



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“COMPUESTOS ANTIHIPERGLICÉMICOS Y ANTINOCICEPTIVOS DE LA ESPECIE
Hintonia standleyana Bullock (Rubiaceae). UNA CONTRIBUCIÓN A LA
DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE INOCUIDAD, CALIDAD Y EFICACIA
DE LA DROGA CRUDA”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. F. B. JOSÉ ANTONIO GUERRERO ANALCO

TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG AÑO: 2007





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Leovigildo Quijano
Primer vocal:	Dr. Enrique Hong Chong
Segundo vocal:	Dr. José Francisco Pedraza Chaverri
Tercer vocal:	Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta
Secretario:	Dr. Andrés Navarrete Castro
Primer suplente:	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Segundo suplente:	Dr. Francisco Hernández Luis

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química,
UNAM.

AGRADECIMIENTOS

De forma muy especial, a la Dra. Rachel Mata Essayag, por su incansable labor de enseñanza, por su infinita paciencia y por encausar mis pasos hasta la culminación de esta importante meta.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos: DGAPA (Dirección General de Asuntos de Personal Académico) IN 212005 y CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) C01-018.

Al CONACyT y a la DGEP (Dirección General de Estudios de Posgrado) por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de doctorado.

A los miembros de mi comité tutelar, la Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez y el Dr. Leovigildo Quijano por sus valiosos comentarios durante la realización de mi trabajo de tesis.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro de la Facultad de Química, UNAM, por su valiosa asesoría para la realización de los estudios *in vivo* sobre la actividad antidiabética de la droga cruda.

Al Dr. José Pedraza Chavarri y al M. en C. Omar Noel Medina Campos de la Facultad de Química, UNAM, por su amable apoyo para la realización de los ensayos biológicos *in vitro* sobre la determinación de los niveles de insulina plasmática y glucógeno hepático.

A la Dra. Myrna Déciga Campos de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por su apoyo para la evaluación del efecto antinociceptivo *in vivo* de la droga cruda.

A las M. en C. Isabel Rivero y Laura Acevedo, por su apoyo técnico a lo largo del desarrollo del presente proyecto de investigación.

Al Dr. John Thor Arnason y M. S. Cory Harris de la Universidad de Ottawa en Canadá y los Doctores Pierre Haddad y Louis Martinaeu de la Universidad de Montreal en Canadá; por el apoyo brindado durante mi estancia de investigación en ambas Universidades para la realización de los ensayos biológicos sobre la captación de $^3\text{-H}$ deoxiglucosa y activación de la AMP-K en células C2C12.

Al personal técnico de la USAI por el registro de los espectros de masas, IR y RMN (^1H y ^{13}C).

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ESQUEMAS	XI
LISTA DE ESPECTROS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Monografías tipo Organización Mundial de la Salud de especies vegetales de reconocido uso medicinal.	4
2.2 Antecedentes de algunas especies selectas de la familia Rubiaceae que constituyen el complejo copalchi.	8
2.2.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos.	8
2.2.2 Estudios farmacológicos y químicos.	13
2.3 Antecedentes de la diabetes mellitus.	24
2.3.1 Generalidades de la diabetes mellitus y papel fisiológico de la insulina.	24
2.3.2 Complicaciones de la diabetes mellitus y alternativas para su tratamiento.	29
2.3.3 Uso de plantas medicinales en México para el tratamiento de la diabetes mellitus.	32
2.3.4 Métodos para evaluar la actividad antidiabética de las plantas.	34
2.4 Antecedentes sobre el dolor.	35
2.4.1 Generalidades del dolor.	35
2.4.2 Mecanismos de nocicepción.	37
2.4.3 Modelos animales para el estudio del dolor.	42
III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	43
IV. HIPÓTESIS	44
V. PARTE EXPERIMENTAL	45

	Página
5.1 Material vegetal.	45
5.2 Ensayos biológicos.	45
5.2.1 Evaluación de la toxicidad aguda (DL ₅₀) de los extractos íntegros de <i>H. standleyana</i> de acuerdo al método de Lorke.	45
5.2.2 Evaluación del potencial mutagénico del extracto íntegro de la corteza de <i>H. standleyana</i> (ECHS) utilizando el ensayo de Ames.	46
5.2.2.1 <i>Preparación de la muestra</i>	46
5.2.2.2 <i>Preparación del inóculo</i>	47
5.2.2.3 <i>Procedimiento</i>	47
5.2.3 Evaluación de la actividad antidiabética de los extractos íntegros de la corteza (ECHS), de las hojas (EHHS) y compuestos puros aislados de <i>H. standleyana</i> .	47
5.2.3.1 <i>Selección del modelo animal.</i>	48
5.2.3.2 <i>Preparación de la muestras.</i>	48
5.2.3.3 <i>Determinación de los niveles de glucosa sanguínea.</i>	48
5.2.3.4 <i>Efecto agudo hipoglicemiante del extracto íntegro de la corteza (ECHS) de <i>H. standleyana</i> y compuestos 28 y 41.</i>	49
5.2.3.5 <i>Inducción experimental de la diabetes mellitus no insulino-dependiente.</i>	49
5.2.3.6 <i>Efecto agudo antihiper glucémico del extracto íntegro de la corteza (ECHS) de <i>H. standleyana</i>.</i>	50
5.2.3.7 <i>Efecto agudo hipoglicemiante del extracto íntegro de las hojas (EHHS) de <i>H. standleyana</i>.</i>	50
5.2.3.8 <i>Efecto agudo antihiper glucémico del extracto íntegro de las hojas (EHHS) de <i>H. standleyana</i>.</i>	50
5.2.3.9 <i>Efecto de los extractos íntegros de la corteza (ECHS) y hojas (EHHS) de <i>H. standleyana</i> sobre la tolerancia a la glucosa.</i>	51
5.2.3.10 <i>Efecto agudo hipoglicemiante de los extractos íntegros de las cortezas de <i>H. latiflora</i> (ECHL), <i>Exostema caribaeum</i> (ECEC) y de una muestra comercial de copalchi (ECMC).</i>	51

	Página
5.2.3.12 Efecto sub-agudo antihiperглиcémico de los extractos íntegros de las cortezas de <i>H. standleyana</i> (ECHS), <i>H. latiflora</i> (ECHL), <i>Exostema caribaeum</i> (ECEC), de una muestra comercial de copalchi (ECMC) y compuestos puros (9 , 7 , 12 , 28 , 41 y 42) aislados, de <i>H. standleyana</i> y <i>H. latiflora</i> .	52
5.2.3.13 Efecto de los compuestos puros 9 , 7 , 12 , 28 y 41 y de los extractos íntegros de las cortezas de <i>H. standleyana</i> (ECHS), <i>H. latiflora</i> (ECHL), <i>Exostema caribaeum</i> (ECEC), de una muestra comercial de copalchi (ECMC) sobre los niveles de insulina plasmática.	53
5.2.3.14 Efecto de los compuestos puros 9 , 7 , 12 , 28 y 41 y de los extractos íntegros de las cortezas de <i>H. standleyana</i> (ECHS), <i>H. latiflora</i> (ECHL), <i>Exostema caribaeum</i> (ECEC), de una muestra comercial de copalchi (ECMC) sobre el contenido de glucógeno hepático.	53
5.2.3.15 Efecto de los extractos íntegros de las cortezas de <i>H. standleyana</i> (ECHS), <i>H. latiflora</i> (ECHL) y los compuestos puros 9 , 12 , 28 , 41 y 42 sobre la captación de glucosa en células C2C12.	54
5.2.3.16 Efecto de los compuestos puros 9 , 12 , 28 , 41 y 42 y de los extractos íntegros de las cortezas de <i>H. standleyana</i> (ECHS), <i>H. latiflora</i> (ECHL) sobre la activación de la proteína-kinasa activada por AMP (AMP-K) utilizando la técnica de Western-blot.	55
5.2.4 Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto íntegro de la corteza (ECHS) y compuestos 28 , 41 y 42 de <i>H. standleyana</i> en ratones utilizando los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal.	56
5.2.4.1 Modelo de estiramiento abdominal.	56
5.2.4.2 Ensayo con el modelo de la placa caliente.	56
5.2.4.3 Determinación del efecto antinociceptivo del compuesto 28 en presencia de L-NAME (éster metílico de la L- ^G nitro-arginina), glibenclamida y naloxona.	57

	Página
5.2.5 Análisis estadístico.	57
5.3 Estudio fitoquímico.	58
5.3.1 Análisis cromatográficos.	58
5.3.2 Equipos utilizados para el registro de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	58
5.4 Estudio fitoquímico de la especie medicinal <i>H. standleyana</i> .	58
5.4.1 Preparación y fraccionamiento preliminar del extracto íntegro de la corteza de <i>H. standleyana</i> (ECHS).	58
5.4.2 Obtención de los productos 39 , 40 , 28 y 9 a partir de la fracción FC4 .	59
5.4.3 Obtención del producto 41 a partir de la fracción FC8 .	62
5.4.4 Hidrólisis ácida del compuesto 41 .	63
5.4.5 Obtención del producto 42 a partir de la fracción FC10 .	63
5.4.6 Preparación del extracto orgánico de las hojas de <i>H. standleyana</i> (EHHS), fraccionamiento preliminar y obtención de los productos 43 y 36 .	65
5.4.7 Obtención del producto 44 a partir de la fracción FH5 .	66
5.5 Estudio fitoquímico de la especie medicinal <i>H. latiflora</i> .	68
5.5.1 Preparación del extracto orgánico de la corteza de <i>H. latiflora</i> (ECHL) y fraccionamiento preliminar.	68
5.5.2 Obtención de los productos 26 , 40 y 28 a partir de la fracción FL2 .	69
5.5.3 Obtención del producto 15 a partir de la fracción FL10 .	70
5.5.4 Hidrólisis ácida del compuesto 15 .	71
5.5.5 Obtención del producto 42 a partir de la fracción FL12 .	72
5.6 Preparación de los extractos íntegros de las cortezas de <i>E. caribaeum</i> (ECEC) y de la muestra comercial de copalchi (ECMC).	74
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
6.1 Pruebas de inocuidad de <i>H. standleyana</i> .	75
6.2 Pruebas de eficacia de los extractos de <i>H. standleyana</i> , <i>H. latiflora</i> y <i>E.</i> <i>caribaeum</i> .	78
6.2.1 Potencial antidiabético de <i>H. standleyana</i> .	78

	Página
6.2.1.1 Efecto agudo hipoglicemiante del extracto íntegro de la corteza (ECHS).	78
6.2.1.2 Efecto agudo antihiperглиcémico del extracto íntegro de la corteza (ECHS).	79
6.2.1.3 Efecto agudo hipoglicemiante y antihiperглиcémico del extracto íntegro de las hojas (EHHS).	81
6.2.1.4 Efecto de los extractos íntegros de la corteza (ECHS) y hojas (EHHS) sobre la tolerancia a la glucosa.	83
6.2.2 Potencial antinociceptivo de la corteza de <i>H. standleyana</i> (ECHS) en ratones utilizando los modelos de la placa caliente y estiramiento abdominal	84
6.2.3 Potencial antidiabético de las cortezas de <i>H. latiflora</i> (ECHL), de <i>E. caribaeum</i> (ECEC) y de una muestra comercial de copalchi (ECMC).	86
6.2.4 Efecto sub-agudo antihiperглиcémico de los extractos íntegros de las cortezas de <i>H. standleyana</i> (ECHS) <i>H. latiflora</i> (ECHL), de <i>E. caribaeum</i> (ECEC) y de una muestra comercial de copalchi (ECMC).	91
6.3 Obtención e identificación de los principales constituyentes presentes en los extractos íntegros de la corteza (ECHS) y hojas (EHHS) de <i>H. standleyana</i> y en el extracto íntegro de la corteza (ECHL) de <i>H. latiflora</i> .	94
6.3.1 Identificación de la 25-O-acetil-3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidro-cucurbitacina F (40).	97
6.3.2 Identificación de los metabolitos de tipo 4-fenilcumarina (compuestos 41, 43 y 44).	104
6.3.3 Identificación del ácido desoxicordifolínico (42).	111
6.4 Propiedades biológicas de los productos aislados de <i>H. standleyana</i> y <i>H. latiflora</i> .	119
6.4.1 Evaluación de la actividad antidiabética de los principales constituyentes.	119
6.4.1.1 Efecto agudo hipoglicemiante de los productos 28 y 41 aislados de la corteza de <i>H. standleyana</i> .	121
6.4.1.2 Efecto sub-agudo antihiperглиcémico de los compuestos puros (9, 7, 12, 28, 41 y 42) aislados de <i>H. standleyana</i> y <i>H. latiflora</i> .	121

	Página
6.4.1.3 Efecto de los extractos íntegros de las cortezas de <i>H. standleyana</i> (ECHS), <i>H. latiflora</i> (ECHL), <i>Exostema caribaeum</i> (ECEC), de una muestra comercial de copalchi (ECMC) y compuestos puros (9, 7, 12, 28 y 41) aislados de <i>H. standleyana</i> y <i>H. latiflora</i> sobre los niveles de insulina plasmática y sobre el contenido de glucógeno hepático.	124
6.4.1.4 Efecto de los extractos íntegros de las cortezas de <i>H. standleyana</i> (ECHS), <i>H. latiflora</i> (ECHL), y compuestos puros (9, 12, 28, 41 y 42) aislados de <i>H. standleyana</i> y <i>H. latiflora</i> sobre la captación de ³ H-deoxiglucosa en células C2C12.	129
6.4.1.5 Efecto de los extractos íntegros de las cortezas de <i>H. standleyana</i> (ECHS), <i>H. latiflora</i> (ECHL), y compuestos puros (9, 12, 28, 41 y 42) aislados de <i>H. standleyana</i> y <i>H. latiflora</i> sobre la activación de la proteína-cinasa activada por AMP (AMP-K) utilizando la técnica de Western-blot.	131
6.4.2 Evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos 28, 41 y 42 de <i>H. standleyana</i> en ratones utilizando los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal.	133
6.4.3 Determinación del efecto antinociceptivo del compuesto 28 en presencia de L-NAME (éster metílico de la L- ^G nitro-arginina), glibenclamida y naloxona.	135
VII. CONCLUSIONES	137
VIII. PERSPECTIVAS	140
IX. BIBLIOGRAFÍA	141
X. APÉNDICE	149
<i>Antihyperglycemic effect of constituents from Hintonia standleyana in streptozotocin-induced diabetic rats.</i>	150
<i>Antinociceptive activity of 3-O-β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F from Hintonia standleyana (Rubiaceae).</i>	157
<i>Antidiabetic properties of selected Mexican Copalchis of the Rubiaceae family.</i>	164
<i>Difusión científica</i>	196

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1.	Especies, sinonimias, nombres comunes y usos de rubiáceas selectas que integran el “complejo copalchi”.	9
Cuadro 2.	Vouchers de referencia de las especies de <i>H. standleyana</i> y <i>H. latiflora</i> , utilizadas durante la secuenciación del DNA de tres marcadores genéticos: ITS, <i>trnL-F</i> y <i>rps16</i> .	12
Cuadro 3.	Metabolitos secundarios reportados en las rubiáceas que integran el “complejo copalchi”.	17
Cuadro 4.	Ejemplos selectos de agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2	33
Cuadro 5.	Mediadores liberados a partir de las fibras periféricas que activan los nociceptores periféricos.	39
Cuadro 6.	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta del extracto orgánico de la corteza de <i>H. standleyana</i> .	60
Cuadro 7.	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FC4 .	61
Cuadro 8.	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FC4-V .	61
Cuadro 9.	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FC4-VII .	62
Cuadro 10.	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FC8 .	63
Cuadro 11.	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FC10 .	64
Cuadro 12.	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta del extracto orgánico de las hojas de <i>H. standleyana</i> .	67
Cuadro 13.	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FH5 .	67

	Página
Cuadro 14. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de las aguas madres obtenidas del extracto orgánico de la corteza de <i>H. latiflora</i> .	69
Cuadro 15. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FL2 .	71
Cuadro 16. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FL10 .	72
Cuadro 17. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción FL12 .	72
Cuadro 18. Toxicidad aguda de los extractos íntegros de <i>Hintonia standleyana</i> .	76
Cuadro 19. Efecto sub-agudo del ECHS, del ECHL, del ECEC y del ECMC sobre los valores de peso corporal en ratas diabéticas.	93
Cuadro 20. Metabolitos secundarios aislados del extracto íntegro de la corteza de <i>H. standleyana</i> (ECHS).	96
Cuadro 21. Metabolitos secundarios aislados del extracto íntegro de las hojas de <i>H. standleyana</i> (EHHS).	97
Cuadro 22. Metabolitos secundarios aislados del extracto íntegro de la corteza de <i>H. latiflora</i> (ECHL).	98
Cuadro 23. Constantes físicas y espectroscópicas de los productos de tipo cucurbitano 26, 28 y 40 .	100
Cuadro 24. Datos de RMN ¹³ C de los productos de tipo cucurbitano 26, 28 y 40 .	101
Cuadro 25. Constantes físicas y espectroscópicas de los productos de de los productos de tipo 4-fenilcumarina 7, 9, 12, 15, 41, 43 y 44 .	112
Cuadro 26. Datos de RMN ¹ H y ¹³ C de los productos de tipo 4-fenilcumarinas 7, 9, 12, 15, 41, 43 y 44 .	114
Cuadro 27. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto 42 .	120
Cuadro 28. Efecto sub-agudo de los compuestos puros 9, 7, 12, 28, 41 y 42 sobre los valores de peso corporal en ratas diabéticas.	123

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Rubiáceas selectas del complejo copalchi.	10
Figura 2. Diferencias en la secuencia del intrón rps16 de <i>Hintonia standleyana</i> y <i>H. latiflora</i> en los pares de bases 241 y 273.	12
Figura 3. Biosíntesis de la insulina.	25
Figura 4. Mecanismo de liberación de la insulina.	26
Figura 5. Eventos moleculares en la acción de la insulina.	28
Figura 6. Procesos fisiológicos que participan en la percepción del dolor.	37
Figura 7. Clasificación de las fibras nociceptivas encargadas de la transducción y la transmisión de los estímulos generadores de dolor.	38
Figura 8. Teoría del control regulado, uno de los mecanismos para la modulación del dolor.	41
Figura 9. Efecto del ECHS sobre las cepas modificadas de <i>Sallmonella typhimurium</i> : TA100 , TA102 y TA98 ; con y sin fracción S9.	77
Figura 10. Efecto agudo del ECHS sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales.	79
Figura 11. Efecto agudo del ECHS sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas diabéticas.	80
Figura 12. Efecto agudo del EHHS sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales (A) y diabéticas (B).	82
Figura 13. Efecto del ECHS y del EHHS sobre la tolerancia a la glucosa	84
Figura 14. Efecto antinociceptivo del extracto íntegro de <i>H. standleyana</i> (ECHS) en ratones. La gráfica A corresponde al ensayo del número de contorsiones abdominales y la gráfica B al ensayo de la placa caliente.	85
Figura 15. Efecto del ECHL sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales (A) y diabéticas (B).	87

	Página
Figura 16. Efecto del ECEC sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales (A) y diabéticas (B).	88
Figura 17. Efecto del ECMC sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales (A) y diabéticas (B).	90
Figura 18. Efecto sub-agudo del ECHS , del ECHL , del ECEC , del ECMC sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas diabéticas.	94
Figura 19. Efecto agudo de los productos 28 y 41 sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales.	122
Figura 20. Efecto sub-agudo de los compuestos puros 9 , 7 , 12 , 28 , 41 y 42 sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas diabéticas.	124
Figura 21. Ensayo inmunoenzimático para la cuantificación espectrofotométrica de insulina de rata	125
Figura 22. Efecto sub-agudo del ECHS , del ECHL , del ECEC , del ECMC y compuestos puros 9 , 7 , 12 , 28 y 41 sobre los niveles de insulina plasmática (A) y sobre el contenido de glucógeno hepático (B) en ratas diabéticas.	128
Figura 23. Efecto del ECHS , del ECHL , y compuestos puros 7 , 12 , 28 , 41 y 42 sobre la captación de ³ H-deoxiglucosa en células C2C12 de músculo esquelético con 1 (A) y 18 horas (B) de pretratamiento.	130
Figura 24. Vías donde participa la activación de la AMP-K.	132
Figura 25. Efecto del ECHS , del ECHL (A) y de los compuestos 28 , 41 , 42 , 7 y 12 (B) sobre la activación de la AMP-K de células C2C12.	133
Figura 26. Efecto antinociceptivo de los compuestos 28 , 41 y 42 en ratones. La gráfica A corresponde al ensayo del número de contorsiones abdominales y la gráfica B al ensayo de la placa caliente.	134
Figura 27. Efecto del pretratamiento con el éster metílico de la N ^G -L-nitro-arginina (L-NAME), glibenclamida, y naloxona sobre la acción antinociceptiva del producto 28 (100 mg/Kg) en el ensayo de la placa caliente.	135

LISTA DE ESQUEMAS

		Página
Esquema 1.	Extracción y fraccionamiento preliminar de la corteza de <i>H. standleyana</i> .	59
Esquema 2.	Obtención de los productos 39, 40, 28 y 9 a partir de la fracción FC4 .	62
Esquema 3.	Obtención e identificación del producto 41 a partir de la fracción FC8 .	64
Esquema 4.	Obtención del producto 42 a partir de la fracción FC10 .	65
Esquema 5.	Obtención de los productos 43 y 36 .	66
Esquema 6.	Obtención del producto 44 a partir de la fracción FH8 .	68
Esquema 7.	Obtención de los productos 7, 9 y 12 a partir del extracto orgánico de la corteza de <i>H. latiflora</i> .	70
Esquema 8.	Obtención de los productos 26, 40 y 28 a partir de la fracción FL2 .	71
Esquema 9.	Obtención e identificación del producto 41 a partir de la fracción FC8 .	73
Esquema 10.	Obtención del producto 42 a partir de la fracción FL12 .	73

LISTA DE ESPECTROS

		Página
Espectro 1.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 40 (CDOD_3 , 75.5 MHz).	102
Espectro 2.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 28 (CDOD_3 , 75.5 MHz).	102
Espectro 3.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 40 (CDOD_3 , 300 MHz).	103
Espectro 4.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 28 (CDOD_3 , 300 MHz).	103
Espectro 5.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 41 (CDOD_3 , 75.5 MHz).	105
Espectro 6.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 43 (CDOD_3 , 75.5 MHz).	105
Espectro 7.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 44 (CDOD_3 , 75.5 MHz).	106
Espectro 8.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 41 (CDOD_3 , 300 MHz).	107
Espectro 9.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 43 (CDOD_3 , 300 MHz).	107
Espectro 10.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 44 (CDOD_3 , 300 MHz).	108
Espectro 11.	Vista parcial del espectro COSY del compuesto 41 (CDOD_3 , 300 MHz).	108
Espectro 12.	Vista parcial del espectro COSY del compuesto 43 (CDOD_3 , 300 MHz).	110
Espectro 13.	Vista parcial del espectro COSY del compuesto 44 (CDOD_3 , 300 MHz).	110
Espectro 14.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 42 (CDOD_3 , 75.5 MHz).	116
Espectro 15.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 42 (CDOD_3 , 300 MHz).	117
Espectros 16 y 17.	Vista parcial de los espectros COSY del compuesto 42 (CDOD_3 , 300 MHz).	118
Espectro 18.	Espectro HMBC del compuesto 42 (CDOD_3 , 300 y 75.5 MHz).	119

RESUMEN

La presente disertación describe parte de la investigación científica realizada para la elaboración de la monografía científica de la especie medicinal *Hintonia standleyana* Bullock (Rubiaceae) de acuerdo a los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud. El estudio consistió en el establecimiento de algunos parámetros de inocuidad, eficacia y control de calidad de la droga cruda derivada de *H. standleyana*, una de las cien especies más comercializadas en México con propósitos curativos.

En primer lugar se determinaron los parámetros preliminares de inocuidad mediante las pruebas de genotoxicidad de Ames y toxicidad aguda de Lorke, los resultados obtenidos mostraron que el extracto orgánico íntegro elaborado a partir de la corteza de *H. standleyana* no es mutagénico y su toxicidad fue nula de acuerdo con el criterio de Lorke.

A través de la experimentación farmacológica adecuada se evaluó el potencial hipoglicemiante, antihiper glucémico y antinociceptivo del extracto íntegro de la droga cruda de *H. standleyana*. De manera adicional, se determinaron las propiedades hipoglicemiantes y antihiper glucémicas de los extractos de las cortezas de las especies relacionadas *H. latiflora*, *Exostema caribaeum*, de una muestra comercial de copalchi y de un extracto preparado a partir de las hojas de *H. standleyana*. En todos los casos los efectos farmacológicos comprobados fueron dependientes de la dosis de los tratamientos.

