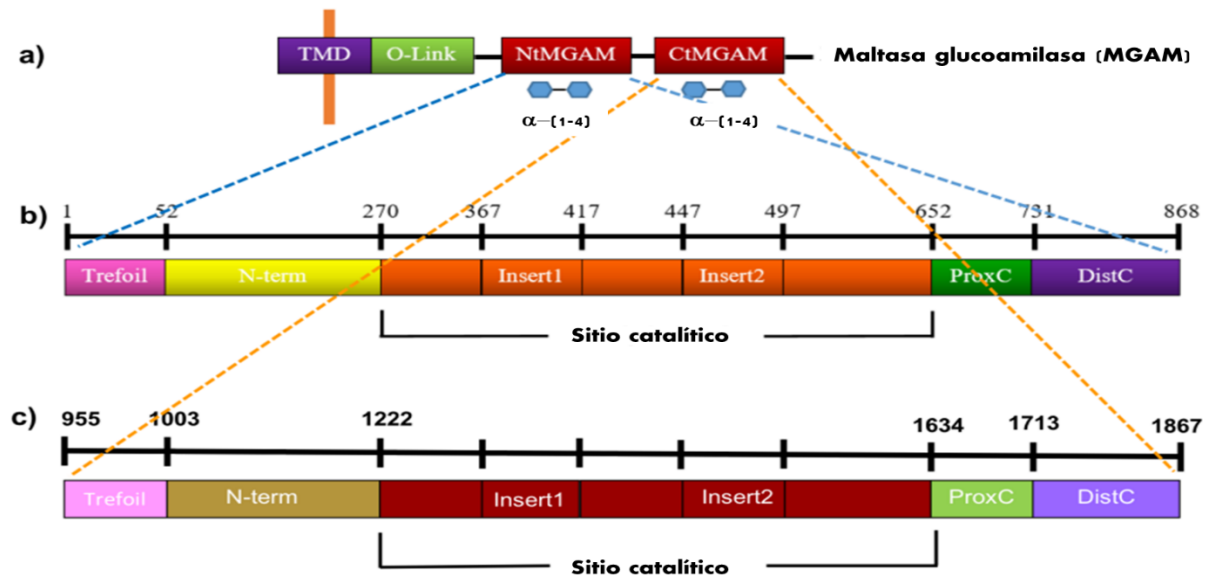
(Figura 10).



**Figura 10** Representación esquemática de la hidrólisis de oligosacáridos a azúcares simples por  $\alpha$ -glucosidasas.(Hooton et al., 2015)

#### 4.13 Maltasa glucoamilasa

La maltasa glucoamilasa (MGAM) está anclada a las células epiteliales del borde en cepillo del intestino delgado y se compone de un dominio citosólico, un dominio transmembrana (TMD), un conector *O*-glicosilado (*O*-linker) y dos subunidades catalíticas homólogas: los dominios amino y carboxilo terminales (NtMGAM y CtMGAM) (Brás et al., 2018).



**Figura 11** Representación esquemática lineal de los dominios estructurales NtMGAM y CtMGAM (Sim et al., 2008a).

Esta enzima consiste en dos subunidades con diferente especificidad de sustrato. Estudios han demostrado que su dominio catalítico *N*-terminal tiene la mejor actividad sobre maltosa mientras que el dominio *C*-terminal tiene una especificidad de sustrato sobre oligómeros de glucosa. En el intestino delgado esta enzima funciona de manera sinérgica con la sacarasa-isomaltasa y  $\alpha$ -amilasa (Quezada-Calvillo et al., 2008) (**Figura 11**).

Los dominios NtMGAM y CtMGAM llevan a cabo la misma reacción catalítica, pero difieren en su especificidad para unirse a longitudes variables de oligosacáridos (Sim et al., 2008b). El sitio activo de NtMGAM tiene una cavidad de unión a sustrato poco profunda con sólo dos subsitios de azúcar (-1 y +1 subsitios, donde el enlace entre azúcares en -1 y +1 se escinde). La presencia de 21 residuos adicionales en el sitio activo de CtMGAM (cinta azul en la Figura 11b) permite que se unan sustratos más largos. Por lo tanto, NtMGAM se une y escinde preferentemente sustratos más cortos, mientras que CtMGAM puede escindir



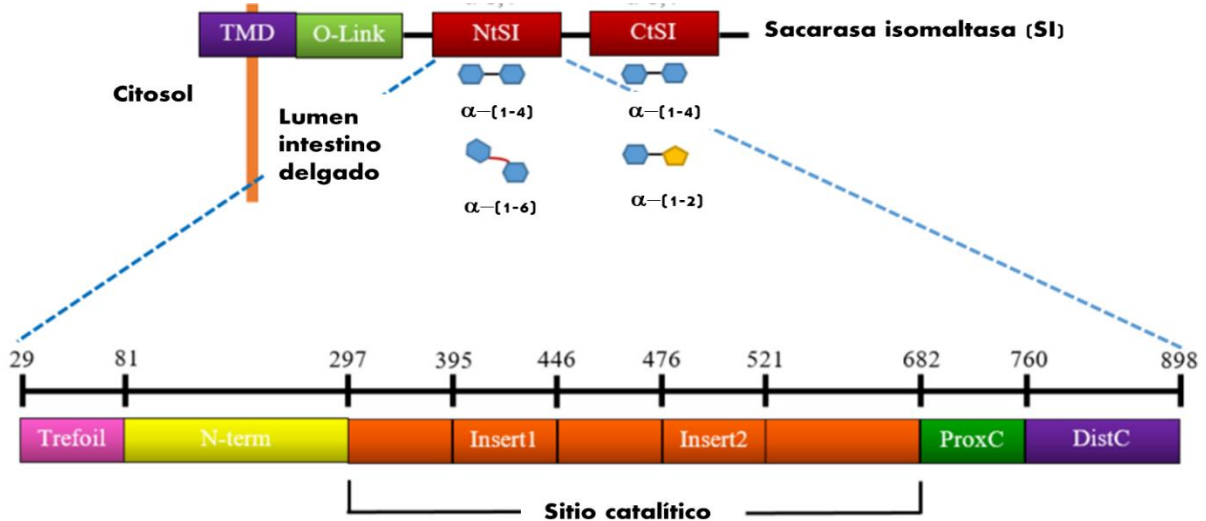
sustratos más largos. La alineación de secuencia con otros miembros de la familia GH31 ha identificado Asp443 en NtMGAM y Asp1420 en CtMGAM como nucleófilos catalíticos. El papel del catalizador ácido/base general es desempeñado por Asp542 en NtMAGAM y Asp1526 en CtMGAM. Ambos dominios catalíticos de MGAM tienen la secuencia de firma WIDMNE (Ernst et al., 2006) que rodea al nucleófilo catalítico (Figuras 11 y 12). Actualmente, no hay estructuras 3D de MGAM unidas a sustratos, por lo que aquí se muestran las estructuras de NtMGAM y CtMGAM unidas a acarbosa. Estos análisis explican por qué todos los fármacos antidiabéticos comercializados actualmente que se dirigen a MGAM bloquean la unión del sustrato al ocupar el subsitio -1.

#### 4.14 Sacarasa isomaltasa

Es una glicoproteína localizada en el borde del intestino delgado y tiene expresión preferente en la membrana apical de los enterocitos. Esta enzima es sintetizada y ensamblada en el retículo endoplasmático rugoso y es transportado a las células apicales de la superficie de las vellosidades intestinales (Gericke et al., 2017). Estas enzimas catalizan los pasos finales de la digestión de carbohidratos por la ruptura de disacáridos y oligosacáridos para obtener monosacáridos absorbibles.

Tiene dos subunidades funcionales homólogas (sacarasa e isomaltasa). Isomaltasa hidroliza los enlaces 1-6, mientras que sacarasa digiere enlaces cortos 1-4 como sacarosa, la maltosa y algunos oligómeros de glucosa.

FACULTAD DE FARMACIA



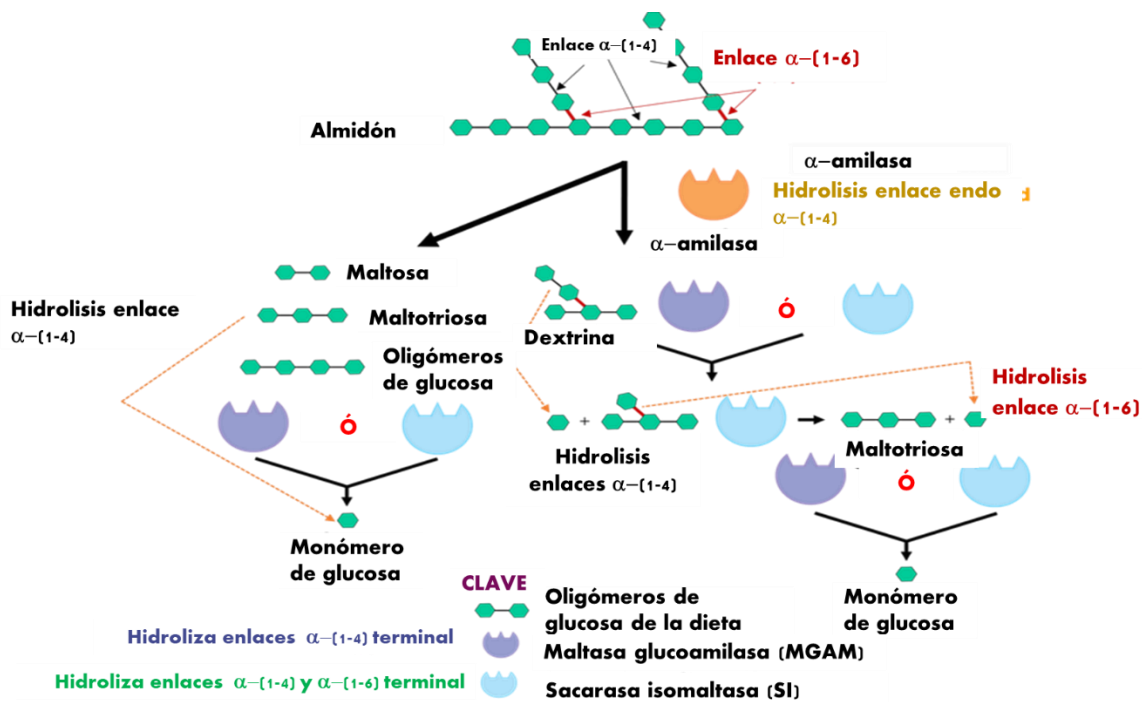
**Figura 12** Representación esquemática lineal de la organización de dominios de SI y su actividad hidrolítica (Jones et al., 2011).

La enzima SI tiene un dominio citosólico, un dominio transmembranal (TMD), un enlazador O-glicosilado (O-enlazador) y dos subunidades catalíticas homólogas, isomaltasa (NtSI) y sacarasa (CtSI) (**Figura 12**). Los dos dominios catalíticos comparten 40% de identidad en su secuencia, y ambos son capaces de escindir oligosacáridos unidos  $\alpha$ -(1,4). NtSI tiene actividad adicional para escindir oligosacáridos unidos a  $\alpha$ -(1,6) mientras que el CtSI tiene actividad adicional de escisión de oligosacáridos unidos  $\alpha$ -(1,2). Ambas unidades catalíticas de SI están compuestas por cinco dominios estructurales principales (Jones et al., 2011).

#### 4.15 $\alpha$ -amilasa

Hidroliza los enlaces  $\alpha$  de polisacáridos tales como almidones y glucógeno, obteniéndose glucosa y maltosa. Aunque se encuentra en muchos tejidos, la amilasa es más prominente en el jugo pancreático y la saliva, los cuales poseen cada uno su propia isoenzima de  $\alpha$ -amilasa humana.

Las  $\alpha$ -amilasas contienen varios dominios proteicos diferentes, el dominio catalítico posee una estructura secundaria que consiste en 8 barriles  $\alpha/\beta$  encadenados que contienen un sitio activo interrumpido por un dominio de unión al calcio, formado por 70 aminoácidos. Tiene un dominio C-terminal estructura barril  $\beta$ , la mayoría de las  $\alpha$ -amilasas contienen un dominio en forma de lámina  $\beta$  que se encuentra ubicado en el extremo C-terminal (Kadziola et al., 1998).



**Figura 13** Digestión de almidón por  $\alpha$  amilasa y  $\alpha$  glucosidasas (Ren et al., 2011).

Los cuatro dominios catalíticos pertenecen a la familia de glucósido hidrolasa 31 (GH31) (Jones et al., 2011) y tienen la secuencia de firma catalítica característica WIDMNE (Ernst et al., 2006). Estos dominios exhiben actividades y especificidades de sustrato superpuestas. Tanto MGAM como SI tienen actividad contra los oligosacáridos unidos a  $\alpha$ -(1,4). El NtSI tiene actividad adicional contra oligosacáridos unidos a  $\alpha$ -(1,6), mientras que el CtSI tiene



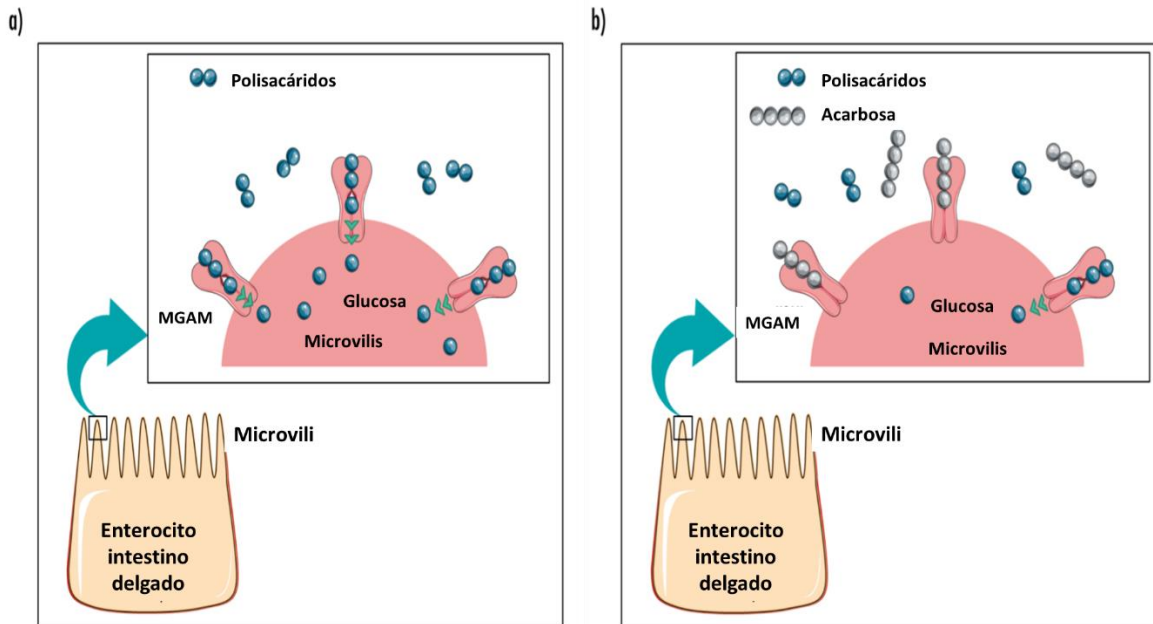
actividad adicional contra oligosacáridos unidos  $\alpha$ -(1,2). La **Figura 13** resume las actividades hidrolíticas de estas enzimas. Se ha postulado que la actividad catalítica unida  $\alpha$ -(1,4) redundante se debe a la relación 19: 1 de enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1,4) y  $\alpha$ -(1,6) en el almidón.

#### 4.16 Inhibidores de $\alpha$ glucosidasas

Un efectivo control de la hiperglucemia en diabetes tipo 2 incluye la regulación o inhibición de la hidrólisis de carbohidratos por  $\alpha$ -glucosidasas.

Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa pertenecen a la tercera categoría de agentes hipoglucemiantes orales. Inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa, como la acarbosa y la voglibosa obtenidas de fuentes naturales, pueden controlar eficazmente los niveles de glucosa en sangre después de la ingesta de alimentos, y se han utilizado clínicamente en el tratamiento de la diabetes mellitus. Sólo unos pocos inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa están disponibles comercialmente. Todos ellos contienen restos de azúcar y su síntesis implica tediosos procedimientos de varios pasos. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas que puedan mostrar inhibición sobre  $\alpha$ -glucosidasa pero sin reacciones secundarias. En los últimos años, los proyectos emprendidos para descubrir potentes inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa sin azúcar a partir de fuentes naturales han recibido una atención tremenda debido a los compuestos altamente abundantes en la naturaleza y sus prometedoras actividades biológicas(V. Kumar et al., 2011).





**Figura 14** Esquema que muestra a) Las etapas finales de la hidrólisis del almidón catalizadas por MGAM; b) Acarbosa se une a  $\alpha$ -glucosidasa (MGAM), inhibiendo competitivamente la enzima (Rosak & Mertes, 2012).

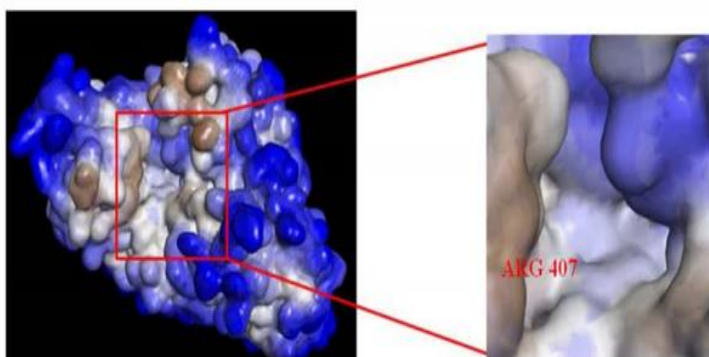
Esta clase de medicamentos (acarbosa, miglitol) inhiben las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas que descomponen los carbohidratos en monosacáridos en el borde intestinal (**Figura 14**). Al retrasar la descomposición de los carbohidratos en el intestino delgado, se reduce la absorción de glucosa, lo que resulta en un mejor control de las concentraciones de glucosa en sangre postprandial. Clínicamente el uso de estos medicamentos está limitado por la intolerancia a los efectos gastrointestinales de los carbohidratos no digeridos en el intestino, causando, en particular, muchos efectos secundarios (Schmeltz & Metzger, 2007).

#### 4.17 Mecanismo de acción de inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas

Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas son medicamentos que inhiben la absorción de carbohidratos del intestino y pueden usarse en el tratamiento de pacientes con diabetes tipo

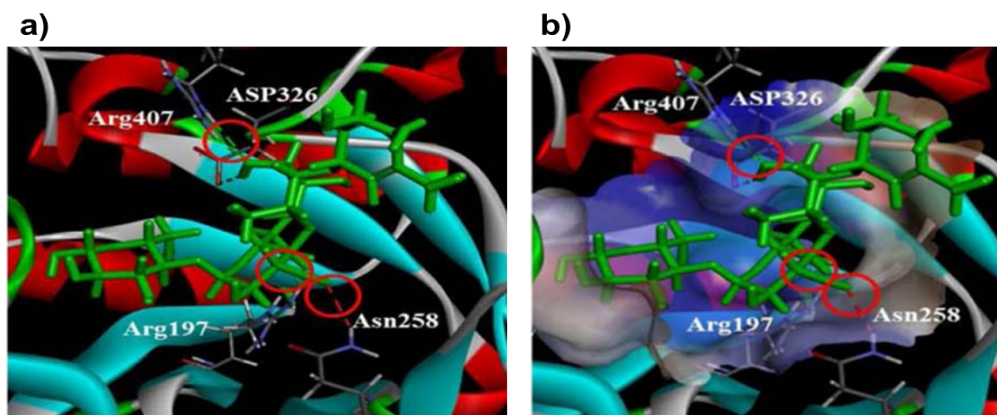


2 o intolerancia a la glucosa. Existen pocos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas disponibles en el mercado (acarbosa, miglitol y voglibosa), siendo la acarbosa el de primera elección en la clínica. Mediante la inhibición competitiva y reversible de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales, la acarbosa retrasa la digestión de carbohidratos y prolonga el tiempo de digestión de estos. Después de una administración oral junto con los alimentos los niveles de glucosa postprandial disminuyen de manera dosis dependiente y la secreción de insulina inducida por glucosa disminuye. Debido a la disminución de la hiperglucemia postprandial y la hiperinsulinemia por la acarbosa, la absorción de triglicéridos en el tejido adiposo, la lipogénesis hepática y el contenido de triglicéridos se reducen (Bischoff, 1995).



**Figura 15** Sitio activo de  $\alpha$ -glucosidasa (Jhong et al., 2015).

Estudios de acoplamiento molecular de acarbosa con  $\alpha$ -glucosidasas indican que el sitio catalítico de la enzima se encuentra el residuo de aminoácido (Arg407) (**Figura 15**), mientras que la predicción de la interacción proteína-ligando (*in silico*) demuestra que acarbosa se une al sitio activo de  $\alpha$ -glucosidasa mediante dos tipos de interacciones, acarbosa forma interacciones de tipo puente de hidrógeno con Asp326, Arg197 y Asn258 **Figura 16a**. En la **Figura 16b** se observa que acarbosa forma una interacción de tipo hidrofóbica (Jhong et al., 2015).



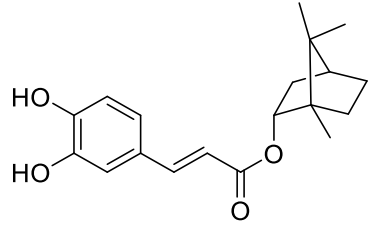
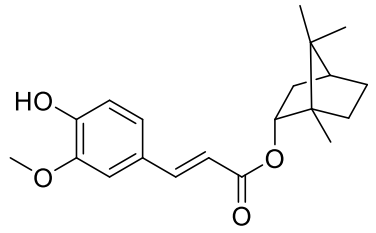
**Figura 16** Acoplamiento molecular de acarbosa (verde) con el sitio activo de  $\alpha$ -glucosidasa; **b)** interacciones hidrofóbicas entre acarbosa y  $\alpha$ -glucosidasa (azul) (Jhong et al., 2015).

#### 4.18 Metabolitos identificados en *Coreopsis mutica*

A pesar de que la especie *C. tinctoria* ha sido la especie más estudiada dentro del género, existen algunos reportes de la especie *C. mutica*, en donde a partir de los extractos acetónico y hexánico se han identificado compuestos de tipo fenilpropanoide entre los que sobresalen el cumarato, cafeato y ferulato de bornilo (**Tabla 1**), los cuales han sido evaluados por su actividad antiinflamatoria en ensayos sobre edema de ratón inducido por TPA. Los tres compuestos presentaron actividad antiinflamatoria de manera dosis-dependiente (Maldonado, Ramírez, et al., 1998).

**Tabla 1** Metabolitos identificados en *Coreopsis mutica*

Nombre y Estructura	Propiedades
<p><b>Cumarato de bornilo (3)</b></p>	<p>Antibacterial (Setzerl et al., 1999)</p> <p>Antiinflamatorio (Maldonado et al., 1998)</p> <p>Antripanosomiásico (Ogungbe et al., 2010)</p>

Nombre y Estructura	Propiedades
 <p data-bbox="357 609 665 651"><b>Cafeato de bornilo (4)</b></p>	<p data-bbox="812 336 1380 420">Inductor de la apoptosis (Chuan-bin Yang et al., 2014)</p> <p data-bbox="812 483 1380 567">Inhibidor de la elastasa neutrofílica (Steinbrecher et al., 2006)</p>
 <p data-bbox="357 913 665 955"><b>Ferulato de bornilo (5)</b></p>	<p data-bbox="812 672 1380 756">Antiinflamatorio (Maldonado, Apan, et al., 1998)</p> <p data-bbox="812 787 1380 840">Antiangiogénico (Yang et al., 2013)</p> <p data-bbox="812 871 1380 924">Inductor de la apoptosis (Qi et al., 1999)</p> <p data-bbox="812 945 1380 997">Inhibidor de 5-lipoxigenasa (Wu et al., 2002)</p>

#### 4.19 Metabolitos inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas

Los flavonoides **6, 7, 8, 9 y 10** (Tabla 2) han demostrado tener efectos inhibitorios contra las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas, sin embargo, la información reportada en la literatura es dispersa y variable ya que utilizan diferentes concentraciones de enzima de diferentes orígenes ( $\alpha$ -glucosidasa intestinal de ratón y/o levadura). Lleva a discrepancias en estos estudios para su comparación (Proença et al., 2017).



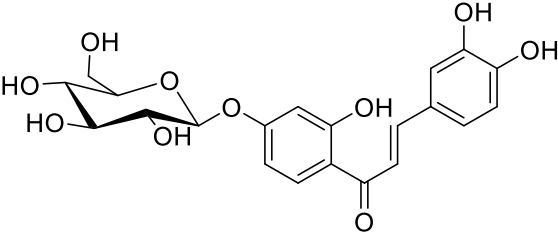
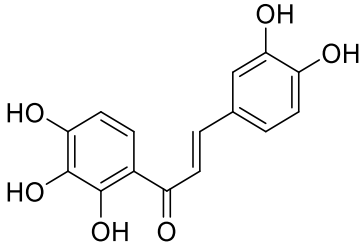
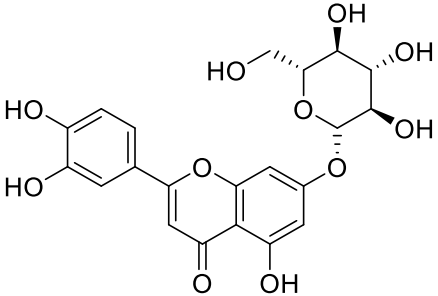
Tabla 2 Metabolitos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas

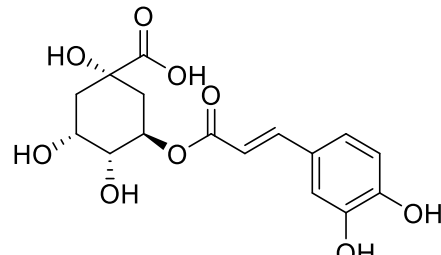
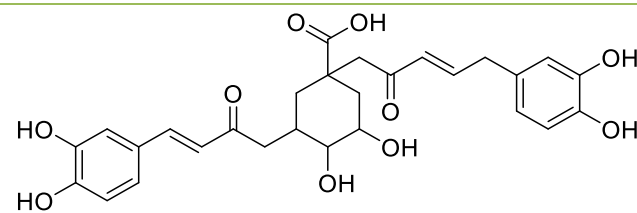
Metabolito	Referencias
 <b>Morina (6)</b>	(Zeng, Zhang, Liao, et al., 2016)
 <b>Luteolina (7)</b>	(Kim et al., 2000)
 <b>Bacaleina (8)</b>	(Nishioka et al., 1998)
 <b>Kaempferol (9)</b>	(Peng et al., 2016)
 <b>Apigenina (10)</b>	(Zeng, Zhang, Lin, et al. 2016)

#### 4.20 Metabolitos identificados en otras especies de *Coreopsis*

Algunas de las especies más estudiadas dentro del género *Coreopsis* son la *C. lanceolata* y *C. tinctoria*, de las cuales se ha identificado gran variedad de metabolitos de interés biológico, en su mayoría de tipo flavonoide, (11-15) los cuales se observan en la **Tabla 3** y han demostrado tener propiedades inhibitorias frente a  $\alpha$ -glucosidasas.

**Tabla 3** Metabolitos con propiedades antidiabéticas identificadas dentro del género *Coreopsis*

Especie	Metabolito	Referencia
<i>C. tinctoria</i> <i>C. lanceolata</i>	 <p><b>Coreopsin (11)</b></p>	(Cai et al., 2016)
<i>C. tinctoria</i> <i>C. petrophiloides</i> <i>C. maritima</i>	 <p><b>Okanin (12)</b></p>	(Saltos et al., 2015)
<i>C. grandiflora</i> <i>C. auriculata</i> <i>C. lanceolata</i> <i>C. intermedia</i>	 <p><b>Luteolina-7-O-<math>\beta</math>-glucopiranosido (13)</b></p>	(Uysal et al., 2018) (Crawford & Smith, 1980) (Crawford & Smith, 1985)

Especie	Metabolito	Referencia
<i>C. tinctoria</i>	 <p><b>Ácido clorogénico (14)</b></p>	(Kalita et al., 2018)
<i>C. tinctoria</i>	 <p><b>Ácido dicafeolquinico (15)</b></p>	(Chen et al., 2014)

El uso de las plantas medicinales y sus compuestos químicos para tratar la diabetes son una alternativa farmacéutica. Éstos previenen enfermedades del corazón y altos niveles de presión sanguínea y mejoran el sistema oxidativo, la acción y secreción de insulina. Por lo que muchos estudios han demostrado que los flavonoides son conocidos por exhibir gran potencia antidiabética. Por ello, la búsqueda de nuevos fármacos antidiabéticos de fuentes naturales es aún atractiva, proporciona una gran cantidad de metabolitos activos, los cuales pueden ser una alternativa segura y efectiva en diabetes mellitus. Consecuentemente, los metabolitos identificados en las plantas de la medicina tradicional son una oportunidad para el desarrollo de nuevos fármacos para la terapia de esta enfermedad.



#### **4.21 Seguridad del uso de plantas medicinales**

A pesar de que el uso de las plantas es milenario en todo el mundo y se conocen sus propiedades curativas, muchas de ellas son utilizadas en preparaciones fitoterapéuticas sin ningún control de calidad y seguridad. Esto es riesgoso considerando que la literatura científica ha demostrado que muchas de las plantas contienen varias sustancias tóxicas. Muchos estudios han reportado la presencia de metabolitos secundarios con potencial tóxico, genotóxico y carcinogénico cuando son usadas de manera crónica y recurrente. Sin embargo, los estudios toxicológicos han sido desarrollados lentamente, lo que resulta en datos inconclusos sobre los efectos de las plantas medicinales en la salud humana (Rietjens et al., 2005).

Las plantas medicinales y sus productos, que incluyen extractos y aceites esenciales, son utilizadas convencionalmente como aditivos, preservativos y agentes saborizantes en la industria alimenticia. Por otro lado, también son un recurso en la síntesis de fármacos usados para la prevención y tratamientos de ciertas enfermedades, debido a la promoción de proveer buena salud (Bahadori et al., 2016). Esta progresiva demanda es debido a la cantidad de actividades biológicas que poseen incluyendo antifúngica, anticancerígena, antidiabética, antibacterial, antioxidante que son utilizadas en la industria farmacéutica. Estas aplicaciones están basadas en las creencias públicas de que estos productos son eficientes y seguros debido a su uso en la medicina tradicional a lo largo de los siglos. Sin embargo, la mayoría de los productos herbarios nunca han sido sujetos a investigaciones toxicológicas, las cuales son requeridas para un producto farmacéutico (Jothy et al., 2013).





A pesar de los grandes beneficios que poseen muchas de las plantas medicinales, recientes estudios han demostrado en ensayos *in vivo* e *in vitro* que algunas usadas en la medicina tradicional o en la comida tienen propiedades genotóxicas, carcinogénicas, citotóxicas y mutagénicas debido a la existencia de múltiples componentes biológicos (Alves Dos Santos et al. 2008).

Se sabe del uso de las plantas del género *Coreopsis* como antidiabético, sin embargo, hoy en día no se cuenta con reportes sobre los compuestos donde reside su actividad antidiabética, ni sobre su toxicidad y seguridad, por lo que es importante obtener evidencia científica de sus efectos tóxicos. El uso de las plantas en la medicina tradicional es una práctica llevada a cabo por siglos para curar enfermedades, su preparación y su uso apropiado brinda muchos beneficios, no obstante, estudios de sus efectos farmacológicos y toxicológicos en humanos todavía son escasos para la mayoría de las plantas con posible actividad en el tratamiento de la diabetes.

#### **4.22 Efecto sinérgico de las plantas medicinales**

La acción selectiva de un fármaco en un tejido u órgano en particular es importante para la seguridad en el uso terapéutico, la cual es usualmente lograda en la medicina moderna a través del descubrimiento de fármacos que actúan sobre receptores específicos. Sin embargo, el uso de estos fármacos está asociados a efectos adversos. La presencia de sinergismo y o de un efecto neutralizante en las plantas medicinales es un concepto viejo. Reportes científicos indican que muchos medicamentos de bases naturales muestran sus efectos terapéuticos a través del sinergismo, o vías aditivas de muchos de los compuestos que actúan sobre múltiples tejidos. Estos efectos sinérgicos y aditivos pueden ser benéficos por



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



eliminación o reducción de los efectos adversos asociados con la predominancia de un compuesto farmacéutico. La potenciación puede ser definida como una interacción positiva que intensifica la potencia del compuesto bioactivo. Los efectos sinérgicos y aditivos son consecuencia de la potenciación. Efectos aditivos son observados cuando dos o más componentes en una mezcla interactúan para proveer un efecto combinado que es igual a la suma de los efectos de los compuestos individuales. Potenciación puede existir entre dos compuestos fitoquímicos en el mismo extracto, dos componentes de dos diferentes extractos.



## 5. JUSTIFICACIÓN

Los antecedentes mostrados por especies del género *Coreopsis* indican que tienen uso en la medicina tradicional para diferentes padecimientos y se ha comprobado que algunos de los compuestos identificados en sus extractos polares (metanólico e hidroalcohólico) presentan actividades biológicas importantes como por ejemplo propiedades anti-hiperglucemiantes. Mientras que en extractos de menor polaridad (hexánico, acetónico) de *Coreopsis mutica* se han identificado metabolitos tipo fenilpropanoide los cuales también han sido reportados en extractos de la misma polaridad en otras especies de *Coreopsis*.

Algunos flavonoides han demostrado tener efectos inhibitorios sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas, y como se menciona en los antecedentes, las especies *C. lanceolata* y *C. tintoria* entre otras han sido evaluadas con esta finalidad (Tabla 3), en este sentido la información reportada en la literatura es dispersa y variable debido a que se utilizan diferentes concentraciones de enzima de diferentes orígenes ( $\alpha$ -glucosidasas intestinal de ratón y/o levadura) lo que conlleva a discrepancias en estos estudios para su comparación. Por estas razones resulta de interés llevar a cabo el estudio fitoquímico y de bioactividad de la especie *Coreopsis mutica* para determinar en cuáles extractos y a que compuestos se les pueden atribuir actividad antidiabética.

