



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOBRE LAS  
ENZIMAS PTP-1B Y  
 $\alpha$ -GLUCOSIDASAS DE LA ESPECIE *Croton  
ehrenbergii*”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

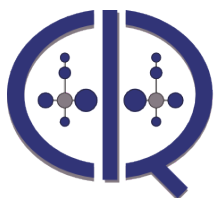
**L. F. Mónica Aideé Díaz Román**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. ANGÉLICA BERENICE AGUILAR GUADARRAMA**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**JUNIO, 2020**



CENTRO DE  
INVESTIGACIONES  
QUÍMICAS

Cuernavaca, Morelos a 21 de febrero de 2020

Folio: FF/D/SAC/CIP/MF/012/2020

**L.F. MÓNICA AIDEE DÍAZ ROMÁN**  
**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 "Evaluación de la actividad sobre las enzimas PTP-1B y  $\alpha$ -glucosidasas de la especie *Croton ehrenbergii*"

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

**PRESIDENTE: Dra. Verónica Rodríguez López**  
**SECRETARIO: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez**  
**VOCAL 1: Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez**  
**VOCAL 2: Dr. Germán Bernal Fernández**  
**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. Verónica Rodríguez López, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez, Dr. Germán Bernal Fernández, Dr. Ismael León Rivera  
mitv



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
COORDINACIÓN ACADÉMICA



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:** Mónica Aideé Díaz Román

**Título de la tesis:** "Evaluación de la actividad sobre las enzimas PTP-1B y  $\alpha$ -glucosidasas de la especie *Croton ehrenbergii*"

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

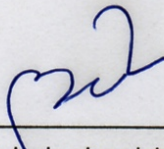
**Miembro del jurado:** Dra. Verónica Rodríguez López

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/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:** Mónica Aideé Díaz Román

**Título de la tesis:** "Evaluación de la actividad sobre las enzimas PTP-1B y  $\alpha$ -glucosidasas de la especie *Croton ehrenbergii*"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

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

10/Marzo/2020

Fecha



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
COORDINACIÓN ACADÉMICA



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:** Mónica Aideé Díaz Román

**Título de la tesis:** "Evaluación de la actividad sobre las enzimas PTP-1B y  $\alpha$ -glucosidasas de la especie *Croton ehrenbergii*"

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Ma. Yolanda Rios 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 Rios Gómez  
Firma del miembro del jurado

21 de mayo de 2020  
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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 11:28:01 | Firmante  
ZQAItzS+uLjDspmX6BpsoStG1hvBva3Cueib9mAHVZseN16H5Fjt+uz207qMacjmMU4IEsyh/UFurJ0Rap0fUEEGzOqTWoJ1vHQi3+E56XhYufiEU7hE6ohaUKXZVxS7aEFRkIn  
WlsoV2aA47Mpn8uq40K9spvK++VlpRbtDjuFHPRGtJjla5xzbepExP6EAwuLy1iCrW6cTNLvGW+AYJllmOWPhVM4pmQ7uMQlbpWL3uBsFNCDiAziEbXXYqfpFZQ+6K58dcwtm  
XcGo2uT6a8faUIV1E3RM1juy87YAL3llstvXakaC/N7uc1TSJtS5CCNOqZqfxGCV/OAQB5QA==

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



[zKlg9\\$FYdA7](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/0fkrhLN4jvezxY21cJQhVvWZUloU4qvX>



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. 3385

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

**Nombre del alumno:** Mónica Aideé Díaz Román

**Título de la tesis:** "Evaluación de la actividad sobre las enzimas PTP-1B y  $\alpha$ -glucosidasas de la especie *Croton ehrenbergii*"

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Germán Bernal Fernández

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

28/Mayo/2020  
Fecha



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
COORDINACIÓN ACADÉMICA

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:** Mónica Aideé Díaz Román

**Título de la tesis:** "Evaluación de la actividad sobre las enzimas PTP-1B y  $\alpha$ -glucosidasas de la especie *Croton ehrenbergii*"

**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

El estudio fitoquímico desarrollado en el presente trabajo y las evaluaciones *in vitro* se llevaron a cabo en el Laboratorio 211 de Química de Productos Naturales, así como en el Laboratorio Nacional de Macromoléculas, del Centro de Investigaciones Químicas, IICBA (UAEM), dirigido por la Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama.



Las evaluaciones *in vivo* fueron realizadas en la Unidad Especializada en I+D+i en Calidad de Alimentos y Productos Naturales del Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología, perteneciente a la Universidad Autónoma de Nayarit, a cargo de la Dra. Gabriela Ávila Villarreal.



Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron en el Laboratorio 5 de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, UAEM, a cargo del Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez.



Esta tesis está dedicada a mi familia, principalmente a mis padres y hermano, por ser los pilares de mi vida, por todo el apoyo, amor y confianza que me dan, por estar siempre a mi lado, apoyándome, aconsejándome y dándome palabras de aliento para poder seguir adelante y cumplir siempre con mis ideales. Este nuevo logro es en gran parte gracias a ustedes.



# **AGRADECIMIENTOS**



---

El presente trabajo es el resultado de la participación de diferentes personas e instituciones, por lo que quiero agradecer a la Facultad de Farmacia de la UAEM, por darme la oportunidad de formar parte de su programa de Maestría en Farmacia, así como a sus docentes, quienes contribuyeron enormemente en mi formación académica; asimismo, agradezco al Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM, por brindarme los espacios y servicios analíticos utilizados durante la realización de este proyecto. Del mismo modo, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca de manutención otorgada durante mis estudios de maestría.

De manera especial, expreso mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama, por la confianza que tuvo en mí al permitirme volver a formar parte de su grupo de investigación, por su valiosa orientación y dedicación al dirigir este proyecto. Agradezco también todo su apoyo y la paciencia que tuvo al compartir conmigo sus conocimientos.

A la Dra. Gabriela Ávila Villarreal, por brindarme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en su unidad académica, por la asesoría brindada durante la realización de los ensayos biológicos y por todas las aportaciones realizadas, las cuales contribuyeron considerablemente en la buena culminación de este trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez por llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular, y por la disponibilidad que ha mostrado para compartir sus conocimientos.

A los integrantes de mi comité tutorial, Dra. Leticia González Maya, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez y Dra. Berenice Aguilar Guadarrama, por sus oportunas sugerencias y aportaciones a este proyecto a lo largo de los 4 semestres de mis estudios.

A los miembros de mi jurado, Dra. Verónica Rodríguez López, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez, Dr. Germán Bernal Fernández y Dr. Ismael León Rivera, por dedicar una parte de su tiempo en la revisión de mi tesis, y por las observaciones y sugerencias realizadas ya que cada una de ellas contribuyó en la mejora de este trabajo.

A mis compañeros y amigos, con quienes he compartido grandes momentos y quienes me han brindado su ayuda y consejos en el momento oportuno.

---

## ÍNDICE

---

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1. Generalidades de la Medicina Tradicional.....	14
2.2. Importancia de los Productos Naturales en el Descubrimiento de Nuevos Fármacos.....	16
2.3. Principales causas de mortalidad a nivel mundial.....	18
2.4. Uso de Productos Naturales en el tratamiento de enfermedades crónicas.....	20
2.5. Diabetes mellitus.....	22
2.5.1. Clasificación.....	23
2.5.1.1. Diabetes Tipo 1.....	23
2.5.1.2. Diabetes Tipo 2.....	23
2.5.1.3. Diabetes Gestacional.....	24
2.5.1.4. Otros tipos de Diabetes.....	24
2.5.2. Fisiopatología de la DM2.....	24
2.5.3. Mecanismos de Resistencia a la Insulina.....	27
2.5.4. Inhibición de la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP-1B) como blanco terapéutico en la DM2.....	31
2.5.5. Importancia de la Inhibición de las Enzimas $\alpha$ -glucosidasas intestinales.....	35
2.5.6. Antidiabéticos Orales Actuales.....	39
2.5.7. Uso de Productos Naturales en el Tratamiento de la Diabetes.....	41
2.5.8. Familia Euphorbiaceae.....	44
2.5.9. Género <i>Croton</i> .....	46
2.5.10 <i>Croton ehrenbergii</i> .....	48
3. JUSTIFICACIÓN.....	51
4. HIPÓTESIS.....	53
5. OBJETIVOS.....	55

5.1. Objetivo General.....	55
5.2. Objetivos Particulares.....	55
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
6.1. Obtención del Material Vegetal.....	57
6.2. Metodología General.....	57
6.3. Obtención de los metabolitos secundarios de la fracción de AcOEt.....	59
6.3.1. Separación de los metabolitos secundarios de las fracciones 39-47 de la fracción de AcOEt.....	61
6.3.2. Separación de los metabolitos secundarios de las fracciones 25-70 de la fracción de AcOEt.....	62
6.4. Obtención de los metabolitos secundarios de la fracción de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	63
6.4.1. Separación de los metabolitos secundarios de las fracciones 3-5 de la fracción de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	65
6.4.2. Separación de los metabolitos secundarios de las fracciones 11-16 de la fracción de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	66
6.5. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción de Butanol.....	67
6.5.1. Extracción en Fase Sólida.....	67
6.5.2. Reacción de acetilación.....	68
6.5.3. Separación de los metabolitos del producto acetilado precipitado.....	71
6.6. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en el residuo acuoso...	72
6.7. Determinación de la actividad antihiper glucemiante.....	73
6.7.1. Evaluación <i>in vitro</i> sobre la actividad de las enzimas $\alpha$ -glucosidasas intestinales.....	73
6.7.2. Curva de Tolerancia a Sacarosa.....	74
6.8. Evaluación de la actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B.....	74
6.8.1. Evaluación <i>in vitro</i> .....	74
6.8.2. Estudio de acoplamiento molecular.....	76
6.9. Evaluación de la Toxicidad Oral Aguda.....	78
6.10. Análisis Estadístico.....	80
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82

7.2.	Bipartición del extracto hidroalcohólico.....	82
7.3.	Fracción de AcOEt.....	82
7.3.1.	Tilirósido.....	82
7.3.2.	Rutina.....	91
7.3.4.	Nicotiflorina.....	98
7.3.5.	Isoquercetina.....	104
7.4.	Fracción de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	108
7.4.1.	7, 4'-di- <i>O</i> -metilnaringenina.....	108
7.4.2.	β-Sitosterol.....	116
7.4.3.	Compuestos identificados mediante CG-EM.....	121
7.5.	Fracción de Butanol.....	129
7.6.	Residuo Acuoso.....	132
7.7.	Determinación de la actividad antihiper glucemiante.....	135
7.7.1.	Evaluación de la actividad inhibitoria de las enzimas α-glucosidasas intestinales.....	135
7.7.2.	Curva de Tolerancia a Sacarosa.....	139
7.8.	Evaluación sobre la actividad de la Enzima PTP-1B.....	145
7.8.1.	Evaluación <i>in vitro</i> sobre la enzima PTP-1B.....	145
7.8.2.	Estudio de acoplamiento molecular.....	149
7.9.	Evaluación de la Toxicidad Oral Aguda.....	151
8.	CONCLUSIÓN.....	155
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	157

---

## LISTA DE FIGURAS

- 
- Figura 1.** Fármacos antifúngicos, antibacterianos y antitumorales, obtenidos de productos naturales.
- Figura 2.** Estructuras de los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas actuales (acarbosea y miglitol).
- Figura 3.** Estructuras de galegina y metformina.
- Figura 4.** Estructuras de compuestos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, obtenidos de *Adathoda vasica* (vasicina y vasicinol).
- Figura 5.** Estructuras de compuestos obtenidos de plantas medicinales, con importante actividad inhibitoria sobre PTP-1B.
- Figura 6.** Estructuras de los metabolitos identificados en la especie *Croton ehrenbergii*.
- Figura 7.** Mecanismo de una reacción de acetilación.
- Figura 8.** Mapa de interacciones 2D y 3D de la validación del acoplamiento de PTP-1B co-cristalizada con el ácido 6-(oxalil-amino)1*H*-indol-5-carboxílico (1C83).
- Figura 9.** Superposición del ligando co-cristalizado y su posición de acoplamiento validada.
- Figura 10.** Diagrama de flujo del estudio de observación del ensayo de toxicidad oral agua. Guía 420 OECD.
- Figura 11.** Diagrama de flujo del estudio principal del ensayo de toxicidad oral aguda. Guía 420 OECD
- Figura 12.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en posición meta dentro de un anillo aromático.
- Figura 13.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones acoplados en posición orto dentro de un anillo aromático.
- Figura 14.** Protones simétricamente equivalentes en un anillo aromático.
- Figura 15.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones AB de un anillo aromático, acoplados en posición orto.
- Figura 16.** Protones simétricamente equivalentes en un anillo aromático.
- Figura 17.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones AB vinílicos acoplados en posición trans.

- Figura 18.** Señal identificada en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuida al protón de la posición 1 de la glucosa.
- Figura 19.** Estructura química del flavonoide tilirósido.
- Figura 20.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones de un anillo aromático acoplados en posición meta.
- Figura 21.** Señal simple identificada en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuida a un sustituyente OH.
- Figura 22.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones ABX en un anillo aromático.
- Figura 23.** Señal identificada en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, característica del -CH<sub>3</sub> de rhamnosa.
- Figura 24.** Estructura química de rutina.
- Figura 25.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en posición meta en un anillo aromático.
- Figura 26.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en posición orto en un anillo aromático.
- Figura 27.** Estructura química de nicotiflorina.
- Figura 28.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en posición meta en un anillo aromático A de un flavonoide.
- Figura 29.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones ABX de un anillo aromático B de un flavonoide.
- Figura 30.** Estructura química de isoquercetina.
- Figura 31.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones acoplados en posición orto en un anillo aromático.
- Figura 32.** Protones simétricamente equivalentes en un anillo aromático.
- Figura 33.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones acoplados en posición meta dentro de un anillo aromático.
- Figura 34.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones ABX.
- Figura 35.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, características de grupos metilo.

- Figura 36.** Señal identificada en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuida a un sustituyente OH de un anillo aromático.
- Figura 37.** Estructura química de 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina.
- Figura 38.** Estructura química de β-sitosterol.
- Figura 39.** Mapa 2D de interacciones de tilirósido con PTP-1B.
- Figura 40.** Mapa 3D de las interacciones de tilirósido con PTP-1B.
- Figura 41.** Mapa 2D de interacciones de PTP-1B con 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina.
- Figura 42.** Mapa 3D de interacciones de PTP-1B con 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina.
- Figura 43.** Diagrama de Flujo del Estudio de Toxicidad Oral Aguda.
- 

## LISTA DE IMÁGENES

---

- Imagen 1.** Principales causas de muerte a nivel mundial.
- Imagen 2.** Circuito de realimentación entre las células β-pancreáticas y los tejidos sensibles a insulina.
- Imagen 3.** Condición de resistencia a la insulina.
- Imagen 4.** Condición de resistencia a la insulina y disfunción de las células β-pancreáticas.
- Imagen 5.** Estructura del receptor de insulina.
- Imagen 6.** Actividad de las PTP en la vía de señalización de insulina.
- Imagen 7.** Vías de señalización fisiológicas que involucran la acción de la PTP-1B.
- Imagen 8.** Estructura terciaria de las PTP.
- Imagen 9.** Estructura cristalizada del complejo PTP-1B/sustrato.
- Imagen 10.** Representación esquemática de los dominios de MGAM y SI humanas.
- Imagen 11.** A) Estructura del complejo MGAM-C / acarbosa.  
B) Representación de las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno implicadas en la interacción de MGAM-C y acarbosa.
- Imagen 12.** Proceso de fraccionamiento del extracto hidroalcohólico.
- Imagen 13.** Metodología para la recuperación del producto acetilado.
-

## LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1.** Porcentaje de inhibición de **Acarbosa [10  $\mu\text{M}$ ]** ( $83.46 \pm 2.07 \%$ ), **Extracto Acuoso de Té verde (*Camellia sinensis*)** ( $76.69 \pm 1.82 \%$ ), **Extracto Hidroalcohólico** ( $10.36 \pm 2.21 \%$ ), **Fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$**  ( $14.55 \pm 1.23 \%$ ), **Fracción de AcOEt** ( $41.70 \pm 1.06 \%$ ), **Fracción de BuOH** ( $23.75 \pm 2.47 \%$ ), y **Residuo Acuoso** ( $19.12 \pm 1.00 \%$ ) [**1 mg/mL**] sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas
- Gráfica 2.** Porcentaje de inhibición de **Acarbosa [10  $\mu\text{M}$ ]** ( $83.46 \pm 2.07 \%$ ), **Tilirósido** ( $37.84 \pm 1.67 \%$ ), **7, 4'-di-*O*-metilnaringenina** ( $14.59 \pm 1.71 \%$ ) y **Nicotiflorina** ( $32.49 \pm 1.98 \%$ ) [**1000  $\mu\text{M}$ ]** sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas.
- Gráfica 3.** Porcentaje de inhibición de **Acarbosa [10  $\mu\text{M}$ ]** ( $83.46 \pm 2.07 \%$ ), **Fracción de AcOEt [1 mg/mL]** ( $41.70 \pm 1.06 \%$ ), **Tilirósido** ( $37.84 \pm 1.67 \%$ ), y **Nicotiflorina** ( $32.49 \pm 1.98 \%$ ) [**1000  $\mu\text{M}$ ]** sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas.
- Gráfica 4.** Porcentaje de inhibición de **Acarbosa [10  $\mu\text{M}$ ]** ( $84.156 \pm 0.70 \%$ ), [**100  $\mu\text{M}$ ]** ( $86.50 \pm 0.90 \%$ ), [**300  $\mu\text{M}$ ]** ( $88.77 \pm 2.02 \%$ ), [**600  $\mu\text{M}$ ]** ( $97.82 \pm 0.61 \%$ ), [**1000  $\mu\text{M}$ ]** ( $90.37 \pm 2.68\%$ ), **Tilirósido [10  $\mu\text{M}$ ]** ( $3.63 \pm 0.33 \%$ ), [**100  $\mu\text{M}$ ]** ( $21.34 \pm 3.41 \%$ ), [**300  $\mu\text{M}$ ]** ( $32.09 \pm 3.40 \%$ ), [**600  $\mu\text{M}$ ]** ( $56.92 \pm 5.01 \%$ ), [**1000  $\mu\text{M}$ ]** ( $37.84 \pm 1.67 \%$ ) sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas.
- Gráfica 5.** Porcentaje de inhibición de **Acarbosa [10  $\mu\text{M}$ ]** ( $83.46 \pm 2.07 \%$ ), **Fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1 mg/mL]** ( $14.55 \pm 1.23 \%$ ), y **7, 4'-di-*O*-metilnaringenina [1000  $\mu\text{M}$ ]** ( $14.59 \pm 1.71 \%$ ) sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas.
- Gráfica 6.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos del Extracto Hidroalcohólico ( $\text{ABC}_{\text{Gluc}} = 198.9 \text{ mmol} \cdot \text{h/L}$ ) y sus fracciones de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\text{ABC}_{\text{Gluc}} = 235.2 \text{ mmol} \cdot \text{h/L}$ ), AcOEt ( $\text{ABC}_{\text{Gluc}} = 250.0 \text{ mmol} \cdot \text{h/L}$ ), BuOH ( $\text{ABC}_{\text{Gluc}} = 67.5 \text{ mmol} \cdot \text{h/L}$ ) y el Residuo Acuoso ( $\text{ABC}_{\text{Gluc}} = 72.5 \text{ mmol} \cdot \text{h/L}$ ), evaluados a una dosis de 100 mg/Kg, y acarbosa a una dosis de 3 mg/Kg.
- Gráfica 7.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos de la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\text{ABC}_{\text{Gluc}} = 235.2 \text{ mmol} \cdot \text{h/L}$ ) y acarbosa, evaluados a dosis de 100 mg/Kg y 3 mg/Kg, respectivamente.

- Gráfica 8.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y acarbosa, evaluados a dosis de 100 mg/Kg y 3 mg/Kg, respectivamente.
- Gráfica 9.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos de la fracción de AcOEt y acarbosa, evaluados a dosis de 100 mg/Kg y 3 mg/Kg, respectivamente.
- Gráfica 10.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos de la fracción de BuOH y acarbosa evaluados a dosis de 100 mg/Kg y 3 mg/Kg, respectivamente.
- Gráfica 11.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos del Residuo Acuoso y acarbosa, evaluados a dosis de 100 mg/Kg y 3 mg/Kg, respectivamente.
- Gráfica 12.** Porcentaje de inhibición de **EHACe** ( $58.91 \pm 0.002\%$ ), **Fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** ( $13.58 \pm 0.001\%$ ), **Fracción de AcOEt**( $11.41 \pm 0.003\%$ ), **Fracción de BuOH** ( $93.42 \pm 0.002\%$ ), **Residuo Acuoso** ( $38.57 \pm 0.001\%$ ), **Suramina** ( $88.49 \pm 0.004\%$ ) [300 mg/mL] sobre la actividad de la enzima PTP-1B.
-

## LISTA DE TABLAS

- 
- Tabla 1.** Efectos adversos de los antidiabéticos actuales
- Tabla 2.** Composición química y efecto antidiabético de especies de Euphorbiaceae
- Tabla 3.** Composición química y efecto antidiabético de algunas especies de *Croton*
- Tabla 4.** Proceso cromatográfico de la fracción de AcOEt
- Tabla 5.** Proceso cromatográfico de las fracciones 39-47 de la fracción de AcOEt
- Tabla 6.** Proceso cromatográfico de las fracciones 25-70 de la fracción de AcOEt
- Tabla 7.** Proceso cromatográfico de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- Tabla 8.** Proceso cromatográfico de las fracciones 3-5 de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- Tabla 9.** Proceso cromatográfico de las fracciones 11-16 de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- Tabla 10.** Sistemas de elución empleados en la Extracción en Fase Sólida de la fracción de Butanol
- Tabla 11.** Proceso cromatográfico del producto acetilado
- Tabla 12.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H reportados y obtenidos experimentalmente para tilirósido
- Tabla 13.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H reportados y obtenidos experimentalmente para rutina
- Tabla 14.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H reportados y obtenidos experimentalmente para nicotiflorina
- Tabla 15.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H reportados y obtenidos experimentalmente para isoquercetina
- Tabla 16.** Datos de RMN <sup>1</sup>H Y <sup>13</sup>C reportados y obtenidos experimentalmente para 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina
- Tabla 17.** Datos de RMN <sup>1</sup>H Y <sup>13</sup>C reportados y obtenidos experimentalmente para β-sitosterol
- Tabla 18.** Compuestos identificados mediante CG-EM de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- Tabla 19.** Compuestos identificados mediante CG-EM de la fracción de BuOH
- Tabla 20.** Compuestos identificados mediante CG-EM del residuo acuoso
-

## LISTA DE ABREVIATURAS.

---

<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etilo
<b>BG</b>	Biguanidas
<b>BuOH</b>	Butanol
<b>CCA</b>	Cromatografía en Columna
<b>CCF</b>	Cromatografía en Capa Fina
<b>CF</b>	Cromatografía Flash
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
<b>cm</b>	Centímetro
<b>dL</b>	Decilitro
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media.
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DM1</b>	Diabetes Mellitus Tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes Mellitus Tipo 2
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPP-IV</b>	Dipeptidil peptidasa tipo 4
<b>EHACe</b>	Extracto Hidroalcohólico de <i>Croton ehrenbergii</i>
<b>EE</b>	Error Estándar
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa tipo 4
<b>h</b>	Hora
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicosilada
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IM</b>	Infarto al miocardio
<b>IRL</b>	Índice de Retención Lineal
<b>Kcal</b>	Kilocaloría

<b>L</b>	Litro
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>M<sup>+</sup></b>	Ión Molecular
<b><i>m/z</i></b>	Masa/carga
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramo
<b>MHz</b>	MegaHertz
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mmHg</b>	Milímetro de Mercurio
<b>mmol</b>	Milimol
<b>NIST</b>	National Institute of Standards and Technology
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>RMSD</b>	Root-Mean-Square Deviation
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Resonancia Magnética Nuclear de protón
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SGLT-2</b>	
<b>SPE</b>	Extracción en Fase Sólida
<b>SU</b>	Sulfonilureas
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TZD</b>	Tiazolidindionas
<b>UI</b>	Unidad Internacional
<b>Uma</b>	Unidad de masa atómica

---



# RESUMEN



**RESUMEN.**

El género *Croton* (Euphorbiaceae) cuenta con un importante número de especies, las cuales son utilizadas para el tratamiento de diversos padecimientos, incluyendo la diabetes. Existen reportes sobre algunas especies de este género, que han documentado su efecto antidiabético, el cual ha sido atribuido a diversos compuestos, principalmente flavonoides. Sin embargo, algunas otras especies, como es el caso de *C. ehrenbergii*, no cuentan con reportes sobre la determinación de su actividad antidiabética, ni de la seguridad de su uso después de una administración por vía oral.

En el presente trabajo se estudió el extracto hidroalcohólico de *C. ehrenbergii*, con la finalidad de determinar su potencial antihiper glucémico e insulinosensibilizador, así como su toxicidad oral aguda.

Con la finalidad de determinar el contenido metabólico del extracto, se realizó una bipartición, obteniendo las fracciones de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, BuOH y el residuo acuoso y, a partir de procesos cromatográficos convencionales y del análisis de datos espectroscópicos y espectrométricos, se logró determinar que la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> está constituida principalmente por β-sitosterol y el flavonoide 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina, así como otros metabolitos minoritarios; por su parte, la fracción de AcOEt se caracterizó por presentar abundantemente flavonoides, como tilirósido, rutina, nicotiflorina e isoquercetina; mientras que pinitol es el metabolito mayoritario de la fracción de BuOH y del residuo acuoso.

Por otro lado, para evaluar el efecto antihiper glucemiante mediante la inhibición de las enzimas α-glucosidasas, se realizó un ensayo *in vitro*, el cual permitió determinar que la fracción de AcOEt inhibe de forma moderada la actividad enzimática (41.70 ± 1.06%), mientras que el extracto hidroalcohólico y las fracciones de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, BuOH y el residuo acuoso, no presentaron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ).

El efecto mostrado por la fracción de AcOEt se atribuye principalmente a tilirósido, metabolito mayoritario de esta fracción, pues al ser evaluado, tuvo un efecto similar al de la fracción total ( $37.84 \pm 1.67 \%$ ). Adicionalmente, se realizaron curvas de tolerancia a sacarosa, administrando una dosis de 100 mg/Kg del extracto y sus fracciones. La fracción de AcOEt, contrariamente a lo observado en el ensayo *in vitro*, no presentó una actividad significativa, al igual que el extracto hidroalcohólico y la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; mientras que la fracción de BuOH y el residuo acuoso inhibieron significativamente el pico hiperglucémico ( $p < 0.05$ ) generado tras la administración de la sacarosa, presentando un comportamiento similar al del fármaco de referencia. Este efecto se atribuye a pinitol, metabolito mayoritario de las dos muestras de prueba.

Por otra parte, para determinar el efecto insulino-sensibilizador mediante la inhibición de la enzima PTP-1B, se llevó a cabo un ensayo *in vitro*, en el cual se observó que tanto el extracto hidroalcohólico como sus fracciones presentaron una actividad significativa ( $p < 0.05$ ) al ser comparados con el vehículo. La fracción de BuOH presentó la mayor actividad, con un porcentaje de inhibición de  $82.070 \pm 0.004\%$ . Por su parte, las fracciones de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt, cuyo contenido metabólico es abundante en flavonoides, presentaron porcentajes de inhibición de  $72.421 \pm 0.004$  y  $78.645 \pm 0.001\%$ , respectivamente.

El ensayo permitió además sugerir que el efecto mostrado por la fracción de AcOEt se debe a la presencia de tilirósido, pues al ser evaluado, el flavonoide inhibió la actividad enzimática con un  $83.433 \pm 0.001\%$ . Mientras que el flavonoide 7,4'-di-*O*-metilnaringenina, obtenido de la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , inhibe la actividad de PTP-1B con un  $40.599 \pm 0.001\%$ .

Finalmente, para determinar el grado de toxicidad del extracto hidroalcohólico, se realizó un estudio de toxicidad oral aguda, siguiendo las especificaciones descritas en la guía 420 de la OECD, en el cual el extracto mostró una baja toxicidad, y de acuerdo con lo observado a lo largo de todo el ensayo, se pudo clasificar dentro de la categoría 5 del GHS.

De este modo, la presente investigación permite documentar el contenido metabólico de *C. ehrenbergii* y además, proporciona información sobre su potencial antidiabético, el cual puede deberse más a un efecto insulino-sensibilizador mediante la inhibición de la enzima PTP-1B, que a un efecto antihiper glucemiante. Asimismo, permite documentar la seguridad del uso de su extracto hidroalcohólico tras una única administración por vía oral



# ABSTRACT



## ABSTRACT.

*Croton* genus (Euphorbiaceae) is constituted by significant number of species, some of them are frequently used in traditional medicine to treat a variety of illness, including diabetes. There are several reports about antidiabetic effect from some species of this genus, which has been attributed to flavonoids. However, some species such as *C. ehrenbergii* does not have reports about their antidiabetic activity or safety after oral administration. Therefore, is considered important to conduct research on these no studied species that to obtain information about its biological activity and safety.

In this work, hydroalcoholic extract from *C. ehrenbergii* was studied in order to evaluate its antihyperglycemic and insulin sensitizer potential as well as its acute toxicity.

In order to determine the metabolic content of the extract, a bipartition was done, obtaining the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt and BuOH fractions, as well as aqueous residue. Conventional chromatographic processes and analysis of spectroscopic and spectrometric data, allowed to determine that CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction is composed of  $\beta$ -sitosterol and flavonoid 7, 4'-di-*O*-methylnaringenin, as well as other minor compounds. While AcOEt fraction was constituted mainly by flavonoids, including tiliroside, rutin, nicotiflorin and isoquercetin. And finally, pinitol was the major compound in BuOH fraction and aqueous residue.

On the other hand, with the aim to evaluate the antihyperglycemic effect, an *in vitro* assay through the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase enzymes was performed. From the assay, AcOEt fraction shown moderately enzymatic inhibition activity ( $41.70 \pm 1.06\%$ ), while hydroalcoholic extract as well as CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, BuOH fractions and aqueous residue did not show a significant effect ( $p < 0.05$ ).

The effect showed by AcOEt fraction is mainly attributed to tiliroside, major compound in this fraction, since it was evaluated, shown similar effect to the total fraction ( $37.84 \pm 1.67\%$ ).

Additionally, sucrose tolerance curves were performed, administering a dose of 100 mg / Kg of the extract and its fractions. AcOEt fraction did not shows significant activity, contrary to the observed *in vitro*, but neither hydroalcoholic extract nor CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction. BuOH fraction and aqueous residue displayed a significant inhibition in the hyperglycemic peak ( $p < 0.05$ ) generated after sucrose administration, presenting a similar behavior to that of the reference.

On the other hand, to determine the insulin-sensitizing effect an *in vitro* assay was carried out through the inhibition of the PTP-1B enzyme. In this assay both hydroalcoholic extract and its fractions showed significant activity ( $p < 0.05$ ) compared with vehicle. BuOH fraction presented the highest activity, with an  $82.070 \pm 0.004$  percent of inhibition. On the other hand, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and AcOEt fractions, whose metabolic content is abundant in flavonoids, displayed  $72.421 \pm 0.004$  and  $78.645 \pm 0.001$  percent of inhibition, respectively. Assay also suggested that the effect shown by AcOEt fraction is due to the presence of tiliroside, since it was evaluated, and this flavonoid inhibited enzyme activity in  $83.433 \pm 0.001\%$ . While flavonoid 7, 4'-di-*O*-methylnaringenin, obtained from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction, inhibits the PTP-1B activity in  $40.599 \pm 0.001\%$ . Finally, to determine the degree of toxicity of the hydroalcoholic extract, an acute oral toxicity study was carried out, in which the extract showed low toxicity, classifying it within category 5 of the GHS.

Thus, present research allows report the metabolic content of *C. ehrenbergii*, and provides information about its antidiabetic potential, which may be due more to an insulin-sensitizing effect by the PTP-1B inhibition, to an antihyperglycemic effect. Likewise, it allows document the safety of use of hydroalcoholic extract after a single oral administration.



# INTRODUCCIÓN



## **1. INTRODUCCIÓN.**

El uso de plantas medicinales como una fuente para el alivio de enfermedades es tan antiguo como la humanidad, se remonta a documentos escritos por las primeras civilizaciones milenios de años atrás (**Hamburger, 1991**); con el paso del tiempo, se realizaron experimentos de prueba y error con varias plantas para conocer su actividad biológica, y a través de estos, se descubrió que sus extractos puros contienen compuestos con poder curativo; por lo que se considera que el uso de plantas con propiedades curativas puede conducir al descubrimiento de nuevos agentes botánicos potentes en el tratamiento de varias enfermedades (**Chintoju, et al., 2015**). Actualmente, las plantas son una de las principales fuentes de fármacos para la mayoría de la población mundial, y se conoce que alrededor de 7,000 compuestos naturales se utilizan actualmente en la medicina moderna (**Eddouks, et al, 2014**). Por ello, la investigación de plantas medicinales se ha incrementado durante las últimas décadas; sin embargo, de las 250,000-500,000 especies conocidas de plantas, solo un pequeño porcentaje ha sido estudiado con fines fitoquímicos, biológicos y farmacológicos (**Hamburger, 1991**).

Se considera que el estudio del uso de plantas con propiedades medicinales en el tratamiento de enfermedades es fundamental, pues durante el último siglo, los cambios drásticos en el estilo de vida y los hábitos alimentarios han llevado a la aparición de enfermedades crónicas. Además, se ha observado una disminución en la eficacia de algunos fármacos sintéticos y un gran número de reacciones adversas debidas a estos fármacos; en este sentido, las plantas pueden ser una fuente importante de fármacos potentes en el tratamiento de estas enfermedades (**Chintoju, et al., 2015**); sin embargo, el proceso que conduce a la obtención de compuestos farmacológicamente activos, es muy largo y tedioso, y requiere una colaboración de diversas disciplinas, como la botánica, farmacognosia, química, farmacología y toxicología (**Hamburger, 1991**).

Las enfermedades crónicas tienden a ser de larga duración, y resultan de la combinación de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales, afectando desproporcionadamente a los países de ingresos bajos y medios, donde se registran más del 75% de las muertes por enfermedades crónicas. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares constituyen la mayoría de las muertes por enfermedades crónicas, seguidas del cáncer, enfermedades respiratorias y diabetes mellitus (DM) (OMSa, 2018).

El panorama general de la DM es alarmante, pues de acuerdo con datos de la Federación Internacional de Diabetes (IDF), se estima que aproximadamente 425 millones de adultos de entre 20-79 años han sido diagnosticados con este padecimiento y, aunado a ello, la proporción de personas con DM2 ha incrementado en la mayoría de los países, siendo la causa de 4 millones de defunciones al año y se estima además, que 352 millones de personas se encuentran en riesgo de desarrollar DM2 (IDF, 2017).

La DM2 representa aproximadamente el 90-95% de los casos de diabetes (OMSb, 2016), se caracteriza por una condición crónica de hiperglucemia, que se desarrolla a partir de múltiples alteraciones patogénicas y ocasiona daños a largo plazo, como disfunción y falla de diferentes órganos, especialmente riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Tébar-Massó, *et al.*, 2009); por ello, el tratamiento farmacológico se basa en múltiples agentes antidiabéticos, que al ejercer su efecto sobre diferentes niveles fisiopatológicos de la DM2, puedan ser utilizados solos o en combinación para mantener la normoglucemia (González-Sánchez, *et al.*, 2012); sin embargo, el tratamiento no solo debe ser efectivo y seguro, sino también debe mejorar la calidad de vida de los pacientes (DeFronzo, *et al.*, 2015).

Algunas de las principales características en la DM2 son la resistencia a la insulina y la hiperglucemia post-prandial. Se ha encontrado que la resistencia a la insulina puede deberse a diversos mecanismos, dentro de los cuales se ha incluido la desfosforilación del receptor de insulina (IR), acción mediada por proteínas fosfatasas de tirosina, como la PTP-1B (**Singla, et al., 2010**), y la inhibición de esta enzima ha demostrado ser un objetivo eficaz en el tratamiento de la DM2 (**Zhang, et al., 2007**). Por otra parte, la hiperglucemia post-prandial es ocasionada por la hidrólisis de los carbohidratos ingeridos, reacción catalizada por enzimas digestivas, como las  $\alpha$ -glucosidasas, por lo que la inhibición de estas enzimas puede retardar la digestión de carbohidratos, causando una disminución en la tasa de absorción de glucosa en la sangre y se considera un enfoque terapéutico en el control de la DM2 (**Kalita, et al., 2018**).

En este sentido, es importante mencionar que se han realizado grandes progresos en el desarrollo de inhibidores potentes y selectivos de PTP-1B, algunos sintéticos o aislados como agentes bioactivos de productos naturales, que interactúan tanto con el sitio activo como con sitios catalíticos; estos inhibidores mejoran la sensibilidad del IR y tienen un efecto favorable para las enfermedades relacionadas con la resistencia a la insulina; sin embargo, a pesar de estos avances, el diseño de moléculas inhibidoras de PTP-1B es aún un desafío (**Zhang, et al., 2007** y **Tamrakar, et al., 2014**). Con respecto a la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas, se han desarrollado algunos inhibidores, como la acarbosa y la voglibosa, sin embargo, presentan efectos secundarios como flatulencia y trastornos en la funcionalidad hepática y digestiva, por lo que se ha puesto especial atención en inhibidores provenientes de fuentes naturales y se ha encontrado que metabolitos secundarios de plantas, como flavonoides, flavonoles, antocianinas y ácidos fenólicos, inhiben de forma eficaz la actividad de estas enzimas (**Kalita, et al., 2018**).

De este modo, en vías de buscar compuestos naturales con actividad hipoglucemiante que además de ser eficaces resulten seguros, en el presente proyecto se realizará un estudio fitoquímico biodirigido de la especie *Croton ehrenbergii*, ya que se ha encontrado que varias especies pertenecientes al mismo género son utilizadas por pacientes con DM2 (Salatino, *et al.*, 2007); a partir de esto, se espera encontrar compuestos que inhiban de forma significativa la actividad de la PTP-1B y de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas y que ocasionen menos efectos indeseables, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.



# **ANTECEDENTES**



## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1. Generalidades de la Medicina Tradicional.

Los productos naturales han sido una fuente de agentes medicinales desde hace miles de años, y un número notable de medicamentos modernos se han derivado de fuentes naturales, basándose predominantemente en sus conocimientos disponibles en la medicina tradicional (**Pan, et al., 2014**). De acuerdo con la OMS, la medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales. Históricamente, la medicina tradicional ha sido utilizada para mantener la salud y prevenir enfermedades, en particular aquellas que son crónicas, por lo que ha contribuido enormemente a la salud humana; sin embargo, ha sido una parte subestimada de los servicios de salud (**OMSc, 2018**).

La importancia de la medicina tradicional se debe a la accesibilidad y asequibilidad a los servicios de salud, principalmente en los países en desarrollo; por lo que debe considerarse como una perspectiva “nueva” con referente conceptual y metodológico muy complejo y diferente a la medicina convencional (**SENA, 2006**).

La utilización de la medicina tradicional sigue siendo amplia en la mayoría de los países, y de acuerdo con datos de la OMS, se estima que aproximadamente el 80% de la población mundial hace uso de la medicina tradicional, principalmente herbolaria, para cubrir sus necesidades de salud. Cabe destacar que, desde el inicio de la humanidad, el uso de plantas medicinales o hierbas ha ofrecido una medicina eficaz para el tratamiento de enfermedades, y hasta ahora, la práctica de la medicina herbal implica el uso de más de 53,000 especies (**Pan, et al., 2014**).

Sin embargo, en muchas partes del mundo, las instancias normativas, los profesionales de la salud y el público están afrontando cuestiones relativas a la seguridad, eficacia, calidad, disponibilidad, preservación y reglamentación de la medicina tradicional. Como consecuencia, la OMS efectuó un análisis general de la situación, y elaboró una estrategia con la finalidad de aprovechar la contribución potencial de la medicina tradicional a la salud, el bienestar y la atención de salud centrada en las personas, y promover la utilización segura y eficaz de la medicina tradicional a través de la reglamentación y la investigación, así como mediante la incorporación de productos, profesionales y prácticas en los sistemas de salud; de esta forma, se estaría contribuyendo a asegurar el acceso de todas las personas a la atención a la salud (OMSd, 2014).

A pesar de lo anterior, los problemas asociados con la seguridad, eficacia y calidad de la medicina tradicional aún persiste, ello debido al limitado respaldo experimental, la ausencia de ensayos clínicos como fuente de respaldo y la ausencia de métodos de prueba para evaluar sus resultados en grupos de pacientes; por otro lado, otra de las dificultades relacionadas con la seguridad es la toxicidad propia y la generada por interacciones entre algunos constituyentes químicos de los preparados de hierbas y fármacos de la medicina moderna.

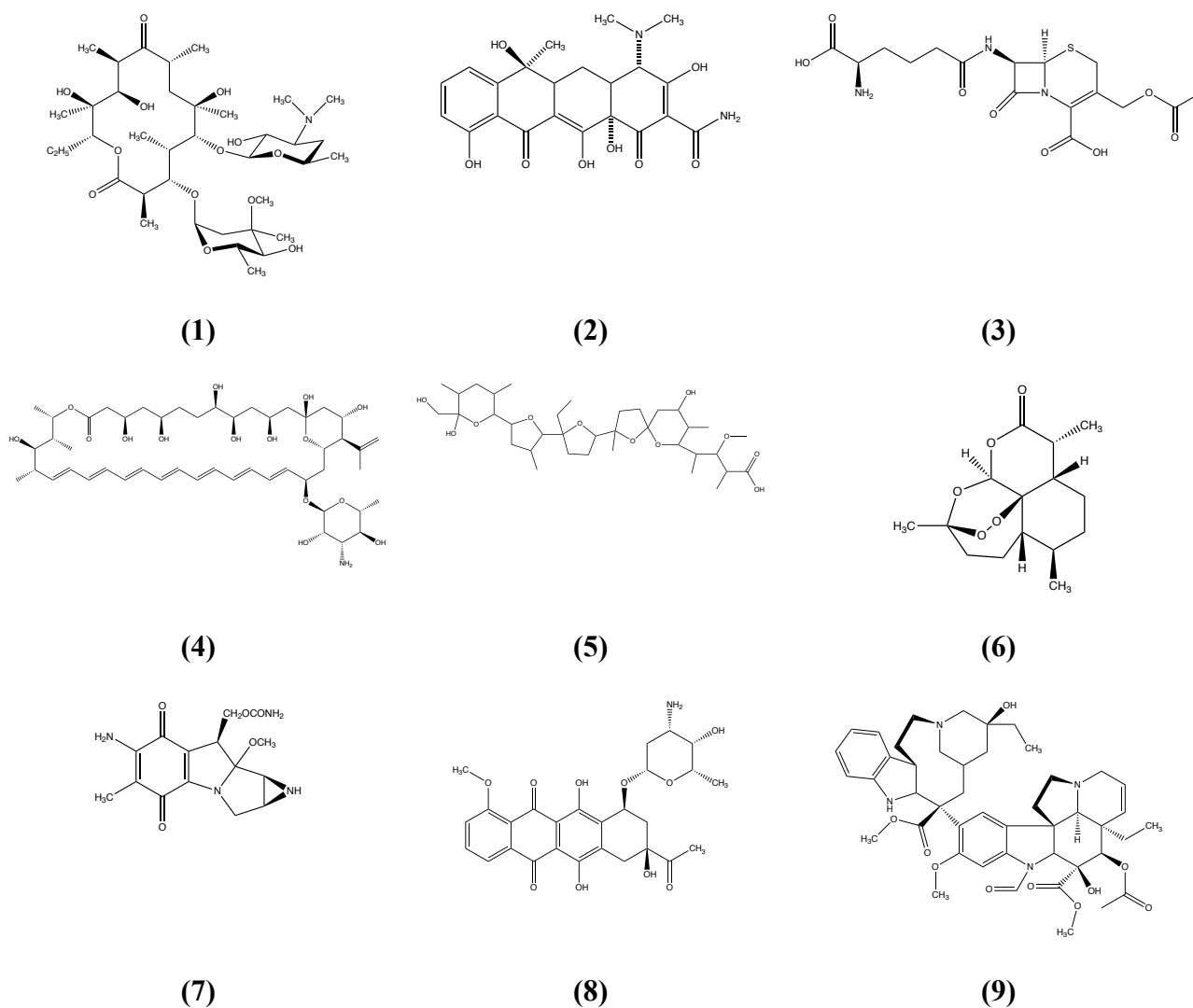
Por otra parte, la medicina moderna tiene también sus limitaciones, relacionadas principalmente con la aparición de efectos secundarios graves, así como la resistencia a fármacos provocada por un uso inadecuado de los mismos. Por ello, se considera que existe una necesidad imperiosa de contar con nuevos fármacos, y en este contexto, el conocimiento sobre el uso de la medicina tradicional puede proporcionar un recurso invaluable.

Con todo lo anterior, conviene resaltar la importancia de continuar realizando investigaciones multidisciplinarias que conduzcan a evidenciar el potencial farmacológico y seguridad de los productos utilizados dentro de la medicina tradicional.

## 2.2. Importancia de los Productos Naturales en el Descubrimiento de Nuevos Fármacos.

Los productos naturales son sustancias químicas orgánicas que son producidas por las vías del metabolismo secundario de los diferentes organismos vivos que se encuentran en la naturaleza; y que tienen propiedades farmacológicas importantes en el tratamiento de diversos tipos de enfermedades. Por lo que pueden actuar como potentes activos no solo para la medicina tradicional, sino también para las medicinas modernas, ya que se utilizan a menudo como puntos de partida para el descubrimiento de fármacos (Chintoju, *et al.*, 2015).

De este modo, el descubrimiento de productos naturales ha sido impulsado por los hallazgos de que son agentes importantes y valiosos: productos farmacéuticos, herbicidas, insecticidas, etc. Desde el descubrimiento de la penicilina, hace más de 75 años, se han caracterizado más de 23,000 productos naturales (Katz, *et al.*, 2016). En este contexto, se conoce que, en el periodo de 1981-2014, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó un total de 1562 fármacos, de los cuales aproximadamente el 40% son productos naturales o sus derivados (derivados semisintéticos, compuestos sintéticos basados en farmacóforos de productos naturales, o imitadores de productos naturales), con actividades terapéuticas variadas, destacando principalmente, compuestos antibióticos, como la eritromicina (1), la tetraciclina (2), y la cefalosporina (3), anfotericina C (4), la monensina (5), y la artemisinina (6) y antitumorales, como la mitomicina C (7), la daunorubicina (8), y la vincristina (9) (Figura 1) (Newman, 2016 y Katz, *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Fármacos antibacterianos, antifúngicos, y antitumorales, obtenidos de fuentes naturales (Katz, *et al.*, 2016).

Actualmente, el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es aún un desafío, por lo que se considera que un enfoque multidisciplinario que implique la generación de diversidad molecular a partir de fuentes de productos naturales, combinado con metodologías sintéticas totales y combinatorias (incluida la manipulación de vías biosintéticas), podría ser una solución (Newman, 2016).

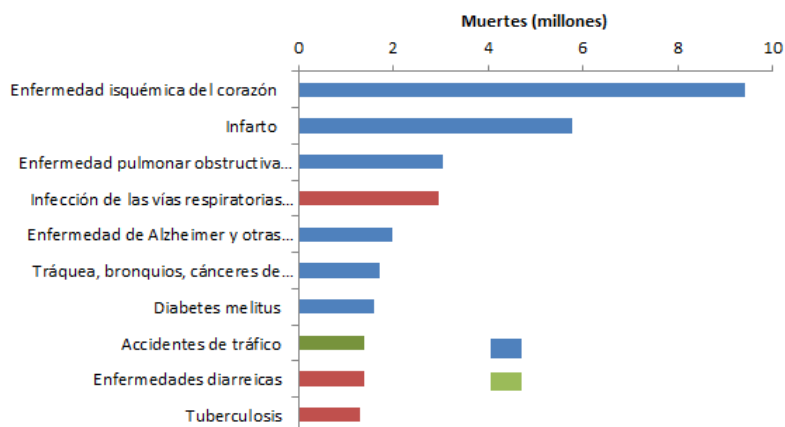
### 2.3. Principales Causas de Mortalidad a Nivel Mundial.

Durante muchos años, la carga de morbilidad a nivel mundial correspondía a enfermedades transmisibles, como la malaria, la tuberculosis, el VIH/SIDA y a su vez, estas constituían la primera causa de defunciones a nivel mundial, principalmente en países de ingresos bajos y medios; por lo que los organismos de salud en todo el mundo implementaron medidas enfocadas en el tratamiento y prevención de estas enfermedades, dedicando poca atención a la prevención y tratamiento de enfermedades no transmisibles (ENT) (Dounac, 2014). Gracias a estas medidas, de acuerdo con datos de la OMS, la tasa de mortalidad adulta ha disminuido en las últimas décadas en la mayoría de las regiones del mundo y la esperanza de vida ha incrementado (OMSa, 2018). Este aumento en la esperanza de vida supone una disminución en la carga de morbilidad asociada a enfermedades transmisibles, sin embargo, supone también un incremento en el desarrollo de ENT (Soto-Estrada, *et al.*, 2016).