Posteriormente, el estudio fitoquímico de los extractos activos condujo al aislamiento y purificación de los siguientes metabolitos secundarios: la 25-O-acetil-3-O-*b*-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**40**), la 3-O-*b*-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**28**), la 5-O-*b*-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**9**), la 5-O-[*b*-D-apiofuranosil-(1→6)-*b*-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**41**) y el ácido desoxicordifolínico (**42**) a partir del extracto de la corteza de *H. standleyana*; la 6''-O-acetil-5-O-*b*-D-galactopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**43**), y la 6''-O-acetil-5-O-*b*-D-galactopiranosil-7,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**44**) a partir del extracto de las hojas de *H. standleyana*, la 23,24-dihidro-cucurbitacina F (**26**), la 5-O-*b*-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**7**), 5-O-*b*-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-

fenilcumarina (**12**), 5-O-[*b*-D-xilopiranosil-(1→6)-*b*-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**15**) y los compuestos **9**, **28**, **40** y **42** a partir del extracto de la corteza de *H. latiflora*. Los productos **40-44** resultaron metabolitos secundarios novedosos, y la elucidación estructural de estos compuestos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos.

Un estudio antihiper glucémico a largo plazo, permitió establecer que los extractos de las especies del género *Hintonia* y los productos **28**, **12** y **41** son agentes antidiabéticos, capaces de restablecer los niveles normales de glucosa sanguínea en ratas diabéticas. De manera adicional, el extracto y producto **28** de *H. standleyana* presentaron propiedades antinociceptivas significativas.

Con el propósito de iniciar los estudios sobre el posible mecanismo de acción antidiabética de los principios activos y extractos se decidió explorar su efecto sobre los niveles de insulina plasmática, contenido de glucógeno hepático, captación de ³H-deoxiglucosa y la cinasa activada por AMP (AMP-K). Los resultados de estos estudios sugieren que el mecanismo mediante el cual los productos **28**, **12** y **41** ejercen su efecto antidiabético podría involucrar una estimulación de la secreción de insulina, un efecto insulinomimético y/o la activación de la AMP-K.

Finalmente, con la finalidad de establecer el mecanismo de acción mediante el cual el producto **28** provoca analgesia se realizaron experimentos en presencia de naloxona (antagonista no selectivo de los opioides), L-NAME (inhibidor de la sintasa del óxido nítrico) y glibenclamida. Los resultados obtenidos indican que el mecanismo de acción antinociceptiva podría involucrar la vía de NO-GMPc, la apertura de canales de K⁺ sensibles a ATP y/o la estimulación de los receptores opioides.

ABSTRACT

This work describes part of the research conducted to generate a scientific monograph of *Hintonia standleyana* Bullock (Rubiaceae) following the World Health Organization (WHO) criteria. The main goal was to establish toxicity, efficacy and quality control parameters for better assessment of the crude drug of *H. standleyana*, one of the most commercialized medicinal plants in Mexico.

In the acute toxicity studies in mice performed according to the Lorke procedure the extracts of *H. standleyana* was not toxic with a LD₅₀ value higher than 5 g/Kg. The Ames test revealed that the crude extract did not induce mutations of *S. typhimurium* TA98 and TA100 with or without the S9 microsomal fraction.

According to a series of pharmacological experiments *in vivo*, the crude extract of *H. standleyana*, showed hypoglycemic, antihyperglycemic and antinociceptive activity in a dose-dependent manner. Additionally, the antidiabetic properties of the extracts of the stem barks of *H. latiflora*, *Exostema caribaeum*, a commercial mixture of copalchi and the leaves of *H. stanleyana* were established.

From the active extracts 25-acetoxy-3-O-*b*-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (**40**), 3-O-*b*-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (**28**), 5-O-*b*-D-glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**9**), 5-O-[*b*-D-apiofuranosyl-(1→6)-*b*-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**41**), desoxicordifolinic acid (**42**), 6''-acetoxy-5-O-*b*-D-galactopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (**43**), 6''-acetoxy-5-O-*b*-D-galactopyranosyl-7,4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**44**), la 23,24-dihydrocucurbitacin F (**26**), 5-O-*b*-D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**7**), 5-O-*b*-D-glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (**12**), 5-O-[*b*-D-xylopyranosyl-(1→6)-*b*-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**15**) were obtained. Compounds **40-44** are new natural products and were characterized by spectroscopic methods.

Compounds **12**, **28** and **41** restored blood glucose levels to normal values. On the other hand, the major antinociceptive active principle from *H. standleyana* is compound **28**.

To initiate the study of the antidiabetic mode of action of the active principles, different parameters using *in vivo* and *in vitro* experimental models were determined.

These included plasma insulin levels, glycogen content, glucose uptake, AMP-K activity. The results suggest that the antidiabetic mode of action of compound **12**, **28** and **41** include a stimulatory effect of insulin secretion and/or insulinomimetic effect and/or AMP-K activation.

Finally, compound **28**-induced antinociception was partially blocked by naloxone (1 mg/Kg, i.p.), L-NAME (150 mg/Kg, i.p.) and glibenclamide (10 mg/Kg, i.p.) suggesting that its pharmacological effect could be due to the activation of the nitric oxide pathway, followed by the opening of the ATP-sensitive K⁺ channels, as well as an activation of the opioid receptors.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales juegan un papel primordial en los sistemas de salud de numerosas regiones del mundo, en particular en los países en vías de desarrollo, algunos de los cuales cuentan con sistemas de medicina tradicional milenarios (Akerele, 1988). Un buen ejemplo es la China cuya medicina tradicional ha cubierto satisfactoriamente las necesidades de salud de su población por casi 5000 años (Shen, 1996; Mahady, 1997). Este sistema de medicina tiene sus propios métodos de diagnóstico e incorpora alrededor de 7000 plantas medicinales como agentes terapéuticos (Shen, 1996).

En los países en vías de desarrollo los sistemas de medicina tradicional han jugado siempre un papel importante en el cuidado de la salud. Se estima que cerca del 80% de la población mundial depende de los sistemas de medicina tradicional como una fuente primaria para el cuidado de su salud (Bennerman *et al.*, 1983). Además en muchos de estos países los productos farmacéuticos modernos son inaccesibles para un sector importante de la población debido a sus altos costos. Por lo tanto, la herbolaria medicinal representa el recurso terapéutico más importante para esta población (WHO-TRM, 1998). Una característica común de todos los sistemas de medicina tradicional es su dependencia de las plantas como fuente de medicamentos (Mahady, 2001).

El reconocimiento de los beneficios médicos y económicos de la medicina verde continúa creciendo tanto en los países industrializados como en aquellos en vías de desarrollo (WHO-TRM, 1998). De tal forma que durante las últimas dos décadas la herbolaria medicinal ha tenido un resurgimiento en muchos países industrializados, incluyendo los EE.UU., Canadá, Australia, Japón y la Comunidad Europea (Eisenberg *et al.*, 1993; 1998; MacLennan *et al.*, 1996; Millar, 1997). Tan solo en los EE.UU., se estima que el uso de “hierbas” se incrementó en un 380% entre 1990 y 1997 (Eisenberg *et al.*, 1998). Este renacimiento ha sido motivado por muchos factores, incluyendo el incremento de practicantes de la medicina preventiva y la decepción de muchos usuarios de medicamentos convencionales. Estos últimos han buscado los productos botánicos con la percepción errónea de que son inocuos y libres de efectos colaterales (Mahady, 1998).

Aunque existe información limitada para calcular el mercado global para las medicinas basadas en plantas, con certeza, se puede estimar conservadoramente que las ventas mundiales de productos herbolarios se encuentran en el rango de los \$16 a los 20

miles de millones de dólares por año. En la Comunidad Europea, los medicamentos a base de plantas representan una parte importante del mercado farmacéutico, con ventas anuales de aproximadamente \$7 mil millones de dólares al año (Mahady, 2001). En EE.UU., la venta de medicamentos herbolarios, bajo la denominación de suplementos alimenticios, se ha incrementado drásticamente. En 1988, las ventas anuales al por menor de medicamentos herbolarios se aproximaban a los \$200 millones de dólares y para 1998, las ventas al por menor de estos productos fue estimada en \$5.1 miles de millones de dólares al año (Eisenberg *et al.*, 1998). Así que en EE.UU., la venta de medicamentos herbolarios presentó un incremento de 24 veces en tan solo 10 años.

El uso indiscriminado de medicamentos herbolarios, tanto en el seno de la medicina tradicional como fuera de esta, ha traído como consecuencia que los consumidores cuestionen su calidad, inocuidad y eficacia, principalmente debido a la falta de una regulación adecuada para su comercialización. La promoción exagerada de la compra de productos no controlados por autoridad sanitaria alguna ha empeorado esta situación (DeSmet, 2002).

La mayoría de los países tienen diferentes maneras de definir lo que es una planta medicinal, una hierba o un producto derivado de estas y han adoptado distintos caminos para la autorización, dispensación, producción y comercialización de estos materiales. Así mismo, los criterios para asegurar su calidad, inocuidad y eficacia pueden diferir considerablemente (WHO-TRM, 1998). En los EE.UU., la mayoría de los productos de origen vegetal no son considerados productos terapéuticos sino suplementos dietéticos. En cambio, en Europa se consideran medicamentos herbolarios y son regulados como los agentes terapéuticos convencionales. Para la comercialización de estos productos los fabricantes europeos deben obtener un permiso de las autoridades sanitarias, mismo que se obtiene bajo la presentación de un expediente que contenga pruebas científicas de la inocuidad y eficacia de cada producto (WHO-TRM, 1998).

En el caso específico de México, las plantas medicinales han constituido, desde épocas precolombinas, el recurso más importante con el que cuenta la población para procurar alivio de sus enfermedades. El empleo de las hierbas medicinales con fines curativos no se restringe al medio indígena y el rural, sino también a la población de zonas urbanas y suburbanas. Al igual que en otras regiones del mundo, muchas especies se explotan y comercializan de manera irracional, muchas veces bajo la creencia que son inocuas. Aún más, estas plantas y los productos derivados de ellas no son sujetos a control de calidad alguno por lo que en muchas ocasiones el usuario consume productos

adulterados o de mala calidad. A pesar de ello, a la fecha no se han elaborado de manera rigurosa monografías de tipo Organización Mundial de la Salud (OMS) de las plantas más utilizadas con fines medicinales.

En el año 2001, la Secretaría de Salud publicó la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). Este documento fue elaborado con el objetivo siguiente: “Establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, con el propósito de contribuir al mejoramiento de este tipo de productos y su uso adecuado” (FHEUM, 2001). Sin embargo, el número de monografías de especies vernáculas e introducidas resultó insuficiente, por la sencilla razón de que no se contaba con la información científica adecuada para su integración. De manera adicional, muchas de las monografías allí incluidas de especies medicinales introducidas son copia fiel de la Real Farmacopea Española. Esta estrategia, obviamente es incorrecta, ya que las plantas que se cultivan en distintas regiones pueden variar en composición, y por lo tanto en eficacia y toxicidad. Evidentemente los procedimientos para el control de calidad serán también diferentes. Entonces este primer esfuerzo de las autoridades sanitarias del país por integrar las monografías científicas de plantas medicinales, aunque importante, es insuficiente.

En consecuencia el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Secretaría de Salud, a través de un proyecto sectorial, en el cual se encuentra enmarcado el presente trabajo de tesis, otorgo fondos a un conjunto de investigadores de la UNAM y el INAH para iniciar la elaboración de monografías científicas tipo OMS de las plantas medicinales mexicanas mas ampliamente utilizadas en las prácticas terapéuticas contemporáneas. Este proyecto de carácter multidisciplinario pretende integrar los parámetros de eficacia preclínica, inocuidad y calidad de varias especies medicinales, seleccionadas con base en su frecuencia de uso. Algunas de estas especies forman parte del denominado complejo copalchi que incluye, entre otras a las rubiáceas *Hintonia standleyana* Bullock, *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock y *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. et Schult. El estudio de estas plantas constituye el eje central de está disertación.

II. ANTECEDENTES

2.1 Monografías tipo Organización Mundial de la Salud de Especies Vegetales de Reconocido Uso Medicinal.

En los países en vías de desarrollo, a pesar de la gran riqueza en plantas medicinales utilizadas tradicionalmente, no hay normas oficiales claras que regulen su uso como medicamentos (WHO-TRM, 1998). En estos países el aseguramiento de la calidad, inocuidad y eficacia de las plantas medicinales de mayor consumo para tratar las enfermedades comunes constituye un gran problema (WHO-TRM, 1999). Por lo tanto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) como parte de su estrategia global y general de “salud para todos” estableció el Programa de Medicina Tradicional de la Organización Mundial de la Salud. A través de este programa la OMS ha comenzado una tarea exhaustiva de revisión de la literatura científica mundial sobre el uso de los medicamentos herbolarios en las distintas regiones del mundo.

El trabajo preliminar para este programa comenzó en el año de 1978, en la Conferencia Internacional sobre el Cuidado Primario de la Salud realizado por la OMS y la UNICEF en Alma-Ata, en la antigua Unión Soviética. Durante esta reunión, el valor de los sistemas tradicionales de medicina fue ampliamente reconocido, y se recomendó la integración de las prácticas médicas tradicionales dentro de los sistemas de salud primaria de los Estados Miembros (Akerele, 1988).

En el año de 1986, los participantes de la cuarta Conferencia Internacional de las Autoridades Reguladoras de Fármacos (ICDRA por sus siglas en inglés) solicitaron que la OMS compilara una lista de las plantas medicinales más utilizadas alrededor del mundo y estableciera los lineamientos para el control de calidad de las plantas medicinales. Como consecuencia se elaboró el documento “*Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines*” que contiene los lineamientos generales para establecer los procedimientos destinados al control de calidad de los medicamentos herbolarios. Esta guía fue adoptada en la sexta reunión de la ICDRA celebrada en Ottawa, Canadá en el año de 1991. Durante esta reunión, las autoridades reguladoras de fármacos recomendaron que la misma OMS desarrollara los modelos de monografías científicas de las plantas medicinales más utilizadas en el mundo con el propósito de proveer información científica confiable sobre la inocuidad, eficacia y control de la

calidad y/o aseguramiento de la calidad de estas plantas. Estas monografías deberían realizarse con base en el documento ya aprobado (WHO-TRM, 1999). Como resultado de estas recomendaciones, y en respuesta a las numerosas peticiones de los Estados Miembros para la asistencia en la evaluación de los medicamentos herbolarios, la OMS-TRM se comprometió a desarrollar un proyecto a largo plazo, a fin de revisar y seleccionar las plantas medicinales comúnmente utilizadas alrededor del mundo (WHO-TRM, 1999).

Posteriormente, en el año de 1994, en Beijing, China, se realizó una reunión de expertos de la OMS, donde fueron seleccionadas 31 especies de plantas medicinales, la selección de estas plantas se basó en el amplio uso de las mismas alrededor del mundo y la importancia que tienen cada una de ellas en las regiones donde la OMS tiene injerencia. Además, también se consideró para su selección la información científica disponible para sustentar su inocuidad y eficacia. En el año de 1995, la OMS en colaboración con la Universidad de Illinois en Chicago prepararon los borradores iniciales de 31 monografías científicas (Mahady, 2001). Considerando que en el mundo se utilizan alrededor de 35,000 plantas medicinales estas monografías elaboradas por la OMS solo proporcionarían modelos para facilitar a los Estados Miembros el desarrollo de las monografías de sus propias plantas medicinales (Farnsworth, 1998).

Las monografías fueron diseñadas sobre las bases de una revisión sistemática de la literatura científica global desde 1975 a 1995, incluyendo varias farmacopeas, monografías de la “Comisión Alemana E de Monografías”, información electrónica del “Medline”, “Napralert” y “Toxiline”, referencias de textos, y por supuesto de artículos publicados en revistas científicas internacionales. Una versión preliminar de este documento de monografías fue enviado para su revisión y comentarios a 120 expertos de todos los sectores involucrados (Academia, Gobierno e Industria), entre ellos se encontraban, miembros expertos de los diferentes foros de medicina tradicional de la OMS, de la Farmacopea Internacional y Preparaciones Farmacéuticas, expertos en evaluación de fármacos y autoridades reguladoras de fármacos de 16 países. El documento revisado fue reenviado para su aceptación formal a la “Consulta Experta de la OMS sobre Modelos de Monografías de Plantas Medicinales” realizada en la ciudad de Munich, Alemania en 1996. Después de discusiones exhaustivas, 28 de las 31 monografías fueron aceptadas. Las monografías revisadas fueron entonces presentadas y aprobadas en el octavo congreso de la ICDRA realizado en Noviembre de 1996 en Manama, Bahrain. Este trabajo fue publicado en un primer volumen de una serie de

libros titulados “*WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*” en el año de 1999 (Mahady, 2001; WHO, 1999).

Cada monografía consta de dos partes. La primera parte incluye la definición de la droga, una descripción de las características botánicas, distribución geográfica, pruebas de identidad, pureza y composición, y un listado de los principales constituyentes químicos. La definición de la droga provee la nomenclatura latina correcta (nomenclatura binomial) de cada planta. Además, se presenta una lista con los sinónimos (en nomenclatura binomial) y nombres populares.

Con la inclusión de una descripción botánica detallada se pretende asegurar la calidad durante la recolecta y producción del material vegetal, mientras que la descripción detallada de la droga cruda servirá para facilitar la comercialización de los productos. El compendio de los ensayos de identidad, y de composición pueden ser utilizadas para el control y aseguramiento de la calidad. Los constituyentes químicos se encuentran descritos en la sección de la monografía que tiene por encabezado “Componentes químicos principales”.

La segunda parte de cada monografía contiene información necesaria para los practicantes profesionales del cuidado de la salud. Esta parte comienza con los usos medicinales que han sido apoyados sobre datos científicos. Los usos medicinales están definidos como: usos apoyados en datos a nivel clínico, usos descritos en farmacopeas y sistemas de medicina tradicional (no sustentados por datos clínicos, pero si en información farmacológica experimental que confirma su eficacia); y usos descritos en la medicina popular (usos que no son apoyados en datos clínicos ni experimentales). Esta sección esta escrita específicamente para los profesionales del cuidado de la salud y permitirá que un médico determine con rapidez cuales indicaciones terapéuticas están apoyadas en datos clínicos, sin tener que leer a través de toda la información farmacológica experimental y clínica. Esta sección incluye también una lista de posibles contraindicaciones, riesgos, precauciones [en general, interacción con otros fármacos o plantas, potencial carcinogénico, mutagénico, efectos sobre la fertilidad y el embarazo (efectos teratogénicos o no teratogénicos), efectos en la lactancia y uso pediátrico]. Esta sección también incorpora si existen reacciones adversas o efectos colaterales y una sección de dosificación titulada “Posología”.

Cada monografía esta ampliamente referenciada, permitiendo a los lectores acceder a información extra cuando sea necesario.

En el año de 2001 se publicó el segundo volumen de monografías “*WHO Monographs on Selected Medicinal Plants, Volume II*” que incluye la información científica de otras 30 especies vegetales (WHO, 2001). La revisión de este segundo documento de monografías se llevo a cabo en la consulta de expertos de la OMS, en Milán Italia en Marzo del año 1999.

Indudablemente, en los países en vías de desarrollo la elaboración de monografías tipo OMS de las especies más utilizadas en su medicina tradicional facilitaría la incorporación de esta medicina alternativa en sus sistemas de salud pública. Esta circunstancia conllevaría al uso apropiado de estas plantas bajo una indicación terapéutica válida garantizando además al consumidor el empleo de productos de calidad. Por otro lado, la validación del uso de las plantas medicinales y el establecimiento de los procedimientos de control de calidad a través de sus monografías permitirá el establecimiento y/o desarrollo de industrias que se dediquen a la manufactura de medicamentos herbolarios de uso nacional e internacional. Estas nuevas industrias y comercios, generaran empleos en estos países (Mahady, 2001).

Las naciones industrializadas también se ven beneficiadas por la armonización sobre el uso de estos recursos para el cuidado de la salud. En este sentido, cabe recordar que el *status* legal de los medicamentos herbolarios varía ampliamente de país en país, y en general no hay un marco de referencia internacional que facilite la regulación de estos productos. Por lo tanto, la evaluación científica confiable proporcionará certeza sobre la inocuidad, y el establecimiento de la eficacia y de los estándares de calidad, contribuyendo así a promover la salud a nivel global.

Las monografías tipo OMS no fueron escritas para remplazar otras compilaciones, como aquellas que se encuentran en farmacopeas, formularios o documentos legales, sino para proveer información científica confiable que facilite el uso apropiado de los recursos herbolarios. Sin embargo, pueden constituir la base para la elaboración de monografías de tipo farmacopeico. Finalmente, las monografías tipo OMS pueden contribuir al establecimiento de leyes y normas que regulen globalmente la explotación y conservación de los productos vegetales medicinales.

2.2 Antecedentes de algunas especies selectas de la familia Rubiaceae que constituyen el complejo copalchi.

2.2.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos.

La palabra “copalchi” proviene de dos palabras en náhuatl “copal” y “chichic” que significan “incienso amargo o resina de incienso amargo”, respectivamente. Este término se utiliza para designar al menos a 11 especies de árboles o arbustos que pertenecen a las familias Rubiaceae y Euphorbiaceae y que de acuerdo a algunos autores conforman un complejo de plantas medicinales (Linares y Bye, 1987).

Un complejo de plantas medicinales se define como “un grupo de plantas que reciben el mismo nombre común, comparten características morfológicas y/o aromáticas y les son atribuidas propiedades curativas similares. Generalmente sobresale una planta que le da el nombre al complejo y sale de su área de distribución geográfica por el mercadeo” (Linares y Bye, 1987).

Las plantas del complejo copalchi se caracterizan por sus cortezas extremadamente amargas y útiles en el tratamiento del paludismo y de la diabetes (Martínez, 1989; INI, 1994; Camacho, 2003).

Las especies de copalchi de la familia Rubiaceae se enlistan en el **Cuadro 1**; de estas, *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock, *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. et Schult., *E. mexicanum* Gray y *Hintonia standleyana* Bullock son las más utilizadas y comercializadas (**Figura 1**).

Las especies del género *Hintonia* son endémicas de México y de la región norte de la América Central (Belice y Guatemala). El género fue descrito por primera vez por Bullock (1935) y está constituido por cuatro especies: *H. latiflora*, *H. standleyana*, *H. octomera* (Hemsley) Bullock y *H. lumaeana* (Baillon) Bullock.

Cuadro 1. Especies, sinonimias, nombres comunes y usos de rubiáceas selectas que integran el “complejo copalchi”.

Nombre científico	Sinonimias	Nombre común	Usos	Referencias
<i>Hintonia latiflora</i> (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock	<i>Coutarea pterosperma</i> <i>Coutarea latiflora</i> <i>Portlandia pterosperma</i>	Campanilla, campanillo, chichicpatli, cichicquauitl, copalchi, colpachi de Jojutla, corteza de Jojutla, falsa quina, palo amargo, quina, campanilla, quina de Michoacán, copalchile, copalquin, gurañona, jujetillo, palo negro, quina, San Juan.	antipalúdico, antidiabético, antiperiódico, curar granos, febrífugo, antiséptico, tranquilizante, tratamiento de la bilis, úlcera gástrica, cálculos biliares, eupéptico, purgante y diurético	Díaz, 1976 Camacho, 1990 Aguilar <i>et al.</i> , 1994
<i>Coutarea hexandra</i> Jacq.		Colpachi de Oaxaca	antipalúdico y antidiabético	Landa, 1913 Terrés, 1913 Martínez, 1989
<i>Exostema caribaeum</i> (Jacq.) Roem. et Schult.	<i>Cinchona caribaea</i>	Copalche, colpachi de Michoacán, corteza de Jojutla, jocotillo del cerro, quina de Michoacán, Sabacche, falsa quina, palo santo, copalchi de Jojutla, planta de la quina	Antipalúdico, antidiabético, dolor de estómago, febrífugo, úlcera gástrica, disentería y diurético	Díaz, 1976 Anaya, 1991. INI, 1994
<i>Exostema mexicanum</i> A. Gray		Melena de león, quina blanca, Sabacche, quino, quina	Antipalúdico	Standley <i>et al.</i> , 1975. Camacho, 1990
<i>Hintonia standleyana</i> Bullock		Copalchi, quina amarilla, falsa quina, cocostic quina, tlachichitze	Antipalúdico, antidiabético, granos en la cara, febrífugo, dolores del cuerpo	González-Chávez <i>et al.</i> , 1996; 2000 Herch-Martínez, 1996



Hintonia latiflora (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock



Exostema caribaeum (Jacq.) Roem. et Schult



Hintonia standleyana Bullock

Figura 1. Rubiáceas selectas del complejo copalchi.

Por muchos años *H. standleyana* fue considerada como sinónimo de *H. latiflora* (Lorence, 1999). Esta confusión fue originada por Standley en su obra “Descripción de la flora Norteamericana (Standley 1918-1934)” donde equivocadamente utilizó el nombre de *H. latiflora* para describir a otra especie similar (Stranzinger *et al.*, 2006).