Debido a que no existen reportes sobre la toxicidad de *Coreopsis mutica* a nivel celular también resulta importante evaluar su citotoxicidad en líneas celulares no cancerígenas.



## 6. HIPÓTESIS

Los metabolitos obtenidos de los extractos polares de *Coreopsis mutica* tendrán efecto inhibitorio sobre  $\alpha$ -glucosidasas lo que se corroborará en un modelo *in vitro*. Así mismo se demostrará su efecto tóxico mediante un ensayo de citotoxicidad en células inmortalizadas de riñón e hígado, además de fibroblastos humanos normales.

## 7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad inhibitoria sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de los extractos y metabolitos aislados de *Coreopsis mutica*, así como determinar su citotoxicidad en líneas celulares no cancerígenas en modelos *in vitro*.

## 8. OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar el efecto anti-hipergluceante de los extractos a través de un modelo *in vitro* de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas.

Determinar el contenido de metabolitos secundarios en los extractos que presenten la mejor actividad inhibitoria sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de la especie *Coreopsis mutica*.

Determinar la citotoxicidad de los extractos obtenidos y compuestos aislados en células inmortalizadas de riñón, hígado y fibroblastos dérmicos humanos.

Evaluar el efecto antihypergluqueante en ratones normogluceánicos mediante curvas de tolerancia a sacarosa



## 9. METODOLOGÍA

### 9.1 Obtención de los extractos orgánicos de *C. mutica*

Las partes aéreas de *C. mutica* fueron recolectadas el 27 de octubre de 2014 a 4 km al noroeste de Orizaba camino a Banxú municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo. Latitud Norte: 20° 37'48", longitud oeste: 99° 13'22". Número de recolecta: 1438. Número en la colección herbario FEZA-15067. Identificación y colecta: MC. Ramiro Ríos Gómez.

Las partes aéreas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 días, obteniendo 1.0662 Kg, se trituraron y se maceraron por 72 horas utilizando como disolventes hexano, acetona, metanol, y metanol al 85%. Los extractos correspondientes fueron obtenidos por la evaporación de los disolventes utilizando un rotaevaporador. Este proceso se realizó por triplicado para cada disolvente.

### 9.2 Metodología general

El aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *C. mutica* se realizó mediante diferentes técnicas cromatográficas, principalmente cromatografía en columna (CC) y extracción en fase sólida (EFS) empleando gel de sílice 60 (70:230, gruesa) con un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm y sílice flash (200:400) como fase estacionaria. Como fase móvil se utilizó una mezcla de disolventes en orden ascendente de polaridad. Estos procesos fueron monitoreados mediante cromatografía en capa fina (CCF), utilizando cromatoplas base de aluminio kieselgel 60 F264 como fase estacionaria. Las placas cromatográficas se observaron bajo luz ultravioleta para después ser reveladas con sulfato cérico amoniacal al 2% en ácido sulfúrico 2N.

La elucidación estructural de los metabolitos aislados se realizó mediante técnicas



espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear de protón ( $\text{RMN}^1\text{H}$ ) a 400 MHz y de Carbono trece ( $\text{RMN}^{13}\text{C}$ ) a 100 MHz utilizando un equipo Varian Mercury 400MHz (9.4T). Las muestras fueron disueltas en disolventes deuterados; metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ), dimetilsulfóxido ( $\text{DMSO}-d_6$ ) y utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

El análisis de CG-EM se efectuó en un cromatógrafo de gases Agilent Technology modelo 6890 plus, acoplado a un espectrómetro de masas 5973N con una columna HP-5MS 30 m x 0.225 mm x 0.25  $\mu\text{m}$  y Helio como gas acarreador, con temperatura de columna inicial de 50°C que se elevó a 285°C con una velocidad de 2°C/min y se mantuvo por 20 min.

### 9.3 Ensayo de inhibición sobre $\alpha$ -glucosidasas

Realizado en el laboratorio 211 de Productos Naturales del Centro de Investigaciones Químicas, UAEM.

Para este ensayo se utilizaron ratas de la cepa Wistar provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina, UAEM, que fueron sacrificadas por dislocación cervical (NOM-062-ZOO-1999) para obtener su intestino. Éste se enjuagó en una solución de NaCl 0.9%, con una solución tampón  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  10 mM a pH 7 y ampicilina (1 mg/mL). La proteína total se cuantificó por el método de Lowry. Para medir la actividad enzimática se utilizó almidón como sustrato, preparando una solución de 12.5 mg/mL en una solución de fosfatos 0.1 M a pH 7. Esta reacción se realizó por cuadruplicado, adicionando 100  $\mu\text{L}$  de sustrato (almidón a 25 mg/mL) más 60  $\mu\text{L}$  de Buffer de fosfatos pH 7, así como 25  $\mu\text{L}$  la muestra (1 mg/mL). La reacción se inició con 50  $\mu\text{L}$  de la enzima y se incubó cada tubo durante 10 minutos, luego



la reacción se detiene con 2  $\mu$ L de acarbosa en un baño de hielo. La determinación de glucosa liberada se cuantificó mediante un kit comercial de glucosa oxidasa (Glucosa GOD-POD, SpinReact) (relación 1:100 muestra/reactivo; 250  $\mu$ L volumen final), en microplacas de 96 pozos, midiendo su absorbancia a 492 nm, restando el valor a 630 nm, en un lector de microplacas genérico (Ramírez et al., 2012).

#### 9.4 Citotoxicidad

Este ensayo se realizó en el laboratorio 7 de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Farmacia, UAEM.

A partir de los extractos y los compuestos purificados de *C. mutica* se realizaron los ensayos en líneas celulares no cancerígenas; línea celular de hepatocitos inmortalizados (IHH), células de riñón humano (HEK293) y fibroblastos dérmico humano (HDF).

Las células IHH fueron generadas a partir de la inmortalización de hepatocitos primarios humanos por la inserción del gen de la proteína núcleo (“core”) del VHC (virus de hepatitis C). Por lo tanto, es un linaje celular que mantiene características metabólicas de un hepatocito y puede proliferar de manera continua, cosa que los hepatocitos primarios no pueden hacer *in vitro* (Basu et al., 2006). Por su parte, las células HEK293, fueron obtenidas a partir de células primarias de riñón de embrión, las cuales fueron transformadas con un fragmento del adenovirus tipo 5.

El empleo de estas células como modelos de evaluación en este estudio, permitirá obtener información citotóxica de los extractos y compuestos aislados, en dos de los linajes celulares



con actividad metabólica y detoxificante en el organismo humano. Si bien, aún es requisito evaluar estas moléculas en modelos *in vivo*, que permitan tener un mejor entendimiento de la farmacología (farmacocinética/farmacodinamia), estos modelos pueden ya ofrecer información valiosa de posibles efectos no deseables por la acción de los compuestos identificados en un rango de concentraciones. Además, el incluir células de fibroblastos humanos, también nos permite hacer comparaciones entre los efectos observados de los compuestos en linajes celulares con funciones más metabólicas y menos metabólicas (Graham et al., 1977).

Las células se transfieren a una concentración de 4000 células por pozo para comenzar las evaluaciones citotóxicas. La concentración usada para los extractos y los compuestos puros es de 1000, 100, 10, 1, 0.1  $\mu\text{g/mL}$  para la curva dosis/respuesta y son incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  a una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% por 48 horas. El número de células viables en proliferación se determina usando el reactivo CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La viabilidad celular se determina utilizando un lector ELISA a una longitud de onda de 450 nm. Cada experimento se realizó por triplicado. Los datos son analizados en el programa Prisma 5.0 y se determina el  $\text{CC}_{50}$  por análisis de regresión lineal.

### **9.5 Curvas de tolerancia a sacarosa**

Este ensayo se realizó en el centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología en el laboratorio de Calidad de Alimentos y Productos Naturales, UAN.

Se determinó el efecto anti-hiperglucémico de los extractos por medio de curvas de tolerancia a sacarosa en donde se utilizaron ratones macho normoglucémicos de 25-30 g de la cepa





BALB/c provenientes de la Universidad de Guadalajara (UDG). Los ratones fueron manejados bajo la Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio (Nih et al., 2011) y se mantuvieron bajo condiciones controladas 12 h luz/ 12 h oscuridad. Se agruparon en cantidades de seis ratones por cada grupo de experimentación, grupo control en el cual se administró el vehículo (agua o tween 20 10%) a una dosis de 5 mL, grupo control positivo con acarbosa a una dosis de 2 mg/Kg, y un grupo de prueba en donde se administraron los extractos a una dosis de 100 mg/Kg. Antes de iniciar los ensayos los animales estuvieron bajo ayuno por 16 h con agua a libre acceso. Posteriormente se mide el valor de glucosa a tiempo 0 y se administra el vehículo, la acarbosa y las muestras a los grupos correspondientes. Pasados 30 minutos se administra la carga de sacarosa a una dosis de 2 g/Kg a todos los grupos. Los valores de glucosa son monitoreados a 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 h post administración.

Para realizar la medición de glucosa, las muestras fueron colectadas de la vena caudal de la cola de los ratones, y se utilizó un glucómetro y tiras reactivas de la marca *Accu-chek (Roche)*. Los valores de variación de glucemia se determinaron utilizando la siguiente formula (Ortiz-Andrade et al., 2008).

$$\%Variación\ de\ glucemia = \frac{GlucX - Gluc0}{Gluc0} \times 100$$

Donde: Gluc0 son los valores de glucosa inicial

GlucX son los valores de glucosa a diferentes tiempos (0.5, 1, 1.5, 2 y 3 h).

### 9.6 Análisis estadístico

Los resultados experimentales se expresan como media  $\pm$  SEM. Todas las mediciones fueron replicadas tres veces. Los datos fueron analizados por un análisis de varianza ( $P < 0.05$ ). Los valores de  $CCI_{50}$  e  $IC_{50}$  se calcularon a partir del análisis de regresión lineal.

Porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas; cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE;  $n=6$  vs vehículo. Con un valor de  $***P < 0.0001$  determinado por un análisis estadístico de la prueba ANOVA, seguida de una prueba Dunnet.

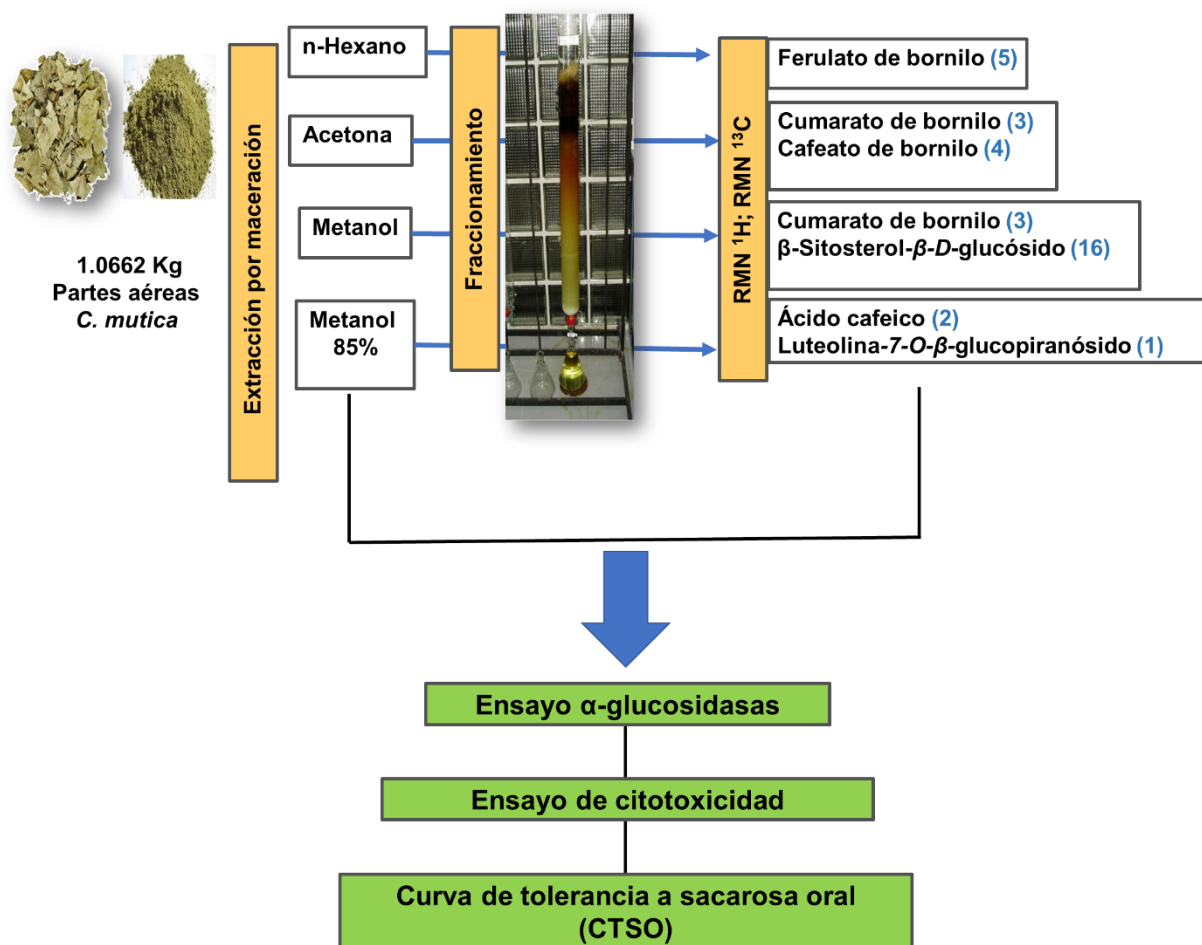


Figura 17 Esquema de la metodología general.



Tabla 4 Total de fracciones analizadas por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$

Columna	Extracto	Fracción	Clave	Metabolito
1	Hidroalcohólico (Extracción Butanol)	15	CMHBU-01	Luteolina-7-O- $\beta$ - glucopiranosido
2	Hidroalcohólico (Extracción Butanol)	45-52	CMHBU-03	Ácido cafeico
3	Hidroalcohólico (Extracción Diclorometano)	36	BAG05-004	Ácido cafeico
4	Hidroalcohólico (Extracción Butanol)	87-112	BAG05-003	Ácido cafeico
3	Hidroalcohólico (Extracción Diclorometano)	SPS-TI	BAG05-002	Ácido cafeico
	Acetona	140-148	BAG05-005	Cafeato de bornilo
	Acetona	56-59	BAG05-006	Cafeato de bornilo
	Acetona	51-60	BAG05-007	Cafeato de bornilo
	Hexano	03	BAG05-008	Ferulato de bornilo
	Acetona	26-46	BAG05-009	Cumarato de bornilo
6	Metanólico	13-15	BAG05-010	Cumarato de bornilo



## 10. RESULTADOS

### 10.1 Bipartición del extracto hidroalcohólico

Se obtuvieron 92.259 g de extracto hidroalcohólico de *C. mutica* a partir del cual se separaron 68.636 g para realizar una bipartición con disolventes de diferentes polaridades (diclorometano, acetato de etilo y butanol).

Disolvente	Cantidad obtenida (g)	Rendimiento %
Diclorometano	9.156	13.33
Acetato de etilo	1.083	1.57
Butanol	6.855	9.98
Residuo acuoso	51.542	74.30

Las fracciones obtenidas de las biparticiones fueron analizadas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) bajo las claves CMBu-OH (butanol) y CMCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (diclorometano).

### 10.2 Cromatografía de la fracción butanólica obtenida de la bipartición del extracto hidroalcohólico de *C. mutica*

Se separaron 5.49 g de fracción butanólica para realizar la cromatografía en columna con sílice gruesa suspendida en acetato de etilo, la cual fue empacada en una columna de 30 mm de diámetro y 60 cm de largo. La muestra se absorbió en una cantidad similar de sílice gruesa en relación con la cantidad de la fracción y se colocó en la columna de la cual se obtuvieron fracciones de aproximadamente 125 mL mismas que fueron evaporadas para eliminar el disolvente con ayuda de un rotaevaporador.

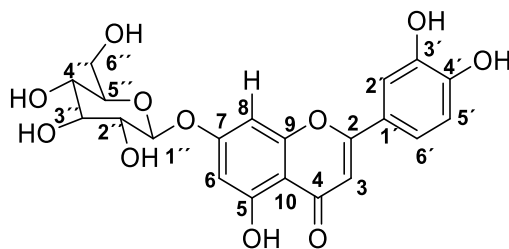
Se obtuvieron 86 fracciones que fueron reunidas en grupos de acuerdo con su homogeneidad observada por CCF. (Tabla 4).



Tabla 5 Cromatografía de la fracción butanólica obtenida de la bipartición del extracto hidroalcohólico de *C. mutica*.

Fase móvil	Fracciones	Reuniones
100% acetato de etilo	1-14	1,2,3,4,5-9,10-12,13-14
98:2 acetato de etilo: metanol	15-20	15, 16, 17,
95:5 acetato de etilo: metanol	21-29	18-35 (Ver sección 10.5)
90:10 acetato de etilo: metanol	30-40	36-38, 39-40
80:20 acetato de etilo: metanol	41-48	41-45, 46-48
70:30 acetato de etilo: metanol	49-56	49, 50-59
60:40 acetato de etilo: metanol	57-64	60-62 (60-72)
50:50 acetato de etilo: metanol	65-72	(Ver sección 10.3)
100 % metanol	73-86	73-80, 81-83, 84-86

Se separaron las fracciones 15 y 60-62 de este proceso las cuales contenían un sólido amarillo para ser analizadas por RMN bajo la clave CMHBu-01 (fracción 15) y CMHBu-02 (fracción 60-62).



7-O- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina (1)

CMHBu-01; Sólido amarillo.



RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.79 (s, 1H, OH sobre C5), 7.32 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-2'), 7.27 (dd,  $J = 8.3, 2.2$  Hz, 1H, H-6'), 6.86 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-5'), 6.64 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-8), 6.49 (s, 1H, H-3), 6.37 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-6), 4.94 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H, H-1''), 3.73-3.17 (m, 5H, H-2'',3'',4'',5''6''').

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  182.28 (C, C-4), 164.94 (C, C-7), 163.21 (C, C-2), 161.68 (C-OH, C-5), 157.34 (C, C-9), 149.96 (C, C-4'), 145.90 (C, C-3'), 121.97 (C, C1'), 119.14 (CH, C-6'), 116.19 (CH, C-5'), 113.62 (CH, C2'), 106.01 (C, C-10), 103.50 (CH, C-3), 100.65 (CH, C-6), 100.05 (CH, C-1''), 95.05 (C, C-8), 77.30 (C, C-3'''), 76.83 (C, C-5''), 73.36 (C, C-2''), 70.03 (C, C-4''), 61.34 (C-6'').

### 10.3 Cromatografía de la fracción 60-72 obtenida de la cromatografía de la fracción butanólica

Se separaron 117 mg de la fracción 60-72 mismos que se utilizaron para realizar una cromatografía en columna utilizando sílice gruesa y una columna de 10 mm de diámetro. La sílice fue suspendida en un sistema de elución 80:20 acetato de etilo: metanol, misma polaridad con la que se inició la columna.

Se obtuvieron 62 fracciones las cuales se reunieron por su similitud cromatográfica en 13 grupos (Tabla 5).

**Tabla 6 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 60-72 obtenida de la cromatografía de la fracción butanólica de *C. mutica***

Fase Móvil	Fracciones	Reuniones
80:20 acetato de etilo: metanol	1-10	1,2,3-11



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

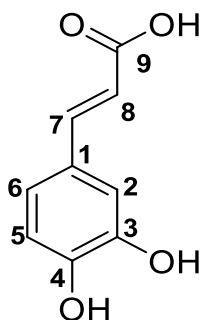
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



<b>75:25 acetato de etilo: metanol</b>	11-31	12, 13-14, 15, 16,17- 18, 19-20, 21-23, 24- 25, 26-29
<b>73:27 acetato de etilo: metanol</b>	32-39	30-36, 37-40
<b>70:30 acetato de etilo: metanol</b>	40-45	41-43, 44
<b>60:40 acetato de etilo: metanol</b>	46-53	<b>45-52</b> , 53-60,
<b>100% metanol</b>	54-62	61-62

De la fracción 45-52 se obtuvo un precipitado amarillo que se analizó por RMN bajo la clave CMHBu-03.



Ácido cafeico (2)

*CMHBu-03. Precipitado amarillo.*

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.44 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, H-8), 6.98 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H-6), 6.91 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 6.74 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-6), 6.24 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H, H-7).

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  167.10 (CO, C-9), 149.26 (C, C-4), 146.30 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 145.64 (C-C-3), 126.13(C, C-1) , 122.20 (CH, C-6), 116.54 (C, C-5), 115.23 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 115.14 (CH, C-2).



#### 10.4 Cromatografía de la fracción diclorometánica obtenida de la bipartición del extracto hidroalcohólico de *Coreopsis mutica*

Se utilizaron 7.92 g de la fracción de diclorometano para realizar una cromatografía en columna con sílice gruesa y una columna de 40 mm de diámetro a la cual se le adicionaron 8 pulgadas de sílice suspendida 100% diclorometano misma polaridad con la que inicio la columna obteniéndose, eluatos de 100 mL el disolvente fue eliminado con ayuda de un rotaevaporador.

Se obtuvieron 185 fracciones las cuales se reunieron en 26 fracciones (**Tabla 6**).

**Tabla 7 Cromatografía de la fracción diclorometánica de la bipartición del extracto hidroalcohólico de *C. mutica***

Fase móvil	Fracciones	Reuniones
100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1-25	1, 2-4, <b>5</b> ( <i>Ver sección 11.11</i> ), 6-15
95:5 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	26-35	16-35
90:10 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	36-51	<b>36</b> , 37-39, 40-50
85:15 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	52-65	51-58, 59-69
80:20 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	66-79	70-80
70:30 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	80-93	81-85, 86-90, 91-95
65:35 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	94-109	96-105, 106-110
60:40 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	110-121	111-113, 114-119
50:50 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	122-135	120-125, 126-135





Fase móvil	Fracciones	Reuniones
100% acetona	136-149	137-140, 141-147, <b>148-157</b> (Ver sección 10.6)
100% CH <sub>3</sub> OH	150-185	158-165, 166-175, 176-185

La fracción 5 se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CM-EG) bajo la clave **C3-Fx5**. Los resultados se muestran en la *sección 11.11*.

La fracción 36 se analizó por RMN bajo la clave **BAG05-004**. Se trata de un polvo amarillo que fue identificado como ácido cafeico.

### 10.5 Purificación de la fracción 18-35 obtenida de la cromatografía del extracto butanólico.

Se obtuvieron 1.312 g de la fracción 18-35, de la cual se tomaron 1.260 g para realizar una recromatografía en columna con sílice gruesa suspendida en un sistema 90:10 diclorometano: metanol, el cual también fue la fase móvil inicial; la columna utilizada fue de 20 mm de diámetro y se obtuvieron eluatos de 50 mL los cuales se concentraron en un rotaevaporador y se monitorean por CCF.

Se obtuvieron 133 fracciones que se reunieron en 15 grupos por su similitud cromatográfica (Tabla 7).

**Tabla 8 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 16-35 obtenida de la cromatografía de la fracción butanólica de *C. mutica***



Fase móvil	Fracciones	Reuniones
90:10 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	1-24	1-4, 5-6, 7-9, 10-15, 16-19, 20-26
88:12 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	25-45	27-36, 37-45
85:15 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	46-58	46-57
80:20 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	59-73	58-77
78:28 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	74-83	
75:25 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	84-89	78-86
70:30 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	90-96	
60:40 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	97-104	<b>87-112</b>
50:50 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	105-112	
100% CH <sub>3</sub> OH	113-133	113-133

En la fracción 87-112 se observó un precipitado amarillo que se separó por sedimentación del cual se obtuvieron 25 mg que fueron analizados mediante RMN bajo la clave **BAG05-003** identificándose como ácido cafeico.

### 10.6 Extracción en Fase Sólida

Se obtuvieron 115 mg de la fracción 148-157 de la cromatografía de la fracción de diclorometano. Se separaron 110 mg para realizar una extracción en fase sólida. La muestra se disolvió en 5 mL de agua y se utilizó un cartucho C18 de fase reversa, el cual se saturó con metanol y posteriormente con agua. Las fracciones tienen un volumen de 10 mL



recolectadas en tubos. El primer tubo de carga (TL) pertenece al volumen en el que fue disuelta la muestra. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por CCF.

Se agrego la muestra disuelta y como fase móvil se utilizaron los siguientes sistemas:

**Tabla 9 Sistemas utilizados en la extracción en fase solida de la fracción 148-157 obtenida de la cromatografía del extracto diclorometánico de *C. mutica***

Sistema	Fracción	Rendimiento
Carga de la muestra	T-L	40 mg/ 36.36 %
9:1 agua: metanol	T-1	31 mg/ 28.18 %
7:3 agua: metanol	T-2	13 mg/ 11.81 %
5:5 agua: metanol	T-3	7 mg / 6.3%
7:3 agua: metanol	T-4	2 mg/ 1.8 %
100% metanol	T-5	3 mg / 2.72 %

Las fracciones TL y T-1 fueron analizadas mediante RMN bajo las claves **BAG05-001 (T-L)** y **BAG05-002 (T-1)**. Se identifico ácido cafeico.

#### 10.7 Fraccionamiento del extracto metanólico de *Coreopsis mutica*

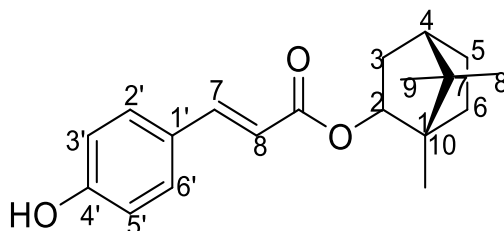
A partir de 50 g de extracto metanólico de *C. mutica* se realizó una cromatografía en columna (50 mm de diámetro) empacada con sílice gruesa suspendida en 100% de diclorometano como fase móvil, aumentando la polaridad gradualmente. Se obtuvieron 130 fracciones que se reunieron por similitud cromatográfica, la fracción 13-15 se analizó por RMN bajo la clave BAG05-010 (Tabla 10).

**Tabla 10 Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de *C. mutica*.**



Fase móvil	Fracciones	Reuniones
100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1-24	1, 2, 3, 4, 5-7, 8-9, 10-12, <b>13-15</b> , 16-18, 19-26
95:5 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	25-38	27-28, 29-30, 31-32, 33-39
90:10 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	39-54	<b>40-44</b> , 45-48, 49-53
80:20 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	55-67	54-56, 57-63, 64-69
70:30 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	68-80	70-74, 75-80
60:40 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	81-94	81-88, 89-95
50:50 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : CH <sub>3</sub> OH	95-106	96-99, <b>97 (Ver sección 10.8)</b> , 100- 110
100% CH <sub>3</sub> OH	107-122	11-119
85:15 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : H <sub>2</sub> O	123-129	120-129

Se analizó mediante RMN la fracción 13-15 bajo la clave **BAG05-010** el cual se observó como un precipitado café que se identificó como cumarato de bornilo.



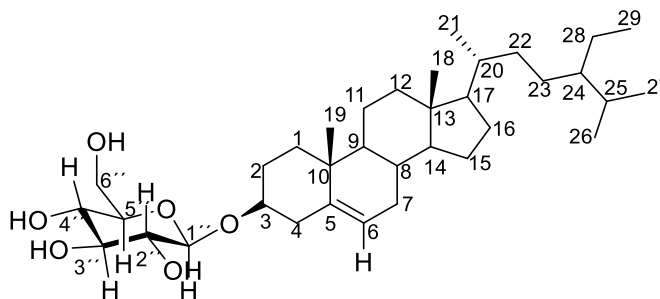
**Cumarato de bornilo (3)**

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.59 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, H-β), 7.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-2'6'), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-3'5'), 6.30 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, H-α), 4.99 (ddd, *J* = 9.9, 3.5, 2.0 Hz, 1H, H-2), 2.38 (dddd, *J* = 13.1, 9.8, 7.9, 4.3 Hz, 1H, H-3b), 2.05 – 1.97 (m, 1H, H-6a), 1.68 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-4), 1.04 (dd, *J* = 13.8, 3.6 Hz, 1H, H-3a), 0.91 (s, 3H, H-8), 0.87 (s, 3H, H-9), 0.86 (s, 3H, H-10).



RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.44 (CO), 144.56 (CH, C-7'), 129.98 (CH, C2'), 126.83, 115.95 (CH-C-2), 115.65 (CH<sub>2</sub>-C-8'), 80.24 (CH-C-2), 48.95, 47.84, 44.95 (CH-C-4), 36.84 (CH<sub>2</sub>, C-3), 28.05 (CH<sub>2</sub>, C-5), 27.23 (CH<sub>2</sub>, C-6), 19.71 (CH<sub>3</sub>, C-9), 18.84 (CH<sub>3</sub>, C-8), 13.54 (CH<sub>3</sub>, C-10).

La fracción 40-44 presentó un precipitado blanco parcialmente soluble en DMSO. Se hizo una cromatoplaque comparativa donde se identificó como **glucósido  $\beta$ -sitosterol**.



**Glucósido  $\beta$ -sitosterol (16)**

### 10.8 Recromatografía de la fracción 97 de la cromatografía del extracto metanólico

A partir de la fracción 97 obtenida de la cromatografía del extracto metanólico se realizó una recromatografía en una columna de 25 mm que se empaco con 45 g de sílice suspendida con 80:20 acetato de etilo: metanol. La muestra se absorbió en 470 mg de sílice y se inició la columna con una polaridad de 80:20 acetato de etilo: metanol obteniéndose fracciones de un volumen de 50 mL que fueron concentradas en un rotaevaporador. Se obtuvieron 76 fracciones que fueron reunidas por similitud cromatográfica en 7 fracciones (**Tabla 11**).

**Tabla 11 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 97 de la cromatografía del extracto metanólico de *C. mutica***

Fase móvil	Fracciones	Reuniones
80:20 acetato de etilo: metanol	1-17	1, 2, 3-16 ( <i>Ver sección 10.9</i> )



<b>75:25 acetato de etilo: metanol</b>	18-37	17, 18-22, 23, 24-26, 27-36
<b>70:30 acetato de etilo: metanol</b>	38-47	37-48
<b>50:50 acetato de etilo: metanol</b>	48-61	49, 50-61
<b>100% metanol</b>	62-76	62-76

### 10.9 Recromatografía de la fracción 3-16 obtenida de la recromatografía de la fracción 97 del extracto metanólico.

180 mg de la fracción 3-16 de la recromatografía de la fracción 97 del extracto metanólico fueron utilizados para recromatografía en columna, utilizando una columna de 10 mm que se empaco con 4 g de sílice flash y fue suspendida en 100% acetato de etilo y absorbida en 150 mg de sílice flash. Se obtuvieron fracciones de 10 mL (**Tabla 12**).

**Tabla 12 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 3-16 obtenida de la recromatografía de la fracción 97 del extracto metanólico de *C. mutica***

Fase móvil	Fracciones	Reuniones
<b>100% acetato de etilo</b>	1-23	1, 2, 3, 4, 5-11, 12, 13- 14, <b>15-25</b>
<b>98:2 acetato de etilo: metanol</b>	24-44	26-33, 34-40
<b>95:5 acetato de etilo: metanol</b>	45-57	41-48, 49-57
<b>100% metanol</b>	58-65	58-65



Se obtuvieron 65 fracciones que se reunieron en ocho grupos de acuerdo con su similitud cromatográfica. Se analizó la fracción 15-25 por RMN bajo la **clave BAG05-012**.

### 10.10 Fraccionamiento del extracto acetónico

Fue realizado en el Laboratorio 211 del Centro de Investigaciones Químicas por la Q.I. Zurisaday Villegas González. A partir de este extracto se identificaron el cafeato y cumarato de bornilo como compuestos mayoritarios, los que fueron analizadas por RMN bajo las claves BAG05-007 y BAG05-009.

El proceso de la obtención y purificación de los compuestos a partir del fraccionamiento del extracto acetónico se describe a continuación:

Se utilizó una columna de 60 mm de diámetro y 70 cm de largo, empacada con 6'' de gel de sílice y aplicando 45 g del extracto previamente adsorbido en 30 g de gel de sílice. La elución del proceso se inició con *n*-hexano al 100%, incrementando la polaridad del sistema por la adición de acetona, hasta finalizar con este último disolvente al 100%. Se obtuvieron 146 fracciones de 350 mL los cuales fueron evaporados con la ayuda de un rotaevaporador **Tabla 13**. Al realizar el cambio de polaridad de 90:10 a 80:20 hexano:acetona, se observó un precipitado color blanco a partir de la fracción 50 y hasta la fracción 73.

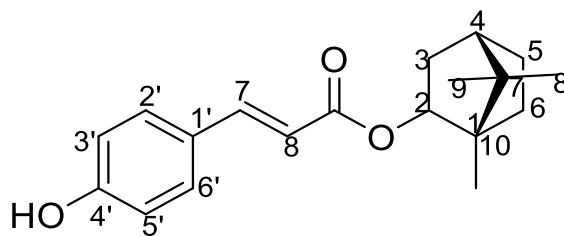
**Tabla 13 Fraccionamiento cromatográfico del extracto acetónico de *C. mutica***

Fase móvil	Fracciones	Reuniones
100% Hexano	1-12	1-2, 3-4, 5-13
95:5 Hexano: acetona	13-24	14, 15-16, 17-18, 19-22, 23-25



Fase móvil	Fracciones	Reuniones
90:10 Hexano: acetona	25-47	26-46
80:20 Hexano: acetona	48-67	47-50, 51-73 (Ver sección 10.11)
70:30 Hexano: acetona	68-78	74-78
60:40 Hexano: acetona	79-96	79-85, 86-91, 92-93
50:50 Hexano: acetona	97-111	94-99, 100-113
40:60 Hexano: acetona	112-126	114-118, 119-120, 121, 122-129
30:70 Hexano: acetona	127-138	130, 131-133, 134-140
100% Acetona	139-146	141-143, 144-146

Se procedió a preparar la fracción 26-46 para su análisis mediante experimentos de RMN bajo la clave BAG05-009. Con base en lo observado mediante CCF, se procedió a realizar recromatografía de la fracción 51-73.