En este contexto, se prevé que para el año 2030 la tasa de mortalidad por las principales enfermedades transmisibles, maternas, perinatales y nutricionales disminuya aún más, y que el número de defunciones por ENT aumente considerablemente. Los principales factores de riesgo de muerte son la hipertensión, el consumo de tabaco, la inactividad física, el sobrepeso, la obesidad y la hiperglucemia (OMC, 2018).

Las ENT, también conocidas como enfermedades crónicas, tienden a ser de larga duración, y resultan de la combinación de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales, afectando desproporcionadamente a los países de ingresos bajos y medios, donde se registran más del 75% de las muertes debidas a ellas. De acuerdo con datos de la OMS, las enfermedades cardiovasculares reportan la mayoría de las muertes por ENT, seguidas del cáncer, enfermedades respiratorias y diabetes mellitus (Imagen 1) (OMSe, 2017).

### 10 principales causas de muerte en 2016



**Imagen 1.** Principales causas de muerte a nivel mundial (OMSe, 2017).

En relación con lo anterior, es conveniente destacar que frecuentemente, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes son enfermedades concomitantes, ya que existe una serie de factores específicos de la diabetes, como la hiperglucemia, la glicosilación de lipoproteínas, el aumento del estrés oxidativo, la insulinoresistencia, alteraciones de la coagulación, disfunción endotelial, inflamación crónica, hipertensión arterial y dislipidemia que favorecen procesos ateroscleróticos (Valdés-Ramos, *et al.*, 2014), que causan el 80% de las muertes en diabéticos, correspondiéndole un 75% a enfermedad coronaria y un 25% a accidente vascular cerebral y enfermedad vascular periférica (Vinocour-Fornieri, 2002). Lo anterior resulta alarmante, pues la prevalencia de la diabetes mellitus está en aumento en todo el mundo, y se estima que se pasará de 170 millones de diabéticos a 642 millones en el año 2040 (Saini, 2010), posicionándose aún más en los primeros lugares de mortalidad a nivel mundial.

Conocer la evolución de la carga mundial de morbilidad y la repercusión de los principales riesgos para la salud permite trazar estrategias eficaces para mejorar la salud mundial (OMC, 2018), y en este contexto, se incluye la investigación guiada al descubrimiento de nuevos fármacos más eficaces, siendo la medicina tradicional una alternativa eficaz para estos fines.

#### 2.4. Uso de Productos Naturales en el Tratamiento de Enfermedades Crónicas.

La práctica de la medicina tradicional o complementaria constituye un grupo diverso de terapias médicas, intervenciones, tratamientos, prácticas y productos que actualmente no se consideran parte de la medicina convencional, e incluye, generalmente, tratamientos y terapias como suplementos a base de hierbas o medicamentos herbarios (Saydah, 2006).

Según la OMS, el concepto de medicamentos herbarios abarca hierbas, material herbario, preparaciones herbarias, y productos herbarios acabados, que contienen como principios activos partes de plantas, u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos (OMSc, 2018). La medicina herbaria se utiliza desde tiempos remotos para curar o aliviar las enfermedades, y es apreciada por su bajo costo y por los reducidos índices de toxicidad, lo que la convierte en la principal alternativa para la atención primaria de la salud, principalmente por parte de los pacientes con enfermedades crónicas (Gallegos-Zurita, 2016).

Enfermedades como la diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, hipertensión e hiperlipidemias son las enfermedades crónicas de mayor prevalencia en el mundo; existen algunas otras, cuya prevalencia no es tan alarmante, como la osteoporosis, la enfermedad obstructiva crónica, asma, epilepsia, hepatitis C, etc. Todas ellas, requieren la mayoría de las veces múltiples intervenciones farmacológicas convencionales (Alamgir, 2018 y Saydah, 2006), y al ser enfermedades crónicas, estas intervenciones son generalmente de larga duración, lo que incrementa el riesgo de desarrollar efectos secundarios indeseables. Ello ha conducido a un incremento en el uso de la medicina herbolaria por parte de la población afectada por estas enfermedades, siendo actualmente, la principal opción de medicina alternativa o complementaria principalmente por su declarada “inocuidad” y efectividad (Alamgir, 2018).

Sin embargo, el uso de medicina herbolaria puede impactar de forma significativa en la salud de las personas con enfermedades crónicas, debido a que muchas terapias y tratamientos utilizados en el contexto de herbarios, son utilizados en combinación con tratamientos convencionales, lo cual puede ocasionar interacciones entre los constituyentes de estos tratamientos y los fármacos convencionales; tal es el caso de fármacos como la aspirina y algunos diuréticos, estos son frecuentemente utilizados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Por otra parte, los constituyentes químicos de los diferentes tratamientos herbarios *per se* pueden causar casos severos de toxicidad. Lo anterior se debe a la falta de pruebas científicas que pongan en evidencia su efectividad y seguridad, así como sus diferentes actividades biológicas y posibles interacciones con otros fármacos.

Por otro lado, es importante mencionar que algunas terapias de medicina herbolaria pueden mejorar la salud de los pacientes con enfermedades crónicas. Algunos estudios han encontrado que un gran número de compuestos químicos, como los ácidos grasos omega 3, reducen la mortalidad, los eventos de enfermedad cardiovascular y los lípidos; y algunos otros, como los esteroides, antioxidantes y flavonoides, tienen importantes efectos que ayudan en el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas, principalmente en personas diagnosticadas con diabetes **(Alamgir, 2018 y Saydah, 2006)**.

## 2.5. Diabetes mellitus.

La diabetes mellitus (DM) es un término diagnóstico para un grupo de desórdenes caracterizados por una homeóstasis anormal de glucosa, que resulta en una elevada concentración de esta en la sangre (**Raffel, et al., 2013**). Son muchos los procesos patogénicos que se encuentran asociados con el desarrollo de la DM; estos van desde la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas, con la consecuente deficiencia de insulina, hasta anormalidades que resultan en resistencia a la acción de la insulina. La acción deficiente de la insulina es consecuencia de la secreción inadecuada de esta hormona y/o la disminución de la respuesta tisular a la insulina; esta acción deficiente ocasiona anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. El deterioro de la secreción de insulina y los defectos en su acción, con frecuencia coexisten en el mismo paciente (**ADAb, 2020**).

De esta forma, se considera que la mayoría de los casos de diabetes se pueden dividir en dos categorías etiopatogénicas. En una categoría, la diabetes tipo 1, la causa es una deficiencia absoluta en la secreción de insulina; en la otra categoría, mucho más prevalente, la diabetes tipo 2, cuya causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una adecuada respuesta secretora de la insulina compensadora (**ADAa, 2020**).

Los síntomas de una marcada hiperglicemia incluyen poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y visión borrosa (**ADAb, 2020**), asimismo, la hiperglicemia crónica puede llevar a complicaciones a largo plazo, que pueden ser microvasculares (nefropatía o retinopatía) o macrovasculares (enfermedad coronaria, enfermedad vascular periférica y nefropatías) (**Clark, et al., 2013**). Es importante señalar que el grado de hiperglicemia puede cambiar con el tiempo, dependiendo de la extensión del proceso de la enfermedad subyacente, por lo que este refleja la gravedad del proceso metabólico y su tratamiento (**ADAb, 2020**).

### 2.5.1. Clasificación.

#### 2.5.1.1. Diabetes Tipo 1.

La Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1), se asocia a una destrucción autoinmune de las células  $\beta$ -pancreáticas, generalmente conduce a una deficiencia absoluta de la secreción de insulina. Representa aproximadamente el 5-10% de todos los casos de diabetes. Los marcadores autoinmunes incluyen autoanticuerpos de células de islotes y autoanticuerpos contra GAD, insulina y las tirosina fosfatasas. La DM1 se define por la presencia de uno o más de estos marcadores autoinmunes. La destrucción autoinmune de las células  $\beta$  tiene múltiples predisposiciones genéticas y también está relacionada con factores ambientales que aún no son bien definidos. La tasa de destrucción de estas células es bastante variable, siendo rápida en algunos individuos (bebés y niños) y lenta en otros (adultos) (ADAa, 2020).

#### 2.5.1.2. Diabetes Tipo 2.

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), conocida como “diabetes no insulino dependiente” es debida a una pérdida progresiva en la secreción de insulina por las células  $\beta$ -pancreáticas, con frecuencia, en el contexto de resistencia a la insulina. Representa el 90-95% de todos los casos de diabetes, abarcando individuos que tienen deficiencia relativa de la producción de insulina y resistencia periférica a la acción de esta. La DM2 con frecuencia no se diagnostica en etapas iniciales, ya que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y no es lo suficientemente grave como para que el paciente advierta los síntomas clásicos de la diabetes; sin embargo, los pacientes no diagnosticados tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones macro y microvasculares. El riesgo de desarrollar DM2 aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física, además factores como el género y la etnicidad pueden influir en el desarrollo de DM2 (ADAa, 2020).

### 2.5.1.3. Diabetes Gestacional.

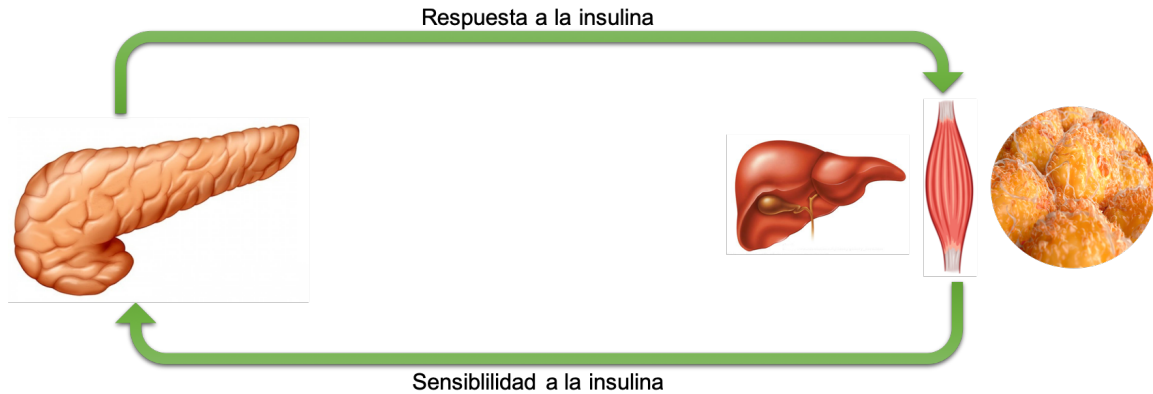
La Diabetes Gestacional es generalmente diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo, que no era claramente diabetes preexistente de tipo 1 o tipo 2. Durante muchos años, este tipo de diabetes se definió como “cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se reconoció por primera vez durante el embarazo”, sin embargo, esta definición estuvo limitada por la imprecisión. La Diabetes Gestacional confiere un mayor riesgo para el desarrollo de DM2 después del parto (ADAa, 2020).

### 2.5.1.4. Otros tipos de Diabetes.

Existen otros tipos específicos de diabetes, debidos a diferentes causas, como los síndromes de diabetes monogénica (diabetes neonatal y diabetes de inicio de madurez de los jóvenes [MODY]), enfermedades del páncreas exocrino (fibrosis quística y pancreatitis), y diabetes inducida por fármacos o químicos (uso de glucocorticoides, tratamientos de VIH/SIDA, o después de un trasplante de órganos (ADAa, 2020).

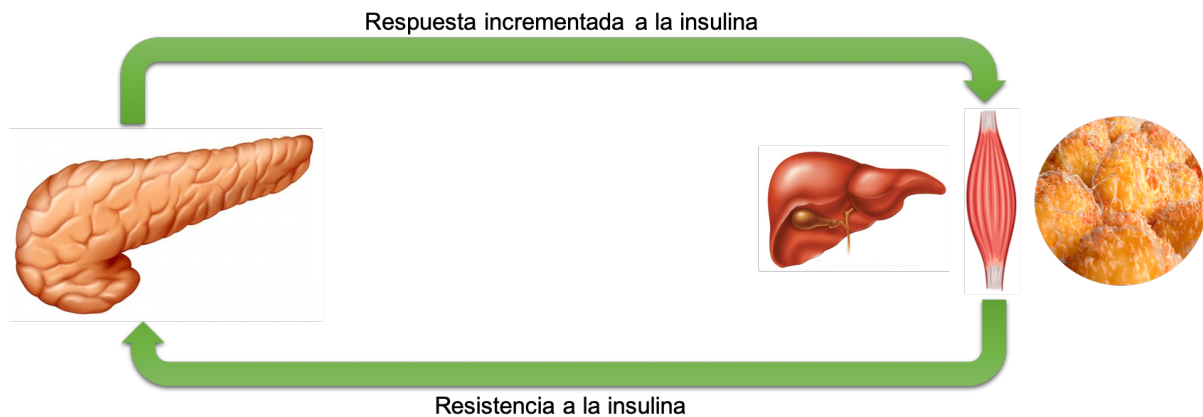
### 2.5.2. Fisiopatología de la DM2.

La DM2 es un trastorno metabólico multifactorial, caracterizado por hiperglucemia crónica, resistencia a la insulina y un defecto en la secreción de insulina. Los factores exactos que conducen al desarrollo de la resistencia a la insulina y la disfunción final de la célula  $\beta$ -pancreática no se han aclarado plenamente (Pérez, 2009). Sin embargo, se considera que al igual que como ocurre con la mayoría de los sistemas endócrinos, opera un ciclo de retroalimentación para garantizar la homeóstasis de glucosa; este circuito de retroalimentación se basa en la diafonía entre los tejidos sensibles a la insulina y la célula  $\beta$  (Imagen 2).



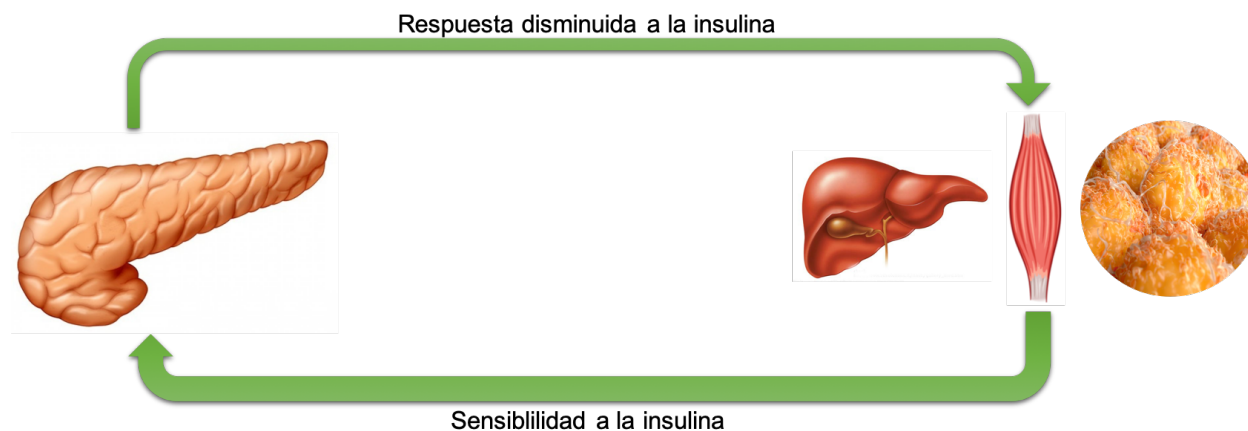
**Imagen 2.** Circuito de realimentación entre las células  $\beta$ -pancreáticas y los tejidos sensibles a insulina (Kahn, *et al.*, 2014).

La insulina liberada en respuesta a la estimulación de las células  $\beta$  media la captación de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos por los tejidos sensibles a la insulina; a su vez, estos tejidos retroalimentan la información al islote con respecto a su necesidad de insulina. Cuando la resistencia a la insulina está presente, la célula  $\beta$  aumenta su producción de insulina para mantener la tolerancia a la glucosa normal (Imagen 3).



**Imagen 3.** Condición de resistencia a la insulina (Kahn, *et al.*, 2014).

Sin embargo, cuando la célula  $\beta$  es incapaz de realizar esta tarea, el resultado es una elevación en la glucosa plasmática (Imagen 4). De esta forma, la reducción en la función de las células  $\beta$  determina el grado de elevación en la glucosa plasmática (Kahn, *et al.*, 2014).



**Imagen 4.** Condición de resistencia a la insulina y disfunción de las células  $\beta$ -pancreáticas (Kahn, *et al.*, 2014).

De forma general, y desde el punto de vista del mecanismo fisiopatológico, en la DM2 es posible observar tres fases bien definidas (Pérez, 2009):

- 1) Aparición de un estado de resistencia periférica a la insulina, generalmente asociada a valores de normoglucemia.
- 2) Una segunda fase asociada a una resistencia a la insulina más marcada a nivel de tejidos periféricos (músculo, tejido adiposo), donde existe una sobreproducción de insulina que no alcanza a controlar la homeóstasis de glucosa.
- 3) Una fase final, asociada a una declinación en el funcionamiento de las células pancreáticas, donde disminuye la síntesis de la hormona.

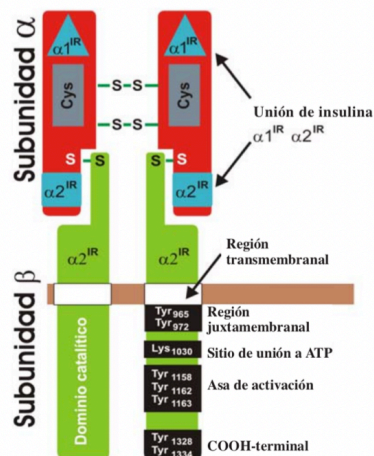
La resistencia a la insulina ya está bien establecida cuando la tolerancia a la glucosa está presente, junto con un aumento en las concentraciones plasmáticas de glucosa (Kahn, *et al.*, 2014); en el momento en que se diagnostica la diabetes, las células  $\beta$  ya no pueden segregar suficiente insulina, con la consiguiente manifestación de hiperglucemia.

Diversas investigaciones han intentado aclarar los mecanismos de la falla de las células  $\beta$ -pancreáticas, ello ha permitido sugerir que los efectos directos de la glucosa y los ácidos libres participan en esta falla, pero aún se desconoce su papel cronológico (**Zaccardi, et al., 2015**).

### 2.5.3. Mecanismos de Resistencia a la Insulina.

La resistencia a la insulina se define como la sensibilidad alterada de los tejidos, principalmente el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo, a los efectos metabólicos de la insulina (**Roden, et al., 2016**). Estos efectos son mediados por varias acciones específicas de los tejidos, incluyendo cambios rápidos en la fosforilación y función de proteínas, así como cambios en la expresión de ciertos genes. El principal efecto de la insulina, una vez transcurridas estas acciones, es la translocación del transportador de glucosa (GLUT4) desde sitios intracelulares hasta la superficie celular, para promover la captación de glucosa al interior de la célula.

La señal inicial para la acción de la insulina es la activación del receptor de insulina IR por las tirosinas cinasas. El IR es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades  $\alpha$ , localizadas en el exterior de la membrana plasmática, que contienen sitios de unión a la insulina, y dos subunidades  $\beta$ , que tienen una porción extracelular, una trans-membranal y una intracelular, en donde se localiza el dominio con actividad de cinasa de Tyr; en la región intracelular se han identificado tres regiones estructurales que incluyen: 1) región yuxtamembranal intracelular, que parece ser importante en la transmisión de la señal y en donde se localizan las tirosinas Tyr965 y Tyr972; 2) región reguladora en donde se encuentran las tirosinas Tyr1158, Tyr1162 y Tyr1163; 3) región con sitios de fosforilación en el extremo carboxilo terminal (Tyr1328 y Tyr1334) (**Imagen 5**). En condiciones de no estímulo, las subunidades  $\alpha$  ejercen un papel regulador sobre las subunidades  $\beta$ , inhibiendo la capacidad del IR para autofosforilarse (**Olivares-Reyes, 2008**).



**Imagen 5.** Estructura del receptor de insulina (IR) (Olivares-Reyes, 2008).

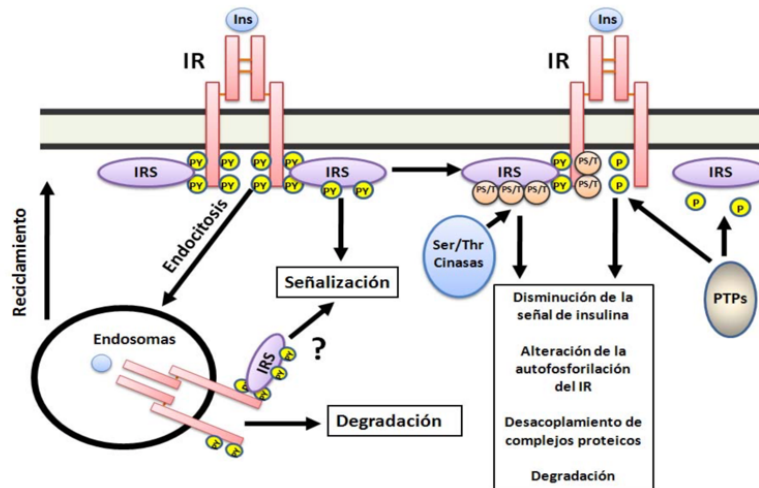
Después de que la insulina se une a su receptor, las subunidades  $\alpha$  sufren cambios conformacionales que permiten que las subunidades  $\beta$  se activen y sean capaces de autofosforilarse en residuos de Tyr. Una vez que la insulina interacciona con su receptor y este es activado, se inicia el encendido de cascadas de señalización que dependen de un orquestado número de interacciones proteicas (Olivares-Reyes, 2008). Dos vías principales de transducción de señales son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos (Olivares-Reyes, 2008).

La duración y extensión de las señales inducidas por acción de la insulina son altamente reguladas para promover el adecuado funcionamiento metabólico, el balance energético y el mantenimiento del peso corporal. El control de las acciones de la insulina se lleva a cabo gracias a mecanismos de autorregulación, en donde enzimas de la misma vía que fueron activadas por acción de la insulina, inhiben la actividad de proteínas claves en la señalización, como lo son el IR o sus sustratos (IRS) (Olivares-Reyes, 2008).

Los IRS son proteínas intracelulares que han sido identificadas como sustratos de fosforilación para IR; cuando se activan por fosforilación pueden actuar activando a otras enzimas que median las últimas acciones de la insulina. De esta forma, tanto el IR como su principal sustrato (IRS), se encuentran sujetos a una combinación de mecanismos de desensibilización homóloga y heteróloga (Olivares-Reyes, 2008).

Los defectos funcionales en la resistencia a la insulina pueden ser debidos a una inadecuada señalización de la insulina en los tres tejidos blanco (adiposo, músculo esquelético e hígado), pues se ha encontrado que la señalización deficiente del receptor de insulina es uno de los principales componentes de la resistencia a la insulina. Además, se ha observado que, en individuos obesos, la expresión de IRS se encuentra reducida, lo cual disminuye la actividad de la PI3K.

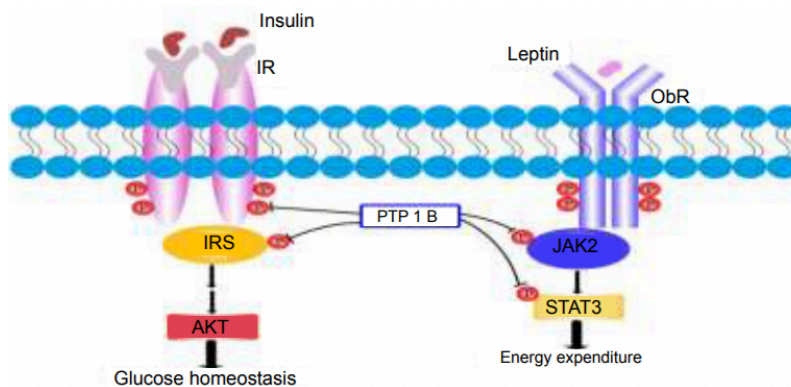
Por otro lado, se ha encontrado que, en condiciones de resistencia a la insulina, existe una mayor expresión y actividad de varias Proteínas Tirosina Fosfatasa (PTP). Las PTP son una superfamilia de proteínas no transmembranales, cuyos miembros son altamente específicos y regulados, y son importantes moduladores de la señal de iniciación y terminación celular (Sun, *et al.*, 2016). La actividad de las PTP es esencial en la vía de señalización regulada por insulina (Zhang, *et al.*, 2007) debido a su capacidad de desfosforilar y desactivar el receptor de insulina (IR), desactivando la señalización (Imagen 6) (Través, *et al.*, 2014) y se ha encontrado que la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) es el principal regulador negativo en la transducción de la señal de la insulina (Sun, *et al.*, 2016).



**Imagen 6.** Actividad de las PTP en la vía de señalización de insulina (Través, *et al.*, 2014).

Uno de los principales puntos de regulación a nivel del IR y del IRS es la acción de las proteínas fosfatasa de Tyr (PTP), ya que se ha postulado que el grado de activación del IR está determinado por acciones opuestas a su fosforilación en los residuos de Tyr. De esta forma, la desfosforilación de residuos claves de Tyr en el asa de activación del receptor por las PTP actualmente objeto de estudio en numerosas investigaciones. Evidencias experimentales han propuesto la participación de las PTP en la regulación de las acciones de insulina, encontrando que PTP-1B y SHP2 son las principales proteínas reguladoras (Olivares-Reyes, 2008).

Durante la unión de la insulina y su receptor, la PTP-1B puede catalizar la desfosforilación del receptor de insulina (IR) y de los sustratos del receptor de insulina (IRS), coordinando el balance entre la fosforilación y desfosforilación de los residuos de tirosina, lo cual resulta en una regulación negativa de la señal de transducción de insulina. Por otro lado, la PTP-1B puede prevenir la señal de transducción de leptina, desfosforilando factores de transcripción como el STAT3 o quinasas como JAK2 (Imagen 7). La alta expresión de PTP-1B influye en la actividad de las PTK, provocando que la insulina no se una a su receptor, induciendo de esta forma, resistencia a la insulina (Sun, *et al.*, 2016).



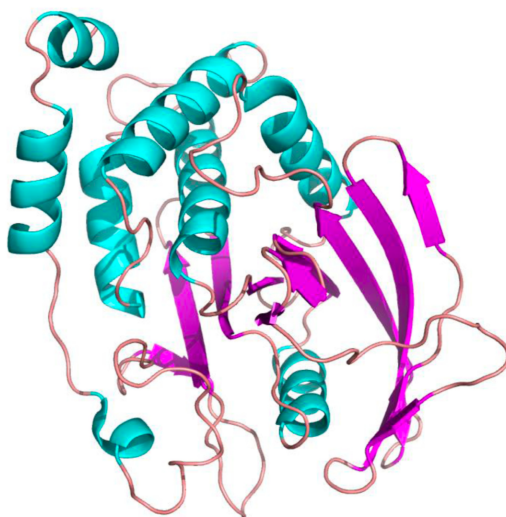
**Imagen 7.** Vías de señalización fisiológicas que involucran la acción de la PTP-1B (Sun, *et al.*, 2016).

Como se ha mencionado, la DM2 se caracteriza por una resistencia a la insulina, debida posiblemente a una disminución en la señalización de los receptores. Por lo anterior, se ha identificado a la proteína tirosina fosfatasa como el principal regulador negativo en la señalización de la insulina; sugiriendo que la PTP-1B es un nuevo blanco terapéutico atractivo para el tratamiento de la DM2 (Zhang, *et al.*, 2007).

#### 2.5.4. Inhibición de la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP-1B) como blanco terapéutico en la DM2.

Los procesos de fosforilación y desfosforilación son el mecanismo básico de muchas funciones celulares, como el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación celular, la respuesta inmune, la oncogénesis y la apoptosis, y en este sentido, se considera que una fosforilación anormal puede estar relacionada con varias enfermedades, incluyendo cáncer, diabetes, desórdenes neurológicos, y enfermedades inmunes. Estos procesos ocurren principalmente en residuos de serina, treonina y tirosina, y son regulados por acción de proteínas tirosina cinasas (PTK) y proteínas tirosina fosfatasas (PTP) (Kim, *et al.*, 2012).

Las PTP constituyen una superfamilia de proteínas codificadas por más de 100 genes en humanos (Kim, *et al.*, 2012). Esta familia de enzimas, contienen dominios catalíticos altamente conservados en términos de estructuras primaria y terciaria, comprendidos por ~280 aminoácidos y comparten una arquitectura de una lámina central altamente empaquetada, de nueve cadenas  $\beta$ . Un lado de la lámina  $\beta$  está cubierto por 6 hélices  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$  anti-paralelas, y el otro lado, por tres hélices  $\alpha$  (Imagen 8). Se definen por un motivo activo HCXAGXXR (S/T), que contiene un residuo de Cys, que actúa como un nucleófilo y es esencial para la catálisis (Kim, *et al.*, 2012 y Kennedy, 1999).

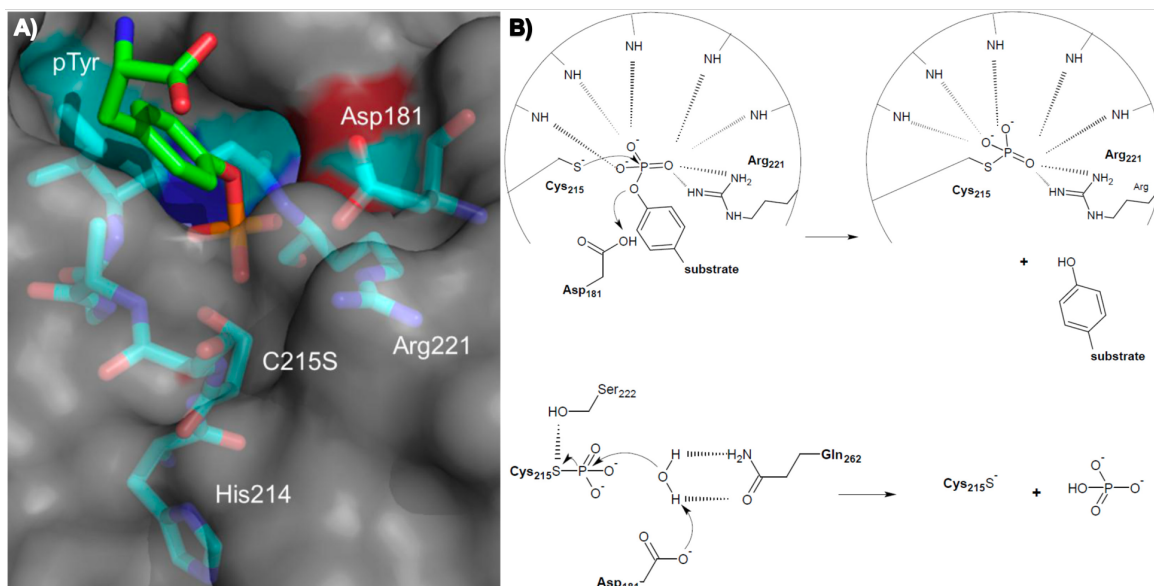


**Imagen 8.** Estructura terciaria de las PTP (Kim, *et al.*, 2012).

Las PTP pueden clasificarse en dos grupos, transmembranales y citosólicas (Kennedy, 1999). El primer miembro identificado de esta superfamilia es la PTP-1B, y diversos estudios la han asociado con la resistencia a la insulina presente en la DM2 (Ukkola, 2002). PTP-1B pertenece al grupo de las fosfatasas citosólicas (Kennedy, 1999), está constituida por 435 aminoácidos, codificados por el gen PTPN1. Tiene una secuencia hidrofóbica C-terminal anclada en el retículo endoplásmico (Bakke, *et al.*, 2015).

Al igual que otros miembros de las PTP, PTP-1B contiene la secuencia HCXAGXXR (S/T) y un giro ácido/base, que contiene Cys. Debido al ambiente químico del sitio activo de la fosfatasa, Cys, que se encuentra localizada en la base del sitio activo, tiene un pKa anormalmente bajo (~5.4), lo que mejora su función catalítica, pero la vuelve más susceptible a oxidación. La interacción PTP-1B con sus sustratos está regulada por su dominio catalítico, así como con motivos no catalíticos, generalmente ricos en prolina (Pro) (Bakke, *et al.*, 2015).

En la **Imagen 9**, se muestra la interacción entre PTP-1B y un sustrato, se observa una interacción entre el grupo fosfato del sustrato y la fosfotirosina (pTyr), y esta interacción está coordinada por las amidas de Arg221, His214 y Asp181. La cadena lateral de la cisteína del sitio activo existe como un ion tiolato en condiciones fisiológicas, y ataca al átomo de fósforo del residuo de fosfotirosina. Al mismo tiempo, Asp se posiciona idealmente para actuar como un ácido general, donando protones al oxígeno fenólico del sustrato con la consiguiente formación de un intermedio de fósforo-cisteína. Este intermedio se resuelve con una molécula de agua activada adicionada con Asp y un residuo de Gln adyacente (Kim, *et al.*, 2012).



**Imagen 9.** A) Estructura cristalizada del complejo PTP-1B/sustrato; B) Mecanismo catalítico de PTP-1B (Kim, *et al.*, 2012).

Numerosos estudios han conducido al desarrollo de sustratos inhibidores de PTP-1B con la finalidad de mejorar la sensibilidad a la insulina y corregir los desórdenes metabólicos, como ertiprotafib, ISIS 112715, ISIS-PTP1BRx y trodusquemina; pero ninguno de ellos ha progresado más allá de estudios clínicos de fase 2, debido a la especificidad y biodisponibilidad de PTP-1B en los tejidos (Thiebaut, *et al.*, 2016 y Sun, 2016).

Por otro lado, se ha reportado que fármacos disponibles en el mercado, como las tiazolidindionas, benzofurano y benzotiofeno, que comparten similitudes moleculares, pueden inhibir a PTP-1B (Sun, 2016).

Además, se ha encontrado que algunos compuestos o moléculas pequeñas, obtenidas a partir de plantas medicinales tienen una potente actividad inhibitoria de esta proteína, estos compuestos incluyen a alcaloides, como la morfina, flavonoides y terpenoides, pero al igual que los compuestos anteriores, no han avanzado en las pruebas clínicas. Lo anterior sugiere que la

búsqueda de moléculas, sintéticas o derivadas de plantas, que inhiban eficazmente a PTP-1B, podría tener un impacto significativo en el tratamiento de la DM2 (Kim, *et al.*, 2016).

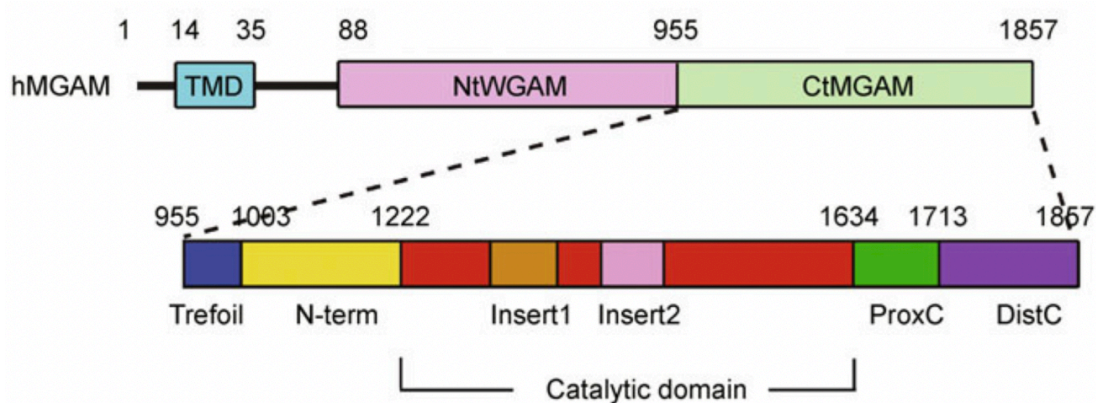
Por otro lado, se ha propuesto la existencia de ciertos factores intestinales que pueden actuar como reguladores, y cuya ausencia o disminuida secreción pueden intervenir en el desarrollo de la DM2, ya que son capaces de estimular la secreción de insulina. Estos factores son principalmente, incretinas, como el péptido similar al glucagón (GLP-1) gástrico y secretado por células del íleon y colon; polipéptidos inhibidores (GIP), secretados por las células del duodeno y yeyuno proximal, entre otros, los cuales ejercen sus funciones después de la ingesta de alimentos y pueden aumentar la insulina y reducir la secreción de glucagón (Zaccardi, *et al.*, 2015).

#### 2.5.5. Importancia de la Inhibición de las Enzimas $\alpha$ -glucosidasas intestinales.

Los carbohidratos son importantes fuentes de energía para los seres humanos, la mayoría de los carbohidratos ingeridos en la dieta se presentan en forma de oligo o polisacáridos, generalmente unidos mediante enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Para poder ser digeridos deben ocurrir rupturas en estos enlaces, y en este proceso se encuentran implicadas cuatro enzimas hidrolasas ( $\alpha$ -glucosidasas), cuya función es catalizar la hidrólisis en los enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucosídicos, para generar glúcidos menores (Sanjay, 2014).

La digestión la inicia la enzima  $\alpha$ -amilasa salival y pancreática, produciendo maltosa, maltotriosa y otros oligoglucanos  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6); la mezcla resultante es hidrolizada en glucosa por la enzima maltasa-glucoamilasa (MGAM) y sacarasa-isomaltasa (SI) en el lumen intestinal, con lo que se genera un aumento en las concentraciones plasmáticas de glucosa (Ren, *et al.*, 2011).

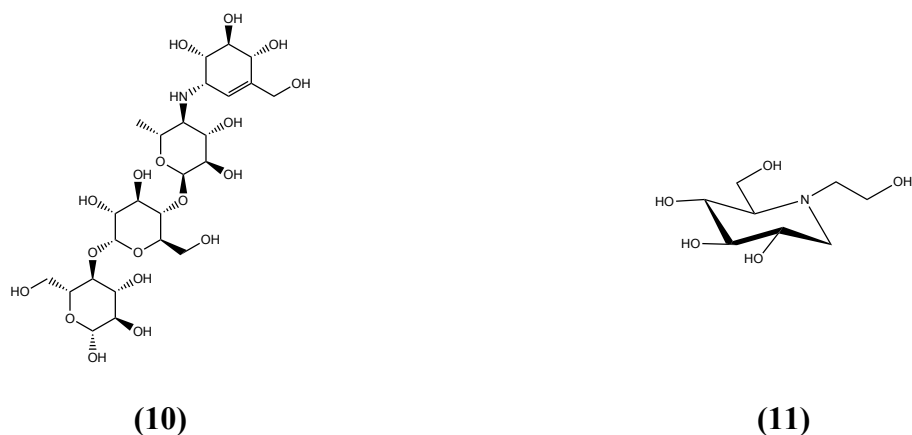
Tanto MGAM como SI son enzimas con centros catalíticos duplicados que se anclan en la membrana del borde del intestino delgado a través de un enlace *O*-glicosilado, procedente de sus extremos N. Ambas enzimas se pueden dividir en una subunidad N-terminal (MGAM-N y SI-N) y una subunidad C-terminal (MGAM-C y SI-C) (**Imagen 10**). Las cuatro subunidades exhiben actividades similares de exoglucosidasa contra sustratos de maltosa lineales ligados con  $\alpha$ -(1→4), pero diferentes preferencias para sustratos de oligosacáridos de varias longitudes; MGAM-N y SI-N tienen actividad máxima contra sustratos con varias glucosas; mientras que MGAM-C y SI-C prefieren oligosacáridos con hasta cuatro residuos de glucosa. MGAM-C tiene una actividad mucho mayor que MGAM-N y es en realidad la subunidad con mayor actividad entre estas cuatro subunidades. Adicionalmente, SI exhibe actividades contra oligoglucanos  $\alpha$ -(1→2) y  $\alpha$ -(1→6) (**Ren, et al., 2011**).



**Imagen 10.** Representación esquemática de los dominios de MGAM y SI humanas (**Ren, et al., 2011**).

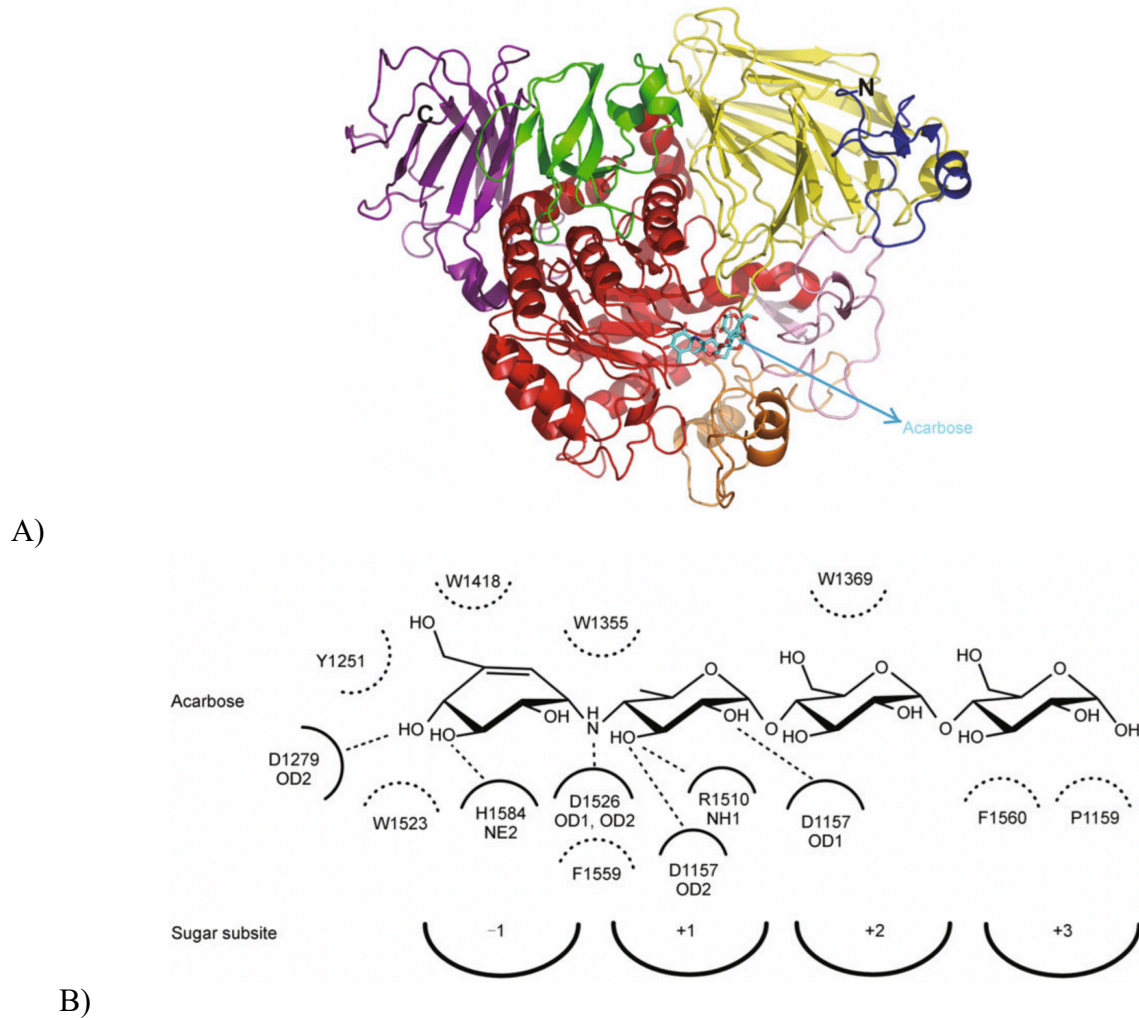
MGAM-C tiene un peso molecular de ~100 kDa y es la subunidad con la mayor actividad de las 4 subunidades existentes; por lo que se considera que su inhibición es un eficaz blanco terapéutico en el tratamiento de la DM2 (**Ren, et al., 2011**).

Actualmente, son pocos los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas comercialmente disponibles, estos incluyen la acarbosa (**10**) y el miglitol (**11**) (**Figura 2**), y ambos han sido aislados a partir de fuentes naturales, principalmente bacterias (**Yin, et al., 2014** y **Sanjay, 2014**).



**Figura 2.** Estructuras de los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas actuales: acarbosa (**10**) y miglitol (**11**) (**Yin, et al., 2014** y **Sanjay, 2014**).

La acarbosa es un pseudo-tetrasacárido constituido por un grupo acarviosina  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) unido a una maltosa; este fármaco, como se ha mencionado anteriormente, presenta una potente inhibición sobre la actividad de MGAM-C; cuyo sitio activo se encuentra entre los residuos 1221-1632. La interacción entre la acarbosa y el sitio activo de MGAM-C implica numerosas interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno; abarcando 4 subsitios MGAM-C, las interacciones ocurren en los aminoácidos His1584, Asp1279, Tyr1251, Trp1523, Trp1418, Asp1157, Arg 1510, Trp1355, Phe1559, Asp1526, Trp1369, Phe1560 y Pro1159 (**Imagen 11**).



**Imagen 11.** A) Estructura del complejo MGAM-C / acarbosa. Dominio catalítico ( $\beta / \alpha$ ) (rojo). El inhibidor de la enzima, acarbosa se muestra en color azul. Terminal N, N; C, terminal C. B) Representación de las interacciones hidrofóbicas (semicírculos de líneas punteadas) y puentes de hidrógeno (líneas punteadas) implicadas en la interacción de MGAM-C y acarbosa (Ren, *et al*, 2011).

Los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas disminuyen la absorción de carbohidratos inhibiendo competitivamente la actividad de estas enzimas, reduciendo así la glicemia postprandial; además, tienen un efecto de ahorro de insulina, aumenta las hormonas incretinas y el péptido similar al glucagón 1, por lo que son de gran utilidad en el tratamiento de la diabetes, principalmente en etapas tempranas de la enfermedad. Estos agentes han sido recomendados como primera línea de terapia por la IDF y la American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) (Sanjay, 2014).

Sin embargo, su mecanismo de acción conlleva a desarrollar los efectos terapéuticos esperados, así como efectos adversos o indeseables. Los carbohidratos sin digerir regresan al lumen intestinal, causando flatulencia, diarrea y dolor abdominal; por otro lado, el uso concomitante de estos con insulina o sulfonilureas puede desarrollar episodios hipoglucémicos (Sanjay, *et al.*, 2014).

Por lo anterior, se considera necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que inhiban de forma eficaz la actividad de las  $\alpha$ -glucosidasas, causando un menor número de efectos adversos. En este contexto, en los últimos años, se han desarrollado proyectos para descubrir potentes inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas a partir de fuentes naturales; en estos estudios se han utilizado enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de levadura, intestino de rata y de ratón como fuentes de enzimas, utilizando acarbosa como control positivo. Derivado de estos estudios, se han logrado aislar a partir de plantas medicinales, aproximadamente 411 compuestos con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas; estos compuestos han sido principalmente terpenos, alcaloides, quininas, fenoles, fenilpropanoides y flavonoides (Yin, *et al.*, 2014).

#### **2.5.6. Antidiabéticos Orales Actuales.**

La DM2 se caracteriza por una condición crónica de hiperglucemia, desarrollada a partir de múltiples alteraciones patogénicas y ocasiona daños a largo plazo, como disfunción y falta de funcionamiento en diferentes órganos, principalmente riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Tébar-Massó, *et al.*, 2009); por ello, el tratamiento farmacológico tiene como propósito aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por esta enfermedad o por sus complicaciones (PROY-NOM-015-SSA2-2018).

El tratamiento se basa en la administración de múltiples agentes antidiabéticos que al ejercer su efecto sobre diferentes niveles fisiopatológicos de la DM2, puedan ser utilizados solos o en combinación para alcanzar los valores de control glucémicos considerados “aceptables”, de acuerdo con la propuesta de la OMS y ADA (Glucemia basal o preprandial: 80-100 mg/dL; Glucemia postprandial: 100-180 mg/dL; Glucemia al acostarse: 100-120 mg/dL; HbA1c: <7%; Colesterol: <200 mg/dL; LDL: <100 mg/dL; HDL: >40 mg/dL; TG: <150 mg/dL; P. A.: <130/85) **(González-Sánchez, et al., 2012 y Lorenzo, et al., 2008)**.

Actualmente, existen múltiples opciones terapéuticas para el tratamiento de la DM2, las cuales varían de acuerdo con su efectividad hipoglucemiante, efectos extra pancreáticos, perfil de seguridad, tolerabilidad y costos, sin embargo, algunos de ellos ocasionan efectos secundarios importantes **(Tabla 1)** **(Salaverría de Sanz, et al., 2012 y Mateos-Santa Cruz, et al., 2002 y Chaudhury, et al., 2017)**. Los fármacos antidiabéticos orales pueden dividirse en tres grandes grupos, de acuerdo con su mecanismo de acción: A) Secretagogos de insulina, que incrementan la secreción de insulina por parte de las células pancreáticas, bloqueando los canales de  $K^+$  sensibles a ATP; B) Sensibilizadores de insulina, que incrementan la sensibilidad de los órganos diana a la insulina mediante mecanismos variados; y C) Antihiperoglucémicos, que impiden el aumento exacerbado de los niveles plasmáticos de glucosa postprandial **(González-Sánchez, 2012)**.