En el año 2000, Ochotorena-Booth reconoce la existencia de tres especies de *Hintonia*: *H. latiflora*, *H. lumaeana* y *H. octomera*. Su conclusión se basó en datos de tipo morfológico incluyendo, el patrón de la disposición de cera en las hojas, los puntos de inserción de los estambres en la corola, el tipo y número de aperturas del polen, las características de la placenta y la placentación así como la orientación de las semillas. Entonces, para Ochotorena-Booth *H. standleyana* y *H. latiflora* son la misma especie (Ochotorena-Booth, 2000). La propuesta de Ochotorena-Booth, sin embargo, no se fundamentó en evidencias de tipo molecular.

En el año 2005, Motley y colaboradores realizaron un estudio filogenético basado en el análisis combinado de un marcador en el cloroplasto (*trnL-F*) y de las regiones nucleares ribosomales ITS; este análisis proporciona la primera evidencia a nivel molecular de que *H. standleyana* y *H. latiflora* son especies diferentes. Más recientemente, un grupo Húngaro realizó la secuenciación del DNA de tres marcadores genéticos: dos del cloroplasto (*trnL-Fy rps16*) y uno de las regiones nucleares ribosomales ITS, de las dos especies recolectadas en distintas regiones de México (**Cuadro 2**). La secuencia de DNA de los marcadores utilizados fue similar para las muestras analizadas, pero lo suficientemente distintas como para separarlas a nivel de especie (Stranzinger, 2006). La principal diferencia se observó en la secuencia de la región ITS (**Figura 2**). Finalmente, este mismo grupo describió diferencias morfológicas importantes entre las dos especies (Borhidi *et al.*, 2006). De tal manera que *H. latiflora* posee los lóbulos del cáliz y la corola glabros, la superficie de las hojas están desnudas y posee tricomas a las orillas de las venas en el envés. En contraste, los lóbulos del cáliz y la corola de *H. standleyana* son pubescentes y blancos, la superficie de las hojas también es pubescente y en el envés se presentan vellosidades a lo largo de la venas.

H. standleyana se conoce popularmente con los nombres de quina, copalchi, falsa quina, cocostic-quina y quina amarilla (**Cuadro 1**). La corteza de la planta se utiliza principalmente en la medicina tradicional para el tratamiento de fiebres asociadas al paludismo, aunque también se emplea para tratar la diabetes y otros padecimientos (**Cuadro 1**) (Hersch-Martínez, 1996; González-Chávez *et al.*, 1996;

ANTECEDENTES

2000). Su distribución geográfica abarca el centro y sur de México (cuenca alta del río Balsas) por lo que muy probablemente se utilice indistintamente de su congénere *H. latiflora* y su homónimo popular *E. caribaeum* (Hersch-Martínez, 1996; González-Chávez *et al.*, 1996; 2000; Rendón-Aguilar *et al.*, 2001).

Cuadro 2. Vouchers de referencia de las especies de *H. standleyana* y *H. latiflora*, utilizadas durante la secuenciación del DNA de tres marcadores genéticos: ITS, *trnL-F* y *rps16* (Stranzinger *et al.*, 2006).

Especie	Voucher	Origen
<i>H. latiflora</i> Bullock	N. Diego y A. Beltrán 5926	México, Guerrero, San Valentino
<i>H. standleyana</i> Standl.	Ahnaran Rodríguez 62	México, Guerrero, Río Zopilote
<i>H. latiflora</i> Bullock	Reina <i>et al.</i> 98-2067	México, Sonora, Río Mayo
<i>H. standleyana</i> Benth.	Castillo 1463	Guatemala

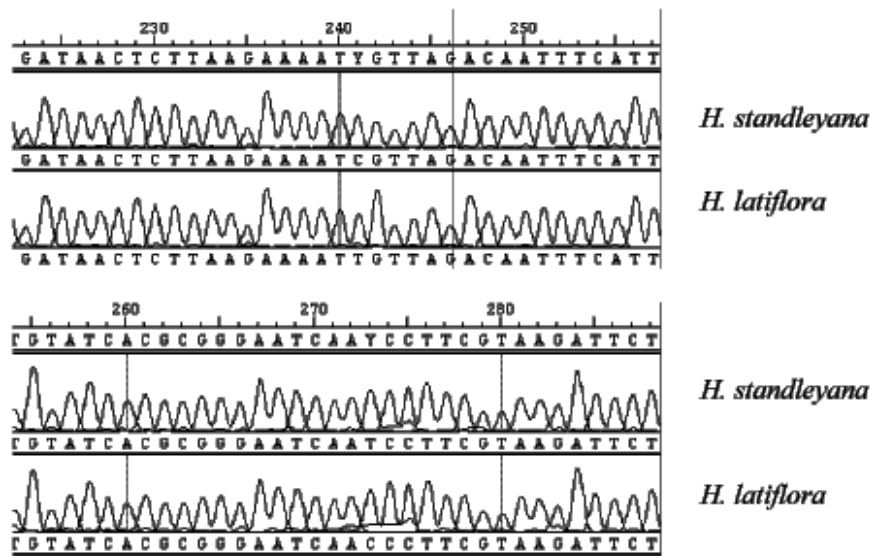


Figura 2. Diferencias en la secuencia del intrón *rps16* de *Hintonia standleyana* y *H. latiflora* en los pares de bases 241 y 273 (Stranzinger *et al.*, 2006).

La especie *Hintonia latiflora*, se encuentra distribuida en el oeste y suroeste de México y Guatemala. La especie es un árbol de siete metros de altura, con hojas opuestas, ovaladas de 4 a 12cm; las flores acampanadas, son blancas de 5 a 7 cm y aromáticas; el fruto es capsulado con semillas pequeñas y aladas (Martínez, 1989) Se conoce popularmente con los nombres de copalchi, copalquin, copalchi de Jojutla, falsa quina, entre otros (**Cuadro 1**). La corteza de esta planta es utilizada en la medicina

tradicional Mexicana como sustituto de la quina peruana para el tratamiento de la malaria, entre otros usos (**Cuadro 1**). El *Códice Florentino*, en el siglo XVI la refiere como diurético y eupéptico. A principios del siglo XX, el Instituto Medico Nacional la describe como: antipalúdico, antidiabético y diurético. Posteriormente, Alfonso Herrera señala: “vulgarmente es muy usada, pero en realidad parece poco eficaz, como diurético, en la diabetes y la albuminuria”. Maximino Martínez reporta su uso como antipalúdico, contra la bilis y para la dermatosis. Finalmente, Luís Cabrera cita su empleo como antidiarreico, antipalúdico, carminativo, diurético, nefritis, tifus exantemático, tónico y enfermedad de los riñones (INI, 1994).

La especie *Exostema caribaeum* es un árbol de diez metros de altura, su corteza es escamosa, café con manchas blanquecinas y fisuras longitudinales profundas; las hojas pecioladas, ovaladas o elípticooblondas miden de 5 a 12cm; las flores solitarias poseen una corola blanca en forma de campana; el fruto es capsular ovalado de 1 a 1.5 cm de largo, café oscuro lustroso (Anaya, 1991; INI, 1994). En su distribución geográfica se incluyen las Indias Occidentales, Centro y Sudamérica (Mata *et al.*, 1987; Pinto *et al.*, 1997); en México se encuentra distribuida en el centro, sur, suroeste y noroeste del territorio nacional (Anaya, 1991). Popularmente se conoce con los nombres de copalchi, copalche, copalchi de Michoacán, falsa quina, entre otros (**Cuadro 1**); la corteza de esta planta también es utilizada para el tratamiento del paludismo. A principios del siglo XX, el Instituto Medico Nacional la reporta como antipalúdico y diurético. Posteriormente, Maximino Martínez reporta su uso nuevamente como antipalúdico (INI, 1994). Otros usos medicinales se encuentran enlistados en el **Cuadro 1**. Un especie relacionada es *E. mexicanum* Gray que se distribuye desde el sur de México hasta Panamá. Esta especie es muy similar a *E. caribaeum* y se utiliza también como sustituto de la quina para el tratamiento del paludismo (Köhler *et al.*, 2001; Mata *et al.*, 1990). También se emplea para tratar las fiebres provocadas por el dengue.

2.2.2 Estudios farmacológicos y químicos.

Los estudios realizados sobre la actividad farmacológica de *H. latiflora* y *E. caribaeum* son numerosos y la mayoría están enfocados a la demostración de sus propiedades antidiabéticas y antipalúdicas.

Los primeros estudios sobre los efectos antidiabéticos de *H. latiflora* y *E. caribaeum* se remontan a principios del siglo XX, con el trabajo desarrollado por científicos del Instituto Médico Nacional (Landa, 1913; Terres, 1913). Posteriormente estos trabajos fueron confirmados por investigadores en Alemania, Francia e Italia mediante el empleo de varios modelos experimentales en animales. Así, en 1960 Paris y Bastien comprobaron que un extracto de *H. latiflora* no afectaba los niveles de azúcar en conejos normoglicémicos en experimentos agudos. Sin embargo, cuando el extracto fue administrado por vía oral después de de una carga de glucosa (prueba de tolerancia a la glucosa), el máximo de hiperglicemia producido era menor al nivel de glicemia observado en los animales del grupo control tratados con el vehículo (Bastien, 1960).

A finales de la década de los noventas, en otro estudio realizado en Italia, Pinto y colaboradores (Pinto *et al.*, 1997) evaluaron el efecto hipoglicemiante crónico de un preparado herbolario alemán que se comercializa con el nombre de Sucontral[®] en ratas normoglicémicas. El preparado de acuerdo a la descripción de Pinto es a base de un extracto hidroalcohólico de una mezcla de las cortezas de *H. latiflora* y *E. caribaeum*. Los resultados permitieron establecer que el preparado tiene un efecto hipoglicemiante importante.

Posteriormente, en el año 2000 Korec y colaboradores (Korec *et al.*, 2000) en Alemania demostraron el efecto antihiperglicémico agudo en ratas diabéticas del producto de síntesis 3',4',5-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina y de un extracto de "copalchi" fabricado por la empresa Harras Pharma Curarina, misma compañía que fabrica el Sucontral[®]. Tanto el producto de síntesis como el extracto, administrados por vía oral, disminuyeron significativamente los niveles de glucosa sanguínea en ratas con diabetes provocada por la estreptozotocina. Korec y colaboradores concluyeron que el compuesto de síntesis era uno de los principios activos responsables del efecto biológico observado, sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado la presencia de ese metabolito en *E. caribaeum* o *H. latiflora*.

Roca (2003) reportó que un paciente de sexo masculino, 58 años de edad y afectado con diabetes tipo I experimentó una serie de efectos adversos al ser tratado con un fitofármaco elaborado con extracto del copalchi *Coutarea latiflora* (sinónimo de *Hintonia latiflora*) por la compañía española Soria Natural. El enfermo presentó vómito, ictericia y orina muy oscura, sugiriendo un cuadro clínico de rabdomiólisis y hemólisis. Los síntomas se observaron a los dos días posteriores a la ingesta del producto y desaparecieron a los cuatro días siguientes de la interrupción del

medicamento. Cabe destacar, que este reporte representa el único caso documentado de efectos tóxicos del copalchi en humanos (Roca, 2003).

Recientemente Korecova y colaboradores (2006) describieron el estudio clínico del preparado Sucontral antes mencionado. El estudio se realizó con 30 pacientes afectados por diabetes tipo II. El estudio fue abierto, monocéntrico y no controlado. Todos los pacientes se sometieron a una dieta regular desde dos meses antes de iniciar la terapia y durante los doce meses que duró el estudio. Al cabo del estudio los niveles de glucosa en ayuno se redujeron en un 20.6% y la glucosa postprandial en un 19%. Los niveles promedio de hemoglobina glicosilada disminuyeron en un 10.3% ($p < 0.001$). Estos valores se mantuvieron estables durante 33 meses. En ningún caso se observó cuadros de hipoglicemia o efectos adversos como los reportados por Roca en 2003. Este estudio permite inferir que en caso reportado por Roca obedece a una susceptibilidad individual del paciente afectado con diabetes tipo I.

Con respecto a las propiedades antipalúdicas de *H. latiflora* y *E. caribaeum*, Noster y Kraus (1990) encontraron que los productos de hidrólisis ácida de algunos extractos orgánicos preparados con acetato de etilo de las cortezas de ambas especies, presentaban moderada actividad anti-*Plasmodium falciparum in vitro*. La actividad biológica en ninguno de los casos fue mejor que la observada por los controles positivos (cloroquina y/o quinina).

El estudio mas reciente realizado sobre las propiedades antipalúdicas fue desarrollado por Argotte-Ramos y colaboradores (2006); en este trabajo se describe la actividad antipalúdica de un extracto de AcOEt de la corteza de *H. latiflora*, el cual suprimió significativamente la parasitemia y el número de esquizontes de *Plasmodium berghei in vivo* en ratones infectados con el parásito. Del extracto activo se aislaron los glucósidos: 5-O- β -D-glucopiranosil-7,4'-dimetoxi-3'-hidroxi-4-fenilcumarina (**25**) y 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**9**). El producto **9**, suprimió significativamente respecto a la cloroquina (control positivo) el desarrollo de los esquizontes de *P. berghei* en un ensayo *in vivo*.

Camacho y colaboradores (2003) comprobaron la actividad antiprotozoaria moderada de un extracto metanólico elaborado con la corteza de *H. latiflora*. En este caso los organismos de prueba fueron *Leishmania donovani promastigotes* y *Trypanosoma brucei*.

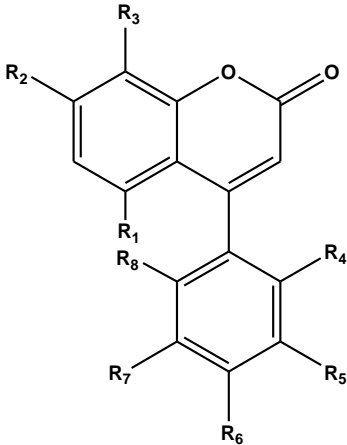
En un estudio sobre la potencialidad antimicrobiana de *H. latiflora* se demostró que un extracto metanólico fue inactivo contra levaduras, bacterias gram-positivas y

gram-negativas, sin embargo, el metabolito 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**7**) aislado durante el estudio fitoquímico de *H. latiflora* presento una actividad moderada contra *Candida albicans* (Rojas *et al.*, 1992). En este mismo trabajo se comprobó que los glicósidos 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-4'-hidroxi-fenilcumarina (**11**), 6''-O-acetil-5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4',-trihidroxi-4-fenilcumarina (**16**), 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**28**) y 6-O- β -D-glucopiranosil-4-metoxi-2,3',4'-trihidroxi- β -fenilestireno (**37**), metabolitos secundarios aislados a partir de la corteza de *H. latiflora* carecen de actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos de prueba (Rojas *et al.*, 1992).

Los estudios fitoquímicos realizados a la fecha sobre las especies *H. latiflora*, *E. caribaeum* y otras rubiáceas que pertenecen al “complejo copalchi” han permitido el aislamiento y caracterización de numerosos metabolitos secundarios principalmente del tipo de las 4-fenilcumarinas [**1-25** y **32-35** (Sánchez-Viesca *et al.*, 1969 Reher *et al.*, 1983; Reher y Kraus. 1984; Delle-Monache *et al.*, 1983; 1984; 1985; Mata *et al.*, 1987; 1988; 1990a; 1990b; 1992; Aquino *et al.*, 1988; Soto *et al.*, 1988; Köhler *et al.*, 2001; Argotte-Ramos *et al.*, 2006)]. También se han descrito la presencia de cucurbitacinas [**26-31** (Reguero *et al.*, 1987; Mata *et al.*, 1990a; 1990b)] un fenilestireno [**37** (Mata *et al.*, 1992)] un flavonoide [**38** (Camacho, 1990)] y manitol [**36** (Sánchez-Viesca *et al.*, 1969; Mata *et al.*, 1987; 1988; Camacho, 1990)]. Las estructuras de los principales constituyentes presentes en estas especies se muestran en el **Cuadro 3**.

Cabe mencionar que la especie medicinal *H. standleyana* no ha sido objeto de ningún estudio fitoquímico y farmacológico previo, orientado a establecer primeramente su inocuidad, enseguida su eficacia y composición química.

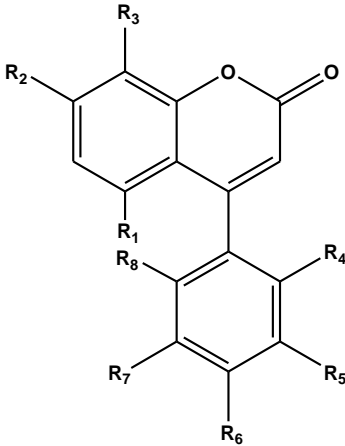
Cuadro 3. Metabolitos secundarios reportados en las rubiáceas que integran el “complejo copalchi”.

Estructura	Especie	Referencia
	<p><i>Exostema caribaeum</i> (1, 2, 7 y 8) <i>Coutarea latiflora</i> (2, 4 y 5) <i>Coutarea hexandra</i> (2, 3, 5, 6) <i>Exostema mexicanum</i> (3 y 4) <i>Hintonia latiflora</i> (7)</p>	<p>Sanchez-Viesca <i>et al.</i>, 1969 Reher <i>et al.</i>, 1983 Reher y Kraus, 1984 Delle-Monache <i>et al.</i>, 1983; 1984; 1985 Mata <i>et al.</i>, 1987; 1988; 1990a Köhler <i>et al.</i>, 2001</p>
<p>1: R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= OH, R₄= H, R₅= H, R₆= OCH₃, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>2: R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= H, R₆= OCH₃, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>3: R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= H, R₆= OH, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>4: R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OCH₃, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>5: R₁= OH, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= OH, R₅= H, R₆= H, R₇=OH y R₈= H</p>		
<p>6: R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= H, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>7: R₁= O-β-D-galactopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OH, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>8: R₁= OH, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= OCH₃, R₆= OH, R₇=H y R₈= H</p>		

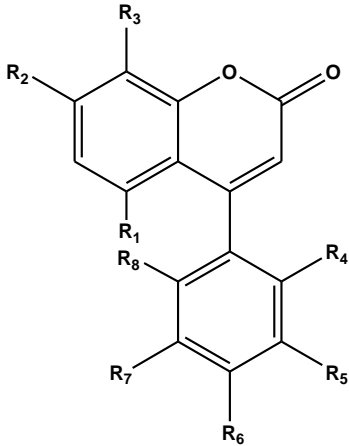
Cuadro 3. Metabolitos secundarios reportados en las rubiáceas que integran el “complejo copalchi” (continuación).

Estructura	Especie	Referencia
	<p><i>Exostema caribaeum</i> (9, 10, 11 y 13) <i>Coutarea hexandra</i> (9, 12 y 14) <i>Exostema mexicanum</i> (9) <i>Hintonia latiflora</i> (9 y 12)</p>	<p>Mata <i>et al.</i>, 1987; 1988; 1990a; 1992 Aquino <i>et al.</i>, 1988 Soto <i>et al.</i>, 1988 Argotte-Ramos <i>et al.</i>, 2006</p>
<p>9: R₁= O-β-D-glucopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OH, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>10: R₁= O-6''-acetil-β-D-galactopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OH, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>11: R₁= O-β-D-galactopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= H, R₆= OCH₃, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>12: R₁= O-β-D-glucopiranosil, R₂= OH, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OH, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>13: R₁= OH, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= CH₃, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>14: R₁= O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)- β-D-glucopiranosil], R₂= OH, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OH, R₇=H y R₈= H</p>		

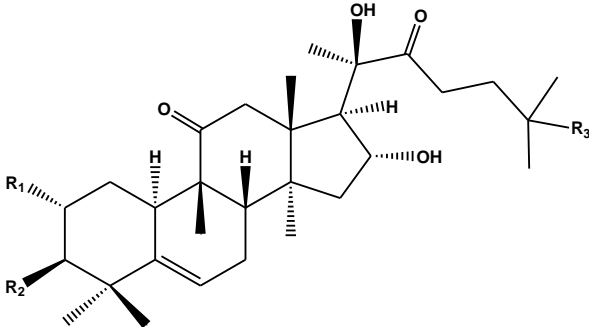
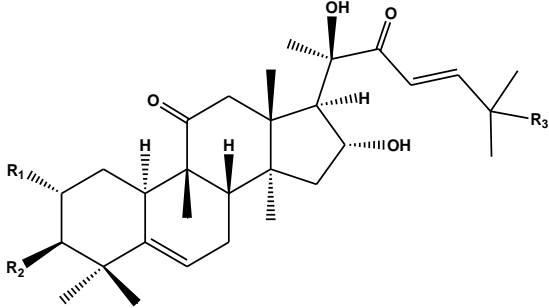
Cuadro 3. Metabolitos secundarios reportados en las rubiáceas que integran el “complejo copalchi” (continuación).

Estructura	Especie	Referencia
	<p><i>Coutarea hexandra</i> (15) <i>Hintonia latiflora</i> (16, 17 y 18) <i>Exostema mexicanum</i> (16, 19 y 20)</p>	<p>Aquino <i>et al.</i>, 1988 Mata <i>et al.</i>; 1990a; 1990b; 1992 Soto <i>et al.</i>, 1988 Köhler <i>et al.</i>, 2001</p>
<p>15: R₁= O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)- β-D-glucopiranosil], R₂= OH, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OH, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>16: R₁= O-6''-acetil-β-D-glucopiranosil, R₂= OH, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OH, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>17: R₁= O-β-D-galactopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= H, R₆= OH, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>18: R₁= O-β-D-glucopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= OH, R₅= H, R₆= OH, R₇=OH y R₈= H</p>		
<p>19: R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OH, R₇=H y R₈= H</p>		
<p>20: R₁= OCH₃, R₂= OH, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OCH₃, R₇=H y R₈= H</p>		

Cuadro 3. Metabolitos secundarios reportados en las rubiáceas que integran el “complejo copalchi” (continuación).

Estructura	Especie	Referencia
	<p><i>Exostema mexicanum</i> (21, 22, 23 y 24) <i>Hintonia latiflora</i> (25)</p>	<p>Köhler <i>et al.</i>, 2001 Argotte-Ramos <i>et al.</i>, 2006</p>
<p>22: R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= OH, R₄= H, R₅= H, R₆= OH, R₇=H y R₈= H 23: R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= OCH₃, R₄= H, R₅= OH, R₆= OH, R₇=H y R₈= H 24: R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= OH, R₄= H, R₅= OH, R₆= OH, R₇=H y R₈= H 25: R₁= O-β-D-glucopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OCH₃, R₇= H y R₈= H</p>		

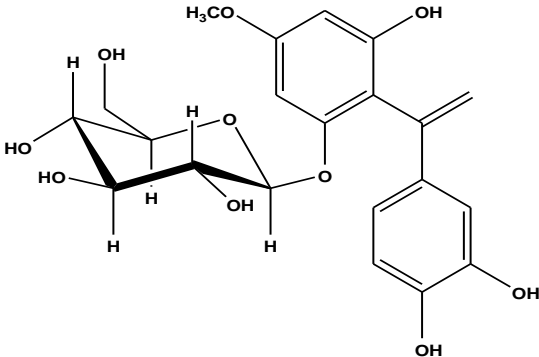
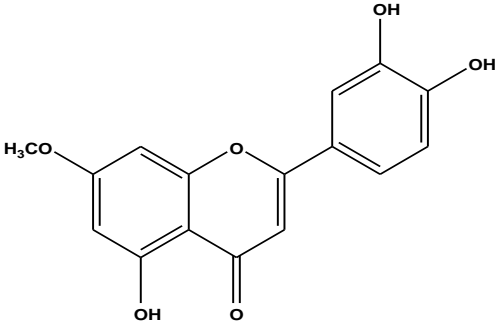
Cuadro 3. Metabolitos secundarios reportados en las rubiáceas que integran el “complejo copalchi” (continuación).

Estructura	Especie	Referencia
	<i>Hintonia latiflora</i> (26, 27 y 28)	Reguero <i>et al.</i> , 1987 Mata <i>et al.</i> , 1990a
<p>26: R₁= OH, R₂= OH y R₃= OH; 27: R₁= OH, R₂= OH y R₃= OAc; 28: R₁= OH, R₂=O-β-D-glucopiranosil y R₃= OH</p>		
	<i>Exostema mexicanum</i> (29, 30 y 31)	Mata <i>et al.</i> , 1990b
<p>29: R₁= OH, R₂= OH y R₃= OH; 30: R₁= OH, R₂= OH y R₃= OAc; 31: R₁= O-β-D-glucopiranosil, R₂= OH y R₃= OAc</p>		

Cuadro 3. Metabolitos secundarios reportados en las rubiáceas que integran el “complejo copalchi” (continuación).