Cumarato de bornilo (3)

#### BAG05-009

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.59 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H, H $\beta$ ), 7.40 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2'6'), 6.83 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3'5'), 6.30 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H, H $\alpha$ ), 4.99 (ddd,  $J = 9.9, 3.5, 2.0$  Hz, 1H, H-2), 2.38 (dddd,  $J = 13.1, 9.8, 7.9, 4.3$  Hz, 1H, H-3b), 2.05 – 1.97 (m, 1H, H-6a), 1.68 (t,  $J = 4.4$  Hz, 1H, H-4), 1.04 (dd,  $J = 13.8, 3.6$  Hz, 1H, H-3a), 0.91 (s, 3H, H-8), 0.87 (s, 3H, H-9), 0.86 (s, 3H, H-10).





$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.44 (CO), 144.56 (CH, C-7'), 129.98 (CH, C2'), 126.83, 115.95 (CH-C-2), 115.65 (CH<sub>2</sub>-C-8'), 80.24 (CH-C-2), 48.95, 47.84, 44.95 (CH-C-4), 36.84 (CH<sub>2</sub>, C-3), 28.05 (CH<sub>2</sub>, C-5), 27.23 (CH<sub>2</sub>, C-6), 19.71 (CH<sub>3</sub>, C-9), 18.84 (CH<sub>3</sub>, C-8), 13.54 (CH<sub>3</sub>, C-10).

### 10.11 Recromatografía de la fracción 51-73 obtenida de la cromatografía del extracto acetónico de *C. mutica*

Mediante el análisis de CCF se determinó realizar una CC de las fracciones 51-73 del extracto acetónico, utilizando 6.942 g de las fracciones, adsorbiéndolos en 6 g de sílice flash. Se montó una columna de 50 mm de diámetro por 40 cm de largo, utilizando 6 pulgadas de sílice flash (200:400) como fase estacionaria. La elución se inició con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  al 100%, realizando cambios de polaridad de forma ascendente con la adición de acetona, obteniendo 141 fracciones de 50 mL, y agrupadas de acuerdo con su similitud observada mediante CCF.

**Tabla 14 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción 51-73 de la cromatografía del extracto acetónico de *C. mutica***

Fase móvil	Fracciones	Reuniones
100% $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1-65	7-12, 13-29, 30-35, <b>51-60, 36-73 (Ver sección 10.12)</b>
98:2 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Acetona	66-87	74-78, 79-89
95:5 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Acetona	88-99	90-100
90:10 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Acetona	100-113	101-108, 109, 110-113
80:20 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Acetona	114-131	114-120, 121, 122-123, 124-130

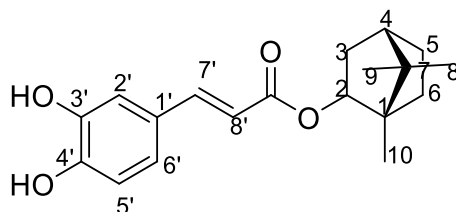


100% Acetona

132-141

131-134, 135-137, 138-141.

En las fracciones 51-60 se obtuvo un precipitado color blanco, el cual fue purificado mediante precipitación y preparado experimentos de RMN con la clave BAG05-007.



#### Cafeato de bornilo (4)

**BAG05-007; Solido blanco.**

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, Acetona- $d_6$ )  $\delta$  7.54 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H, H-7'), 7.16 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H-2'), 7.04 (dd,  $J = 8.2, 2.1$  Hz, 1H, H-6'), 6.86 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-5'), 6.31 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H, H-8'), 4.97 (ddd,  $J = 9.9, 3.6, 2.1$  Hz, 1H, H-2), 2.36 (dddd,  $J = 13.4, 9.9, 4.7, 3.3$  Hz, 1H, H-3b), 2.10 – 1.97 (m, 2H, H6), 1.77 (q,  $J = 4.1$  Hz, 1H, H-5b), 1.69 (q,  $J = 4.2$  Hz, 1H, H-4), 1.41 (dd,  $J = 4.1, 2.4$  Hz, 1H, H-6b), 1.32 – 1.18 (m, 1H, H-5a), 1.01 (dd,  $J = 13.6, 3.7$  Hz, 1H, H-3a), 0.93 (s, 3H, H-9), 0.89 (s, 3H, H-8), 0.85 (s, 3H, H-10).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz, Acetona- $d_6$ )  $\delta$  167.60 (CO), 148.62 (C, C-4'), 146.24 (C, C-3'), 145.26 (CH, C-7'), 127.57 (C- C-1'), 122.38 (CH, C-H-6'), 116.24 (CH, C-8'), 116.01 (CH, C-2'), 115.07 (CH, C-5'), 47.7 (C, C-7), 45.69 (CH, C-4), 37.49 (CH, C-3), 28.55 (CH, C-5), 27.77 (CH, C-6), 19.92 (CH<sub>3</sub>, C-8), 19.03 (CH<sub>3</sub>, C-9), 13.78 (CH<sub>3</sub>, C-10).

#### 10.12 Recromatografía de la fracción 36-73 de la recromatografía de la fracción 51-73 del extracto acetónico de *C. mutica*.

Se reunieron 2.4 g de las fracciones 36-73 de la recromatografía de la fracción 51-73 del extracto acetónico. Se adsorbieron en sílice flash y se colocaron en una columna de 5.5 cm



de diámetro previamente empacada con sílice flash (200:400). Inicialmente se utilizó como fase móvil  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  al 100% y se incrementó la polaridad adicionando acetona, hasta terminar en un sistema de elución 95:5 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : acetona). Los eluatos 1 a 48 se colectaron de 50 mL y a partir del 49 se colectaron de 100 mL. En este proceso cromatográfico se obtuvo un total de 158 fracciones (**Tabla 15**), las cuales fueron concentrados en un rotaevaporador y reunidos de acuerdo con su similitud observada en CCF.

**Tabla 15 Proceso cromatográfico de la fracción 36-73 obtenida de la recromatografía de la fracción 51-73 del extracto acetónico de *C. mutica***

Fase Móvil	Fracciones	Reuniones
100% $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1-67	1-17, 18, 19-25, 26-33, 34-38, 39-44, 45-49, 50-54, 55-62, 63-65, 66-69
99:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Acetona	68-130	70-71, 72-73, 74-99, 100-101, 102, 103-109, 110-119, 120-131
98:2 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Acetona	131-142	132-139, <b>140-148</b>
95:5 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Acetona	143-158	149-152, 153-158

A partir de la fracción 140 hasta 148 se pudo observar un precipitado que se comparó con cafeato de bornilo mediante CCF, identidad que fue comprobada mediante RMN con la siguiente clave **BAG005-005 (140-148). Precipitado blanco. Cafeato de bornilo**

### 10.13 Fraccionamiento del extracto hexánico de *Coreopsis mutica*

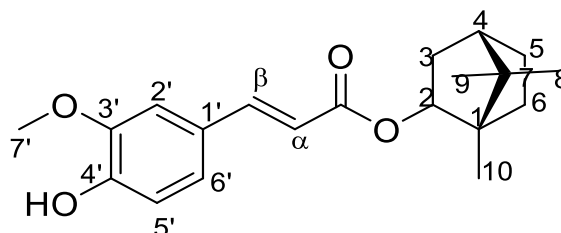
En ensayos cromatográficos previos a este trabajo se fraccionó el extracto hexánico del cual se obtuvo en forma de cristales blancos el ferulato del bornilo el cual se analizó por RMN bajo la clave BAG05-008.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**Ferulato de bornilo (5)**

**BAG05-008, Cristales blancos.**

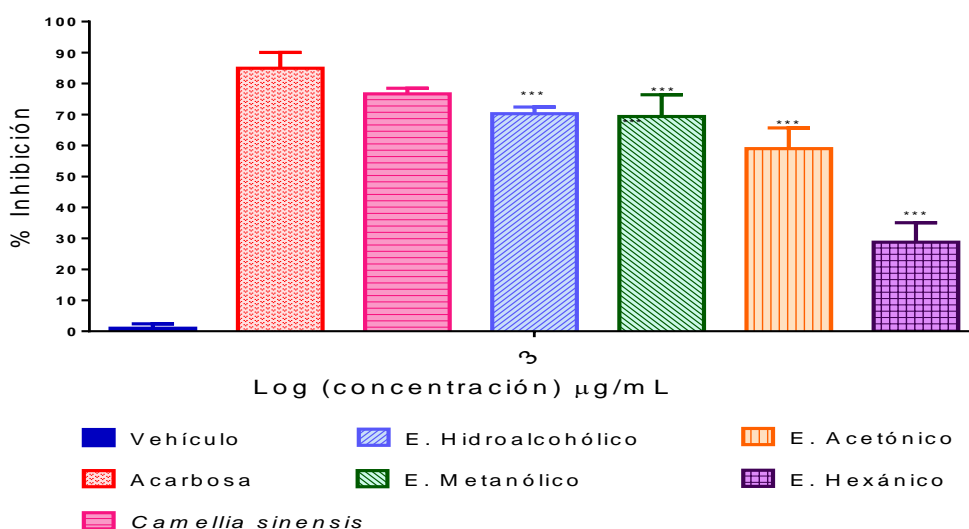
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.59 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ), 7.08 (dd,  $J = 8.2, 1.9$  Hz, 2H,  $\text{H-6}'$ ), 7.04 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H,  $\text{H-2}'$ ), 6.91 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H,  $\text{H-5}'$ ), 6.32 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H,  $\text{H-}\alpha$ ), 5.01 (ddd,  $J = 9.9, 3.5, 2.1$  Hz, 1H,  $\text{H-2}$ ), 3.93 (s, 3H,  $\text{H-7}'$ ), 2.41 (dddd,  $J = 13.5, 9.9, 4.6, 3.3$  Hz, 1H,  $\text{H-3a}$ ), 2.16 – 1.93 (m, 1H,  $\text{H-6a}$ ), 1.70 (t,  $J = 4.3$  Hz, 1H,  $\text{H-4}$ ), 1.37 – 1.21 (m, H,  $\text{H-6b}$ ), 1.05 (dd,  $J = 13.7, 3.5$  Hz, 1H,  $\text{H-3a}$ ), 0.94 (s, 3H,  $\text{H-9}$ ), 0.89 (s, 3H,  $\text{H-8}$ ), 0.88 (s, 3H,  $\text{H-10}$ ).

**10.14 Ensayo de inhibición de enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de los extractos obtenidos de *C. mutica***

Se evaluaron los extractos de *C. mutica* a una concentración exploratoria de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , los resultados indican que todos los extractos tienen actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas estadísticamente significativa frente al vehículo, siendo los extractos de mayor polaridad (hidroalcohólico y metanólico) los que presentan mayor porcentaje de inhibición (70.25% y 69.33%), mientras que los extractos menos polares (acetónico y hexánico) también mostraron actividad inhibitoria sobre enzimas  $\alpha$ -glucosidasas pero en menor porcentaje que los extractos polares (58.99% y 28.75%) (**Gráfica 1**), se utilizó acarbosa como fármaco de referencia y dado que el té verde (*Camellia sinensis*) es bien conocido por su actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -glucosidasas (Y. Wang et al., 2012) se utilizó extracto acuoso de té verde



(té verde puro Twinings®) como control positivo obteniéndose 76.69 % de inhibición. Por lo que se asume, que la mayor cantidad de metabolitos con potente actividad inhibitoria se encuentran en los extractos polares de *C. mutica* así es que se prosiguió a la purificación e identificación de los metabolitos contenidos en los extractos mediante técnicas cromatográficas convencionales.

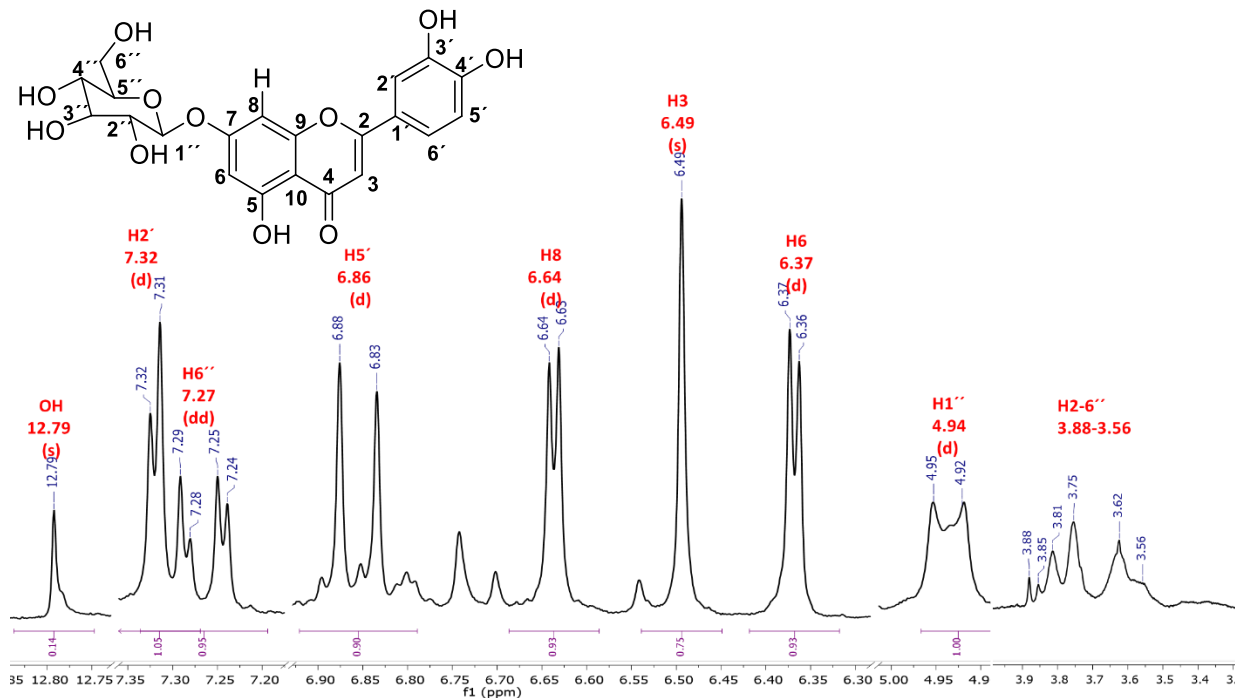


**Gráfica 1** Actividad inhibitoria de los extractos hidroalcohólico, hexánico, acetónico y metanólico de *C. mutica* sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas. [1000  $\mu\text{g/mL}$ ] cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=8 vs vehículo. Acarbosa y extracto acuoso de *Camellia sinensis* fueron usados como control positivo. Con un valor de  $***P < 0.0001$  determinado por un análisis estadístico de la prueba ANOVA, seguida de una prueba Dunnet.

## 11. DISCUSIÓN

### 11.1 Caracterización espectroscópica por $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido de luteolina

En la fracción CMHBu-01, se identificaron dos compuestos por medio de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido de luteolina) y ácido cafeico en las fracciones que fueron etiquetadas bajo las claves BAG005-003, BAG05-004 y BAG05-005.



Espectro 1 RMN <sup>1</sup>H de Luteolina-7-O-β-glucopiranosido. 200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>

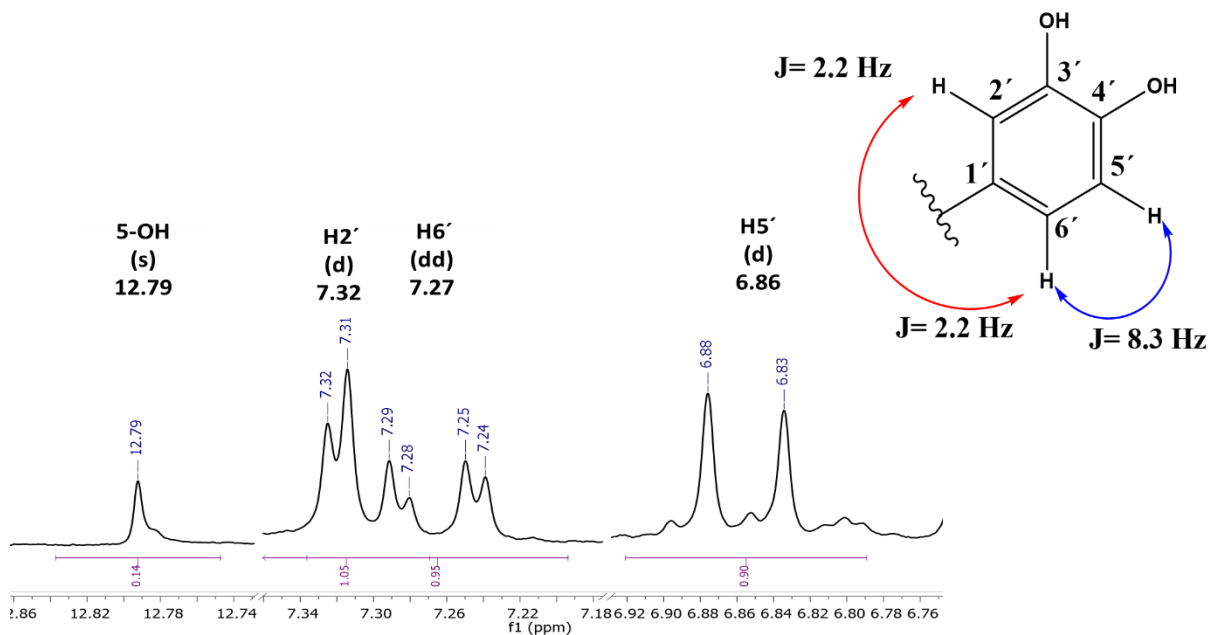
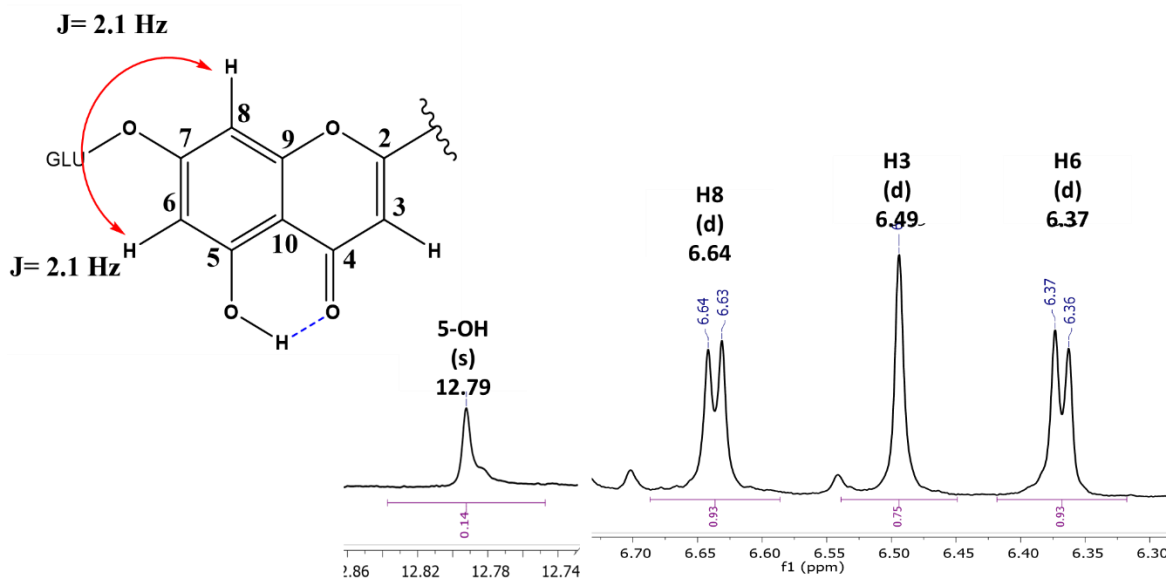


Figura 18 Espectro de los acoplamientos *meta* y *orto* de 7-O-β-glucopiranosido de luteolina.



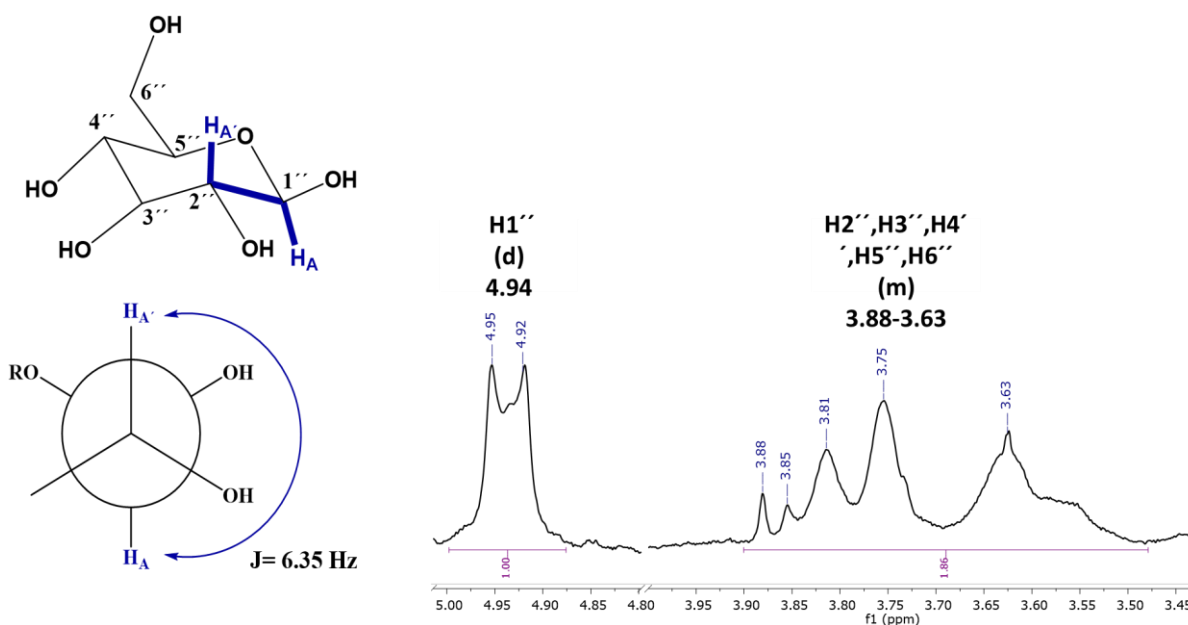
La señal que se encuentra a un desplazamiento de 7.32 ppm integra para un hidrógeno y presenta una multiplicidad doble con una constante de acoplamiento de 2.2 Hz, por lo que se asigna al hidrógeno de la posición 2', el cual se acopla en posición *meta* con el hidrógeno 6' que se designa por la señal desplazada a 7.27 ppm que integra para un hidrógeno, y presenta multiplicidad doble de doble por lo que tiene una constante de acoplamiento adicional de 8.3 Hz, esto indica que H6' se acopla en posición *orto* con la señal en 6.83 ppm que integra para un hidrógeno y que presenta multiplicidad de doble con una constante de 8.3 Hz, por lo que se asigna al hidrógeno 5'.



**Figura 19** Espectro del acoplamiento *orto* en el anillo A de 7-O-β-glucopiranosido de luteolina.

Por otro lado, como un singulete se observa una señal a 12.79 ppm que corresponde a el hidrógeno del hidroxilo en posición 5 el cual se encuentra a campo muy bajo por el enlace de puente de hidrogeno que forma con el oxígeno en posición 4 los puentes de hidrogeno

alargan el enlace O-H reduciendo la densidad de electrones de valencia alrededor del proton el cual se ve más desprotegido y desplazado a campo bajo, a 6.64 ppm se observa una señal que integra para un hidrógeno con multiplicidad doble y constante de acoplamiento de 2.1 Hz, la cual comparte con la señal a 6.37 ppm, que integra para un hidrógeno y presenta multiplicidad doble y una constante de acoplamiento de 2.1 Hz, por lo que se asigna al protón 6, el cual se encuentra en posición *orto* con el hidrógeno 8. La señal a 6.49 ppm que aparece como una señal simple, integra para un hidrógeno y se asignó al hidrógeno 3.



**Figura 20** Espectro del acoplamiento del protón anomérico 7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina.

La señal que se encuentra en 4.94 ppm que integra para un hidrógeno y que tiene una multiplicidad doble con una constante de acoplamiento de 6.35 Hz es atribuible al protón anomérico 1'' de la glucosa, el espectro muestra una serie de señales entre 3.88 ppm y 3.63 ppm, atribuibles al resto del azúcar.





FACULTAD DE FARMACIA

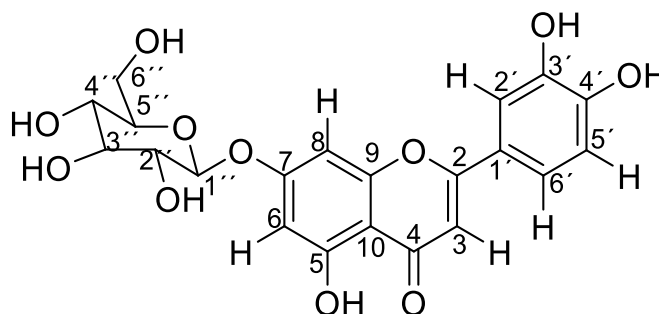


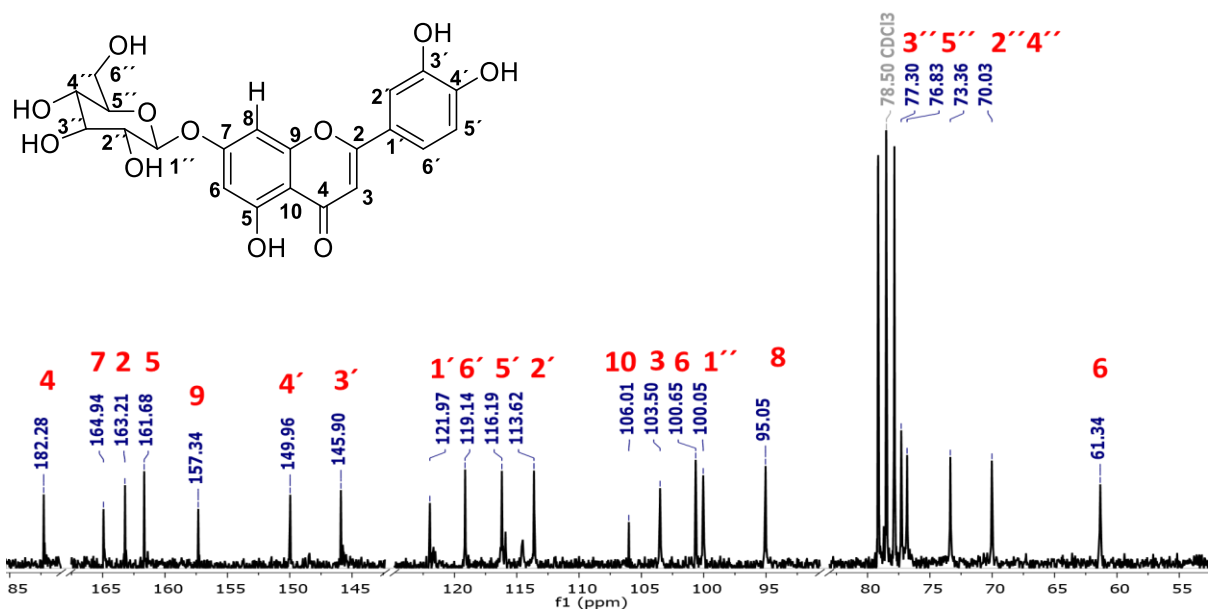
Figura 21 7-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosido de Luteolina (1)

Tabla 16 Comparación de los desplazamientos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de 7-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosido de luteolina. (B. Wang & Hu, 2013).

Posición	(200 y 50 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).		(400 y 100 MHz DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )		Tipo de carbono
	$\delta\text{C}$	$^1\text{H}$ Experimental $\delta\text{C}$ (J: Hz)	$\delta\text{C}$	$^1\text{H}$ Reportado $\delta\text{C}$ (J: Hz)	
C-4	182.29		181.9		C
C-7	164.95		164.3		C
C-2	163.22		164.2		C
C-5	161.68	12.79 (s)	159.8	12.98 (s)	C-OH
C-9	157.25		157.3		C
C-4'	149.91		149.9		C
C-3'	145.90		145.6		C
C-1'	121.97		121.0		C
C-6'	119.14	7.35 (dd, 8.3; 2.2)	119.3	7.46 (dd, 8.0; 2.1)	CH
C-5'	116.20	6.93 (d, 8.3)	115.8	6.88 (d, 8.0)	CH
C-2'	113.62	7.40 (d, 2.2)	113.7	7.41 (d 2.1)	CH
C-10	105.56		105.2		C
C-3	103.04	6.57 (s)	103.4	6.74 (s)	CH
C-6	99.58	6.45 (d, 2.1)	99.5	6.43 (d, 1.9)	CH



C-8	95.05	6.72 (d, 2.1)	94.5	6.79 (d, 1.9)	CH
C-1''	100.20	5.02 (d, 6.3)	100.1	5.08 (d, 7.5)	CH
C-3''	76.83		77.5		
C-5''	76.36		76.4		
C-2''	72.91		73.1		
C-4''	69.576		69.7		
C-6''	60.87		60.6		



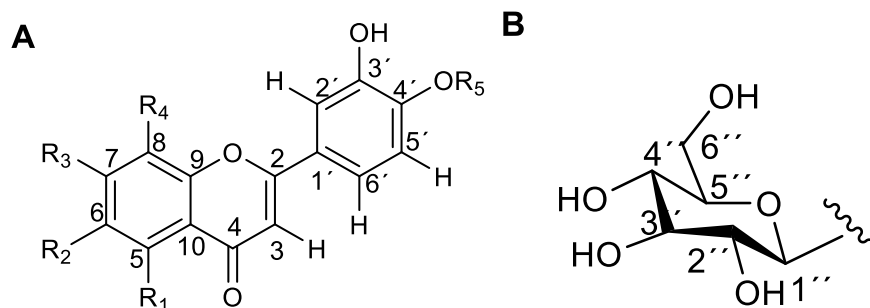
**Espectro 2** RMN  $^{13}\text{C}$  de Luteolina-7-O- $\beta$ -glucopiranosido. 50 MHz  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  (*Espectro 2*) se observan 21 señales correspondientes al total de los carbonos de la molécula, 15 de ellos corresponden al flavonoide y seis a la glucosa fragmentos inferidos por el análisis de RMN  $^1\text{H}$ . Así, la señal desplazada a campo más bajo en 182.2 ppm corresponde a un carbono de tipo carbonilo que es asignado al carbono 4, se encuentran señales de carbonos olefínicos a 163.2 y 103.5 ppm que se asignan a los carbonos 2 y 3, respectivamente. Tres señales de carbonos unidos a grupo hidroxilo en 161.8, 149.9 y



145.9 ppm se asignaron a los carbonos 5, 4' y 3' respectivamente. Los desplazamientos en 100.2 ppm (carbono anomérico), 76.8, 73.36, 72.92, 69.57 y 60.87 ppm corresponden a los carbonos del fragmento de glucosa y son asignados por comparación con los ya reportados. Adicionalmente los datos espectroscópicos, de la luteolina glicosilada obtenida en este trabajo, fueron comparados con los reportados en la literatura para aquellos que se encuentran glicosilados en diferentes posiciones (**I**, **II**, **III**, **IV**, **V**). Dado que los compuestos **II** y **III** están sustituidos en posición 6 y 8 respectivamente, las señales dobles en posición *orto* entre 6.3-6.8 ppm no se observan y sus carbonos anoméricos se encuentran a campo más alto. Por otro lado, el compuesto **IV** se encuentra glicosilado en posición 5, por lo que, si bien el resto de las señales es muy similar a las del compuesto aislado, este no cuenta con la señal de  $^1\text{H}$  a campo muy bajo que corresponde a la generada por el puente de hidrogeno en posición 5 que si se observa en el espectro del compuesto obtenido, por último el compuesto **V** con el glucósido en posición 4' en el anillo B del flavonoide, la señal del hidrogeno 5' (7.32 ppm) se encuentra a campo más bajo que la del compuesto de referencia (6.88 ppm) por la presencia del glicósido.

Los experimentos de RMN en 2D confirmarían la asignación de las señales del glucósido, así mismo los análisis de FAB/MS o ESI/MS, estos no fueron realizados ya que, las señales obtenidas fueron comparadas con las ya reportadas y se determinó que el compuesto obtenido esta glicosilado en posición 7, además de que el 7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina ha sido identificado en la mayoría de las especies de *Coreopsis* (Crawford & Smith, 1980).