**Tabla 1.** Efectos adversos de los antidiabéticos actuales (Chaudhury, *et al.*, 2017).

Antidiabético	HbA1c (Reducción)	Riesgo de Hipoglucemia	Peso Corporal	Metabolismo	Riesgo CV
BG	1-2%	Ninguno	Pérdida de peso debido a efecto anoréxico.	Acidosis láctica, náuseas, vómito, diarrea.	Reduce IM (39%) y muerte coronaria (50%)
Inhibidores de la DPP-IV	0.5-0.8%	Bajo	---	---	Insuficiencia cardíaca congestiva
Inhibidores de SGLT-2	---	Bajo	---	---	Efecto positivo, debido a la reducción de sodio y absorción de ácido úrico
SU	1-2%	Muy alto (daño renal severo)	Aumento de peso	---	Incrementa riesgo cardiovascular, debido a hipoglucemia
TZD	0.5-1.4%		Aumento de peso	---	Insuficiencia cardíaca, edema

Debido a la severidad de los efectos adversos que presentan los antidiabéticos actuales, se considera necesaria la búsqueda de nuevas alternativas en el tratamiento farmacológico de la DM2, incluyendo el desarrollo de nuevas moléculas sintéticas o de fuentes naturales que resulten más seguras y efectivas (Tabatabaei-Malazy, *et al.*, 2015).

## 2.6. Uso de Productos Naturales en el Tratamiento de la Diabetes.

Recientemente, la popularidad y uso de terapias alternativas ha incrementado considerablemente, principalmente, el uso de la medicina herbolaria, ya que es una de las alternativas más accesibles para la población, y ha jugado un papel importante en el tratamiento de la DM2. En este contexto, diferentes remedios y fármacos de origen natural han sido utilizados a lo largo de la historia, incluyendo a la insulina.

Algunos de ellos han sido incluidos en el arsenal terapéutico de la medicina y otros se utilizan como terapia complementaria en pacientes con hiperglucemia (Tabatabaei-Malazy, *et al.*, 2015 y Ríos, *et al.*, 2015). La primera planta medicinal descrita con efecto antidiabético fue *Galega officinalis* (Fabaceae), que históricamente se ha utilizado para tratar la DM, y a partir de la cual se aisló la galegina (12), un derivado de la guanidina, compuesto con estructura similar a la metformina (13) (Figura 3), y responsable del efecto hipoglucemiante producido por el extracto de la planta. Adicionalmente, compuestos fenólicos, como los flavonoides y las antocianinas, tienen efectos positivos sobre la DM (Ríos, *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Estructuras de galegina y metformina (Ríos, *et al.*, 2015).

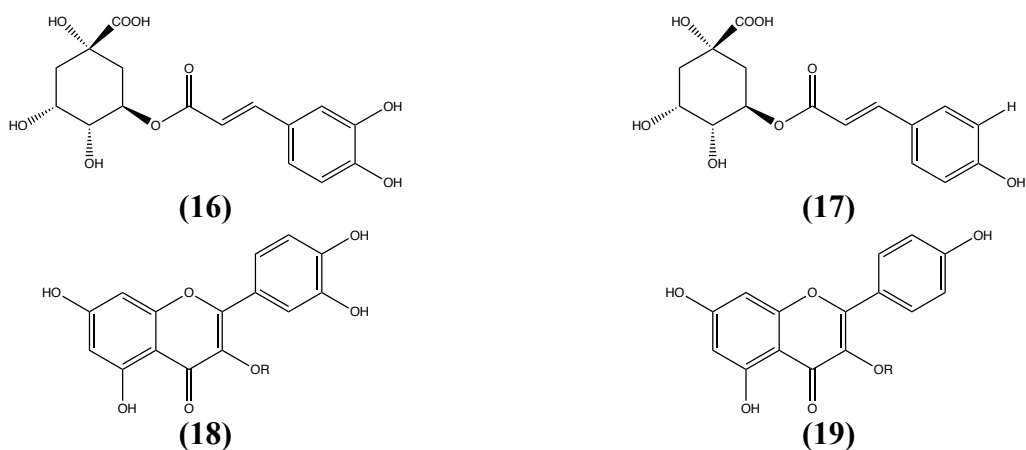
Diferentes investigaciones se han centrado en el mecanismo de acción de los metabolitos aislados de plantas, y se ha establecido que compuestos antioxidantes mejoran la función de las células  $\beta$  pancreáticas y la secreción de insulina, mediante la supresión del estrés oxidativo (Tabatabaei-Malazy, *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha encontrado que compuestos como las catequinas, flavonoles, flavonas y derivados cafeoil han mostrado una importante inhibición de enzimas digestivas ( $\alpha$ -glucosidasas y  $\alpha$ -amilasas), retardando la absorción de carbohidratos en el intestino; adicionalmente, compuestos como vasicina (14) y vasicinol (15) (Figura 4), obtenidos de *Adathoda vasica* Nees (Acanthaceae) han mostrado una potente inhibición sobre  $\alpha$ -glucosidasas, considerándose que estos agentes podrían ser futuros candidatos en el desarrollo de fármacos inhibidores de estas enzimas (Ríos, *et al.*, 2015).



**Figura 4.** Estructuras de compuestos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, obtenidos de *Adathoda vasica* (vasicina y vasicinol) (Ríos, *et al.*, 2015).

Otro de los mecanismos que más han llamado la atención es la inhibición de PTP-1B, ya que se ha sugerido que esta enzima podría ser un blanco terapéutico prometedor en el tratamiento de la DM2. Estudios han demostrado que compuestos como el ácido cloronérgico (16), el ácido 3-p-cumaroilquínico (17) y diversos flavonoides glicosilados de kaempferol (18) y quercetina (19) (Figura 5), así como diversos triterpenoides, inhiben de forma eficaz la actividad de esta enzima (Ríos, *et al.*, 2015).



**Figura 5.** Estructuras de compuestos obtenidos de plantas medicinales, con importante actividad inhibitoria sobre PTP-1B (Ríos, *et al.*, 2015).

Todos estos estudios han sido efectuados a partir de extractos de plantas utilizadas dentro de la medicina tradicional en el concepto de antidiabéticos, la mayoría de ellas pertenecientes a familias como Acanthaceae, Apocynaceae, Araliaceae, Asteraceae, Bromeliaceae, Curcubitaceae, Fabaceae y Euphorbiaceae. Sin embargo, es conveniente resaltar que son numerosas las plantas utilizadas para el tratamiento de la DM2, por lo que la gran mayoría de ellas no han sido estudiadas y no se cuenta con evidencia científica sobre su función, además se estima que cerca de un tercio de estas plantas presentan un importante grado de toxicidad (**Bnouham, et al., 2006** y **Ríos, et al., 2015**).

### 2.7. Familia Euphorbiaceae.

La familia Euphorbiaceae es una de las más grandes de las angiospermas, con una gran importancia económica, su distribución es cosmopolita, con cinco subfamilias, 49 tribus, 317 géneros y cerca de 8,000 especies (**Bijekar, et al., 2014**), que van desde grandes árboles leñosos hasta malezas simples que crecen en el suelo, muchas de ellas habitan en climas tropicales y sobreviven a las condiciones cálidas y secas del desierto, mientras que otras son árboles de la selva y hierbas (**Mwine, et al., 2010**).

Euphorbiaceae es una de las familias de plantas medicinales más frecuentemente consumidas para el tratamiento de la DM y diversos estudios han comprobado el efecto hipoglucemiante de algunas de ellas (**Bnouham, et al., 2006**). Algunas especies de *Euphorbiaceae* contienen metabolitos importantes que inhiben eficazmente a enzimas como  $\alpha$ -glucosidasas y PTP-1B (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Composición química y efecto antidiabético de especies de Euphorbiaceae.

Especie	Extracto	Parte utilizada	Efecto	Metabolitos aislados	Fuente
<i>Euphorbia hirta</i>	Metanólico	Flores	Disminución de glucosa sérica en ratones (Dosis: 250 y 500 mg/Kg). Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas (75.18%, IC50: 78.88 $\mu$ g/mL)	Flavonoides Glicósidos Esteroides Taninos Alcaloides	(Kumar, <i>et al.</i> , 2010 y Sheliya, <i>et al.</i> , 2016)
<i>Euphorbia thymifolia</i>	Metanólico	Planta completa	Disminución de glucosa sérica en ratones (Dosis: 300 mg/Kg). Afinidad de compuestos sobre PTP-1B.	Kaempferol Quercetina Quercetina 3-glicósido Cosmosiin $\beta$ -sitosterol Estigmasterol	(Nguyen, <i>et al.</i> , 2016)
<i>Macaranga adenatha</i>	Metanólico	Planta completa	Inhibición de PTP-1B	Ácido oleanólico Ácido 3 $\beta$ , 28, dihidroxi-12-en-olean, maslínico Ácido 3 $\beta$ -O-acetil aleuritólico	(Subramoniam, 2016)
<i>Macaranga tanarius</i>	AcOEt		Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas	Taninos	(Subramoniam, 2016)
<i>Euphorbia fischeriana</i>	Metanólico	Raíces	Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas	Diterpenoides	(Yun, Long, <i>et al.</i> , 2017)

## 2.8. Género *Croton*.

El género *Croton* pertenece a la familia Euphorbiaceae, dentro de la tribu *Crotoneae*, comprende alrededor de 1,300 especies de árboles, hierbas y arbustos, distribuidas en regiones tropicales y subtropicales. Estas especies se caracterizan por tener flores estaminadas con filamentos inflexos en el brote, y flores pistiladas con pétalos generalmente reducidos, algunas son aromáticas, lo que indica la presencia de constituyentes volátiles (Salatino, *et al.*, 2007).

Este género es rico en metabolitos con actividades biológicas importantes, principalmente diterpenoides, como ésteres de forbol, clerodanos, labdanos, kauranos, traquilobanos, primaranos, etc., así como flavonoides. Dentro de la medicina tradicional, este género es ampliamente utilizado para el tratamiento de problemas digestivos, constipación, disentería, inflamación, problemas intestinales, malaria, úlceras, fiebre, hipercolesterolemia, hipertensión, cáncer y diabetes.

En este sentido, han surgido varias investigaciones encaminadas a la caracterización farmacológica de especies de este género, así como al aislamiento e identificación de los metabolitos biológicamente activos. Es importante resaltar que, debido a su uso como antidiabético, algunas de estas investigaciones corresponden a estudios fitoquímicos biodirigidos sobre su actividad antidiabética mediante diferentes mecanismos (Tabla 3).

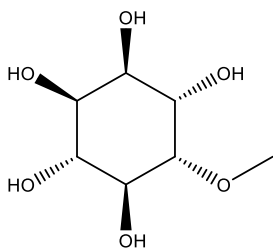
**Tabla 3.** Composición química y efecto antidiabético de algunas especies de *Croton*.

Especie	Extracto	Parte utilizada	Efecto	Metabolitos aislados	Fuente
<i>C. cajucara</i>	Metanólico y acuoso	Tallo Hojas	Disminución de glucosa sérica en ratas Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas	Terpenos Ácido acetylauritólico Trans-dehidrocrotonina Flavonoides Cumarinas Alcaloides	(Campos, et al., 2010 y Ramos-Rodrigues, et al., 2012)
<i>C. lobatus</i>	Metanólico	Hojas	Restauración de lesiones de células pancreáticas Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas y $\alpha$ -amilasas	Flavonoides Alcaloides Diterpenoides Fenilbutanoides	(Fasola, et al., 2016)
<i>C. heterodoxus</i>	Extractos de Hexano, AcOEt y residuo acuoso obtenidos por bipartición del extracto hidroalcohólico	Partes aéreas	Disminución de glucosa sérica en ratas Aumento en la secreción de insulina	Triterpenos	(Gomes-Castro, et al., 2015 y Da Luz, et al., 2016)
<i>C. bonplandianum</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Metanólico Etanólico	Hojas	Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas y $\alpha$ -amilasas	Taninos Fenoles Flavonoides	(Keertana, et al., 2013 y Qaisar, et al., 2014)
<i>C. macrostachyus</i>	Acuoso	Hojas	Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas	Taninos Flavonoides Saponinas Alcaloides Antraquinonas	(Arika, et al., 2015)

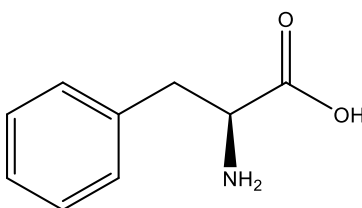
## 2.9. *Croton ehrenbergii*.

La especie *C. ehrenbergii*, perteneciente a la familia Euphorbiaceae, es un arbusto con flores blancas que mide aproximadamente 1.5 m, y se caracteriza por poseer un mecanismo de defensa innato contra predadores, el cual le permite crecer intacto en su hábitat (Ríos, *et al.*, 2019).

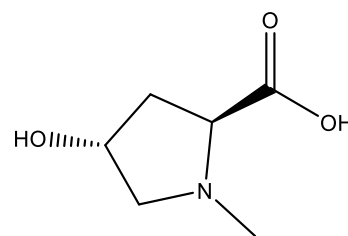
*C. ehrenbergii* a diferencia de otras especies de *Croton* o de la familia Euphorbiaceae no cuenta con muchos reportes fitoquímicos o de actividad biológica, sin embargo, recientemente, Ríos, *et al.*, 2019 demostraron que esta especie posee una importante actividad fitotóxica y nematocida al evaluarse en semillas de *Latuca sativa* (dicotiledónea) y *Lolium perenne* (monocotiledónea). Además, aislaron e identificaron los metabolitos 1-quebrachitol (20), fenilalanina (21), *trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (21), así como los flavonoides kaempferol (22), tilirósido (23), rutina (24) y nicotiflorina (25) y otros metabolitos minoritarios, los cuales poseen importantes actividades biológicas, como antidiabéticos, antifúngicos y bactericidas.



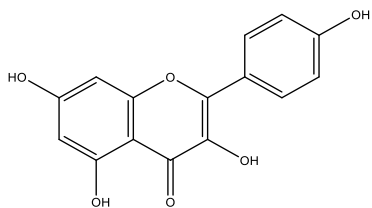
(20)



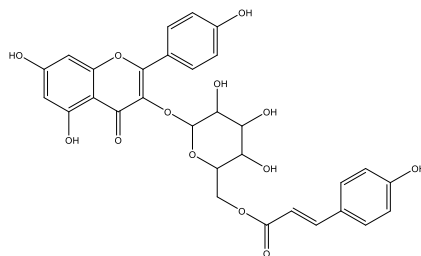
(21)



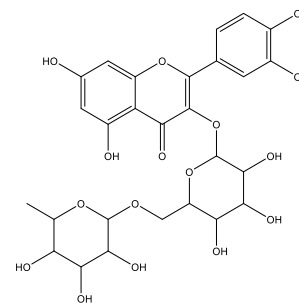
(22)



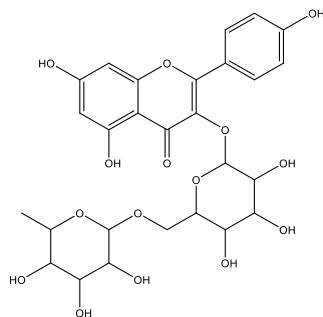
(23)



(24)



(25)



(26)

**Figura 6.** Estructuras de los metabolitos identificados en la especie *Croton ehrenbergii*.



# JUSTIFICACIÓN



### 3. JUSTIFICACIÓN.

La diabetes es un problema de salud pública debido a su alta prevalencia a nivel mundial; actualmente existen múltiples opciones farmacológicas para su tratamiento, sin embargo, diversos estudios han demostrado que la mayoría de los agentes antidiabéticos actuales ocasionan efectos adversos como insuficiencia cardiaca o cuadros hipoglucémicos severos, además, al ser una enfermedad crónica, el tratamiento farmacológico se administra durante largos periodos de tiempo, ocasionando tolerancia en los pacientes (Stein, *et al.*, 2013). Por lo anterior, se considera necesario buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad, incluyendo la búsqueda de potenciales fármacos aislados a partir de fuentes naturales, principalmente de plantas medicinales.

Diversas especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, como *Euphorbia thymipholia* y *Macaranga adenatha*, así como especies del género *Croton*, como *C. cajucara*, *C. lobatus*, *C. bonplandianum* y *C. macrostachyus*, han mostrado un importante efecto antidiabético mediante la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas y PTP-1B, el cual ha sido atribuido a compuestos de tipo alcaloide, diterpenos y flavonoides.

Sin embargo, existen especies de este mismo género que no cuentan con reportes científicos sobre su actividad antidiabética y la seguridad de su uso. Este es el caso de *C. ehrenbergii*, por lo que es importante realizar investigaciones que conduzcan a determinar su contenido metabólico, su actividad antidiabética y su uso seguro.



# HIPÓTESIS



#### **4. HIPÓTESIS.**

El contenido metabólico del extracto hidroalcohólico de *C. ehrenbergii* presentará efecto antidiabético mediante la inhibición de enzimas blanco en el desarrollo de la enfermedad, además, presentará una baja toxicidad al ser administrado por vía oral.



# OBJETIVOS



## 5. OBJETIVOS.

### 5.1. Objetivo General.

- ❖ Determinar el efecto antidiabético, la toxicidad y el contenido metabólico de *C. ehrenbergii*.

### 5.2. Objetivos Particulares.

- ❖ Aislar a través de técnicas cromatográficas convencionales los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *C. ehrenbergii*.
- ❖ Determinar la estructura química de los metabolitos aislados, a través de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- ❖ Evaluar la actividad inhibitoria de *C. ehrenbergii* sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales.
- ❖ Evaluar la actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B de los compuestos que se obtengan del extracto hidroalcohólico de *C. ehrenbergii*.
- ❖ Evaluar la toxicidad oral aguda del extracto hidroalcohólico de *C. ehrenbergii*.



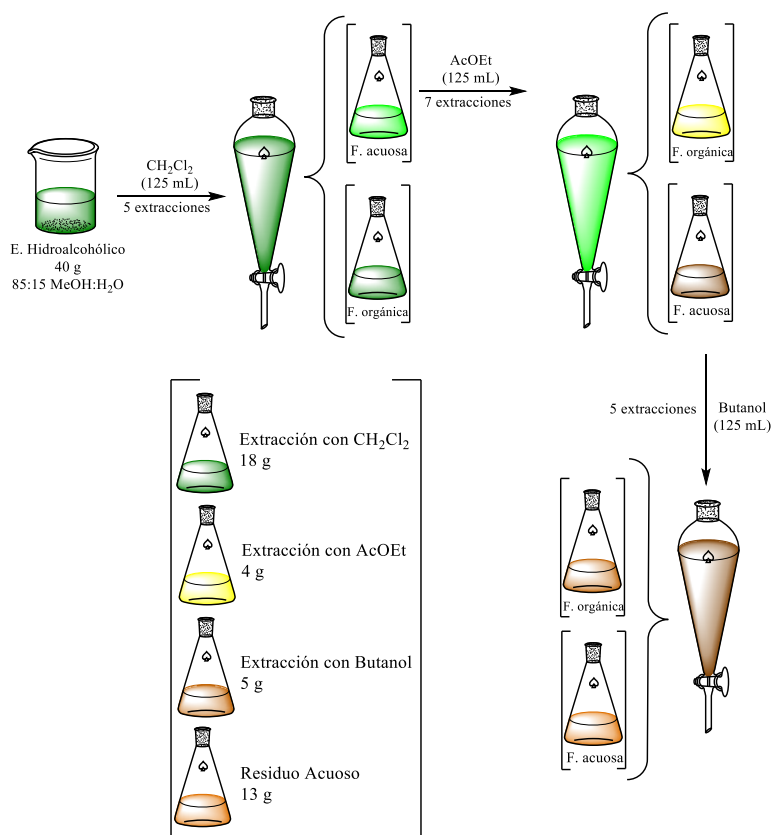
**MATERIALES Y MÉTODOS**



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. Obtención del Material Vegetal.

La especie *C. ehrenbergii* fue recolectada el 24 de agosto de 2014 en el Km 107 de la carretera Peña Blanca-Pinal de Amoles, Querétaro, por el M. en C. Ramiro Ríos Gómez. Sus partes aéreas se secaron con nitrógeno líquido y posteriormente fueron trituradas. Se llevó a cabo una maceración utilizando una mezcla hidroalcohólica al 85%. Posteriormente, con la finalidad de separar los compuestos por gradiente de polaridad, se realizó un fraccionamiento por par de disolvente a partir de 40 g del extracto hidroalcohólico, empleando disolventes en orden ascendente de polaridad. De este fraccionamiento, se obtuvieron las fracciones de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt y butanol, así como el residuo acuoso (**Imagen 12**).



**Imagen 12.** Fraccionamiento del extracto hidroalcohólico.

## 6.2. Metodología General.

La metodología general para el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones obtenidas de la bipartición del extracto hidroalcohólico de *C. ehrenbergii* se realizó mediante técnicas cromatográficas convencionales, como Cromatografía en Columna Abierta (CCA) y Cromatografía Flash (CF), utilizando como fase estacionaria gel de sílice 60 (70:230) con un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, así como sílice flash (200:400), y como fase móvil, mezclas de disolventes en orden ascendente de polaridad; el proceso fue monitoreado mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF), utilizando cromatoplasmas base de aluminio kieselgel 60 F<sub>264</sub> como fase estacionaria. Las cromatoplasmas se observaron bajo luz UV a longitud de onda corta y larga y, posteriormente se revelaron con sulfato cérico amoniacal al 2% en ácido sulfúrico 2N.

La purificación de los compuestos se llevó a cabo mediante diferentes técnicas, como precipitación y recristalización. Los compuestos puros se prepararon para ser analizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. La determinación estructural de los metabolitos aislados se llevó a cabo a partir del análisis de los datos obtenidos por medio de los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno (RMN-<sup>1</sup>H) y de carbono trece (RMN-<sup>13</sup>C), en el equipo Varian Mercury 200 MHz para RMN-<sup>1</sup>H y 50 MHz para RMN-<sup>13</sup>C, así como mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-ES), empleando una columna HP5MS 30 mm x 0.225 mm x 0.25 μm y helio como gas acarreador, en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies, modelo 6890 plus, acoplado a un espectrómetro de masas 5973N. Los resultados obtenidos fueron comparados con datos de fuentes bibliográficas.

### 6.3. Obtención de los metabolitos secundarios de la fracción de AcOEt.

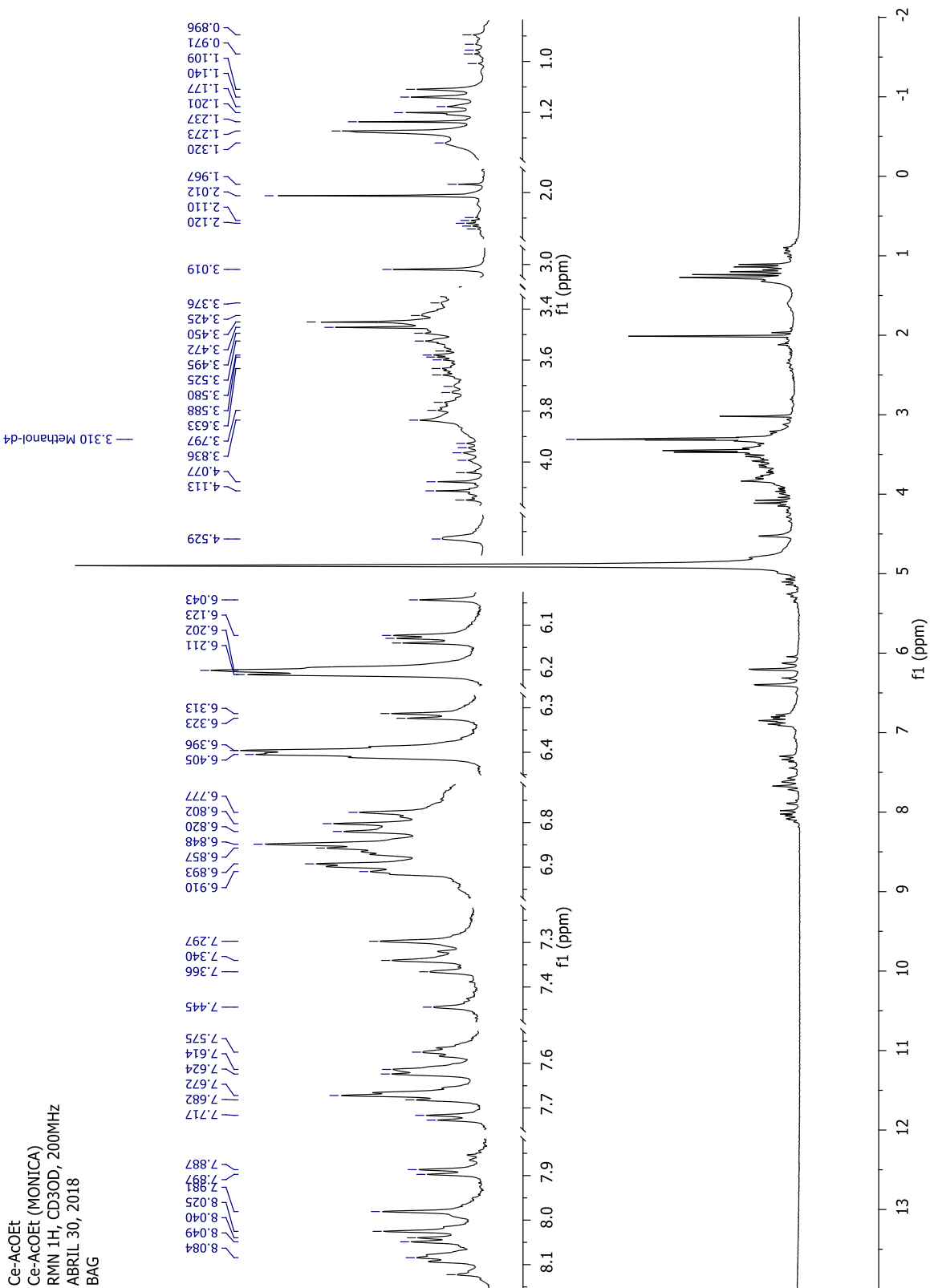
La fracción de AcOEt, obtenida de la bipartición del extracto hidroalcohólico, fue identificada con la clave *CeAcOEt*, para obtención de experimentos de RMN. En el espectro (Espectro 1), se identificaron señales características de sistemas aromáticos, así como señales características de protones de glicósidos, lo que permitió sugerir que esta fracción contenía flavonoides, por lo cual se decidió iniciar un proceso cromatográfico de esta fracción.

Para separar los compuestos presentes en la fracción de AcOEt, se pesaron 3 g de la muestra, mismos que se adsorbieron en 3 g de gel de sílice. Se utilizó una columna de 50 mm de diámetro, la cual fue empacada con 7” de gel de sílice. El proceso cromatográfico se inició con un sistema de 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como fase móvil e incrementando la polaridad con la adición de MeOH. De este proceso cromatográfico se obtuvieron 108 fracciones, las cuales fueron agrupadas por su similitud observada en CCF (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Proceso cromatográfico de la fracción de AcOEt.

Grupo	Polaridad	Fracciones	Reuniones
<b>A</b>	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1-11	1-4, 5, 6-8
<b>B</b>	98:2 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	12-17	9-27
<b>C</b>	95:5 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	18-25	28-32
<b>D</b>	90:10 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	26-33	33
<b>E</b>	80:20 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	34-50	34, 35, 36-38, 39-47
<b>F</b>	75:25 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	51-65	48-50, 51-59, 60-68
<b>G</b>	70:30 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	66-79	69-79
<b>H</b>	50:50 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	80-95	80-90
<b>I</b>	100% MeOH	96-108	91-108

Durante el proceso cromatográfico, se obtuvo un sólido amarillo en las fracciones de los grupos D y E, siendo más abundante en la fracción 34. Mediante CCF, se determinó que el compuesto se encontraba puro, por lo que se identificó con la clave *CeAcOEt-01* y se preparó para su análisis mediante RMN.



**Espectro 1.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, 200 MHz, CD<sub>3</sub>OD del extracto de AcOEt.

Por otro lado, en las fracciones del grupo E, principalmente en las fracciones 39-47, se formó un precipitado de color café, y en CCF, se observaron manchas diferentes, sugiriendo que el compuesto no se encontraba puro, por lo que, para aislar e identificar a los principales metabolitos de estas fracciones, se decidió iniciar un proceso cromatográfico secundario (ver sección 6.3.1).

Asimismo, en algunas fracciones 51-59 del grupo F, se obtuvo un sólido de color café, y al realizar CCF, se observó que presentaban dos manchas diferentes. Sin embargo, estas fracciones fueron reunidas y preparadas para su análisis mediante técnicas espectroscópicas, con la clave *CeAcOEt-02*.

### **6.3.1. Separación de los metabolitos secundarios de las fracciones 39-47 de la fracción de AcOEt.**

Mediante CCF, se observó que las fracciones 39-47 (Grupo E), presentaban tres manchas similares, una de ellas con una coloración amarilla, por lo que, para poder aislar e identificar estos compuestos, se agruparon para posteriormente, efectuar una recromatografía de estas fracciones.

El peso total de la muestra fue de 1.2 g, por lo que se utilizó una columna de 30 mm de diámetro, la cual se empacó con 7” de gel de sílice. La elución del proceso cromatográfico se inició con una polaridad de 100% AcOEt, incrementándola hasta llegar a 100% MeOH. De este proceso de recromatografía, se obtuvieron 210 fracciones, las cuales se agruparon de acuerdo con su similitud de elución en CCF (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Proceso cromatográfico de las fracciones 39-47 de la fracción de AcOEt.

Grupo	Polaridad	Fracciones	Reuniones
<b>A</b>	100% AcOEt	1-27	1-12, 13-17, 18-24, 25-32
<b>B</b>	98:2 AcOEt:MeOH	28-72	33-50, 51-58, 59-64, 65-70, 71-75
<b>C</b>	96:4 AcOEt:MeOH	73-118	76-77, 78-107, 108-127
<b>D</b>	94:6 AcOEt:MeOH	119-156	128-153, 154, 155-170
<b>E</b>	90:10 AcOEt:MeOH	157-191	171-190, 191-194
<b>F</b>	100% MeOH	192-210	195, 196-200, 201-210

Durante este proceso cromatográfico, se obtuvo un compuesto de interés en las fracciones del grupo C (78-107), las cuales fueron identificadas con la clave *CeAcOEt-03* para analizarlas mediante los experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Por otro lado, se observó un precipitado de color amarillo en las fracciones 25-70 de los grupos A y B, el cual fue parcialmente soluble en AcOEt y soluble en MeOH. En CCF se observaron varias manchas, sugiriendo que se trataba de una mezcla de compuestos, la cual no fue posible separar mediante precipitación, por lo que se procedió a realizar nuevamente una recromatografía de estas fracciones.

### 6.3.2. Separación de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones 25-70 de la fracción de AcOEt.

Las fracciones 25-70, obtenidas de la cromatografía de la fracción de AcOEt fueron reunidas para realizar una recromatografía. El peso total de la muestra fue de 340 mg. Se utilizó una columna de vidrio de 20 mm de diámetro, la cual fue empacada con 10 g de gel de sílice, previamente hidratado con AcOEt al 100%.

Posteriormente, se agregó la muestra adsorbida y se inició el proceso cromatográfico, iniciando con una polaridad de AcOEt 100%, e incrementando la polaridad con MeOH.

Se colectaron 140 fracciones de 10 mL, las cuales fueron agrupadas por su similitud en CCF (Tabla 6).

**Tabla 6.** Proceso cromatográfico de la reunión 25-70 de la fracción de AcOEt.

Grupo	Polaridad	Fracciones	Reuniones
<b>A</b>	100% AcOEt	1-32	1-6, 7-10, 11-32
<b>B</b>	98:2 AcOEt:MeOH	33-72	33-56, 57-69, 70, 71-77
<b>C</b>	95:5 AcOEt:MeOH	73-104	78-84, 85-131
<b>D</b>	90:10 AcOEt:MeOH	105-115	
<b>E</b>	85:15 AcOEt:MeOH	116-131	
<b>F</b>	100% MeOH	132-140	132-140

Al reunir las fracciones del Grupo A (1-6 y 7-10), se observó que no eran totalmente solubles en solo AcOEt, sino que eran solubles en una mezcla de disolventes, lo que condujo a sugerir que se trataba de una mezcla de compuestos por lo que, para tratar de purificarlos, se realizaron lavados con diferentes disolventes.

De este modo, se obtuvieron diferentes muestras de estas fracciones, acorde a la polaridad en la que resultaron solubles. Se realizó CCF de todas ellas y se observó que en la muestra correspondiente al lavado realizado con AcOEt, se encontraban metabolitos de interés, por lo que se preparó para ser analizada mediante experimentos de RMN, identificándola con la clave **BAG03-004**.

#### 6.4. Obtención de los metabolitos secundarios de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Para el aislamiento y caracterización de los metabolitos de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se llevó a cabo un fraccionamiento primario, para lo cual, se pesaron 15 g de la fracción. Esta cantidad de muestra fue adsorbida en gel de sílice y colocada en una columna cromatográfica de 40 mm de diámetro, previamente empacada con gel de sílice e hidratada con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

De este modo, se inició la elución del proceso cromatográfico, incrementando la polaridad con Acetona, obteniendo un total de 147 fracciones (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Proceso cromatográfico de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Grupo	Polaridad	Fracciones	Reuniones
<b>A</b>	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1-44	1, 2, 3-5, 11-16, 17-23, 24-31, 32-44
<b>B</b>	95:5 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona	45-55	45-48, 49-62
<b>C</b>	90:10 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona	56-67	63-69
<b>D</b>	80:20 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona	68-87	70-83, 84-87
<b>E</b>	70:30 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona	88-100	88-92, 93-106
<b>F</b>	60:40 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona	101-115	107-121
<b>G</b>	50:50 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona	116-125	122-125
<b>H</b>	100% Acetona	126-139	126-127, 128-138
<b>I</b>	100% MeOH	140-147	139-147

Al inicio del proceso cromatográfico, en la fracción 1 (Grupo A), se observó una coloración naranja muy intensa, y mediante CCF se observó una sola mancha, por lo que se pesaron 30 mg de esta fracción y se identificó con la clave *CeDC-01* para analizarla mediante CG-EM.

Por otro lado, al monitorear el proceso cromatográfico mediante CCF, se observó que las fracciones 3-5 del grupo A presentaban una mancha amarilla, sugiriendo la presencia de un compuesto de interés; adicionalmente, en la mayoría de las fracciones de este grupo, se formó un sólido en forma de cristales.

Por lo anterior, se decidió realizar recromatografías de algunas de estas fracciones, con la finalidad de separar e identificar sus constituyentes. Además, se observó que en las fracciones 11-16 se formaron cristales con forma de agujas, y mediante CCF se determinó que el contenido metabólico era diferente al de las fracciones 3-5, y que se encontraban mezclados diferentes metabolitos, por lo que, al igual que en las fracciones 3-5, se decidió realizar una recromatografía para tratar de separar los compuestos.

#### 6.4.1. Separación de los metabolitos secundarios de las fracciones 3-5 de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Las fracciones 3-5 fueron similares en CCF, caracterizándose por presentar una mancha amarilla; por lo que se agruparon para realizar una recromatografía y lograr aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes en ellas. El peso total de las fracciones fue de 2.032 g, los cuales fueron adsorbidos en gel de sílice. Se utilizó una columna de 30 mm de diámetro, empacada con 50 g de gel de sílice previamente hidratada con una mezcla de Hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en proporción 80:20 (Tabla 8).

**Tabla 8.** Proceso cromatográfico de las fracciones 3-5 de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Grupo	Polaridad	Fracciones	Reuniones
A	80:20 Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1-34	1, 2, 3, 4-8, 9-15, 16-20, 21-29, 30-31, 32-34
B	78:22 Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	35-65	35-42, 43-50, 51-59, 60-62, 63-66
C	76:24 Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	66-79	67-69, 70-72, 73, 74-78, 79-80
D	73:27 Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80-119	81-83, 84, 85-87, 91-98, 99-102, 103-109, 110-120
E	70:30 Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	120-136	121-126, 127-131, 132-135, 136-137
F	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	137-158	138-141, 142-148, 149-152, 153-157
G	100%Acetona	159-171	158-163, 164-167, 168-171

De este proceso cromatográfico, se obtuvieron 171 fracciones, de las cuales, las fracciones del grupo E, principalmente las fracciones 136-137, presentaron un compuesto de interés. Este compuesto fue visible en UV y tuvo una coloración naranja al revelar. El compuesto fue purificado por recristalización, y una vez puro, fue preparado e identificado con la clave *CeDC-11* para realizar análisis espectroscópicos.

Por otro lado, en las fracciones 1 y 2 se observó una coloración naranja intenso, sin embargo, no se formó algún precipitado, y en CCF se observaron varias manchas, por lo que estas fracciones fueron identificadas con las claves *CeDC-02* y *CeDC-03*, respectivamente, para determinar su composición química mediante CG-EM.

Adicionalmente, se observó en CCF que en las fracciones 80-102 de los Grupos C y D tenían un contenido similar, caracterizado por una mancha naranja, así como algunas manchas adicionales. Se observó que la mancha era más intensa en las fracciones 80-89, por lo que se seleccionó la más abundante (fracción 84) para analizar y determinar su contenido metabólico mediante CG-.EM, con la clave *CeDC-07*.

#### **6.4.2. Separación de los metabolitos secundarios de las fracciones 11-16 de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.**

Durante el proceso cromatográfico de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, las fracciones 11-16 del grupo A (**Tabla 7**), tuvieron una consistencia oleosa y una coloración café, en CCF, se observó que estas fracciones eran similares, presentando varias manchas visibles en UV, por lo que fueron agrupadas para aislar sus constituyentes químicos mediante CC.

El peso total de las fracciones fue de 2.481 g, los cuales fueron adsorbidos en gel de sílice. Para el proceso de recromatografía, se utilizó una columna de 40 mm de diámetro, misma que fue empacada con gel de sílice previamente suspendida en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 100%. De este modo, la elución del proceso se inició con una polaridad de 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se fue incrementando con acetona, obteniendo 43 fracciones (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Proceso cromatográfico de las reunión 11-16 de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Grupo	Polaridad	Fracciones	Reuniones
<b>A</b>	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1-18	1-3, 4, 5-8, 9-11, 12-17
<b>B</b>	98:2 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona	19-41	18-20, 21-22, 23-25, 26-30, 31-32, 33-36, 37-40
<b>C</b>	100% Acetona	42-43	41-43

Las fracciones del grupo A obtenidas en este proceso de cromatografía presentaron manchas de interés observadas en CCF, además, en las fracciones 12-17 se formó un sólido en forma de cristales; por lo que se decidió purificarlos mediante recristalización.

Posteriormente, el compuesto purificado fue identificado con la clave *CeDC-10* para realizar análisis espectroscópicos.

Adicionalmente, se identificaron manchas interesantes en las fracciones 1 y 7, del Grupo A, las cuales fueron identificadas con las claves *CeDC-04* y *CeDC-05* respectivamente, para analizarlas mediante CG-EM.

## 6.5. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción de Butanol.

### 6.5.1. Extracción en Fase Sólida.

Debido a la alta polaridad de esta fracción, se decidió iniciar su purificación realizando una extracción en fase sólida, utilizando un cartucho empacado con sílice C18 fase reversa, para lo cual 100 mg de muestra fueron disueltos en 3 mL de agua destilada. El cartucho fue hidratado con 10 mL de MeOH y, para equilibrar el sistema, se agregaron 10 mL de agua destilada; posteriormente se aplicó la solución de la muestra (Carga). Se trabajó con 6 sistemas de elución constituidos por agua y MeOH y finalmente se lavó con 20 mL de MeOH (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** Sistemas de elución empleados en la Extracción en Fase Sólida de la fracción de Butanol.

Eluato	Polaridad	Volumen
1	Carga	10 mL
2	98:2 H <sub>2</sub> O:MeOH	10 mL
3	95:5 H <sub>2</sub> O:MeOH	10 mL
4	90:10 H <sub>2</sub> O:MeOH	10 mL
5	80:20 H <sub>2</sub> O:MeOH	10 mL
6	70:30 H <sub>2</sub> O:MeOH	10 mL
7	50:50 H <sub>2</sub> O:MeOH	10 mL
8	100% MeOH	10 mL
9	100% MeOH	10 mL

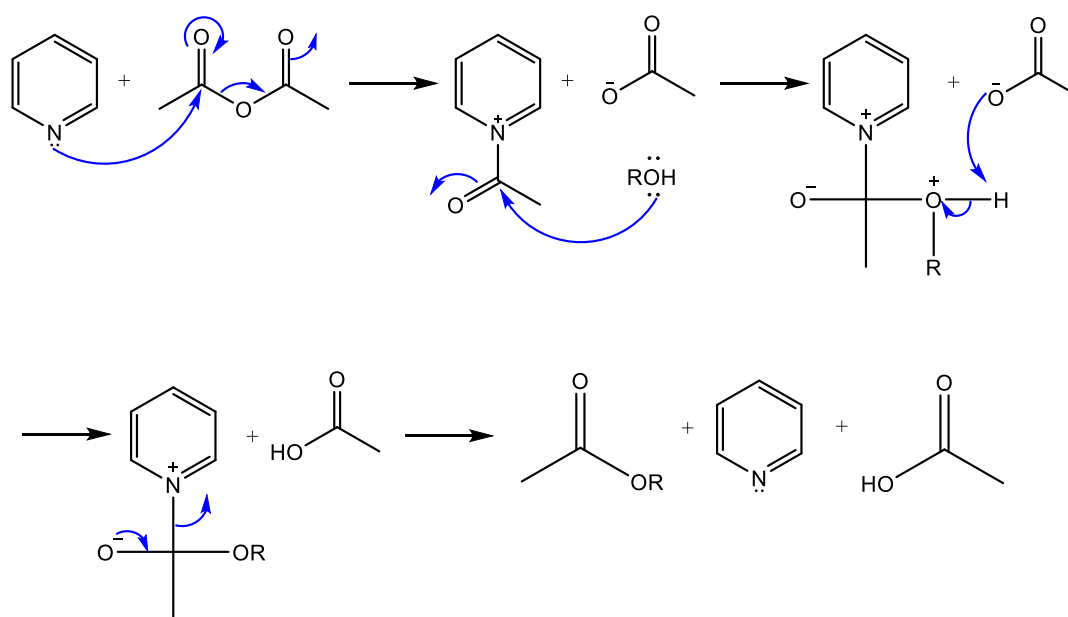
El proceso fue monitoreado mediante CCF, utilizando un sistema de elución 4:1:1 BuOH:H<sub>2</sub>O:Ácido Acético. De este modo, se identificaron compuestos de interés en las muestras 1 y 2, por lo que se analizaron mediante RMN, sin embargo, no fue posible identificar alguna estructura química; por lo que, para disminuir la polaridad de los compuestos y de este modo poder identificarlos mediante técnicas espectroscópicas, se decidió realizar una reacción de acetilación.

### 6.5.2. Reacción de acetilación.

Se pesó 1 g de la fracción de BuOH, posteriormente, se adicionaron 4 mL de anhídrido acético y se añadieron 6 gotas de piridina, como catalizador. La reacción fue puesta en agitación y monitoreada mediante CCF durante las primeras dos horas y posteriormente, cada 24 horas. Para eliminar el margen de error, se aplica vacío en la placa después de adsorber la muestra, para eliminar los residuos de piridina.

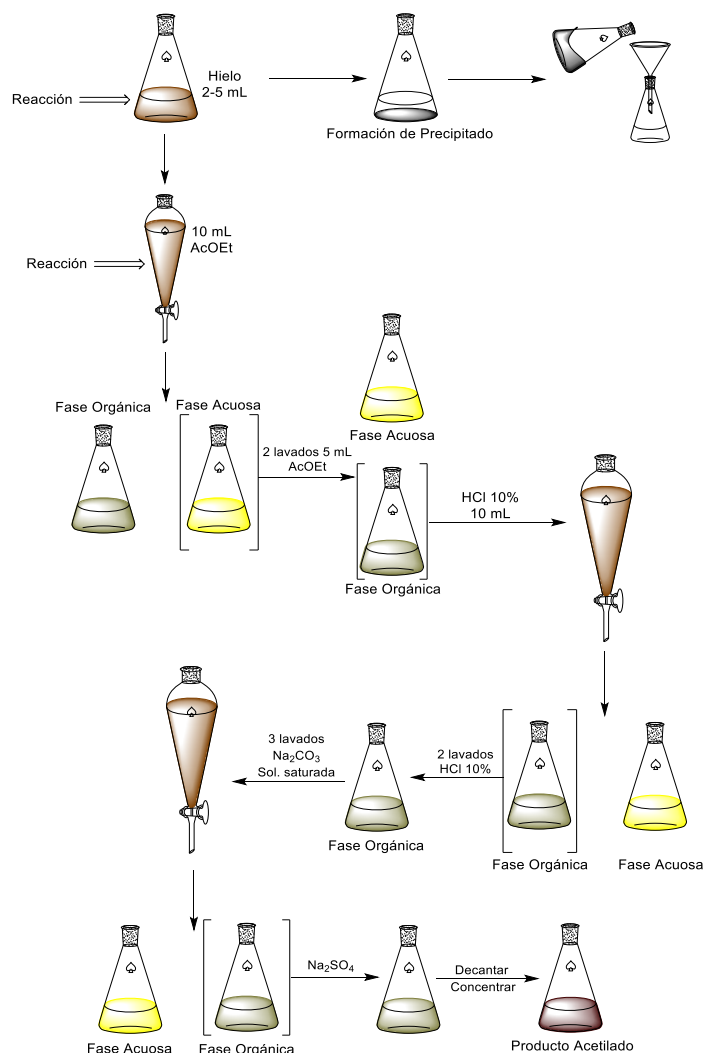
Durante una reacción de acetilación, los grupos OH de los compuestos son sustituidos por grupos acilo mediante una reacción nucleofílica. En este caso, al utilizar piridina como catalizador, ocurre una reacción entre esta y el anhídrido acético, que actúa como donante del grupo acilo, formando así un catión acilpiridinio.

Posteriormente, el OH del azúcar reacciona con el catalizador acilado para formar el correspondiente éster junto con el catalizador desactivado (protonado). (**Figura 7**) (**Xu, et al., 2005**). De este modo, se disminuye la polaridad del compuesto, facilitando su identificación mediante técnicas espectroscópicas.



**Figura 7.** Mecanismo de una reacción de acetilación.

Transcurridos 14 días de reacción, se observó en CCF una mancha diferente a la observada al inicio de la reacción, lo cual permitió sugerir que el compuesto se encontraba acetilado, por lo que se procedió a purificarlo. De manera inicial, al producto de reacción se le adicionaron 3 mL de hielo, y se esperaron algunos segundos hasta observar la formación de un precipitado. Posteriormente, se eliminó el exceso de disolvente de reacción mediante filtración al vacío. Adicionalmente, al disolvente recuperado se le realizaron extracciones líquido-líquido, como se describe en la **Imagen 13**, para recuperar y purificar la mayor cantidad posible del producto acetilado.



**Imagen 13.** Metodología para la recuperación del producto acetilado.

Debido a que el producto de esta reacción se encuentra acetilado, para recuperarlo se inició una extracción con AcOEt (10 mL), recuperando la fase orgánica. A la fase acuosa se le realizaron dos extracciones más con AcOEt (5 mL), recuperando también la fase orgánica. A continuación, las fases orgánicas fueron reunidas y posteriormente se efectuaron lavados primero con HCl al 10% y posteriormente con una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para eliminar los residuos del catalizador. Finalmente, al producto recuperado se le adicionó cantidad suficiente de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro para eliminar la humedad. El producto de la reacción fue recuperado por decantación, eliminando el exceso de disolvente por destilación a presión reducida.

De este modo, a partir de esta reacción, se obtuvieron dos productos diferentes, el precipitado y el recuperado mediante extracciones. Al realizar CCF, se observó que su contenido era diferente. En el producto recuperado mediante extracciones, se observaron al menos tres manchas diferentes, mientras que el precipitado contenía seis manchas; por lo que el primero fue identificado con la clave **BAG03-005**, para su posterior análisis mediante experimentos de RMN. Sin embargo, al realizar el análisis no fue posible elucidar la estructura de algún compuesto, debido a que únicamente se observaron señales indefinidas en un rango de 1 a 5 ppm. Por otro lado, en CCF se observaron diferentes manchas amarillas en el producto que precipitó, sugiriendo la posible presencia de flavonoides, por lo que se decidió iniciar un proceso cromatográfico, esperando de esta forma, aislar los metabolitos y facilitar la elucidación estructural.

### 6.5.3. Separación de los metabolitos del producto acetilado precipitado.

Se utilizó una columna de 30 mm de diámetro, la cual fue empacada con 8” de gel de sílice, previamente suspendida en una mezcla 60:40 Hexano:AcOEt. La muestra fue adsorbida y posteriormente se colocó en la columna. El proceso cromatográfico fue iniciado con el sistema de elución mencionado, colectando eluatos de 20 mL. Se obtuvo un total de 147 fracciones, las cuales fueron agrupadas de acuerdo con lo observado en CCF (**Tabla 11**).