Estructura	Especie	Referencia
	<p><i>Exostema caribaeum</i> (32, 33, 34 y 35) <i>Coutarea latiflora</i> (32 y 33) <i>Coutarea hexandra</i> (32) <i>Hintonia latiflora</i> (32)</p>	<p>Reher <i>et al.</i>, 1983 Reher y Kraus. 1984 Mata <i>et al.</i>, 1987; 1988</p>
<p>32: R₁= OCH₃, R₂= H, R₃= H, R₄= OH, R₅= OH y R₆= H 33: R₁= OCH₃, R₂= H, R₃= H, R₄= OCH₃, R₅= OH y R₆= H 34: R₁= OH, R₂= H, R₃= H, R₄= OH, R₅= OH y R₆= H 35: R₁= OCH₃, R₂= H, R₃= H, R₄= H, R₅= OH y R₆= OCH₃</p>		
<p style="text-align: center;">36</p>	<p><i>Exostema caribaeum</i> <i>Hintonia latiflora</i></p>	<p>Sanchez-Viesca <i>et al.</i>, 1969 Mata <i>et al.</i>, 1987; 1988 Camacho, 1990</p>

Cuadro 3. Metabolitos secundarios reportados en las rubiáceas que integran el “complejo copalchi” (continuación).

Estructura	Especie	Referencia
 <p style="text-align: center;">37</p>	<i>Hintonia latiflora</i>	Mata <i>et al</i> , 1992
 <p style="text-align: center;">38</p>	<i>Hintonia latiflora</i>	Camacho, 1990

2.3 Antecedentes de la diabetes mellitus

2.3.1 Generalidades de la diabetes mellitus y papel fisiológico de la insulina.

La diabetes mellitus es el desorden endocrino más común alrededor del mundo. De acuerdo a la OMS (WHO, 2004) este padecimiento afecta a más de 176 millones de personas en el planeta.

El termino diabetes mellitus describe a un desorden metabólico de múltiples etiologías que se caracteriza por un estado de hiperglicemia crónico asociado a un defecto en la secreción de insulina y/o resistencia a la acción de esta hormona, como resultado de estos trastornos se presentan alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. La diabetes mellitus se clasifica principalmente en dos categorías, la diabetes tipo 1 o diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID) y la diabetes tipo 2 o diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID).

La diabetes tipo 1 se caracteriza por la falta de secreción de insulina como consecuencia de una destrucción total de tipo auto inmune de las células β del páncreas. Este tipo de diabetes es la menos común y tan solo representa el 5 % de todos los casos de esta enfermedad.

La diabetes tipo II es una condición que se caracteriza por una relativa deficiencia en la secreción de insulina y/o una resistencia a la acción de esta hormona (“resistencia a la insulina”); este tipo de diabetes es la forma más común de la enfermedad en el mundo y representa el 95% de todos los casos (WHO, 1999). Los factores comúnmente asociados con la resistencia a la insulina son la obesidad y la falta de actividad física (sedentarismo). Otros factores que incrementan el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 son: hipertensión, sobrepeso, síndrome de ovario poliquístico, desordenes endocrinos (acromegalia, síndrome de Cushing), hiperlipidemia, hipercolesterolemia y la genética (Ross *et al.*, 2004; Soumyanath, 2006).

La insulina es el principal regulador de las concentraciones de glucosa sanguínea y posee múltiples acciones sobre diferentes tejidos del cuerpo. Posterior a una noche de ayuno, los niveles de insulina se encuentran disminuidos y las concentraciones de glucosa sanguínea se encuentran reguladas por la glucosa almacenada en el hígado. Después de que los alimentos son ingeridos en la dieta, los intestinos digieren este alimento y la glucosa producida es absorbida desde el tracto gastrointestinal, causando un incremento en la concentración de glucosa sanguínea. La liberación de la insulina de

las células β del páncreas es estimulada por el incremento de la glucosa sanguínea. La insulina reduce rápidamente la glicemia inhibiendo la liberación de glucosa del hígado y por un incremento en la captura de glucosa por el músculo y el tejido adiposo. Una vez que las concentraciones de glucosa comienzan a disminuir, la liberación de la insulina se inhibe a través de un proceso clásico homeostático de retroalimentación negativa (Ross *et al.*, 2004, Soumyanath, 2006).

La insulina se produce exclusivamente en las células β del páncreas en una región celular conocida como los islotes de Langerhans. La insulina es una proteína pequeña que se produce a partir de una proteína inactiva más grande llamada preproinsulina. La preproinsulina contiene una secuencia de aminoácidos en la región amino-terminal que es necesaria para que este precursor atraviese la membrana del retículo endoplásmico (RE) mediante un proceso post-translacional. Una vez que la preproinsulina se encuentra en el RE, su péptido señal se remueve proteolíticamente y se genera la proinsulina. La proinsulina resultante contiene ya los tres enlaces disulfuro, indispensables en la forma activa de la hormona. Enseguida, peptidasas específicas actúan sobre la proinsulina liberando la forma madura y activa de la insulina (**Figura 3**). Finalmente, la insulina se almacena en gránulos secretores, los cuales son acumulados en el citoplasma hasta que son liberados al medio extracelular (Ross *et al.*, 2004, Soumyanath, 2006).

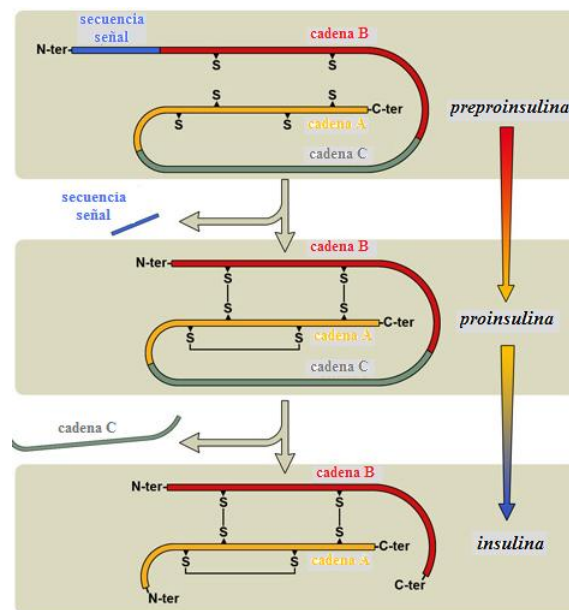


Figura 3. Biosíntesis de la insulina.

El proceso mediante el cual la insulina se libera de las células β , se lleva a cabo en respuesta a cambios en la concentración de la glucosa sanguínea. Los transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT-2) presentes en el páncreas regulan la entrada de glucosa dentro de las células β . Una vez que la glucosa entra a las células, es fosforilada por la enzima glucocinasa y metabolizada en la vía glicolítica. El producto principal del metabolismo de la glucosa es el trifosfato de adenosina (ATP), molécula que almacena gran cantidad de energía para las funciones biológicas; esta energía se almacena en los enlaces de alta energía que unen los grupos fosfato y se liberan cuando uno o dos de los fosfatos se separan de las moléculas de ATP. El compuesto resultante de la pérdida de un fosfato se llama difosfato de adenosina (ADP); si se pierden dos se llama monofosfato de adenosina (AMP). Un incremento en la relación ATP:ADP provoca el cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP en la membrana celular. El incremento de los iones K^+ tiene como consecuencia la despolarización de la célula. El efecto neto es una activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, los cuales transportan iones Ca^{2+} dentro de la célula. El incremento vertiginoso de las concentraciones de calcio provoca la translocación de los gránulos que almacenan a la insulina por un proceso de exocitosis. El resultado final es la liberación de la insulina y su difusión hacia los vasos sanguíneos (**Figura 4**).

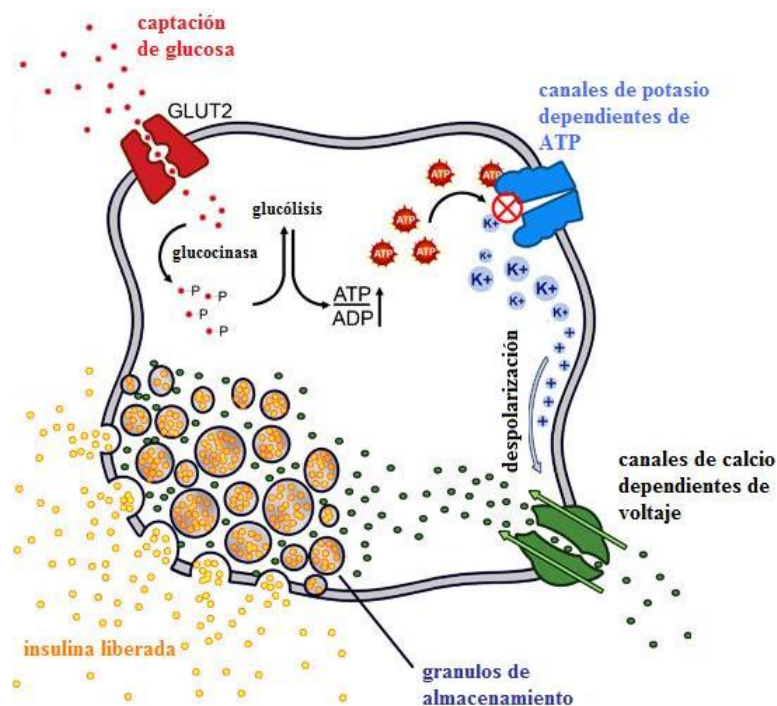


Figura 4. Mecanismo de liberación de la insulina.

La liberación de la insulina es un proceso bifásico. La cantidad inicial de insulina que se libera tras la absorción de glucosa depende de las cantidades disponibles almacenadas. Esta liberación se puede prolongar mientras persista la hiperglicemia siempre y cuando la producción de la hormona sea normal. Además, las células β deben de regenerar las cantidades iniciales de insulina almacenada que disminuyeron en la fase de respuesta rápida (Ross *et al.*, 2004, Soumyanath, 2006).

Aunque la insulina es la principal hormona que disminuye los niveles de glucosa sanguínea, un número de factores humorales pueden incrementar las concentraciones de glucosa sanguínea, estos factores incluyen el glucagón, las catecolaminas, el cortisol y la hormona del crecimiento. El glucagón es una hormona péptidica que se libera de las células α del páncreas en respuesta a una disminución de la glicemia. El principal órgano blanco del glucagón es el hígado, en el cual se incrementa la glucogenólisis y la gluconeogénesis, además inhibe la glucogénesis y la glucólisis (Ross *et al.*, 2004, Soumyanath, 2006).

La insulina ejerce su efecto sobre sus órganos blancos (hígado, músculo y tejido adiposo) por la unión a un receptor celular de superficie, activando una serie de cascadas de señalización intracelular (Ross *et al.*, 2004, Soumyanath, 2006). Esta es un área de intensa investigación científica porque se espera que el entendimiento del mecanismo de acción de la insulina permita revelar nuevos blancos de acción de fármacos. A grandes rasgos, el receptor de insulina es un heterotetrámero miembro de una familia de receptores de tipo tirosina-cinasa (actividad enzimática que adiciona grupos fosfato a residuos de tirosina en las proteínas) que posee dos sub-unidades α (dominio extracelular) y dos sub-unidades β (dominio intracelular). En condiciones basales, el dominio extracelular sirve de inhibidor alostérico de las sub-unidades β . Así, la insulina se une reversiblemente a su receptor transmembranal que se encuentra en altas concentraciones en los tejidos sensibles a insulina. La región intracelular del receptor de insulina posee actividad tirosina-cinasa. La unión de la insulina a su receptor en el dominio extracelular induce un cambio conformacional en la molécula del receptor; este cambio incrementa la actividad tirosina-cinasa de las sub-unidades β , de tal forma que múltiples residuos de tirosina son fosforilados dentro de la porción intracelular (Ross *et al.*, 2004, Soumyanath, 2006). Los residuos de tirosina fosforilados crean sitios de unión para un número de proteínas intracelulares solubles que se unen al receptor y son entonces fosforiladas por el receptor tirosina-cinasa de insulina. Este

evento inicial, da lugar a diferentes cascadas de señalización celular que involucran otras tirosina-cinasas, serina-cinasas y cinasas de lípidos. Las principales moléculas involucradas incluyen la cinasa de lípidos PI3-cinasa, la proteína-cinasa B, glucógeno sintasa 3-cinasa y algunas isoformas de la proteína-cinasa C (Ross *et al.*, 2004, Soumyanath, 2006).

Por medio de esta compleja red de señalización, la insulina promueve la captura de glucosa en el músculo esquelético y tejido adiposo, el almacenamiento de glucógeno en el hígado, y la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) desde el citoplasma hasta la membrana celular en los tejidos sensibles a insulina; este último efecto promueve la entrada de glucosa a las células a través de un gradiente de concentración (Ross *et al.*, 2004, Soumyanath, 2006) y depende de las moléculas PI3-cinasa y de la proteína-cinasa C. Los eventos antes descritos se ilustran en la **Figura 5**.

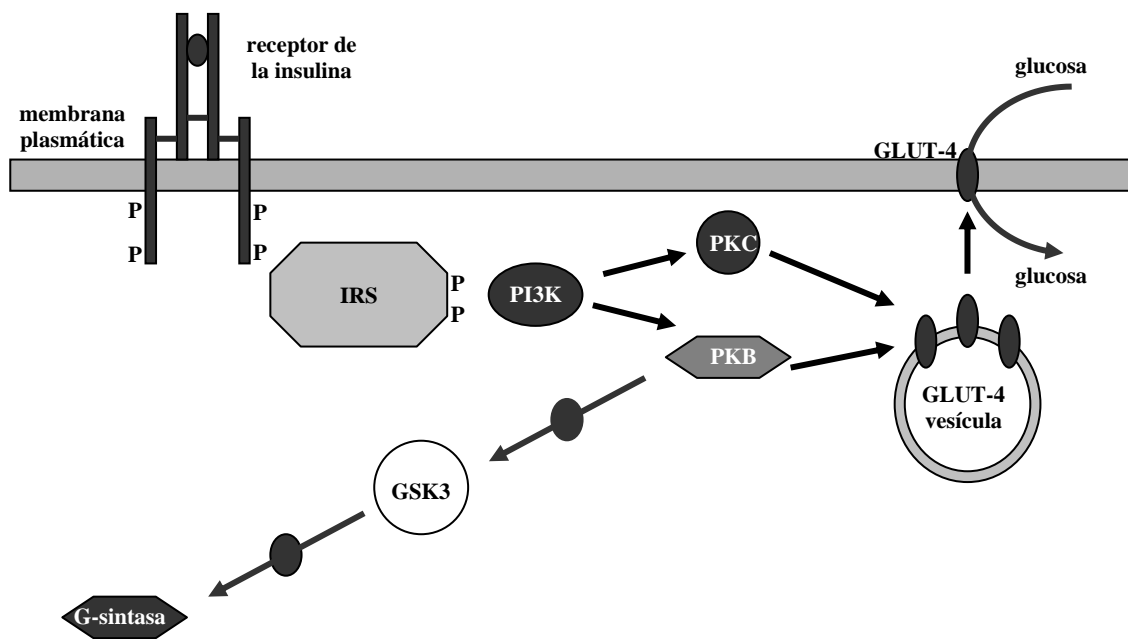


Figura 5. Eventos moleculares en la acción de la insulina. IRS (sustrato del receptor de insulina), PI3K (cinasa del PI-3), PKC (proteína-cinasa C), PKB (proteína-cinasa B), GLUT-4 (transportador de glucosa sensible a la insulina), GSK3 (cinasa de la glucógeno sintasa-3), G-sintasa (glucógeno sintasa) y P (grupos fosfato).

2.3.2 Complicaciones de la diabetes mellitus y alternativas para su tratamiento.

La diabetes mellitus es una enfermedad de largo plazo y degenerativa, asociada con un gran número de complicaciones clínicas. La enfermedad afecta los pequeños vasos sanguíneos de la retina, el riñón y los nervios periféricos y estas alteraciones están directamente relacionadas con la duración y severidad de las altas concentraciones de glucosa sanguínea (hiperglicemia). Estas complicaciones microvasculares pueden provocar una serie de inconvenientes; los más comunes son: ceguera, insuficiencia renal crónica y daño a las fibras nerviosas de las extremidades, principalmente en los pies donde se presentan ulceraciones, tan graves, que la mayoría de las veces es necesario amputar uno o dos de los miembros a los pacientes. Los vasos sanguíneos mayores también son afectados en el corazón, cerebro y circulación periférica (daños a nivel macrovascular). Los pacientes diabéticos tienen altos índices de insuficiencia cardíaca, embolias y enfermedades de tipo vascular periférica, con respecto a los individuos normales de su misma edad y sexo. Estas complicaciones contribuyen significativamente al incremento en los índices de mortalidad en las personas diabéticas (Ross *et al.*, 2004, Soumyanath, 2006).

La terapia de la diabetes mellitus está enfocada en la reducción de la hiperglicemia; la regulación de los niveles de glucosa sanguínea disminuirá los riesgos por complicaciones macro y microvasculares de la enfermedad (Ross *et al.*, 2004, Soumyanath, 2006).

Los principales mecanismos mediante el cual los agentes terapéuticos reducen las altas concentraciones de glucosa son:

- *Supresión de la motilidad gástrica.*

Una reducción de la motilidad gástrica resultara en una liberación retardada del contenido de carbohidratos de los alimentos en el intestino delgado y además incrementara la distensión gástrica, resultando en un menor volumen de alimento del que fue consumido. Se cree que parte de la eficacia mostrada por el péptido 1 tipo glucagón (GLP-1) y por la colescistocinina (CCK) en pacientes diabéticos se debe a sus efectos sobre la motilidad gástrica. Sin embargo, estos tratamientos han mostrado diferentes efectos adversos como náuseas y vomito (inherentes a una disminución de la motilidad gástrica), lo que ha limitado su aceptación en tratamientos a largo plazo.

- Reducción en la absorción de los carbohidratos.

La restricción del contenido de carbohidratos de la dieta es obviamente un método para reducir la absorción de los mismos en el organismo. Los alimentos que contienen un alto contenido de fibra soluble también retardan la absorción de los carbohidratos. Los carbohidratos muy complejos necesitan ser degradados por enzimas intestinales -por ejemplo la amilasa- en subunidades monosacáridas antes de su absorción en el tracto gastrointestinal. La inhibición de ciertas enzimas disacaridasas (por ejemplo la α_1 -glucosidasa) presentes en el epitelio intestinal es uno de los blancos de acción más estudiado para el desarrollo de nuevos fármacos que disminuyan la absorción de la glucosa desde el lumen intestinal, la cual se lleva a cabo mediante un proceso activo en el que participan transportadores de glucosa dependientes de sodio.

Algunos productos de este tipo como la acarbosa y el miglitol (**Cuadro 4**) se han comercializado recientemente.

- Aumento en la secreción de insulina pancreática.

La hiperglicemia en la diabetes tipo 2 ocurre por una disfunción en la secreción de insulina. La alteración en la secreción de insulina se agrava por la resistencia que desarrollan los tejidos sensibles a la hormona. Las sulfonilurías (**Cuadro 4**) incrementan la secreción de insulina a través del bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP (K^+_{ATP}) en las células β pancreáticas que son responsables de la secreción de la hormona. Estos fármacos son capaces de provocar hipoglicemia debido a que la liberación de insulina que se produce es independiente de las concentraciones de glucosa sanguínea. La eficacia de las sulfonilureas está limitada por la pérdida progresiva de las células β con el paso del tiempo. Después de una terapia de 10 años, estos fármacos son incapaces de estimular eficientemente la secreción de insulina, lo cual limita su uso en la diabetes tipo 2. Por este motivo, frecuentemente, el tratamiento de la diabetes de tipo 2 se basa en una terapia de combinación de fármacos.

- Administración de insulina exógena.

La deficiencia absoluta de insulina en el organismo es tratada lógicamente con el reemplazo de esta hormona, por lo que constituye la única terapia para el tratamiento de la diabetes tipo 1. La terapia con insulina exógena se realiza mediante la inyección subcutánea de la hormona.

La insulina es también necesaria para aquellos pacientes con diabetes tipo 2 que no responden a la terapia con fármacos orales, situación común con el paso de los años y el desarrollo de la enfermedad.

Los pacientes tratados con insulina tienen un riesgo muy alto de sufrir hipoglicemia cuando los niveles de glucosa sanguínea (NGS) disminuyen por debajo de los valores normales; además, la administración de insulina exógena mediante inyecciones subcutáneas, con el objetivo de evitar su degradación por las enzimas gastrointestinales e incrementar su biodisponibilidad, resulta molesto para los pacientes.

- Disminución de la liberación de glucosa hepática.

Durante la hiperglicemia en la diabetes tipo 2, está ampliamente establecido que se presenta un incremento en la liberación de la glucosa hepática, por lo tanto, cualquier tratamiento que reduzca o inhiba este mecanismo, disminuirá los niveles de glucosa sanguínea. La metformina (**Cuadro 4**) uno de los fármacos de uso frecuente para tratar la diabetes tipo 2, ejerce su efecto farmacológico a través de este mecanismo. La insulina también inhibe la liberación de glucosa hepática; por el contrario, el glucagón incrementa la liberación de glucosa hepática, por lo que, cualquier mecanismo que interfiera con la actividad del glucagón también disminuirá la glicemia. De manera alterna, los fármacos que inhibieran cualquiera de las enzimas involucradas en la glucogenólisis o en la gluconeogénesis pudieran tener un efecto relevante en disminuir la liberación de la glucosa hepática.

- Incremento en la sensibilidad a la insulina.

La resistencia a la insulina es una característica patofisiológica de la diabetes tipo 2. Para incrementar la sensibilidad de las células a la insulina, se han recomendado cambios en el estilo de vida de los pacientes y algunos tratamientos farmacológicos. La metformina también incrementa la sensibilidad a la insulina. Recientemente, una clase de fármacos llamados tiazolidinedionas (**Cuadro 4**) –agonistas de un receptor nuclear de hormonas de tipo PPAR γ (receptor γ activado por un proliferador de peroxisomas)- se están estudiando a nivel clínico para el tratamiento de la diabetes tipo 2; estos agonistas del PPAR γ incrementan la sensibilidad a la insulina mediante un aumento en la transcripción de ciertos genes que participan en el proceso de sensibilización.

- Pérdida de peso corporal y ejercicio.

Un tratamiento efectivo de la diabetes tipo 2 es la pérdida de peso corporal, especialmente de tejido adiposo visceral (abdominal). Esto es debido a la restricción parcial en la ingesta calórica y de carbohidratos, pero la pérdida de peso también mejora la sensibilidad a la insulina, así que, los niveles de glucosa sanguínea permanecen disminuidos a pesar de un incremento en el consumo de calorías en la dieta. Con las elevadas concentraciones de ácidos grasos presentes en el plasma de las personas obesas, existe un incremento de liberación de glucosa hepática, además de una inhibición en la acción de la insulina en el músculo esquelético. Con la pérdida de peso corporal, se presenta una disminución del contenido de tejido adiposo y por lo tanto, un decremento en la liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo.

El ejercicio también provoca un aumento en la sensibilidad a la insulina y disminuye las concentraciones de glucosa en la diabetes tipo 2. A largo plazo, el ejercicio reduce la cantidad de tejido adiposo visceral e incrementa la captación de glucosa en el músculo esquelético en un periodo post-prandial. La captación de glucosa incrementa con el ejercicio debido a que durante esta actividad se promueve la translocación de los transportadores de glucosa GLUT-4 a la superficie celular. Este efecto es independiente de la insulina y por lo tanto constituye un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos fármacos.

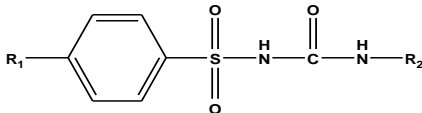
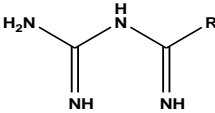
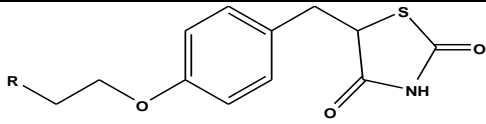
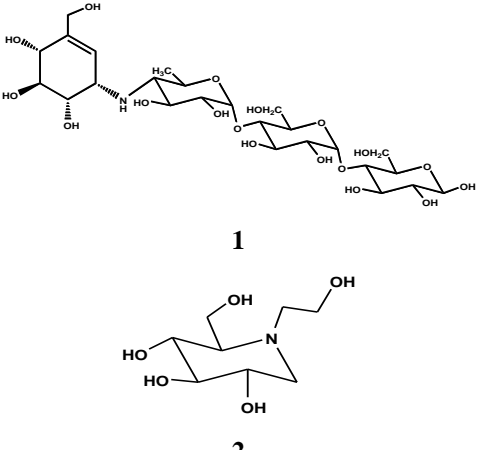
Un cambio en el estilo de vida con un aumento en el ejercicio y una disminución de peso corporal, han mostrado tener un efecto preventivo en el desarrollo de la DM tipo 2. El promover las actividades físicas y un control en la dieta, han llegado a convertirse en un desafío de salud pública para aquellos gobiernos que intentan controlar los altos índices de prevalencia de la diabetes tipo 2.