**Figura 22** Estructura del flavonoide luteolina glucosilado en diferentes posiciones. A) Luteolina B) Glucósido

	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>
<i>I, Ia</i>	OH	H	<i>O</i> - $\beta$ -glucosa	H	OH
<i>II</i>	OH	H	OH	<i>C</i> - $\beta$ -glucosa	OH
<i>III</i>	OH	<i>C</i> - $\beta$ -glucosa	OH	H	OH
<i>IV</i>	<i>O</i> - $\beta$ -glucosa	H	OH	H	OH
<i>V</i>	OH	H	OH	H	<i>O</i> - $\beta$ -glucosa

**I.** Luteolina-7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido (Reportado)

**Ia.** Luteolina-7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido (Experimental)

**II.** Luteolina-8-*C*- $\beta$ -glucopiranosido

**III.** Luteolina-6-*C*- $\beta$ -glucopiranosido

**IV.** Luteolina-5-*O*- $\beta$ -glucopiranosido

**V.** Luteolina-4'-*O*- $\beta$ -glucopiranosido

**Tabla 17** Datos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los compuestos I-V

#	<b>I</b> (B. Wang & Hu, 2013) <i>DMSO-d6</i>		<b>Ia</b> ( <i>experimental</i> ) <i>DMSO-d6</i>		<b>II</b> (Rayyan et al., 2005) <i>CD3OD</i>		<b>III</b> (Rayyan et al., 2005) <i>DMSO-d6</i>		<b>IV</b> (Lin et al., 2001) <i>DMSO-d6</i>		<b>V</b> (Krenn et al., 2003) <i>CD3OD</i>	
	$\delta\text{H}$ ppm J (Hz)	$\delta\text{C}$ ppm	$\delta\text{H}$ ppm J (Hz)	$\delta\text{C}$ ppm	$\delta\text{H}$ ppm J (Hz)	$\delta\text{C}$ ppm	$\delta\text{H}$ ppm J (Hz)	$\delta\text{C}$ ppm	$\delta\text{H}$ ppm J (Hz)	$\delta\text{C}$ ppm	$\delta\text{H}$ ppm J (Hz)	$\delta\text{C}$ ppm
<b>2</b>	12.98; (s)	164.2	12.79; (s)	163.2		166.7		163.7		162.5		166.2
<b>3</b>	6.66 (s)	103.4	6.48; (s)	103.0	6.62; (s)	103.6	6.66; (s)	102.8	6.52; (s)	105.7	6.62; (s)	105.2



FACULTAD DE FARMACIA

	<b>I</b> (B. Wang & Hu, 2013) <i>DMSO-d6</i>		<b>Ia</b> ( <i>experimental</i> ) <i>DMSO-d6</i>		<b>II</b> (Rayyan et al., 2005) <i>CD<sub>3</sub>OD</i>		<b>III</b> (Rayyan et al., 2005) <i>DMSO-d6</i>		<b>IV</b> (Lin et al., 2001) <i>DMSO-d6</i>		<b>V</b> (Krenn et al., 2003) <i>CD<sub>3</sub>OD</i>	
<b>4</b>		181.9		182.2		184.1		181.9		176.8		183.7
<b>5</b>		159.8		161.6		162.6		160.7		158.6		163.2
<b>6</b>	6.43; d (1.9)	99.5	6.35; d (2.1)	99.5	6.36; (s)	99.3		108.9	6.69; d (2.1)	104.2	6.22; d (2.1)	100.3
<b>7</b>		164.4		164.5		164.5		163.3		161.3		165.4
<b>8</b>	6.79; d (1.9)	94.5	6.62; d (2.1)	95.0		105.7	6.47; (s)	93.5	6.78; d (2.1)	98.1	6.43; d (2.1)	95.2
<b>9</b>		157.3		157.2		158.1		156.2		158.3		159.4
<b>10</b>		105.2		105.5		105.1		103.4		108.5		105.4
<b>1'</b>		121.0		121.9		124.0		121.4		121.5		127.2
<b>2'</b>	7.41; d (2.1)	113.7	7.32; d (2.2)	113.2	7.64; (s)	114.9	7.39; d (2.2)	113.38	7.34- 7.37; (m)	113.2	7.45; d (2.4)	114.9
<b>3'</b>		145.6		145.9		147.0		145.8		145.6		148.6
<b>4'</b>		149.9		149.9		150.9		148.7		149.2		149.9
<b>5'</b>	6.88; d (8.0)	115.8	6.84; d (8.3)	116.2	6.99; d (8.2)	116.7	6.88; d (8.4)	116.1	6.87; d (8.9)	116.0	7.32; d (8.4)	117.9
<b>6'</b>	7.41; dd (8.0, 2.1)	119.3	7.27; dd (8.2, 2.2)	119.1	7.60; d (8.2)	120.9	7.50; (s)	119.0	7.34- 7.37; (m)	118.5	7.46; dd (8.4, 2.0)	119.8
<b>1''</b>	5.08 (d, 7.5)	100.1	4.93; d (7.4)	100.2	5.07; d (9.7)	76.2	4.57; d (9.7)	73.1	4.70; d (7.1)	104.4	4.95; d (7.5)	103.2
<b>2''</b>	3.49; t (9)	73.1	3.63- 3.75 (m)	72.9	4.20; t (9.5)	72.8	4.03; t (9.4)	70.2		73.6	3.55; t	74.8
<b>3''</b>	3.56; t (9)	77.5	3.63- 3.75	76.8	3.62; m	80.3	3.19; m	79.0		75.6	3.50; m	77.5
<b>4''</b>	3.42; t (9)	69.7	3.63- 3.75 (m)	69.5	3.78; t (9.2)	72.3	3.11; t (9.2)	70.7		69.7	3.40; m	71.3
<b>5''</b>	3.60; m	76.4	3.63- 3.75 (m)	76.3	3.56; m	82.9	3.15; m	81.6		77.5	3.50; m	78.5
<b>6''</b>	3.68; d (12. 0)	60.6	3.78; d (12.0)	60.8	4.06 m	62.2	3.68; dd (1.8, 12.0)	61.5		60.49	3.72; dd	62.4



## 11.2 Caracterización espectroscópica por $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de ácido cafeico

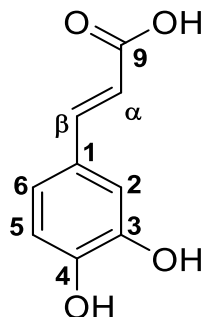
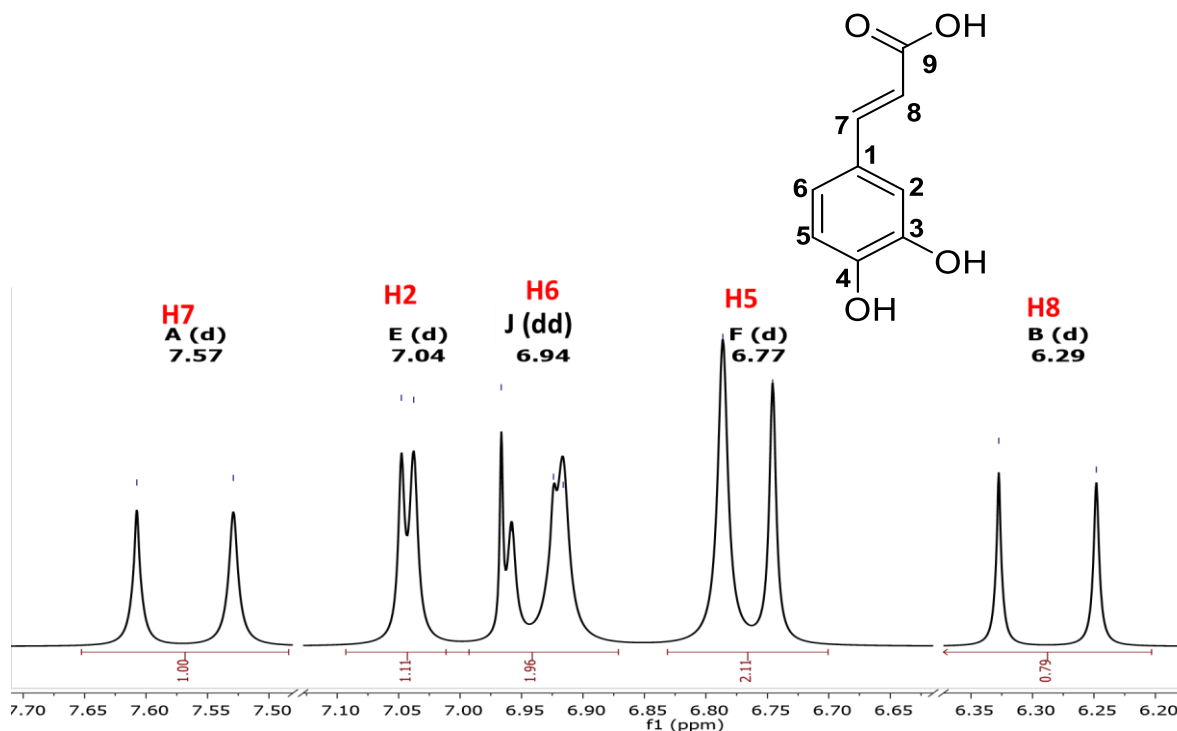


Figura 23 Ácido cafeico (2)

Tabla 18 Comparación de los desplazamientos en RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de Ácido cafeico (2)  
Acetona 400 MHz (Jeong et al., 2011)

Posición	$\delta\text{C}$	$^1\text{H}$ Experimental $\delta\text{C}$ (J: Hz)	$\delta\text{C}$	$^1\text{H}$ Reportado $\delta\text{C}$ (J: Hz)	Tipo de carbono
1	126.1		128.3		C
2	115.1	7.04 (d; 2.1)	115.7	7.07 (d; 2)	CH
3	145.6		147.2		C
4	149.2		149.8		C
5	116.5	6.77 (d; 8.2)	117.0	6.81 (d; 8.2)	CH
6	122.2	6.94 (d;8.2)	123.4	6.95 (d; 8.2)	CH
H- $\beta$	146.3	7.57 (d;15.7)	147.6	7.55 (d;15.9)	CH <sub>2</sub>
H- $\alpha$	115.2	6.29 (d;15.7)	116.0	6.24 (d;15.9)	CH <sub>2</sub>
9	167.1		171.6		CO



**Espectro 3** RMN  $^1\text{H}$  de Ácido Cafeico. 200 MHz, DMSO- $d_6$

En el espectro (**Espectro 3**) se observan cinco señales con multiplicidad doble y una señal simple, la señal desplazada a campo bajo se encuentra a 7.57 ppm tiene multiplicidad doble e integra para un hidrógeno y tiene una constante de acoplamiento de 15.7 Hz pertenece al protón vinílico  $\beta$  que tiene un acoplamiento tipo *trans* con el protón  $\alpha$ , el cual se asigna por la señal que aparece a un desplazamiento a 6.29 ppm, que también presenta multiplicidad doble e integra para un hidrógeno y presenta constante de acoplamiento de 15.7 Hz, concluyendo que se trata de un sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ - insaturado.

Adicionalmente, en 6.94 ppm aparece una señal que corresponde al hidrógeno 6 con multiplicidad doble de doble que integra para un hidrógeno, con una constante de



acoplamiento de 8.2 Hz que se acopla con un segundo hidrógeno (H-5) en posición *orto*, la segunda constante de acoplamiento es de 2.1 Hz que corresponde a un acoplamiento tipo *meta* con el hidrógeno 2. En 6.77 ppm se encuentra una señal con multiplicidad doble que integra para un hidrógeno y que comparte una constante de 8.2 Hz en posición *orto* con la señal del hidrógeno 6, por lo que se asume que se trata del hidrógeno 5, respectivamente, del anillo aromático. Finalmente, a 7.04 ppm se observa una señal doble que integra para un hidrógeno con una constante de acoplamiento de 2.1 Hz que se asigna al protón 2, que se está acoplando en posición *meta* con el hidrógeno 6 en la molécula del ácido cafeico.

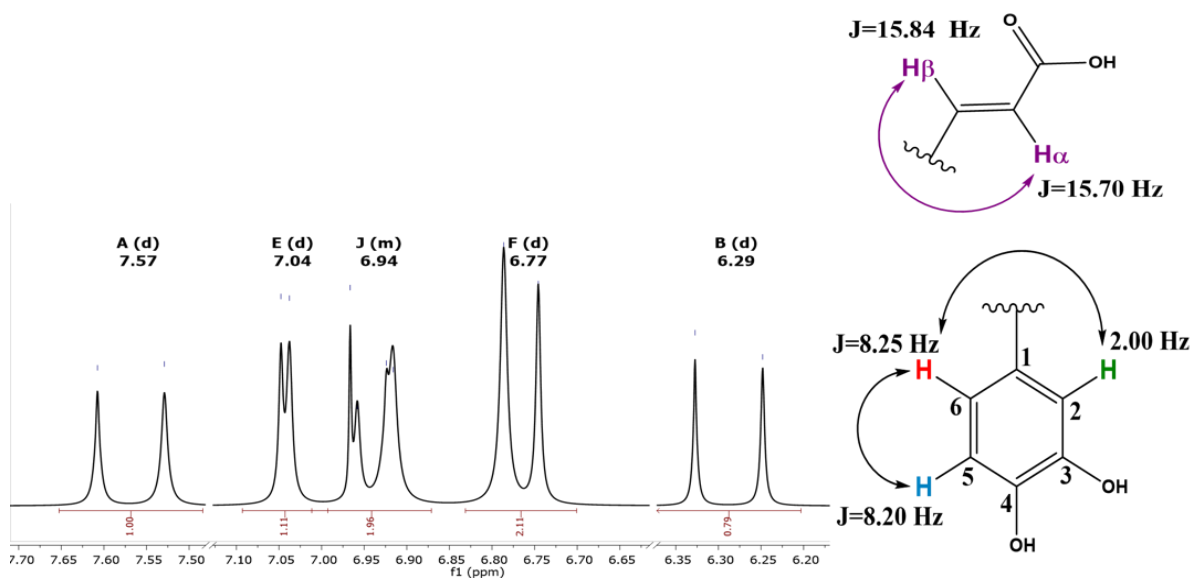
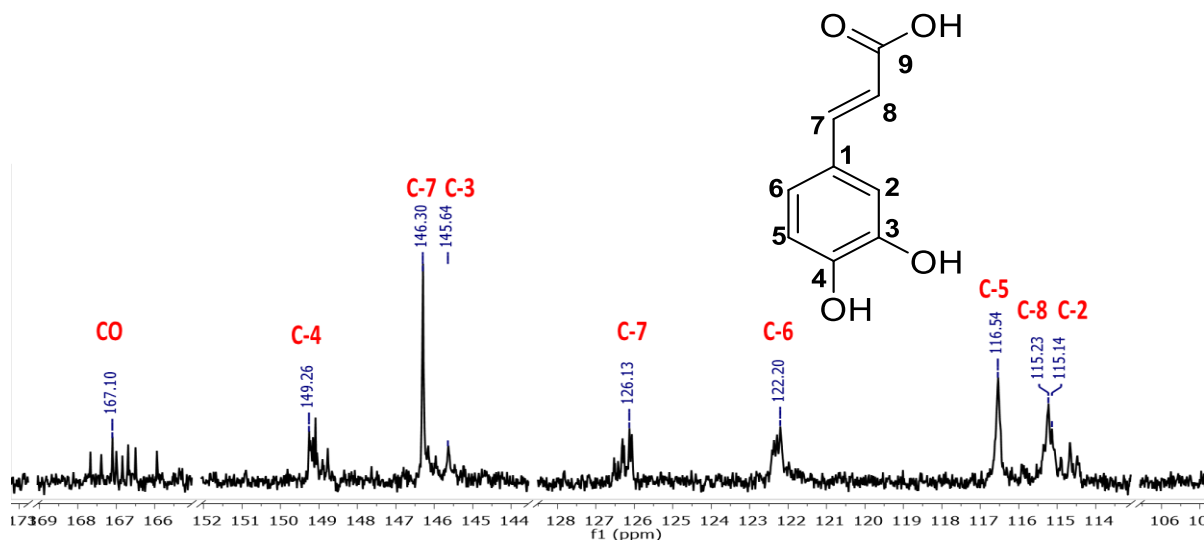


Figura 24 Espectro de los acoplamientos vinílico y *orto* de ácido cafeico.

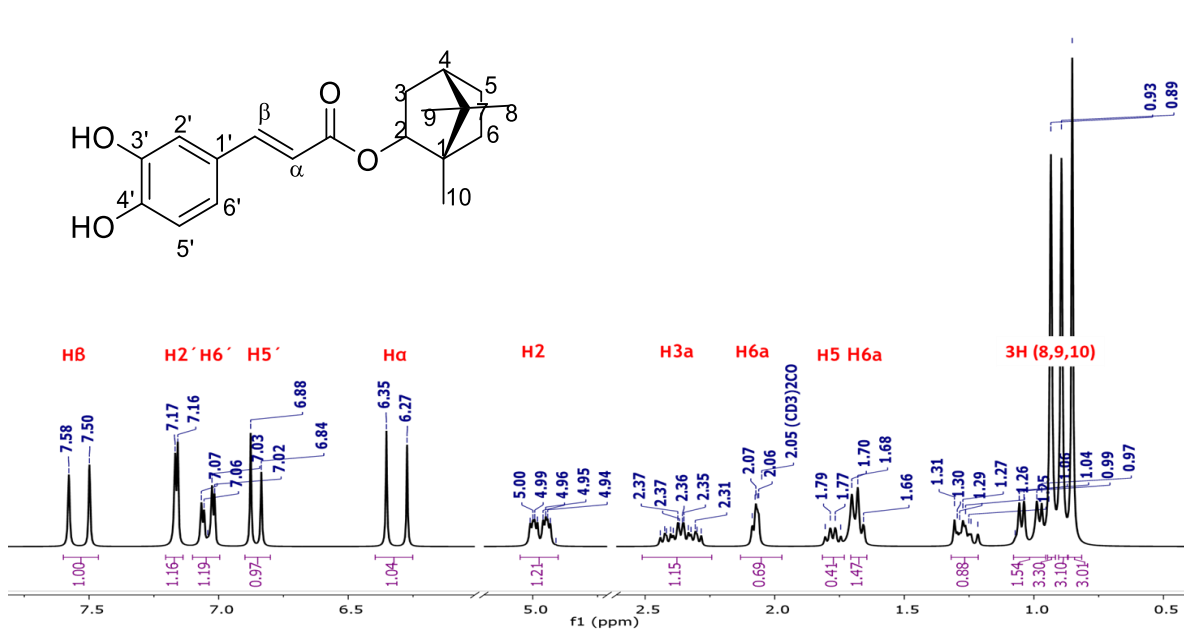




Espectro 4 RMN <sup>13</sup>C de Ácido Cafeico. 50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>

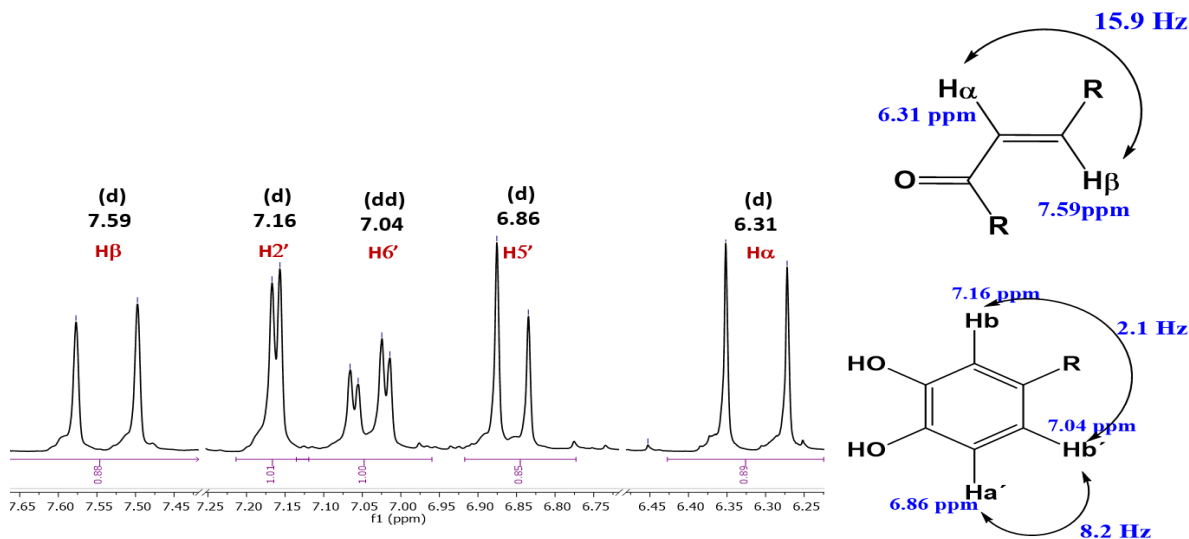
En el espectro 4 se observan 9 señales que corresponden a los carbonos de la estructura del ácido cafeico, en campo alto se observa una señal característica de carbono base de oxígeno a 167.10 ppm que corresponde al carbonilo del ácido carboxílico, a 194.26 y 145.64 ppm se encuentran las señales de carbonos unidos a grupos hidroxilos C-7 y C-8, los carbonos vinílicos se encuentran desplazados a 146.30 y 115.23 ppm, el resto de las señales corresponde a los carbonos del anillo aromático.

### 11.3 Caracterización espectroscópica por RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de cafeato de bornilo



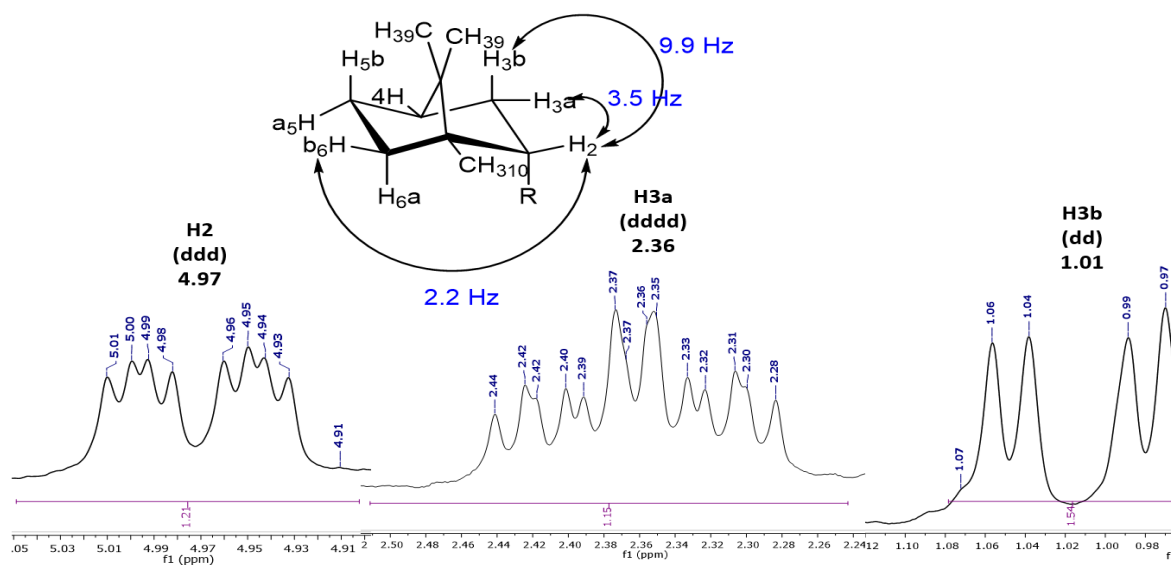
**Espectro 5** RMN  $^1\text{H}$  de cafeato de bornilo. 400 MHz, Acetona

Se identificaron señales con desplazamientos entre 6 y 7 ppm (**Espectro 5**), lo que sugiere la presencia de un sistema aromático, y a partir del análisis de los datos se identificó un sistema ABX. Se observa una señal en 7.54 ppm (H $\beta$  multiplicidad doble, integración para 1 hidrógeno) que comparte una constante de acoplamiento de 15.9 Hz con una señal doble en 6.31 ppm (H $\alpha$ ). La diferencia en el desplazamiento químico de estas señales indica que uno de los hidrógenos se encuentra fuertemente desprotegido, lo que conduce a suponer que se trata de hidrógenos vinílicos de un sistema  $\alpha$ - $\beta$  insaturado, una señal doble de doble en 7.04 ppm, que integra para un hidrógeno con dos constantes de acoplamiento de 2.1 y 8.2 Hz, esta última acoplada en *orto* con una señal doble en 6.89 ppm que integra para un hidrógeno y que corresponde al hidrógeno 6'.



**Figura 25** Espectro de los acoplamiento vinílico y *orto* de cafeato de bornilo.

A campo alto se observa una señal a 4.97 ppm (H2) con multiplicidad doble de doble de doble que integra para un hidrógeno, la cual tiene tres constantes de acoplamiento; 9.9 Hz con una señal doble de doble de doble de doble a 2.36 ppm (H3a), la segunda constante de 3.5 Hz que comparte con una señal doble de doble a 1.01 ppm (H3b) y la tercera constante de 2.0 Hz que se acopla por efecto W con una señal múltiple a 1.35 ppm (H6b).



**Figura 26** Acoplamiento de los protones en el anillo biciclo de cafeato de bornilo



Para la señal doble de doble de doble de doble en 2.36 ppm (H3a) la constante de acoplamiento de 13.3 Hz se acopla con el doble de doble del hidrógeno 3b (1.01 ppm), mientras que la constante de 4.7 Hz la comparte con una señal triple (H4) desplazado en 1.69 ppm, y por último, la constante de 3.2 Hz se acopla con una señal múltiple desplazada a 1.77 ppm que corresponde al hidrógeno 5a.

Estos datos fueron comparados con los ya descritos en la bibliografía y se determinó que el compuesto aislado es el cafeato de bornilo.

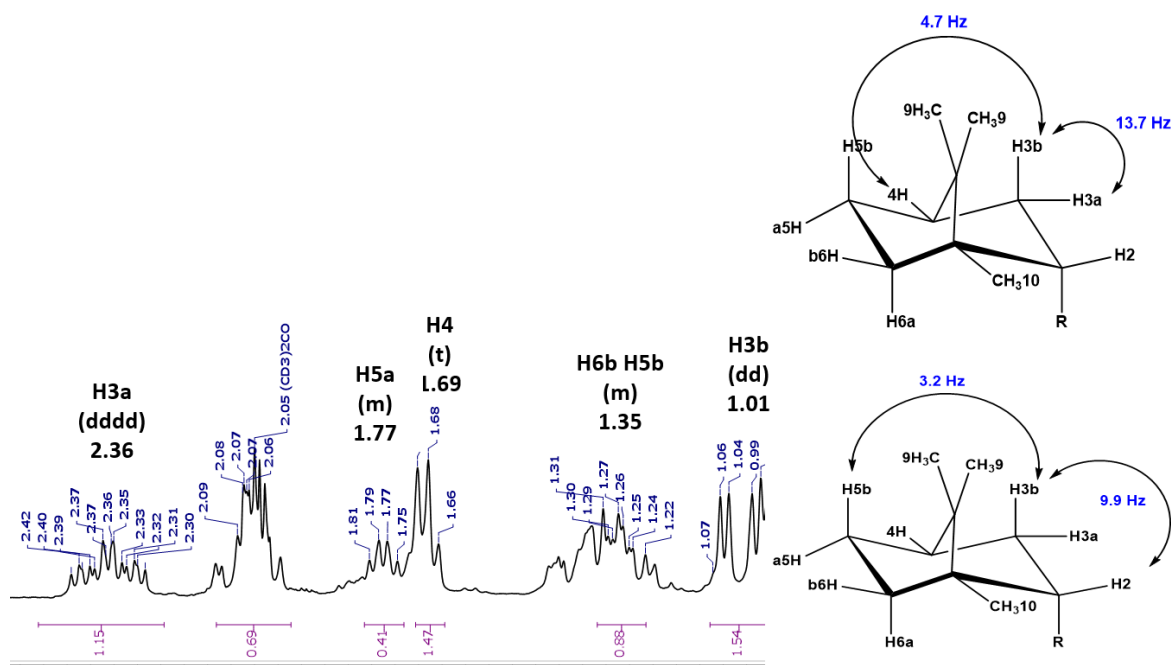
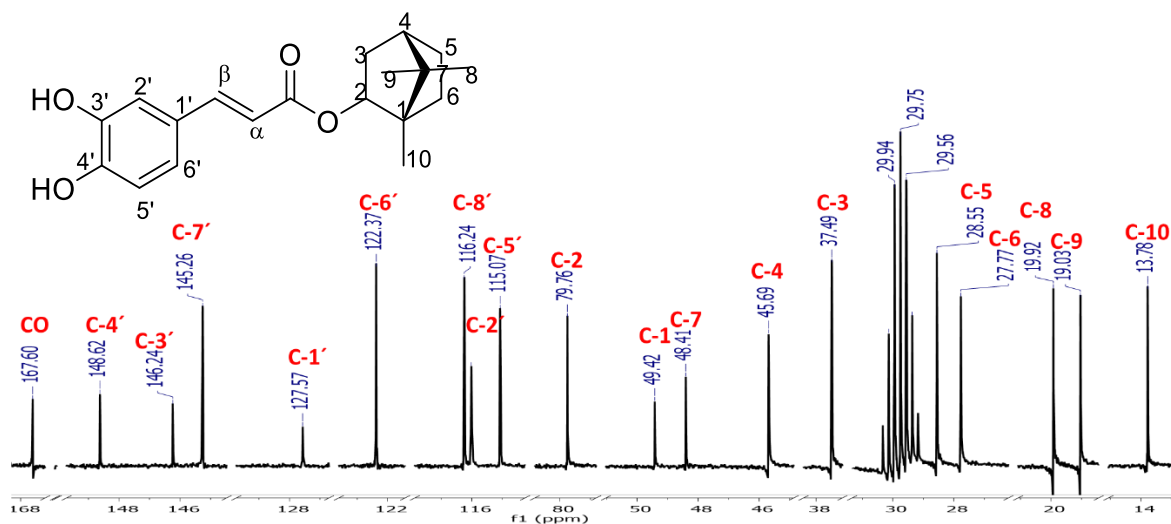
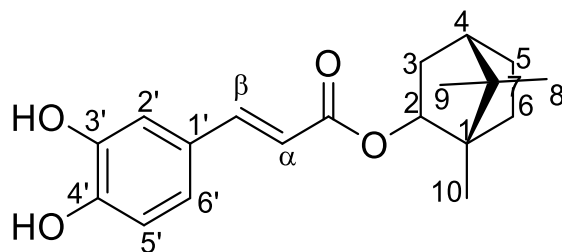


Figura 27 Acoplamiento de los protones en el anillo biciclo.



**Espectro 6** RMN  $^{13}\text{C}$  de cafeato de bornilo. 100 MHz, Acetona.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 6**) se observan 19 señales de la molécula, 10 de las cuales corresponden al anillo biciclo. En 167.60 ppm se observa la señal característica del carbonilo de ester, así como las señales de los carbonos vinílicos C-7' y C-8' a 145.26 y 116.24 ppm. Las señales entre 79.76 y 13.78 ppm que corresponden a los carbonos del biciclo. Estos datos también fueron comparados con los reportados en la literatura (**Tabla 19**).



**Figura 28** Cafeato de bornilo (4)

**Tabla 19** Comparación de los desplazamientos en RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de Cafeato de bornilo (4) Acetona 400 MHz (Maldonado, Apan, & Pérez-Castorena, 1998)



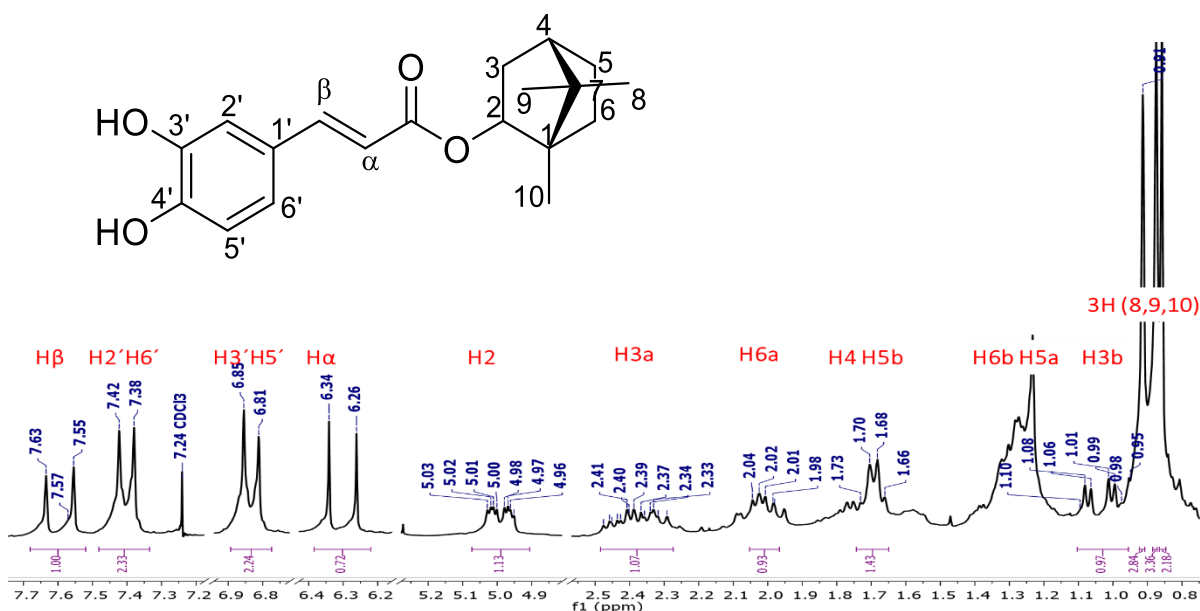
FACULTAD DE FARMACIA

Posición	(400 y 100 MHz, Acetona).		(400 y 200 MHz Acetona)		Tipo de carbono
	$\delta$	<sup>1</sup> H Experimental $\delta H$ (J: Hz)	$\delta C$	<sup>1</sup> H Reportado $\delta C$ (J: Hz)	
H-2	79.4	5.00 (ddd 10, 3.5, 2.2)	78.9	4.97 (ddd 9.9, 3.5, 2.0)	CH
H-3a	36.7	2.44 (dddd; 13.8, 10.0, 4.5, 3.5)	36.6	2.36 (dddd; 13.3, 9.9, 4.6, 3.2)	CH
H-3b		1.07 (dd; 13.8, 3.5)	-	1.01 (dd; 13.6, 3.7)	-
H-4	44.8	1.70 (t; 4.4)	44.8	1.69 (t ;4.1)	CH
H-5a	27.9	1.78 (m)	27.9	1.77 (m)	CH <sub>2</sub>
H-5b	-	1.25 (m)	-	1.28 (m)	-
H-6a	27.1	2.03 (m)	26.9	2.06 (m)	CH <sub>2</sub>
H-6b	-	1.35 (m)	-	1.41 (m)	CH
H-7	47.7	-	47.6	-	C
H-8	19.6	0.90 (s)	19.1	0.89 (s)	CH <sub>3</sub>
H-9	18.7	0.94 (s)	18.2	0.93 (s)	CH <sub>3</sub>
H-10	13.4	0.88 (s)	12.9	0.85 (s)	CH <sub>3</sub>
H-11	-	-	-	-	-
H $\alpha$	115.6	6.31 (d, 15.9)	115.4	6.31 (d; 15.9)	CH
H $\beta$	144.5	7.59 (d, 15.9)	144.4	7.54 (d, 15.9)	CH
H-1'	126.5	-	126.7	-	C
H-2'	115.3	7.15 (d; 2.0)	115.1	7.16 (d; 2.0)	CH
H-3'	145.1	-	145.4	-	C
H-4'	147.5	-	147.8	-	C
H-5'	114.4	6.89 (d; 8.2)	114.2	6.86 (d; 8.19)	CH
H-6'	121.4	7.04 (dd; 8.2, 1.5)	121.5	7.04 (dd; 8.21, 2.21)	CH



Posición	(400 y 100 MHz, Acetona).		(400 y 200 MHz Acetona)		Tipo de carbono
	$\delta$	$^1\text{H}$ Experimental $\delta H$ (J: Hz)	$\delta C$	$^1\text{H}$ Reportado $\delta C$ (J: Hz)	
	167.6		166.8		CO

#### 11.4 Caracterización espectroscópica por $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de cumarato de bornilo

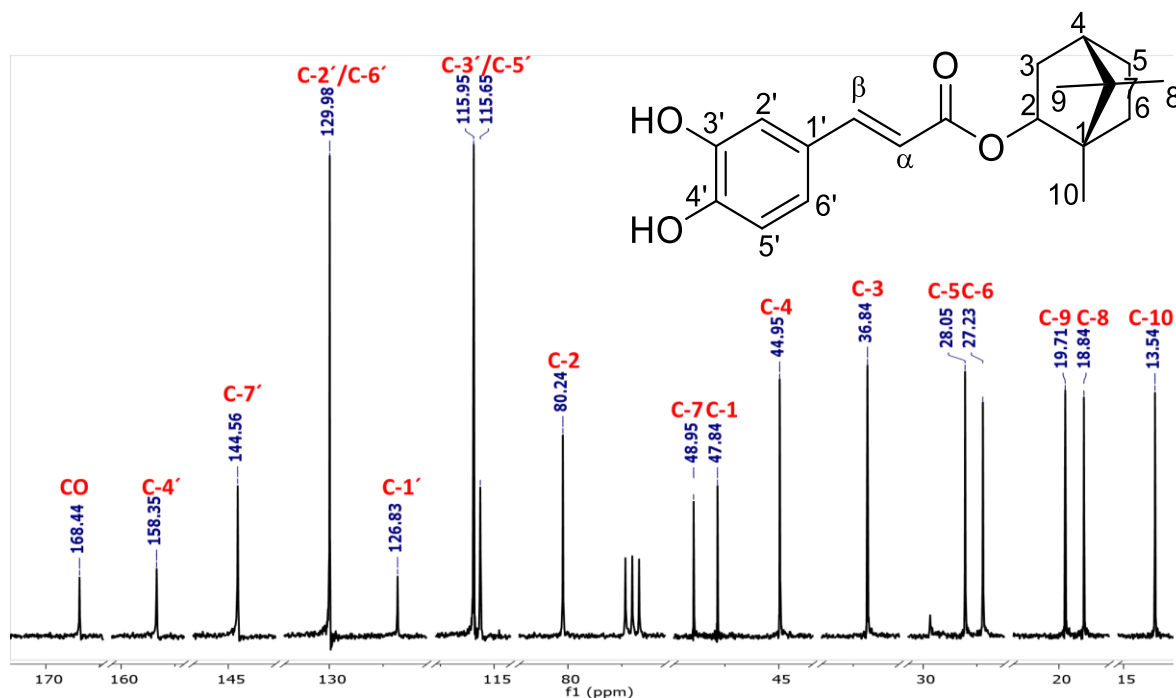


**Espectro 7** RMN  $^1\text{H}$  de cumarato de bornilo. 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectro 7**), para este compuesto se observaron señales similares a las obtenidas en el espectro del cafeato de bornilo. Como se observa en la figura 4, el cumarato de bornilo no tiene sustituyente en el carbono 3', lo que le confiere simetría a su molécula la cual se observa en la señal desplazada a 7.40 ppm ( $\text{H}_{2'}$ ,  $\text{H}_{6'}$ ) con multiplicidad doble y que integra para dos hidrógenos, misma que muestra una constante de acoplamiento de 7.63 Hz que se acopla en posición *orto* con hidrógeno cuya señal doble resuena en 6.86



ppm (H3', H5). Dado, que ambas señales integran para dos hidrógenos se considera que existe un eje de simetría en el anillo aromático, lo que permite identificar al compuesto como el cumarato de bornilo.