**Tabla 11.** Proceso cromatográfico del producto acetilado precipitado.

Grupo	Polaridad	Fracciones	Reuniones
<b>A</b>	60:40 Hexano:AcOEt	1-20	1-4, 5-9, 10-16, 17-18, 19-29
<b>B</b>	58-42 Hexano:AcOEt	21-103	30-36, 37-43, 44-60, 61-82, 83-103
<b>C</b>	55:45 Hexano:AcOEt	104-119	104-147
<b>D</b>	50:50 Hexano:AcOEt	120-130	
<b>E</b>	100% AcOEt	131-147	

En CCF se observó un compuesto de interés en las fracciones 5-9 y 19-29 del Grupo A, que de acuerdo con lo observado en CCF, se trataba de compuestos puros, por lo que fueron identificados con las claves **BAG03-007** y **BAG03-008**, respectivamente, para posteriores experimentos de RMN que permitirían la identificación del compuesto, sin embargo, al observar las señales, no fue posible determinar la estructura de los compuestos, debido a que estas señales no estaban bien definidas y únicamente aparecían en los rangos de 1 a 5 ppm, por lo que posteriormente se analizaron mediante CG-ES.

#### **6.6. Identificación de los metabolitos secundarios presentes en el residuo acuoso.**

Debido a la alta polaridad del residuo acuoso, se decidió iniciar una reacción de acetilación, siguiendo la metodología previamente descrita para la fracción de BuOH. Se colocó 1 g del residuo acuoso, adicionando esta vez 5 mL de anhídrido acético y 5 gotas de piridina. Transcurridas dos semanas de reacción, se confirmó por CCF la formación del producto acetilado, el cual fue recuperado realizando el procedimiento planteado anteriormente.

Al igual que en el caso de la fracción de BuOH, al adicionar el hielo, se formó un precipitado, el cual fue reservado, y al disolvente restante se le efectuaron extracciones líquido-líquido.

Se realizó CCF de ambos productos, observando algunas diferencias, por lo que ambos fueron analizados mediante CG-EM, con las claves **BAG03-011** (producto precipitado) y **BAG03-012** (producto recuperado con extracciones).

## 6.7. Determinación de la actividad antihiper glucemiante.

### 6.7.1. Evaluación *in vitro* sobre la actividad de las enzimas $\alpha$ -glucosidasas intestinales.

Para determinar si el extracto hidroalcohólico de *C. ehrenbergii* y sus fracciones obtenidas por bipartición poseen actividad antihiper glucemiante mediante la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales, se realizó un modelo *in vitro*.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical; posteriormente se realizó una incisión abdominal, se removió cuidadosamente el intestino delgado y se lavó varias veces con una solución de NaCl al 0.9% en una solución tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7.0) y ampicilina (1 mg/mL), posteriormente, se aisló el tejido adiposo, y al tejido libre de grasa se le realizó un corte longitudinal.

A continuación, sobre una superficie de cristal, en un baño de hielo, se raspó el intestino para lograr obtener la mucosa intestinal. El material obtenido fue homogeneizado y almacenado en criotubos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para medir la actividad enzimática se utilizó almidón de maíz como sustrato (12.5 mg/mL) en una solución tampón de fosfatos 10 mM (pH 7.0). De este modo, se efectuaron reacciones por cuadruplicado, adicionando 100  $\mu\text{L}$  de sustrato, 60  $\mu\text{L}$  de la solución tampón y 25  $\mu\text{L}$  de las muestras de prueba; las reacciones fueron iniciadas con la adición de 50  $\mu\text{L}$  de enzima (solución de mucosa intestinal), incubando cada tubo en un termoblock a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos a 450 rpm. Las reacciones se detuvieron con la adición de 2  $\mu\text{L}$  de acarbosa y se colocaron inmediatamente en un baño de hielo. La determinación de glucosa liberada fue cuantificada mediante un kit comercial de glucosa oxidasa (GOD-POD, SpinReact), siguiendo las indicaciones del fabricante (relación 1:100 muestra/reactivo; 250  $\mu\text{L}$  de volumen final), en microplacas de 96 pozos, midiendo su absorbancia a 505 nm en un lector de microplacas genérico.

### 6.7.2. Curva de Tolerancia a Sacarosa.

Se utilizaron ratones normoglucémicos, los cuales fueron separados en siete grupos de estudio, cada uno conformado por 6 ratones. El grupo 1 corresponde al control negativo, el grupo 2 al control positivo, y los grupos 3-7 a los grupos de prueba. Previo al inicio del experimento, los animales fueron puestos en ayuno durante 14 horas, con acceso libre al agua; al término de este tiempo, se tomaron muestras de sangre de la vena caudal para medir la glucosa basal, utilizando un glucómetro comercial *AccuChek Performa*.

Posteriormente, se administraron por vía intragástrica, las muestras de prueba, así como el fármaco de referencia (acarbose), y el vehículo. Treinta minutos después, se administró una carga oral de sacarosa (2 g/Kg), y se tomaron muestras de sangre a las 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas después de esta administración para medir la glucosa plasmática.

El porcentaje de variación de glucemia fue calculado con relación a los valores de glucosa basal, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% VG = \frac{Glu_x - Glu_0}{Glu_0} \times 100$$

En donde  $Glu_0$  corresponde a los valores de glucosa basal, mientras que  $Glu_x$  corresponde a los valores de glucosa en cada uno de los tiempos.

## 6.8. Evaluación de la actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B.

### 6.8.1. Evaluación *in vitro*.

Se evaluó la actividad inhibitoria del extracto hidroalcohólico, así como de sus fracciones obtenidas por bipartición y los metabolitos secundarios mayoritarios aislados de ellas, sobre la actividad de la enzima PTP-1B mediante un ensayo colorimétrico no radioactivo en una microplaca de 96 pozos, utilizando un kit comercial.

Debido a que la principal función de la enzima PTP-1B es desfosforilar al receptor de insulina o a sus sustratos, el ensayo se basa en determinar la cantidad de fosfato liberado durante la reacción entre la enzima y el sustrato en presencia de algún inhibidor. Por lo anterior, para poder establecer la concentración de fosfato inorgánico liberado se realizó una curva estándar de fosfatos. Se establecieron diferentes concentraciones de fosfato inorgánico (0, 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 nmol), colocando diferentes cantidades del estándar de fosfatos y buffer de ensayo (pH 6.04), teniendo un volumen final de 100  $\mu$ L en cada pozo.

Por otro lado, con la finalidad de evaluar el progreso de la reacción enzimática, se realizó un ensayo de curso de tiempo, designando diferentes tiempos de reacción (0, 5, 10, 20 y 30 min).

Finalmente, para evaluar la actividad inhibitoria de las muestras de prueba, se empleó la enzima humana recombinante PTP-1B (residuos 1-322), con un peso molecular de 37.4 kDa, expresada en *E. coli* y como sustrato, el receptor de insulina 5  $\beta$  (IR5 $\beta$ , residuos 1142-1153, pTyr-1158).

La detección de fosfato liberado se llevó a cabo mediante una reacción similar a la del ensayo clásico de verde de Malaquita, el cual se basa en la reducción de fosfomolibdato a azul de molibdeno, resultando en la formación de un complejo colorido con una banda intensa de absorbancia entre 620-650 nm (**Baykov, et al., 1987** y **Geladopoulos, et al., 1991**).

El extracto hidroalcohólico y sus fracciones fueron evaluados a una concentración exploratoria de 300  $\mu$ g/mL, mientras que los compuestos fueron evaluados a una concentración de 100  $\mu$ M, disueltos en el buffer de ensayo incluido en el kit comercial.

### 6.8.2. Estudio de acoplamiento molecular.

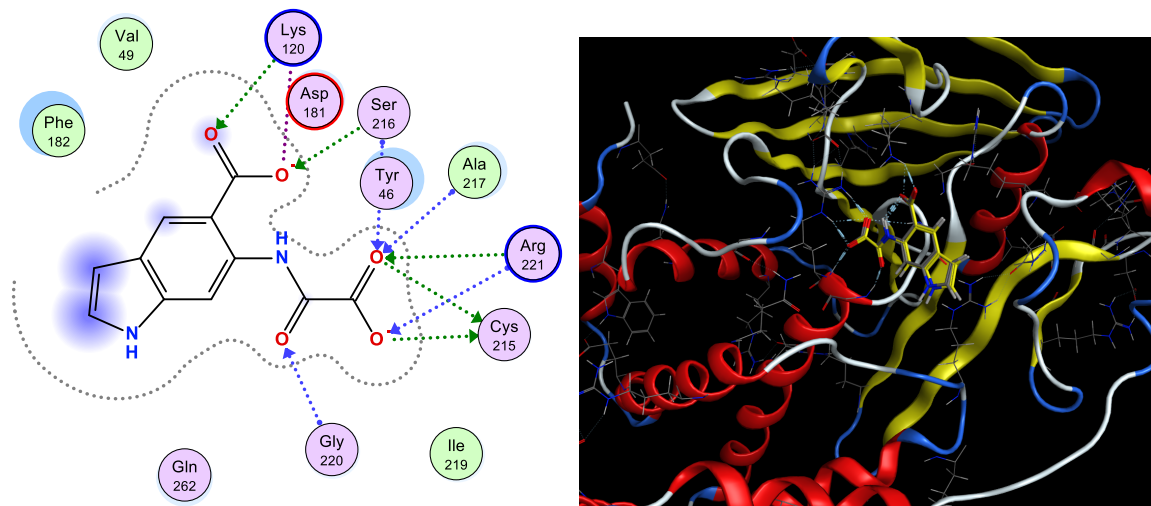
Todos los cálculos *in silico* se realizaron utilizando el programa Molecular Operating Environment (MOE), versión 2018.01. Se seleccionó la estructura cristalográfica de la PTP-1B en complejo con el ácido 6-(oxalil-amino)1*H*-indol-5-carboxílico (1C83) con una resolución de 1.8 Å, obtenida del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). Se eliminaron todas las moléculas de agua; los átomos de hidrógeno y las cargas fueron ajustadas con el campo de fuerza MMFF94 de la suite MOE (Chemical Computing Group Inc. <http://www.chemcomp.com>). Las estructuras 3D fueron construidas y minimizadas en MOE, utilizando el mismo campo de fuerza previamente mencionado. El acoplamiento molecular se realizó considerando todos los residuos dentro de una esfera de 4.5 Å centrada en los átomos de ligando cocrystalizados.

Como función de colocación se seleccionó el Alpha Triangle y los scores fueron calculados con la función Affinity DG, la cual mide la contribución entálpica a la energía libre de unión (MOE), en concordancia con un procedimiento de validación, la misma pose del ligando cocrystalizado en la estructura cristalina (RMSD= 0.843 Å) y un score de -7.455 Kcal/mol.

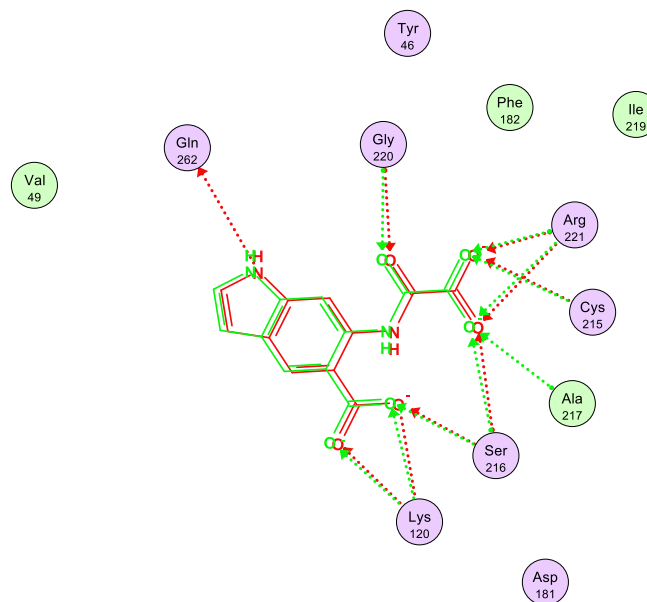
Para cada ligando se generaron diez conformaciones, y se seleccionó la conformación más alta de acuerdo con el score del acoplamiento para estudios posteriores.

Después del acoplamiento molecular, se analizaron los mejores poses calculados y las representaciones gráficas fueron desarrolladas por Surface Maps, y Ligand Interaction, de los softwares MOE y Pymol.

El ligando co-cristalizado muestra diversas interacciones con PTP-1B, principalmente mediante fuerzas electrostáticas entre el grupo carboxilato y Arg221, Lys120, así como puentes de hidrógeno con Ala217, Cys216, Tyr46 y Asp181. Además, el grupo amida muestra interacciones polares con Gly220 (**Figuras 8 y 9**).



**Figura 8.** Mapa de interacciones 2D y 3D de la validación del acoplamiento de PTP-1B co-cristalizada con el ácido 6-(oxalil-amino)1H-indol-5-carboxílico (1C83). RMSD= 0.843 Å. Score:-7.455 Kcal/mol.



**Figura 9.** Superposición del ligando co-cristalizado y su posición de acoplamiento validada. Rojo: co-cristalizado, Verde: validación. RMSD= 0.843 Å.

### 6.9. Evaluación de la Toxicidad Oral Aguda.

Con la finalidad de determinar la seguridad en el uso del extracto hidroalcohólico de *C. ehrenbergii*, se realizó un estudio *in vivo* de toxicidad oral aguda, siguiendo las especificaciones descritas en la guía 420 de la OECD, la cual proporciona información sobre las propiedades peligrosas de una sustancia y permite clasificarla de acuerdo con el Sistema Globalmente Armonizado (GHS) para la clasificación de productos químicos que causan toxicidad aguda.

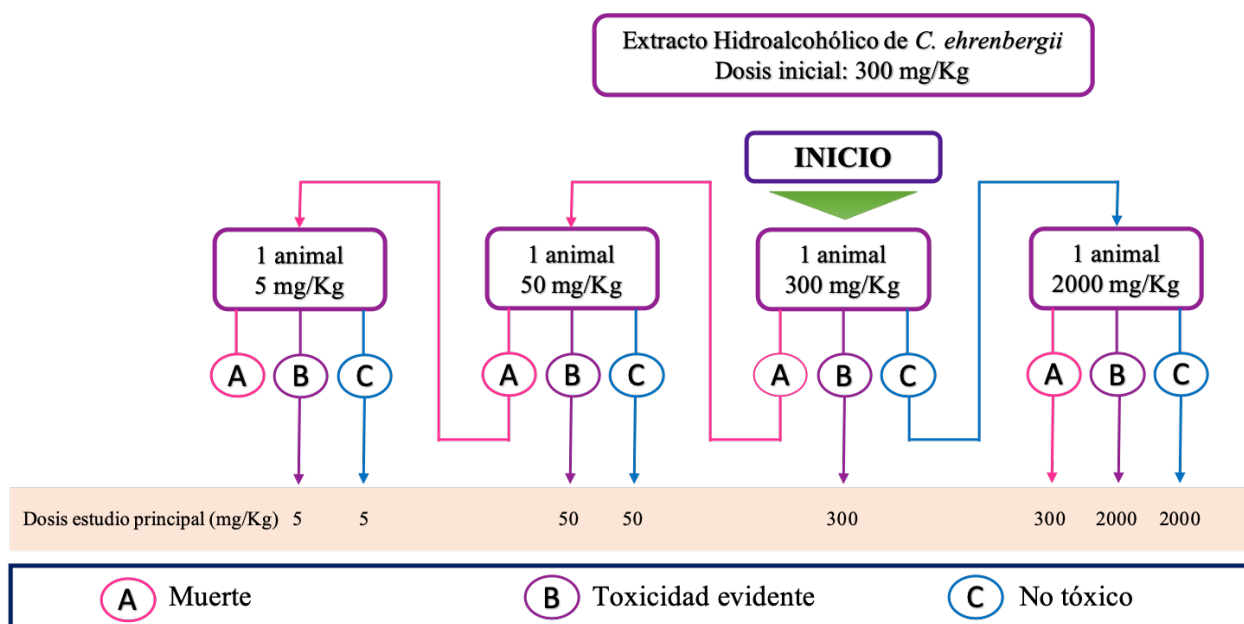
El estudio se divide en dos etapas, la primera es un estudio de observación, cuyo principal objetivo es la adecuada selección de la dosis de extracto o sustancia de prueba con base en los signos de toxicidad observados en un solo animal administrado, para posteriormente realizar la segunda etapa, que es el estudio principal, en donde la sustancia de prueba es administrada a una dosis previamente establecida en la primera etapa, en cinco animales diferentes. Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1, con pesos aproximados de 20-30 g.

Previo al inicio del ensayo, los animales fueron puestos en ayuno por 4 horas, con acceso libre al agua, tal y como lo indica la guía 420 de la OECD.

Para el estudio de observación, se utilizaron dos animales, de los cuales, uno fue administrado con la dosis exploratoria de 300 mg/Kg del extracto hidroalcohólico (dosis seleccionada debido a la ausencia de datos reportados sobre la toxicidad de la especie), mientras que el otro fue administrado únicamente con vehículo, siendo en este caso, tween 20 al 10%.

Los animales son observados durante los primeros 30 minutos después de la administración del extracto, y periódicamente las primeras 24 horas con especial atención en las primeras 4, y diariamente por 14 días, reportando algún signo evidente de toxicidad, como cambios en el comportamiento, salivación, piloerección, cambios en la respiración, ojos, mucosas y actividad somatomotora.

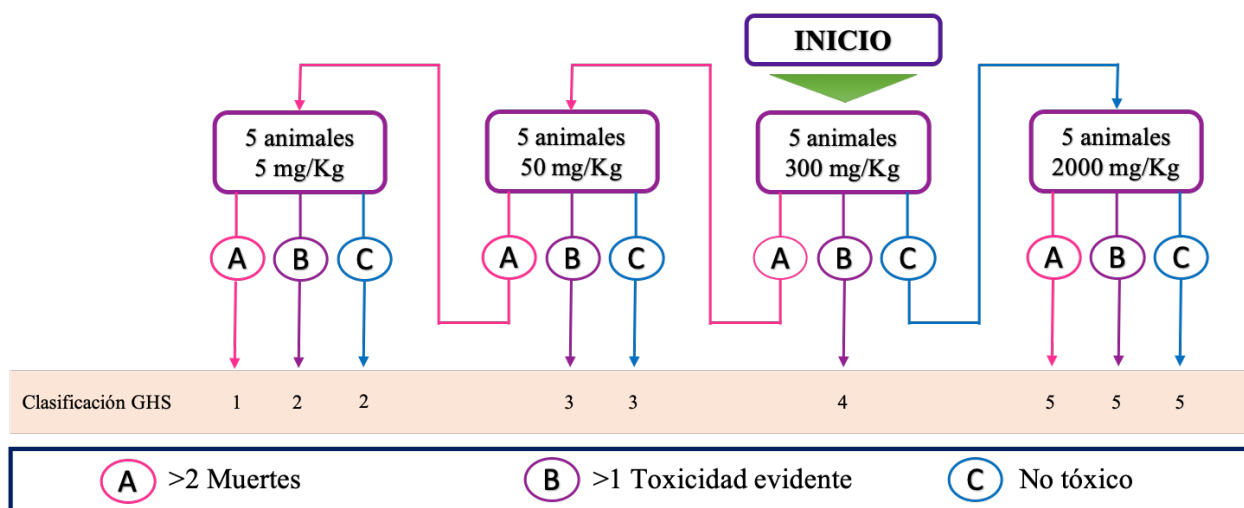
Al término de este periodo, si no se observan signos de toxicidad, se realiza la segunda parte del estudio de observación, que consiste en administrar a un segundo animal, una dosis de 2000 mg/Kg del extracto hidroalcohólico; o bien, en caso de observar algún signo de toxicidad, se administra una dosis de 50 mg/Kg; mientras que si el animal muere dentro del periodo de observación, la dosis a administrar en el estudio principal debe ser de 300 mg/Kg. Al igual que en la administración anterior, los animales son observados durante 14 días, reportando cualquier signo de toxicidad observado (**Figura 10**).



**Figura 10.** Diagrama de flujo del estudio de observación del ensayo de toxicidad oral agua. Guía 420 OECD.

Transcurridos los 14 días del estudio de observación, se decide la dosis a evaluar en el estudio principal (Figura 10); en el cual se utilizan 10 ratones divididos en dos grupos de 5, el primero de ellos administrado con vehículo, mientras que el segundo grupo es administrado con la dosis del extracto establecida.

Los animales son observados durante 14 días, reportando decesos o signos de toxicidad. Al término del periodo de observación, se pueden probar dosis mayores o menores a la inicial; si durante los 14 días hubo 2 o más muertes, se prueban dosis menores, si no hubo muertes y ninguno de los animales tuvo algún signo de toxicidad, se prueban dosis mayores, mientras que si sólo se observaron signos de toxicidad, se procede a clasificar el extracto en alguna de las cinco categorías del GHS, de acuerdo con lo planteado en la guía 420 (Figura 11).



**Figura 11.** Diagrama de flujo del estudio principal del ensayo de toxicidad oral aguda. Guía 420 OECD.

### 6.10. Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos de las evaluaciones biológicas fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 5. Para las evaluaciones *in vitro* del extracto hidroalcohólico y sus fracciones sobre la actividad de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas y PTP-1B, se realizó un análisis de varianza (ANADEVA) de una vía, seguido de la prueba de Dunnett para comparar los tratamientos contra el vehículo. En el caso de los compuestos, evaluados a diferentes concentraciones, y para las evaluaciones *in vivo*, se realizó un ANADEVA de dos vías, así como una prueba de Bonferroni como *post-hoc* para comparar los grupos contra el vehículo.



# RESULTADOS



## 7. Resultados.

### 7.1. Bipartición del extracto hidroalcohólico.

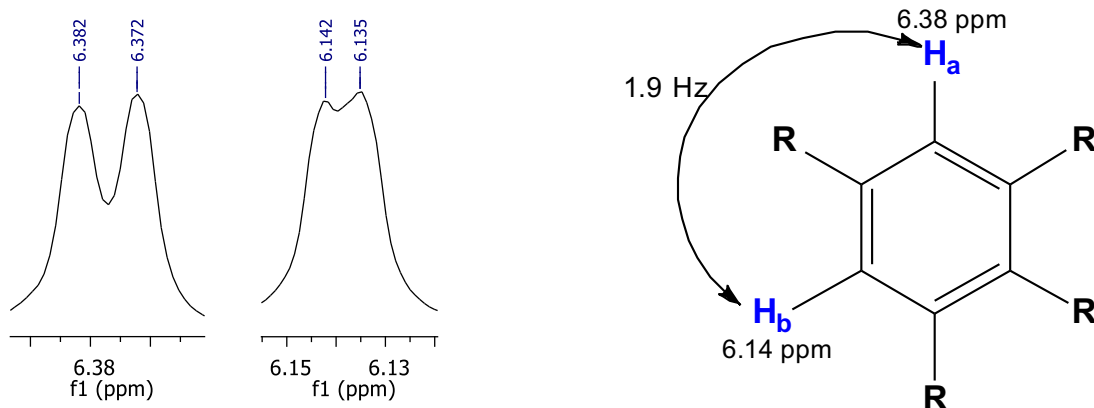
A partir del proceso de maceración de las partes aéreas en una mezcla hidroalcohólica, se obtuvo el extracto hidroalcohólico. 40 g de este extracto fueron utilizados para efectuar extracciones líquido-líquido con la finalidad de separar sus constituyentes por gradiente de polaridad. De esta bipartición, se obtuvieron las fracciones de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (18 g, rendimiento: 45%), de AcOEt (4 g, rendimiento: 10%), de butanol (5 g, rendimiento: 12.5%), así como el residuo acuoso (13 g, rendimiento: 32.5%).

### 7.2. Metabolitos identificados en la Fracción de AcOEt.

#### 7.2.1. Tilirósido.

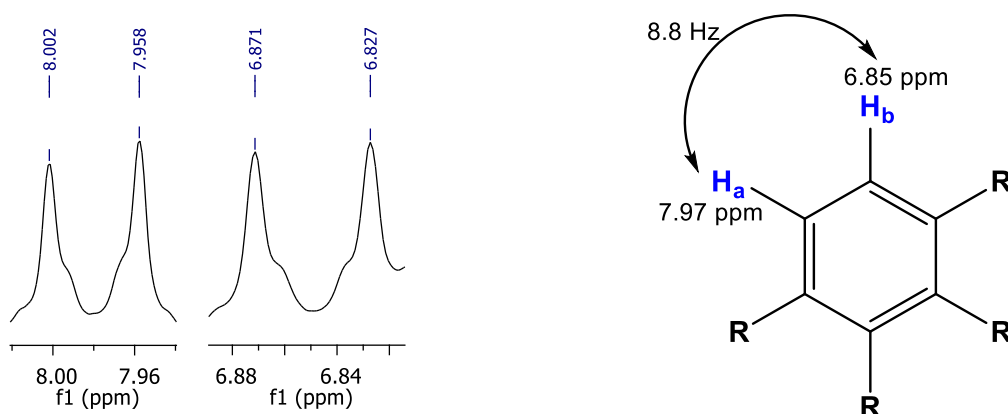
Durante el proceso cromatográfico primario de la fracción de AcOEt, se obtuvo un sólido amarillo soluble en MeOH en las fracciones de los grupos D y E, siendo más abundante en la fracción 34, por lo que esta muestra fue preparada e identificada con la clave ***CeAcOEt-01***, para ser analizada mediante experimentos de RMN y determinar su estructura química.

Al analizar los datos espectroscópicos obtenidos en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Anexo 2), se observaron señales características de protones de anillos aromáticos (6-8 ppm), así como señales características de protones de glicósidos. Se identificó una señal doble desplazada en 6.38 ppm, que integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento de 1.9 Hz, misma que comparte con otra señal doble desplazada en 6.14 ppm; estas señales fueron atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en posición *meta* en un anillo aromático A de un flavonoide (**Figura 12**).



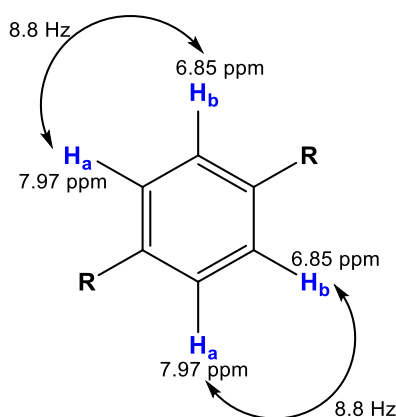
**Figura 12.** Señales identificadas en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en posición *meta* dentro de un anillo aromático.

Por otro lado, se identificó una señal doble desplazada en 7.97 ppm, que comparte una constante de acoplamiento de 8.8 Hz con otra señal doble desplazada en 6.85 ppm, ambas señales integran para 2 protones cada una, por lo que se atribuyeron a un sistema de protones AB simétricamente equivalentes, que, dentro de un anillo aromático, se encuentran acoplados en posición *orto* (**Figura 13**).



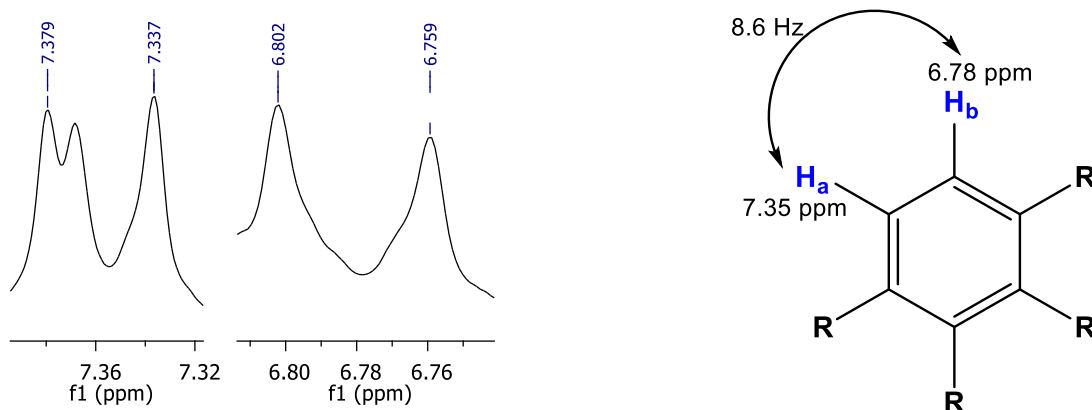
**Figura 13.** Señales identificadas en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , atribuidas a un sistema de protones acoplados en posición *orto* dentro de un anillo aromático.

Como se mencionó antes, ambas señales integran para dos protones, por lo que se considera que se trata de protones siméticamente equivalentes (**Figura 14**); de esta forma, se considera un anillo con un eje de simetría, con dos sustituyentes diferentes en posición *para*, por lo que los dos protones en posición *orto* adyacentes a ellos comparten el mismo ambiente químico y sólo generan una señal; a su vez, estos protones se acoplan entre ellos en posición *orto*, por lo que la señal que generan es una señal doble. Así, dos protones que generan una señal en 6.85 ppm se encuentran en relación *orto* con otros dos protones que generan una señal doble en 7.97 ppm, los cuales, por su desplazamiento químico, se considera que tienen un sistema electroattractor cercano a ellos.



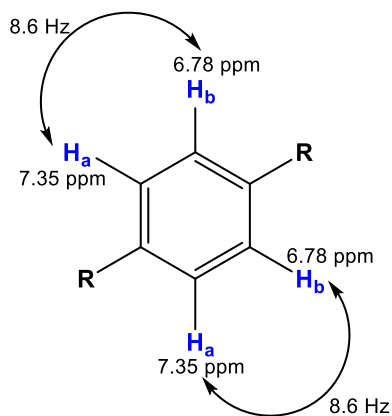
**Figura 14.** Protones siméticamente equivalentes en un anillo aromático.

Adicionalmente, se identificó una señal doble desplazada en 7.35 ppm, cuya constante de acoplamiento de 8.6 Hz comparte con otra señal doble desplazada en 6.78 ppm, y que es característica de un sistema de protones AB acoplados en posición *orto* dentro de un anillo aromático (**Figura 15**).



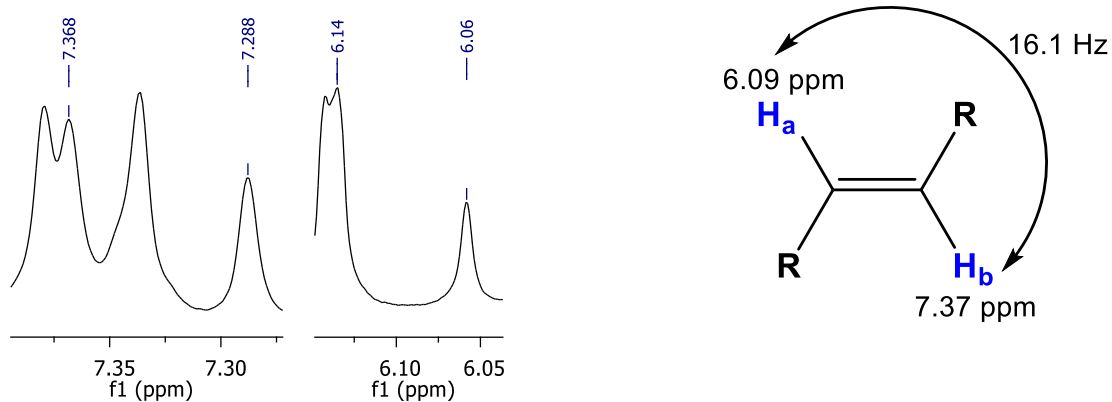
**Figura 15.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones AB de un anillo aromático, acoplados en posición *orto*.

Es importante mencionar que ambas señales integran para dos protones, por lo que se considera que se trata de un sistema de protones AB simétricamente equivalentes en un anillo aromático (**Figura 16**).



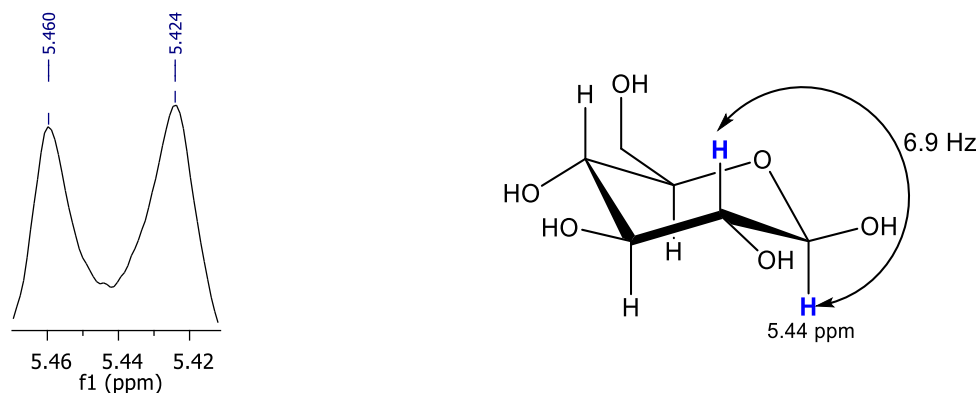
**Figura 16.** Protones simétricamente equivalentes en un anillo aromático.

Por otro lado, se identificó una señal doble en 7.37 ppm, la cual integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento de 16.1 Hz, la cual comparte con otra señal doble desplazada en 6.09 ppm, características de un sistema de protones vinílicos acoplados en posición *trans* (**Figura 17**).



**Figura 17.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones AB vinílicos acoplados en posición *trans*.

Finalmente, se identificó una señal doble desplazada en 5.45 ppm, que integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento de 6.9 Hz. Esta señal es característica del protón de la posición 1 de la glucosa, el cual se encuentra acoplado con el protón de la posición 2 (**Figura 18**). A partir de lo anterior, se pudo determinar que el compuesto presente en esta muestra es un flavonoide que se encuentra glicosilado.



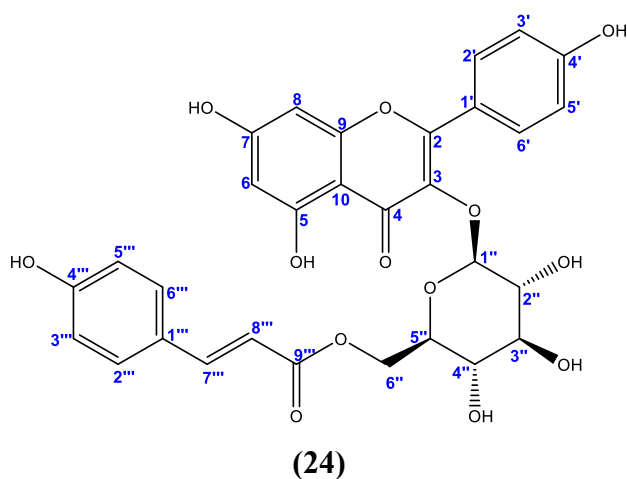
**Figura 18.** Señal identificada en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuida al protón de la posición 1 de la glucosa.

Los datos espectroscópicos obtenidos fueron comparados con los reportados previamente en la literatura (**Tabla 12**), a partir de lo cual, se determinó que se trata del flavonoide tilirósido (**24**) (**Figura 19**).

**Tabla 12.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H reportados y obtenidos experimentalmente para tilirósido.

Tilirósido										
#	RMN- <sup>1</sup> H								RMN- <sup>13</sup> C	
	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) (Lokadi, <i>et al.</i> , 2016)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )				Datos Bibliográficos RMN- <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) (Lokadi, <i>et al.</i> , 2016)	Datos Experimentales RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
	δ	f	m	J	δ	f	m	J	δ	δ
1									---	---
2									159.34	166.0
3									135.20	141.1
4									179.42	187.0
5									162.95	170.7
6	6.15	1	d	--	6.14	1	d	1.6	99.98	110.5
7									165.92	173.8
8	6.38	1	d	--	6.38	1	d	1.9	94.82	108.4
9									158.40	165.9
10									105.60	123.2
1'									122.73	134.5
2'	8.02	1	d	--	7.97	2	d	8.8	132.19	140.4
3'	6.90	1	d	--	6.85	2	d	8.8	116.03	125.3
4'									161.50	169.5
5'	6.90	1	d	--	6.85	2	d	8.8	116.03	125.3
6'	8.02	1	d	--	7.97	2	d	8.8	132.19	140.4
1''	5.45	1	d	--	5.45	1	d	6.9	103.97	113.4
2''	3.70	1	m	--	4.20	1	m	--	75.72	83.7
3''	3.59	1	dd	--	4.02	1	dd	6.1 11.8	78.01	103.3

4''	3.61	1	m	--	3.76	1	m	--	71.72	79.6
5''	3.63	1	d	--	3.19	1	d	11.8	75.8	83.8
6''									64.3	72.5
1'''									127.1	138.2
2'''	7.37	1	d	--	7.35	2	d	8.6	131.1	139.7
3'''	6.78	1	d	--	6.78	2	d	8.6	116.8	130.3
4'''									161.1	169.3
5'''	6.78	1	d	--	6.78	2	d	8.6	116.8	130.3
6'''	7.37	1	d	--	7.35	2	d	8.6	131.1	139.7
7'''	7.34	1	d	--	7.33	1	d	16.1	146.5	154.2
8'''	6.12	1	d	--	6.09	1	d	16.1	114.7	124.7
9'''									168.8	175.7



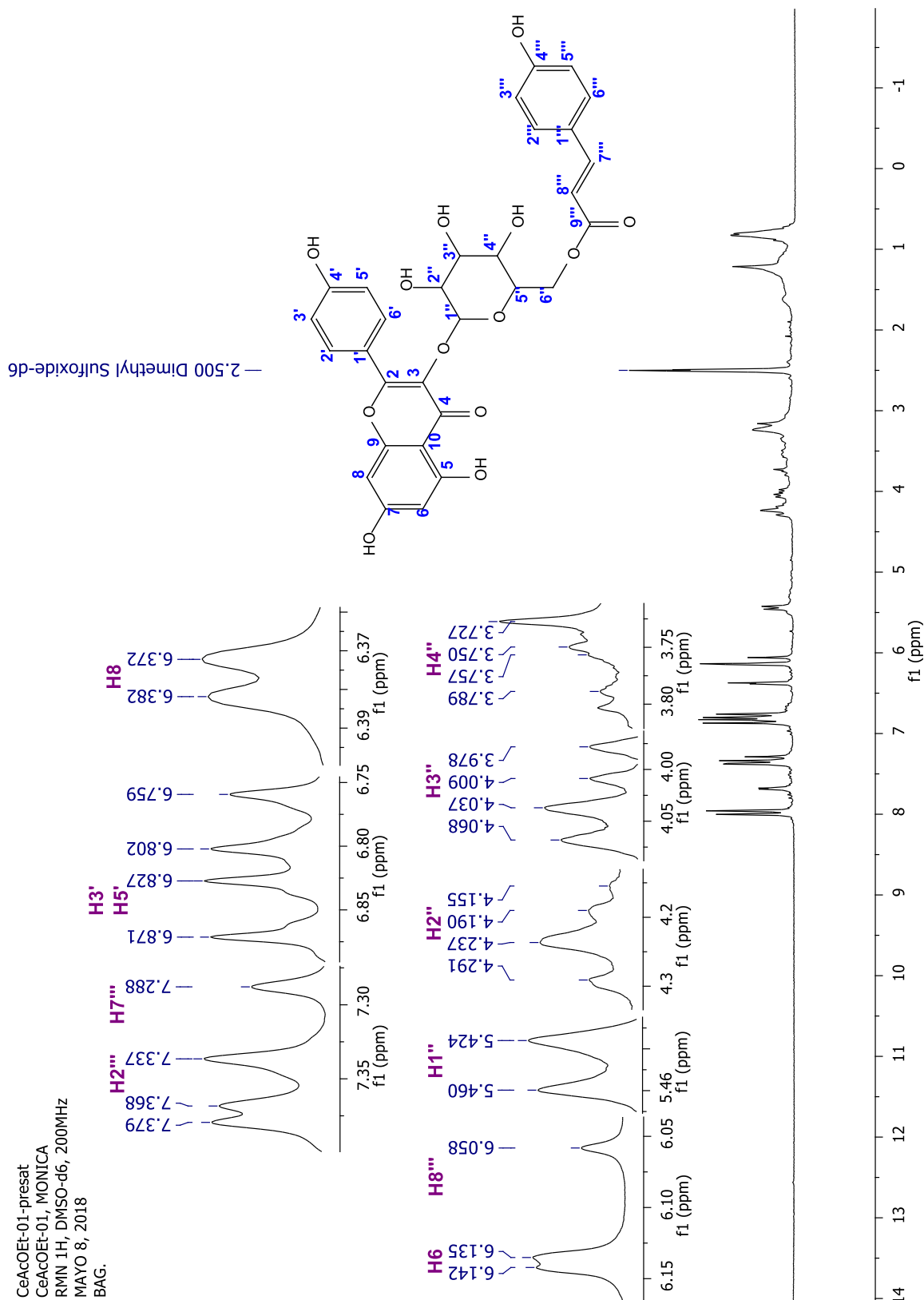
**Características físicas:** Sólido amarillo.

**Rf:** 0.750 (85:15 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH)

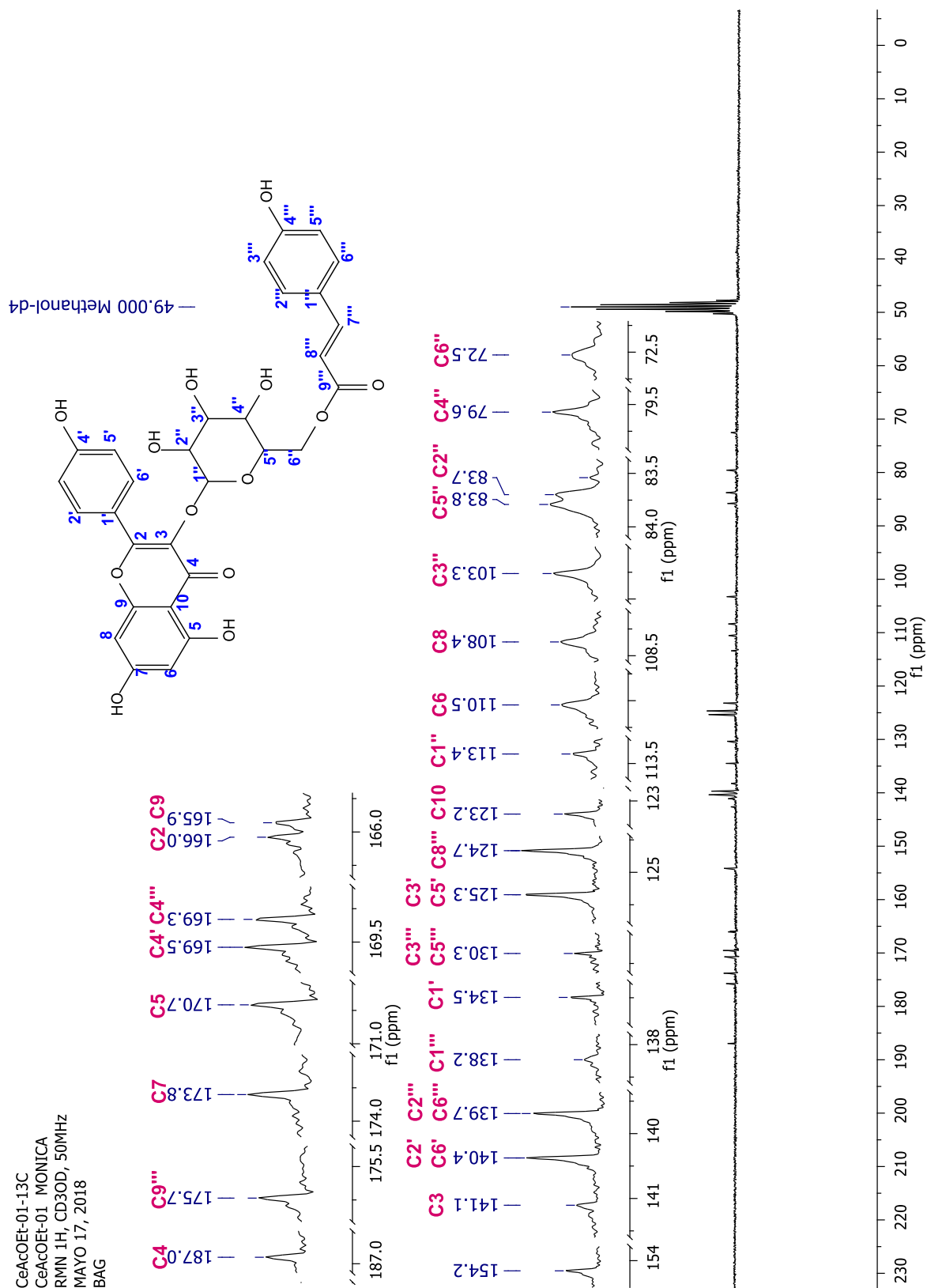
**Cantidad obtenida:** 223 mg

**IR:** Número de ondas (cm<sup>-1</sup>): 3459.45-2922.23 (m, aguda, tensión C-H, aromáticos); ~3200 (f, ancha, tensión O-H, alcohol); 1681.92-1724.61 (d, agudas, tensión C=O); 1604.78-1418.63 (f, agudas, tensión C-C, aromáticos); 1349.64- 1032.76 (f, agudas, tensión C-O, alcohol); 979.48-737.15 (m, agudas, flexión C-H, aromáticos).

**Figura 19.** Estructura química del flavonoide tilirósido.



**Espectro 2.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, 200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, correspondiente a tilirósido.

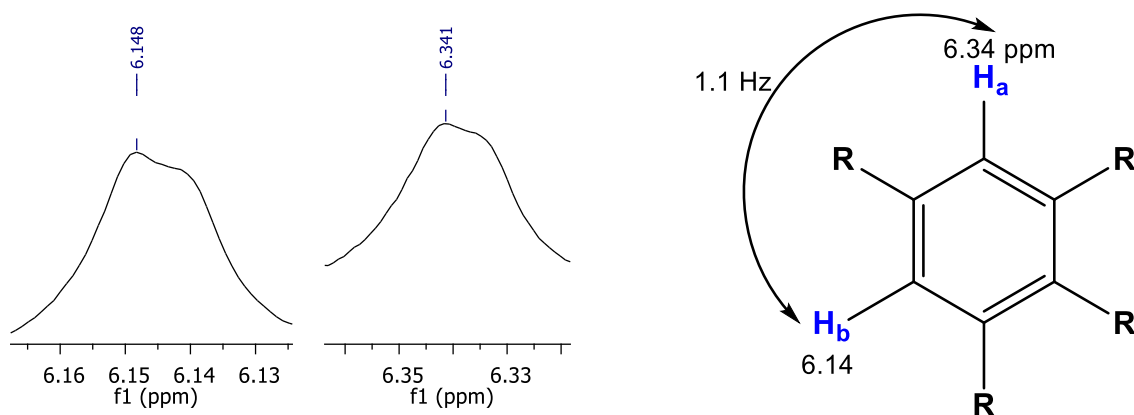


**Espectro 3.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C, 50 MHz, CD<sub>3</sub>OD, correspondiente a tilirósido.

### 7.2.2. Rutina.

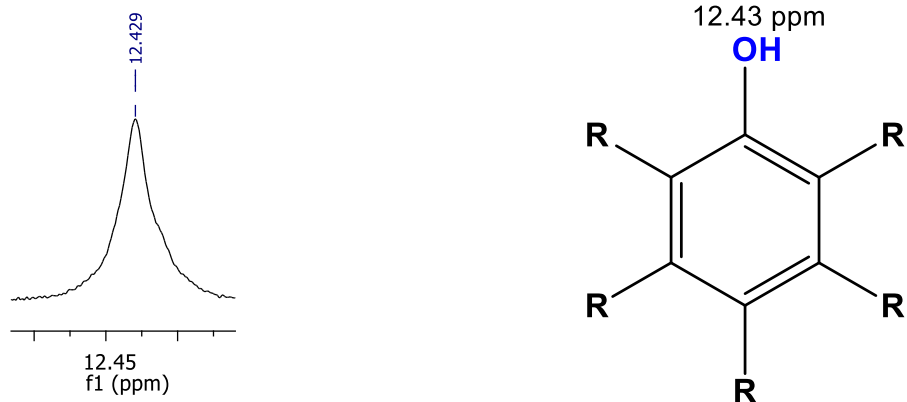
Durante el proceso cromatográfico de la fracción de AcOEt, se obtuvo un sólido de color café en las fracciones del grupo F, el cual fue identificado con la clave **CeAcOEt-02**. El espectro obtenido de RMN-<sup>1</sup>H (Anexo 3), presentó señales entre 6 y 8 ppm, características de sistemas aromáticos; es importante mencionar que el compuesto no se encontraba completamente puro, por lo que solo se tomaron en cuenta las señales mejor definidas.

Al analizar los datos espectroscópicos, se identificó una señal doble en 6.34 ppm, que integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento de 1.1 Hz, al igual que otra señal doble desplazada en 6.14 ppm. Ambas señales fueron atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en posición *meta* en un anillo aromático A de un flavonoide (**Figura 20**).