2.3.3 Uso de plantas medicinales en México para el tratamiento de la diabetes mellitus.

En México, la OMS estima que el número de pacientes diabéticos se incrementará de dos millones que se tenían registrados en el año 2002 a más de seis millones para el 2030. Estas cifras implican que en tan sólo un par de décadas en nuestro país se alcanzaría uno de los índices de diabetes más altos del mundo. De acuerdo a la Secretaría de Salud (SSA), en el año 2001 la diabetes fue la primera causa de mortalidad entre la población mexicana (SSA, 2004). Esto se debe a las

complicaciones de la enfermedad –trastornos cardiacos, retinopatías, insuficiencias renales y neuropatías-, mismas que son las causas más comunes de morbilidad crónica y discapacidad entre la clase obrera.

Cuadro 4. Ejemplos selectos de agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

Categoría	Núcleo base	Ejemplos
Sulfoniluréas	 <p>1: $R_1 = C_{10}H_{11}O_2NCl$, $R_2 = C_6H_{11}$ 2: $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_4H_9$ 3: $R_1 = C_{10}H_{14}O_2N$, $R_2 = C_7H_{13}$</p>	1: glibenclamida 2: tolbutamida 3: glimepirida
Biguanidas	 <p>1: $R = NH(CH_2)_3$ 2: $R = NHCH_2C_6C_5$</p>	1: metformina 2: fenformina
Tiazolidinedionas	 <p>1: $R = C_7H_8N$ 2: $R = C_7H_8N$</p>	1: pioglitazona 2: rosiglitazona
Inhibidores de la α -glucosidasa	 <p>1 2</p>	1: acarbosa 2: miglitol

Desde el punto de vista etnofarmacológico, es importante entender que un gran sector de la población mexicana que padece esta enfermedad utiliza para su tratamiento tanto la medicina convencional como la tradicional. En México, la información oficial

disponible acerca del uso de plantas para el tratamiento de la diabetes es limitada, pero, los pacientes diabéticos siempre utilizan hierbas con o sin prescripción médica. Normalmente, los pacientes son diagnosticados en algún centro primario para el cuidado de la salud y allí los médicos encargados regularmente prescriben el tratamiento alopático apropiado. Sin embargo, una vez hecho el diagnóstico los pacientes recurren con frecuencia a los tratamientos prescritos por los curanderos locales o vendedores de hierbas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Soumyanath, 2006). Las rubiáceas del complejo copalchi pertenecen al grupo de aproximadamente 306 especies vegetales que son utilizadas en las practicas medicas populares en México para el tratamiento de la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Soumyanath, 2006).

2.3.4 Métodos para evaluar la actividad antidiabética de las plantas.

Muchos modelos en animales han sido ampliamente utilizados para investigar la eficacia, modo de acción y efectos colaterales de las plantas antidiabéticas y sus principios activos. Debido a la heterogeneidad de las condiciones de diabetes en el hombre, un simple modelo animal no es completamente representativo de un tipo particular de diabetes humana. Por lo tanto, diferentes modelos en animales han sido desarrollados cada uno con algunas de las características que son observadas en los enfermos con diabetes. El uso de animales normales (no diabéticos), diabéticos (inducidos experimentalmente), con baja tolerancia a la glucosa e insulino-resistentes (pero no diabéticos), también son utilizados para demostrar la actividad hipoglicemiante y para investigar el posible modo de acción antidiabética de los materiales derivados de plantas (Bailey y Flatt, 1990). No es extraño que algunos agentes que muestran efecto en disminuir los niveles de glucosa sanguínea en animales, no sean efectivos en el hombre y viceversa. Se sabe que entre individuos de una misma especie pueden existir variaciones en la sensibilidad a un mismo agente por diferencias en los parámetros de absorción, metabolismo y eliminación.

Los modelos animales más ampliamente utilizados son roedores, los cuales son relativamente más económicos que los mamíferos superiores y generalmente son más susceptibles a adquirir condiciones de diabetes en un periodo de tiempo menor. Por ejemplo, la rata de la cepa Wistar tiene la ventaja de presentar en su etapa adulta y en condiciones normales de confinamiento valores de glicemia similares a los del ser humano (80-120 mg/dL), además de que es una especie susceptible a la acción de

diabetógenos convencionales como la aloxana y la estreptozotocina (STZ) (Verspohl, 2002; Soumyanath, 2006); ambas sustancias son los diabetógenos más recurridos por los investigadores para el estudio de la actividad antidiabética potencial de sustancias. Los trabajos que describen el empleo de estas sustancias para la inducción experimental de la diabetes en roedores son innumerables rebasando el millar (Verspohl, 2002; Soumyanath, 2006). Sin embargo, el grado y severidad de la hiperglicemia obtenida con estas sustancias variará dependiendo de la dosis empleada, la vía de administración y del tiempo de exposición al diabetógeno, por lo que es posible inducir experimentalmente diabetes tipo 1 (insulino-dependiente) ó de tipo 2 (no insulino-dependiente) en los animales de prueba (Verspohl, 2002; Soumyanath, 2006).

Una vez comprobada las propiedades hipoglicemiantes de las diferentes sustancias de prueba, la literatura sugiere la realización de ensayos *in vitro* que permitan establecer el posible modo de acción antidiabética de los extractos y/o compuestos puros, por ser este tipo de ensayos más selectivos y específicos que los modelos *in vivo*. En este caso, se han desarrollado numerosos ensayos que involucran la determinación de la actividad de distintas enzimas clave en los diferentes procesos metabólicos alterados en la diabetes, además del empleo de líneas celulares de músculo esquelético, tejido adiposo e hígado que permitan de manera más precisa establecer las propiedades antidiabéticas de las diferentes sustancias de prueba (Verspohl, 2002; Soumyanath, 2006).

En un libro publicado recientemente se revisa de manera detallada la metodología utilizada para el descubrimiento de nuevos agentes antidiabéticos de origen natural, así como el impacto de las plantas medicinales para el tratamiento de la diabetes en México y otras regiones del mundo (Soumyanath, 2006).

2.4 Antecedentes sobre el dolor.

2.4.1 Generalidades del dolor.

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular que se puede experimentar de manera cotidiana (Teixidor y Massó, 1997). En esta experiencia, se combinan mecanismos neurofisiológicos, psicológicos, de comportamiento y culturales. En síntesis, el dolor es un problema multidimensional, psicofísico y sociocultural.

El dolor es afectado por varios factores como son: las emociones, el medio ambiente, el estado afectivo, la experiencia previa, factores socioculturales, y acondicionamiento previo, entre otros. Es importante señalar que el dolor es la causa más común de estrés psíquico y fisiológico, y el motivo más usual para buscar atención médica. Asimismo, es el factor más importante de ausentismo laboral, incapacidad y pensión por invalidez.

Como la experiencia del dolor y la capacidad para tolerarlo varía entre los individuos y las circunstancias, se optó por acuñar el término neurofisiológico de nocicepción (Forth y Martín, 1995). Se denomina nocicepción a la detección de estímulos (ya sea térmicos, mecánicos, eléctricos y químicos) y sus consecuencias inmediatas (Yaksh, 1997). Estos estímulos se transmiten por las fibras periféricas sensitivas que llegan a la médula espinal y de ésta al tronco cerebral (Teixidor y Massó, 1997).

El dolor está determinado por dos componentes: uno discriminativo sensorial, relacionado con la intensidad específica y con la localización del estímulo afectivo; y otro, afectivo-motivacional, a través del cual se percibe el ambiente definido y complejo conductual atribuido a las emociones y ansiedad (Yaksh, 1997).

El dolor puede ser persistente o crónico. El primero caracteriza a muchas enfermedades y es la razón principal por la que un paciente acude al médico, mientras que el dolor crónico parece no tener ningún propósito útil y tan solo sirve para hacer miserable la vida del paciente. A su vez, los dolores persistentes pueden dividirse en dos categorías, los nociceptivos y los neuropáticos. Los primeros son el resultado de la activación directa de nociceptores de la piel o de los tejidos blandos en respuesta a una lesión tisular. Por lo general, aparecen como acompañantes de una inflamación. Tal es el caso del dolor ocasionado por esguinces, cólicos, distensiones musculares, artritis, y aquellos asociados a tumores cancerosos que invaden los tejidos blandos. Los tres primeros padecimientos producen formas leves de dolor nociceptivo, mientras que el dolor ocasionado por los dos últimos es más intenso.

Los dolores neuropáticos se deben a la lesión directa de los nervios del sistema nervioso periférico o central, y a menudo producen una sensación de quemadura o de descarga eléctrica. Estos se presentan en casos de diabetes, síndromes de distrofia simpática refleja y de neuralgia post-herpética, que es un dolor agudo que se presenta en algunos pacientes después de un ataque de herpes zóster o “culebrilla”.

2.4.2 Mecanismos de nocicepción

Algunos autores describen a la nocicepción como la percepción de señales eléctricas en el sistema nervioso central (SNC), que se originan por la estimulación y activación de receptores sensoriales que son terminaciones nerviosas especializadas (nociceptor), localizados en la periferia y que nos informan acerca del daño en algún tejido. La nocicepción, como mecanismo electroquímico, comprende cuatro procesos fisiológicos ilustrados en la **Figura 6** y son: la transducción, transmisión, modulación y percepción.

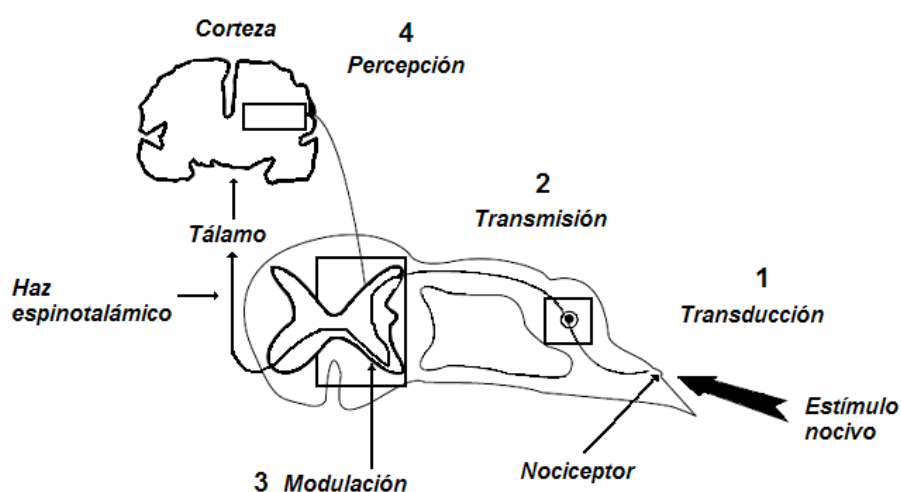


Figura 6. Procesos fisiológicos que participan en la percepción del dolor.

Transducción y transmisión.

La transducción es la conversión de los estímulos nocivos en señales eléctricas por las terminaciones nerviosas periféricas, en tanto que, la transmisión es la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas (**Figura 6**). Los nociceptores tienen la capacidad de extraer la información generada por los estímulos y transformarla en potenciales de acción.

Tanto la transducción, como la transmisión de los estímulos generadores de dolor se llevan a cabo a través de diferentes tipos de fibras. Estas se clasifican de acuerdo a su grado de mielinización y la velocidad a la cual conducen los potenciales de acción en: (i) Fibras C, (ii) Fibras A δ , (iii) Fibras A β (**Figura 7**).

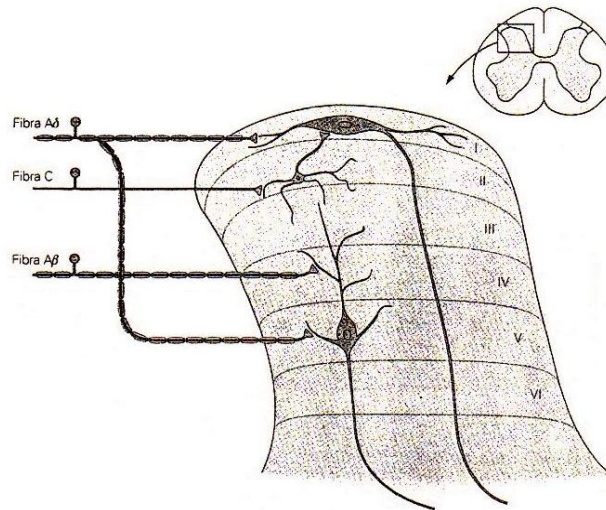


Figura 7. Clasificación de las fibras nociceptivas encargadas de la transducción y la transmisión de los estímulos generadores de dolor.

La activación de fibras aferentes somáticas (que inervan piel, articulaciones y músculo esquelético) o viscerales (que inervan tejido cardiovascular, genitourinario, respiratorio y gastrointestinal) por estímulos mecánicos, térmicos, eléctricos o químicos, provocan la liberación local de mediadores que sensibilizan a los nociceptores y además facilitan el desarrollo del proceso de inflamación. Estos mediadores y sus efectos se indican en el **Cuadro 5**.

Los potenciales de acción generados por el estímulo de los nociceptores son transmitidos a lo largo de los axones hacia el asta posterior de la médula espinal, luego se bifurcan y ascienden o descienden por el fascículo de Lissauer. Las células marginales de Cajal reciben estas fibras con la información periférica nociceptiva (Forth y Martín, 1995).

De las fibras periféricas se liberan sustancias excitadoras como la sustancia P, el glutamato y el aspartato que hacen sinapsis con neuronas de relevo amplificando la transmisión del dolor; estas neuronas de relevo se concentran en una serie de vías localizadas preferentemente en el cordón anterior y anterolateral de la sustancia blanca. La información nociceptiva puede ser modulada endógenamente a diferentes niveles. El mecanismo principal de modulación es a nivel supraespinal, en éste se activan sistemas que se dirigen hacia la médula espinal para contrarrestar la información de la periferia (Teixidor y Massó, 1997). A nivel supraespinal la sustancia gris periacueductal (SGPA), el núcleo de rafé magnus (NRM) y el locus coeruleus (LC) modulan la transmisión nociceptiva a nivel espinal (Forth y Martín, 1995). Estos sistemas están interconectados

entre sí permitiendo que la activación de uno genere la actividad de otro (Benhbehani, 1995).

Cuadro 5. Mediadores liberados a partir de las fibras periféricas que activan los nociceptores periféricos.

Mediador	Mecanismo hiperalgésico	Referencia
Bradiquininas	Actúan en el receptor B2 acoplado a PLC promoviendo la liberación de ácido araquidónico; el cual participa en la síntesis de prostaglandinas involucradas en la nocicepción. Además, en presencia de la serotonina y prostaglandinas, incrementan el influjo de calcio y la conductancia. Este efecto es de tipo sinérgico.	Dray y Perkins, 1993, 1994 Millan, 1999
Prostaglandinas	Las de la serie E ₂ e I ₂ sensibilizan a los nociceptores periféricos. Las E ₂ actúan sobre sus receptores EP ₁ -EP ₄ acoplados a proteínas G, incrementando los niveles de AMPc y en consecuencia la nocicepción. También tienen un efecto excitatorio directo al incrementar la conductancia al Na ⁺ en la neuronas sensoriales que liberan la sustancia P.	Ferreira y Nakamura, 1979a; 1979b; 1979c Nicol <i>et al.</i> , 1992
Serotonina	Actúa sobre los receptores 5-HT ₂ acoplados a proteínas G ocasionando el cierre de los canales de K ⁺ y el incremento de la descarga neuronal para que las neuronas sensoriales se activen. También puede sensibilizar a las neuronas, incrementar su excitabilidad vía AMPc y aumenta la inhibición de las fosfodiesterasas.	Fozard, 1984 Taiwo <i>et al.</i> , 1992
Protones	Activan los nociceptores y los sensibilizan a estímulos de tipo mecánico. Niveles bajos de pH ocasionan dolor e hiperalgesia asociada a inflamación.	Steen <i>et al.</i> , 1992
Oxido nítrico	Puede regular la actividad de la COX-II (producción de prostanoïdes proinflamatorios), además también produce hiperalgesia por el aumento de GMPc.	Salvemini <i>et al.</i> , 1992 Duarte y Ferreira, 1992
Adrenalina y noradrenalina	Estas catecolaminas estimulan las fibras aferentes. En axones aferentes dañados se encontró un aumento en los receptores α ₂ – adrenérgicos.	Sato y Perl, 1991
Canales de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ⁺⁺	Cuando hay daño en los axones y un incremento de los mediadores inflamatorios se incrementa la conductancia del Na ⁺ y Ca ⁺⁺ y los canales de K ⁺ se cierran. Estos eventos contribuyen a la excitabilidad de la neurona.	Devor <i>et al.</i> , 1993 Dolphin, 1990 Weinreich y Wonderlin, 1987

En la SGPA abundan los receptores opioides de tipo μ ; cuando estos son activados por los opioides endógenos y exógenos se inhibe al sistema GABAérgico y se activan las células de apagado “off-cells” localizadas en el NRM las cuales producen analgesia. Estas células de apagado permanecen inactivas por la actividad inhibitoria GABAérgica (Roerig *et al.*, 1988). Cabe destacar que existen tres familias de péptidos opioides: la propiomelanocortina (precursor de β -endorfinas); la proencefalina (precursor de las encefalinas) y la prodinorfina (precursor de dinorfina y péptidos relacionados); estos actúan en receptores específicos opioides μ , δ y κ (Gaveriaux-Ruff y Kieffer, 1999).

Además de las células de apagado, en el NRM existen dos tipos más de células: células de encendido “on-cells” y células neutrales “neutral-cells”, mismas que se proyectan hacia el trigémino y médula espinal, a lo largo del funículo dorsolateral. Las neuronas “off-cells” tienen una influencia inhibitoria tónica sobre las aferentes nociceptivas de la médula espinal, mientras que las “on-cells” facilitan la respuesta de estas aferencias al estímulo nocivo (Fields *et al.*, 1991). Cuando las células de apagado son activadas hay liberación de 5-HT, la cual actúa en los receptores 5-HT_{1B} y 5HT₃ ocasionando la disminución de la excitabilidad de las fibras aferentes (Fields *et al.*, 1991).

El LC es un sistema que se activa cuando la noradrenalina (NA) ocupa los receptores adrenérgicos α_2 . En consecuencia se incrementa el umbral de actividad de las fibras C y la hiperpolarización de las fibras aferentes primarias, que trae como consecuencia una disminución de la liberación de la sustancia P. Este sistema se proyecta hacia la médula espinal para bloquear la información nociceptiva, debido a la actividad presináptica (Nance y Sawynok, 1987; Bensson, 1997).

Modulación y percepción.

Uno de los principales descubrimientos en la investigación del dolor es que el encéfalo tiene circuitos moduladores cuya principal función es regular la percepción del dolor. Hay varios sistemas moduladores o reguladores dentro del sistema nervioso central (SNC) que responden a estímulos nocivos. El sitio donde inicia la regulación está en la médula espinal, donde las interconexiones entre las vías aferentes nociceptivas y no nociceptivas pueden controlar la transmisión de información nociceptiva a centros superiores del encéfalo.

El mecanismo más estudiado de modulación del dolor es el de “Compuerta de Control” o del “Control Regulado”. Este mecanismo, en palabras sencillas, implica el “cierre” de las fibras aferentes no nociceptivas, y la “apertura”, de las fibras aferentes nociceptivas, durante la transmisión de los potenciales nocivos. El mecanismo se centra en la interacción entre cuatro clases de neuronas en el asta posterior de la médula espinal: 1) fibras aferentes nociceptivas no mielínicas (fibras C); 2) fibras no nociceptivas mielínicas (fibras A β); 3) neuronas de proyección; e 4) interneuronas inhibitorias. La neurona de proyección es excitada tanto por neuronas nociceptivas como no nociceptivas. La neurona inhibitoria se activa espontáneamente y normalmente inhibe a la neurona de proyección, con lo que reduce la intensidad del dolor; esta neurona excitada por fibras no nociceptivas mielínicas, sin embargo, no es inhibida directamente por el nociceptor no mielínico. Así pues, el nociceptor tiene efectos directos e indirectos sobre la neurona de proyección (**Figura 8**).

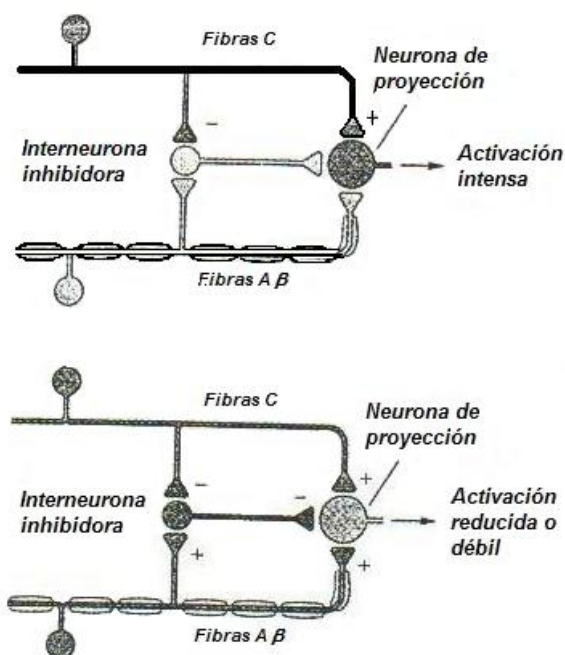


Figura 8. Teoría del control regulado, uno de los mecanismos para la modulación del dolor.

2.4.3 Modelos animales para el estudio del dolor

El estudio del dolor requiere de modelos que nos permitan obtener información útil para comprender la red de eventos involucrados en el proceso. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor ha descrito varios modelos que requieren el uso de animales. Básicamente, los modelos animales de dolor deben tratar de reproducir situaciones clínicas o fisiopatológicas que permitan el estudio de alternativas terapéuticas aplicables a la clínica o, al menos, el mejor conocimiento de las mismas. Las características de estos modelos son las siguientes:

- *Deben ser de utilidad clínica.*
- *Deben ser cuantificables y reproducibles.*
- *Deben estar validados y cumplir con determinados requerimientos de tipo ético.*

Dos de los modelos más utilizados son: el de retirada ante un estímulo térmico (modelo de la placa caliente) y el de estiramiento abdominal. Ambos modelos son de fácil implementación y detectan principalmente dolor agudo.

1). Modelo de retirada ante un estímulo térmico

El animal, generalmente roedores (rata o ratón), se coloca dentro de un cilindro de plástico que está sobre una placa caliente (a temperatura constante, $55 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$). Este estímulo produce dos conductas (saltar o lamer sus patas traseras) que pueden medirse en términos de tiempo de reacción. Este modelo es comúnmente usado para identificar analgésicos que actúan a nivel del SNC (Eddy y Leimbach, 1953).

2). Modelo de estimulación química: estiramiento abdominal

En este modelo, el animal (normalmente roedores) responde al dolor que se genera en respuesta a un estímulo químico. El método consiste en inyectar intraperitonealmente a los roedores una solución algogénica (i.e. sol. diluida de ácido acético) y medir, en un periodo de tiempo, el número de estiramientos-contracciones provocados por el estímulo químico. El modelo permite detectar compuestos con actividad analgésica central y periférica; cabe señalar que este modelo ha sido objeto de críticas debido a que el estímulo químico no se considera natural (Koster *et al.*, 1959).

III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las especies vegetales *H. standleyana*, *H. latiflora* y *E. caribaeum* constituyen – de acuerdo a la FHEUM (sección de extrafarmacopea)- tres de las 100 plantas más comercializadas con fines curativos en México (FHEUM, 2001). Sin embargo, a la fecha, no se cuenta con la información científica necesaria para validar su inocuidad y eficacia. Tampoco existen criterios para establecer la calidad de las drogas crudas y/o preparados herbolarios derivados de estas especies. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo primordial generar algunos parámetros de inocuidad, eficacia y calidad de *Hintonia standleyana* Bullock (Rubiaceae), de acuerdo a los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud. Así mismo pretende completar algunos parámetros de eficacia de las drogas crudas de *H. latiflora* y *E. caribaeum*. La información generada permitirá la elaboración de una monografía integral tipo OMS y sentará las bases para el desarrollo y aplicación de procedimientos para la validación de la eficacia y control de calidad de estas especies. La información también será apropiada para la elaboración, revisión y actualización de sus monografías farmacopéicas. Toda esta información indudablemente será de utilidad para los industriales, médicos, farmacéuticos y otros profesionistas de la salud.