**Espectro 8** RMN <sup>13</sup>C de cumarato de bornilo. 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>

En el espectro de <sup>13</sup>C (**Espectro 8**) se observan las 17 señales del compuesto, 10 de las cuales corresponden al anillo biciclo. En 168.44 ppm se observa la señal característica del carbonilo, y las señales de los carbonos vinílicos C-7' y C-8' a 144.56 y 115.95 ppm. De manera similar, las señales entre 80.24 y 13.54 ppm corresponden a los carbonos del biciclo. Estos datos también fueron comparados con los reportados en la bibliografía.





FACULTAD DE FARMACIA

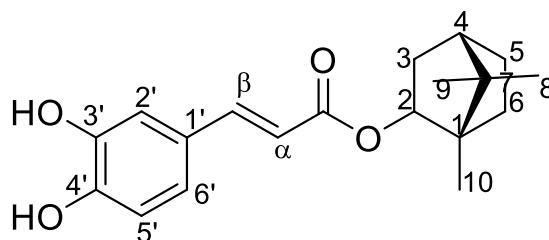


Figura 29 Cumarato de bornilo (3)

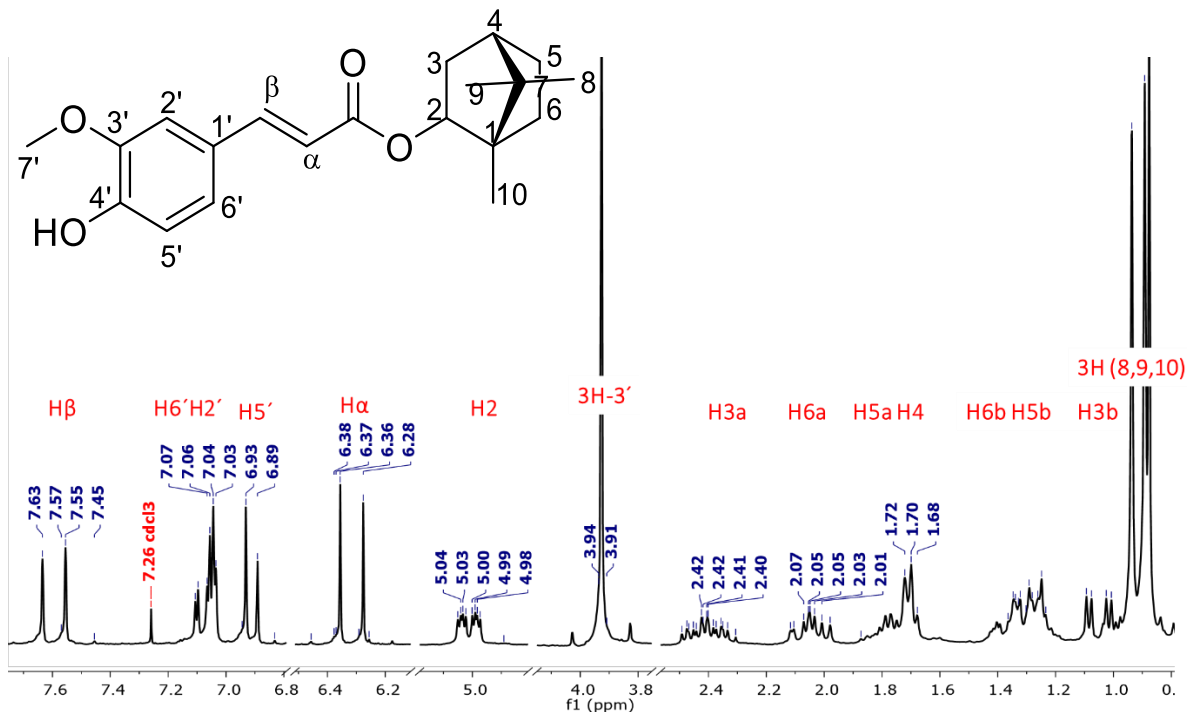
Tabla 20 Comparación de los desplazamientos en RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de Cumarato de bornilo (3),  $\text{CDCl}_3$  200 MHz (Maldonado, Apan, & Pérez-Castorena, 1998).

Posición	(200 y 50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).		(400 y 100 MHz $\text{CDCl}_3$ )		Tipo de carbono
	$\delta$	$^1\text{H}$ Experimental $\delta H$ (J: Hz)	$\delta C$	$^1\text{H}$ Reportado $\delta C$ (J: Hz)	
-	168.3	-	165.3	---	CO
H- $\beta$	144.4	7.65 (d; 15.9)	141.4	7.60 (d; 15.9)	CH
H-2'6'	130.0	7.45 (d; 8.6)	126.7	7.40 (d; 7.63)	CH
H-3'5'	115.8	6.89 (d; 8,6)	112.5	6.86 (d; 7.39)	CH
H- $\alpha$	115.9	6.35 (d; 15.9)	112.8	6.31 (d; 15.9)	CH
H-2	80.3	5.0 (ddd; 9.9, 3.4, 2.0)	77.1	4.9 (ddd; 10, 3.5, 1.76)	CH
H-3b	-	2.45 (m)	-	2.40 (m)	-
H-6a	27.2	2.10 (m)	24.1	2.01 (m)	CH <sub>2</sub>
H-5b	-	1.80 (m)	-	1.75 (m)	-
H-4	44.9	1.70 (t, 4.5)	41.8	1.69 (t, 4.5)	CH
H-6b	-	1,40 (m)	-	1.34 (m)	-
H-5a	28.0	1.30 (m)	26.6	1.25 (m)	CH <sub>2</sub>
H-3a	36.8	1.00 (dd; 13.8, 3.4)	33.7	1.04 (dd; 13.7, 2.9)	CH <sub>2</sub>
H-8	18.8	0.93 (s)	15.7	0.91 (s)	CH <sub>3</sub>
H-9	19.7	0.89 (s)	16.6	0.87 (s)	CH <sub>3</sub>



H-10	13.5	0.87 (s)	10.4	0.86 (s)	CH <sub>3</sub>
------	------	----------	------	----------	-----------------

### 11.5 Caracterización espectroscópica por <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de ferulato de bornilo



**Espectro 9** RMN <sup>1</sup>H de ferulato de bornilo. 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (**Espectro 9**) se observan señales similares a las identificadas en el cafeato de bornilo y el cumarato de bornilo por lo que se asumió que el compuesto también era un derivado de bornilo. La señal característica es un singulete intenso desplazado en 3.93 ppm que integra para 3 hidrógenos, y que corresponde al CH<sub>3</sub> del metoxilo (H'7), grupo funcional localizado en el carbono 3' del ferulato de bornilo.



FACULTAD DE FARMACIA

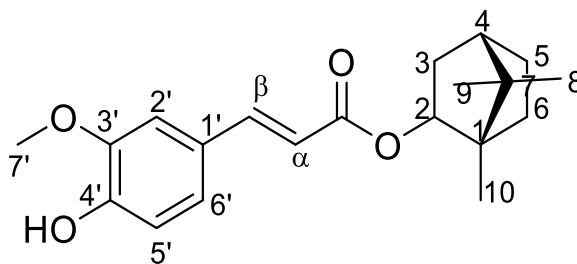


Figura 30 Ferulato de Bornilo (5)

Tabla 21 Comparación de los desplazamientos en RMN  $^1\text{H}$  de ferulato de bornilo (5),  $\text{CDCl}_3$  200 MHz (Maldonado, Apan, & Pérez-Castorena, 1998).

	(200 MHz $\text{CDCl}_3$ ).	(200 MHz $\text{CDCl}_3$ )
Posición	$^1\text{H}$ Experimental $\delta\text{H}$ (J: Hz)	$^1\text{H}$ Reportado $\delta\text{H}$ (J: Hz)
H-B	7.59 (d; 15.9)	7.59 (d; 15.9)
H-5'	6.91 (d; 8.2)	6.91 (d; 8.0)
H-6'	7.08 (dd; 8.2, 2.2)	7.08 (dd; 8.1, 1.9)
H-2'	7.05 (d; 1.5)	7.04 (d; 1.8)
H- $\alpha$	6.31 (d; 15.9)	6.32 (d; 15.9)
H-2	5.0 (ddd; 10, 3.3, 1.8)	5.0 (ddd; 9.9, 3.5, 2.0)
H-3b	1.05 (dd, 13.3, 3.3)	1.06 (dd; 13.7, 3.5)
H-6a	2.06 (m)	2.03 (m)
H-5b	1.29 (m)	1.29 (m)
H-4	1.71 (t, 4.5)	1.72 (t, 4.3)
H-6b	1.31 (m)	1.30 (m)
H-5a	1.78(m)	1.78 (m)
H-3a	2.41 (dddd; 13.8, 10.0, 4.0, 3.5)	2.41 (dddd; 13.5, 9.9, 4.5, 3.0)

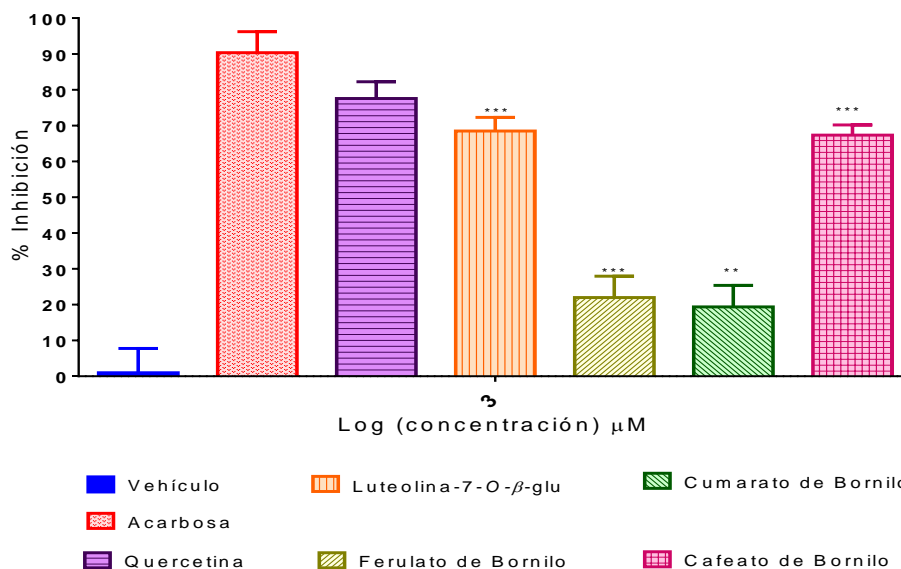


H-7'	3.93 (s)	3.93 (s)
H-8	0.90 (s)	0.93 (s)
H-9	0.94 (s)	0.89 (s)
H-10	0.88 (s)	0.88 (s)

### 11.6 Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas de los compuestos aislados de *C. mutica*

Una vez que los metabolitos mayoritarios de cada extracto fueron purificados e identificados, se determinó su actividad anti-hiperglucemiante en un modelo *in vitro* sobre  $\alpha$ -glucosidasas a una concentración exploratoria de 1000  $\mu$ M, utilizándose acarbosa y quercetina a la misma concentración. La quercetina fue utilizada como control positivo ya que al evaluar compuestos de origen natural es más certero comparar el efecto con otro compuesto del mismo origen y porque es bien conocida su actividad como inhibidor competitivo de  $\alpha$ -glucosidasas (Proença et al., 2017).

El 7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina tuvo el mayor porcentaje de inhibición (68.48%) seguido del cafeato de bornilo (67.31%), cumarato y ferulato de bornilo también inhibieron significativamente a  $\alpha$ -glucosidasas, pero en menor porcentaje 19.35% y 21.98% respectivamente. **Gráfica 2.**

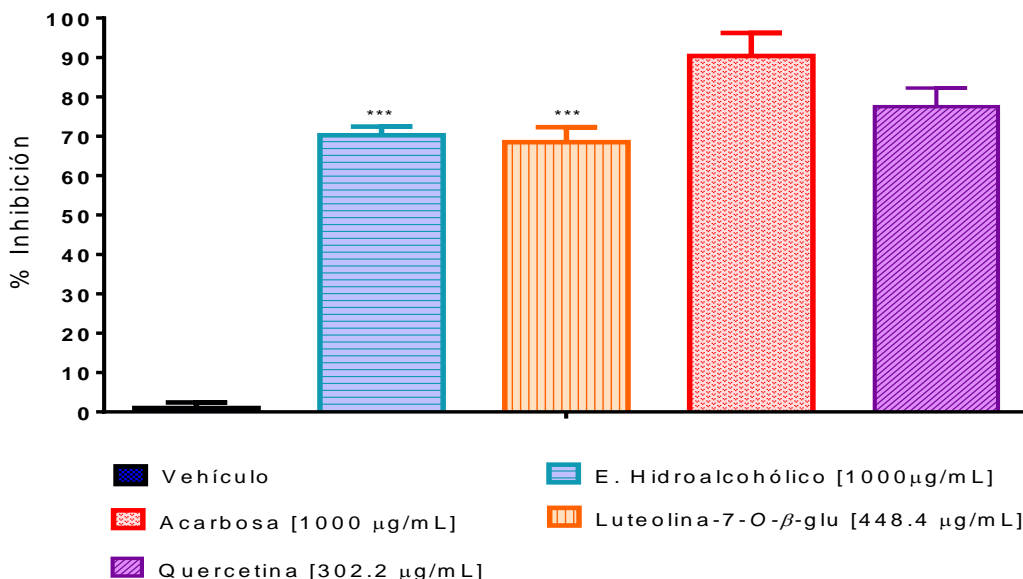


**Gráfica 2** Actividad inhibitoria de los metabolitos aislados de *C. mutica* sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas. [1000  $\mu\text{M}$ ] cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=8 vs vehículo. Acarbosa y quercetina son usados como control positivo. Con un valor de \*\*\*P < 0.0001 \*\*P < 0.001 determinado por un análisis estadístico de la prueba ANOVA, seguida de una prueba Dunnet.

Se realizaron gráficas comparativas de los extractos con sus respectivos compuestos aislados para determinar si el efecto se debe a la presencia de estos metabolitos. Para el extracto hidroalcohólico se observa que a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (extracto) y 1000  $\mu\text{M}$  (compuesto) tienen un porcentaje de inhibición de 70.25 y 68.48 % **Gráfica 3**, observándose que el compuesto tiene un efecto más potente, lo que indica que en efecto el glucósido de luteolina podría ser el principal responsable del efecto anti-hiperglucemiante del extracto, debido a que posee grupos hidroxilo en el anillo C, lo que aumenta su actividad pues favorece la formación de puentes de hidrógeno con los residuos del sitio activo de la enzima (Proença et al., 2017). Los compuestos con una estructura *O*-glucósido tienen un rol importante en la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas ya que su estructura al ser similar a la del sustrato, lo que permite que el glicósido se una al sitio activo con mayor afinidad (Elya et al., 2012). Aun cuando



ácido cafeico fue aislado del extracto hidroalcohólico este no fue evaluado sobre  $\alpha$ -glucosidasas debido a que es bien sabido que los derivados de ácido cinámico tienen un potente efecto supresor sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas (Adisakwattana et al., 2009).

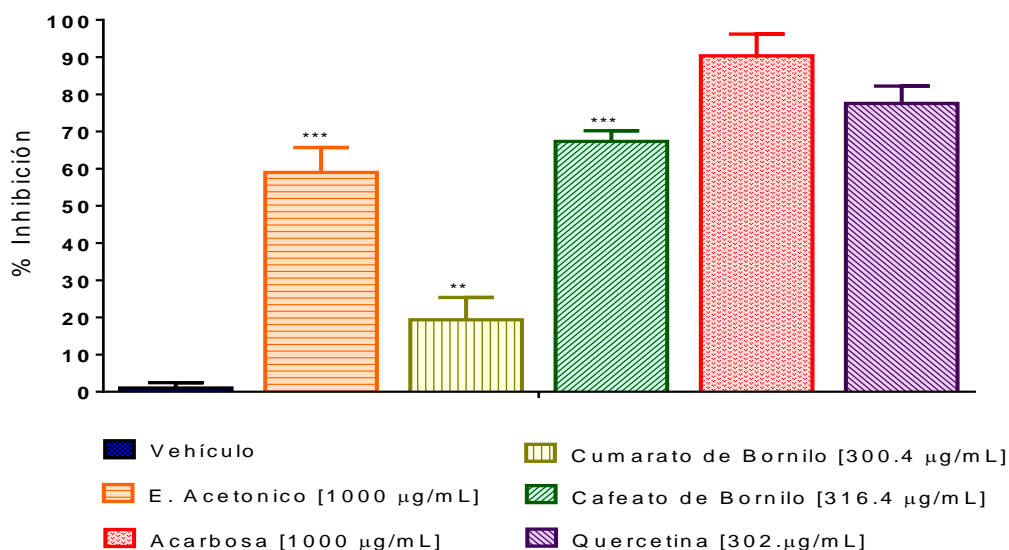


**Gráfica 3** Actividad inhibitoria del extracto hidroalcohólico [1000 µg/mL] de *C. mutica* y luteolina-7-O-β-glucopiranosido [1000 µM] sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas. Acarbosa y quercetina son usados como control positivo. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6 vs vehículo. Con un valor de \*\*\*P < 0.0001 determinado por un análisis estadístico de la prueba ANOVA, seguida de una prueba Dunnet.

En el extracto acetónico, los metabolitos cafeato de bornilo y cumarato de bornilo son los compuestos mayoritarios. A pesar de que el cafeato de bornilo presentó un efecto inhibitorio significativo (67.31%) éste no había sido reportado con anterioridad, por tener actividad antihiper glucemiante, dado que el cafeato de bornilo tiene sustituyentes hidroxilo en posición 3 y 4 estos promueven la interacción con  $\alpha$ -glucosidasas aumentando su capacidad



inhibitoria, por otro lado, el cumarato de bornilo posee solo un grupo hidroxilo en posición 4 atribuyéndole menor efecto inhibitorio (Chochkova et al., 2017).



**Gráfica 4** Actividad inhibitoria del extracto acetónico [1000 µg/mL] de *C. mutica*, Cumarato de bornilo y Cafeato de bornilo [1000 µM] sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas. Acarbosa y quercetina son usados como control positivo. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6 vs vehículo. Con un valor de \*\* P < 0.001 \*\*\*P < 0.0001 determinado por un análisis estadístico de la prueba ANOVA, seguida de una prueba Dunnet

### 11.7 Ensayo de citotoxicidad

Se evaluó el efecto sobre la viabilidad celular de los cuatro extractos de *C. mutica* y los principales metabolitos contenidos sobre las líneas celulares IHH, HEK293 y HDF a diferentes concentraciones, para determinar el valor de CC<sub>50</sub> (50% de inhibición del crecimiento) mediante el ensayo MTT, para así evaluar el efecto citotóxico. El análisis se realizó a diferentes concentraciones 0.125, 1.25, 12.5, 125 y 250 µg/mL para los extractos y 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg/mL para los compuestos. Se utilizó como control positivo Taxol a una concentración de 0.25 µM, el cual es un fármaco quimioterapéutico contra el cáncer ampliamente utilizado que exhibe actividad clínica en una variedad de tumores malignos



humanos y DMSO como control negativo, este es ampliamente utilizado como solvente en toxicología y farmacología, para la criopreservación de células y como potenciador de la penetración durante los tratamientos topológicos. El uso de DMSO generalmente se acepta como no tóxico por debajo del 10% (v / v)(Verheijen et al., 2019).

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante regresiones no lineales graficándose curvas dosis-respuesta (Gráficas 5-15), y se calculó los valores de  $CC_{50}$ , los cuales se resumen en la **Tabla 21 y 22**.

**Tabla 22 Actividad citotóxica de los extractos de *C. mutica* contra las líneas celulares IHH, HEK293 y HDF. \*\***

Extracto	IHH $CC_{50}$	HEK293 $CC_{50}$	HDF $CC_{50}$
Hidroalcohólico	117.3 ± 16.6 µg/mL	254.7 ± 4.55 µg/mL	>1000 µg/mL
Metanólico	> 1000 µg/mL	738.5 ± 15.80 µg/mL	>1000 µg/mL
Acetónico	13.38 ± 2.31 µg/mL	12.37 ± 4.55 µg/mL	449.5 ± 4.55 µg/mL
Hexánico	47.99 ± 11.4 µg/mL	25.19 ± 3.57 µg/mL	154.2 ± 3.57 µg/mL

**Tabla 23 Actividad citotóxica de los compuestos aislados de *C. mutica* contra las líneas celulares IHH, HEK293 y HDF\*\***

Compuesto	IHH $CC_{50}$	HEK293 $CC_{50}$	HDF $CC_{50}$
Luteolina-7-O-β-glucopiranosido	204.9 ± 5.4 µg/mL (456.9 ± 12.0 µM)	357.6 ± 8.3 µg/mL (797.5 ± 18.5 µM)	>1000 µg/mL
Cumarato de bornilo	175.8 ± 16.2 µg/mL (585.2 ± 53.9 µM)	107.6 ± 15.2 µg/mL (358.1 ± 50.5 µM)	71.6 ± 8.6 µg/mL (238.3 ± 28.6 µM)
Cafeato de bornilo	89.8 ± 2.2 µg/mL (283.8 ± 6.9 µM)	87.6 ± 5.4 µg/mL (276.8 ± 17.0 µM)	>1000 µg/mL





<b>Ferulato de bornilo</b>	21.8 ± 2.0 µg/mL (65.9 ± 6.0 µM)	36.53 ± 3.4 µg/mL (110.5 ± 10.2 µM)	35.28 ± 3.9 µg/mL (106.5 ± 11.8 µM)
----------------------------	-------------------------------------	--	--

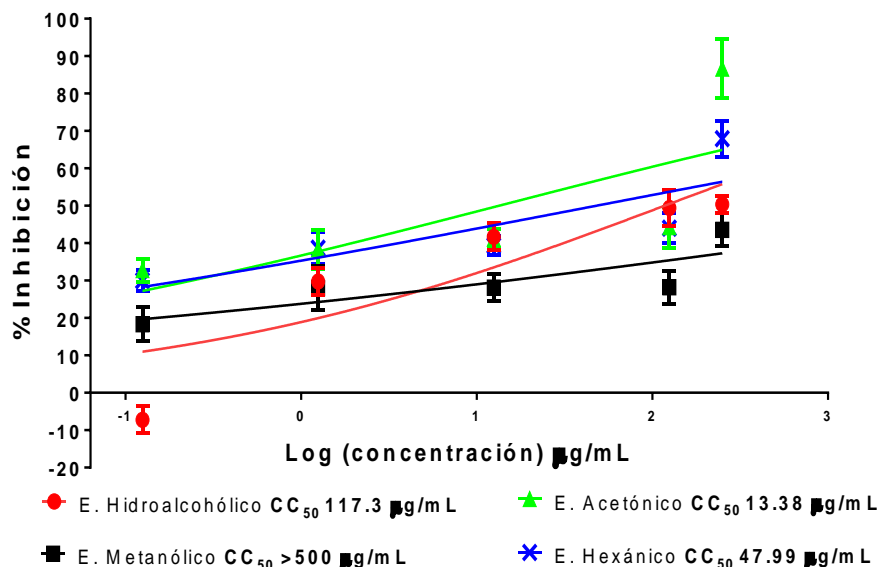
\*Taxol fue usado como control positivo [0.25 µM].

\*\*DMSO fue utilizado como control negativo.

## 11.8 Viabilidad celular

### 11.8.1 IHH

Ensayos de viabilidad de los extractos menos polares de *C. mutica* muestran un efecto tóxico significativo sobre las células IHH de origen hepático, en un rango de concentración 12.5 a 250 µg/mL con respecto al control negativo (DMSO) (**Gráfica 5**). En ella, para el extracto hidroalcohólico se observa un efecto significativo a partir de 125 µg/mL. Por otra parte, el extracto metanólico no presenta actividad citotóxica significativa como el resto de los extractos a concentraciones mas elevadas. La citotoxicidad mas elevada corresponde al extracto acetónico con una inhibición del 86.65% a una concentracion de 250 µg/mL y una CC<sub>50</sub> de 13.38 ± 2.31 µg/mL, seguida del extracto hexanico con una inhibición de 67.91% a una concentración de 250 µg/mL y una CC<sub>50</sub> de 47.99 ± 11.4 µg/mL, mientras que a la misma concentracion el extracto hidroalcoholico y metanólico tienen un porcentaje de inhibición del 50.35% y 43.55%, respectivamente.

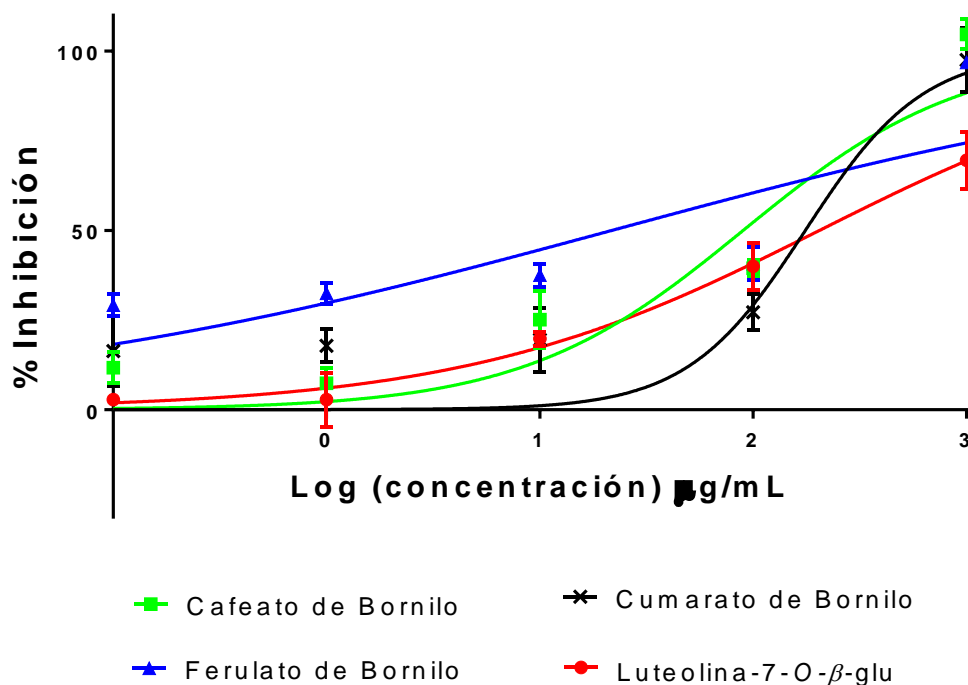


**Gráfica 5** Inhibición del crecimiento celular en la línea IHH tras 48 h de tratamiento con extractos de *C. mutica* por ensayo de MTT. [0.125, 1.25, 12.5, 125, 250  $\mu\text{g/mL}$ ]. Taxol fue usado como control positivo [0.25  $\mu\text{M}$ ]. DMSO fue usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD.

De la misma manera, se evaluaron los metabolitos mayoritarios de cada extracto para determinar si eran los responsables del efecto citotóxico, los resultados (**Gráfica 6**) muestran que los compuestos luteolina-7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido y el cafeato de bornilo tienen un efecto citotóxico significativo a partir de una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que para el cumarato de bornilo y el ferulato de bornilo un efecto citotóxico significativo se encuentra en un rango de 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ . El cumarato de bornilo y el cafeato de bornilo presentan un mayor porcentaje de inhibición del 97.54 y 104.68% a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  con una  $\text{CC}_{50}$   $175.8 \pm 16.2 \mu\text{g/mL}$  (574  $\mu\text{M}$ ) y  $89.8 \pm 2.25 \text{ mg/mL}$  (284.0  $\mu\text{M}$ ). A la misma concentración la luteolina-7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido inhibe 69.54% y una  $\text{CC}_{50}$   $204.9 \pm 5.4 \mu\text{g/mL}$  (456.9  $\mu\text{M}$ ), siendo el ferulato de bornilo el que presenta un menor efecto citotóxico,



de 52.57% a la máxima concentración evaluada con una  $CC_{50}$   $843.3 \pm 17.9 \mu\text{g/mL}$  ( $2552.2 \mu\text{M}$ ).



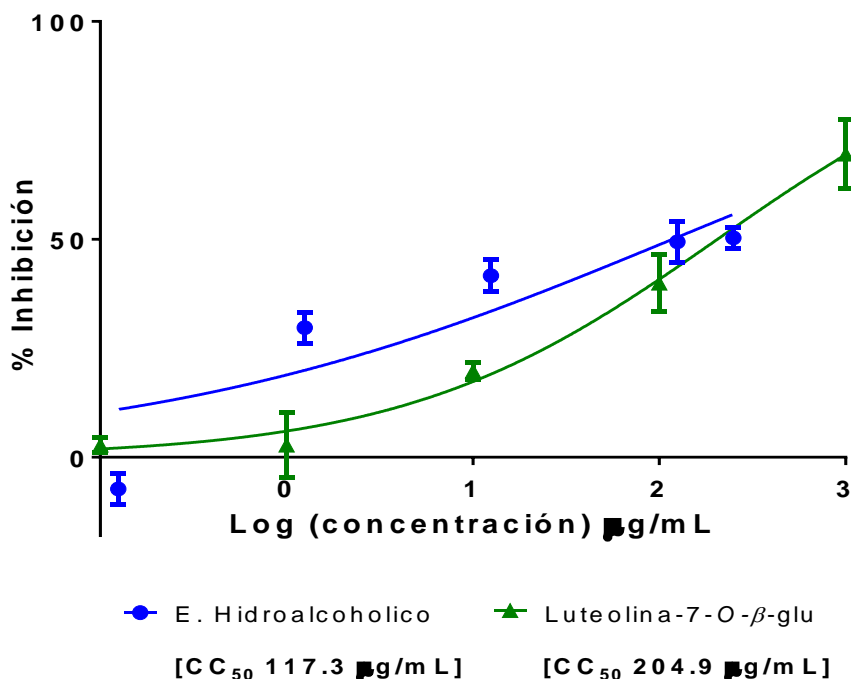
**Gráfica 6** Inhibición del crecimiento celular en la línea **IHH** tras 48 h de tratamiento con los compuestos contenidos en los extractos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol fue usado como control positivo [**0.25 μM**]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD.