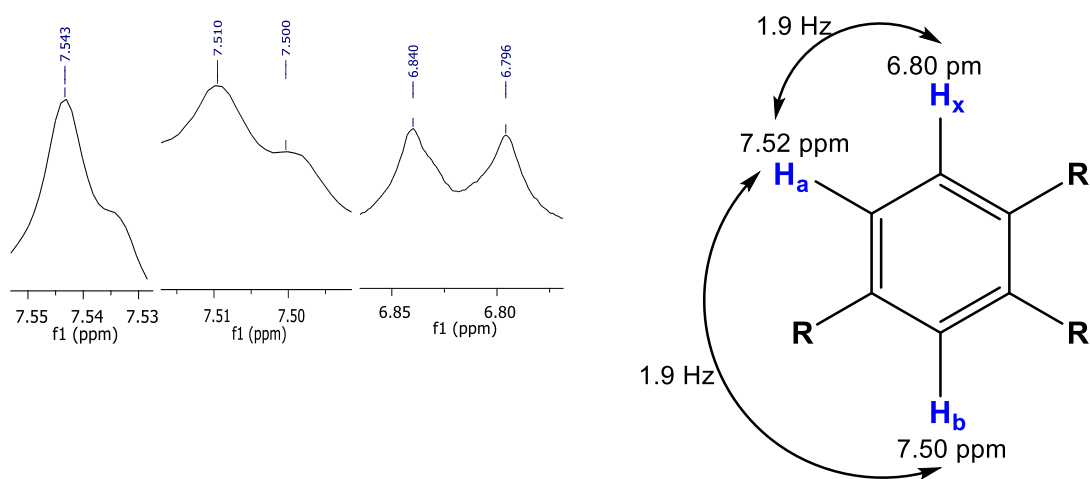
**Figura 20.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones de un anillo aromático acoplados en posición *meta*.

Se identificó también una señal simple en 12.43 ppm, característica de un OH en un anillo aromático (**Figura 21**), por lo que se atribuyó a un sustituyente OH en el anillo aromático.



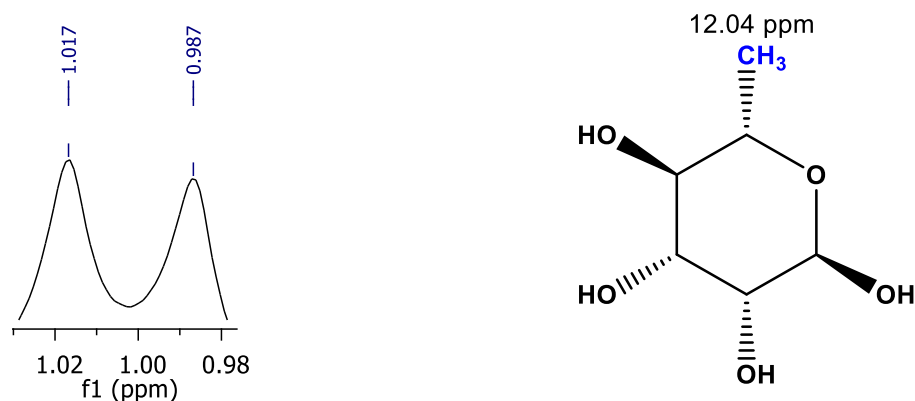
**Figura 21.** Señal simple identificada en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuida a un sustituyente OH.

Por otro lado, se identificó una señal doble de doble desplazada en 7.52 ppm, la cual integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento de 1.9 Hz, misma que comparte con otra señal doble desplazada en 7.50 ppm, así como una segunda constante de acoplamiento de 8.8 Hz que comparte con una señal doble en 6.80 ppm. Estas señales fueron atribuidas a un sistema de protones ABX de un anillo aromático B de un flavonoide (**Figura 22**).



**Figura 22.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones ABX en un anillo aromático.

Se identificó también una señal doble en 0.98 ppm, que integra para tres protones y tiene una constante de acoplamiento de 6.8 Hz. Esta señal es característica del -CH<sub>3</sub> de rhamnosa (Figura 23), lo que condujo a sugerir que la estructura del compuesto corresponde a un flavonoide glicosilado.



**Figura 23.** Señal identificada en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, característica del -CH<sub>3</sub> de rhamnosa.

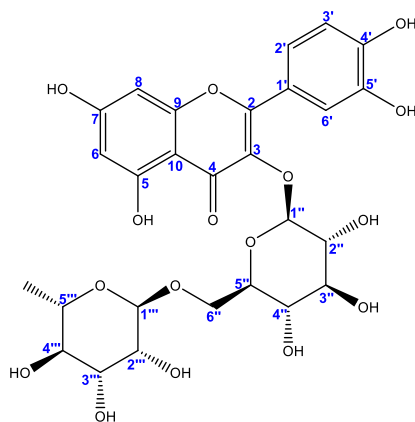
Los datos espectroscópicos obtenidos fueron comparados con datos espectroscópicos de fuentes bibliográficas, y a partir de este análisis, se determinó que el compuesto presente en esta muestra corresponde al flavonoide rutina (25) (Figura 24).

**Tabla 13.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H reportados y obtenidos experimentalmente para rutina.

Rutina												
#	RMN- <sup>1</sup> H					RMN- <sup>13</sup> C						
	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) (Fathiazal, <i>et al.</i> , 2006)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> :DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )				Datos Bibliográficos RMN- <sup>13</sup> C (50.32 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) (Fathiazal, <i>et al.</i> , 2006)		Datos Experimentales RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> :DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	
	δ	f	m	J	δ	f	m	J	δ	δ		
1									---	---		
2									157.3	156.5		

Rutina										
#	RMN- <sup>1</sup> H								RMN- <sup>13</sup> C	
	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) (Fathiazal, <i>et al.</i> , 2006)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> :DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )				Datos Bibliográficos RMN- <sup>13</sup> C (50.32 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) (Fathiazal, <i>et al.</i> , 2006)	Datos Experimentales RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> :DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )
	δ	f	m	J	δ	f	m	J	δ	δ
3									134.1	133.6
4									178.2	177.4
5	12.62	1	s	--	12.43	1	s	--	157.5	157.0
6	6.21	1	d	2.0	6.14	1	d	1.1	99.5	98.8
7	10.86	1	s	--					164.9	164.2
8	6.40	1	d	2.0	6.34	1	d	1.1	94.5	93.6
9									162.1	161.3
10									104.8	104.0
1'									122.5	121.7
2'	7.56	1	dd	9.0 2.1	7.52	1	dd	8.8 1.9	116.1	115.1
3'	6.86	1	d	9.0	6.80	1	d	8.8	145.6	144.6
4'	9.71	1	s	--					149.3	148.3
5'	9.21	1	s	--					117.1	116.3
6'	7.55	1	d	2.1	7.50	1	d	1.9	122.0	121.2
1''	5.35	1	d	7.4	5.18	1	d	6.8	101.6	100.7
2''									74.9	74.0
3''									77.3	76.6
4''									72.7	72.1
5''									76.7	75.7
6''									67.9	66.9
1'''	5.12	1	d	1.9					102.2	102.0

Rutina										
#	RMN- <sup>1</sup> H								RMN- <sup>13</sup> C	
	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) (Fathiazal, <i>et al.</i> , 2006)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> :DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )				Datos Bibliográficos RMN- <sup>13</sup> C (50.32 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) (Fathiazal, <i>et al.</i> , 2006)	Datos Experimentales RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> :DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )
	δ	ƒ	m	J	δ	ƒ	m	J	δ	δ
2'''									70.8	69.7
3'''									71.2	70.3
4'''									71.4	70.7
5''									69.1	68.0
6'''	1.00	3	d	6.1	0.98	3	d	6.03	18.6	17.6



(25)

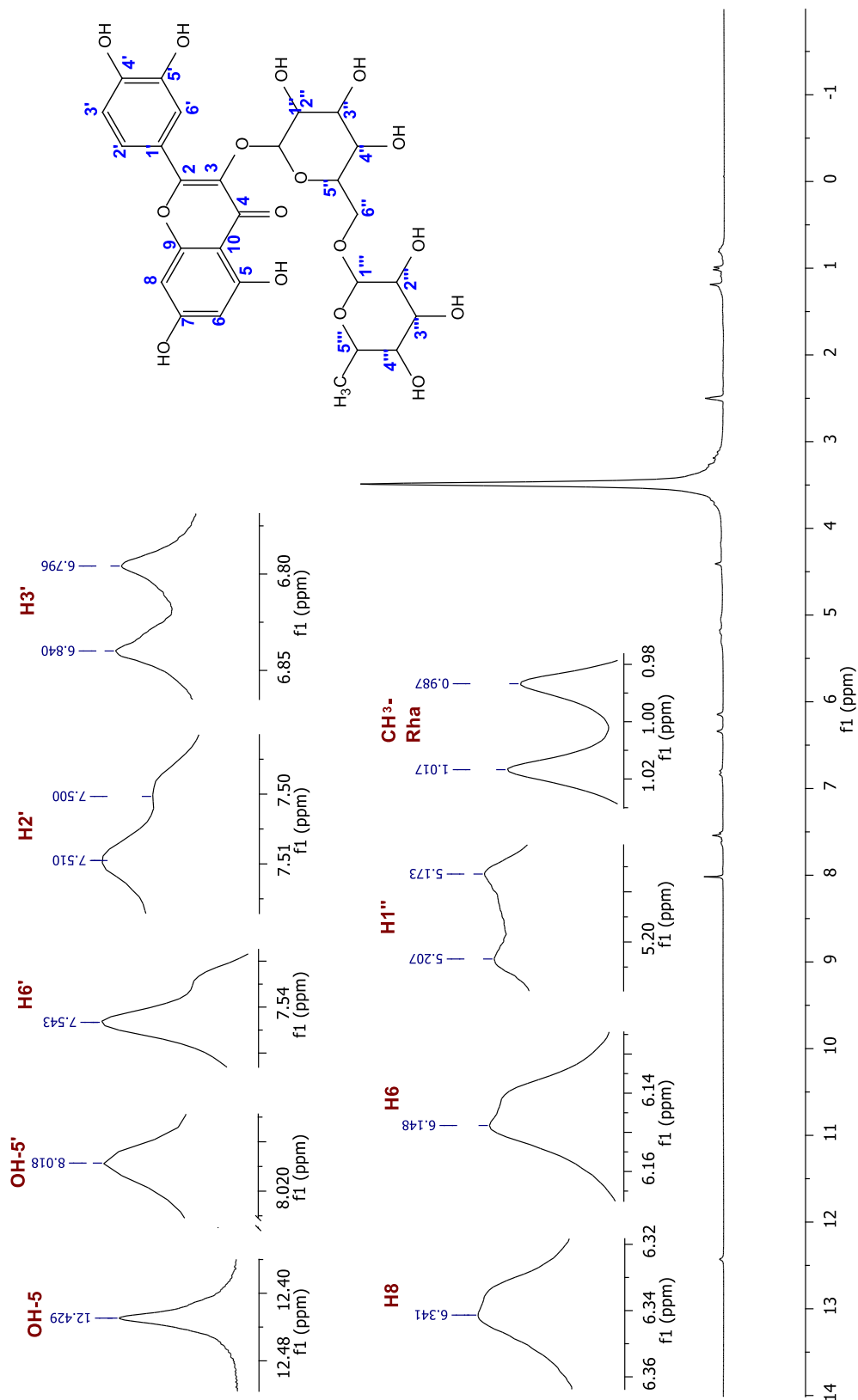
Figura 24. Estructura química de rutina.

**Características físicas:** Sólido café.

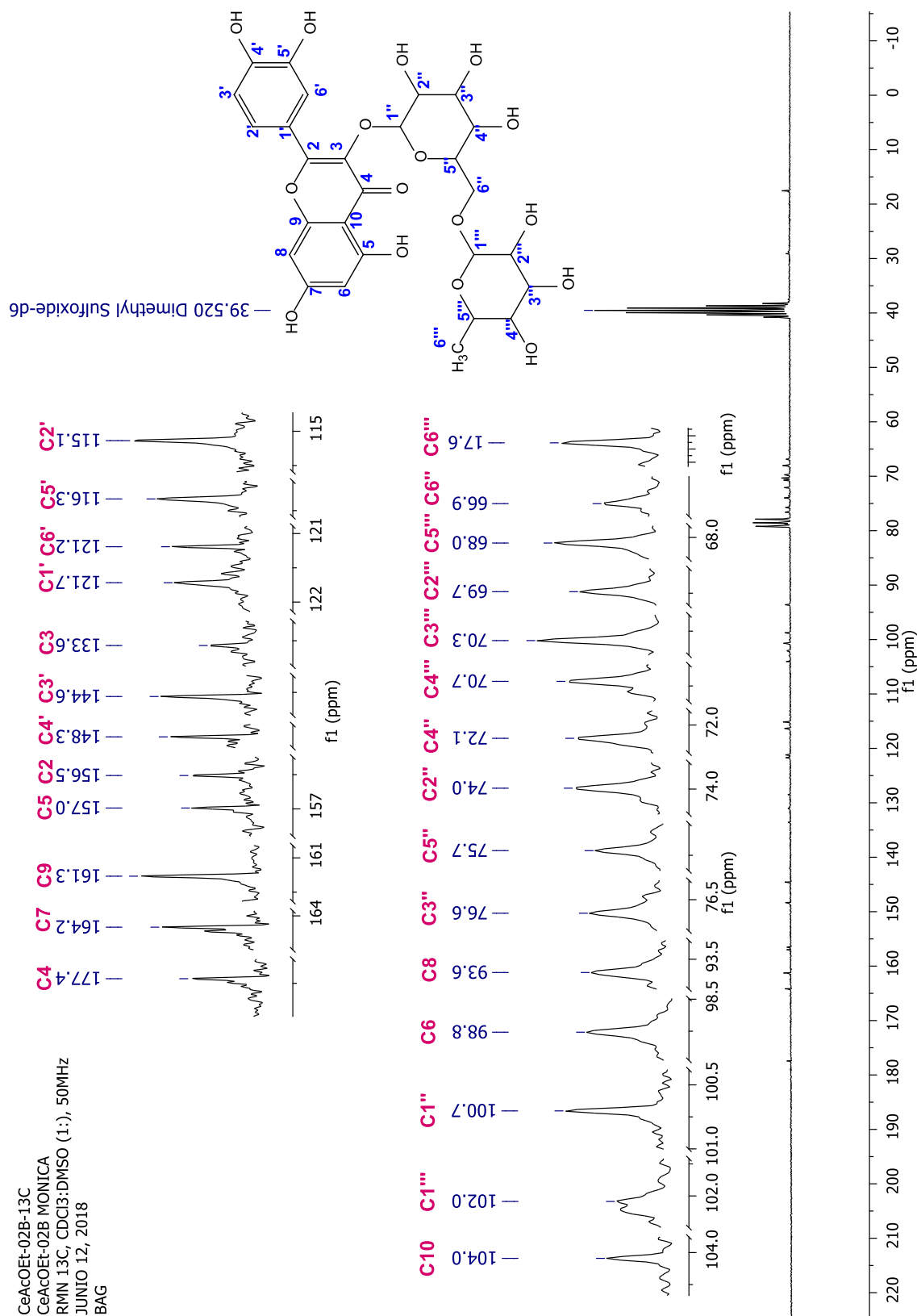
**Rf:** 0.625 (5:0.5:0.5 Butanol:H<sub>2</sub>O:Ác. acético)

**Cantidad obtenida:** 41 mg

CeAcOEt-02B  
 CeAcOEt-02B MONI  
 RMN 1H, CDCl<sub>3</sub>:DMSO (1:1), 200 MHz  
 JUNIO 11, 2018  
 BAG



**Espectro 4.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, correspondiente a rutina.



**Espectro 5.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C, 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, correspondiente a rutina.

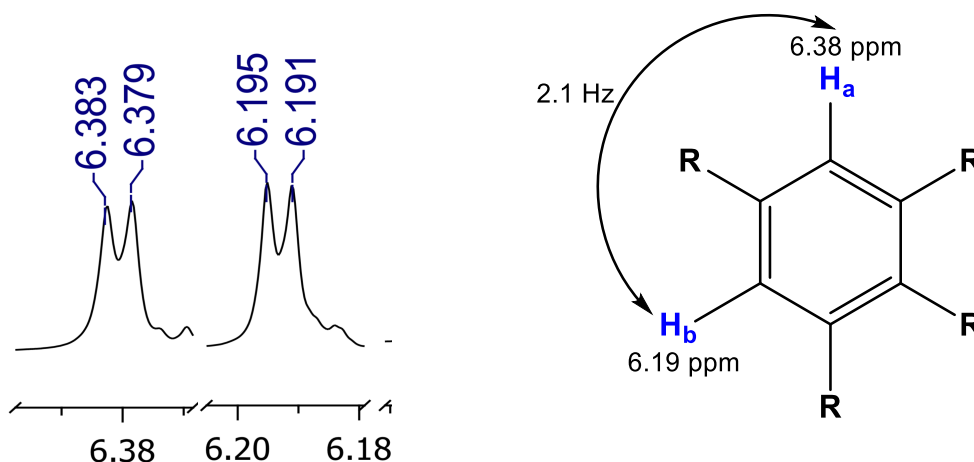
### 7.2.3. Nicotiflorina.

Durante la re-cromatografía de las fracciones 39-47 de la fracción de AcOEt, se obtuvo un compuesto de interés en las fracciones 78-107 (Grupo C); el cual fue identificado con la clave *CeAcOEt-03*, para efectuar experimentos de RMN y determinar su estructura química.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H obtenido, se identificaron señales entre 6-8 ppm, características de sistemas aromáticos, así como señales entre 3-5 ppm características de protones glicosídicos; todas ellas asociadas a la presencia de un flavonoide glicosilado.

Por otra parte, es importante mencionar que el compuesto no se encontraba totalmente puro, por lo que, para el análisis, sólo se tomaron en cuenta aquellas señales mejor definidas.

De este modo, se identificó una señal doble en 6.38 ppm, la cual integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento de 2.1 Hz, al igual que otra señal doble desplazada en 6.19 ppm. Estas señales se atribuyeron a un sistema de protones AB de un anillo aromático, acoplados en posición *meta* (Figura 25).



**Figura 25.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en posición *meta* en un anillo aromático.

Por otro lado, se identificó una señal doble en 8.05 ppm, que integra para un protón y comparte una constante de acoplamiento de 9.0 Hz con otra señal doble desplazada en 6.89 ppm.

Ambas fueron atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en relación *orto* dentro de un anillo aromático (Figura 26).

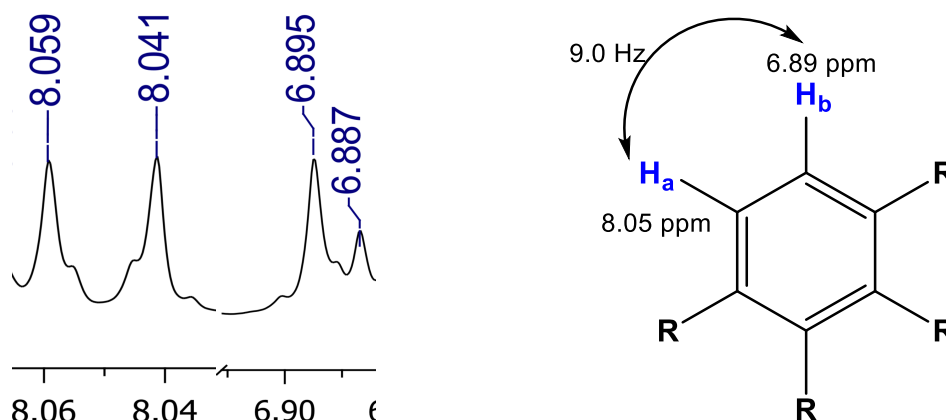


Figura 26. Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en posición *orto* en un anillo aromático.

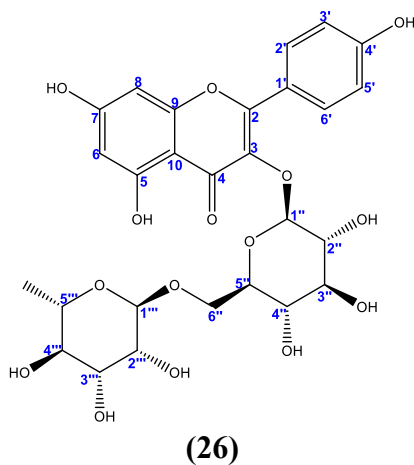
Los datos espectroscópicos obtenidos fueron comparados con datos bibliográficos reportados (Tabla 14), a partir de lo cual, se logró determinar que el compuesto presente en estas fracciones corresponde al flavonoide nicotiflorina (26) (Figura 27).

Tabla 14. Datos de RMN-<sup>1</sup>H reportados y obtenidos experimentalmente para nicotiflorina.

Nicotiflorina										
#	RMN- <sup>1</sup> H								RMN- <sup>13</sup> C	
	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) (De Oliveira, <i>et al.</i> , 2013)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD)				Datos Bibliográficos RMN- <sup>13</sup> C (300 MHz, DMSO) (De Oliveira, <i>et al.</i> , 2013)	Datos Experimentales RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
	δ	f	m	J	δ	f	m	J	δ	δ
1									---	---
2									156.7	158.4
3									134.3	135.5

Nicotiflorina										
#	RMN- <sup>1</sup> H								RMN- <sup>13</sup> C	
	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) (De Oliveira, <i>et al.</i> , 2013)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD)				Datos Bibliográficos RMN- <sup>13</sup> C (300 MHz, DMSO) (De Oliveira, <i>et al.</i> , 2013)	Datos Experimentales RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
	δ	f	m	J	δ	f	m	J	δ	δ
4									177.2	179.3
5									161.1	162.9
6	6.18	1	d	2.0	6.19	1	d	2.1	98.63	100.0
7									164.2	165.9
8	6.41	1	d	2.0	6.38	1	d	2.1	93.6	94.9
9									159.8	159.4
10									103.8	104.6
1'									120.8	122.7
2'	7.98	2	d	9.0	8.05	2	d	9.0	115.0	116.1
3'	6.88	2	d	9.0	6.89	2	d	8.9	130.8	132.4
4'									160.0	161.4
5'	6.88	2	d	9.0	6.89	2	d	8.9	130.8	132.3
6'	7.98	2	d	9.0	8.05	2	d	9.0	115.0	116.1
1''	5.30	1	d	7.5	5.11	1	d	7.6	101.2	102.4
2''									74.0	74.1
3''									76.2	77.1
4''									69.8	69.7
5''									75.6	75.7
6''									66.7	68.6
1'''	4.38	1	d	1.0	4.52	1	d	1.7	100.6	101.9
2'''									70.22	71.4
3'''									70.47	71.5

Nicotiflorina										
#	RMN- <sup>1</sup> H								RMN- <sup>13</sup> C	
	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) (De Oliveira, <i>et al.</i> , 2013)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD)				Datos Bibliográficos RMN- <sup>13</sup> C (300 MHz, DMSO) (De Oliveira, <i>et al.</i> , 2013)	Datos Experimentales RMN- <sup>13</sup> C (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
	δ	f	m	J	δ	f	m	J	δ	δ
4'''									71.7	72.3
5'''									68.1	69.3
6'''	0.98	1	d	6.0	1.13	3	d	6.3	17.6	17.9



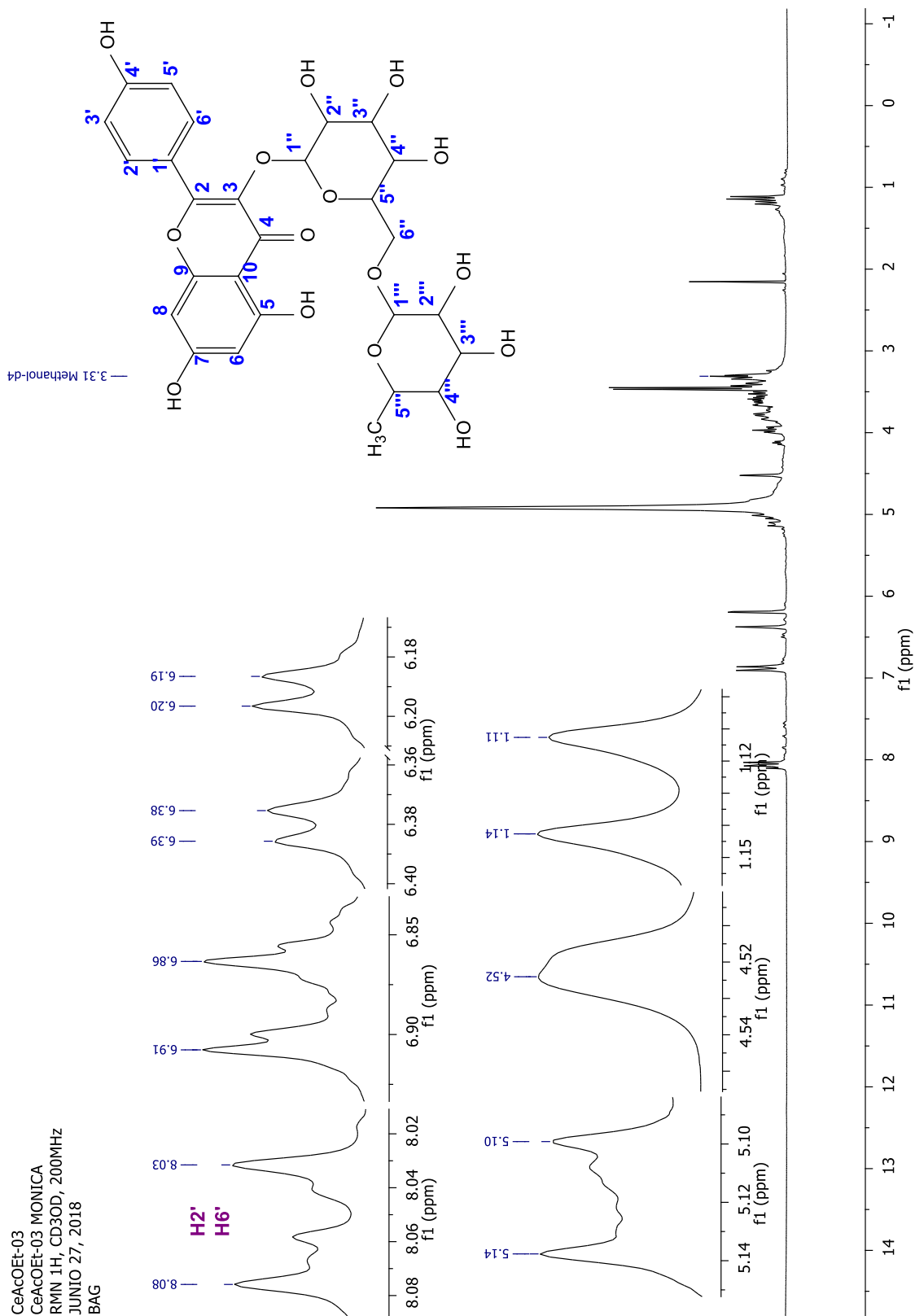
**Características físicas:** Sólido amarillo.

**Rf:** 0.625 (5:0.5:0.5 Butanol:H<sub>2</sub>O:Ác. acético)

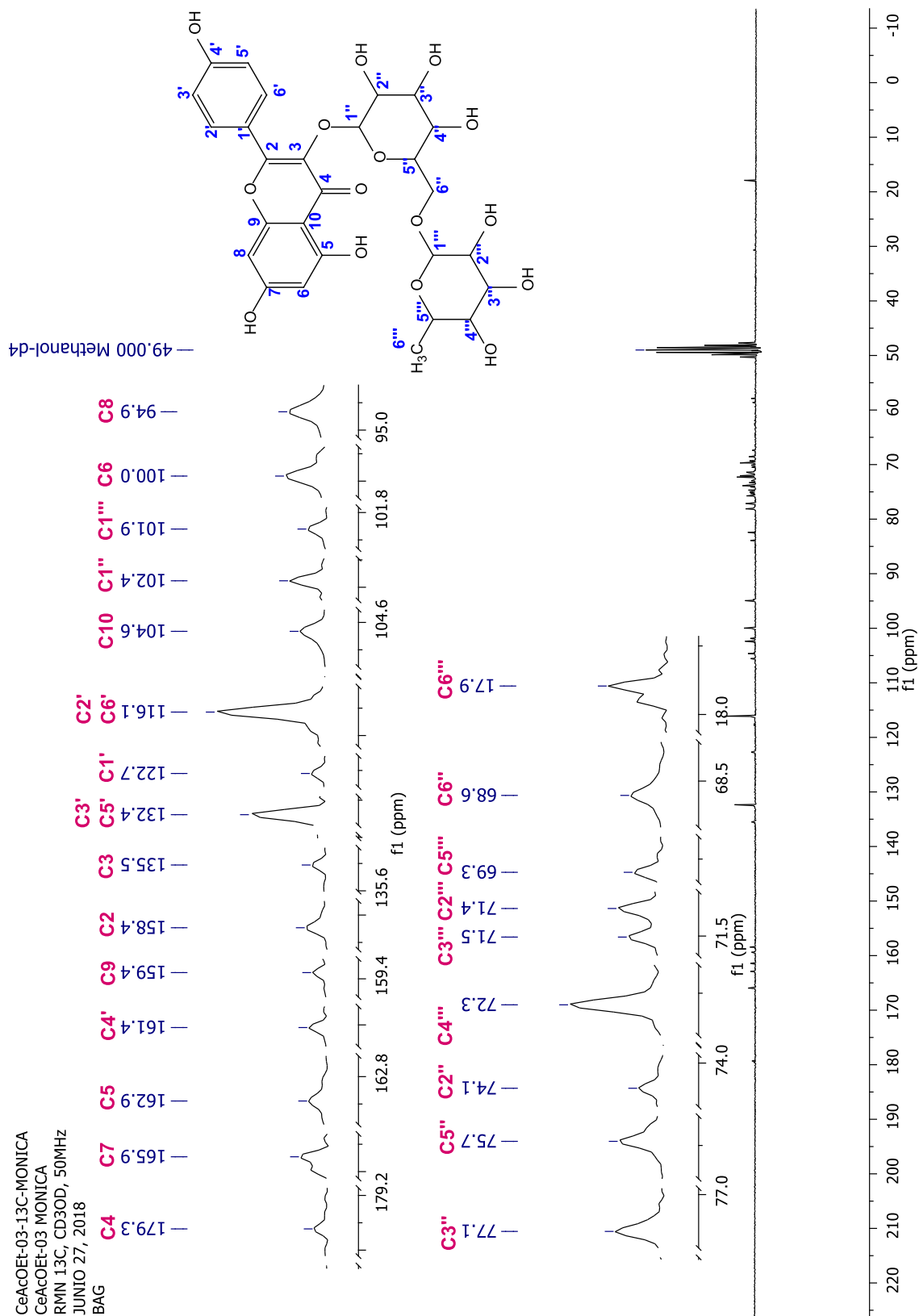
**Cantidad obtenida:** 42 mg

**IR:** Número de ondas (cm<sup>-1</sup>): 3332.48 (m, tensión O-H); 1651.95 (d, aguda, tensión C=O); 1595.05-1454.92 (m, agudas, tensión C-C, aromáticos); 1358. 67-1000.21 (f, agudas, tensión C-O, alcohol); 968.65-594.91 (m, agudas, flexión C-H, aromáticos).

**Figura 27.** Estructura química de nicotiflorina.



**Espectro 6.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, 200 MHz, CD<sub>3</sub>OD, correspondiente a nicotiflorina.

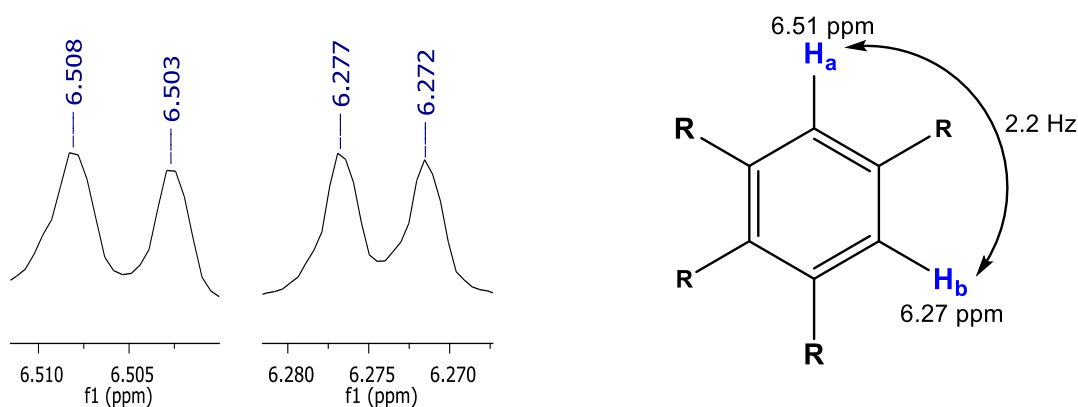


**Espectro 7.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C, 50 MHz, CD<sub>3</sub>OD, correspondiente a nicotiflorina.

#### 7.2.4. Isoquercetina.

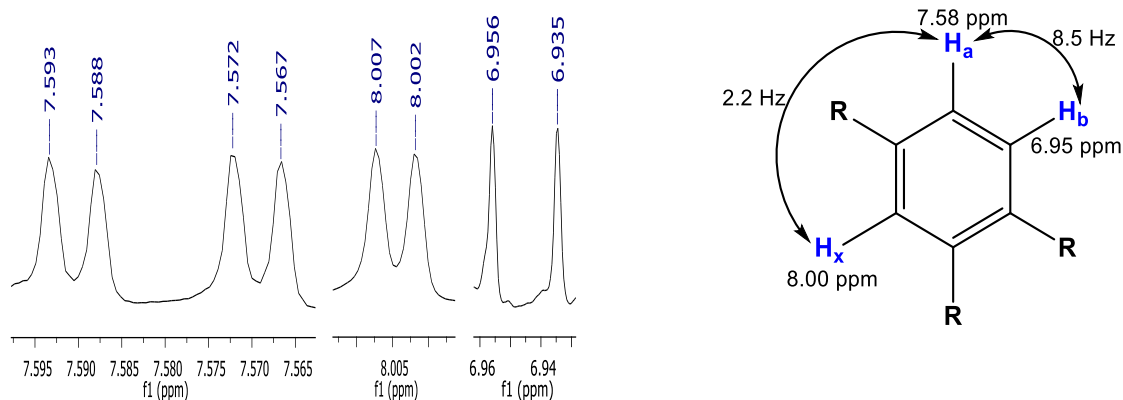
Como se menciona en la parte experimental (sección 6.3.2), en las fracciones 25-70 se observó un compuesto interesante en aquellas fracciones que fueron obtenidas con acetona y AcOEt, por lo que fueron agrupados para posteriormente realizar experimentos de RMN (**BAG03-004**) y determinar la estructura química del compuesto de interés.

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se identificó una señal doble en 6.51 ppm, la cual integra para un protón y comparte una constante de acoplamiento de 2.2 Hz con otra señal doble desplazada en 6.27 ppm, correspondiendo a un sistema de protones AB acoplados en posición *meta* en el anillo aromático A de un flavonoide (**Figura 28**).



**Figura 28.** Señales identificadas en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en posición *meta* en un anillo aromático A de un flavonoide.

Adicionalmente, se identificó un sistema de protones ABX en el anillo aromático B de un flavonoide, el cual se encuentra conformado por una señal doble de doble desplazada en 7.58 ppm, que integra para un protón y comparte una primera constante de acoplamiento de 2.2 Hz con una señal doble desplazada en 8.00 ppm, asimismo, comparte una segunda constante de acoplamiento de 8.5 Hz con otra señal doble desplazada en 6.95 ppm (**Figura 29**).

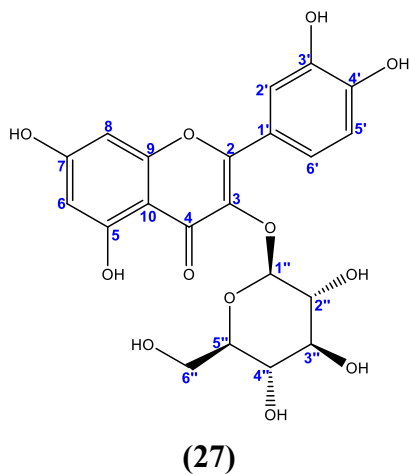


**Figura 29.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones ABX de un anillo aromático B de un flavonoide.

Finalmente, se identificó una señal doble en 5.25 ppm, que integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento de 7.4 Hz, así como otras señales entre 3.81-3.36 ppm, características de los protones de glucosa. Al comparar los datos obtenidos con datos bibliográficos (**Tabla 15**), se determinó que el compuesto presente en estas fracciones corresponde al flavonoide isoquercetina (**27**) (**Figura 30**).

**Tabla 15.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H reportados y obtenidos experimentalmente para isoquercetina.

Isoquercetina								
#	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) (Kuruüzüm-Uz, <i>et al.</i> , 2013)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 200 MHz)			
	δ	f	m	J	δ	f	m	J
H6	6.21	1	d	2.0	6.27	1	d	2.1
H8	6.41	1	d	2.0	6.51	1	d	2.2
H2'	7.61	1	d	2.2	8.00	1	d	2.2
H3'	9.65	1	s					
H5'	6.86	1	d	9.0	6.95	1	d	8.5
H6'	7.58	1	dd	2.2 9.0	7.58	1	dd	2.2 8.5
H1''	5.47	1	d	7.4	5.25	1	d	7.4
H2''	3.10-		m		3.44		m	
H3''	3.60							
H4''								
H5''								
H6''								



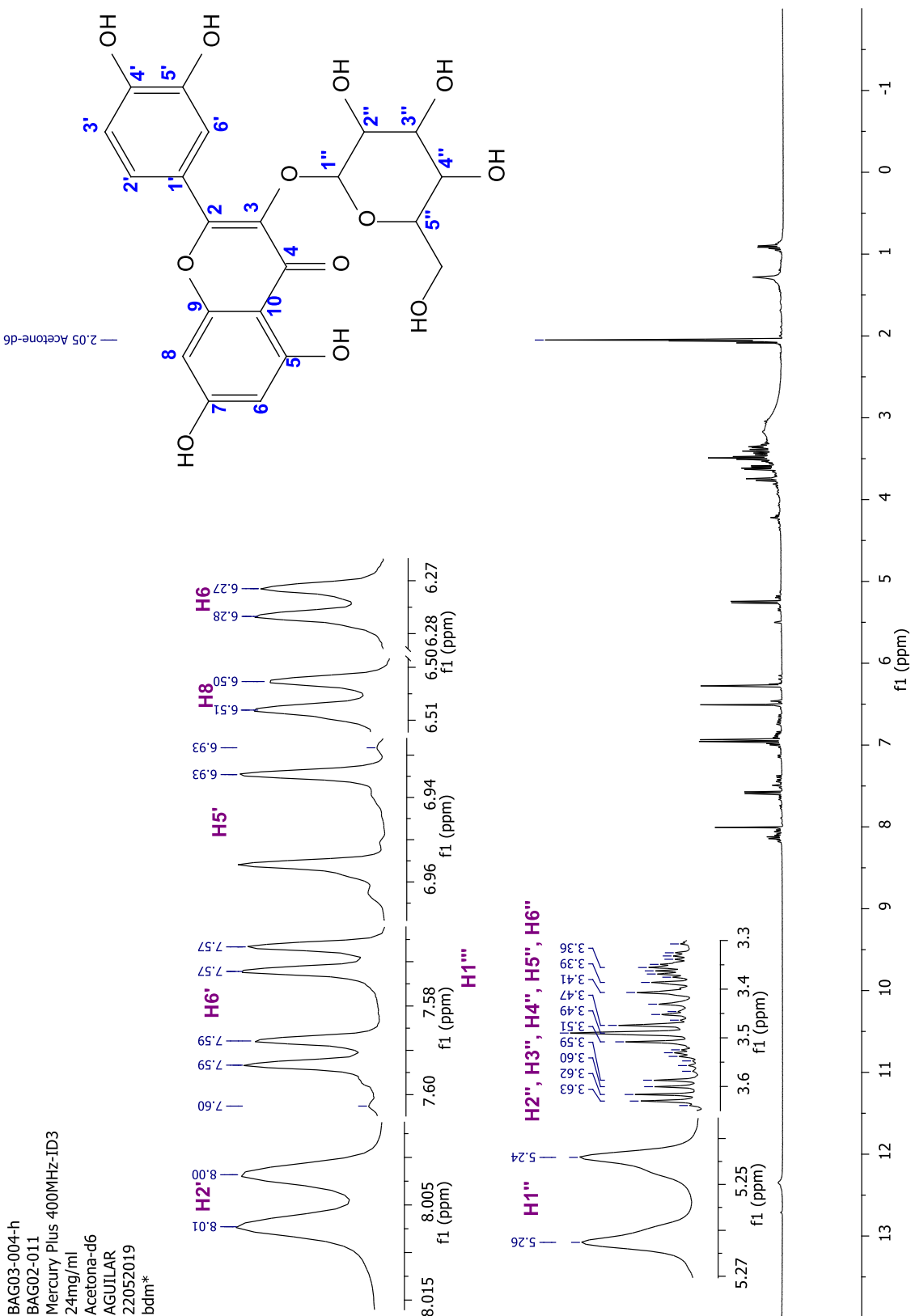
**Características físicas:** Sólido amarillo.

**Rf:** 0.625 (5:0.5:0.5 Butanol:H<sub>2</sub>O:Ác. acético)

**Cantidad obtenida:** 9 mg

**IR:** Número de ondas (cm<sup>-1</sup>): 3254.16 (m, ancha, tensión O-H, alcohol); 2923.85 (d, tensión C-H, aromáticos); 1695.30 (d, aguda, tensión C=O), 1652.54-1442.68 (m, agudas, tensión C-C, aromáticos); 1357.46-1013.22 (m, agudas, estiramiento C-O, alcohol); 996.85-531.67 (d, agudas, flexión C-H, aromáticos).

**Figura 30.** Estructura química de isoquercetina.



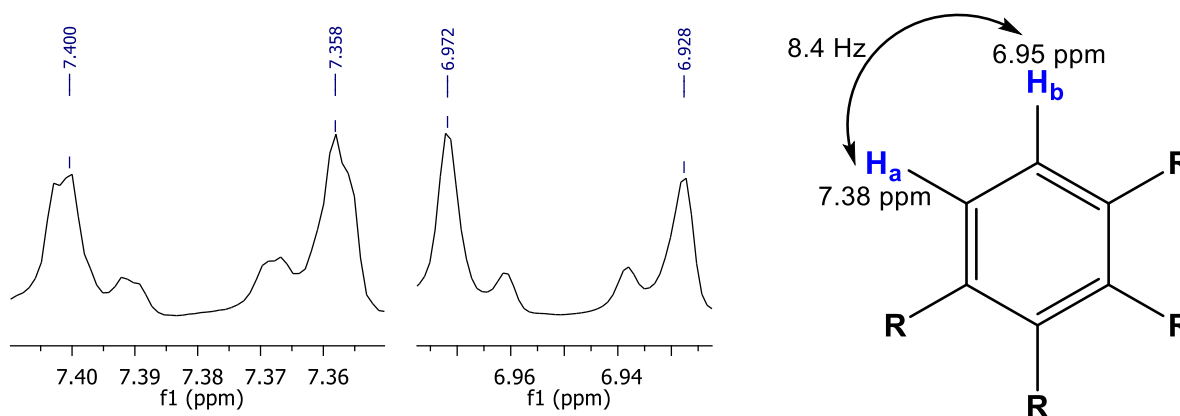
**Espectro 8.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, 400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>, correspondiente a isoquercetina.

### 7.3. Metabolitos secundarios identificados en la Fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

#### 7.3.1. 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina.

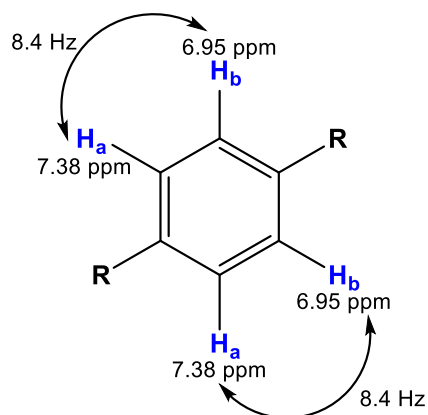
El compuesto identificado con la clave *CeDC-11* purificado por recristalización de la reunión 3-5 de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, como se menciona en la sección experimental 6.4.1, fue enviado a RMN para la obtención de sus experimentos los cuales una vez analizados permitieron determinar su estructura química.

En el espectro obtenido de RMN-<sup>1</sup>H, se identificaron señales entre 6 y 8 ppm, características de sistemas aromáticos, así como señales características de sistemas vinílicos. Se identificó una señal doble desplazada en 7.38 ppm, que tiene una constante de acoplamiento de 8.4 Hz, misma que comparte con la señal doble desplazada en 6.95 ppm, ambas se atribuyeron a un sistema de protones AB acoplados en posición *orto* dentro de un anillo aromático (**Figura 31**).



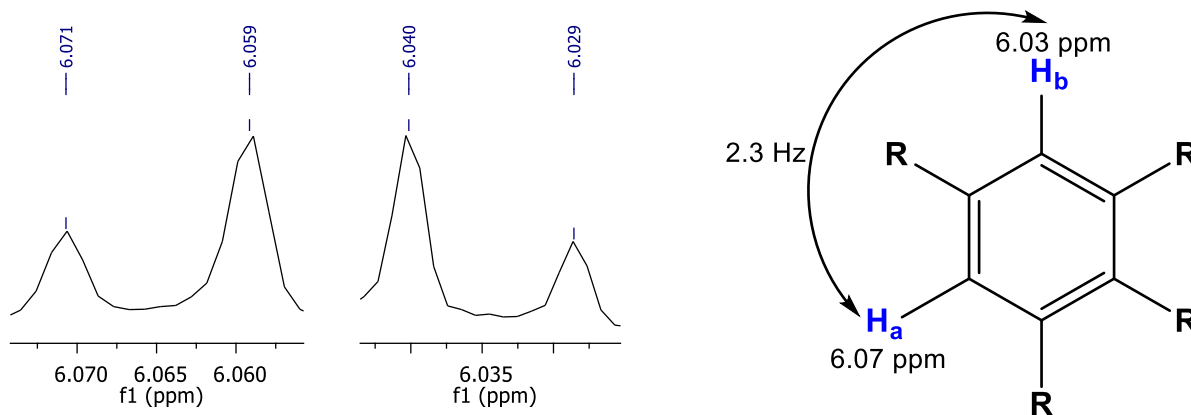
**Figura 31.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones acoplados en posición *orto* en un anillo aromático.

Es importante destacar que ambas señales integran para dos protones cada una, por lo que se sugiere que estos son simétricamente equivalentes (**Figura 32**).



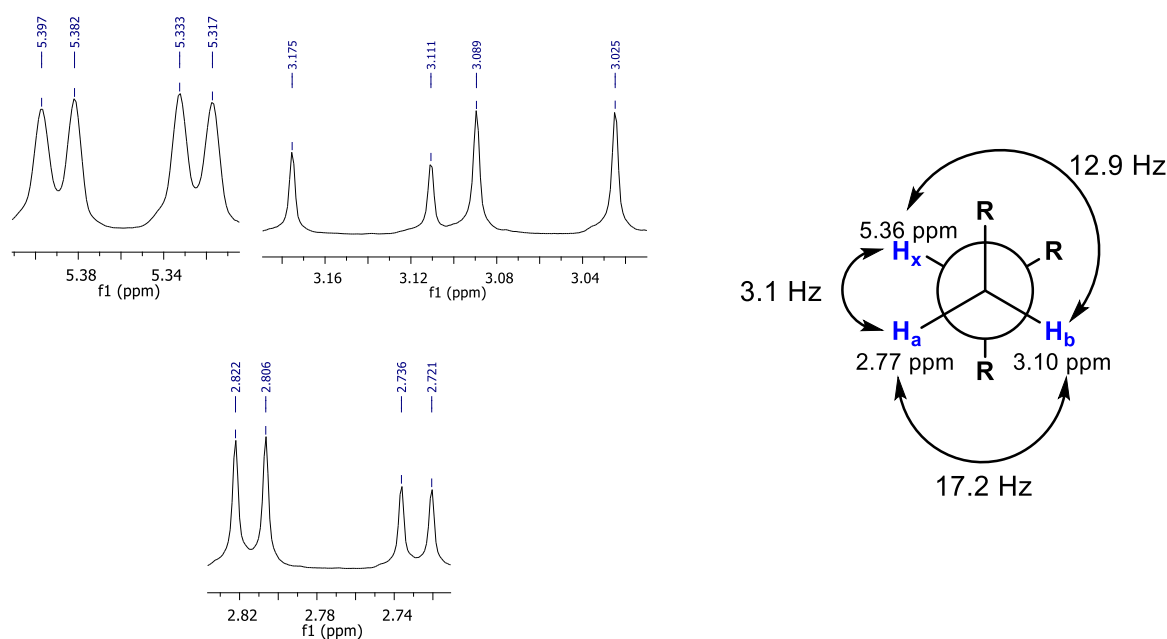
**Figura 32.** Protones simétricamente equivalentes en un anillo aromático.

Por otro lado, se identificó una señal doble desplazada en 6.07 ppm, la cual integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento de 2.3 Hz, que comparte con otra señal doble desplazada en 6.03 ppm. Estas señales fueron atribuidas a un sistema de protones AB acoplados en posición *meta* en un anillo aromático (**Figura 33**).