Para el cumplimiento del objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la toxicidad aguda en ratones y el potencial mutagénico de la corteza de *H. standleyana* de acuerdo con los métodos de Lorke y Ames, respectivamente, con el propósito de iniciar los estudios relativos a su inocuidad.
2. Determinar el potencial antidiabético de las drogas crudas de *H. latiflora*, *E. caribaeum* y *H. standleyana*, con la finalidad de corroborar en forma parcial la eficacia de estas plantas en las prácticas médicas alternativas de México.
3. Establecer los principios activos y/o marcadores a través del estudio fitoquímico de los extractos orgánicos de la corteza y hojas de *H. standleyana* y de la corteza de *H. latiflora*. El aislamiento e identificación de estos constituyentes permitirán la estandarización de los preparados herbolarios a base de estas especies, así como el establecimiento de las pruebas de identidad y composición de la droga cruda y los preparados elaborados con este material.

4. Iniciar los estudios de mecanismos de acción antidiabético de los extractos y compuestos que resultasen activos a través de las evaluaciones biológicas apropiadas.
5. Determinar el efecto antinociceptivo de *H. standleyana* con la finalidad de corroborar su utilidad como agente analgésico e iniciar los estudios de mecanismo de acción antinociceptivo de los extractos y compuestos que resultasen activos.

IV. HIPÓTESIS.

Aunque este trabajo se realizará de acuerdo a una serie de lineamientos de la OMS (WHO, 1998; 1999) es factible establecer las siguientes hipótesis de trabajo:

1. El uso popular de *H. standleyana* y su relación filogenética con *H. latiflora* permiten proponer que la especie también biosintetize metabolitos con propiedades antidiabéticas y analgésicas, mismos que le conferirían a sus preparados vernáculos propiedades antihiperlipidémicas y antinociceptivas, respectivamente.
2. Sí las hojas de *H. standleyana* acumulan el mismo tipo de metabolitos que la corteza es probable que los preparados a base de las hojas presenten las mismas propiedades farmacológicas que los de la droga cruda.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material vegetal.

El material vegetal (corteza y hojas) de la especie medicinal *Hintonia standleyana* fue recolectado en Temalac, Municipio de Atenango del Río, Guerrero, en Enero del 2003 (corteza) y Mayo del 2005 (hojas) e identificados por el Ingeniero Celso Guerrero del Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH) y el Biólogo Francisco Ramos del Herbario Nacional, MEXU. Ejemplares de referencia están depositados en la colección etnobotánica del Herbario Actores Sociales de la Flora Medicinal (ASFM)-INAH, en Cuernavaca, Morelos (P. Hersch No. 824 y P. Hersch No. 423, corteza y hojas, respectivamente). El material vegetal (corteza) de la especie medicinal *H. latiflora* fue recolectado en Chihuahua en Junio del 2003 e identificado por el Dr. Robert Bye (Jardín Botánico, UNAM). Un ejemplar de referencia (Bye No 31, 735) está depositado en el Herbario Nacional (MEXU). El material vegetal de la especie medicinal *E. caribaeum* fue recolectado en Atenango del Río, Guerrero, en Enero del 2003 e identificado por el Ingeniero Celso Guerrero del INAH y el Biólogo Francisco Ramos del MEXU. Un ejemplar de referencia (Marchena 1167098) está depositado en la colección etnobotánica del ASFM-INAH en Cuernavaca, Morelos. La muestra comercial de “copalchi” (MC) fue obtenida del mercado popular de Sonora, en la Ciudad de México.

El material vegetal fue desecado a temperatura ambiente y la fragmentación se realizó por separado (cortezas y hojas) en un molino Willey Modelo 4.

5.2 Ensayos biológicos.

5.2.1 Evaluación de la toxicidad aguda (DL₅₀) de los extractos íntegros de *H. standleyana* de acuerdo al método de Lorke.

Para la determinación de la dosis letal media (DL₅₀), se utilizó el protocolo experimental descrito por Lorke (1983). Para esto, se utilizaron ratones de la cepa ICR de 60 días de edad y con un peso corporal promedio en un rango de 20-30 g, los cuales fueron adquiridos comercialmente de Harlan de México S. A. de C. V. Los extractos

orgánicos [CH₂Cl₂-MeOH (1:1)] de la corteza (**ECHS**) y hojas de *H. standleyana* (**EHHS**) se evaluaron en una primera etapa a las dosis de 10, 100, 1000 mg /Kg (dosis únicas *per os*, n = 3); las muestras fueron suspendidas en solución salina (0.1 % de Tween 80). Después de la administración de los extractos, los animales se mantuvieron bajo vigilancia durante las primeras ocho horas y durante intervalos de 24 horas hasta completar dos semanas, registrándose su comportamiento, peso corporal y algún cambio perceptible. Si durante el periodo de evaluación alguno de los ratones de prueba murió se registró la hora y el día del deceso, además se hizo un examen morfológico de los órganos del animal.

En una segunda etapa, se utilizaron nuevos grupos de ratones y las muestras fueron administradas por la misma vía con dosis más altas (1600, 2900 y 5000 mg/Kg), de acuerdo a los criterios de Lorke. A continuación se realizaron las mismas observaciones que en la primera fase.

El valor de la DL₅₀ se calculó con la media geométrica entre la dosis donde se presentó el deceso del primer animal y la última dosis donde no hay ratones muertos.

5.2.2 Evaluación del potencial mutagénico del extracto íntegro de la corteza de *H. standleyana* (ECHS) utilizando el ensayo de Ames.

El potencial mutagénico del **ECHS** se determinó de acuerdo al protocolo experimental descrito por Ames (Ames y Maron, 1983). Para lo cual, se utilizaron las cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 y TA 102 que presentan diferentes tipos de mutación en el operón de histidina.

5.2.2.1 Preparación de la muestra

Las muestras a evaluar se prepararon de la siguiente manera: 50 mg del **ECHS** se disolvió en 1 mL de DMSO. A partir de estas soluciones se realizaron las diluciones necesarias para obtener concentraciones finales de 50, 25 y 12.5 µg/µL.

5.2.2.2 Preparación del inóculo

100 µL de la cepa en estudio, 20 µL de la muestra a evaluar y 500 µL de agua o bien de la fracción S9 se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía exactamente 2 ml de medio de inóculo, cuya composición es la siguiente: 0.6% de agar, 0.6% de NaCl, 0.5 mM de L-histidina y 0.5 mM de D-biotina. La suspensión anterior se homogeniza antes de depositarse sobre la superficie de las placas de agar.

5.2.2.3 Procedimiento

Los ensayos se realizaron en placas de Petri de 10 cm de diámetro interno. Para cada muestra de prueba se transfirieron a las cajas de Petri 25 mL del medio Vogel-Bonner previamente esterilizado. Posteriormente, se realizaron los subcultivos mediante la adición del inóculo sobre la superficie de las cajas. Las placas se incubaron en posición invertida a 37 °C durante 48 horas. Al finalizar el tiempo de incubación se procedió a contar el número de revertantes de histidina con ayuda de un contador de colonias modelo Fisher. Como mutágenos de referencia se utilizaron el ácido picrolónico, ciclofosfamida, etilen-nitro-guanidina y la mitomicina C. Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado y para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de variancia (ANADEVA) seguido de una prueba t de Dunnett.

5.2.3 Evaluación de la actividad antidiabética de los extractos íntegros de la corteza (ECHS), hojas (EHHS) y compuestos puros de *H. standleyana*.

Para la determinación de la actividad antidiabética de los extractos orgánicos y compuestos puros aislados de *H. standleyana* se diseñaron diferentes experimentos de tipo agudo y sub-agudo *in vivo* con base en los protocolos experimentales ampliamente descritos en la literatura (Bailey y Flatt, 1990; Williamson *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1997; Verspohl, 2002; Subash-Babu y Stanley-Mainzen, 2004; Soumyanath, 2006., *inter alia*).

5.2.3.1 Selección del modelo animal.

Los ensayos de actividad antidiabética se realizaron en ratas macho de la cepa Wistar normoglicémicas y diabéticas (diabetes inducida experimentalmente), con un peso corporal promedio en un rango de 180-220 g, las cuales fueron adquiridas comercialmente de Harlan de México S. A. de C. V. Todos los experimentos fueron conducidos conforme a la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manipulación de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999) y en armonía con las reglas internacionales sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio (dieta, temperatura y humedad) con libre acceso al alimento y agua. Para los ensayos de tipo agudo, los animales de prueba se colocaron en jaulas individuales y privados de alimento doce horas antes de la evaluación (incisos 5.2.3.4, 5.2.3.5, 5.2.3.7, 5.2.3.8, 5.2.3.9, 5.2.3.10, 5.2.3.11), durante el periodo de ayuno y el desarrollo del experimento todos los animales tuvieron acceso libre al agua. En el caso del ensayo de tipo sub-agudo los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento durante todo el período de evaluación (inciso 5.2.3.12).

5.2.3.2 Preparación de la muestras

Los extractos orgánicos y compuestos puros se suspendieron en una solución salina que contenía 0.05% de Tween 80[®]. Como control positivo se utilizó el hipoglicemiante oral comercial glibenclamida (Sigma Co., St. Louis, MO) y como control negativo el vehiculo en el que fueron suspendidas las muestras (solución salina con 0.05% de Tween 80[®], 0.5 mL/100 g). Todas las muestras se prepararon minutos antes de las evaluaciones y se administraron por la misma vía (intragástrica o *per os*).

5.2.3.3 Determinación de los niveles de glucosa sanguínea.

Las muestras sanguíneas fueron recolectadas de la vena caudal de los animales a través de una pequeña incisión en el final de la cola. Los niveles de glucosa sanguínea

se midieron por el método enzimático de la glucosa oxidasa utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra, Jonhson-Jonhson, Milpitas, CA, EE.UU.).

*5.2.3.4 Efecto agudo hipoglicemiante del extracto íntegro de la corteza (ECHS) de *H. standleyana* y compuestos 28 y 41.*

Al término de las doce horas de ayuno, 36 ratas normoglicémicas fueron divididas en seis grupos: Al grupo 1 (control negativo) se le administró el vehículo y al grupo 2, 10 mg/Kg de glibenclamida (control positivo). Los animales de los grupos 3 y 4 recibieron 10 y 100 mg/Kg del **ECHS**, respectivamente; a los de los grupos 5 y 6 se les administro 10 mg/Kg de los compuestos **28** y **41**, respectivamente. A continuación, los niveles de glucosa sanguínea se midieron a las 0, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 horas posteriores a la administración de las muestras. Una vez obtenidos los valores de las lecturas de glucosa sanguínea (mg/dL), se calcularon los porcentajes de variación de glicemia de acuerdo a la ecuación:

$$\% \text{ de variación de glicemia} = [(G_i - G_t) / G_i] \times 100$$

G_i corresponde al valor de glicemia inicial y G_t el valor de glicemia a las 0, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 horas posteriores a la administración de las muestras.

5.2.3.5 Inducción experimental de la diabetes mellitus no insulino-dependiente.

La diabetes mellitus se indujo en las ratas mediante la administración de una dosis única de estreptozotocina [(STZ, Sigma Co., St. Louis, MO) 50 mg/Kg i.p.] disuelta en una solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH = 4.5 en un volumen de 1 mL/Kg. Los niveles de glucosa se determinaron de 3 a 5 días después de la administración de la STZ y aquellos que presentaban niveles de glucosa sanguínea mayores a 250 mg/dL fueron considerados diabéticos e incluidos en los estudios de actividad antihiperглиcémica.

5.2.3.6 Efecto agudo antihiperглиcémico del extracto íntegro de la corteza (ECHS) de H. standleyana.

Al término de las doce horas de ayuno 24 ratas diabéticas se dividieron en cuatro grupos: A las del grupo 1 (control negativo) se les administró el vehículo; a los animales del grupo 2 se les administró 10 mg/Kg de glibenclamida (control positivo), Finalmente, los de los grupos 3 y 4 recibieron 10 y 100 mg/Kg, respectivamente del **ECHS**. Los niveles de glucosa sanguínea se midieron a las 0, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 horas posteriores a la administración de las muestras. Una vez obtenidos los valores de las lecturas de glucosa sanguínea, se calcularon los porcentajes de variación de glicemia.

5.2.3.7 Efecto agudo hipoglicemiante del extracto íntegro de las hojas (EHHS) de H. standleyana.

Al término de las doce horas de ayuno, 36 ratas normoglicémicas se dividieron en seis grupos: A los animales del grupo 1 (control negativo) se les administró el vehículo; los del grupo 2 se trataron con 10 mg/Kg de glibenclamida (control positivo); y los de los grupos 3-6 recibieron 10, 30, 100 y 300 mg/Kg, respectivamente del **EHHS**. Enseguida, se procedió conforme lo descrito en el inciso 5.2.3.4.

5.2.3.8 Efecto agudo antihiperглиcémico del extracto íntegro de las hojas (EHHS) de H. standleyana.

Al término de las doce horas de ayuno 36 ratas diabéticas se agruparon en seis lotes: A los animales del lote 1 (control negativo) se les administró el vehículo; los del lote 2 se trataron con 10 mg/Kg de glibenclamida (control positivo), los de los lotes 3-6 se trataron con 10, 30, 100 y 300 mg/Kg del **EHHS**, respectivamente. Enseguida, se procedió conforme lo descrito en el inciso 5.2.3.6.

*5.2.3.9 Efecto de los extractos íntegros de la corteza (**ECHS**) y hojas (**EHHS**) de *H. standleyana* sobre la tolerancia a la glucosa.*

Posterior a las doce horas de ayuno los animales de prueba (24 ratas normoglicémicas) fueron divididos en cuatro grupos. El grupo 1 (control negativo) recibió el vehículo; al grupo 2 (control positivo) se le administró 10 mg/Kg de glibenclamida; el grupo 3 recibió 100 mg/Kg del **ECHS** y el grupo 4, 100 mg/Kg del **EHHS**. Treinta minutos después, a todos los animales se les administró por vía oral una solución que contenía una dosis de 1 g/Kg de glucosa anhidra (Sigma Co., St. Louis, MO). Los niveles de glucosa sanguínea se midieron a los 0, 30, 60, 90, 120 y 240 minutos posteriores a la administración de la carga de glucosa.

*5.2.3.10 Efecto agudo hipoglicemiante de los extractos íntegros de las cortezas de *H. latiflora* (**ECHL**), *Exostema caribaeum* (**ECEC**) y de una muestra comercial de *copalchi* (**ECMC**).*

Al término de las doce horas de ayuno, 84 ratas normoglicémicas se dividieron en catorce grupos: A las ratas del grupo 1 (control negativo) se les administró el vehículo; las del grupo 2 recibieron 10 mg/Kg de glibenclamida (control positivo); las de los grupos 3-6 se trataron con 10, 30, 100 y 300 mg/Kg del **ECHL**, respectivamente; mientras que a las de los grupos 7-10 se les administró 10, 30, 100 y 300 mg/Kg del **ECEC**, respectivamente. Finalmente, las ratas de los grupos 11-14 se trataron con 10, 30, 100 y 300 mg/Kg del **ECMC**, respectivamente. Enseguida, se procedió conforme lo descrito en el inciso 5.2.3.4.

*5.2.3.11 Efecto agudo antihiper glucémico de los extractos íntegros de las cortezas de *H. latiflora* (**ECHL**), *Exostema caribaeum* (**ECEC**) y de una muestra comercial de *copalchi* (**ECMC**).*

Al término de las doce horas de ayuno 84 ratas diabéticas fueron divididas en 14 subconjuntos: Las del subconjunto 1 (control negativo) se le administró el vehículo; los animales del subconjunto 2 recibieron 10 mg/Kg de glibenclamida (control positivo), las de los subconjuntos 3-6 se les administró 10, 30, 100 y 300 mg/Kg del **ECHL**,

respectivamente; las de los subconjuntos 7-10 se trataron con 10, 30, 100 y 300 mg/Kg del **ECEC**; respectivamente. Finalmente, las de los subconjuntos 11-14 se les administró 10, 30, 100 y 300 mg/Kg del **ECMC**, respectivamente. Los siguientes pasos fueron idénticos a los descritos en el inciso 5.2.3.6.

5.2.3.12 Efecto sub-agudo antihiper glucémico de los de los compuestos puros 9, 7, 12, 28, 41 y 42 y extractos íntegros de las cortezas de H. standleyana (ECHS), H. latiflora (ECHL), Exostema caribaeum (ECEC) y una muestra comercial de copalchi (ECMC).

Sesenta y seis ratas diabéticas se repartieron en 11 grupos (grupos A-L), los extractos, compuestos puros y la glibenclamida fueron administrados *per os* durante 30 días, dos veces al día (9:00 a.m. y 6:00 p.m.) como se describe: a continuación: los animales del grupo A (grupo testigo) se trataron con glibenclamida (15 mg/Kg; 30 mg/Kg/día); los del grupo B-E se les administraron el **ECHS**, el **ECHL**, el **ECEC** y el de **ECMC**, (50 mg/Kg; 100mg/Kg/día); a los de los grupos F-K se les administró los compuestos **7, 9, 12, 28, 41 y 42**, respectivamente (15 mg/Kg; 30 mg/Kg/día); los del grupo L recibieron el vehículo (control positivo de diabetes), y por ultimo un grupo de ratas normoglicémicas (grupo M) fue incluido en el experimento y recibió sólo el vehículo (control negativo de diabetes). Los niveles de glucosa sanguínea (mg/dL) se determinaron a los 0, 3, 7, 10, 12, 15, 21 y 30 días de iniciados los tratamientos. Los valores de peso corporal (g) de todos los animales de prueba se determinaron de manera paralela a los niveles de glucosa sanguínea. Al término de los 30 días, los animales de prueba se sacrificaron por decapitación y enseguida se obtuvieron muestras de sangre total en tubos previamente heparinizados; los tubos con las muestras se centrifugaron a fin de separar el plasma del paquete globular. De manera adicional, se obtuvieron muestras de tejido hepático que fueron congeladas en nitrógeno líquido. Las muestras de plasma e hígado se mantuvieron en congelación hasta su utilización.

5.2.3.13 Efecto de los compuestos puros 9, 7, 12, 28 y 4 y de los extractos íntegros de las cortezas de H. standleyana (ECHS), H. latiflora (ECHL), Exostema caribaeum (ECEC) y de una muestra comercial de copalchi (ECMC) sobre los niveles de insulina plasmática.

Las muestras de plasma de los grupos de prueba del inciso anterior fueron descongeladas a temperatura ambiente antes de la evaluación. Acto seguido, los niveles de insulina en plasma (ng/mL) se determinaron mediante un método inmunoenzimático (“Rat Insulin Enzyme Immunoassay Method”). El “kit” se adquirió de la compañía SpiBio (Grassi y Pradelles, 1991). Las determinaciones se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas BIO-RAD Modelo 680. Los valores de los niveles de insulina se estimaron por interpolación con la curva de calibración descrita en el protocolo referido en el manual del “kit”.

5.2.3.14 Efecto de los compuestos puros 9, 7, 12, 28 y 41 y extractos íntegros de las cortezas de H. standleyana (ECHS), H. latiflora (ECHL), Exostema caribaeum (ECEC) y de una muestra comercial de copalchi (ECMC) sobre el contenido de glucógeno hepático.

El contenido de glucógeno hepático (mg/g de tejido) se determinó de acuerdo al método descrito por Murat y Serfaty (1974). Para esto, las muestras de tejido hepático de los grupos de prueba del inciso 5.2.3.12 se descongelaron a temperatura ambiente y enseguida 100 mg de cada muestra se homogenizó en 2 mL de solución amortiguadora de citratos (0.1 M, pH 4.2). Inmediatamente, una alícuota de 10 μ L de la muestra homogenizada se utilizó para determinar la concentración de glucosa libre en el tejido de utilizando un método comercial para medición de glucosa TR, Cat 1001190, Spinreact, Girona, España. Por otro lado, otra alícuota de 10 μ L de la misma muestra se mezcló con 1 mg/mL de amiloglucosidasa (exo-1,4- α -glucosidasa, EC 3.2.1.3, Cat #A9228, Sigma Chemical, Co, St Louis, MO, EU) durante 2 horas a temperatura ambiente. Al término de la reacción, se determinó la concentración de glucosa total en

el tejido y el contenido de glucógeno para cada muestra se estableció como la diferencia de la concentración de glucosa total menos la concentración de glucosa inicial.

5.2.3.15 Efecto de los extractos íntegros de las cortezas de H. standleyana (ECHS), H. latiflora (ECHL) y los compuestos puros 9, 12, 28, 41 y 42 sobre la captación de glucosa en células C2C12.

Para evaluar el efecto insulinomimético de los extractos **ECHS** y **ECHL** así como de los compuestos puros **9, 12, 28, 41 y 42** se empleó un ensayo de captación de glucosa en células diferenciadas de músculo esquelético (miotubos) C2C12 (Klip y Paquet, 1990; Kumar y Dey, 2002; Martineau *et al.*, 2006). El experimento se realizó en placas de 12 pozos; un grupo de células fue incubado con el vehículo (DMSO); otro con las muestras de prueba disueltas en el vehículo y un tercero con los controles positivos [insulina (100 nm) y metformina (5mM)] (Klip y Paquet, 1990; Kumar y Dey, 2002; Martineau *et al.*, 2006). Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 100, 10 y 1 µg/µL, los compuestos puros a las concentraciones de 1 µg/µL, 100 y 10 ng/µL. Las células se incubaron con los distintos tratamientos durante dos diferentes periodos de tiempo, 1 hora (incubación a corto plazo) y 18 a 21 horas (incubación a largo plazo). Los grupos controles se incubaron durante 18 horas (metformina) y 30 minutos (insulina).

Para los experimentos a corto plazo, el medio de diferenciación fue remplazado con medio libre de suero una hora antes de comenzar el periodo de incubación en un medio libre de suero. Para los experimentos a largo plazo, las últimas tres horas de incubación se efectuó en un medio libre de suero. Tras el periodo de incubación, todas las células se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos (solución de Krebs), libre de glucosa, a 37°C. Posteriormente, las células se trataron con 0.5 mCi/mL de 2-deoxi-D-[1-³H] glucosa (TRK-383, Amersham Biosciences, UK) disuelta en el mismo amortiguador por exactamente 10 minutos a 37°C. Enseguida las células se colocaron sobre hielo y se lavaron tres veces con una solución fría (0°C) amortiguadora de fosfatos. Por último, se realizó la lisis celular con una solución de NaOH 0.1M durante 30 minutos. El lisado celular se separó de las placas y se depositó en 1 mL de líquido de centelleo (Ready-Gel 586601, Beckman Coulter). La radioactividad

incorporada se determinó en un contador de centelleo Beckman-Coulter Modelo LS 6500.

5.2.3.16 Efecto de los compuestos puros 9, 12, 28, 41 y 42 y de los extractos íntegros de las cortezas de H. standleyana (ECHS), H. latiflora (ECHL) sobre la activación de la proteína-cinasa activada por AMP (AMP-K) utilizando la técnica de Western-blot.

Para evaluar el efecto del **ECHS**, del **ECHL** y compuestos puros **9, 12, 28, 41 y 42** sobre la activación de la AMP-K, se utilizó una técnica de Western-blot. Para ello, las muestras proteicas de células diferenciadas de músculo esquelético (miotubos) C2C12 primero se incubaron con las muestras de prueba y luego se analizaron por la técnica de Western-blot. El análisis por Western-blot se realizó de acuerdo a las metodologías ampliamente descritas (Huypens *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006; Imai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). El crecimiento celular se efectuó en placas de seis pozos. Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y los compuestos puros a las concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 100 y 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$, como control positivo se utilizó AICAR (ribósido de la 5'-amino-4-imidazol- carboxamida, 1 μM) (Huypens *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006; Imai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). En todos los casos las muestras se disolvieron en DMSO. Las células se incubaron con los distintos tratamientos durante 1 hora. Después del periodo de incubación, las células se lisaron y los lisados resultantes se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos; las muestras resultantes se centrifugaron a 14 000 g durante 10 minutos a 4°C; los sobrenadantes, que incluían el contenido proteico, se resolvieron mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% de dodecil sulfato de sodio (SDS). El gel resultante se transfirió electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas por 24 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario adecuado [anticuerpo comercial contra fosfo-AMPK (Thr 172), Cell Signaling Technology, CA]. Después del revelado con el anticuerpo secundario, la detección se realizó utilizando un “kit” de quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las cuantificaciones de las bandas fueron realizadas utilizando un software Molecular Imager (Bio-Rad Lab, CA).

5.2.4 Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto íntegro de la corteza (ECHS) y compuestos 28, 41 y 42 de *H. standleyana* en ratones utilizando los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal.

El efecto antinociceptivo se determinó utilizando los modelos de la placa caliente y el estiramiento abdominal, de acuerdo a los protocolos experimentales reportados en la literatura (Williamson *et al.*, 1996). En ambos tipos de experimentos se utilizaron ratones de la cepa ICR con un peso corporal promedio en el rango de 25 a 30 g. Los animales se mantuvieron en el bioterio con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Antes de los ensayos, los animales se dividieron en grupos de seis y se mantuvieron en ayuno por 24 horas con libre acceso a agua (*ad libitum*).