Se graficaron los datos obtenidos para comparar el efecto de aquellos extractos con efecto tóxico significativo y determinar si su efecto es dependiente de los metabolitos mayoritarios.

Se compararon los datos obtenidos para el extracto hidroalcohólico y su componente mayoritario luteolina-7-O-β-glucopiranosido (**Gráfica 7**). Para observar un efecto antagónico o de sinergismo se graficó el % de inhibición del extracto acetónico con el de cumarato de bornilo y cafeato de bornilo. La tendencia de la gráfica indica un posible



efecto sinérgico de ambos compuestos, mismo que se puede notar en el comportamiento del extracto acetónico quien presenta mayor efecto tóxico. (Gráfica 8)

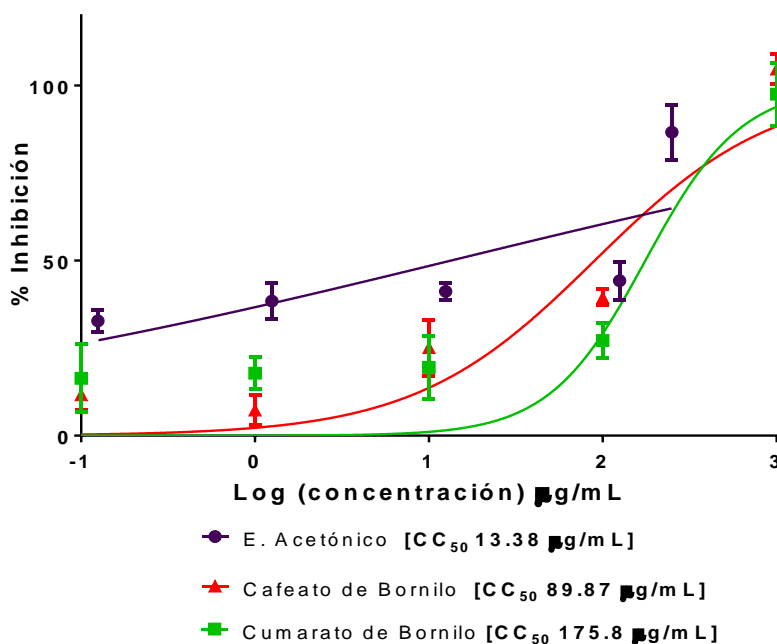


**Gráfica 7** Inhibición del crecimiento celular en la línea **IHH** tras 48 h de tratamiento de los extractos y su metabolito mayoritario de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol fue usado como control positivo [0.25 µM]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media ± SD.

Se ha reportado que la luteolina y 7-O-β-glucopiranosido de luteolina pueden inducir un efecto hepatoprotector en roedores con toxicidad inducida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (Yan et al., 2019) debido a su acción antioxidante, los efectos protectores se evidenciaron por un bloqueo del aumento inducido por CCl<sub>4</sub> en las actividades transaminasa glutámico piruvica (GPT) y transaminasa glutámico oxalacética (GOT) en suero, la formación de malondialdehído (MDA) y 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) y el agotamiento de GSH en los tejidos vivos de las ratas (Qiu-sheng et al., 2004). Sin embargo, en la evaluación de



citotoxicidad observamos que si bien no presenta un potente efecto citotóxico si presenta un efecto dependiente de la concentración.



**Gráfica 8** Inhibición del crecimiento celular en la línea IHH tras 48 h de tratamiento con los compuestos contenidos en el extracto acetónico de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol es usado como control positivo [0.25  $\mu\text{M}$ ]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD.

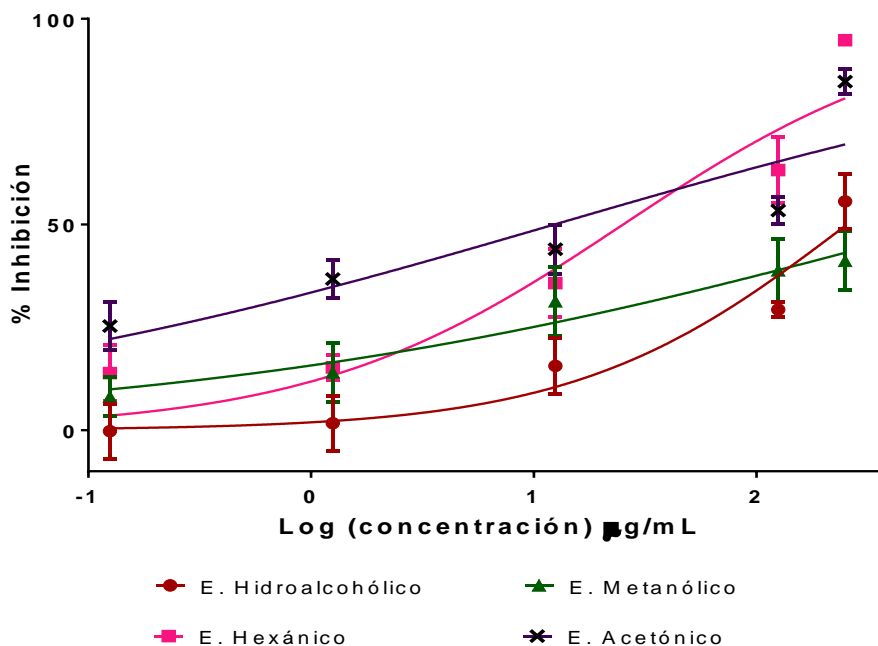
Los compuestos fenilpropanoides cafeato, cumarato y ferulato de bornilo poseen un grupo carbonilo  $\alpha$ - $\beta$  insaturado los cuales son conocidos como aceptores de Michael ya que agregan nucleófilos en posición  $\beta$  del sistema insaturado. Los nucleófilos heteroatómicos de la naturaleza contienen átomos de azufre, oxígeno y nitrógeno donde especialmente el grupo sulfhidrido de cisteínas en las proteínas juega un papel importante en los procesos de activación basados en la adición de Michael a través de compuestos de carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados. La toxicidad celular ocurre cuando la formación de aductos interrumpe la



estructura y / o función de la proteína, lo que ocasionalmente causa daño a los orgánulos submembrana, vías metabólicas o procesos citológicos (Amslinger, 2010). Por lo que la citotoxicidad de estos compuestos depende de los grupos funcionales en el anillo, pues se sabe que la cantidad de grupos hidroxilo puede aumentar la toxicidad como se observa en el cafeato de bornilo con respecto al cumarato de bornilo el cual solo tiene un sustituyente hidroxilo.

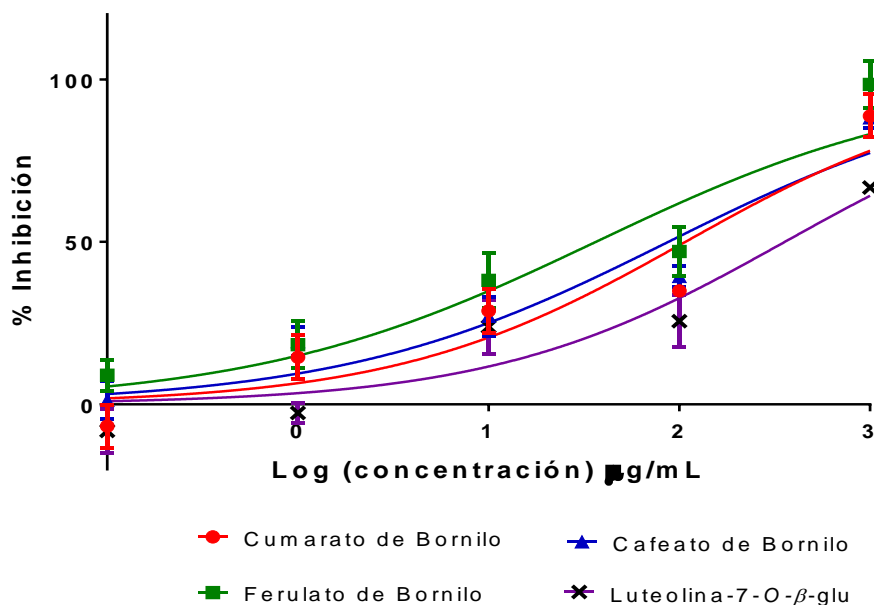
### 11.8.2 HEK 293

Se determinó el efecto citotóxico de los extractos y metabolitos obtenidos de *C. mutica* sobre la línea HEK293 (**Gráfica 9**). Se observa el efecto tóxico de los extractos acetónico y hexánico a partir de 1.25  $\mu\text{g/mL}$  teniendo una inhibición máxima del 87.73% y 97.77% a 250  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que para los extractos polares el efecto significativo empieza a partir de 12.25  $\mu\text{g/mL}$  mostrando una inhibición del 55.61% y 41.16% a la máxima concentración ensayada. El valor de  $\text{CC}_{50}$  para el extracto acetónico es de 12.37  $\mu\text{g/mL}$  siendo el que presenta mayor efecto tóxico sobre las células HEK293. Los extractos polares hidroalcohólico y metanólico son los que muestran menor efecto citotóxico  $\text{CC}_{50}$  254.7  $\mu\text{g/mL}$  y 738.5  $\mu\text{g/mL}$ .

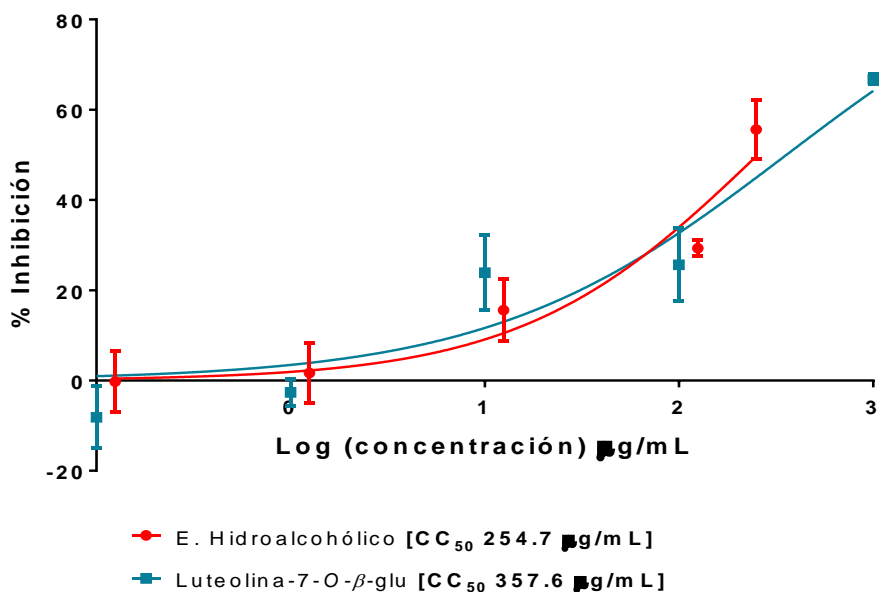


**Gráfica 9.** Inhibición del crecimiento celular en la línea HEK293 tras 48 h de tratamiento de los extractos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol es usado como control positivo [0.25 µM]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media ± SD.

En la gráfica 10 se observa el efecto tóxico sobre las células HEK293 de los metabolitos contenidos en los extractos de *C. mutica* a concentraciones desde 1 µg/ml. En ella se observa que los compuestos de tipo fenilpropanoide mostraron un efecto citotóxico significativo a partir de 10 µg/mL mientras que el flavonoide glicosilado luteolina-7-*O*-β-glucopiranosido tiene un efecto citotóxico a partir de 100 µg/mL, obteniéndose 66.73% de inhibición a la concentración de 1000 µg/mL, mientras que para los compuestos fueron: cumarato de bornilo 88.77%, cafeato de bornilo 88.16% y ferulato de bornilo 98.46%, siendo este último el que presenta mayor efecto tóxico sobre las células de origen renales.



**Gráfica 10.** Inhibición del crecimiento celular en la línea HEK293 tras 48 h de tratamiento de los metabolitos aislados de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol es usado como control positivo [0.25 µM]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media ± SD.

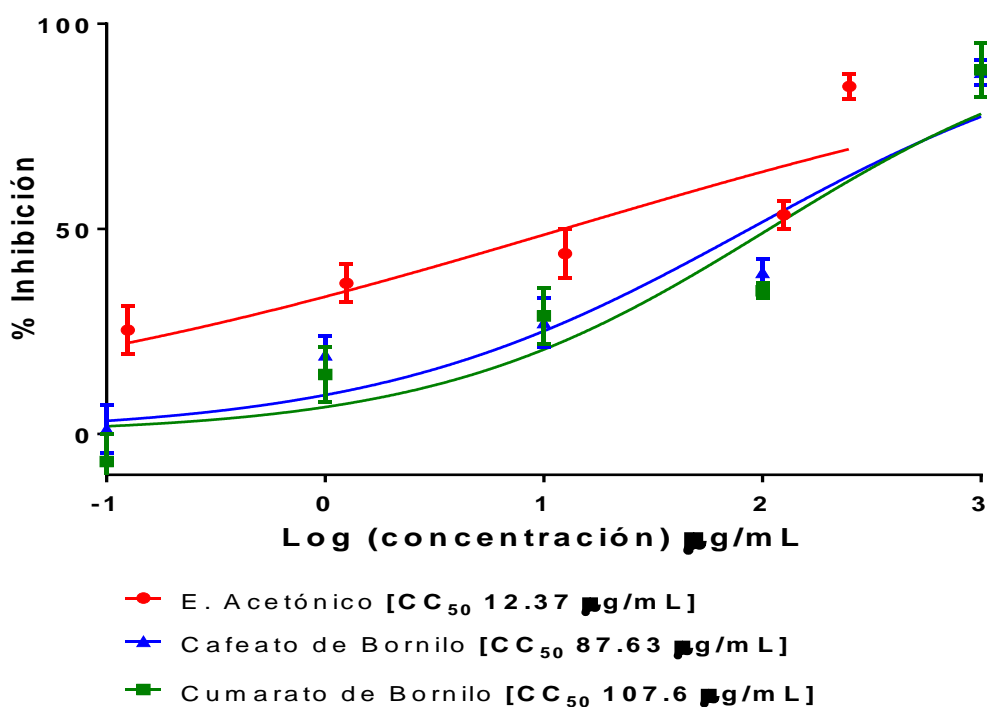


**Gráfica 11** Inhibición del crecimiento celular en la línea HEK293 tras 48 h de tratamiento de los extractos y metabolitos obtenidos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol es usado como control positivo [0.25 µM]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media ± SD.



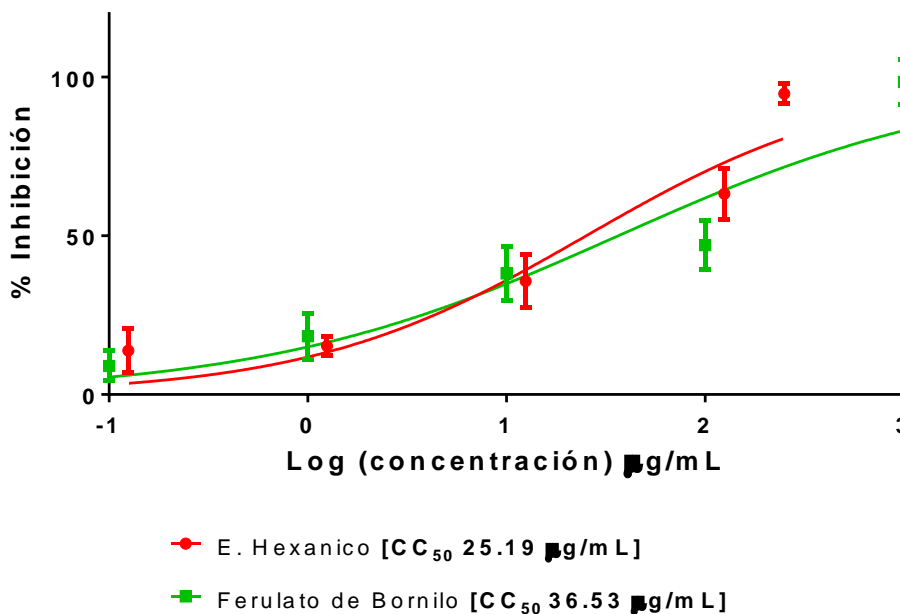


Se realizaron gráficas comparativas de los datos de metabolitos vs de los extractos de donde fueron aislados (**Gráfica 11**). En esta gráfica se observa que el efecto tóxico del extracto hidroalcohólico puede atribuirse principalmente a luteolina-7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido, ya que ambos tienen el mismo comportamiento a diferentes concentraciones. Mientras que para el extracto acetónico el cual fue el más citotóxico se comparó con los compuestos cafeato y cumarato de bornilo. **Grafica 12**.



**Gráfica 12.** Inhibición del crecimiento celular en la línea HEK293 tras 48 h de tratamiento de los extractos y metabolitos obtenidos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol es usado como control positivo [0.25  $\mu\text{M}$ ]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media  $\pm$  SD.

Para los compuestos contenidos en el extracto acetónico, se puede notar un posible efecto sinérgico, ya que su efecto individual es menor que el efecto del extracto, sin embargo, al ser los compuestos mayoritarios, la suma de los efectos individuales podría ser el responsable de la toxicidad del extracto acetónico. (**Gráfica 13**)



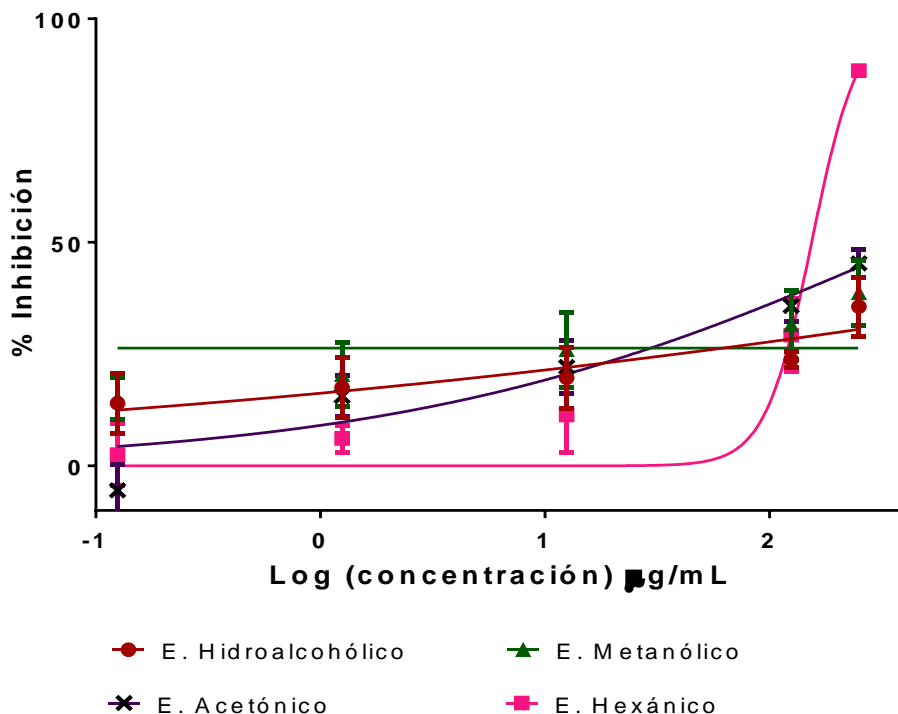
**Gráfica 13** Inhibición del crecimiento celular en la línea HEK293 tras 48 h de tratamiento de los extractos y metabolitos obtenidos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol fue usado como control positivo [0.25 µM]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media ± SD.

De la misma manera se comparó el extracto hexánico y el ferulato de bornilo en donde se corroboró que el efecto citotóxico, el cual es dependiente de la dosis se puede asociar principalmente, a la abundancia de este metabolito (**Gráfica 14**)

### 11.8.3 HDF (Origen fibroblastos dérmicos humanos)

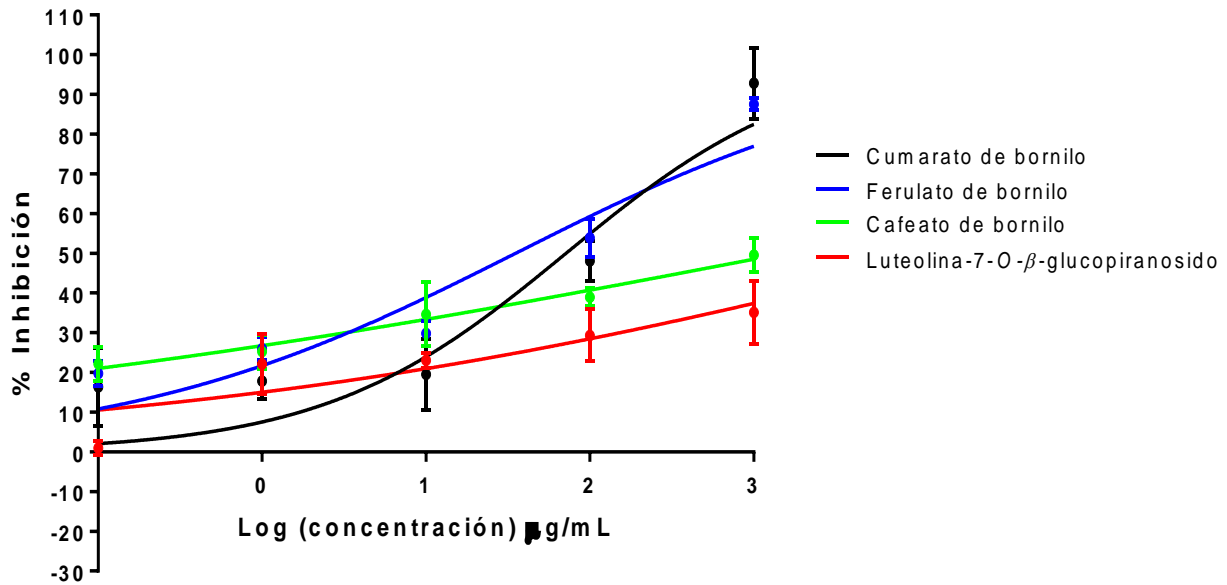
Las células HDF (fibroblastos dérmicos humanos) son las responsables de producir la matrix extracelular formando el tejido conectivo de la piel.

A diferencia de las células renales y hepáticas, los extractos evaluados en esta línea mostraron menor efecto citotóxico, ya que los fibroblastos no tienen una capacidad metabólica elevada. Sólo el extracto hexánico mostro un efecto tóxico significativo a una concentración de 250 µg/mL con un efecto del 88.8% de inhibición y con un  $CC_{50}$  de  $154.2 \pm 3.57$  µg/mL, el resto de los extractos no tuvieron efecto tóxico significativo a la concentración más elevada.



**Gráfica 14** Inhibición del crecimiento celular en la línea HDF tras 48 h de tratamiento de los extractos de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol usado como control positivo [0.25 µM]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media ± SD.

En la **Grafica 15** se observa el efecto tóxico de los compuestos aislados a diferentes concentraciones. Como en la gráfica anterior el efecto fue menor que en el resto de las líneas celulares, cumarato de bornilo mostro un efecto tóxico mayor y una  $CC_{50}$  71.64 µg/mL ± 15.2 µg/mL (238.4 ± 50.59 µM), ferulato de bornilo también tuvo un efecto significativo  $CC_{50}$  35.28 ± 3.4 µg/mL (106.77 ± 10.29 µM). Cafeato de bornilo y luteolina-7-*O*-β-glucopiranosido no tuvieron un efecto significativo.



**Gráfica 15** Inhibición del crecimiento celular en la línea HDF tras 48 h de tratamiento de los metabolitos aislados de *C. mutica* por ensayo de MTT. Taxol fue usado como control positivo [0.25 µM]. DMSO usado como control negativo. Cada barra representa la media ± SD.

### 11.9 Curvas de tolerancia a sacarosa

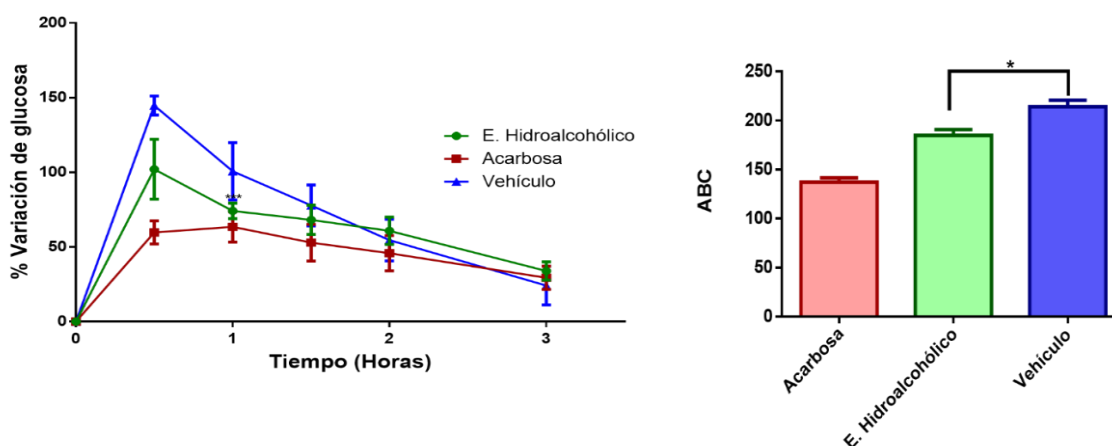
Por último se determinó el efecto anti-hiperglucémico de los extractos hidroalcohólico, metanólico y acetónico de *C. mutica*, el extracto hexánico no se consideró para la evaluación *in vivo* ya que en la evaluación *in vitro* mostró poca actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -glucosidasas, además de los resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad, por lo que sólo se evaluaron 3 extractos a una dosis de 100 mg/kg; se utilizó sacarosa como sustrato a una dosis de 2 g/kg; acarbosa a 2 mg/kg; y el vehículo a 5 mL/kg. Se calculó el área bajo la curva (ABC) utilizando el método de los trapezoides.

El extracto hidroalcohólico sólo presentó un efecto significativo con respecto al control después de 1 hora de la administración, de la misma manera los datos de ABC indican que si hay una disminución de los niveles de glucosa en el grupo tratado con el extracto



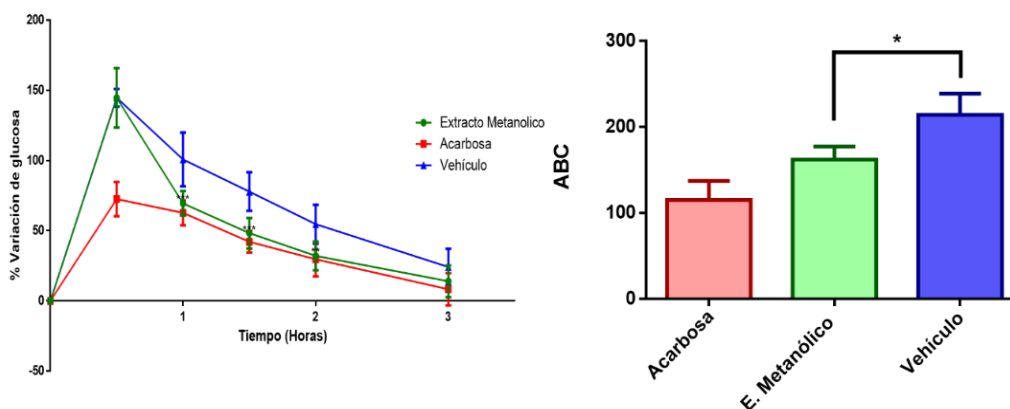
hidroalcohólico pero no es significativo con respecto al vehículo, sin embargo, debido a la presencia de los compuestos ácido cafeico y luteolina-7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido se proyectaba que el efecto anti-hiperglucémico fuera mayor debido a que ambos compuestos destacan por ser potentes inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas (Oboh et al., 2015) (**Gráfica 16**). No obstante, los reportes que respaldan el efecto anti-hiperglucémico de luteolina-7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido indican que por vía oral este es metabolizado a luteolina y que a pesar de que su biodisponibilidad aumenta siendo administrado en forma de glicósido la luteolina, ha demostrado su efecto anti-hiperglucemiante tras 4 semanas de tratamiento, de tal manera que es necesario alcanzar altas concentraciones de metabolito para tener un efecto significativo (Zang et al., 2016).

El ácido cafeico también ha demostrado tener efecto como inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro*, pero este no es tan eficaz cuando es administrado vía oral, ya que posee una muy baja permeabilidad (S.-J. Wang et al., 2014).



**Gráfica 16** Curva de tolerancia a sacarosa oral (CTSO); área bajo la curva (ABC). Evaluación del extracto hidroalcohólico [100 mg/kg] de *C. mutica*. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6.

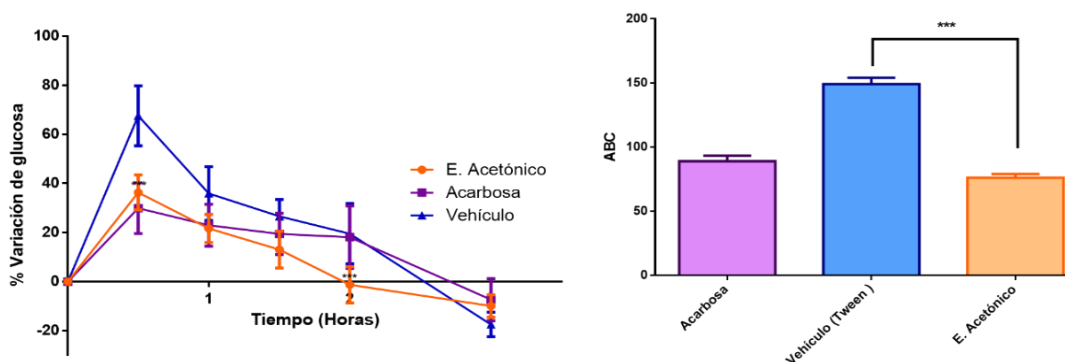
\*\*\*p<0.001 vs vehículo.



**Gráfica 17** Curva de tolerancia a sacarosa oral (CTSO); área bajo la curva (ABC). Evaluación del extracto metanólico [100 mg/kg] de *C. mutica*. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6. \*\*\*p<0.001 vs vehículo.

El extracto metanólico presentó una actividad significativa frente al vehículo como antihiperglucemiante a partir de la primera hora, sin embargo, no disminuyó el pico hiperglucémico post-administración de sacarosa como lo hace la acarbosa, por lo que sus metabolitos no podrían ser directamente inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, entre ellos el glucósido de  $\beta$ -sitosterol del cual se sabe que puede aumentar los niveles de insulina en la circulación debido a su aglicona (Ivorra et al., 1990). Ya que el glucósido de  $\beta$ -sitosterol es metabolizado principalmente a  $\beta$ -sitosterol (aglicona), se ha demostrado que como aglicona es más efectivo que en su forma glicosilada cuando es administrado vía oral dado que se metabolizan a colesterol y ácido quenodesoxicólico (Salen et al., 1970) los cuales se sabe que no poseen actividad anti-hiperglucemiante a diferencia de la aglicona  $\beta$ -sitosterol del cual se conoce ampliamente su actividad antidiabética mediante diferentes mecanismos de acción (S. Kumar et al., 2013) entre ellas como inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasas (Sheng et al., 2014).

Por otro lado, no se tienen reportes de la actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -glucosidasas del cumarato de bornilo. En nuestro trabajo (**Grafica 4**) se corroboró que sólo inhibe un 17.5%. Si bien en la **Grafica 3** se observa que el extracto metanólico si tuvo un efecto inhibitorio significativo, éste puede deberse al glucósido de  $\beta$ -sitosterol y a la mezcla de otros metabolitos.



**Gráfica 18** Curva de tolerancia a sacarosa; área bajo la curva (ABC). Evaluación del extracto acetónico [100 mg/kg] de *C. mutica*. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6. \*\*\*p<0.001 vs vehículo.

El extracto acetónico presento mejor actividad anti-hiperglucémica (**Grafica 18**), inhibiendo el aumento del pico hiperglucémico. De la misma manera, que la acarbosa, en el gráfico ABC se observa que el efecto del extracto acetónico es incluso mayor. A pesar de que aparentemente el cafeato de bornilo y el cumarato de bornilo tienen un efecto antagónico entre ellos en el ensayo *in vitro*, en este ensayo se observa un mayor porcentaje de variación de glucosa. Esto se puede deber al metabolismo de fase 1 (hidrolisis, oxidación, reducción) en el intestino, que da como principal metabolito el ácido cafeico a partir de cafeato de bornilo. Se ha demostrado que el ácido cafeico como producto del metabolismo tiene mejor biodisponibilidad que el ácido cafeico administrado directamente ya que este tiene una baja absorción, de esta manera su efecto anti-hiperglucémico es más eficaz cuando es

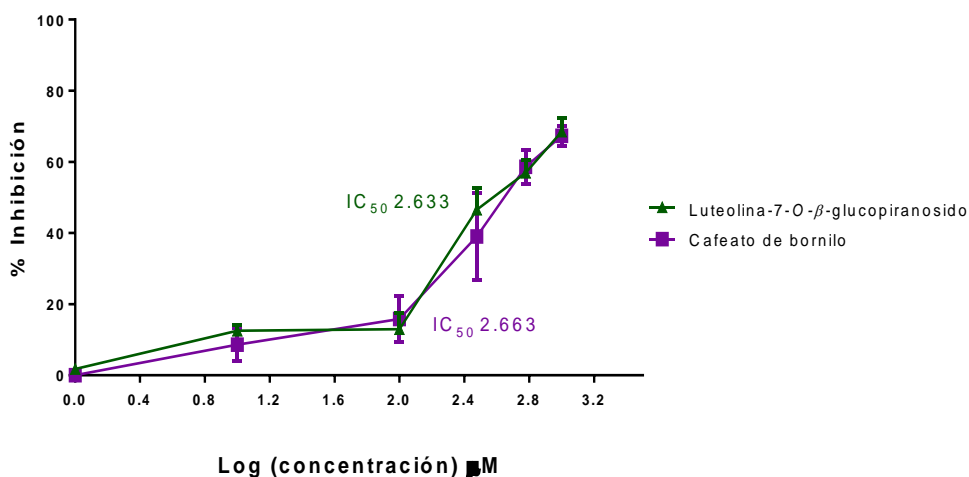


administrado oralmente como cafeato de bornilo y en menor proporción como cumarato de bornilo (Shi et al., 2019).