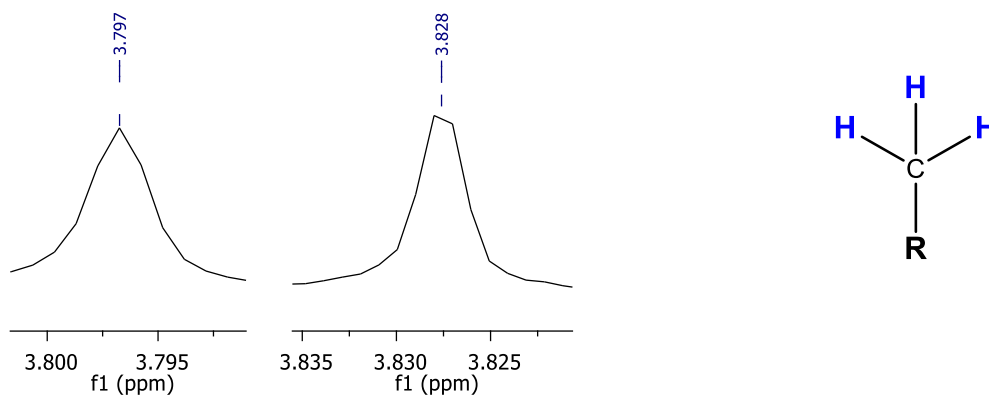
**Figura 33.** Señales identificadas en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , atribuidas a un sistema de protones acoplados en posición *meta* dentro de un anillo aromático.

Adicionalmente, se identificaron señales dobles de dobles entre 2 y 5 ppm las cuales integran para un protón y comparten constantes de acoplamiento; la primera de ellas se encuentra desplazada en 2.77 ppm, tiene una constante de acoplamiento de 17.2 Hz, la cual la comparte con otra señal doble de doble desplazada en 3.10 ppm, esta constante es característica de un sistema de protones AB geminales. Adicionalmente, ambas señales tienen una segunda constante de acoplamiento, de 12.9 y 3.1 Hz respectivamente, las cuales comparten con la señal doble de doble en 5.36 ppm, y que son características de protones vecinales. Todas estas señales fueron atribuidas a un sistema de protones ABX (**Figura 34**).



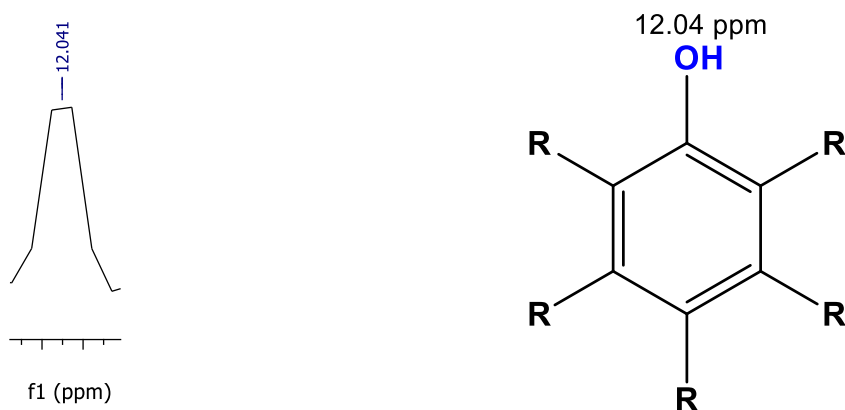
**Figura 34.** Señales identificadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, atribuidas a un sistema de protones ABX.

Se identificaron también dos señales simples en 3.80 y 3.83 ppm, ambas integran para tres protones cada una, y son características de grupos metilo base de oxígeno (**Figura 35**).



**Figura 35.** Señales identificadas en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , características de grupos metoxilo.

Finalmente, se identificó una señal simple desplazada en 12.04 ppm, la cual es característica de sustituyentes OH en un anillo aromático (**Figura 36**); esta señal integra para un protón, y se atribuyó al OH quelatado de un flavonoide.



**Figura 36.** Señal identificada en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , atribuida a un sustituyente OH de un anillo aromático.

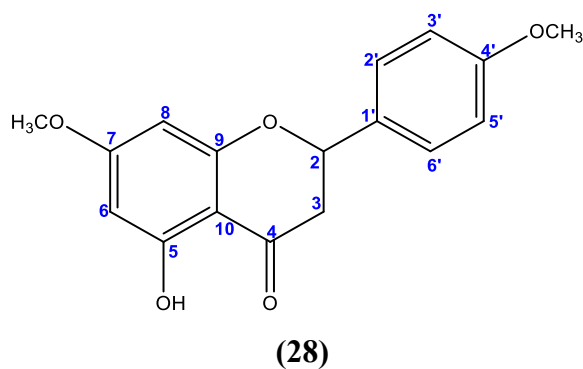
De manera adicional, se realizaron experimentos de  $^{13}\text{C}$  y DEPT; en el primero, se identificaron 17 señales desde 43.3 ppm hasta 196.1 ppm, indicando que la estructura del compuesto presenta 17 carbonos diferentes; mientras que, mediante el experimento DEPT, se determinó la presencia de los dos grupos metilo y los CH observados para la estructura en el experimento de  $^1\text{H}$ .

Los datos obtenidos fueron comparados con datos bibliográficos previamente reportados (Tabla 16), y a partir del análisis efectuado, se determinó que se trata de un flavonoide derivado de naringenina, el cual tiene dos sustituyentes metilo en las posiciones 1 y 4'; por lo que se determinó que el compuesto presente en las fracciones del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> corresponde al flavonoide 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina (28) (Figura 37).

**Tabla 16.** Datos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C reportados y obtenidos experimentalmente para 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina.

7, 4'-di- <i>O</i> -metilnaringenina										
#	RMN- <sup>1</sup> H								RMN- <sup>13</sup> C	
	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) (Kozłowska, <i>et al.</i> , 2017)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO)				Datos Bibliográficos RMN- <sup>13</sup> C (300 MHz, DMSO) (Kozłowska, <i>et al.</i> , 2017)	Datos Experimentales RMN- <sup>13</sup> C (400 MHz, DMSO)
	δ	f	m	J	δ	f	m	J	δ	δ
1									---	---
2	5.36	1	dd	13.1 3.0	5.36	1	dd	12.9 3.1	79.1	79.1
3a	3.10	1	dd	17.2 13.1	3.10	1	dd	17.2 12.9	43.3	43.3
3b	2.79	1	dd	17.2 13.1	2.77	1	dd	17.2 13.1	43.3	43.3
4									196.1	196.2
5	12.03	1	s		12.04	1	s		164.2	164.2
6	6.07	1	d	2.3	6.07	1	d	2.3	95.2	95.2
7									168.0	168.0
8					6.03	1	d	2.3	94.3	94.3
9									163.0	163.0
10									103.2	103.3

7, 4'-di- <i>O</i> -metilnaringenina										
#	RMN- <sup>1</sup> H								RMN- <sup>13</sup> C	
	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) (Kozłowska, <i>et al.</i> , 2017)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO)				Datos Bibliográficos RMN- <sup>13</sup> C (300 MHz, DMSO) (Kozłowska, <i>et al.</i> , 2017)	Datos Experimentales RMN- <sup>13</sup> C (400 MHz, DMSO)
	δ	f	m	J	δ	f	m	J	δ	δ
1'									127.8	127.8
2'	7.41	2	m		7.38	2	d	8.4	130.5	130.5
3'	6.98	2	m		6.95	2	d	8.8	114.3	114.3
4'									160.1	160.2
5'	6.91	2	m		6.95	2	d	8.8	114.3	114.3
6'	7.35	2	m		7.38	2	d	8.4	130.5	130.5
CH <sub>3</sub>	3.83	3	s		3.83	3	s		55.8	55.8
CH <sub>3</sub>	3.80	3	s		3.80	3	s		55.5	55.5



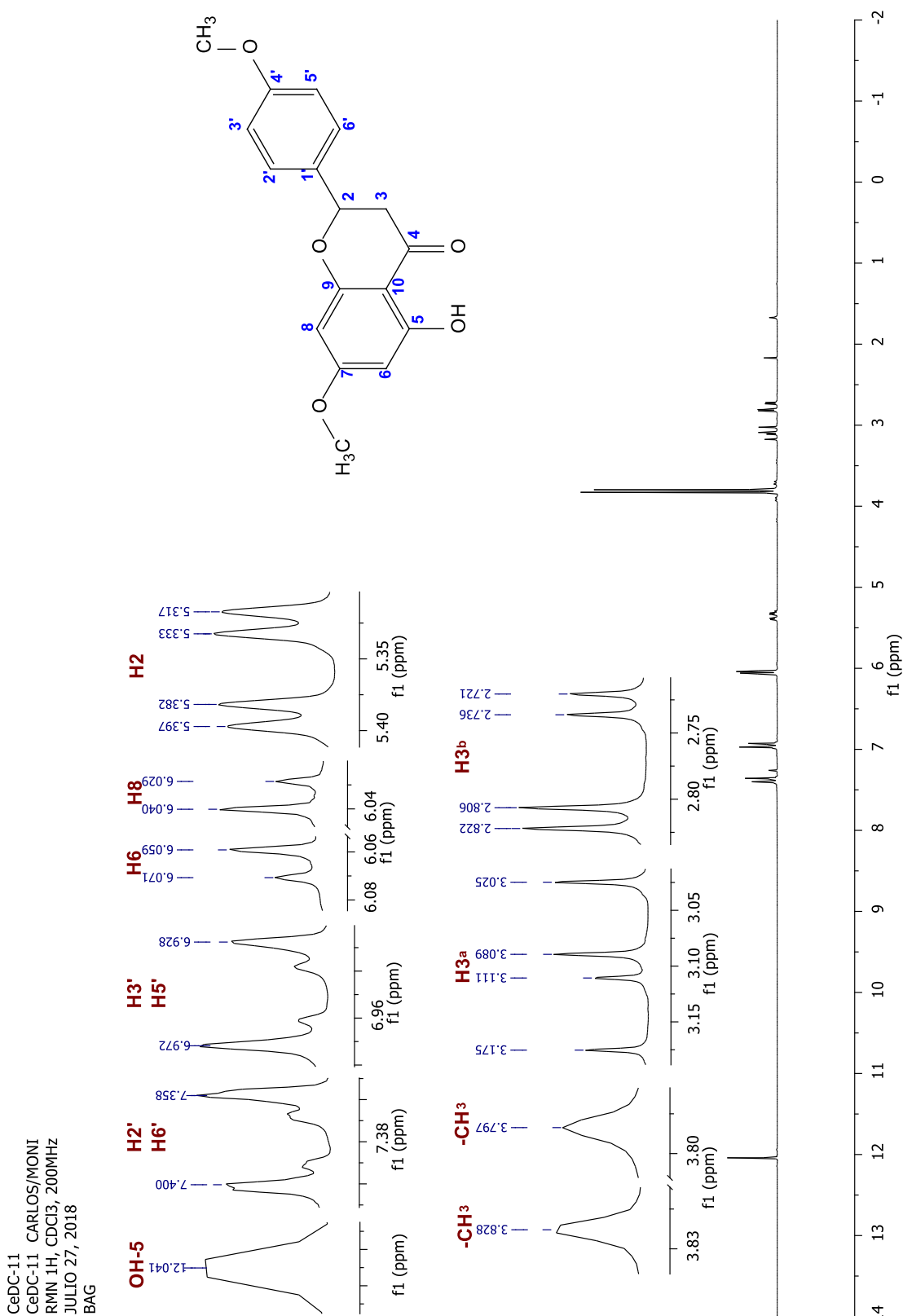
**Características físicas:** Cristales blancos.

**Rf:** 0.375 (85:15 Hexano:Acetona)

**Cantidad obtenida:** 58 mg

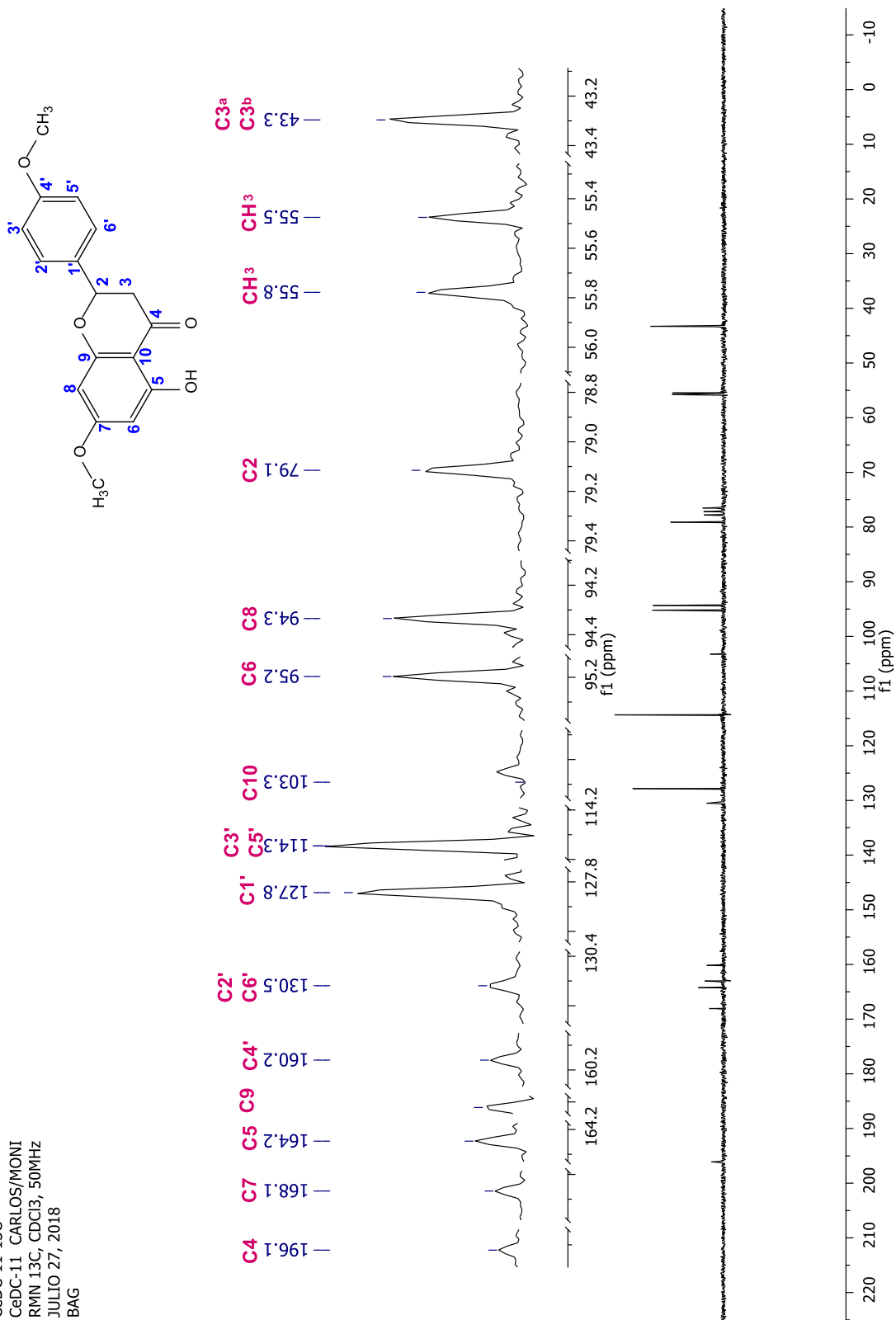
**IR:** Número de ondas (cm<sup>-1</sup>): 2916.54 (m, tensión C-H aromáticos); 1625.31 (d, aguda, tensión C=O), 1577.90-1433.87 (m, agudas, tensión C-C aromáticos); 1355.24-1027.08 (m, agudas, estiramiento C-O, alcohol); 984.89-537.09 (d, agudas, flexión C-H, aromáticos).

**Figura 37.** Estructura química de 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina.



**Espectro 9.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, correspondiente a 7, 4'-di-O-metilnaringina.

CeDC-11-13C  
 CeDC-11 CARLOS/MONI  
 RMN 13C, CDCl<sub>3</sub>, 50MHz  
 JULIO 27, 2018  
 BAG



**Espectro 10.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C, 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, correspondiente a 7, 4'-di-O-metilnaringenina.

### 7.3.2. $\beta$ -Sitosterol.

Durante la re-cromatografía de las fracciones 11-16 del extracto de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se obtuvo un sólido en forma de cristales en las fracciones 12-17, este sólido fue purificado por precipitación e identificado con la clave *CeDC-10*, para determinar su estructura química mediante experimentos de RMN. El espectro de RMN- $^1\text{H}$ , mostró la presencia de seis señales características de metilo, de las cuales, dos son singuletes en 0.67 y 1.00 ppm; mientras que las otras cuatro son señales dobles, desplazadas en 0.92, 0.86, 0.83 y 0.81 ppm. Asimismo, el espectro mostró la presencia de un protón vinílico en 5.34 ppm, así como un hidrógeno que se encuentra a campo bajo en 3.51 ppm, debido a la desprotección ejercida por un grupo OH. Por otro lado, en el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ , se identificó la presencia de 29 carbonos diferentes.

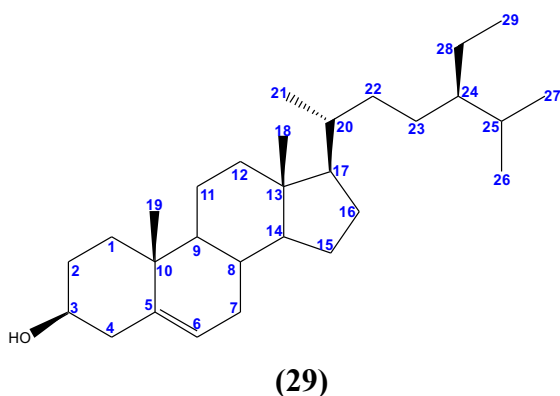
Los datos obtenidos fueron comparados con aquellos reportados en la literatura (**Tabla 17**), a partir de lo cual se determinó que el compuesto presente en estas fracciones corresponde a  $\beta$ -sitosterol (**29**) (**Figura 38**).

**Tabla 17.** Datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  reportados y obtenidos experimentalmente para  $\beta$ -sitosterol.

$\beta$ -Sitosterol										
#	RMN- $^1\text{H}$								RMN- $^{13}\text{C}$	
	Datos Bibliográficos RMN- $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{Cl}$ ) (Vitus, <i>et al.</i> , 2016)				Datos Experimentales RMN- $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CD}_3\text{Cl}$ )				Datos Bibliográficos RMN- $^{13}\text{C}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{Cl}$ ) (Vitus, <i>et al.</i> , 2016)	Datos Experimentales RMN- $^{13}\text{C}$ (200 MHz, $\text{CD}_3\text{Cl}$ )
	$\delta$	f	m	J	$\delta$	f	m	J	$\delta$	$\delta$
1									37.5	37.4

$\beta$ -Sitosterol										
#	RMN- <sup>1</sup> H								RMN- <sup>13</sup> C	
	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> Cl) (Vitus, <i>et al.</i> , 2016)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> Cl)				Datos Bibliográficos RMN- <sup>13</sup> C (400 MHz, CD <sub>3</sub> Cl) (Vitus, <i>et al.</i> , 2016)	Datos Experimentales RMN- <sup>13</sup> C (200 MHz, CD <sub>3</sub> Cl)
	$\delta$	<i>f</i>	<i>m</i>	<i>J</i>	$\delta$	<i>f</i>	<i>m</i>	<i>J</i>	$\delta$	$\delta$
2									31.9	31.8
3	3.51	1	<i>m</i>		3.51	1	<i>m</i>		72.0	72.0
4									42.5	42.4
5									140.9	140.9
6	5.34	1	<i>d</i>	5.2	5.34	1	<i>d</i>	5.17	121.9	121.9
7									32.1	32.0
8									32.1	32.1
9									50.3	50.3
10									36.7	36.7
11									21.3	21.2
12									39.9	39.9
13									42.6	42.4
14									56.9	56.9
15									26.3	26.2
16									28.5	28.4
17									56.3	56.2
18	0.67	3	<i>s</i>		0.67	3	<i>s</i>		36.3	36.3
19	1.00	3	<i>s</i>		1.00	3	<i>s</i>		19.2	19.2
20									34.2	34.1
21	0.92	3	<i>d</i>	6.0	0.92	3	<i>d</i>	6.39	26.3	26.3

$\beta$ -Sitosterol										
#	RMN- <sup>1</sup> H								RMN- <sup>13</sup> C	
	Datos Bibliográficos RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> Cl) (Vitus, <i>et al.</i> , 2016)				Datos Experimentales RMN- <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> Cl)				Datos Bibliográficos RMN- <sup>13</sup> C (400 MHz, CD <sub>3</sub> Cl) (Vitus, <i>et al.</i> , 2016)	Datos Experimentales RMN- <sup>13</sup> C (200 MHz, CD <sub>3</sub> Cl)
	$\delta$	f	m	J	$\delta$	f	m	J	$\delta$	$\delta$
22									46.1	46.0
23									23.3	23.2
24									12.2	12.1
25									29.4	29.3
26	0.83	3	d	7.2	0.83	3	d	6.83	20.1	20.0
27	0.79	3	d	7.2	0.81	3	d	6.80	19.6	19.5
28									19.0	18.9
29	0.85	3	d	8.0	0.86	3	d	7.24	12.0	12.0



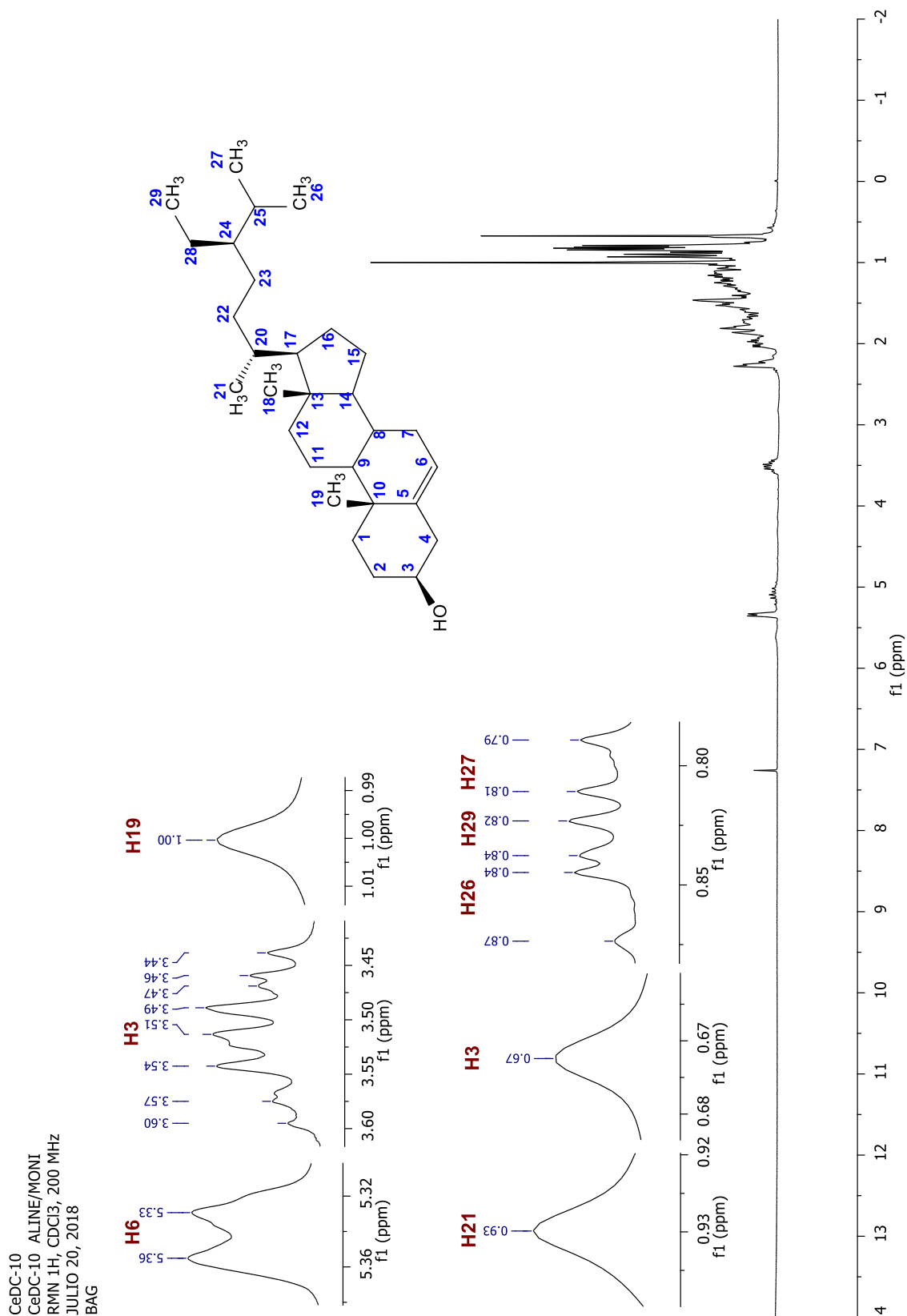
**Características físicas:** Cristales blancos.

**Rf:** 0.400 (85:15 Hexano:Acetona)

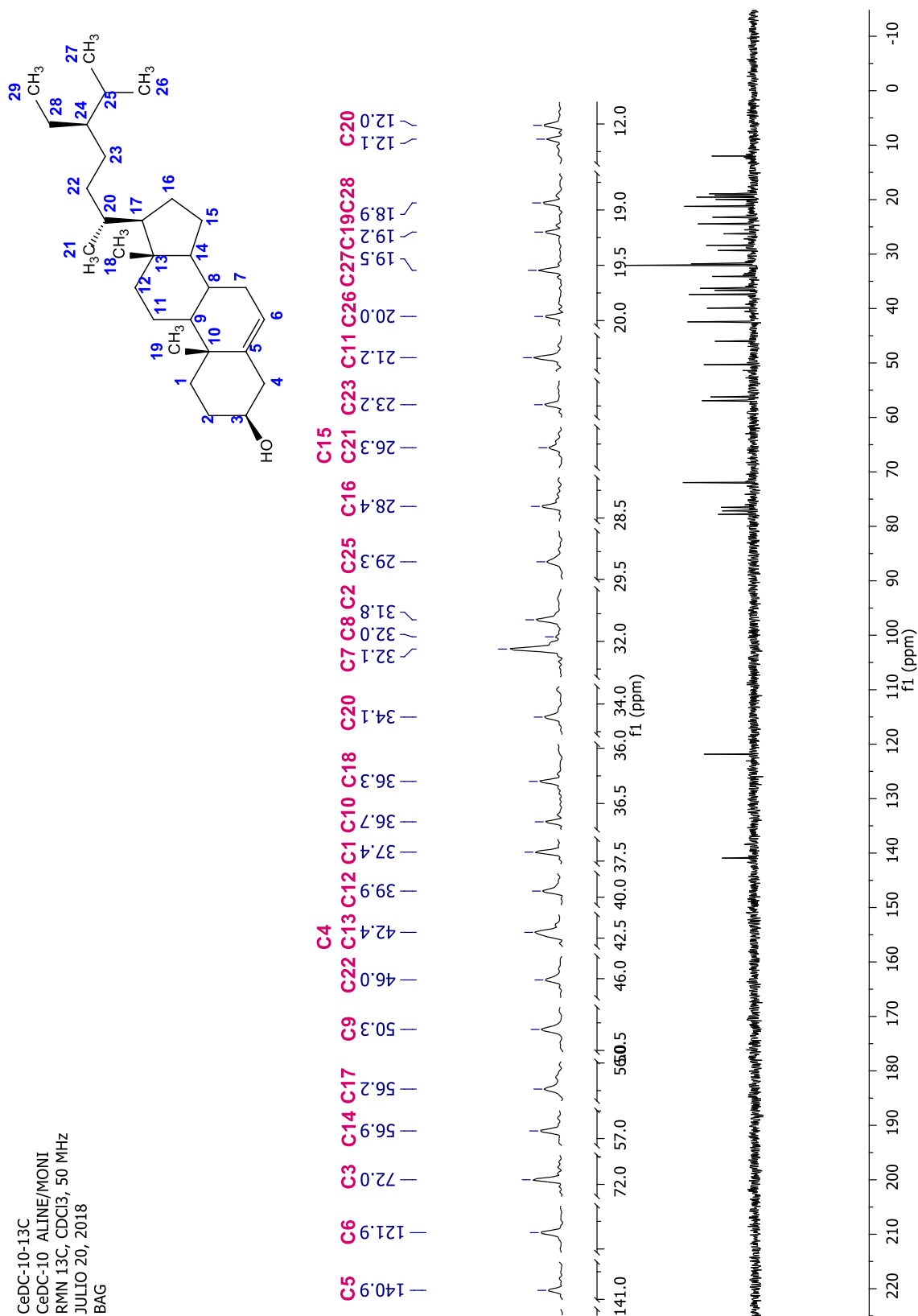
**Cantidad obtenida:** 96 mg

**IR:** Número de ondas (cm<sup>-1</sup>): 3400 (m, ancha, tensión O-H); 2933.14-2864.95 (f, agudas, tensión C-H, alcanos); 1463.42-1375.39 (m, agudas, flexión C-H, alcanos); 1052.72 (f, aguda, tensión C-O).

**Figura 38.** Estructura química de  $\beta$ -sitosterol.



**Espectro 11.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, correspondiente a  $\beta$ -sitosterol.



**Espectro 12.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C, 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, correspondiente a β-sitosterol.

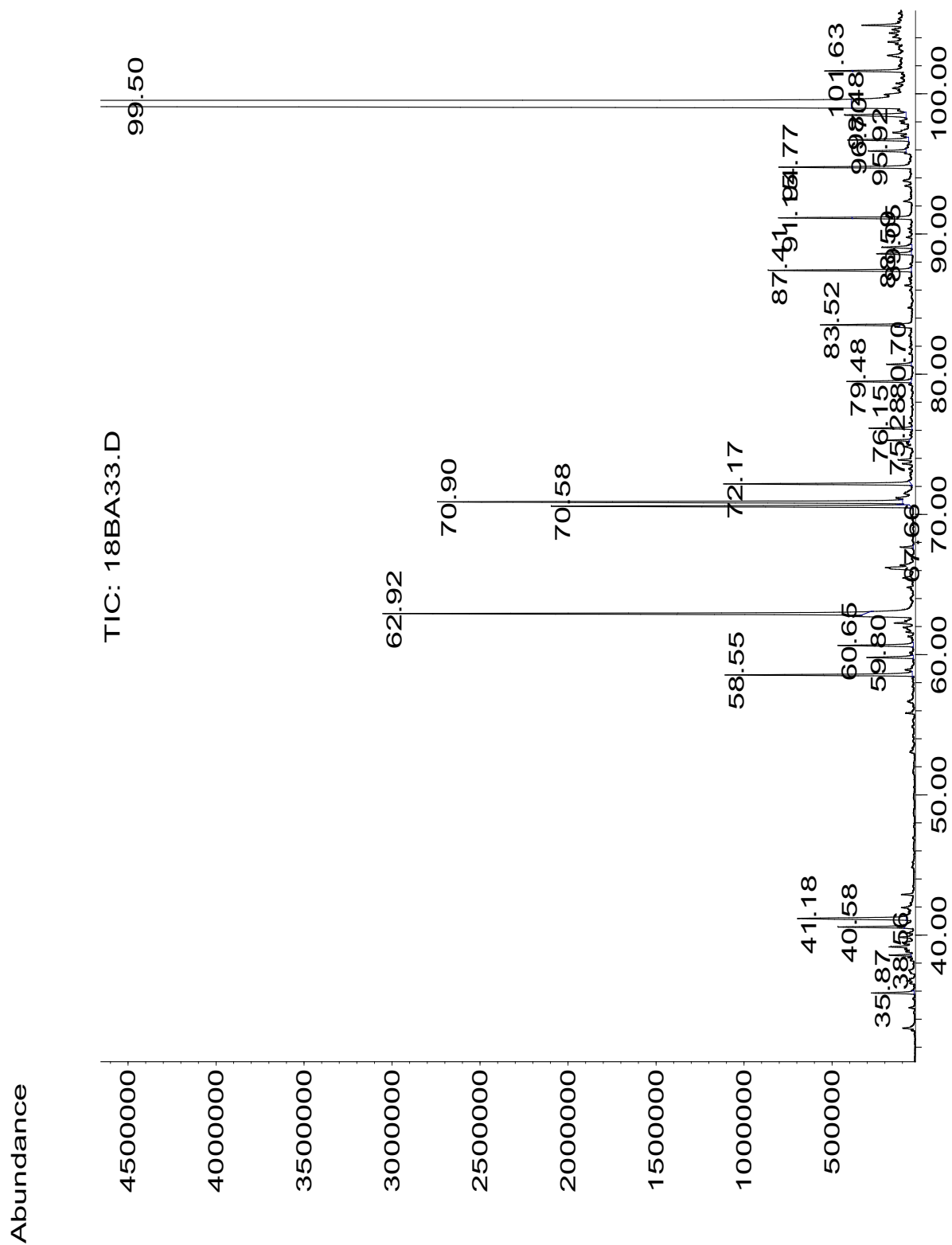
### 7.3.3. Compuestos identificados mediante CG-EM.

En los cromatogramas obtenidos de las muestras *CeDC-01*, *CeDC-02*, *CeDC-03*, *CeDC-04*, *CeDC-05* y *CeDC-07* se observan diferentes picos, con tiempos de retención desde 33.353 hasta 115.856 min (Espectros), los cuales se muestran de manera general en la **Tabla 18**.

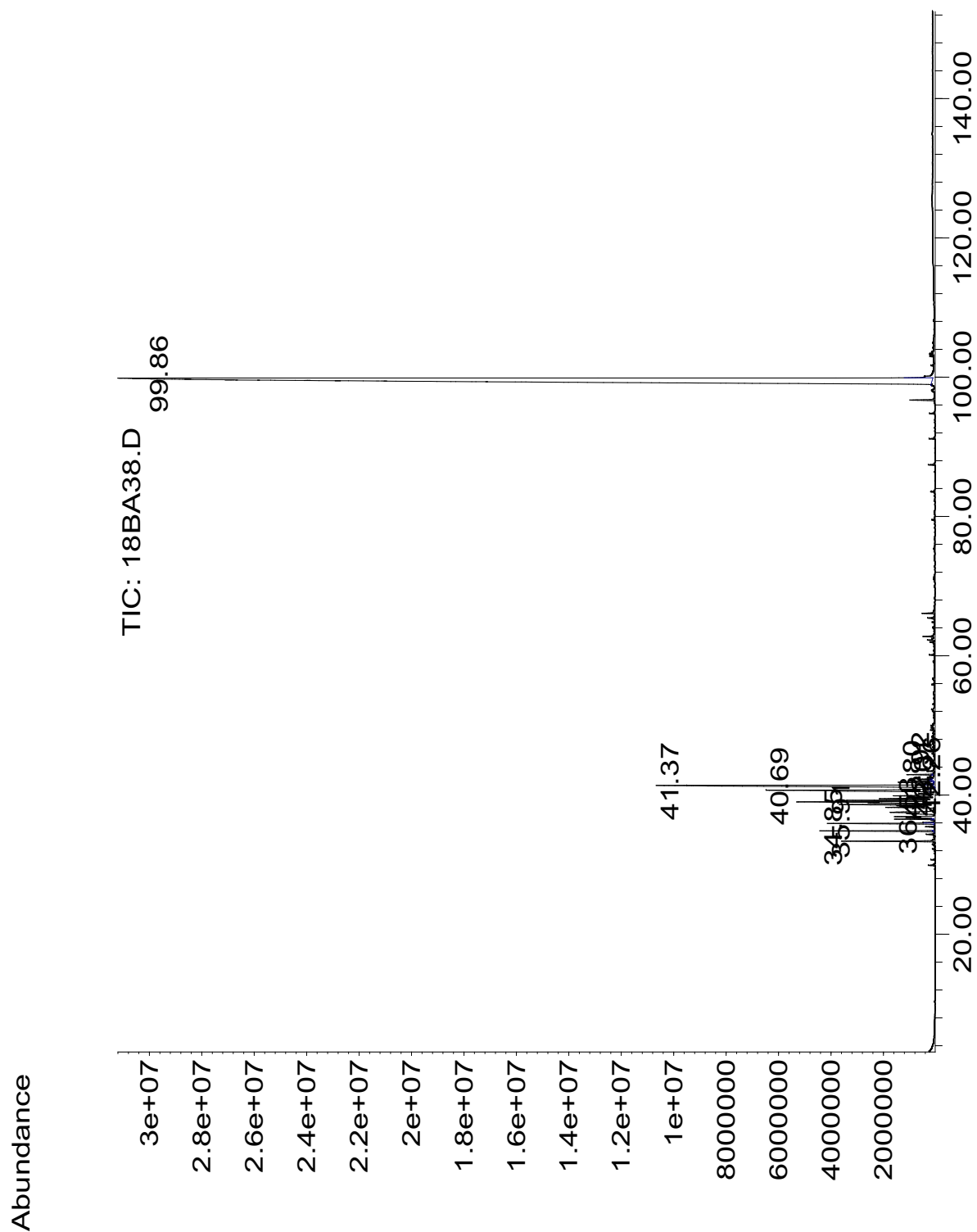
**Tabla 18.** Compuestos identificados mediante CG-EM de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	IRL Experimental	IRL Reportado	Anexos
<b>β-elemeno</b>	33.353	1371	1388	
<b>Isocariofileno</b>	34.844	1394	1394	
<b>τ-elemeno</b>	35.863	1411	1484	
<b>Elixeno</b>	35.889	1411	1445	
<b>β-sesquifelandreno</b>	36.546	1422	1493	
<b>α-cariofileno</b>	36.854	1427	1457	
<b>β-cubebeno</b>	38.569	1456	1432	
<b>Fenol, 3-(1,1-dimetil etil)-4-metoxi-</b>	39.594	1473	1490	
<b>γ-cadineno</b>	40.579	1489	1497	
<b>L-calameneno</b>	41.163	1499	1509	
<b>7-metalozuleno</b>	41.801	1510	1486	
<b>Cadala-1 (10),3,8-trieno</b>	42.260	1518	1562	
<b>γ-Gurjuneno</b>	42.891	1528	1485	
<b>1,6,10-dodecatrien-3-ol-3,7,11-trimetil-</b>	43.817	1545	1562	
<b>Espatulanol</b>	44.172	1551	1572	
<b>Óxido de cariofileno</b>	44.362	1554	1578	
<b>Ledol</b>	45.538	1575	1573	

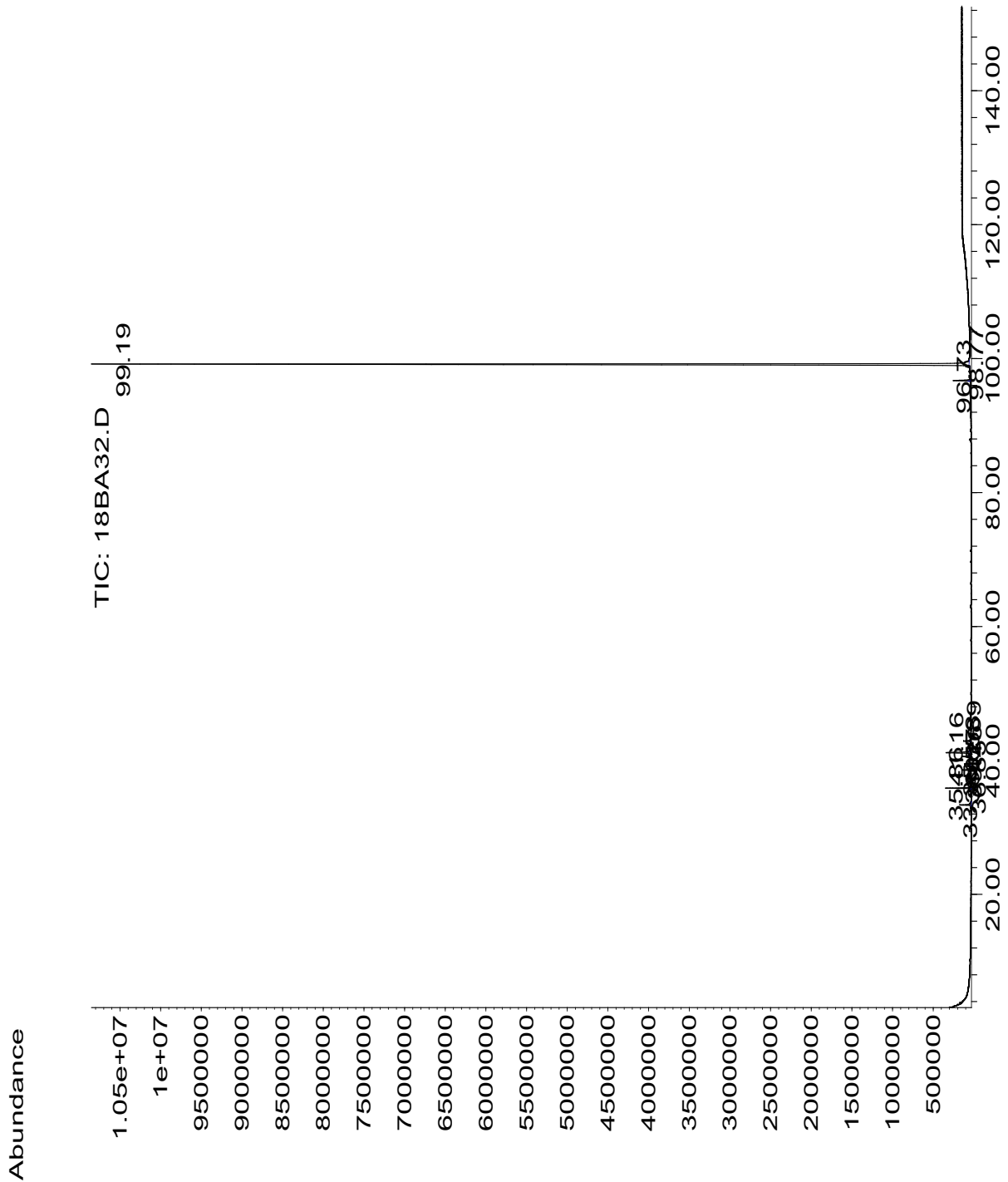
Compuesto	Tiempo de Retención (min)	IRL Experimental	IRL Reportado	Anexos
<b>Cubenol</b>	47.062	1601	1642	
<b>Tau-Cadinol</b>	47.804	1615	1632	
<b><math>\alpha</math>-biabolol</b>	50.300	1660	1660	
<b>Palmitato de metilo</b>	62.965	1905	1905	
<b>3,7,11,15-tetrametil hexadeca-1,6,10,14-tetraen-3-ol</b>	67.648	2003	2008	
<b>Éster metílico del ácido 8,11-octadecadienoico</b>	70.591	2067	2072	
<b>Linoleato de metilo</b>	70.637	2068	2069	
<b>Éster metílico del ácido 10-octadecenoico</b>	70.906	2074	2100	
<b>Ácido linoléico</b>	70.946	2075	2095	
<b>Estearato de metilo</b>	72.194	2102	2102	
<b>Fitol</b>	76.155	2193	2122	
<b>Éster metílico del ácido eicosanoico</b>	80.720	2301	2301	
<b>Éster metílico del ácido docosanoico</b>	88.622	2501	2498	
<b>Ftalato de bis(2-etilhexilo)</b>	89.161	2515	2509	
<b>Escualeno</b>	99.145	2791	2847	
<b>All-trans-Escualeno</b>	99.572	2804	2814	
<b>1,6,10,14,18,22-tetracosahexa en-3-ol, 2,6,10,15,19,23-hexametil-, (all-E)-</b>	102.613	2894	3030	
<b>Vitamina E</b>	108.781	3085	3138	
<b><math>\beta</math>-simiarenol</b>	115.856	3318	3426	



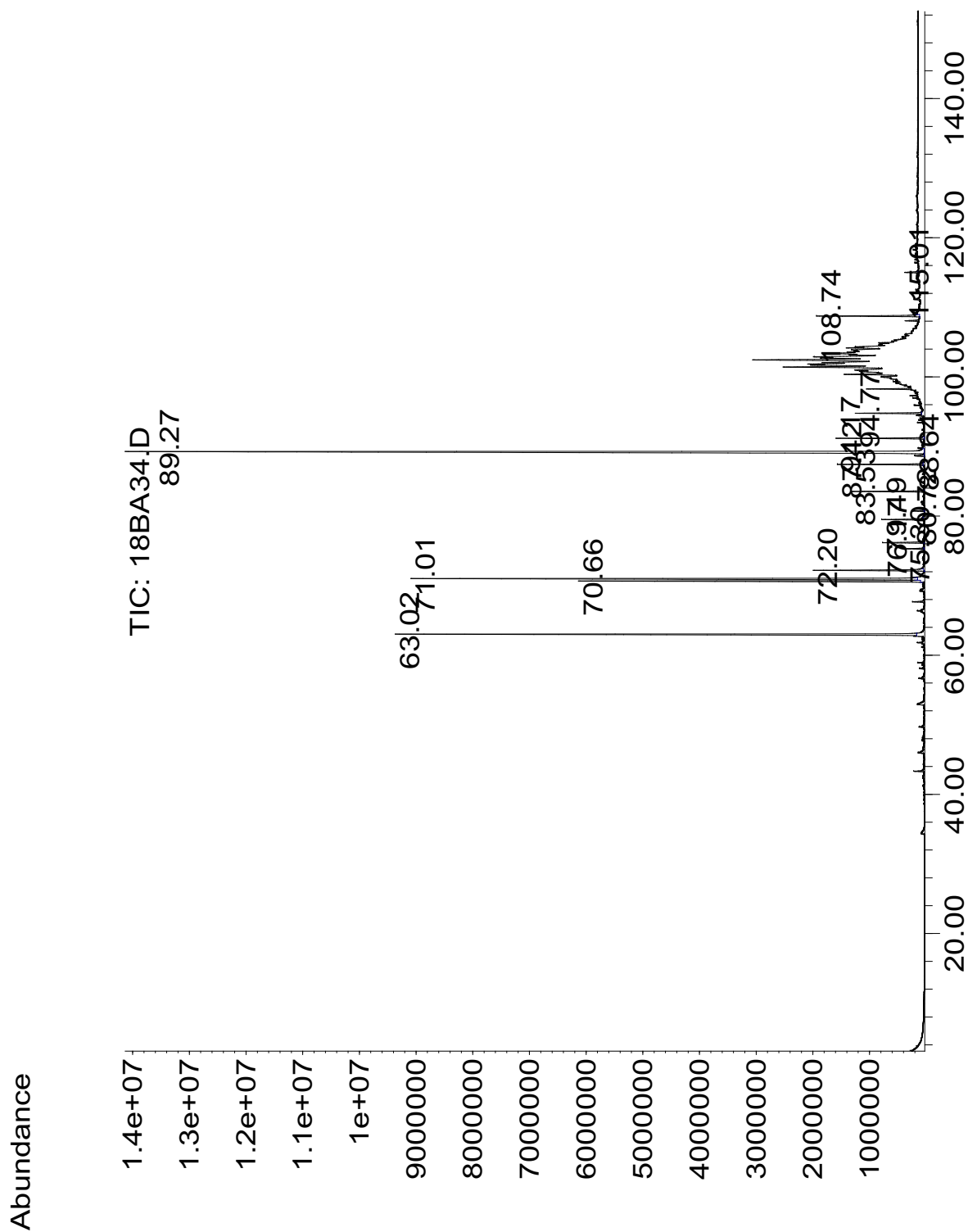
**Cromatograma 1.** Cromatograma de la muestra *CeDC-01*.



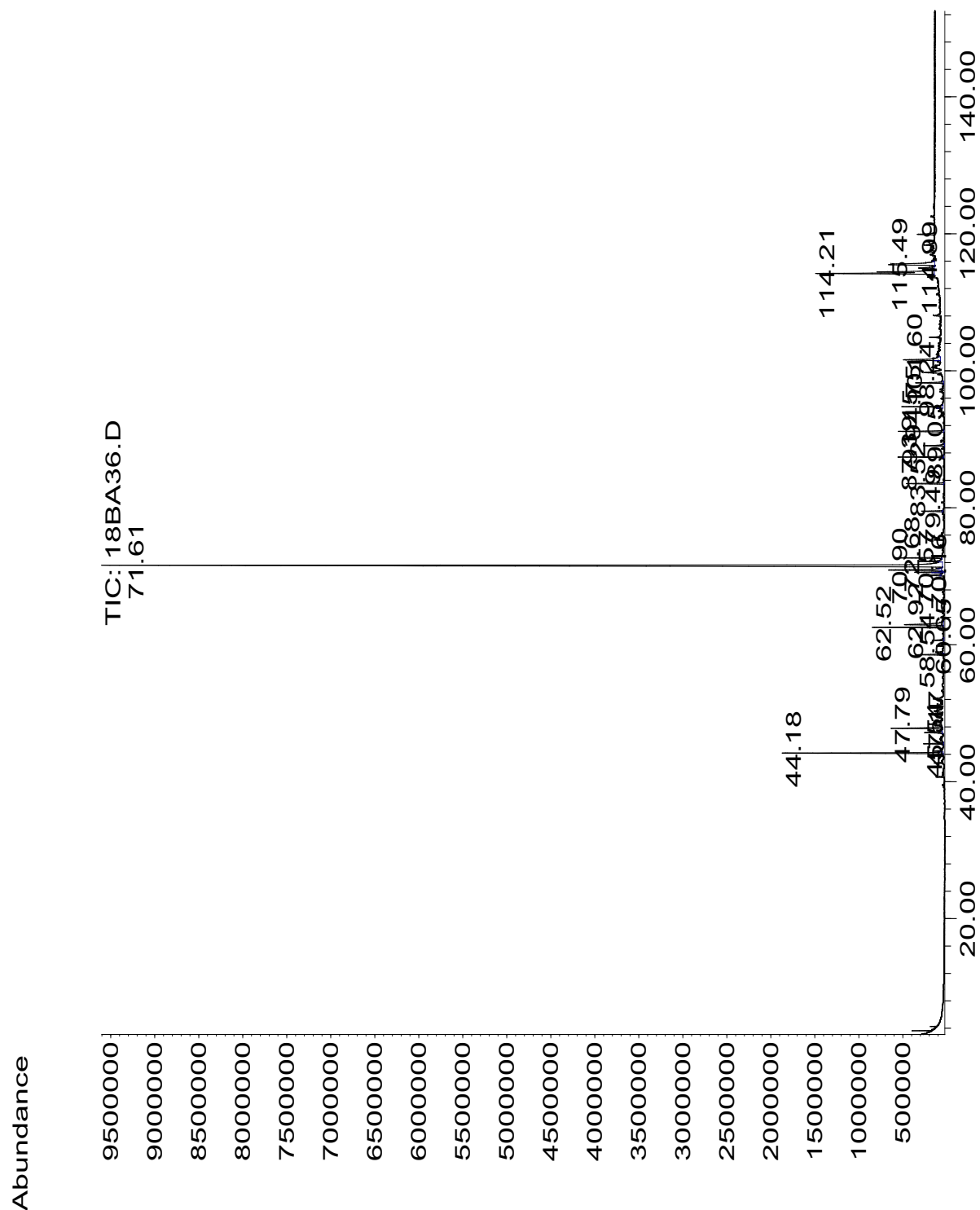
**Cromatograma 2.** Cromatograma de la muestra *CeDC-02*.