5.2.4.1 Modelo de estiramiento abdominal.

El ECHS (150, 300, 600 y 700 mg/Kg) y compuestos **28** (10, 30 y 100 mg/Kg), **41** y **42** (100 mg/Kg, en cada caso) se administraron por vía oral, a los 60 y 30 minutos previos a la realización del experimento, respectivamente. Una vez cumplido el tiempo de absorción, se inyectó a los ratones, por vía intraperitoneal, una solución de ácido acético al 0.6 %. Inmediatamente, los animales se colocaron en una caja de plástico transparente y se observaron durante 30 minutos. En este caso la nocicepción se manifiesta por estiramientos abdominales (en algunas ocasiones se pueden observar contracciones); por lo tanto el experimentador registra el número de estiramientos de las patas traseras y flexión del cuerpo hacia atrás. El efecto antinociceptivo se determinó con base en la disminución del número de estiramientos de los animales tratados con respecto al grupo control (Tween 80[®] al 0.05% en solución salina). En esta prueba se utilizó metamizol como control positivo. A la dosis de 100 mg/Kg y 50 mg/Kg, este fármaco bloquea totalmente el efecto nociceptivo desencadenado por el ácido acético.

5.2.4.2 Ensayo con el modelo de la placa caliente.

Los ratones se introdujeron en un cilindro de plástico transparente colocado sobre una placa caliente a la temperatura de $55.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. Inmediatamente se determinó el período de latencia (en segundos) al dolor, es decir el tiempo transcurrido entre el estímulo y la primera respuesta de los animales al estímulo térmico (ya fuese lamerse,

levantar cualquiera de las patas traseras o saltar fuera del cilindro). Debido a la naturaleza del experimento fue necesario inicialmente ambientar a los animales al entorno del experimento. Para ello, los animales se colocaron dentro del cilindro; a continuación el conjunto animal-cilindro se colocó sobre la placa de calentamiento (apagada) durante 20 minutos o hasta que el ratón no presentó un comportamiento de exploración del medio. Este proceso se realizó el día previo al experimento y momentos antes de iniciarlo. La administración del extracto y los compuestos de prueba se realizó por vía oral. Como control negativo se empleó SSI (solución salina isotónica) y como control positivo morfina a las dosis de 2.5 y 5.0 mg/Kg.

5.2.4.3 Determinación del efecto antinociceptivo del compuesto 28 en presencia de L-NAME (éster metílico de la L-^Gnitro-arginina), glibenclamida y naloxona

Para determinar el posible mecanismo de acción antinociceptivo del compuesto **28** se utilizó nuevamente la metodología descrita en el modelo de la placa caliente (inciso 5.2.4.2), previa administración (30 minutos) de los distintos antagonistas seleccionados: naloxona, glibenclamida y L-NAME.

5.2.5 Análisis estadístico.

Los resultados experimentales de los ensayos de actividad antidiabética y antinociceptiva están expresados como el promedio \pm el error estándar para un valor de $n = 6$. En los gráficos correspondientes se presentan los resultados de las evaluaciones de actividad antidiabética, del efecto antinociceptivo [número de estiramientos en función del tiempo (modelo de estiramiento abdominal) y área bajo la curva (ABC) o latencia vs tiempo (modelo de la placa caliente); el ABC se calculó mediante el método de los trapecios]. En todos los casos se realizó un análisis de varianza (ANADEVA) seguida de la prueba t de Dunnett para encontrar diferencias estadísticas significativas entre los grupos de prueba y los grupos control. Un valor de significancia de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente diferente.

5.3 Estudio fitoquímico.

5.3.1 Análisis cromatográficos

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 μm ASTM). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, en placas de vidrio o de aluminio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 G₂₅₄ Merck), utilizando varios sistemas de elución y diferentes agentes cromógenos: sulfato cérico amoniacal, reactivo de Erlich, reactivo de Drangerdorff, anisaldehído en H₂SO₄ (10 % en EtOH).

5.3.2 Equipos utilizados para el registro de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Jonhs y se reportan sin corregir. Los espectros en el IR se obtuvieron en pastillas de KBr o película y se midieron en un espectrómetro Perkin-Elmer 59913. Los espectros en el UV se registraron utilizando un espectrómetro Lambda II UV en MeOH. Los espectros RMN ¹H (300 MHz), ¹³C (125 MHz), COSY, NOESY, HMBC y HMQC se determinaron en un espectrómetro Varian VXR-300S utilizando CDCl₃ o CD₃OD como disolventes y TMS como referencia interna. Los espectros de masas por impacto electrónico se obtuvieron utilizando un espectrómetro JEOL SX 102 mediante inyección directa con una energía de ionización de 70 eV.

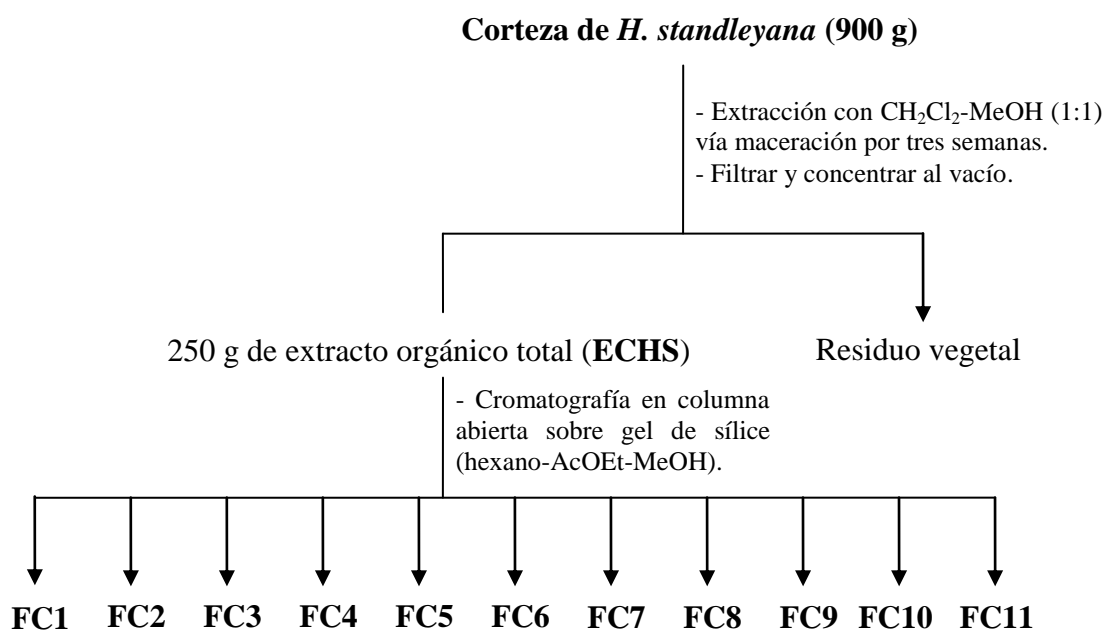
5.4 Estudio fitoquímico de la especie medicinal *H. standleyana*.

5.4.1 Preparación y fraccionamiento preliminar del extracto íntegro de la corteza de *H. standleyana* (ECHS).

El material vegetal (corteza) seco y molido (900 g) se extrajo exhaustivamente con una mezcla CH₂Cl₂ -MeOH (1:1) mediante un proceso de maceración. El extracto fluido total se filtró y concentró al vacío para generar 250 g de un residuo viscoso de color café oscuro (extracto seco). El extracto fue analizado por cromatografía en capa

fina utilizando como sistemas de elución CH₂Cl₂-MeOH (en distintas proporciones) y AcOEt-MeOH (en distintas proporciones).

Parte del extracto seco (200 g) se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante una cromatografía en columna abierta (CCA) sobre gel de sílice (950 g), utilizando como eluyentes hexano, hexano-acetato de etilo (en distintas proporciones de polaridad creciente), acetato de etilo, acetato de etilo-metanol (en diversas proporciones de polaridad creciente) y metanol. Este procedimiento generó un total de 176 fracciones de 300 ml cada una, las cuales se combinaron con base en su similitud cromatográfica en capa fina, para obtener 11 fracciones primarias (**FC1-FC11**). En el **Esquema 1**, **Cuadro 6** se resume el procedimiento anteriormente descrito.



Esquema 1. Extracción y fraccionamiento preliminar de la corteza de *H. standleyana*.

5.4.2 Obtención de los productos 39, 40, 28 y 9 a partir de la fracción FC4

Una porción de la fracción primaria **FC4** (8.0 g) se sometió a una cromatografía en columna abierta empleando como fase estacionaria 200 g de gel de sílice y como eluyentes CHCl₃-AcOEt-MeOH (en diversas proporciones de polaridad creciente); este procedimiento generó 212 fracciones que se combinaron con base en su similitud cromatográfica para generar ocho fracciones secundarias [**FC4-I – FC4-VIII**, (**Cuadro**

PARTE EXPERIMENTAL

7)]. De la fracción secundaria **FC4-II** precipitaron de manera espontánea 100 mg de 3-O- β -D-glucopiranosido del β -sitosterol (**39**).

Cuadro 6. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta del extracto orgánico de la corteza de *H. standleyana*.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
Hexano-AcOEt	30:70	1-35	1-6	FC1
Hexano-AcOEt	20:80	36-47	7-40	FC2
Hexano-AcOEt	10:90	48-61	41-84	FC3
AcOEt		62-75	85-95	FC4
AcOEt-MeOH	99:1	76-82	96-101	FC5
AcOEt-MeOH	95:5	83-91	102-108	FC6
AcOEt-MeOH	90:10	92-110	109-119	FC7
AcOEt-MeOH	80:20	111-119	120-129	FC8
AcOEt-MeOH	70:30	120-131	130-139	FC9
AcOEt-MeOH	60:40	132-141	140-166	FC10
AcOEt-MeOH	50:50	142-151	167-176	FC11
AcOEt-MeOH	40:60	152-161		
AcOEt-MeOH	30:70	162-171		
MeOH		172-176		

La fracción secundaria **FC4-V** (300 mg) se fraccionó en una columna abierta de gel de sílice (70 g), utilizando como fase móvil mezclas de polaridad creciente de CH₂Cl₂-MeOH. Como resultado global de este procedimiento se obtuvieron siete fracciones terciarias (**Cuadro 8**). De la fracción terciaria **FC4-V-3** cristalizaron de manera espontánea 40 mg de la 25-O-acetil-3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocurbitacina F (**40**) como un polvo blanco cristalino, con punto de fusión de 157-163°C.

La fracción secundaria **FC4-VII** (1.4 g) también se sometió a una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (240 g), utilizando como eluyentes una mezcla ternaria de CH₂Cl₂-AcOEt-MeOH (la polaridad se incremento gradualmente incrementando la cantidad de metanol en la mezcla). Al cabo de este fraccionamiento terciario se obtuvieron cinco fracciones terciarias [**FC4-VII-1** – **FC4-VII-5**, (**Cuadro 9**)].

Cuadro 7. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción **FC4**.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	6:6:1	1-50	1-16	FC4-I
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	6:6:1.5	51-180	17-34	FC4-II
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	6:6:3	181-191	35-49	FC4-III
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	6:6:6	192-202	50-54	FC4-IV
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	6:3:6	203-212	55-112	FC4-V
			113-177	FC4-VI
			178-206	FC4-VII
			207-212	FC4-VIII

De la fracción terciaria **FC4-VII-2** cristalizaron 800 mg de un polvo blanco, con punto de fusión de 199-201°C, que fue identificado como 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**28**). De la fracción terciaria **FC4-VII-4** precipitaron 60 mg de 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**9**) como un polvo beige, con punto de fusión de 237-240°C.

Los procedimientos que permitieron la obtención de los productos **39**, **40**, **28** y **9** se encuentran resumidos en el **Esquema 2**.

Cuadro 8. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción **FC4-V**.

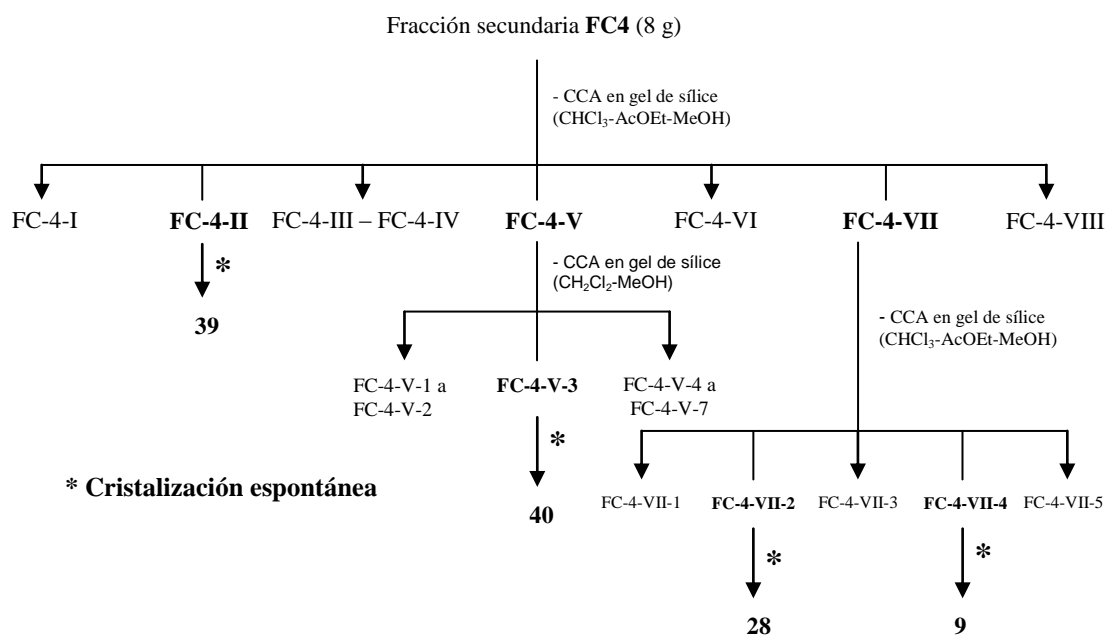
Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
CH ₂ Cl ₂		1-7	1-16	FC4-V-1
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	99:1	8-22	17-44	FC4-V-2
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98:2	23-38	45-69	FC4-V-3
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	39-63	70-74	FC4-V-4
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	92:8	64-164	75-125	FC4-V-5
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	9:1	165-179	126-167	FC4-V-6
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	8:2	180-194	168-209	FC4-V-7
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	7:3	195-209		

Cuadro 9. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción **FC4-VII**.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	4.75:4.75:0.5	1-230	1-230	FC4-VII-1
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	4.5:4.5:1.0	230-246	230-246	FC4-VII-2
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	4:4:2	247-260	247-260	FC4-VII-3
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	3.5:3.5:3.5	261-274	261-274	FC4-VII-4
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	3:3:4	275-280	275-280	FC4-VII-5
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	2:2:8			

5.4.3 Obtención del producto 41 a partir de la fracción FC8.

10 g de la fracción secundaria **FC8** se sometieron a un fraccionamiento en columna abierta sobre gel de sílice (400 g), utilizando como fase móvil CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-MeOH (con incrementos de polaridad gradual) y MeOH. Este procedimiento generó 90 fracciones las cuales se combinaron con base en su similitud cromatográfica, obteniéndose 7 fracciones secundarias [**FC8-1 – FC8-7**, (**Cuadro 10**)]. De la fracción secundaria **FC8-IV** precipitaron 1.2 g de la 5-*O*-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**41**) bajo la forma de un polvo café, con punto de fusión > 300°C.



Esquema 2. Obtención de los productos **39**, **40**, **28** y **9** a partir de la fracción **FC4**.

5.4.4 Hidrólisis ácida del compuesto 41.

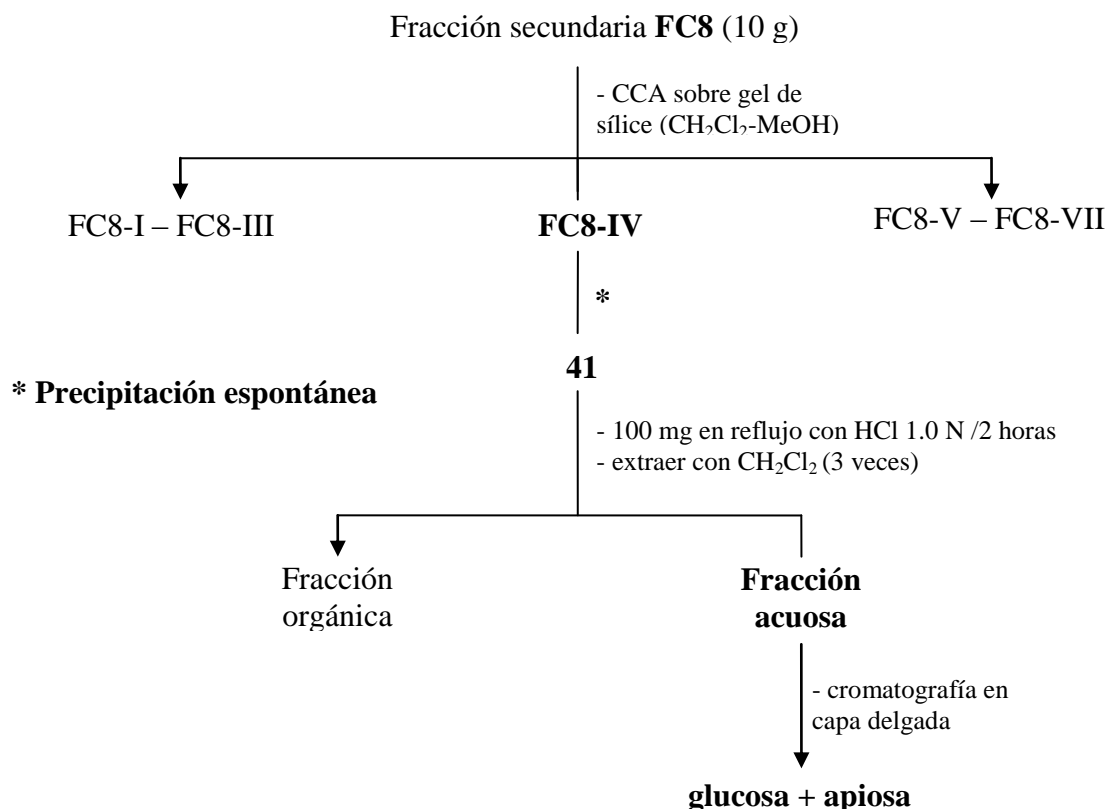
100 mg de la muestra se calentaron a reflujo con 10 ml de HCl 1 N durante 2.0 horas, al finalizar la reacción la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 20 ml); posteriormente la fase orgánica se lavó con agua desionizada (3 x 20 ml) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro; al eliminar el disolvente se obtuvo un residuo donde se encontraba la aglicona. Por otra parte, el análisis cromatográfico en capa fina de la fase acuosa (neutralizada con una solución de NaHCO₃ al 10 %, y concentrada en una bomba de alto vacío) permitió la detección de dos carbohidratos, glucosa y la apiosa. Los procedimientos que permitieron la obtención del producto **41**, se encuentran resumidos en el **Esquema 3**.

Cuadro 10. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción **FC8**.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	1-12	1-5	FC8-I
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	9:1	13-31	6-12	FC8-II
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	8:2	32-38	13-20	FC8-III
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	7:3	39-45	21-31	FC8-IV
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	6:4	46-63	32-48	FC8-V
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	1:1	64-77	49-85	FC8-VI
MeOH		78-90	86-90	FC8-VII

5.4.5 Obtención del producto 42 a partir de la fracción FC10.

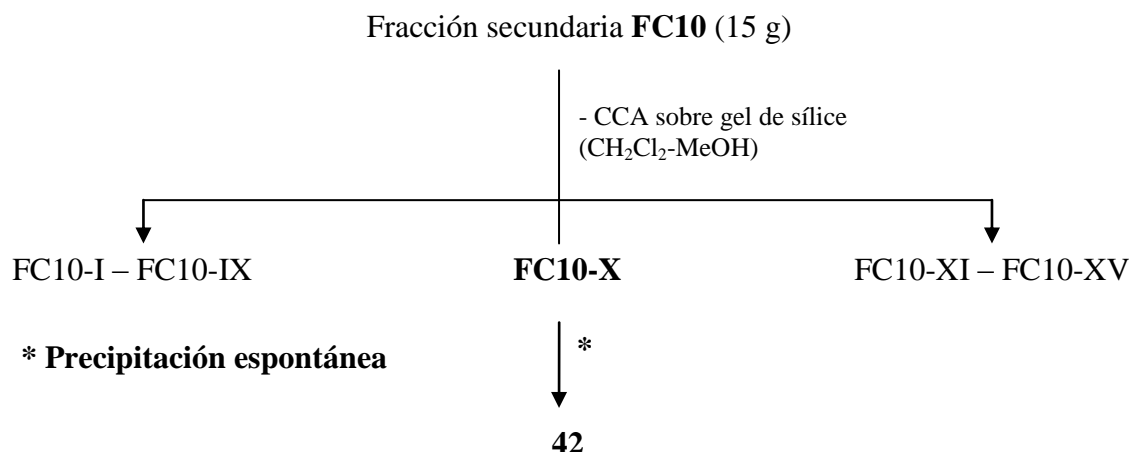
15.0 g de la fracción **FC10** se sometieron a un fraccionamiento en columna abierta sobre gel de sílice (400 g), utilizando como fase móvil CH₂Cl₂-MeOH (diversas proporciones de polaridad creciente) y MeOH. Este procedimiento generó 307 fracciones primarias las cuales se combinaron con base en su similitud cromatográfica, obteniéndose 15 fracciones secundarias [**FC10-I – FC10-XV**, (**Cuadro 11**)]. De la fracción secundaria **FC10-X** precipitaron de forma espontánea 300 mg del ácido desoxicordifolínico (**42**) bajo la forma de un polvo beige, con punto de fusión > 300°C. El procedimiento que permitió la obtención del producto **42** se encuentra resumido en el **Esquema 4**.



Esquema 3. Obtención e identificación del producto **41** a partir de la fracción **FC8**.

Cuadro 11. Fraccionamiento de la fracción **FC10** por cromatografía en columna abierta

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	1-24	1-15	FC10-I
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	9:1	25-48	16-32	FC10-II
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	85:15	49-72	33-64	FC10-III
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	8:2	73-96	65-78	FC10-IV
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	75:25	96-120	79-104	FC10-V
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	7:3	121-144	105-122	FC10-VI
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	65:35	145-168	123-146	FC10-VII
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	6:4	169-194	147-160	FC10-VIII
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	1:1	195-218	161-186	FC10-IX
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	4:6	119-242	187-235	FC10-X
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	3:7	243-266	236-259	FC10-XI
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	2:8	267-280	260-282	FC10-XII
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	1:9	281-300	283-290	FC10-XIII
MeOH		301-307	291-299	FC10-XIV
			300-307	FC10-XV



Esquema 4. Obtención del producto **42** a partir de la fracción **FC10**.

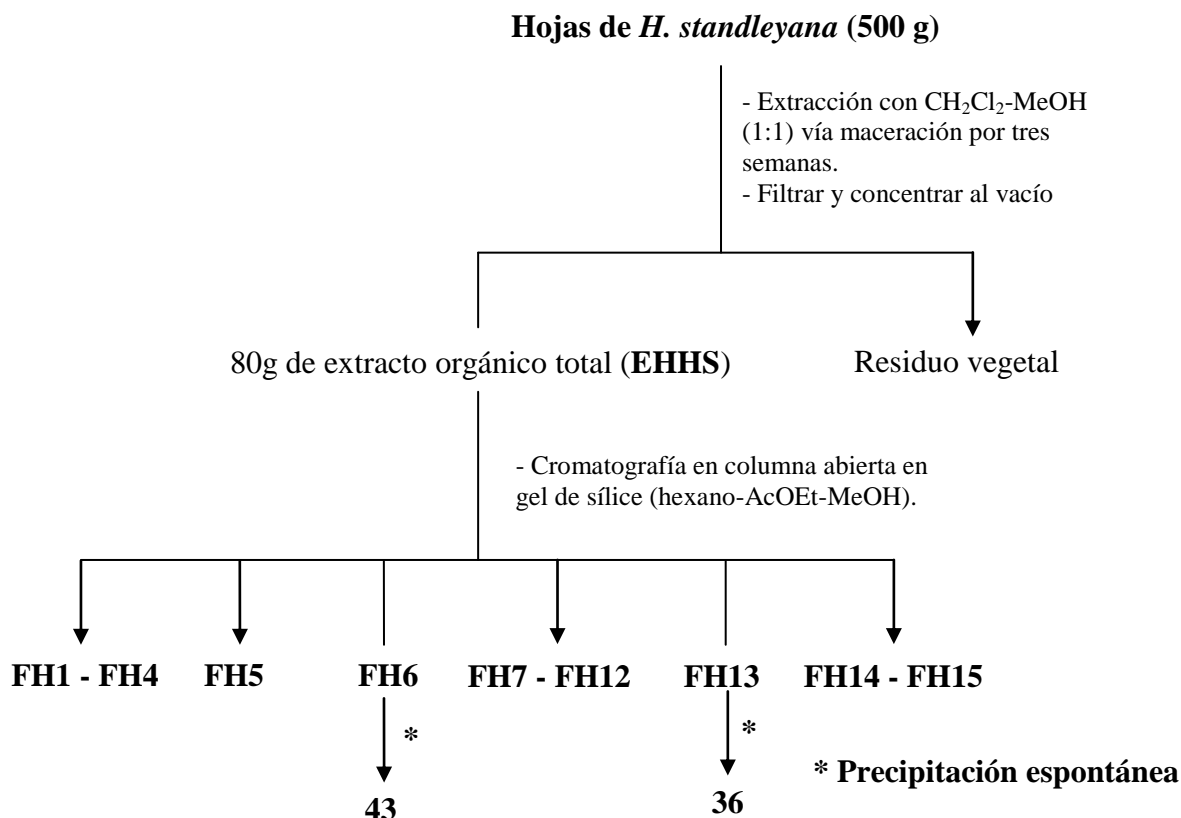
5.4.6 Preparación del extracto orgánico de las hojas de *H. standleyana* (EHHS), fraccionamiento preliminar y obtención de los productos **43 y **36**.**

El material vegetal (hojas) seco y molido (500 g) se extrajo repetidamente con una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:1) mediante un proceso de maceración. El extracto total se filtró y concentró al vacío para generar 80 g de un residuo viscoso verde oscuro (extracto seco). El extracto fue analizado por cromatografía en capa fina utilizando como sistemas de elución CH₂Cl₂-MeOH (en distintas proporciones) y AcOEt-MeOH (en distintas proporciones).