Si bien la mayoría de los compuestos aislados tienen actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -glucosidasas en ensayos *in vitro* estos no toman en cuenta el metabolismo intestinal del cual va a depender su biodisponibilidad y biotransformación esto se observó en el ensayo de CTSO en donde el extracto hidroalcohólico y el extracto metanólico tuvieron menor actividad anti-hiperglucemiante que en los ensayos *in vitro* donde fueron muy eficaces, mientras que el extracto acetónico tuvo mejor actividad *in vivo* posiblemente debido al metabolismo intestinal.

#### 11.10 Determinación de $IC_{50}$ de los compuestos sobre $\alpha$ -glucosidasas

Se evaluaron los compuestos 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina y cafeato de bornilo a diferentes concentraciones ya que fueron los más activos sobre  $\alpha$ -glucosidasas y se compararon con los valores de  $CC_{50}$  y de esta forma se determinó si los valores de  $IC_{50}$  están por debajo del  $CC_{50}$ .







**Gráfica 19** Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas y estimación de  $IC_{50}$  de los compuestos más activos de *C. mutica*.

Se determinaron los valores de  $IC_{50}$  de los compuestos 7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina 429.6  $\mu$ M y cafeato de bornilo 460.7  $\mu$ M, en ambos casos se observa que el porcentaje de inhibición aumenta significativamente a partir de una concentración de 300  $\mu$ M. El valor  $CC_{50}$  del cafeato de bornilo es de 284.0  $\mu$ M siendo menor que su  $IC_{50}$  por lo que a pesar de que tiene un efecto inhibitorio interesante también muestra un efecto citotóxico potente, por otro lado el valor de  $CC_{50}$  de 7-*O*- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina sobre células renales y fibroblastos es mucho más alto que su  $IC_{50}$  lo que indica que es seguro ya que afecta la viabilidad celular a concentraciones más elevadas, mientras que el valor de  $CC_{50}$  (456.9  $\mu$ M) en hepatocitos es similar a su  $IC_{50}$  lo que podría provocar que la ventana terapéutica sea muy estrecha.

### 11.11 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

Dado que se obtuvo bajo rendimiento de la fracción 5 obtenida de la cromatografía del extracto de diclorometano (columna 3) obtenido de la bipartición del extracto hidroalcohólico, se analizó por CG-EM bajo la clave C-3FX5 de la cual se identificaron 13 compuestos en su mayoría esteres de ácidos grasos. Los más abundantes son el éster metílico de ácido hexadecanoico (35.85%), el éster metílico de ácido 9,12,15-octadecatrienoico (26.18%) y el éster metílico de ácido eicosanoico (11.51%). La identificación de estos compuestos sustenta el efecto anti-hiperglucemiante del extracto hidroalcohólico ya que es bien conocida la actividad antidiabética que pueden tener estos esteres de ácidos grasos en conjunto y en forma de ácidos libres (Artanti- et al. 2012) **Tabla 24**. Para confirmar la



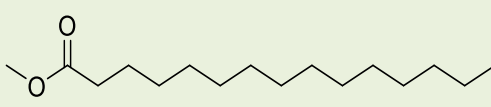
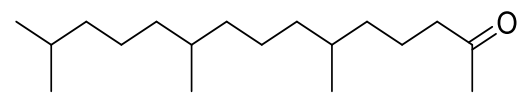
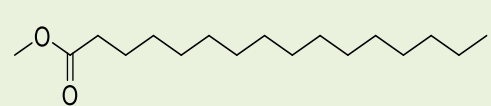
identidad de los metabolitos, el índice de retención calculado de cada compuesto fue comparado con el ya reportado en la base de datos NIST con la que cuenta el cromatógrafo de gases.

Para el cálculo de índice de retención lineal se utilizó la ecuación

$$LRI = \left[ \frac{RT_i - RT_z}{R_{T(z-1)} - R_{TZ}} + z \right] \times 100$$

Donde *i* es el tiempo de retención (RT por sus siglas en inglés) del compuesto de interés, *z* es el RT del alcano que eluye antes y *Z*+1 es el RT del alcano que eluye después.

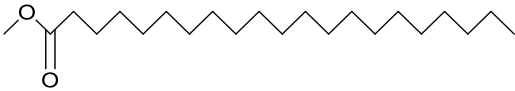
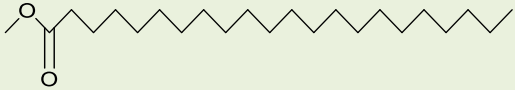
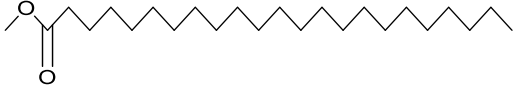
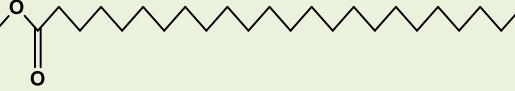
**Tabla 24 Metabolitos identificados por CG-EM de la fracción C-3FX5**

Compuesto	Abundancia %	IR Calculado	IR reportado NIST*
Éster metílico de ácido pentadecanoico  (17)	0.78	1800	1811
Perhidrofarnesil acetona  (18)	1.01	2010	2097
Éster metílico de ácido hexadecanoico  (19)	35.85	1914	1912
Éster metílico de ácido heptadecanoico	1.53	2340	2010

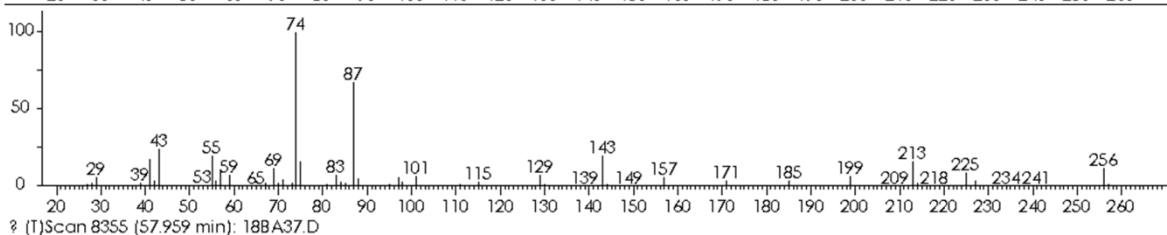
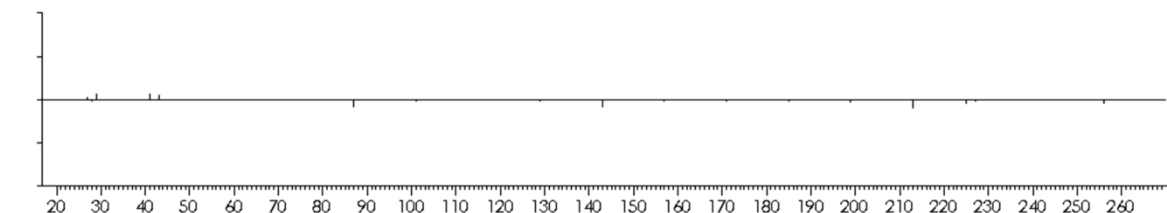
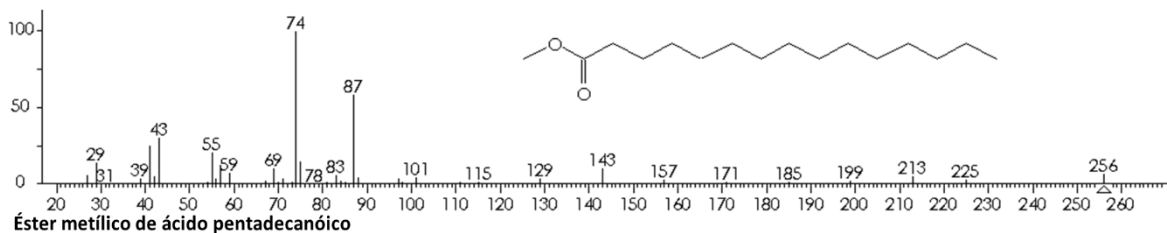


Compuesto	Abundancia %	IR Calculado	IR reportado NIST*
 (20)			
Éster metílico de ácido 9,12,15- octadecatrienoico 	26.181	2105	2078
Éster metílico de ácido octadecanoico 	9,27	2100	2109
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol 	0.72	2105	2119
Éster metílico de ácido nonadecanoico 	0.45	2127	1529
Éster metílico de ácido eicosanoico 	11.51	2250	2295
Éster metílico de ácido heneicosanoico	1.33	2370	2410

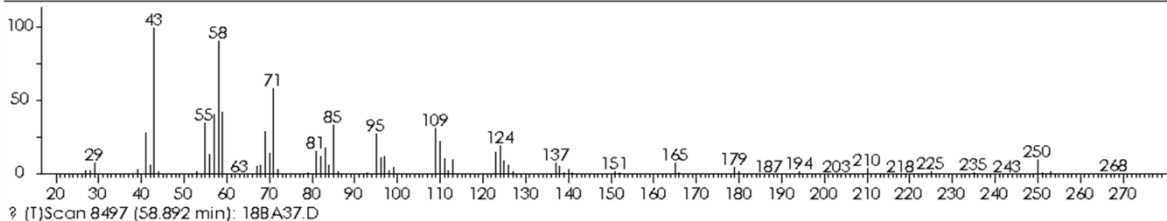
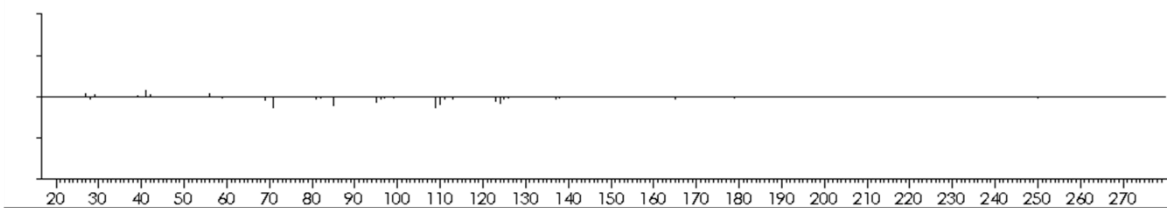
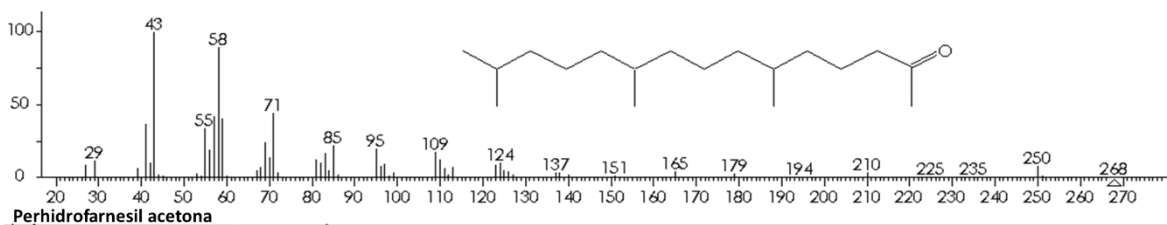


Compuesto	Abundancia %	IR Calculado	IR reportado NIST*
 (26)			
Éster metílico de ácido docosanoico  (27)	6.23	2480	2513
Éster metílico de ácido tricosanoico  (28)	0.67	2565	2615
Éster metílico de ácido tetracosanoico  (29)	1.02	2940	3024

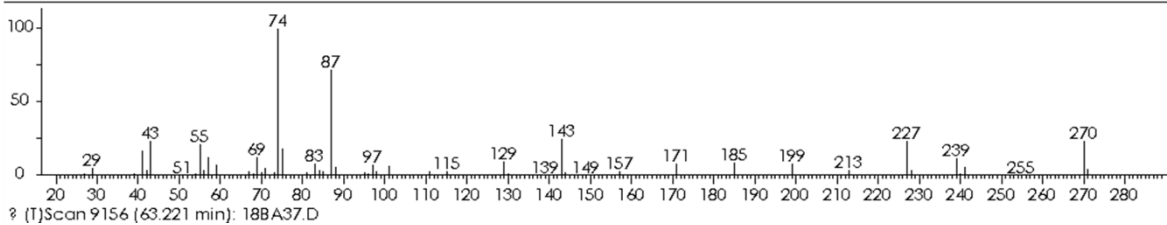
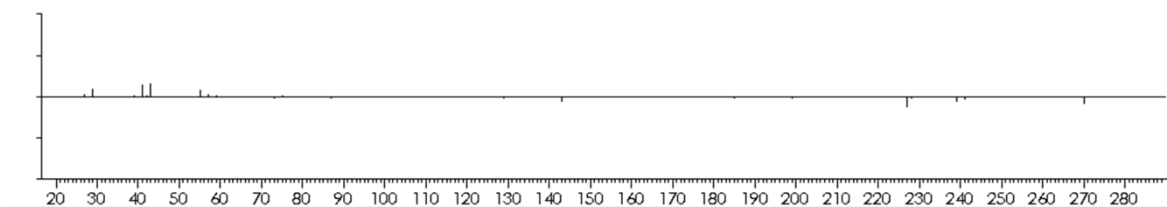
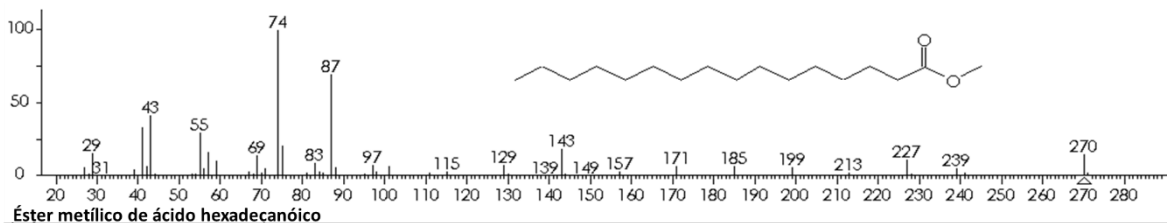
NIST (National Institute of Standards and Technology)



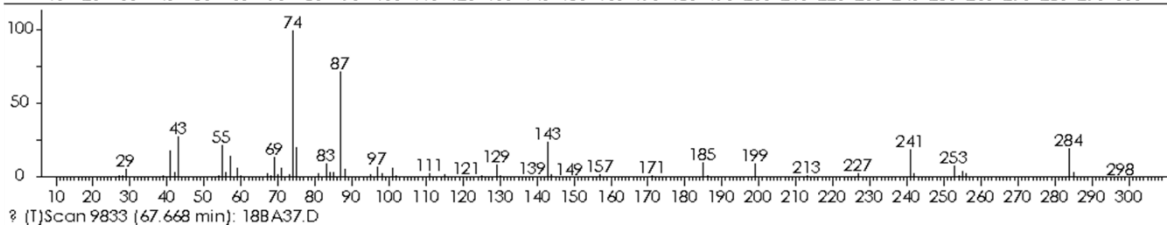
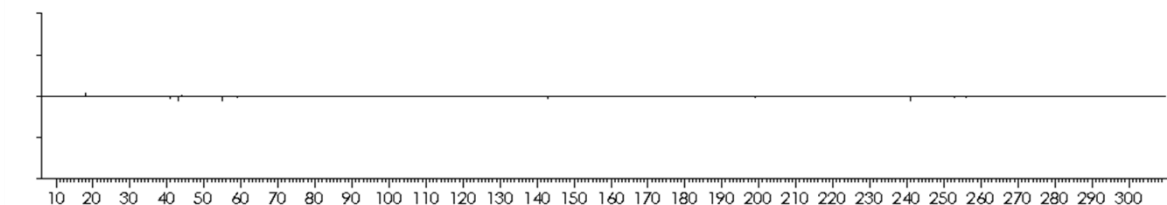
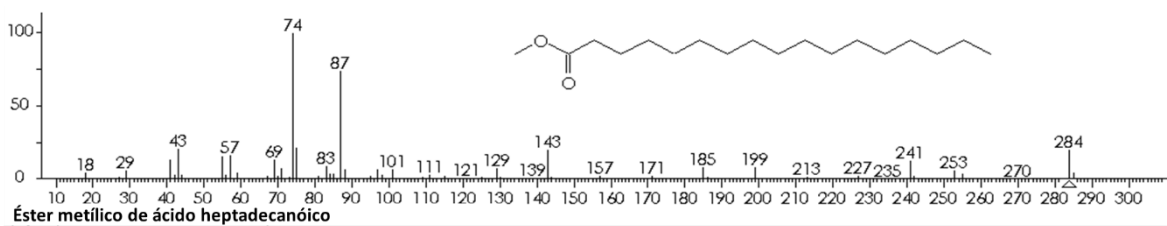
### Espectro de masas. Éster metílico de ácido pentadecanóico (17)



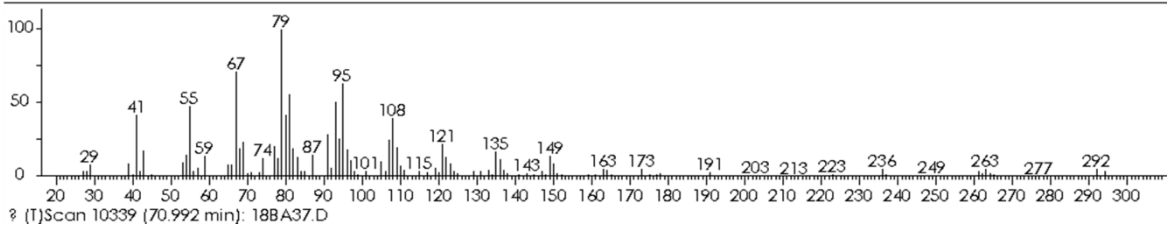
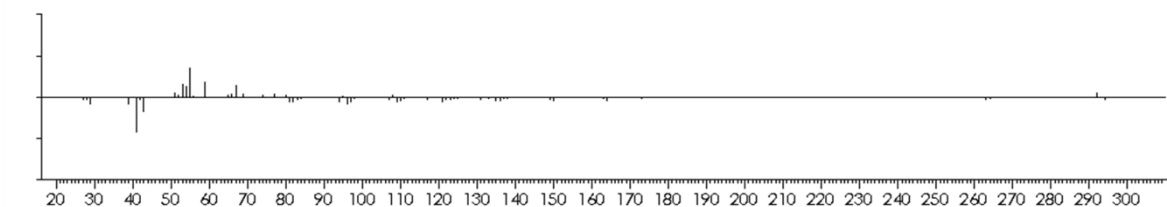
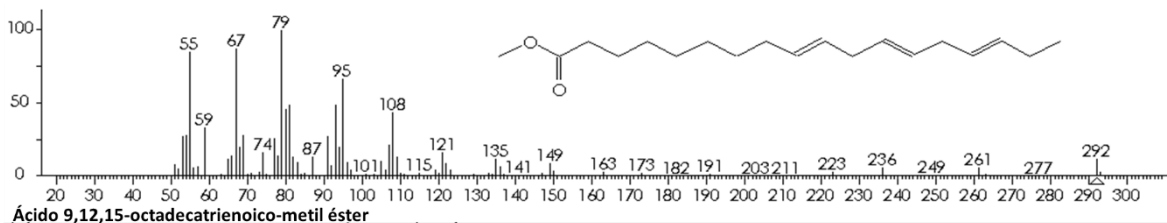
### Espectro de masas. Perhidrofarnesil acetona (18)



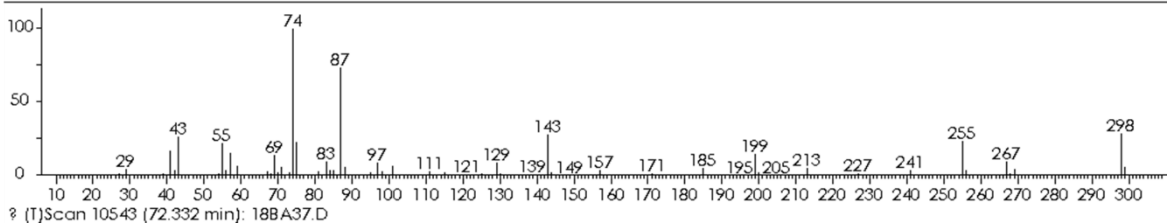
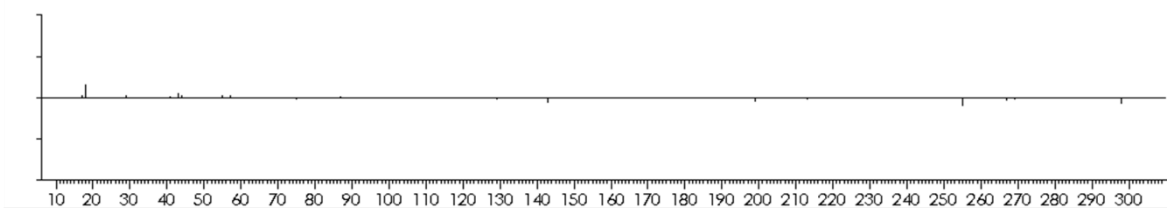
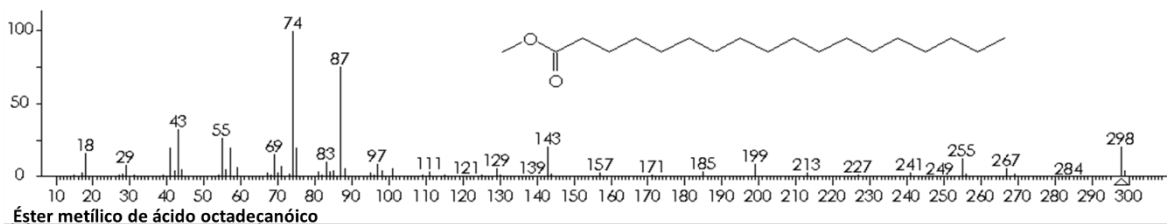
### Espectro de masas. Éster metílico de ácido hexadecanoico (19)



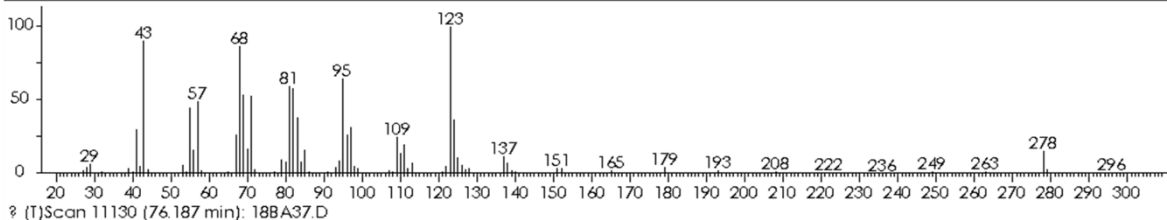
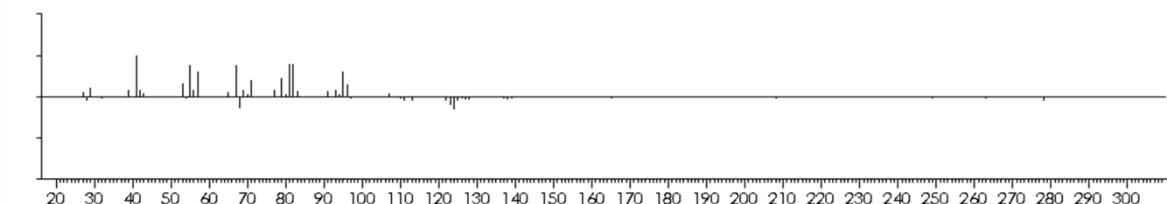
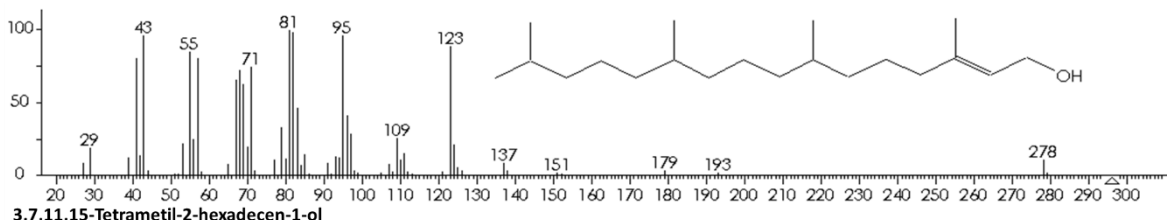
### Espectro de masas. Éster metílico de ácido heptadecanoico (20)



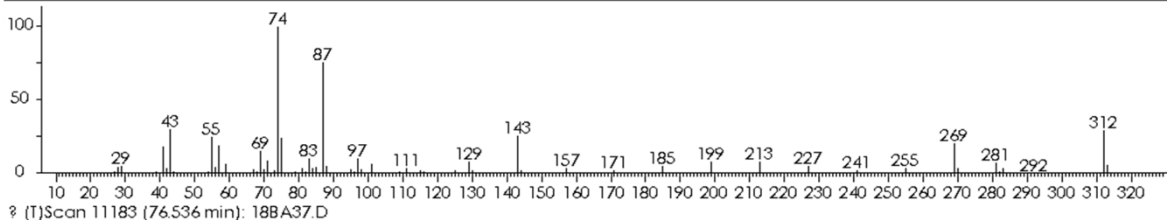
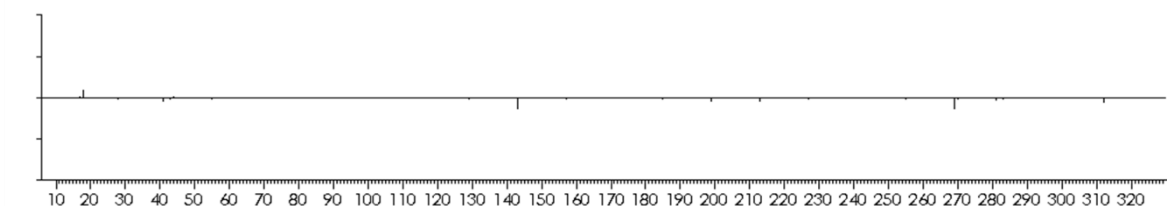
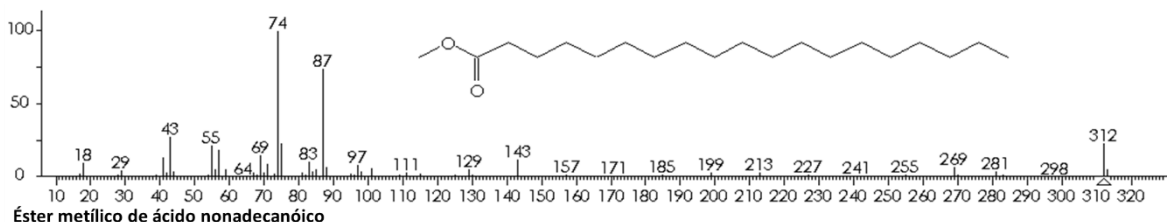
### Espectro de masas. Ácido 9,12,15-octadecatrienoico-metil éster (21)



### Espectro de masas. Éster metílico de ácido octadecanoico (22)

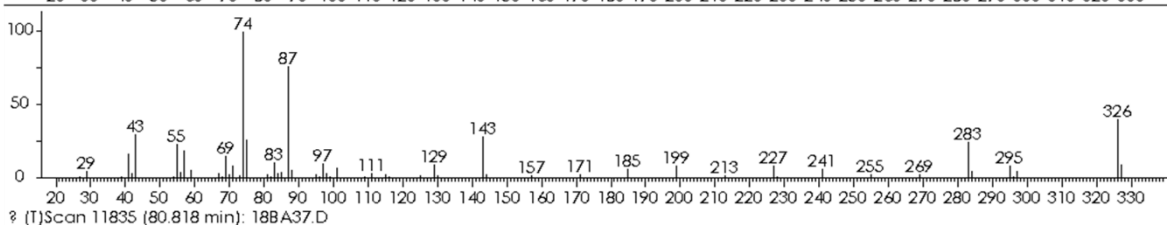
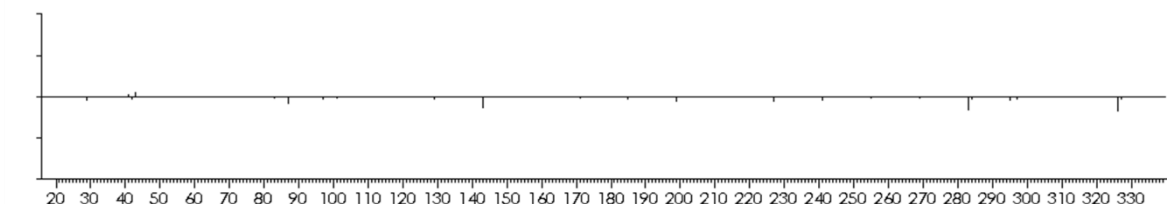
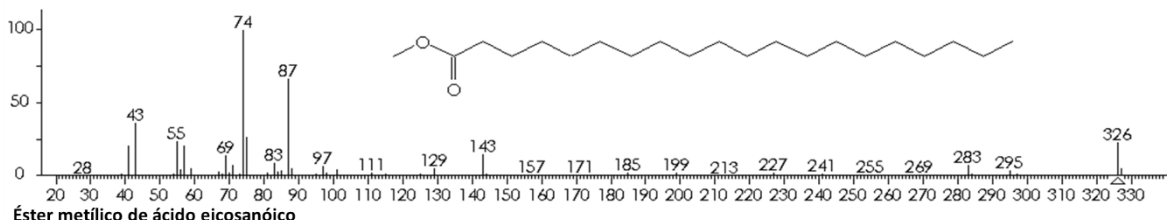


### Espectro de masas. 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (23)

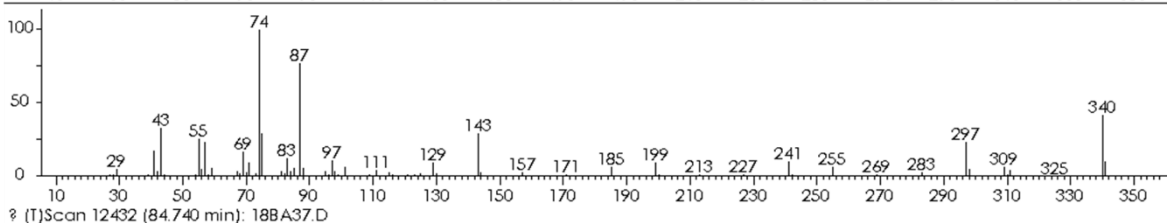
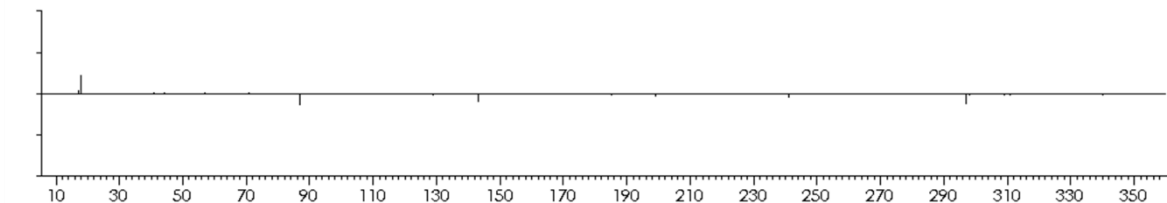
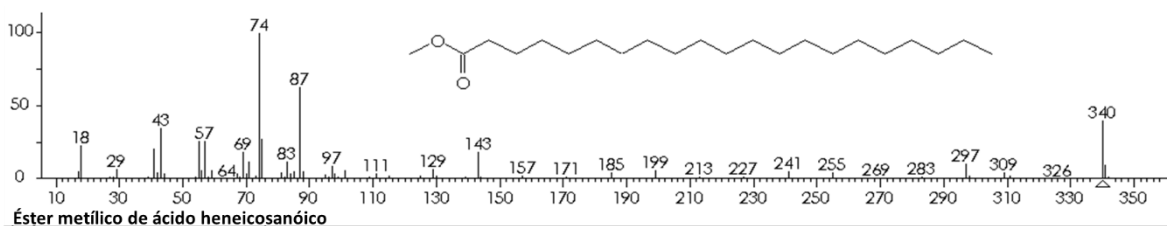


### Espectro de masas. Éster metílico de ácido nonadecanóico (24)

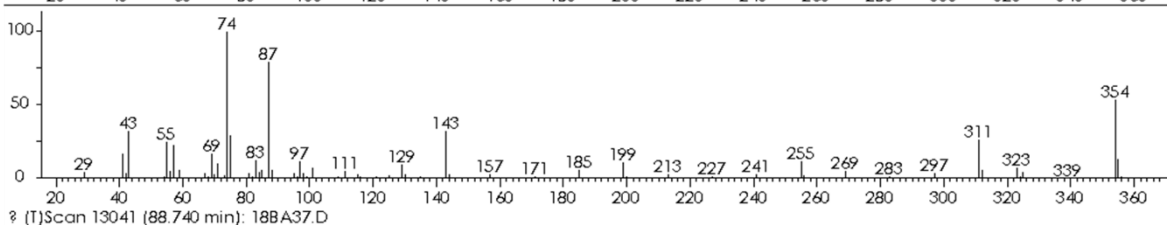
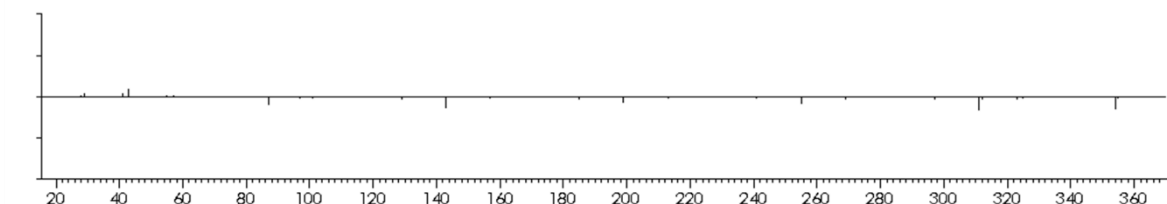
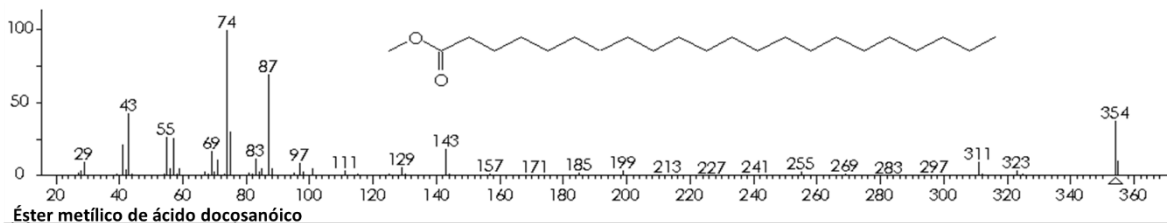