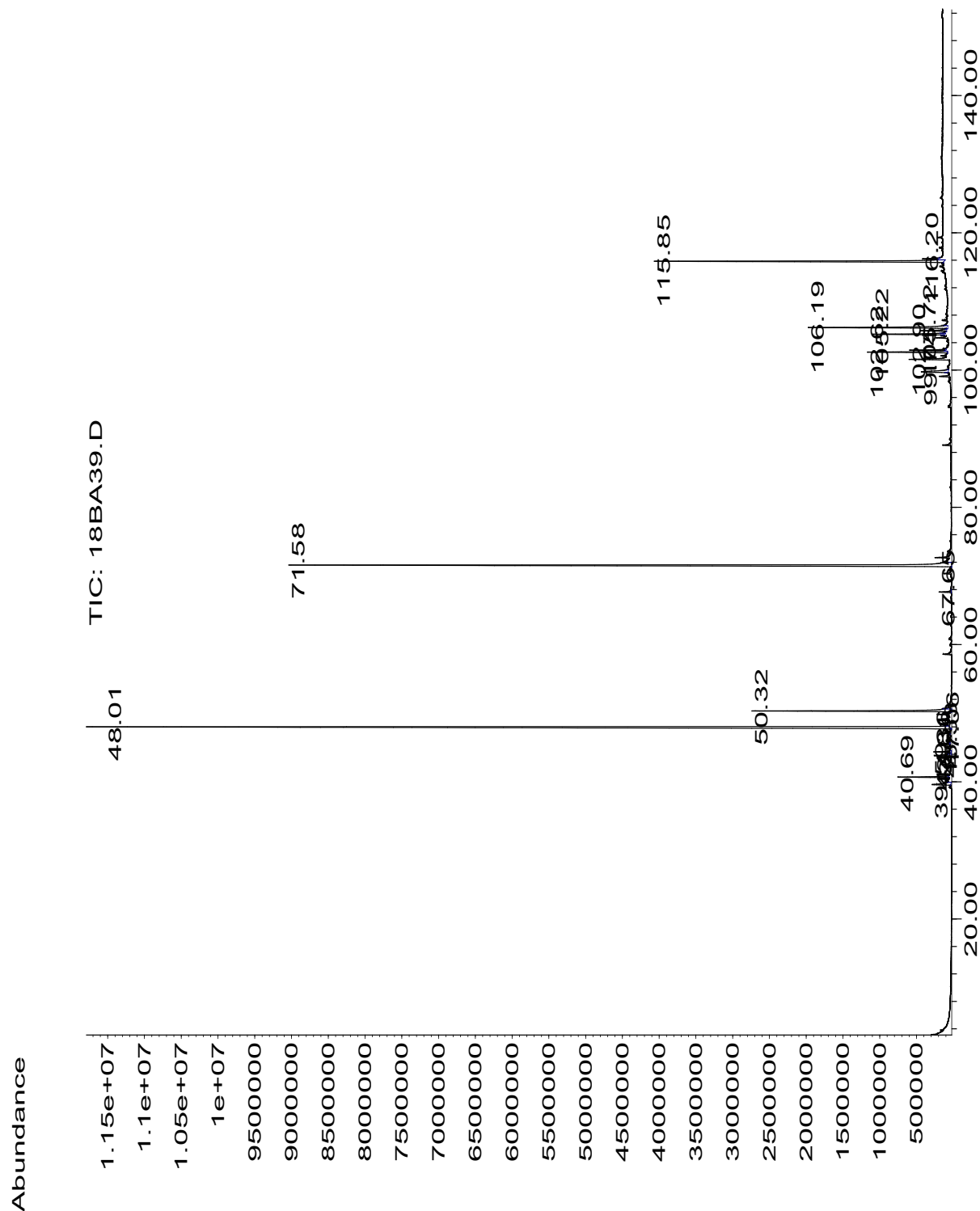
**Cromatograma 3.** Cromatograma de la muestra *CeDC-03*.



**Cromatograma 4.** Cromatograma de la muestra *CeDC-04*.



Cromatograma 5. Cromatograma de la muestra *CeDC-05*.



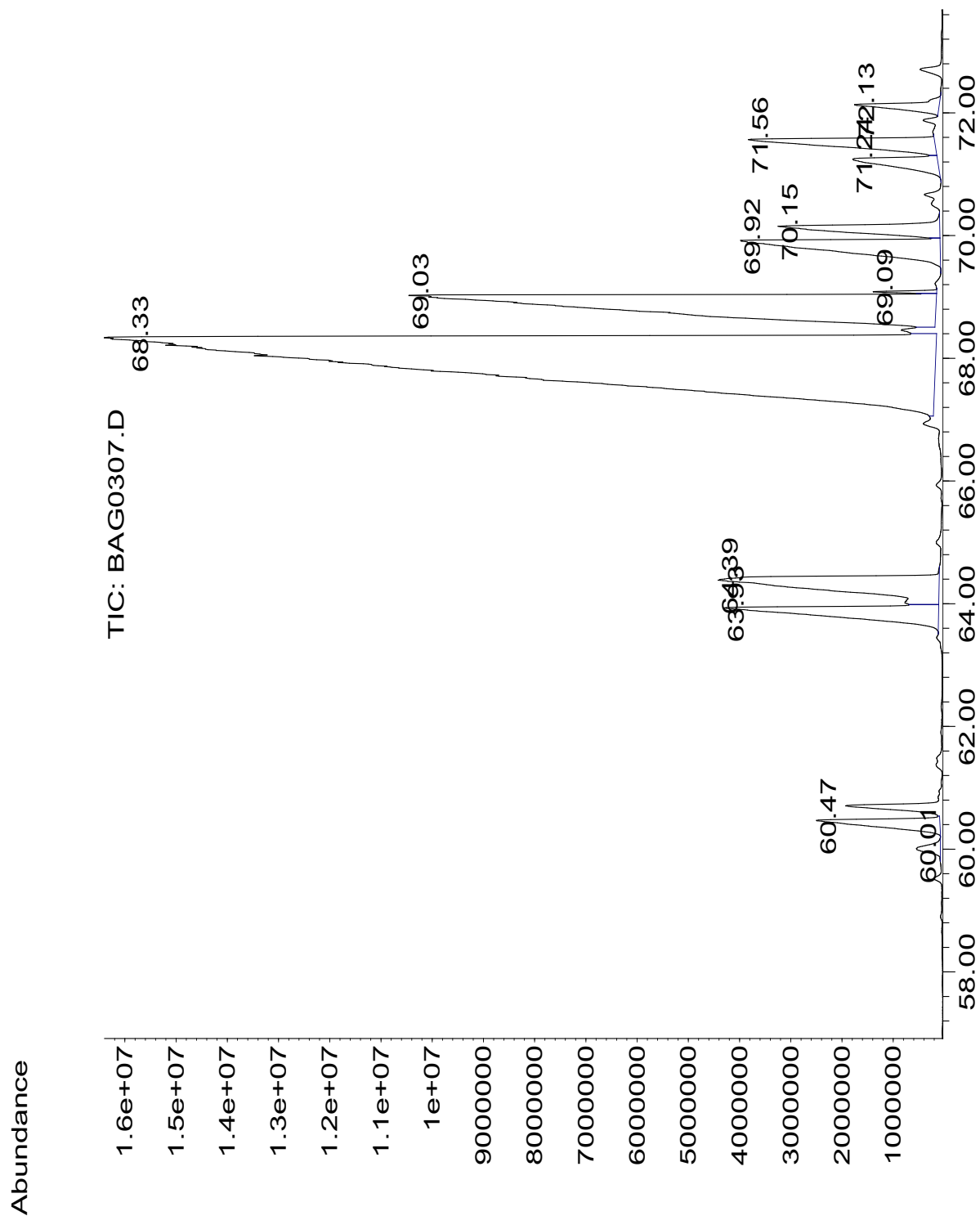
Cromatograma 6. Cromatograma de la muestra *CeDC-07*.

#### 7.4. Fracción de Butanol.

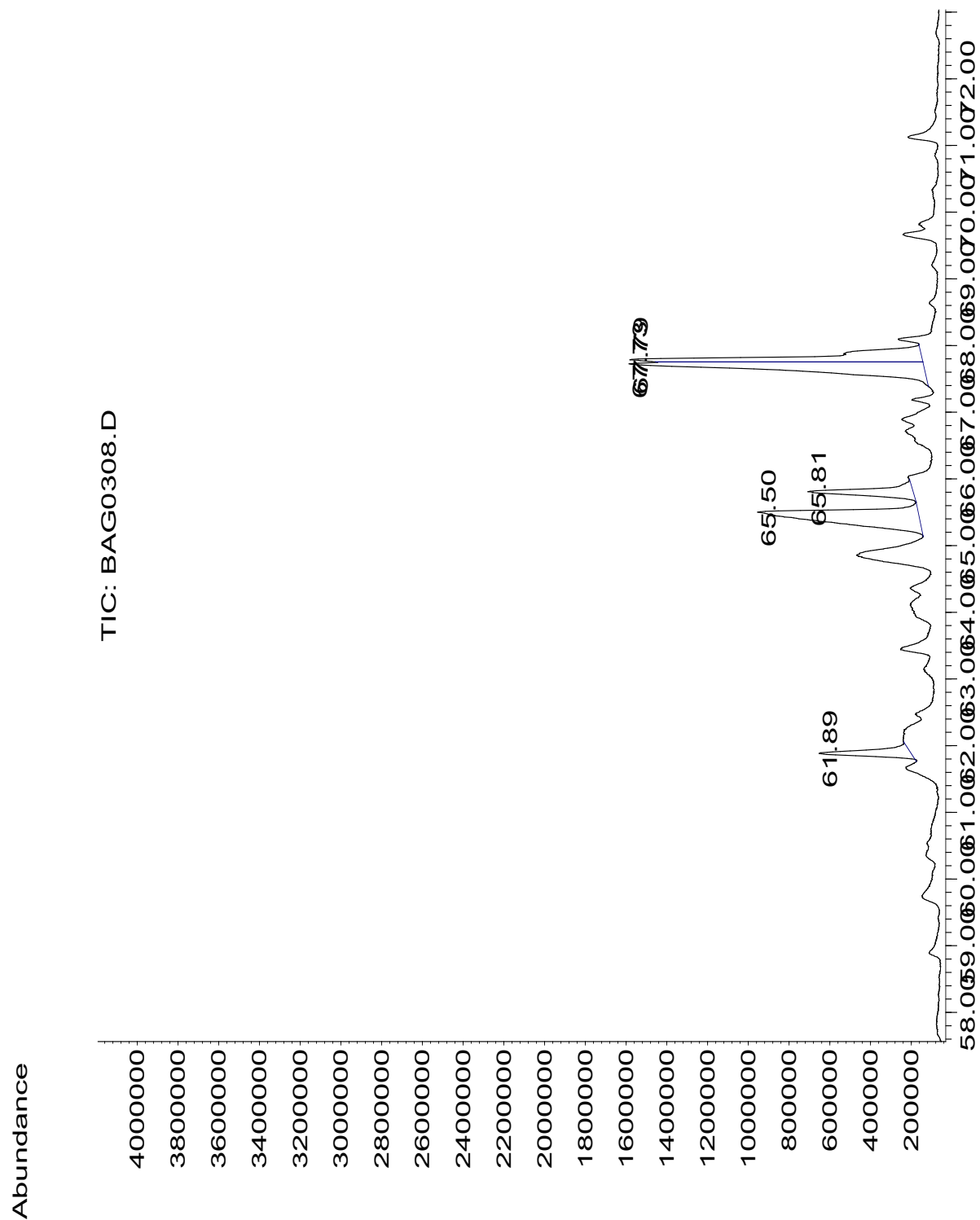
Después de la reacción de acetilación de la fracción de BuOH, se realizó una CC del producto acetilado, tal como se indica en la parte experimental. A partir de este proceso cromatográfico se obtuvieron dos fracciones de interés, identificadas con las claves **BAG03-007** y **BAG03-008**, y mediante CG-ES se identificaron los compuestos acetilados enlistados en la tabla 19.

**Tabla 19.** Compuestos identificados mediante CG-EM de la fracción de BuOH.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	IRL Experimental	IRL Reportado
<b>Xylitol 1,2,3,4,5-penta-O-acetil</b>	60.009	1845	1744
<b>Iditol hexaacetato</b>	64.475	1854	1829
<b>Metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil <math>\beta</math>-D Glucopiranosido</b>	63.930	1925	--
<b>Pinitol pentaacetato</b>	64.850	1944	1885
<b>Myo-inositol hexaacetato</b>	71.248	2082	2073



**Cromatograma 7.** Cromatograma de la muestra **BAG03-007**.



**Cromatograma 8.** Cromatograma de la muestra *BAG03-008*.

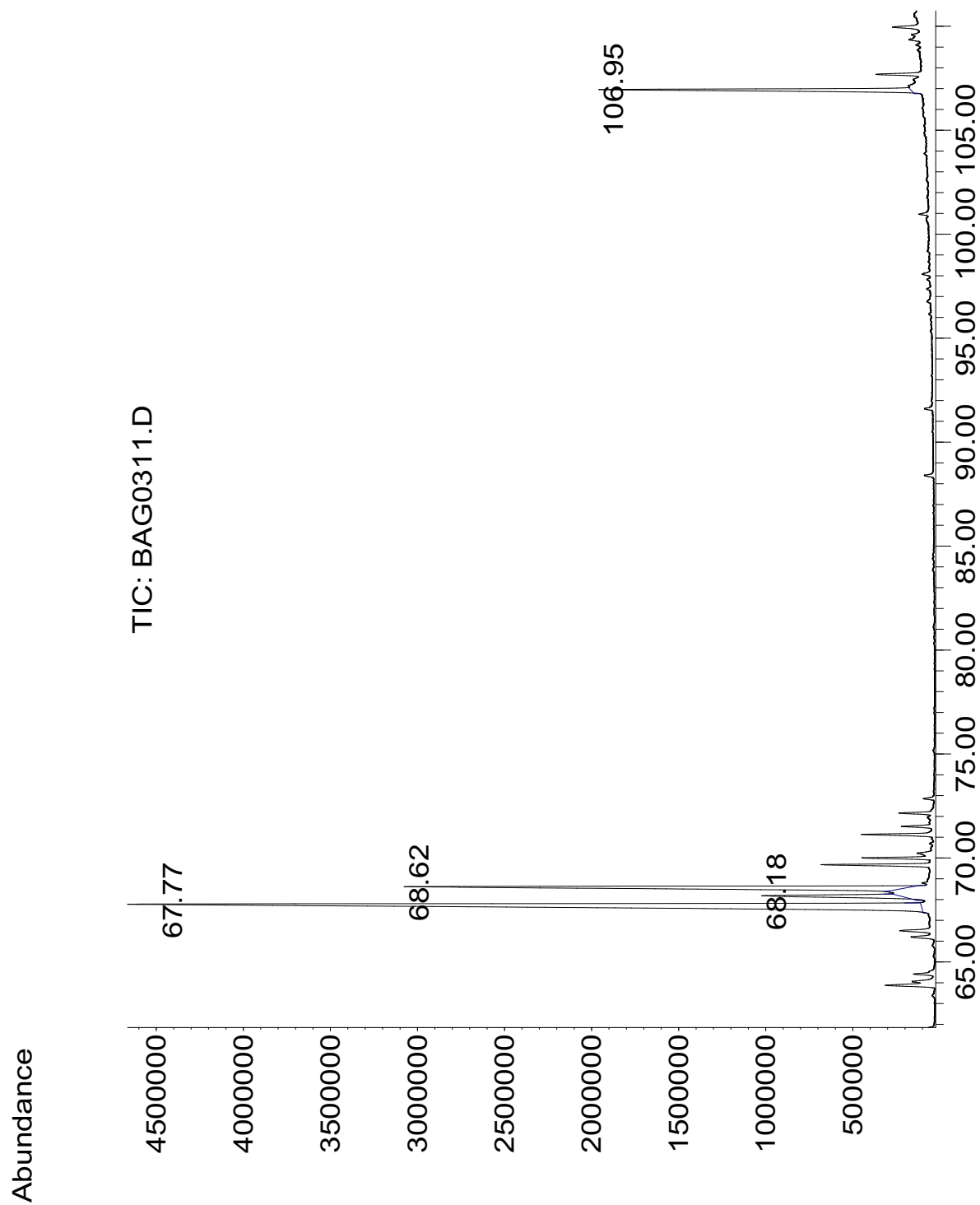
### 7.5. Residuo Acuoso.

Debido a la alta polaridad del residuo acuoso, se decidió realizar una reacción de acetilación. Al término de la reacción, se recuperó el producto acetilado, obteniendo dos productos diferentes, el primero correspondiente al precipitado formado durante el proceso, y el segundo es el producto obtenido de las extracciones efectuadas al sobrenadante restante. Ambos fueron identificados con las claves **BAG03-011** y **BAG03-012**, respectivamente, para ser analizadas mediante CG-EM.

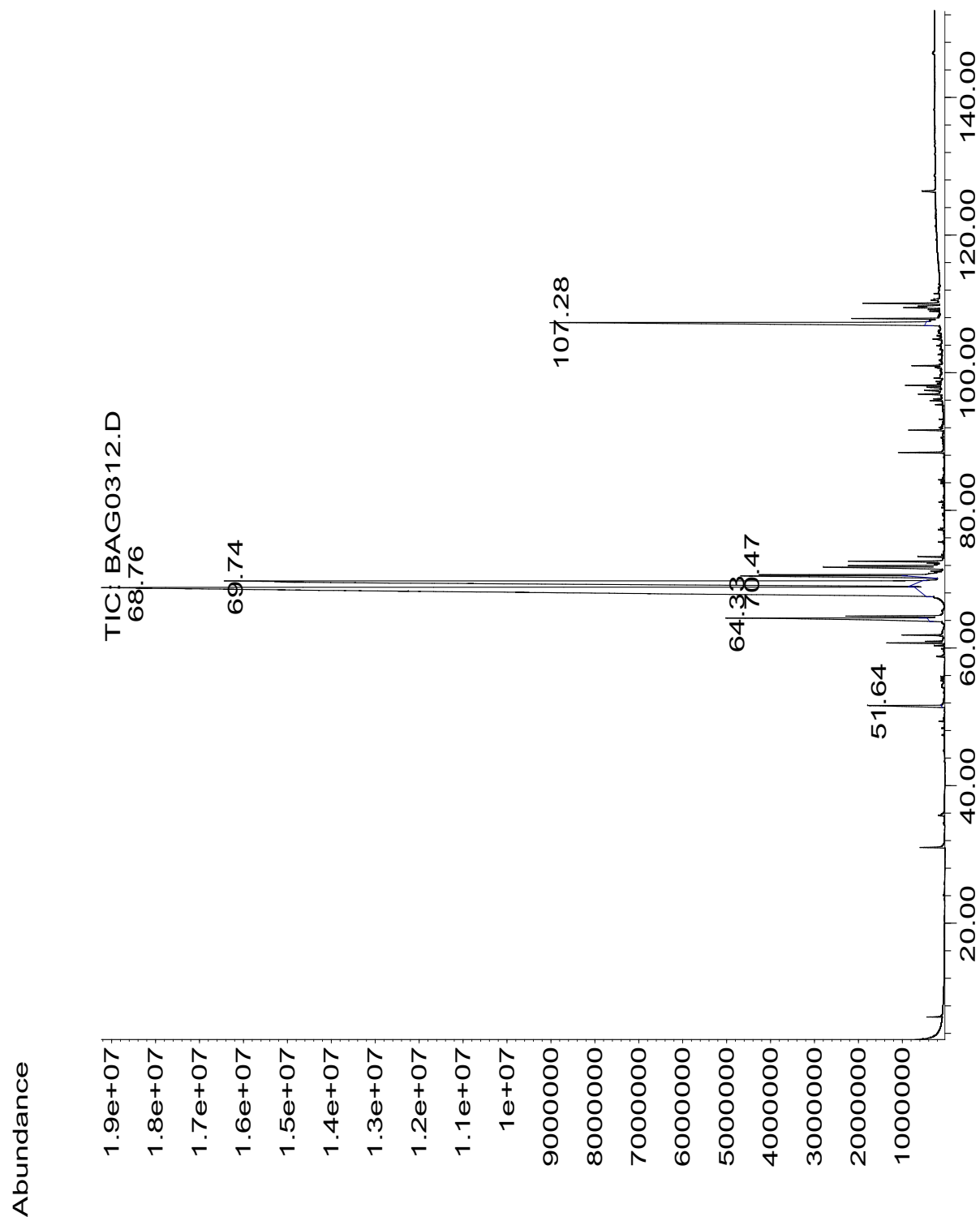
Los cromatogramas obtenidos sugieren la presencia de cinco compuestos diferentes, con tiempos de retención entre 57.64 y 107.28 min (**Tabla 20**).

**Tabla 20.** Compuestos identificados mediante CG-EM del residuo acuoso.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	IRL Experimental	IRL Reportado
<b>Pinitol pentaacetato</b>	67.773	2005	1885
<b><math>\beta</math>-D Manopiranosido, metil tetraacetato</b>	64.338	1933	--
<b>Metil 2,3,4,6-tetra-O-acetil <math>\alpha</math>-D Glucopiranosido</b>	70.473	2065	1455
<b>Sacarosa octaacetato</b>	107.283	2337	--



**Cromatograma 9.** Cromatograma de la muestra **BAG03-011**.



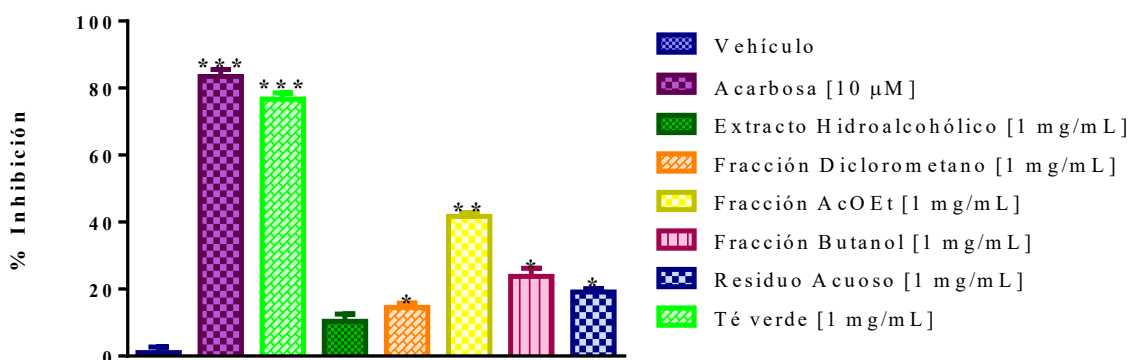
**Cromatograma 10.** Cromatograma de la muestra *BAG03-012*.

## 7.6. Determinación de la actividad antihiper glucemiante.

### 7.6.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de las enzimas $\alpha$ -glucosidasas intestinales.

Se realizó una evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria del extracto hidroalcohólico y las fracciones obtenidas de su bipartición sobre la actividad de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales. El extracto y fracciones fueron evaluados a una concentración exploratoria de 1 mg/mL, utilizando acarbosa como referencia a una concentración de 5  $\mu$ g/mL, así como el extracto acuoso de *Camellia sinensis* (Té verde) a una concentración de 1 mg/mL.

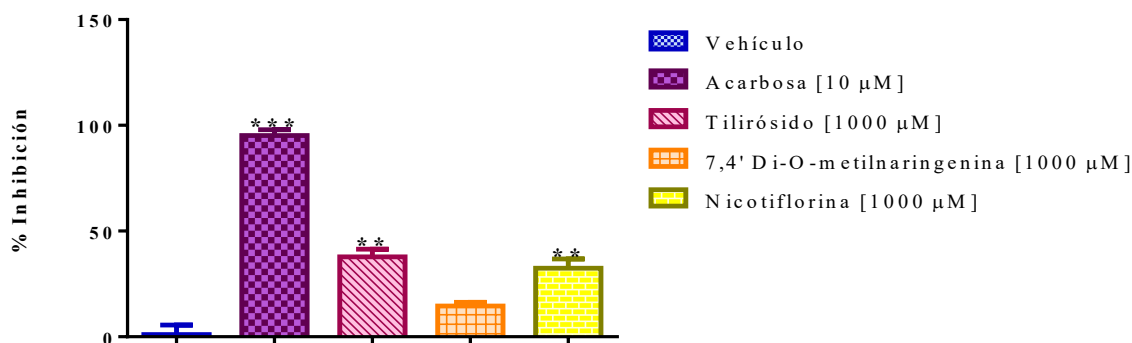
Al comparar los resultados obtenidos de cada una de las muestras evaluadas con respecto al vehículo, se observó que todos los extractos inhiben de forma moderada la actividad de las enzimas, sin embargo, únicamente las fracciones de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $14.55 \pm 1.23$  %), AcOEt ( $41.70 \pm 1.06$  %), butanol ( $23.75 \pm 2.47$  %) y el residuo acuoso ( $19.12 \pm 1.00$  %), fueron estadísticamente significativas (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Porcentaje de inhibición de Acarbosa [10  $\mu$ M] ( $83.46 \pm 2.07$  %), Extracto Acuoso de Té verde (*Camellia sinensis*) ( $76.69 \pm 1.82$  %), Extracto Hidroalcohólico ( $10.36 \pm 2.21$  %), Fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $14.55 \pm 1.23$  %), Fracción de AcOEt ( $41.70 \pm 1.06$  %), Fracción de BuOH ( $23.75 \pm 2.47$  %), y Residuo Acuoso ( $19.12 \pm 1.00$  %) [1 mg/mL] sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE de n=6, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*<0.001 vs vehículo

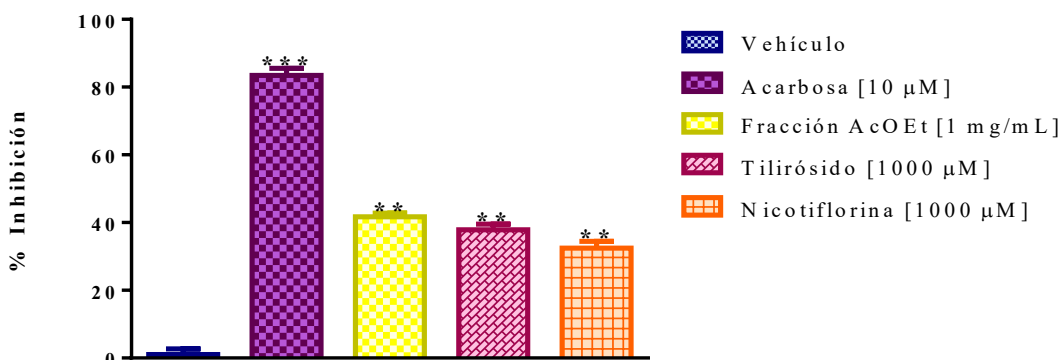
Con base en lo observado en el ensayo exploratorio del extracto hidroalcohólico y sus fracciones, se decidió evaluar la actividad inhibitoria de sus metabolitos mayoritarios sobre las enzimas digestivas, y con ello determinar si estos son los responsables de la moderada inhibición mostrada por las fracciones. Debido a que existen reportes previos sobre la actividad inhibitoria sobre estas enzimas de rutina e isoquercetina, en el presente trabajo, se evaluaron los flavonoides tilirósido, nicotiflorina y 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina a una concentración exploratoria de 1000  $\mu\text{M}$ .

Los resultados obtenidos fueron comparados con el vehículo, observando que tilirósido ( $37.84 \pm 1.67 \%$ ) y nicotiflorina ( $32.49 \pm 1.98 \%$ ) inhiben de forma moderada la actividad enzimática a la concentración evaluada (**Gráfica 2**). Es importante señalar que estos dos flavonoides fueron aislados de la fracción de AcOEt, por lo que se puede sugerir que estos compuestos son responsables de la moderada inhibición mostrada por esta fracción.



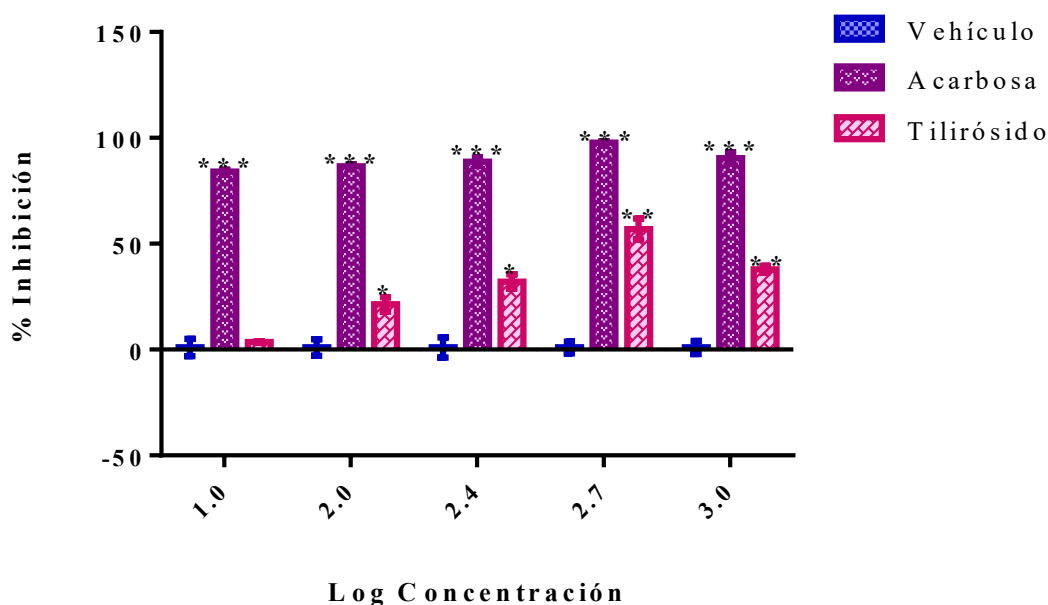
**Gráfica 2.** Porcentaje de inhibición de **Acarbosa [10  $\mu\text{M}$ ]** ( $83.46 \pm 2.07 \%$ ), **Tilirósido** ( $37.84 \pm 1.67 \%$ ), **7, 4'-di-*O*-metilnaringenina** ( $14.59 \pm 1.71 \%$ ) y **Nicotiflorina** ( $32.49 \pm 1.98 \%$ ) [**1000  $\mu\text{M}$ ]** sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE de  $n=6$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $<0.001$  vs vehículo.

La **Gráfica 3** compara los porcentajes de inhibición de la fracción de AcOEt ( $41.70 \pm 1.06$  %) con sus metabolitos mayoritarios tilirósido ( $37.84 \pm 1.67$  %) y nicotiflorina ( $32.49 \pm 1.98$  %), observando valores similares en todos los casos, con lo cual se demuestra que estos compuestos son responsables de la actividad mostrada por la fracción de AcOEt.



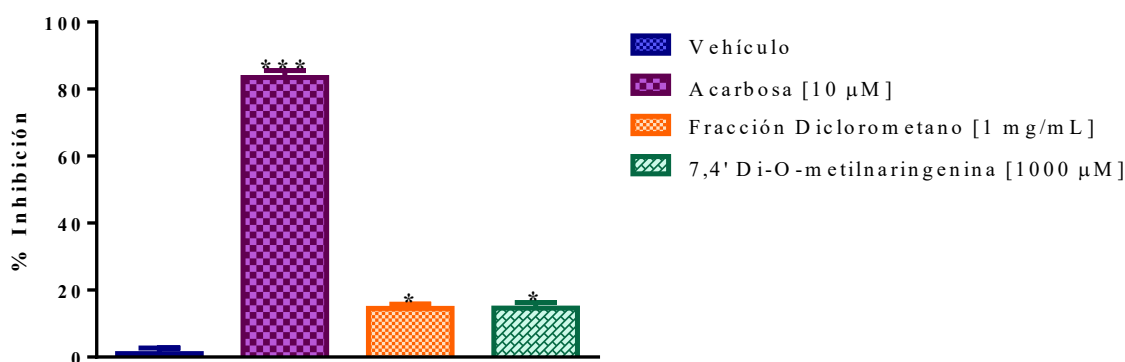
**Gráfica 3.** Porcentaje de inhibición de **Acarbosa [10 µM]** ( $83.46 \pm 2.07$  %), **Fracción de AcOEt [1 mg/mL]** ( $41.70 \pm 1.06$  %), **Tilirósido** ( $37.84 \pm 1.67$  %), y **Nicotiflorina** ( $32.49 \pm 1.98$  %) [**1000 µM**] sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE de  $n=6$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $<0.001$  vs vehículo.

Adicionalmente, al observar que el flavonoide tilirósido tuvo la mayor actividad de los dos compuestos anteriores, se decidió evaluar su actividad en cinco diferentes concentraciones entre 10 y 1000 µM. Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en la **Gráfica 4**, en la cual se observa que la actividad inhibitoria de este compuesto depende de la concentración. Sin embargo, se observa una disminución de la actividad entre la concentración de 600 µM ( $56.92 \pm 5.01$  %) y 1000 µM ( $37.84 \pm 1.67$  %), sugiriendo una posible saturación enzimática en esta última concentración.



**Gráfica 4.** Porcentaje de inhibición de **Acarbosa** [10  $\mu\text{M}$ ] ( $84.156 \pm 0.70$  %), [100  $\mu\text{M}$ ] ( $86.50 \pm 0.90$  %), [300  $\mu\text{M}$ ] ( $88.77 \pm 2.02$  %), [600  $\mu\text{M}$ ] ( $97.82 \pm 0.61$  %), [1000  $\mu\text{M}$ ] ( $90.37 \pm 2.68$  %), **Tilirósido** [10  $\mu\text{M}$ ] ( $3.63 \pm 0.33$  %), [100  $\mu\text{M}$ ] ( $21.34 \pm 3.41$  %), [300  $\mu\text{M}$ ] ( $32.09 \pm 3.40$  %), [600  $\mu\text{M}$ ] ( $56.92 \pm 5.01$  %), [1000  $\mu\text{M}$ ] ( $37.84 \pm 1.67$  %) sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE de  $n=6$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs vehículo.

Finalmente, se evaluó la actividad de 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina, metabolito mayoritario de la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . En la **Gráfica 5**, se observa que tanto el flavonoide como la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , presentan un efecto similar, con porcentajes de 14.55 y 14.59 respectivamente; sugiriendo que este compuesto es el responsable del moderado efecto mostrado por la fracción.



**Gráfica 5.** Porcentaje de inhibición de Acarbosa [10 µM] ( $83.46 \pm 2.07$  %), Fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1 mg/mL] ( $14.55 \pm 1.23$  %), y 7, 4'-di-O-metilnaringenina [1000 µM] ( $14.59 \pm 1.71$  %) sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE de  $n=6$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $<0.001$  vs vehículo.

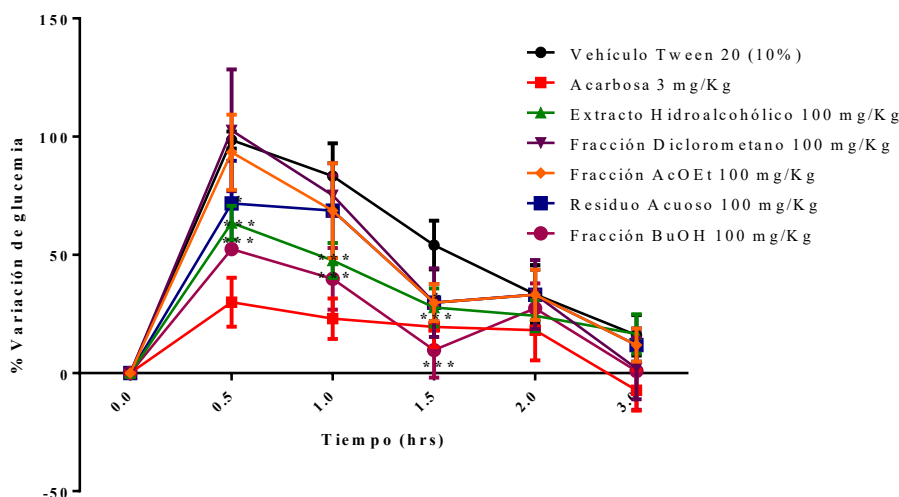
### 7.6.2. Curva de Tolerancia a Sacarosa.

La sacarosa, comúnmente conocida como azúcar de mesa, es un disacárido constituido por una molécula de glucosa y una de fructosa, unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos  $\alpha$  1→4; por lo que para su absorción, se requiere la actividad de enzimas digestivas, como las  $\alpha$ -glucosidasas, las cuales hidrolizan los enlaces interglicosídicos, y de este modo se favorece la liberación y absorción de glucosa, ocasionando un pico hiperglucémico pocos minutos después de la ingesta de este disacárido. Actualmente, existen fármacos inhibidores de estas enzimas, como la acarbosa, que es un pseudo-tetrasacárido constituido por un grupo acarviosina y una maltasa, unidos mediante un enlace  $\alpha$  1→4; al ser un inhibidor competitivo, se une directamente al sitio catalítico de las enzimas, impidiendo la hidrólisis de los carbohidratos y con ello el pico hiperglucémico.

En el presente trabajo, se realizó una curva de tolerancia a sacarosa del extracto hidroalcohólico y de sus fracciones obtenidas por bipartición, con la finalidad de determinar una posible actividad antihiperglucémica.

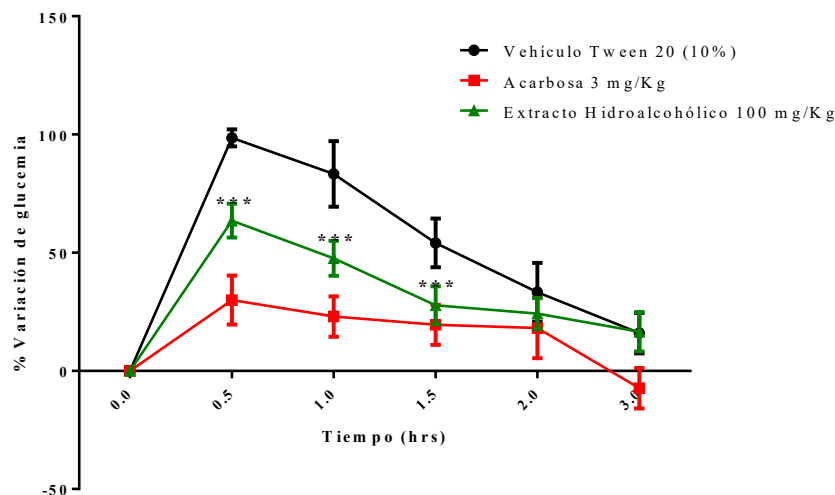
Todas las muestras fueron evaluadas a una dosis de 100 mg/Kg, utilizando acarbosa a una dosis de 3 mg/Kg como control positivo, y debido a la baja solubilidad acuosa del extracto y sus fracciones, se utilizó como vehículo Tween 20 al 10%.

Los resultados obtenidos de este bioensayo se muestran en la **Gráfica 6**, en donde se observa que tanto el extracto hidroalcohólico como la fracción de BuOH y el residuo acuoso, disminuyen significativamente el pico hiperglucémico al ser comparados con el vehículo, con áreas bajo la curva de glucosa de 198.2, 67.5 y 72.5 mmol\*h/L, respectivamente.



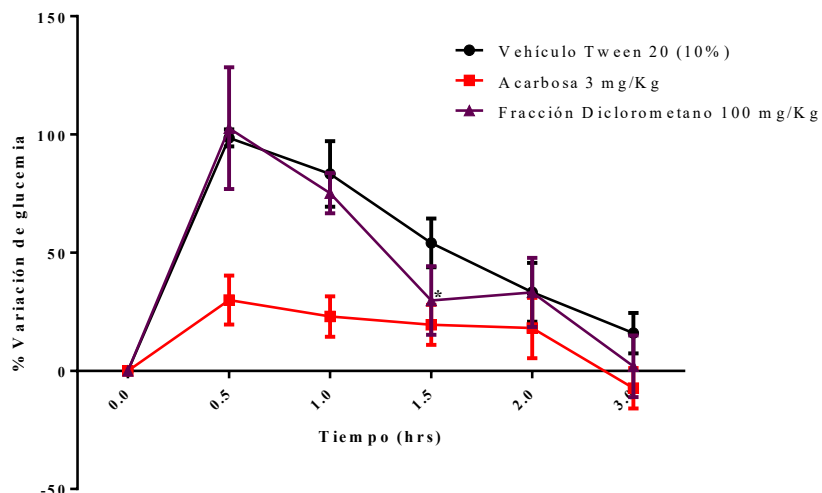
**Gráfica 6.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos del Extracto Hidroalcohólico ( $ABC_{Gluc} = 198.9$  mmol\*h/L) y sus fracciones de  $CH_2Cl_2$  ( $ABC_{Gluc} = 235.2$  mmol\*h/L), AcOEt ( $ABC_{Gluc} = 250.0$  mmol\*h/L), BuOH ( $ABC_{Gluc} = 67.5$  mmol\*h/L) y el Residuo Acuoso ( $ABC_{Gluc} = 72.5$  mmol\*h/L), evaluados a una dosis de 100 mg/Kg, y acarbosa a una dosis de 3 mg/Kg. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE;  $n=6$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs vehículo, determinado mediante un ANADEVa de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni.

En la **Gráfica 7**, se observa que el extracto hidroalcohólico disminuye significativamente la variación de glucemia a la hora 0.5, y este efecto se mantiene sostenido durante todo el ensayo, observando incluso, en las horas 1.5 y 2 un efecto similar a la acarbosa. Estos resultados indican que el extracto hidroalcohólico sí tiene un efecto antihyperglucémico, sugiriendo una inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales.



**Gráfica 7.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos de la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\text{ABC}_{\text{Gluc}} = 235.2 \text{ mmol}\cdot\text{h/L}$ ) y acarbose, evaluados a dosis de 100 mg/Kg y 3 mg/Kg, respectivamente. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE;  $n=6$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs vehículo, determinado mediante un ANADEVIA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni.

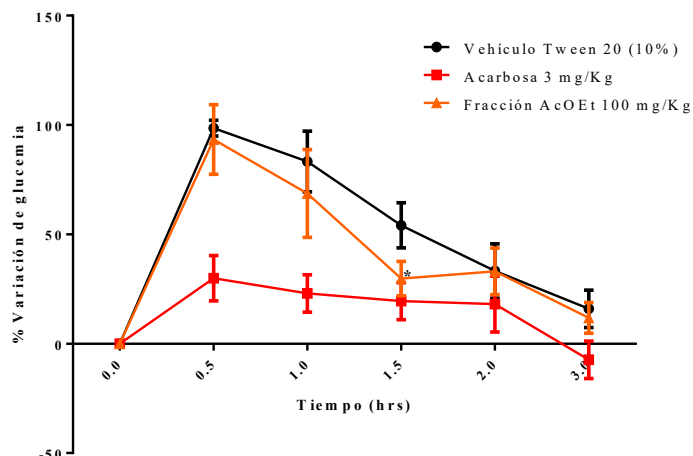
Por otro lado, en investigaciones previas se ha reportado que el flavonoide naringenina inhibe de manera significativa la actividad de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas (Priscilla, *et al.*, 2014 y Sun, *et al.*, 2017), por lo que sería de esperar que sus derivados posean cierta actividad inhibitoria sobre estas enzimas, y observar algún efecto antihiperglucemiante *in vivo*. Sin embargo, al evaluar la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  mediante la Curva de Tolerancia a Sacarosa (Gráfica 8), se observa que esta tuvo un comportamiento similar al vehículo, es decir, no se observa una disminución significativa en los valores de glucemia, a pesar de que el constituyente mayoritario de esta fracción es el flavonoide 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina, el cual además, tuvo una moderada inhibición de las enzimas digestivas en el ensayo *in vitro*. Con lo anterior, se puede sugerir que este compuesto no posee actividad inhibitoria de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo*, o bien, que su efecto pueda verse disminuido en presencia de otros compuestos que se encuentran de forma minoritaria en la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , mediante un efecto antagónico funcional.



**Gráfica 8.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos de la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y acarbosa, evaluados a dosis de 100 mg/Kg y 3 mg/Kg, respectivamente. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs vehículo.

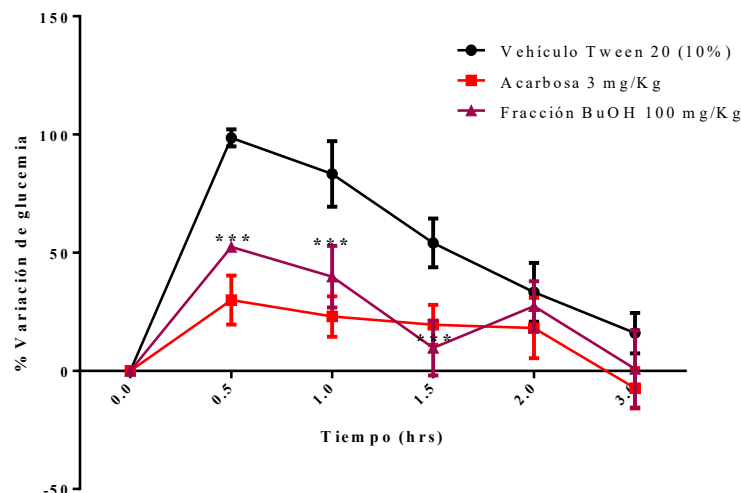
Por otra parte, es importante resaltar que el contenido metabólico de la fracción de AcOEt fue abundante en flavonoides, destacando a rutina e isoquercetina, cuya actividad antihiper glucémica ha sido previamente reportada, mediante una posible inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales. Adicionalmente, el flavonoide tilirósido mostró una actividad significativa sobre estas enzimas *in vitro* y nicotiflorina también tuvo una actividad moderada; por lo que se esperaría que esta fracción tuviera un efecto significativo en la disminución de glucemia en la curva de tolerancia a sacarosa; sin embargo, como se observa en la **Gráfica 9**, esta fracción no se opuso al pico hiper glucémico generado después de la administración de sacarosa.

Este efecto puede deberse a diferentes factores, uno de ellos es la precipitación de los compuestos *in vivo* ocasionada por cambios en el pH a lo largo del tracto gastrointestinal, lo cual puede reducir la concentración total de los compuestos bioactivos de acción inmediata, conllevando a una disminución o retardo en su eficacia (GuoDai, 2010 y Vinavak, *et al.*, 2004).



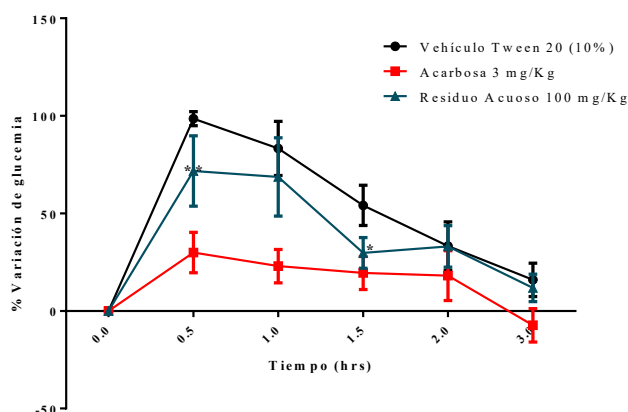
**Gráfica 9.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos de la fracción de AcOEt y acarbosa, evaluados a dosis de 100 mg/Kg y 3 mg/Kg, respectivamente. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs vehículo.