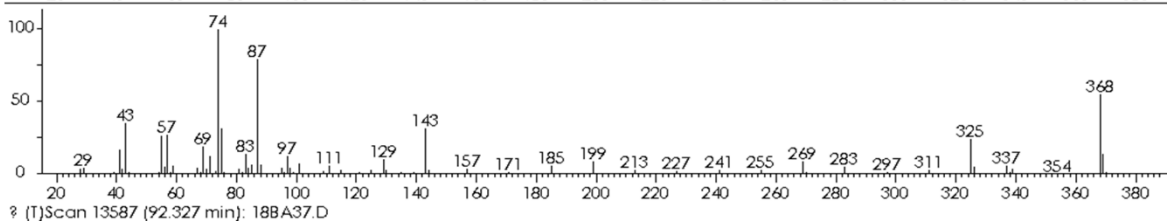
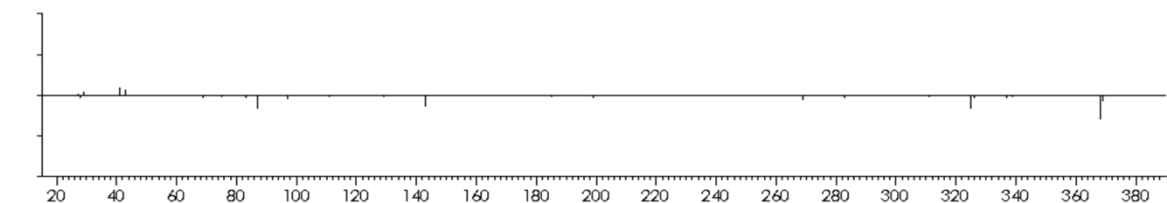
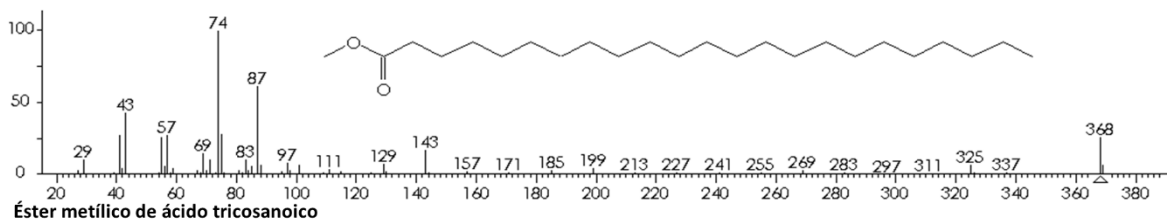
### Espectro de masas. Éster metílico de ácido eicosanóico (25)



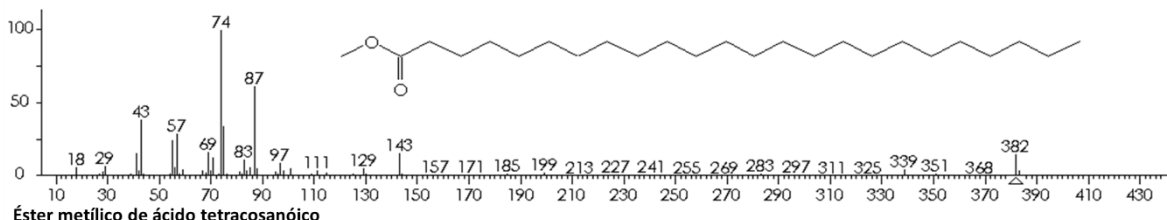
### Espectro de masas. Éster metílico de ácido heneicosanóico (26)



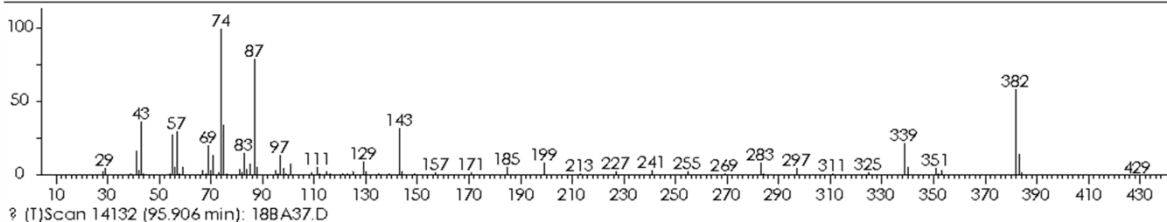
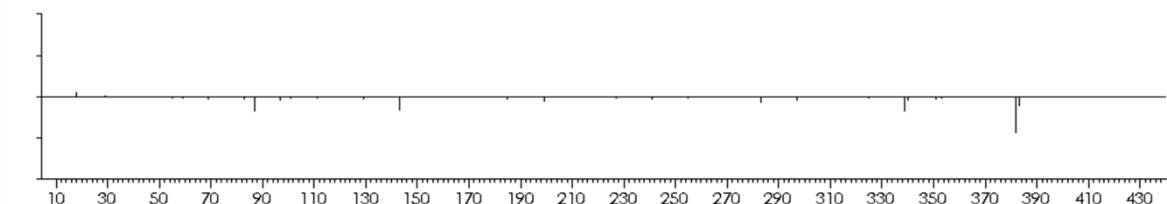
### Espectro de masas. Éster metílico de ácido docosanoico (27)



### Espectro de masas. Éster metílico de ácido tricosanoico (28)



Éster metílico de ácido tetracosanoico



Espectro de masas. Éster metílico de ácido tetracosanoico (29)



## 12. CONCLUSIÓN

Se demostró la actividad inhibitoria  $\alpha$ -glucosidasas de los extractos y los compuestos aislados de las partes aéreas de *Coreopsis mutica* y se determinó el valor de IC<sub>50</sub> de los compuestos más activos. Se evaluó la toxicidad de extractos y compuestos en células inmortalizadas de riñón, hígado y fibroblastos dérmicos humanos. El extracto hidroalcohólico, metanólico y acetónico disminuyen significativamente las concentraciones de glucosa en sangre en ratones normoglucémicos en ensayos de CTSO.

### 12.1 Conclusiones parciales

- El extracto hidroalcohólico, metanólico y acetónico mostraron actividad anti-hiperglucemiante significativa en un modelo *in vivo* a una dosis de 100 mg/kg. Estos mismos extractos presentaron actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -glucosidasas.
- Mediante RMN, se aislaron e identificaron seis compuestos que corresponden a los metabolitos mayoritarios de cada extracto siendo 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina y el cafeato de bornilo los que tuvieron mayor porcentaje de inhibición sobre  $\alpha$ -glucosidasas.
- Los extractos acetónico y hexánico mostraron mayor efecto citotóxico sobre células de origen hepático y renal (IHH y HEK 293), respectivamente, el cual se ve potenciado por la presencia de cafeato y cumarato de bornilo. El 7-O- $\beta$ -glucopiranosido de luteolina demostró tener el mayor efecto sobre  $\alpha$ -glucosidasas, así como una toxicidad baja por lo que podría ser un buen candidato como agente anti-hiperglucemiante.



### 13. PERSPECTIVAS

- Determinar la toxicidad de los extractos en un modelo *in vivo* (Toxicidad Oral Aguda).
- Realizar estudios de citotoxicidad en líneas celulares cancerígenas de aquellos compuestos aislados de *C. mutica*.
- Proponer un modelo *ex vivo* de intestino invertido para determinar la absorción y metabolismo intestinal de los compuestos aislados.
- Considerar otra posible diana terapéutica involucrada en diabetes en la que el compuesto más activo (luteolina 7-*O*- $\beta$ - glucopiranosido) pueda ser más eficaz.



#### 14. BIBLIOGRAFÍA

Adisakwattana, S., Chantarasinlapin, P., Thammarat, H., & Yibchok-Anun, S. (2009). A

series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal  $\alpha$ -glucosidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24:5, 1195–2000. <https://doi.org/10.1080/14756360902779326>

Alberto, J., Reyes, O., & Plancarte, A. A. (2008). *Bases Moleculares de las acciones de la insulina*.

Amslinger, S. (2010). The tunable functionality of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds enables their differential application in biological systems. En *ChemMedChem* (Vol. 5, Número 3, pp. 351–356). <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900499>

Artanti, N., Tachibana, S., Kardono, L. B. S., & Sukiman, H. (2012). Isolation of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors produced by an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. TSC13 from *Taxus sumatrana*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(14), 673–679. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2012.673.679>

Bahadori, M. B., Dinparast, L., & Zengin, G. (2016). The Genus *Heracleum* : A Comprehensive Review on Its Phytochemistry, Pharmacology, and Ethnobotanical Values as a Useful Herb. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1018–1039. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12222>

Barrett, K. E. (2014). *Chapter 15. Carbohydrate, Protein, and Water-Soluble Vitamin Assimilation*. *Gastrointestinal Physiology*, 2e. <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=57851128>



- Basu, A., Saito, K., Meyer, K., Ray, R. B., Friedman, S. L., Chang, Y.-H., & Ray, R. (2006). Stellate cell apoptosis by a soluble mediator from immortalized human hepatocytes. *Apoptosis*, *11*(8), 1391–1400. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-8312-z>
- Bischoff, H. (1995). The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale*, *18*(4), 303–311. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8549017>
- Brás, N. F., Santos-Martins, D., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2018). Mechanistic Pathway on Human  $\alpha$ -Glucosidase Maltase-Glucoamylase Unveiled by QM/MM Calculations. *Journal of Physical Chemistry B*, *122*(14), 3889–3899. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b01321>
- Bryant, N. J., Govers, R., & James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 3, Número 4, pp. 267–277). <https://doi.org/10.1038/nrm782>
- Cai, W., Yu, L., Zhang, Y., Feng, L., Kong, S., Tan, H., Xu, H., & Huang, C. (2016). Extracts of *Coreopsis tinctoria* Nutt. Flower Exhibit Antidiabetic Effects via the Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase Activity. *Journal of diabetes research*, *2016*, 2340276. <https://doi.org/10.1155/2016/2340276>
- Chen, J., Mangelinckx, S., Ma, L., Wang, Z., Li, W., & De Kimpe, N. (2014). Caffeoylquinic acid derivatives isolated from the aerial parts of *Gynura divaricata* and their yeast  $\alpha$ -glucosidase and PTP1B inhibitory activity. *Fitoterapia*, *99*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2014.08.015>



Cheng, A. Y. Y., & Fantus, I. G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. En *CMAJ* (Vol. 172, Número 2, pp. 213–226).

<https://doi.org/10.1503/cmaj.1031414>

Chochkova, M. G., Petrova, P. P., Stoykova, B. M., Ivanova, G. I., Štícha, M., Díbó, G., & Milkova, T. S. (2017). Structure-Activity Relationships of N-Cinnamoyl and Hydroxycinnamoyl Amides on  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition. *Journal of Chemistry*, 2017.

<https://doi.org/10.1155/2017/6080129>

Crawford, D. J. (1970). Systematic studies on mexican coreopsis (compositae). *Coreopsis mutica*: flavonoid chemistry, chromosome numbers, morphology, and hybridization. *Brittonia*, 22, 93–111. <https://link.springer.com/content/pdf/10.2307%2F2805804.pdf>

Crawford, D. J. (1981). A New Variety of *Coreopsis Mutica* (Compositae) from Mexico. *Brittonia*, 33(4), 547. <https://doi.org/10.2307/2806762>

Crawford, D. J., & Mort, M. E. (2005). Phylogeny of eastern North American *Coreopsis* (Asteraceae-Coreopsideae): Insights from nuclear and plastid sequences, and comments on character evolution. *American Journal of Botany*, 92(2), 330–336.

<https://doi.org/10.3732/ajb.92.2.330>

Crawford, D. J., & Smith, E. B. (1980). Flavonoid Chemistry of *Coreopsis Grandiflora* (Compositae). *Brittonia*, 32(2), 154. <https://doi.org/10.2307/2806783>

Crawford, D. J., & Smith, E. B. (1985). Leaf flavonoid chemistry and taxonomy of *Coreopsis* sect. *Coreopsis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 13(2), 115–118.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



[https://doi.org/10.1016/0305-1978\(85\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0305-1978(85)90068-7)

De Meyts, P. (2000). The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. En *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27512793>

Demirbilek, H., Rahman, S. A., Buyukyilmaz, G. G., & Hussain, K. (2017). Diagnosis and treatment of hyperinsulinaemic hypoglycaemia and its implications for paediatric endocrinology. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, 2017(1).

<https://doi.org/10.1186/s13633-017-0048-8>

Díaz Hernández, D. P., Carlos, L., & Herrera, B. (2002). *¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular?*

Elya, B., Basah, K., Mun'Im, A., Yulastuti, W., Bangun, A., & Septiana, E. K. (2012). Screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/281078>

Fowler, M. J. (2008). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*, 26(2), 77–82. <https://doi.org/10.2337/diaclin.26.2.77>

Gaspar, L., Oliveira, A. P., Silva, L. R., Andrade, P. B., Pinho, P. G. de, Botelho, J., & Valentão, P. (2012). Metabolic and biological prospecting of *Coreopsis tinctoria*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 350–358. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000224>

Gericke, B., Schecker, N., Amiri, M., & Naim, H. Y. (2017). Structure-function analysis of



human sucrase-isomaltase identifies key residues required for catalytic activity.

*Journal of Biological Chemistry*, 292(26), 11070–11078.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.791939>

Govil, J. N., & Singh, S. (2018). *Metabolic disorders : diabetes. Part I.*

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), 59–72. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>

Grand, R., & Levine, J. (2013). *Carbohydrate Digestion and Absorption NASPGHAN Physiology Series.*

Gutiérrez Rodelo, C., Roura Guiberna, A., & Olivares Reyes, J. A. (2015). *Molecular mechanisms of insulin resistance: An update.*

Holmes, R. (1971). Carbohydrate digestion and absorption From the Royal Infirmary, Manchester. En *J. clin. Path* (Vol. 24). BMJ Publishing Group.

Hooton, D., Lentle, R., Monro, J., Wickham, M., & Simpson, R. (2015). The secretion and action of brush border enzymes in the mammalian small intestine. En *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Vol. 168, pp. 59–118). Springer Verlag. [https://doi.org/10.1007/112\\_2015\\_24](https://doi.org/10.1007/112_2015_24)

Hutton, J. C. (1994). Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases. *Diabetologia*, 37(2 Supplement). <https://doi.org/10.1007/BF00400826>

Ivorra, M. D., Paya, M., & Villar, A. (1990). Effect of  $\beta$ -sitosterol-3 $\beta$ -D-glucoside on



insulin secretion in vivo in diabetic rats and in vitro in isolated rat islets of

Langerhans. *Pharmazie*, 45(4), 271–273.

Jeong, C. H., Jeong, H. R., Choi, G. N., Kim, D. O., Lee, U., & Heo, H. J. (2011).

Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. *Chinese Medicine*, 6. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-6-25>

Jhong, C. H., Riyaphan, J., Lin, S. H., Chia, Y. C., & Weng, C. F. (2015). Screening alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitors from natural compounds by molecular docking in silico. *BioFactors*, 41(4), 242–251. <https://doi.org/10.1002/biof.1219>

Jones, K., Sim, L., Mohan, S., Kumarasamy, J., Liu, H., Avery, S., Naim, H. Y., Quezada-Calvillo, R., Nichols, B. L., Mario Pinto, B., & Rose, D. R. (2011). Mapping the intestinal alpha-glucogenic enzyme specificities of starch digesting maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(13), 3929–3934. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.05.033>

Joseph, B., & Jini, D. (2011). Insight into the hypoglycaemic effect of traditional indian herbs used in the treatment of diabetes. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(4), 352–376. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2011.352.376>

Jothy, S. L., Chen, Y., Kanwar, J. R., & Sasidharan, S. (2013). Evaluation of the genotoxic potential against h<sub>2</sub>o<sub>2</sub>-radical-mediated DNA damage and acute oral toxicity of standardized extract of *polyalthia longifolia* leaf. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/925380>



- Kadziola, A., Søggaard, M., Svensson, B., & Haser, R. (1998). Molecular structure of a barley  $\alpha$ -amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 278(1), 205–217.  
<https://doi.org/10.1006/JMBI.1998.1683>
- Kalita, D., Holm, D. G., LaBarbera, D. V., Petrash, J. M., & Jayanty, S. S. (2018). Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. *PLOS ONE*, 13(1), e0191025.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191025>
- Kebede, M. A., Oler, A. T., Gregg, T., Balloon, A. J., Johnson, A., Mitok, K., Rabaglia, M., Schueler, K., Stapleton, D., Thorstenson, C., Wrighton, L., Floyd, B. J., Richards, O., Raines, S., Eliceiri, K., Seidah, N. G., Rhodes, C., Keller, M. P., Coon, J. L., ... Attie, A. D. (2014). SORCS1 is necessary for normal insulin secretory granule biogenesis in metabolically stressed  $\beta$  cells. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4240–4256.  
<https://doi.org/10.1172/JCI74072>
- Kim, J.-S., Kwon, C.-S., & Son, K. H. (2000). Inhibition of Alpha-glucosidase and Amylase by Luteolin, a Flavonoid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(11), 2458–2461. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.2458>
- Krenn, L., Miron, A., Pemp, E., Petr, U., & Kopp, B. (2003). Flavonoids from *Achillea nobilis* L. En *Z. Naturforsch* (Vol. 58). [www.znaturforsch.com](http://www.znaturforsch.com)
- Kumar, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2013). Enzymes inhibition and antidiabetic effect of isolated constituents from *Dillenia indica*. *BioMed Research International*, 2013.



<https://doi.org/10.1155/2013/382063>

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

<https://doi.org/10.4103/0973-7847.79096>

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

<https://doi.org/10.4103/0973-7847.79096>

Lam, S.-C., Lam, S.-F., Zhao, J., & Li, S.-P. (2016). Rapid Identification and Comparison of Compounds with Antioxidant Activity in *Coreopsis tinctoria* Herbal Tea by High-Performance Thin-Layer Chromatography Coupled with DPPH Bioautography and Densitometry. *Journal of Food Science*, 81(9), C2218–C2223.

<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13402>

Lin, J.-H., Lin, Y.-T., Huang, Y.-J., Wen, K.-C., Chen, R.-M., Ueng, T.-H., & Liao, C.-H. (2001). Isolation and Cytotoxicity of Flavonoids from *Daphnis Genkwae* Flos. En *Journal of Food and Drug Analysis* (Vol. 9, Número 1).

Maldonado, E., Apan, M., & Pérez-Castorena, A. (1998). Anti-Inflammatory Activity of Phenyl Propanoids from *Coreopsis mutica* var. *mutica*<sup>1</sup>. *Planta Medica*, 64(07), 660–661. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957544>

Maldonado, E., Ramírez, M. T., & Pérez Castorena, A. (1998). Anti-Inflammatory Activity of Phenyl Propanoids from *Coreopsis mutica* var. *mutica*. *Planta Medica*, 64, 660–



661.

- Navale, A. M., & Paranjape, A. N. (2016). Glucose transporters: physiological and pathological roles. En *Biophysical Reviews* (Vol. 8, Número 1, pp. 5–9). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2>
- Nih, Od, Oer, & Olaw. (2011). *Guide laboratory animals for the care and use*. <http://www.nap.edu>.
- Nishioka, T., Kawabata, J., & Aoyama, Y. (1998). Baicalein, an alpha-Glucosidase Inhibitor from *Scutellaria baicalensis*. *Journal of Natural Products*, 61, 1413–1415. <https://doi.org/10.1021/np980163p>
- Oboh, G., Agunloye, O. M., Adefegha, S. A., Akinyemi, A. J., & Ademiluyi, A. O. (2015). Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): A comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 26(2), 165–170. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2013-0141>
- Ogungbe, I. V, Crouch, R. A., Haber, W. A., & Setzer, W. N. (2010). Phytochemical investigation of *Verbesina turbacensis* Kunth: trypanosome cysteine protease inhibition by (-)-bornyl esters. *Natural product communications*, 5(8), 1161–1166. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839609>
- Ortiz-Andrade, R. R., Sá Nchez-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., & Estrada-Soto, S. (2008). Antidiabetic and toxicological



evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rat models and its implications on extra-pancreatic glucose regulation. *The Authors Journal Compilation* #, 10, 1097–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00869.x>

Patel, D., 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*, 2(5), 411–420. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60067-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60067-7)

Peng, X., Zhang, G., Liao, Y., & Gong, D. (2016). Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on  $\alpha$ -glucosidase. *Food Chemistry*, 190, 207–215. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.05.088>

Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F. T., Sousa, J. L. C., Tomé, S. M., Ramos, M. J., Silva, A. M. S., Fernandes, P. A., & Fernandes, E. (2017).  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1216–1228. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1368503>

Qi, J., Ojika, M., & Sakagami, Y. (1999). Differentiation in a rat PC12 cell line induced by ostruthin and (-)-bornyl ferulate, constituents of a chinese herbal medicine. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(8), 1501–1502. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.1501>

Qiu-sheng, Z., Xi-ling, S., Xu-bo, Meng, S., & Chang-hai, W. (2004). Protective effects of luteolin-7-glucoside against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats.



*undefined.*

Quezada-Calvillo, R., Sim, L., Ao, Z., Hamaker, B. R., Quaroni, A., Brayer, G. D., Sterchi, E. E., Robayo-Torres, C. C., Rose, D. R., & Nichols, B. L. (2008). Luminal starch substrate “Brake” on maltase-glucoamylase activity is located within the glucoamylase subunit. *The Journal of nutrition*, 138(4), 685–692.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18356321>

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, 1–6.

<https://doi.org/10.1155/2012/701261>

Rayyan, S., Fossen, T., Solheim Nateland, H., & Andersen, Ø. M. (2005). Isolation and Identification of Flavonoids, Including Flavone Rotamers, From The Herbal Drug “Crataegi Folium Cum Flore” (Hawthorn). *PHYTOCHEMICAL ANALYSIS*

*Phytochem. Anal*, 16, 334–341. <https://doi.org/10.1002.pca.853>

Ren, L., Qin, X., Cao, X., Wang, L., Bai, F., Bai, G., & Shen, Y. (2011). Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. *Protein & Cell*, 2(10), 827–836. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1105-3>

Riddy, D. M., Delerive, P., Summers, R. J., Sexton, P. M., & Langmead, C. J. (2018). G protein-coupled receptors targeting insulin resistance, obesity, and type 2 diabetes mellitus. En *Pharmacological Reviews* (Vol. 70, Número 1, pp. 39–67). American Society for Pharmacology and Experimental Therapy.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



<https://doi.org/10.1124/pr.117.014373>

Rietjens, I. M. C. M., Boersma, M. G., van der Woude, H., Jeurissen, S. M. F., Schutte, M. E., & Alink, G. M. (2005). Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 574(1–2), 124–138.

<https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2005.01.028>

Rorsman, P., & Renström, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. En *Diabetologia* (Vol. 46, Número 8, pp. 1029–1045). <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1153-1>

Rosak, C., & Mertes, G. (2012). Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: Patient considerations. En *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* (Vol. 5, pp. 357–367). Dove Press.

<https://doi.org/10.2147/dmso.s28340>

Salen, G., Ahrens, E. H., & Grundy, S. M. (1970). Metabolism of beta-sitosterol in man. *The Journal of clinical investigation*, 49(5), 952–967.

<https://doi.org/10.1172/JCI106315>

Saltos, M. B. V., Puente, B. F. N., Faraone, I., Milella, L., Tommasi, N. De, & Braca, A. (2015). Inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase from *Andromachia igniaria* Humb. & Bonpl. *Phytochemistry Letters*, 14, 45–50.

<https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2015.08.018>



- Sanders, L. M. (2015). Carbohydrate: Digestion, Absorption and Metabolism. En *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 643–650). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00114-8>
- Schmeltz, L., & Metzger, B. (2007). Diabetes/Syndrome X. En *Comprehensive Medicinal Chemistry II* (pp. 417–458). <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00179-6>
- Sheng, Z., Dai, H., Pan, S., Wang, H., Hu, Y., & Ma, W. (2014). Isolation and characterization of an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from musa spp. (Baxijiao) flowers. *Molecules*, 19(7), 10563–10573. <https://doi.org/10.3390/molecules190710563>
- Shi, B., Yang, L., Gao, T., Ma, C., Li, Q., Nan, Y., Wang, S., Xiao, C., Jia, P., & Zheng, X. (2019). Pharmacokinetic profile and metabolite identification of bornyl caffeate and caffeic acid in rats by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *RSC Advances*, 9(7), 4015–4027. <https://doi.org/10.1039/c8ra07972b>
- Sim, L., Quezada-Calvillo, R., Sterchi, E. E., Nichols, B. L., & Rose, D. R. (2008a). Human Intestinal Maltase-Glucoamylase: Crystal Structure of the N-Terminal Catalytic Subunit and Basis of Inhibition and Substrate Specificity. *Journal of Molecular Biology*, 375(3), 782–792. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.069>
- Sim, L., Quezada-Calvillo, R., Sterchi, E. E., Nichols, B. L., & Rose, D. R. (2008b). Human Intestinal Maltase-Glucoamylase: Crystal Structure of the N-Terminal Catalytic Subunit and Basis of Inhibition and Substrate Specificity. *Journal of Molecular Biology*, 375(3), 782–792. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.069>



- Steinbrecher, T., Case, D. A., & Labahn, A. (2006). A Multistep Approach to Structure-Based Drug Design: Studying Ligand Binding at the Human Neutrophil Elastase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(6), 1837–1844.  
<https://doi.org/10.1021/jm0505720>
- Tokarz, V. L., MacDonald, P. E., & Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. En *Journal of Cell Biology* (Vol. 217, Número 7, pp. 1–17). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802095>
- Uysal, S., Ugurlu, A., Zengin, G., Baloglu, M. C., Altunoglu, Y. C., Mollica, A., Custodio, L., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., & Mahomoodally, M. F. (2018). Novel in vitro and in silico insights of the multi-biological activities and chemical composition of *Bidens tripartita* L. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 525–536.  
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.11.058>
- Van Beers, E. H., Büller, H. A., Grand, R. J., Einerhand, A. W. C., & Dekker, J. (1995). Intestinal Brush Border Glycohydrolases: Structure, Function, and Development. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(3), 197–262.  
<https://doi.org/10.3109/10409239509085143>
- Verheijen, M., Lienhard, M., Schrooders, Y., Clayton, O., Nudischer, R., Boerno, S., Timmermann, B., Selevsek, N., Schlapbach, R., Gmuender, H., Gotta, S., Geraedts, J., Herwig, R., Kleinjans, J., & Caiment, F. (2019). DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0>



- Wang, B., & Hu, H. (2013). Flavonoids from Tartary Buckwheat seeds. *Asian Journal of Chemistry*, 25(4), 2012–2014. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.13277>
- Wang, J., Aierken, G., Li, X., Li, L., & Mao, X. (2016). Testing the absorption of the extracts of *Coreopsis tinctoria* Nutt. in the intestinal canal in rats using an Ussing chamber. *Journal of Ethnopharmacology*, 186, 73–83. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2016.03.061>
- Wang, S.-J., Zeng, J., Yang, B.-K., & Zhong, Y.-M. (2014). Bioavailability of caffeic acid in rats and its absorption properties in the Caco-2 cell model. *Pharmaceutical Biology*, 52(9), 1150–1157. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.879906>
- Wang, Y., Huang, S., Shao, S., Qian, L., & Xu, P. (2012). Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase in vitro. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.031>
- Wu, D., Muraleedharan, G. N., & DeWitt, L. D. (2002). Novel Compounds from *Piper methysticum* Forst (Kava Kava) Roots and Their Effect on Cyclooxygenase Enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 701–705.
- Yan, Y., Jun, C., Lu, Y., & Jiangmei, S. (2019). Combination of metformin and luteolin synergistically protects carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: Mechanism involves antioxidant, anti-inflammatory, antiapoptotic, and Nrf2/HO-1 signaling pathway. *BioFactors*, 45(4), 598–606. <https://doi.org/10.1002/biof.1521>



- Yang, D.-S., Peng, W.-B., Li, Z.-L., Wang, X., Wei, J.-G., Liu, K.-C., Yang, Y.-P., & Li, X.-L. (2013). Chemical constituents from the aerial parts of *Euphorbia sikkimensis* and their bioactivities. *Natural Products Bioprospect*, 3, 112–116.  
<https://doi.org/10.1007/s13659-013-0006-y>
- Zang, Y., Igarashi, K., & Li, Y. L. (2016). Anti-diabetic effects of luteolin and luteolin-7-O-glucoside on KK-Ay mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(8), 1580–1586. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1116928>
- Zeng, L., Zhang, G., Liao, Y., & Gong, D. (2016). Inhibitory mechanism of morin on  $\alpha$ -glucosidase and its anti-glycation properties. *Food and Function*, 14(9), 3953–3963.  
<http://pubs.rsc.org/en/content/getauthorversionpdf/C6FO00680A>
- Zeng, L., Zhang, G., Lin, S., & Gong, D. (2016). Inhibitory Mechanism of Apigenin on  $\alpha$ -Glucosidase and Synergy Analysis of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(37), 6939–6949. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02314>
- Zhang, Y., Shi, S., Zhao, M., Chai, X., & Tu, P. (2013). Coreosides A–D, C14-polyacetylene glycosides from the capitula of *Coreopsis tinctoria* and its anti-inflammatory activity against COX-2. *Fitoterapia*, 87, 93–97.  
<https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2013.03.024>

# 15. ANEXOS



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
COORDINACIÓN ACADÉMICA

Av. Universidad 1001 Chamépe, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3085



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Itzel Berenice Morales Montesinos

**Título de la tesis:** "Estudio fitoquímico de *Coreopsis mutica* biodirigido por la actividad sobre  $\alpha$ -glucosidasas y estudios de citotoxicidad"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez

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

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez

Firma del miembro del jurado

14 mayo 2020

Fecha



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

NATIVIDAD SARA CONCEPCION GARCIA JIMENEZ | Fecha:2020-05-14 13:11:33 | Firmante  
mCGCehNGGgHtz3N30drdcjC+J3dDcxJsJAQFF0AHVZ2bsQd0KPrFTTzSSiX+wL4LTlu/9zdf+AWeJXVSTI51woRtorYkhsplz0I7rVsUHNWnhVRZSW0I2tcGuOYCKrJqyDLd6  
gs0V/sbYM5Y5gMW5w4ZTSNhg4F4SOHIRdGgCWoaS5KglottUPpsttkZG1yE7DCLqxcfrLC7d6x0NXg17goAVfOpWWfI99MIW1+JNfI6XF2DQoPvF3HXJQXWy6I5Q81BMz5kL  
LwX3rpP1U17Xb+WP+hA5bk16vmWNKLGd3LWnH3QlxKNiNw62yMSMIWcnWSDMUwEpGSIJ52Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[NbgvAP8%Dd](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/y5P1CdSh3CVUZRlnsa9NOZqf4kX4GaiB>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023





FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARIA ACADÉMICA  
COORDINACION ACADEMICA

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Itzel Berenice Morales Montesinos

**Título de la tesis:** "Estudio fitoquímico de *Coreopsis mutica* biodirigido por la actividad sobre  $\alpha$ -glucosidasas y estudios de citotoxicidad"

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

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

La tesis:

- Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Firma del miembro del jurado

13 marzo 2020

Fecha



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARIA ACADÉMICA  
COORDINACION ACADÉMICA



Av. Universidad 1001 Chamipa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Itzel Berenice Morales Montesinos

**Título de la tesis:** "Estudio fitoquímico de *Coreopsis mutica* biodirigido por la actividad sobre  $\alpha$ -glucosidasas y estudios de citotoxicidad"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez

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

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez

Firma del miembro del jurado

21 de mayo de 2020

Fecha



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

MA. YOLANDA RIOS GOMEZ | Fecha:2020-05-21 11:27:30 | Firmante  
BJYr67VikFuf13zWH0RGMA5zaG+eKDdSdvzmTJf3bUOHsO5a3c8ogBQI+do3LCej02g1Qn7Y7g3kJlaRa6OXoaGmJY0PbFZ17Mb0B2ETJRmnroUocLWaYnxHcKxFMEav1Pa8FYIa/x19pm5plbSo42YnlmLQPLuhmbETfioBKNDTVYlka84lgmCTAnupspSPi5iFQcV/NSke/wHrf2L6M2vMcHsN2vxwAIH0QcAMDShRxLbaeYUJK9oGviYNafcp+90aXO++Fh2r+2Av+CAVDhG+u5ROOCFerAv5PtmZj+qpnZvHs5MJxqWuUhsDexGelBLdNuDSWW1iHAKA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



@PEK#jm'4!F

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Mrr5EQQ1ZTn0G3CgQJbz8Am7gEg7KKWw>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
COORDINACIÓN ACADÉMICA

Av. Universidad 4004 Chamépe, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62240 Tel. (01 777) 329 7088 y 329 7040 Ext. 3365



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Itzel Berenice Morales Montesinos

**Título de la tesis:** "Estudio fitoquímico de *Coreopsis mutica* biodirigido por la actividad sobre  $\alpha$ -glucosidasas y estudios de citotoxicidad"

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

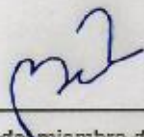
**Miembro del jurado:** Dra. Verónica Rodríguez López

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

La tesis:

- Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

22 de mayo 2020  
\_\_\_\_\_  
Fecha



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARIA ACADÉMICA  
COORDINACION ACADEMICA



Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Itzel Berenice Morales Montesinos

**Título de la tesis:** "Estudio fitoquímico de *Coreopsis mutica* biodirigido por la actividad sobre  $\alpha$ -glucosidasas y estudios de citotoxicidad"

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Ismael León Rivera

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

La tesis:

- Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Firma del miembro del jurado

26 marzo 2020

Fecha