Por otro lado, como se describe previamente, la fracción de BuOH contiene pinitol de forma abundante. Este compuesto ha sido previamente reportado como un potente agente antihiperoglucemiante, lo cual permite respaldar los resultados obtenidos en la curva de tolerancia a sacarosa, en donde se observa que esta fracción tiene un efecto similar al de la acarbosa, oponiéndose significativamente al pico hiperoglucémico, con un efecto sostenido durante todo el ensayo. Por ello, se puede sugerir que la eficacia mostrada por la fracción de BuOH al oponerse al pico hiperoglucémico, se debe principalmente a la presencia de pinitol, ya que al ser muy similar a la molécula de glucosa, puede inhibir de forma eficaz a las enzimas, de forma casi similar a miglitol (**11**), fármaco inhibidor de las  $\alpha$ -glucosidasas.



**Gráfica 10.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos de la fracción de BuOH y acarbosa evaluados a dosis de 100 mg/Kg y 3 mg/Kg, respectivamente. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs vehículo.

Finalmente, el residuo acuoso también mostró un efecto antihiperoglucemiante significativo durante todo el ensayo, sin embargo, su eficacia es menor en comparación con la mostrada por la fracción de BuOH, a pesar de tener pinitol como constituyente mayoritario. Lo anterior puede atribuirse a la presencia de azúcares, como la sacarosa, que se encuentran de forma minoritaria en el residuo acuoso.



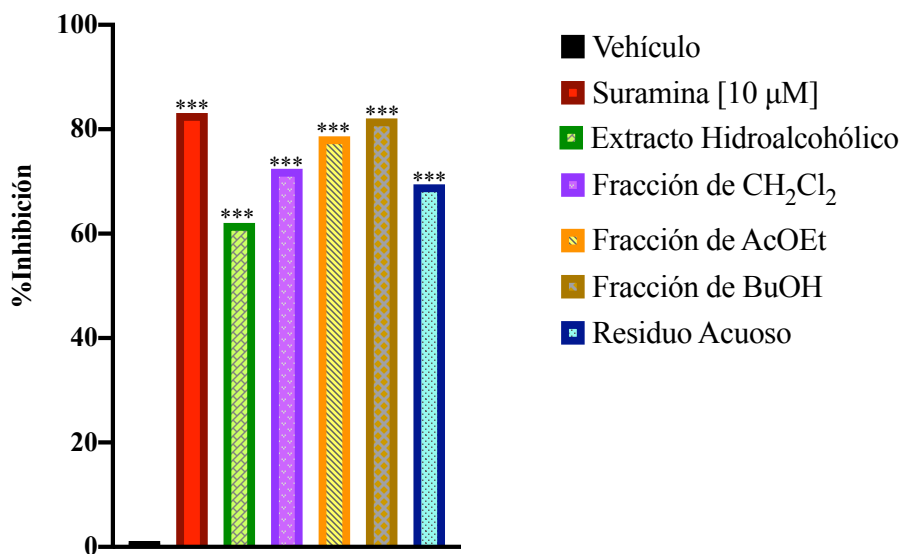
**Gráfica 11.** Curva de Tolerancia a Sacarosa en ratones CD1 normoglucémicos del Residuo Acuoso y acarbosa, evaluados a dosis de 100 mg/Kg y 3 mg/Kg, respectivamente. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=6, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs vehículo.

## 7.7. Evaluación sobre la actividad de la Enzima PTP-1B.

### 7.1.1. Evaluación *in vitro* sobre la PTP-1B.

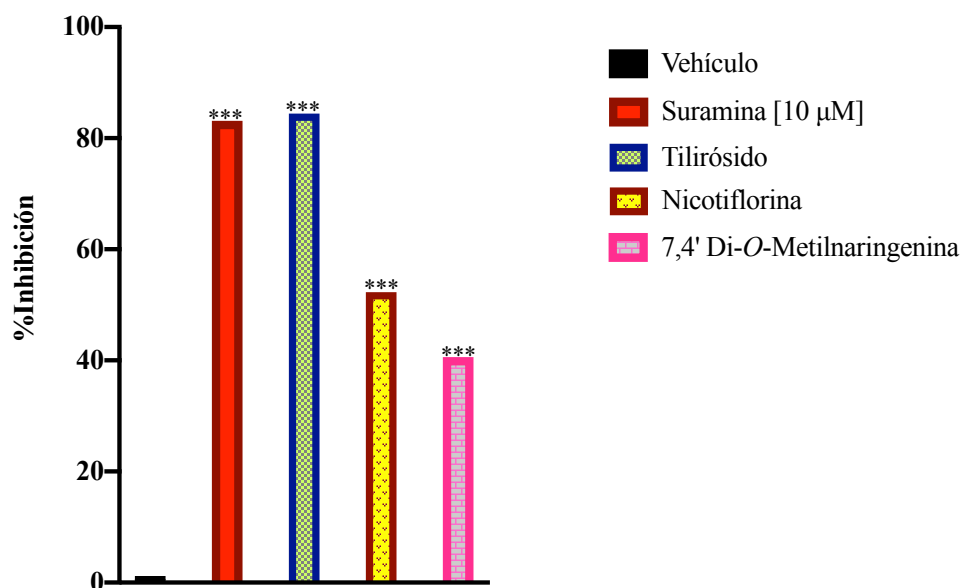
Se llevó a cabo la evaluación *in vitro* del extracto hidroalcohólico, sus fracciones y metabolitos, sobre la actividad de la enzima PTP-1B utilizando un kit comercial. El extracto hidroalcohólico y sus fracciones fueron evaluados a una concentración exploratoria de 300  $\mu\text{g/mL}$ .

En la **Gráfica 12** se muestran los porcentajes de inhibición enzimática del extracto y sus fracciones, en ella se observa que tanto el extracto hidroalcohólico como sus fracciones inhiben de forma significativa a la PTP-1B. Las fracciones de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt, cuyo contenido metabólico es abundante en flavonoides, mostraron mayor eficacia comparadas con el extracto hidroalcohólico ( $72.421 \pm 0.004$  y  $78.645 \pm 0.001\%$ , respectivamente). Lo anterior permite atribuir el efecto observado a la presencia de estos compuestos.



**Gráfica 12.** Porcentaje de inhibición de *EHACe* ( $62.047 \pm 0.001\%$ ), *Fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$*  ( $72.421 \pm 0.004\%$ ), *Fracción de AcOEt* ( $78.645 \pm 0.001\%$ ), *Fracción de BuOH* ( $82.070 \pm 0.004\%$ ), *Residuo Acuoso* ( $69.457 \pm 0.003\%$ ) [300  $\mu\text{M}$ ], *Suramina* ( $83.115 \pm 0.001\%$ ) [10  $\mu\text{M}$ ] sobre la actividad de la enzima PTP-1B. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE de  $n=6$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $<0.001$  vs vehículo, determinado mediante un ANADEVIA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

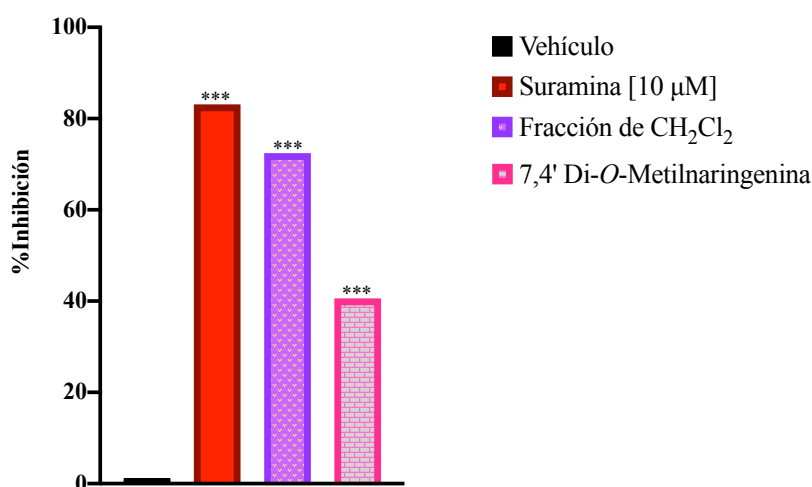
Con la finalidad de comprobar la hipótesis anterior, se evaluó la actividad inhibitoria de los metabolitos obtenidos de estas fracciones a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Debido a que los flavonoides rutina e isoquercetina cuentan con reportes sobre su actividad en esta enzima (Lemos-Lima, *et al.*, 2018 y Zhao, *et al.*, 2016), únicamente fueron evaluados en este ensayo los flavonoides tilirósido, nicotiflorina y 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina. En la **Gráfica 13** se observa que los tres flavonoides tuvieron una actividad significativa al compararlos con el vehículo, sin embargo, tilirósido fue más eficaz inhibiendo la actividad de la PTP-1B ( $84.433 \pm 0.001\%$ ), mientras que los otros dos mostraron una inhibición moderada de la enzima.



**Gráfica 13.** Porcentaje de inhibición de *Tilirósido* ( $83.433 \pm 0.001\%$ ), *Nicotiflorina* ( $52.272 \pm 0.004\%$ ), 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina ( $40.599 \pm 0.001\%$ ) [100  $\mu\text{M}$ ], *Suramina* ( $83.115 \pm 0.001\%$ ) [10  $\mu\text{M}$ ] sobre la actividad de la enzima PTP-1B. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE de  $n=6$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $<0.001$  vs vehículo, determinado mediante un ANADEVVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

Se comparó el efecto mostrado por las fracciones y sus metabolitos, para determinar si la actividad observada se podría atribuir a la presencia de ellos o bien, a efectos de sinergismo funcional con constituyentes minoritarios de las fracciones.

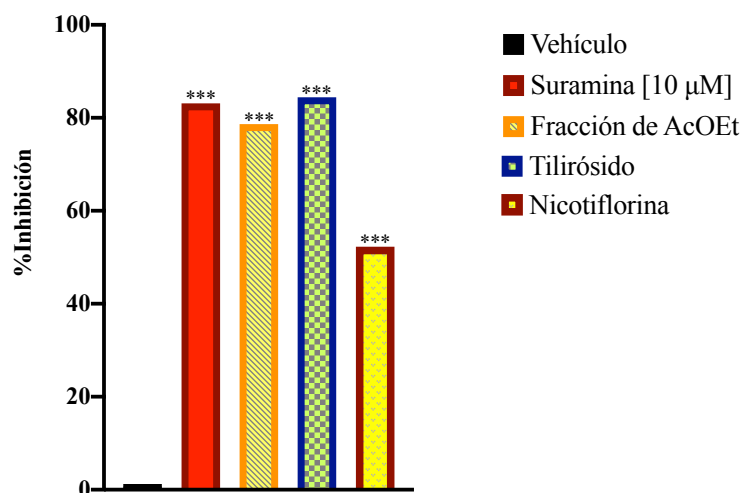
En la **Gráfica 14**, se observa que la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y su metabolito mayoritario 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina inhiben a la PTP-1B de forma significativa, sin embargo, la eficacia mostrada por el flavonoide es menor comparada con la de la fracción, con lo cual se puede sugerir que la actividad inhibitoria del flavonoide 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina puede incrementar en presencia de otros constituyentes que se encuentran de forma minoritaria en la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Lo anterior puede resultar concordante, debido a que algunos de los metabolitos secundarios identificados mediante CG-EM han mostrado importantes efectos antidiabéticos en investigaciones previas, aunque su mecanismo de acción no ha sido establecido.



**Gráfica 14.** Porcentaje de inhibición de *Fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$*  ( $72.421 \pm 0.004\%$ ) [300 mg/mL], *7, 4'-di-O-metilnaringenina* ( $14.55 \pm 12.00\%$ ) [10 µM], *Suramina* ( $83.115 \pm 0.001\%$ ) [100 µM] sobre la actividad de la enzima PTP-1B. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE de n=6, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*<0.001 vs vehículo, determinado mediante un ANADEVIA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

Por otro lado, en la **Gráfica 15** se comparan los porcentajes de inhibición de la fracción de AcOEt y sus metabolitos tilirósido y nicotiflorina; se observa que si bien, la fracción de AcOEt tienen un efecto significativo, con un porcentaje de inhibición de  $78.645 \pm 0.001$ , su metabolito tilirósido mostró una mayor eficacia, inhibiendo con  $84.433 \pm 0.001\%$  la actividad enzimática.

Lo anterior sugiere un posible efecto antagónico funcional, en el cual la presencia de metabolitos adicionales, como rutina e isoquercetina los cuales, en investigaciones previas, no han mostrado un efecto significativo inhibiendo la actividad de PTP-1B, así como nicotilforina, quien en este ensayo no mostro un efecto significativo; disminuyen la eficacia de tilirósido.



**Gráfica 15.** Porcentaje de inhibición de *Fracción de AcOEt* ( $78.645 \pm 0.001\%$ ) [300 mg/mL], *Tilirósido* ( $83.433 \pm 0.001\%$ ), *Nicotiflorina* ( $52.272 \pm 0.004\%$ ) [100 µM], *Suramina* ( $83.115 \pm 0.001\%$ ) [10 µM] sobre la actividad de la enzima PTP-1B. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE de n=6, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*<0.001 vs vehículo, determinado mediante un ANADEVVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

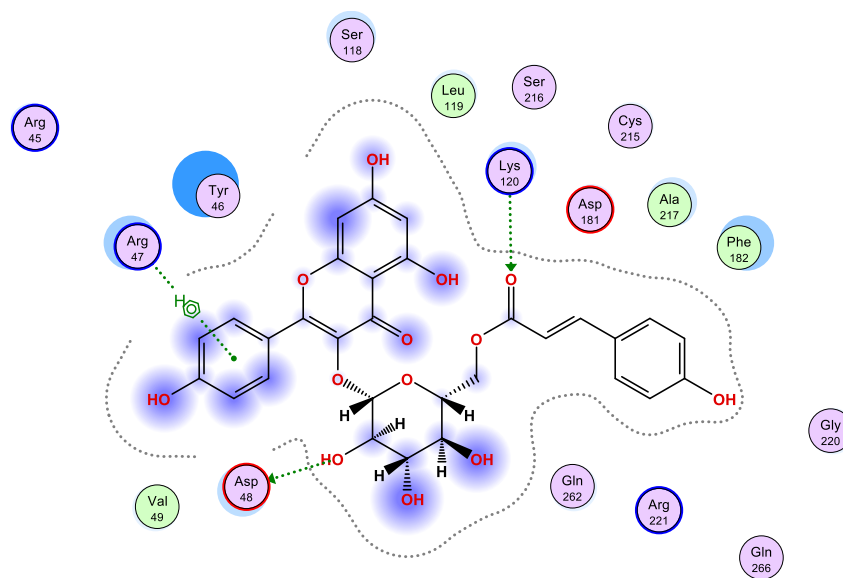
Adicionalmente, en la **Gráfica 12** se observa que la fracción de butanol inhibe significativamente a la PTP-1B ( $82.07 \pm 0.004\%$ ), con una eficacia similar a la del fármaco de referencia, quien inhibió en un  $83.115 \pm 0.001\%$ ; este efecto puede atribuirse a la presencia de pinitol, constituyente mayoritario de esta fracción. Es importante mencionar que, en investigaciones previas, se ha demostrado que pinitol tiene un potente efecto insulinosensibilizador, no obstante, los mecanismos no han sido del todo descritos; sin embargo, con base en los resultados obtenidos en este ensayo, se puede sugerir que este efecto insulinosensibilizador puede deberse a su eficaz inhibición de la PTP-1B.

Por otro lado, el residuo acuoso, cuyo principal metabolito es también pinitol, inhibe de forma menos eficaz a la enzima, con un porcentaje de inhibición de  $69.457 \pm 0.003\%$ . Esta disminución en su actividad puede deberse a la presencia de azúcares que se encuentran de forma minoritaria en el residuo acuoso.

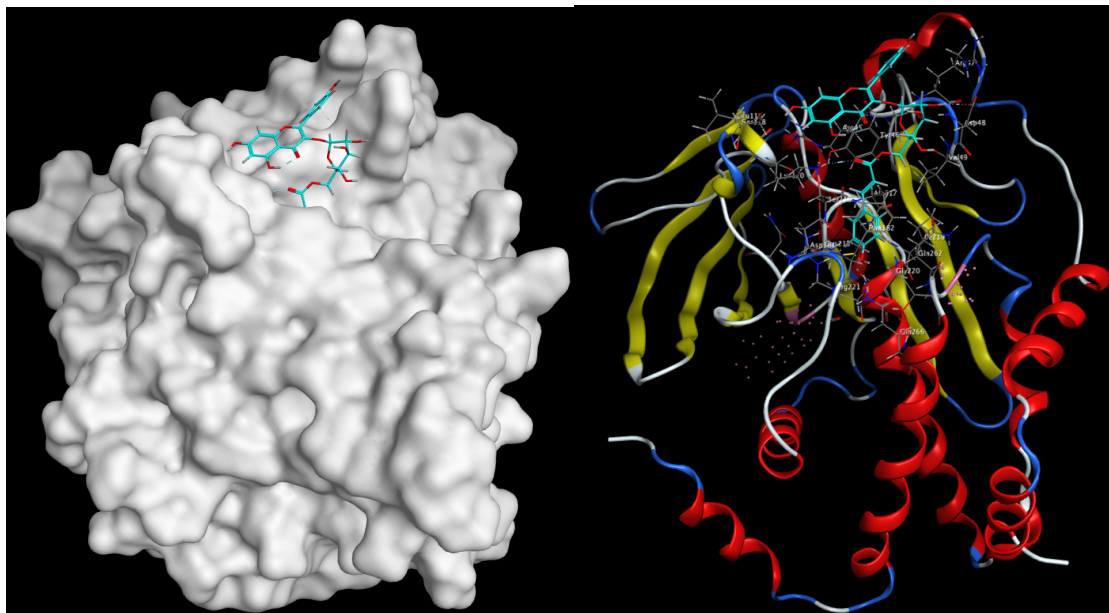
Estos resultados permiten sugerir que pinitol, tal y como se ha descrito en investigaciones previas, es un potente agente antidiabético de múltiple acción, sin embargo, este efecto puede verse disminuido si se encuentra mezclado con otros metabolitos, como se observa en el caso del extracto hidroalcohólico.

### 7.7.2. Estudio de acoplamiento molecular.

Las Figuras 39 y 40 muestran las interacciones del flavonoide tilirósido con la enzima PTP-1B co-cristalizada, en donde se observan conservadas las interacciones con la triada catalítica Arg221, Asp181 y Cys215; además, se observan interacciones polares adicionales con Lys120 y Asp48, así como una interacción  $\pi$ -sp<sup>3</sup> con Arg47.

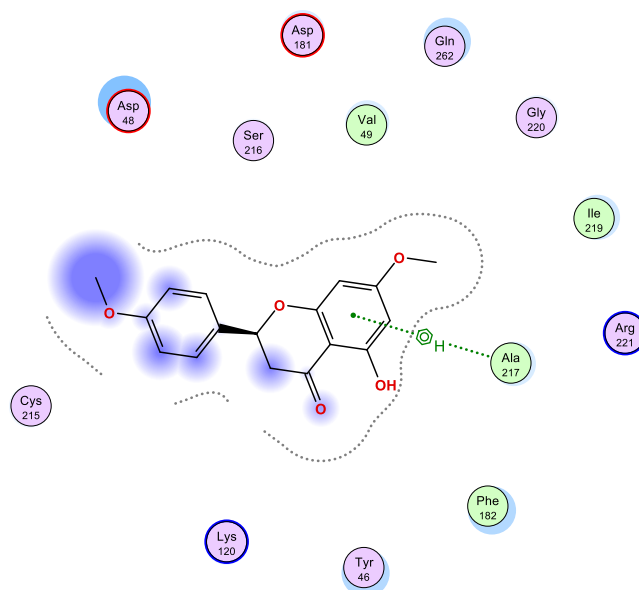


**Figura 39.** Mapa 2D de interacciones de tilirósido con PTP-1B. Se muestra la interacción  $\pi$ -sp<sup>3</sup> con Arg47 (Docking score: -7.1 Kcal/mol)

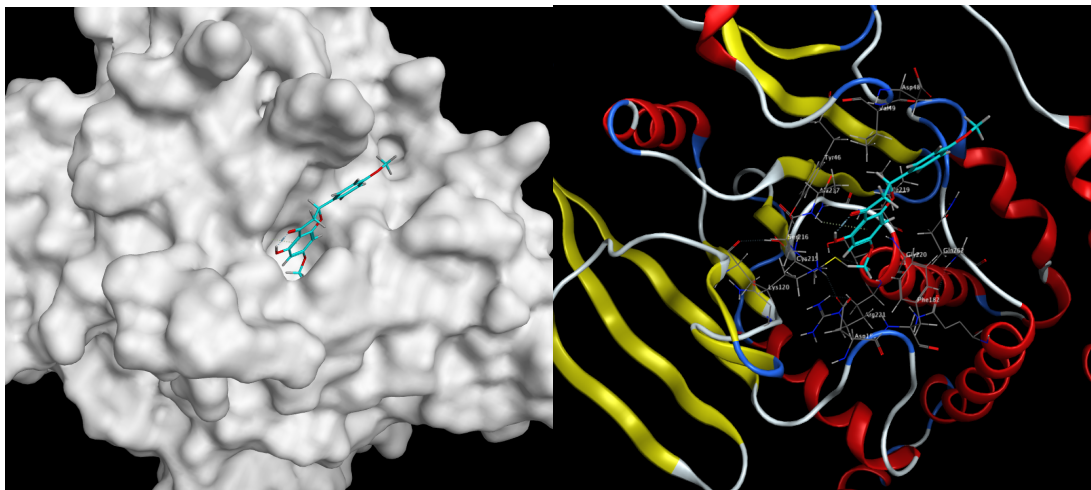


**Figura 40.** Mapa 3D de las interacciones de tilirósido con PTP-1B.

Por otro lado, en las **Figuras 41 y 42**, se representan las interacciones entre la enzima PTP-1B y el flavonoide 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina, en donde se observan conservadas las interacciones con los aminoácidos Arg221, Asp181 y Cys215, así como interacciones polares adicionales con Ala217.



**Figura 41.** Mapa 2D de interacciones de PTP-1B con 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina, se muestra la interacción polar con Ala217 (Docking Score: -5.9745 Kcal/mol).

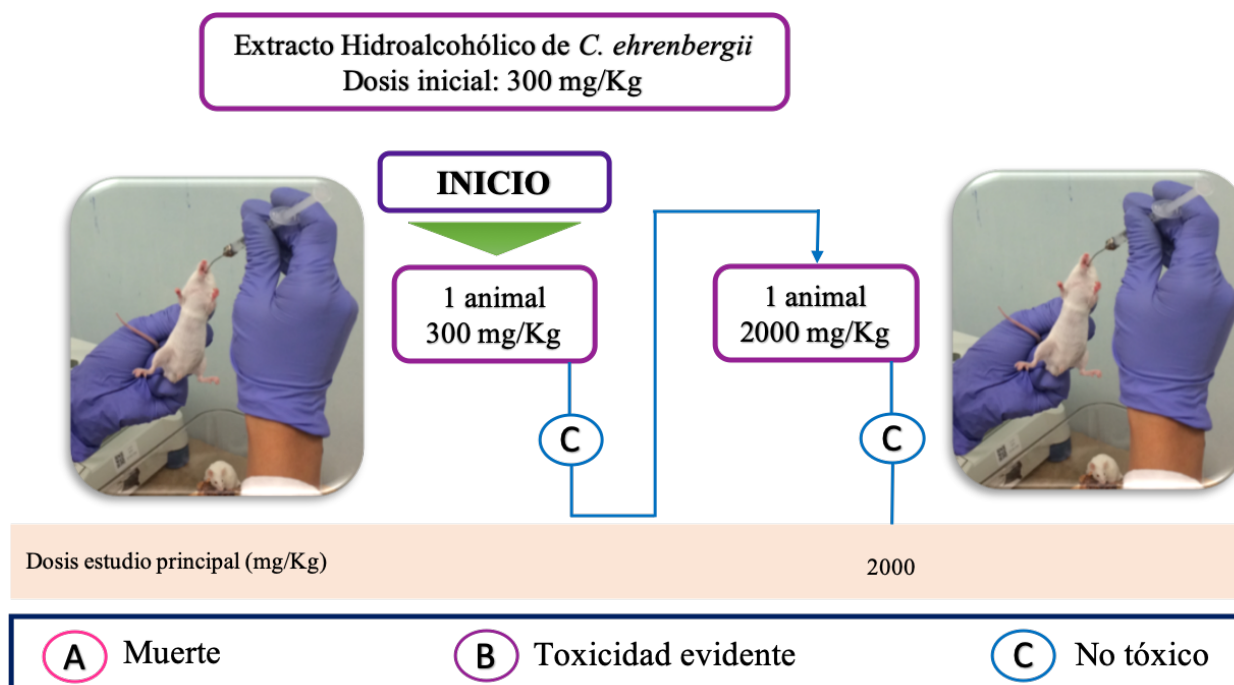


**Figura 42.** Mapa 3D de interacciones de PTP-1B con 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina.

De acuerdo con lo observado en este análisis computacional, ambos metabolitos conservaron las principales interacciones con la triada catalítica de PTP-1B (Arg221, Asp181 y Cys215); sin embargo, el flavonoide tilirósido tuvo mayor afinidad por la enzima PTP-1B que 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina, con scores de -7.1 y 5.97 Kcal/mol, respectivamente. Lo anterior permite corroborar lo observado en el ensayo *in vitro*, en donde tilirósido mostró una mayor eficacia inhibiendo a la enzima.

### 7.8. Evaluación de la Toxicidad Oral Aguda.

En el estudio de observación de toxicidad oral aguda, se administró a un solo animal una dosis de 300 mg/Kg del extracto hidroalcohólico por vía intragástrica, observando su comportamiento durante 14 días, al término de este periodo, no se observaron signos de toxicidad evidente, por lo que se procedió a administrar a un segundo animal, una dosis de 2000 mg/Kg. El segundo animal fue observado durante 14 días, tiempo durante el cual no se observaron signos de toxicidad evidente (**Figura 43**).



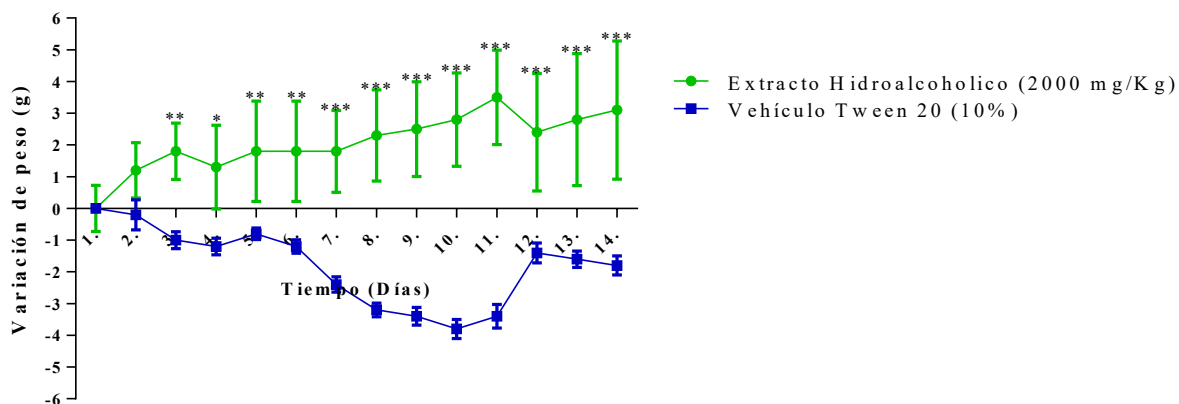
**Figura 43.** Diagrama de Flujo del Estudio de Toxicidad Oral Aguda.

Con base en lo reportado en el estudio de observación, se inició el estudio principal, administrando a 5 animales, una dosis de 2000 mg/Kg del extracto hidroalcohólico, y un segundo grupo fue administrado con vehículo. Los animales fueron observados durante las primeras 4 horas después de la administración, poniendo especial atención en los primeros 30 minutos.

Durante estos primeros 30 minutos, se observó que los animales presentaban somnolencia y letargo, además de una disminuida reacción a estímulos externos. Los resultados obtenidos en los ensayos previos sugirieron que estos signos se deban a un posible efecto hipoglucemiante severo.

Sin embargo, transcurridas 4 horas después de la administración, los animales tenían un comportamiento normal, sin sueño o letargo, manteniéndose así durante los 14 días de observación. Al final de este periodo, se reportó el deceso de dos animales, el primero ocurrido el día 4 después de la administración del extracto y el segundo ocurrido en el día 12.

En la **Gráfica 16**, se reporta la variación de pesos de todos los animales administrados tanto con el extracto como con el vehículo. De forma general, se plantea que todos los animales administrados con el extracto, perdieron peso durante los 14 días de observación. Al comparar al grupo tratado con el vehículo, se observa una diferencia significativa desde el día 3, en donde los animales tratados perdieron 2 g de peso con respecto al día 0, mientras que los animales del grupo del vehículo, ganaron 1 g. A pesar de las diferencias observadas en ambos grupos, se puede sugerir que la pérdida de peso observada en el grupo tratado no es significativa, pues durante los 14 días de observación, los pesos fueron constantes, teniendo una pérdida máxima de 3 g.



**Gráfica 16.** Variación de peso de los dos grupos experimentales. Cada grupo representa el promedio  $\pm$  EE; n=5, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs vehículo, determinado mediante un ANADEVIA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni.

Los resultados observados en este ensayo permiten clasificar al extracto hidroalcohólico de *C. ehrenbergii* dentro de la categoría 5 del GHS que, de forma general, establece que es una sustancia no nociva al consumo humano a dosis menores a 2000 mg/Kg, y que su dosis letal media (DL<sub>50</sub>) se encuentra en un rango de 2000 a 5000 mg/Kg.



# CONCLUSIÓN



## 8. CONCLUSIÓN.

La especie *C. ehrenbergii* posee un importante potencial antidiabético, el cual se debe principalmente a un efecto insulino-sensibilizador, ejercido mediante la inhibición de la enzima PTP-1B. Este efecto puede asociarse principalmente a la presencia de pinitol, metabolito mayoritario de la fracción de BuOH y del residuo acuoso, así como a algunos flavonoides como tilirósido y 7, 4'-di-*O*-metilnaringenina, aislados a partir de las fracciones de AcOEt y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, los cuales al ser evaluados mostraron un efecto significativo inhibiendo la actividad de esta enzima. Además, el potencial antidiabético de la especie puede estar relacionado con un moderado efecto antihiper glucémico a través de la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales. Sin embargo, estos efectos pueden verse modificados en modelos *in vivo* debido a diferentes factores a nivel gastrointestinal.

Adicionalmente, el extracto hidroalcohólico se puede clasificar dentro de la categoría 5 del GHS, debido a que las dosis evaluadas no causaron signos de toxicidad significativos durante el periodo de observación. De este modo, la presente investigación aporta evidencia sobre el potencial antidiabético en dos diferentes blancos terapéuticos de la diabetes mellitus, así como de la toxicidad oral aguda de la especie en estudio.



# **BIBLIOGRAFÍA**



## 9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Ahmadian, D. Z., Asghari, G., y Sadeghi, D. M. (2017). Isolation and Identification of Nicotiflorin and Narcissin from the Aerial Parts of *Peucedanum aucheri* Boiss. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 7. 45-51.
2. Alamgir, A. N. M. (2018). Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Volume 2. Phytochemistry and Bioactive Compounds. *Progress in Drug Research*. 74. Switzerland. Springer.
3. American Diabetes Association. (2020). Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 43(1). 14-31.
4. American Diabetes Association. (2020). Introduction: *Standards of Medical Care in Diabetes-2020*. *Diabetes Care*. 43(1). 1-2.
5. Arika, W. M., Abdirahman, Y. A., Mawia, M. A., Wambua, K. F., Nyamai, D. M., Ogola, P. E., Kiboi, N. G., Nyandoro, H. O., Agyirifo, D. S., Ngugi, M. P., y Enjagi, E. (2015). *In vivo* antidiabetic activity of the aqueous leaf extract of *Croton macrostachyus* in alloxan induced diabetic mice. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 6(11). 441/1-447/5.
6. Bakke, J., y Haj, F. G. (2015). Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Substrates and Metabolic Regulation. *Seminars in Cells and Developmental Biology*. 0. 58-65.
7. Bijekar, S., y Gayatri, M. C. (2014). Ethnomedicinal properties of Euphorbiaceae family- A comprehensive review. *International Journal of Phytomedicine*. 6. 144-156.
8. Bnouham, M., Ziyat, A., Mekhfi, H., Tahri, A., y Legssyer, A. (2006). Medicinal plants with potential antidiabetic activity – A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *International Journal of Diabetes and Metabolism*. 14. 1-25.
9. Campos, M. C., Salomão, K., Castro-Pinto, D. B., Leon, L. L., Barbosa, H. S., Maciel, M. A., y de Castro, S. L. (2010). *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*. 107(5). 1193-1204.
10. Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy-Dendi, V, S., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekhawat, N. S., Montales, M. T., Kuriakose, K., Sasapu, A., Beebe, A., Patil, N., Musham, C. K., Lohani, G. P., y Mirza, W. (2017). Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Frontiers in Endocrinology*. 8(6). DOI: 10.3389/fendo.2017.00006.
11. Chintoju, N., Konduru, P., Lakshmi-Kathul, R., y Remella, R. (2015). Importance of Natural Products in the Modern History. *Research and Reviews: Journal of Hospital and Clinical Pharmacy*. 1(1). 5-10.
12. Clark, P., y McDonald, T. (2013). Diabetes Mellitus. *The Immunoassay Handbook*. 4<sup>th</sup> edition. Chapter 9. 10. 783-794.
13. Da Luz, G., Frederico, M. J., Castro, A. J., Moraes, A. L., De Carvalho, F. K., Espíndola, L., Schmidt, É. C., Bouzon, Z. L., Pizzolatti, M. G., y Silva, F. R. (2016). Triterpene derivative: A potential signaling pathway for the fern-9(11)-ene-2 $\alpha$ , 3 $\beta$ -diol on insulin secretion in pancreatic islet. *Life Sciences*. 154. 58-65.
14. De Oliveira, D. M., Siqueira, E. P., y Yule, R. F. (2013). Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. ISSN0102-695X.
15. DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., y Weiss, R.

- (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*. **1**. Article Number 15019.
16. Dougnac, D. C. (2014). Impacto Económico de las Enfermedades Crónicas. Tesis. Universidad de Chile.
  17. Eddouks, M., Chattopadhyay, D., De Feo, V., Chi-shing Cho, W. (2014). Medicinal Plants in the Prevention and Treatment of Chronic Diseases 2013. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*. 2014;2014:180981. DOI: 10.1155/2014/180981.
  18. Fasola, T. R., Ukwanya, B., Oyagbemi, A. A., Omobowale, T. O., y Ajibade, T. O. (2016). Antidiabetic and antioxidant effects of *Croton lobatus* L. in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. **5**(4). 364-371.
  19. Fathiazad, F., Delazar, A., Amiri, R., y Sarker, S. D. (2006). Extraction of Flavonoids and Quantification of Rutin from waste Tobacco Leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. **5**(3). 222-227.
  20. Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: la principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anuales de la Facultad de Medicina*. **77**(4). 327-332.
  21. Georgeta, S., Pop, J. A., Horvath, T., y Bota, S. (2016). The isolation and identification of rutin from pharmaceutical products. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie si Tehnologii de Industrie Alimentara*. 15.
  22. Gomes-Castro, A. J., Cazarolli, L. H., De Carvalho, F. K., DaLuz, G., Altenhofen, D., Soares dos Santos, A. R., Pizzolatti, M. G., y Barreto-Silva, F. R. M. (2015). Acute effect of 3 $\beta$ -hidroxihop-22(29)ene on insulin secretion is mediated by GLP-1, potassium and calcium channels for the glucose homeostasis. **150**. 112-122.
  23. González-Sánchez, A., y OrtizAndrade, R. (2012). ¿Qué sabe usted acerca de... los antidiabéticos orales (ADO's)? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **43**(1). 79-84.
  24. GuoDai, W. (2010). *In vitro* methods to assess drug precipitation. *International Journal of Pharmaceutics*. **393**(1-2). 1-16.
  25. Hamburger, M., y Hostettmann, K. (1991). Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*. **30**(12). 3864-3874.  
[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010) Consulta el 30 de septiembre de 2018.
  26. International Diabetes Federation. (2017). En línea. *IDF Diabetes Atlas*. 8<sup>th</sup> edition. Brussels, Belgium. <http://www.diabetesatlas.org>. Consulta el 16 de marzo de 2018.
  27. Kahn, S. E., Cooper, M. E., y Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present and future. *Lancet*. **383**(9922). 1068-1083.
  28. Kalita, D., Holm, D. G., LaBarbera, D. V., Petrash, J. M., y Jayanti, S. S. (2018). Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amilase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. *PLoS ONE*. **13**(1): e0191025.
  29. Katz, L., y Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **43**(2-3). 155-176.
  30. Keerthana, G., Kalaiyani, M. K., y Sumathy, A. (2013). *In vitro*  $\alpha$ -amylase inhibitory and anti-oxidant activities of ethanolic leaf extract of *Croton bonplandianum*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. **6**(4). 32-36.

31. Kennedy, B. P. (1999). Role of protein tyrosine phosphatase-1B in diabetes and obesity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **53**. 466-470.
32. Kim, S. J., y Ryu, S. E. (2012). Structure and catalytic mechanism of human protein tyrosine phosphatase. *BMB Reports*.
33. Kozłowska, J., Potaniec, B., Zarowska, B., y Aniol, M. (2017). Synthesis and Biological Activity of Novel *O*-Alkyl Derivatives of Naringenin and Their Oximes. *Molecules*. **22**(1485).
34. Kozłowska, J., Potaniec, B., Zarowska, B., y Aniol, M. (2017). Synthesis and Biological Activity of a Novel *O*-Alkyl Derivatives of Naringenin and Their Oximes. *Molecules*. **22**(9). 1485.
35. Kumar, S., Malhotra, R., y Kumar, D. (2010). Antidiabetic and Free Radical Scavenging Potential of *Euphorbia hirta* Flower Extract. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **74**(4). 533-537.
36. Kuruüzüm-Uz, A., Güvenalp, Z., Kazaz, L. C., y Demirezer, Ö. (2013). Phenolic compounds from the roots of *Anchusa azurea* var. *azurea*. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. **10**(2). 177-184.
37. Lo, M. C., y Lansang, M. C. (2013). Recent and Emerging Therapeutic Medications in Type 2 Diabetes Mellitus: Incretin-Based, Pramlintide, Colesevelam, SGLT2 Inhibitor, Tagatose, Succinobucol. *American Journal of Therapeutics*. **20**. 638-653.
38. Lokadi, P. L., Namboole, M. M., y Hanzooma, H. (2016). Isolation and <sup>1</sup>H-NMR identification of a tiliroside from *Odontonema strictum* (Acanthaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. **5**(1). 206-210.
39. Mateos-Santa Cruz, N., y Zacarías-Castillo, R. (2002). Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Revista del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"*. **5**(1-2). 33-41.
40. Mwine, J. T., y Van Damme, P. (2011). Why do Euphorbeaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5**(5). 652-662.
41. Newman, D. J., Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. **79**. 629-661.
42. Nguyen-Vo, T. H., Tran, N., Nguyen, D., y Le, L. (2016). An *in silico* study on antidiabetic activity of bioactive compounds in *Euphorbia thymifolia* Linn. *Springerplus*. **5**(1). 1359.
43. NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010. En línea. Diario Oficial de la Federación. 23 de noviembre de 2010.
44. Olivares-Reyes, J., y Arellano-Plancarte, A. (2008). Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina. *REB*. **27**(1). 9-18.
45. OMC. (2018). En línea. Promover el acceso a las tecnologías y la innovación en medicina: Intersecciones entre la salud pública, la propiedad intelectual y el comercio. [https://www.wto.org/spanish/tratop\\_s/trips\\_s/trilatweb\\_s/forw\\_trilat\\_web\\_13\\_s.htm](https://www.wto.org/spanish/tratop_s/trips_s/trilatweb_s/forw_trilat_web_13_s.htm). Consulta el 24 de septiembre de 2018.
46. OMSa. (2018). En línea. Las 10 principales causas de defunción. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Consulta el 24 de septiembre de 2018.
47. OMSb. (2016). Informe Mundial sobre la Diabetes.

48. OMSc. (2018). En línea. Medicina tradicional: definiciones. [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/). Consulta el 24 de septiembre de 2018.
49. OMSd. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional.
50. OMSe. (2017). En línea. Las 10 principales causas de defunción. <http://origin.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>. Consulta el 24 de septiembre de 2018.
51. Pan, S. Y., Litscher, G., Gao, S. H., Zhou, S. F., Yu, Z. L., Chen, H. Q., Zhang, S. F., Tang, M. K., Sun, J. N., y Ko, K. M. (2014). Historical Perspective of Traditional Indigenous Medical Practices: The Current Renaissance and Conservation of Herbal Resources. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID: 525340.
52. Patel, D. K., Kumar, R., Laloo, D., y 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.
53. Pérez, F. (2009). Epidemiología y Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Tipo 2. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 20(5). 565-571.
54. Priscilla, D. H., Roy, D., Suresh, A., Kumar, V., y Thirumurugan, K. (2014). Naringenin inhibits  $\alpha$ -glucosidase activity: a promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. *Chemico-biological interactions*. 5(210). 77.85.
55. Qaisar, M. N., Chaudhary, B. A., Sajid, M. U., y Hussain, N. (2014). Evaluation of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of dichloromethane and methanol extracts of *Croton bonplandianum* Baill. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 13(11). 1833-1836.
56. Raffel, L. J., y Goodarzi, M. O. (2007). Diabetes Mellitus. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. Chapter 86. 1980-2022.
57. Ramos-Rodrigues, G., Di-Nasso, F. G., Poraowski, M., Marcolin, E., Kretzmann, N. A., Falcão-Ferraz, A. B., Richter, M. F., Marroni, C. A., y Marroni, N. P. (2012). Treatment with Aqueous Extract from *Croton cajucara* Benth Reduces Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 12. Article ID: 902351.
58. Ren, L., Qin, X., Cao, X., Wang, L., Bai, F., Bai, G., y Shen, Y. (2011). Structural insight into substrates specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. *Protein Cell*. 2(10). 827-836.
59. Ríos, J. L., Francini, F., y Schinella, G. R. (2015). Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Planta Médica*. 81. 975-994.
60. Rios, M. Y., León-Rivera, I., Ríos-Gomez, R., Córdova-Albores, L. C., y Aguilar-Guadarrama, A. B. (2019). Phytotoxic and nematicide evaluation of *Croton ehrenbergii* (Euphorbiaceae). *Pest Management Science*. 75. 2158-2165.
61. Roden, M., Petersen, K., y Shulman, G. (2016). Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. *Textbook of Diabetes*. Eds. R. I. Holt, C. S. Cockram, A. Flyvbjerg and B. J. Goldstein. DOI: 10.1002/9781118924853.
62. Saini, V. (2010). Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 1(3). 68-75.
63. Salatino, A., Faria-Salatino, M. L., y Negri, G. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 18(1). 11-33.

64. Salaverría de Sanz, N., Palmucci, G., Suniaga de Daza, M., y Velásquez, E. (2012). Tratamiento con antihiperoglucemiantes orales: clasificación, propiedades, combinaciones, indicaciones, contraindicaciones y eventos adversos. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. **10**(1). 58-64.
65. Sanjay, K. (2014). Alpha glucosidase inhibitors. *Journal of Pakistan Medical Association*. **64**(4). 474-476.
66. Saxena, A., y Vikram, N. K. (2004). Role of Selected Indian Plants in Management of Type 2 Diabetes: A review. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. **10**(2). 369-378.
67. Saydah, S. H., y Eberhardt, M. S. (2006). Use of Complementary and Alternative Medicine Among Adults with Chronic Diseases: United States 2002. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. **12**(8). 805-812.
68. Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA. (2006). Medicina Alternativa y Terapias Complementarias. Bogotá, Colombia. ISBN:978-958-15-0148-9.
69. Sheliya, M. A., Begum, R., Pillar, K. K., Aeri, V., Mir, S. R., Ali, A., y Sharma, M. (2016). *In vitro*  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibition by aqueous, hydroalcoholic, and alcoholic extract of *Euphorbia hirta*, L. *Drug Development and Therapeutics*. **7**(1). 26-30.
70. Singla, P., Animesh, B., y Parkash, A. A. Metabolic effects of obesity: A review. *World Journal of Diabetes*. **1**(3). 76-88.
71. Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., y Pahua-Díaz, D. (2016). Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. **59**(6). 8-22.
72. Stein, S. A., Lamos, E. M., y Davis, S. N. (2013). A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs. *Expert Opinion on Drug Safety*. **12**(2). 153-175.
73. Subramoniam, A. (2016). Plants with Anti-Diabetes Mellitus Properties. *CRC Press*. Boca Raton, FL. 268.
74. Sun, H., Wang, D., Song, X., Zhang, Y., Ding, W., Peng, X., Zhang, X., Li, Y., Ma, Y., Wang, R., y Yu, P. (2017). Natural Prenylchalconaringenins and Prenylnaringenins as Antidiabetic Agents:  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase inhibition and in vivo Antihyperglycemic and Antihyperlipidemic Effects. *Journal of agricultural and food chemistry*. **65**(8). 1574-1581.
75. Sun, J., Qu, C., Wang, Y., Huang, H., Zhang, M., Li, H., Zhang, Y., Wang, Y., y Zou, W. (2016). PTP1B, a Potential Target of Type 2 Diabetes Mellitus. *Molecular Biology*. **5**(4).
76. Sun, J., Qu, C., Wang, Y., Huang, H., Zhang, M., y Zou, W. (2016). Type 2 Diabetes Mellitus and Protein-Tyrosine Phosphatase 1B. *Journal of Diabetes, Metabolic Disorders & Control*. **3**(8). 96-100.
77. Tabatabaei-Malazy, O., Larijani, B., y Abdollahi, M. (2015). Targeting metabolic disorders by natural products. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. **14**(1). 57-77.
78. Tahrani, A. A. Bailey, C. J., Del Prato, S., y Barnett, A. H. (2011). Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment. *Lancet*. **378**. 182-197.
79. Tamrakar, A. K., Maurya, C. K., y Rai, A. K. (2014). PTP1B inhibitors for type 2 diabetes treatment: a patent review (2011-2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **24**(10). 1101-1115.
80. Tébar-Massó, F. J., y Escobar-Jiménez, F. (2009). La Diabetes en la Práctica Clínica. Madrid. Médica Panamericana.

81. Thiebaut, P. A., Besnier, M., Gomez, E., y Richard, V. (2016). Role of protein tyrosine phosphatase 1B in cardiovascular diseases. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **101**. 50-57.
82. Tiwari, N., Thakur, A. K., Kumar, V., Dey, A., y Kumar, V. (2014). Therapeutic Targets for Diabetes Mellitus: An Update. *Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics*. **3**(1). DOI: 10.4172/2167-065X.1000117.
83. Través, P. G., Pardo, V., Pimentel-Santillana, M., González-Rodríguez, A., Mojena, M., Rico, D., Montenegro, Y., Calés, C., Martín-Sanz, P., Valverde, A. M., y Bosca, L. (2014). Pivotal role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the macrophage response to pro-inflammatory and anti-inflammatory challenge. *Cell Death and Disease*. **5**. e1125.
84. Ukkola, O., y Santaniemi, N. (2002). Protein tyrosine phosphatase 1B: a new target for the treatment of obesity and associated co-morbidities. *Journal of International Medicine*. **251**. 467-475.
85. Valdés-Ramos, E., Camps-Arjona, M. C., y Verdecia-Saborit, R. (2014). Factores de riesgo y enfermedad cardiovascular en diabéticos tipo 2 de diagnóstico reciente. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. **33**(2). 177-185.
86. Verspohl, E. J. (2012). Recommended Testing in Diabetes Research. *Planta Médica*. **68**(7). 581-590.
87. Vinayak, P. S., Smith, D., y Eroux, J. C. (2004). Novel pH-sensitive supramolecular assemblies for oral delivery of poorly water soluble drugs preparation and characterization. *Journal of Controlled Release*. **97**(2). 301-312.
88. Vinocour-Fornieri, M. V., y Tortós-Guzmán, J. E. (2002). Diabetes Mellitus, una Enfermedad Cardiovascular. *Revista Costarricense de Cardiología*. **4**(1). 36-44.
89. Vitus, A. N., Xolani, P., Faith, M., Hamisi, M. M., Robinson, H. M., y Gerda, F. (2016). Isolation and identification of euphol and b-sitosterol from the dichloromethane extracts of *Synadenium glaucescens*. **5**(3). 100-104.
90. Xu, S., Held, I., Kempf, B., Mayr, H., Steglich, W., y Zipse, H. (2005). The DMAP-Catalyzed Acetylation of Alcohols – A Mechanistic Study (DMAP=4-(Dimethylamino)pyridine). *Chemistry – A European Journal*. **11**. 4751-4757.
91. Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., y Kang, W. (2014).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*. **3**(3-4). 136-174.
92. Yun-Long, W., Zheng-Long, Y., Xiao-Kui, H., Xiang-Ge, T., Lei, F., Shang-Shang, H., Sa, DD., Xiao-Chi, M., Jing-Ming, J., y Chao, W. (2017). Diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana* and their inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase. *Journal of Assian Natural Products Research*. **18**(23).
93. Zaccardi, F., Webb, D. R., Yates, T., y Davies, M. J. (2015). Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgraduate Medical Journal*. **92**(1084). 63-69.
94. Zhang, S., y Zhang, Z. Y. (2007). PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discovery Today*. **12**(9, 10). 373-381.