Parte del extracto seco (50 g) se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante cromatografía en columna abierta en gel de sílice (1 Kg), utilizando como eluyentes hexano-acetato de etilo (en distintas proporciones de polaridad creciente), acetato de etilo, acetato de etilo-metanol (en diversas proporciones de polaridad creciente) y metanol. Este procedimiento generó 15 fracciones primarias (**FH1** – **FH15**).

De la fracción primaria **FH6** precipitaron de manera espontánea 900 mg de la 6''-O-acetil-5-O-β-D-galactopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**43**) como un polvo amarillo claro, con punto de fusión 155-158°C.

De la fracción primaria **FH13** precipitaron de manera espontánea 1.8 g de un polvo blanco, con punto de fusión 150-152°C, que fue identificado como el manitol (**36**). En el **Esquema 5** y **Cuadro 12** se resumen los procedimientos que permitieron la obtención de los productos **43** y **36**.



Esquema 5. Obtención de los productos **43** y **36**.

5.4.7 Obtención del producto 44 a partir de la fracción FH5.

La fracción primaria **FH5** (2.0 g) se fraccionó en columna abierta empleando como fase estacionaria 200 g de gel de sílice y como fase móvil CH₂Cl₂-MeOH (en diversas proporciones de polaridad creciente); este procedimiento generó seis fracciones secundarias (**Cuadro 13**).

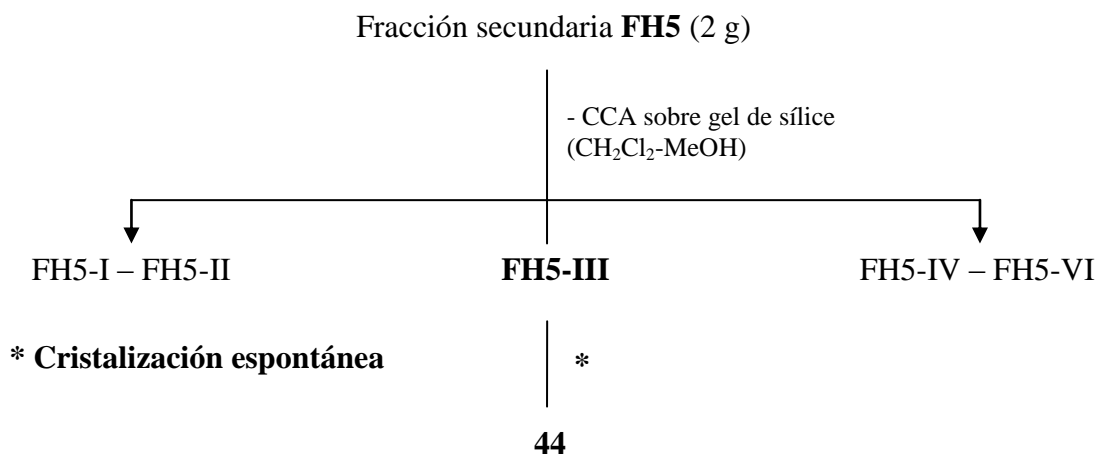
De la fracción secundaria **FH5-III** precipitaron de manera espontánea 600 mg de la 6''-O-acetil-5-O-β-D-galactopiranosil-7, 4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**44**) bajo la forma de un polvo amarillo con un punto de fusión 153-156°C. El procedimiento que permitió la obtención del producto **44** se encuentra resumido en el **Esquema 6**.

Cuadro 12. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta del extracto orgánico de las hojas de *H. standleyana*.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
Hexano-AcOEt	30:70	1-39	1-10	FH1
Hexano-AcOEt	20:80	40-138	11-56	FH2
Hexano-AcOEt	10:90	139-150	57-117	FH3
AcOEt		151-159	118-147	FH4
AcOEt-MeOH	95:5	160-167	148-164	FH5
AcOEt-MeOH	90:10	168-185	165-169	FH6
AcOEt-MeOH	70:30	186-203	170-175	FH7
AcOEt-MeOH	50:50	204-228	176-185	FH8
MeOH		229-315	186-192	FH9
			193-203	FH10
			204-213	FH11
			214-222	FH12
			223-236	FH13
			237-253	FH14
			254-315	FH15

Cuadro 13. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción **FH5**.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	99:1	1-24	1-12	FH5-I
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98:2	25-40	13-49	FH5-II
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	41-64	50-56	FH5-III
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	90:10	65-89	57-102	FH5-IV
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	80:20	90-114	102-148	FH5-V
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	70:30	115-139	149-180	FH5-VI
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	60:40	140-164		
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	50:50	165-175		
MeOH		176-180		



Esquema 6. Obtención del producto **44** a partir de la fracción **FH8**.

5.5 Estudio fitoquímico de la especie medicinal *H. latiflora*.

5.5.1 Preparación del extracto orgánico de la corteza de *H. latiflora* (ECHL) y fraccionamiento preliminar.

El material vegetal (corteza) seco y molido (1 Kg) se extrajo exhaustivamente con una mezcla CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) mediante un proceso de maceración. El extracto se filtró y concentró al vacío para generar 160 g de un residuo café (extracto seco). El extracto fue analizado por cromatografía en capa fina utilizando como sistemas de elución CHCl_3 -MeOH (en distintas proporciones), CH_2Cl_2 -MeOH (en distintas proporciones) y AcOEt-MeOH (en distintas proporciones).

Parte del extracto seco (115 g) se disolvió en MeOH favoreciendo así la cristalización espontánea de 12 g de la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**7**); el producto se obtuvo como un sólido cristalino crema, con punto de fusión de 237-240°C. Posteriormente, las aguas madres se sometieron a un fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (350 g), utilizando como eluyentes hexano, hexano- CHCl_3 (en distintas proporciones de polaridad creciente), CHCl_3 , CHCl_3 -metanol (en diversas proporciones de polaridad creciente) y metanol. Este procedimiento generó 12 fracciones (**FL1-FL12**). De la fracción **FL5** precipitaron de manera espontánea 1.5 g de la 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**9**) como un polvo amarillo con punto de fusión de 238-240°C. De la fracción **FL9** precipitaron de manera espontánea 1.8 g de la 5-O- β -

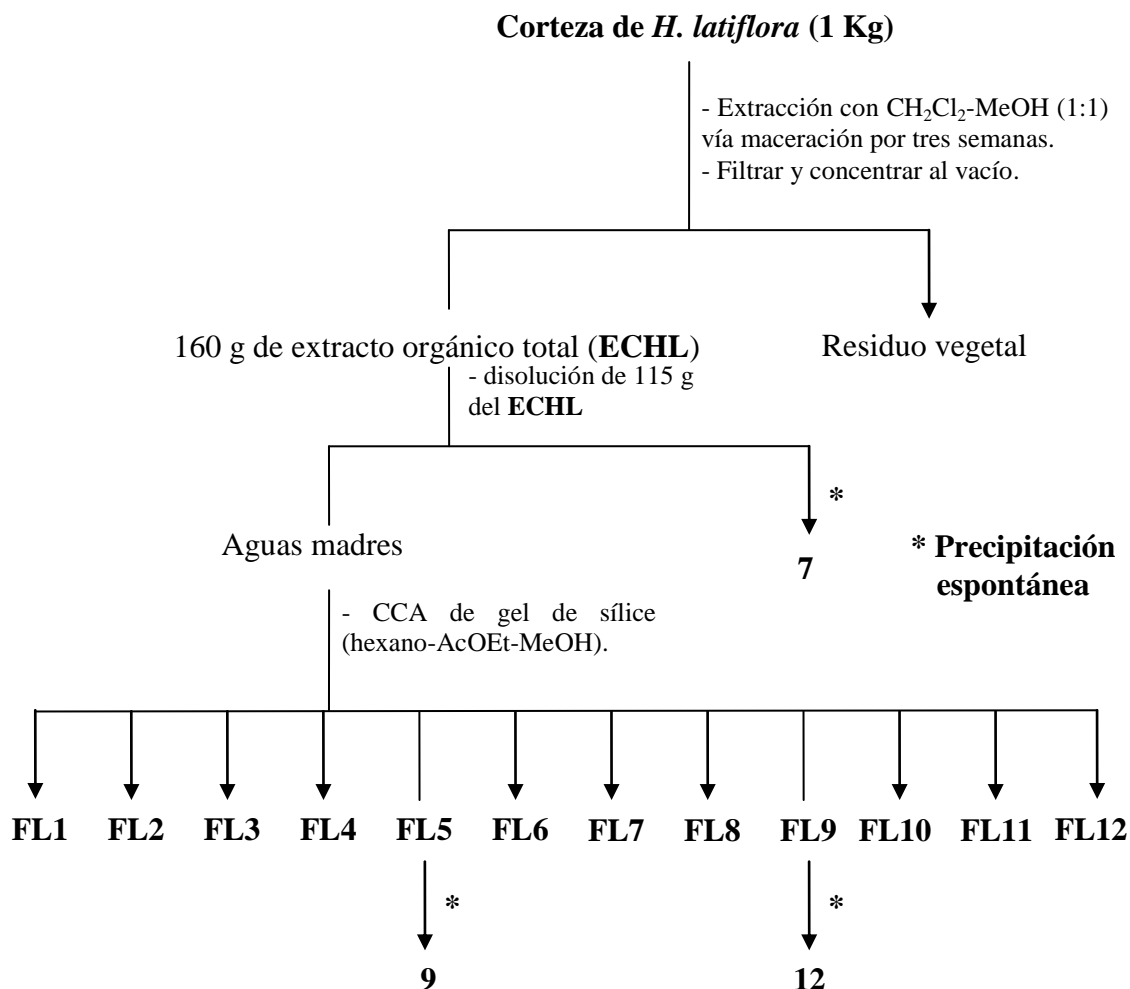
D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**12**) como un polvo amarillo con punto de fusión de 251-253°C. En el **Esquema 7, Cuadro 14** se resumen los procedimientos recién descritos.

Cuadro 14. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de las aguas madres obtenidas del extracto orgánico de la corteza de *H. latiflora*.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
Hexano-CHCl ₃	20:80	1-20	1-35	FL1
Hexano-CHCl ₃	10:90	21-40	36-54	FL2
CHCl ₃		41-60	55-64	FL3
CHCl ₃ -MeOH	99:1	61-80	65-85	FL4
CHCl ₃ -MeOH	95:5	81-100	86-101	FL5
CHCl ₃ -MeOH	90:10	101-120	102-110	FL6
CHCl ₃ -MeOH	80:20	121-140	111-145	FL7
CHCl ₃ -MeOH	70:30	141-160	146-178	FL8
CHCl ₃ -MeOH	60:40	161-180	179-201	FL9
CHCl ₃ -MeOH	50:50	181-200	201-225	FL10
CHCl ₃ -MeOH	40:60	201-220	226-254	FL11
CHCl ₃ -MeOH	30:70	221-240	255-260	FL12
MeOH		241-260		

5.5.2 Obtención de los productos **26**, **40** y **28** a partir de la fracción **FL2**.

La fracción **FL2** (800 mg) se sometió a una cromatografía en columna abierta empleando como fase estacionaria 20 g de gel de sílice y como eluyentes una mezcla isocrática de CHCl₃-AcOEt-MeOH (47.5:47.5:5); este procedimiento generó nueve fracciones secundarias [**FL2-I** – **FL2-IX**, (**Cuadro 15**)]. De la fracción **FL2-III** cristalizaron de manera espontánea 80 mg de la 23,24-dihidrocucurbitacina F (**26**) como un sólido blanco con punto de fusión de 155-157°C; de la fracción **FL2-V** cristalizaron 70 mg de la 25-O-acetil-3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**40**) y de la fracción s **FL2-VII** cristalizaron 900 mg de la 3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**28**). En el **Esquema 8** y **Cuadro 15** se resume el proceso anteriormente descrito.



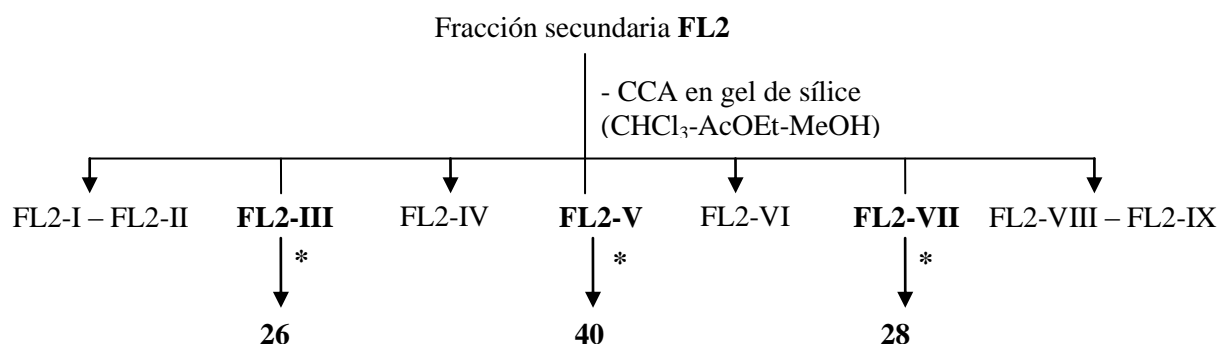
Esquema 7. Obtención de los productos **7**, **9** y **12** a partir del extracto orgánico de la corteza de *H. latiflora*.

5.5.3 Obtención del producto **15** a partir de la fracción **FL10**.

Cinco gramos de la fracción secundaria **FL10** se sometieron a un fraccionamiento en columna abierta sobre gel de sílice (200 g), utilizando como fase móvil CHCl_3 , $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (con incrementos de polaridad gradual) y MeOH. Este procedimiento generó 120 fracciones las cuales se combinaron con base en su similitud cromatográfica, obteniéndose 8 fracciones secundarias [**FL10-I** – **FL10-VIII**, (**Cuadro 16**)]. De la fracción secundaria **FL10-VI** precipitaron 160 mg de la 5-*O*-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**15**) bajo la forma de un polvo café, con punto de fusión $> 300^\circ\text{C}$.

Cuadro 15. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción **FL2**.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
CHCl ₃ -AcOEt-MeOH	47.5:47.5:5	1-180	1-12	FL2-I
			13-24	FL2-II
			25-39	FL2-III
			40-64	FL2-IV
			65-92	FL2-V
			93-107	FL2-VI
			108-146	FL2-VII
			147-162	FL2-VIII
			163-180	FL2-IX



* **Cristalización espontánea**

Esquema 8. Obtención de los productos **26**, **40** y **28** a partir de la fracción **FL2**.

5.5.4 Hidrólisis ácida del compuesto **15**.

10 mg de la muestra se procesaron con 2 ml de HCl conforme al procedimiento descrito en el inciso **5.4.4**. El análisis cromatográfico en capa fina de la fase acuosa neutralizada permitió la detección de dos carbohidratos, glucosa y la xilosa. Los procedimientos que permitieron la obtención del producto **15**, se encuentran resumidos en el **Esquema 9**.

5.5.5 Obtención del producto 42 a partir de la fracción FL12.

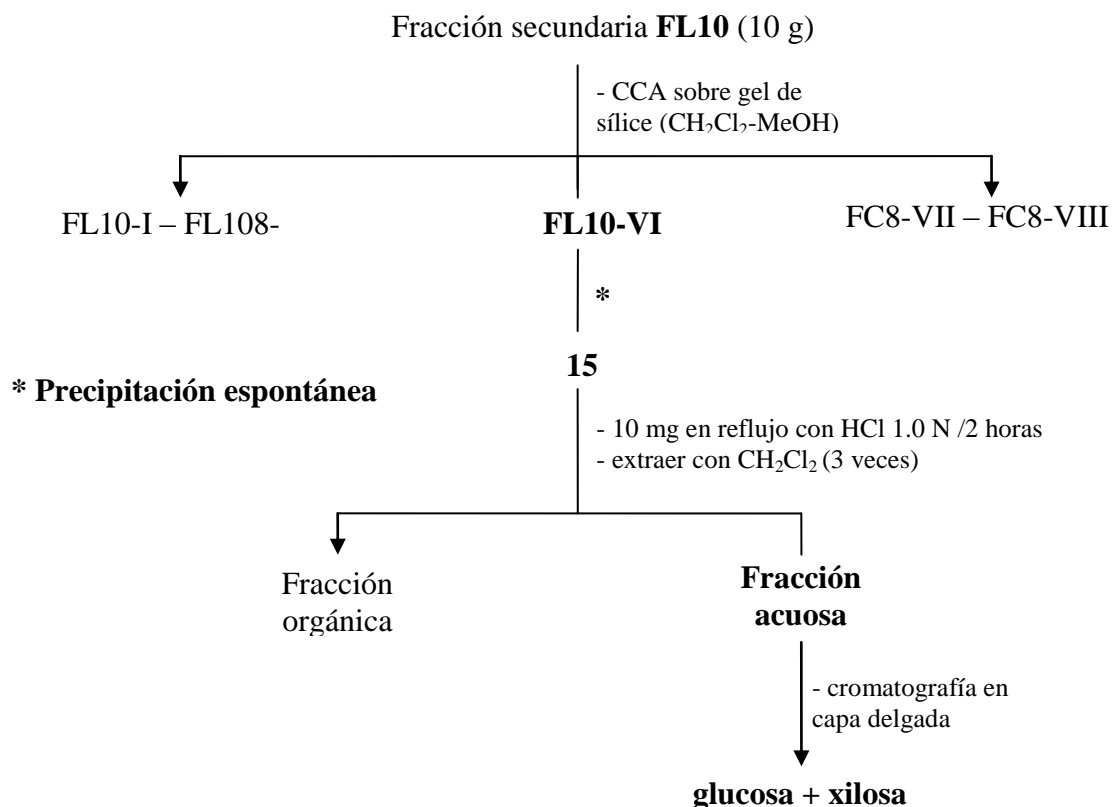
700 mg de la fracción secundaria **FL12** se sometieron a un fraccionamiento en columna abierta sobre gel de sílice (30 g), utilizando como fase móvil CHCl₃-MeOH (diversas proporciones de polaridad creciente) y MeOH. Este procedimiento generó 190 fracciones las cuales se combinaron con base en su similitud cromatográfica, obteniéndose cinco fracciones secundarias [**FL12-I – FL12-V**, (**Cuadro 17**)]. De la fracción secundaria **FL12-III** precipitaron de forma espontánea 280 mg del ácido desoxicordifolínico (**42**) bajo la forma de un polvo beige. El procedimiento que permitió la obtención del producto **42** se encuentra resumido en el **Esquema 10**.

Cuadro 16. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción **FL10**.

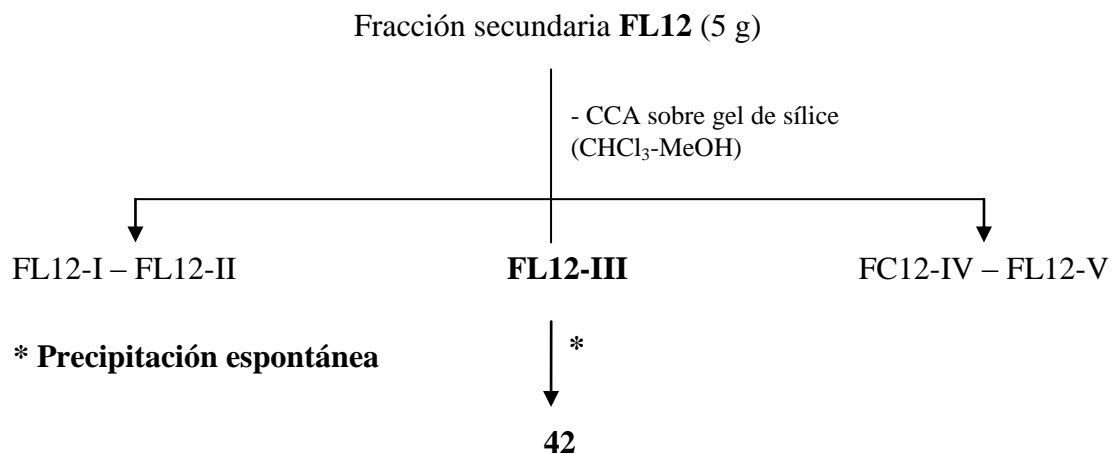
Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
CHCl ₃		1-12	1-5	FC8-I
CHCl ₃ -MeOH	95:5	13-31	6-12	FC8-II
CHCl ₃ -MeOH	9:1	32-38	13-20	FC8-III
CHCl ₃ -MeOH	8:2	39-45	21-31	FC8-IV
CHCl ₃ -MeOH	7:3	46-63	32-48	FC8-V
CHCl ₃ -MeOH	6:4	64-77	49-85	FC8-VI
CHCl ₃ -MeOH	1:1	78-90	86-90	FC8-VII
MeOH		91-120	91-120	FC8-VII

Cuadro 17. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la fracción **FL12**.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	(Clave)
CHCl ₃ -MeOH	9:1	1-24	1-22	FL12-I
CHCl ₃ -MeOH	8:2	25-48	23-93	FL12-II
CHCl ₃ -MeOH	75:25	49-72	92-140	FL12-III
CHCl ₃ -MeOH	7:3	73-96	145-158	FL12-IV
CHCl ₃ -MeOH	65:35	96-120	159-190	FL12-V
CHCl ₃ -MeOH	6:4	121-144		
CHCl ₃ -MeOH	1:1	145-168		
MeOH		169-190		



Esquema 9. Obtención e identificación del producto **41** a partir de la fracción **FC8**.



Esquema 10. Obtención del producto **42** a partir de la fracción **FL12**.

5.6 Preparación de los extractos íntegros de las cortezas de *E. caribaeum* (ECEC) y de la muestra comercial de copalchi (ECMC).

La corteza seco y molido (250 g) de *E. caribaeum* se extrajo exhaustivamente con una mezcla CH₂Cl₂ -MeOH (1:1) mediante un proceso de maceración. El extracto fluido total se filtró y concentró al vacío para generar 80 g de un residuo color café (ECEC). El material vegetal seco y molido (300 g) de la muestra comercial de copalchi se extrajo también con una mezcla CH₂Cl₂ -MeOH (1:1) mediante un proceso de maceración. El extracto se filtró y concentró al vacío para generar 90 g de un residuo color café oscuro (ECMC).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las especies *H. standleyana*, *H. latiflora* y *E. caribaeum* forman parte de las cien plantas medicinales más comercializadas en México (FHEUM, 2001). De tal forma que la persistencia de las cortezas de *H. standleyana*, *H. latiflora* y *E. caribaeum* tanto en centros de acopio de hierbas curativas como en mercados, tianguis y otros expendios de drogas crudas y productos herbolarios acabados, así como su uso continuo para el tratamiento de la diabetes, fiebres y dolores asociados al paludismo justifican el establecimiento de sus parámetros de eficacia, inocuidad y calidad.

En la presente disertación se enfatizó en el estudio sobre el contenido metabólico, farmacología, toxicología preclínica y al establecimiento de los compuestos marcadores de las hojas y corteza de *H. standleyana*. De manera adicional, se realizó la investigación para establecer los principios antidiabéticos de *H. latiflora*.

Para facilitar el seguimiento de la discusión, la información se presentará en cuatro apartados: En el primero se discutirá las pruebas de inocuidad realizadas para la especie *H. standleyana*. A continuación se describe las pruebas del potencial antidiabético -a nivel de extracto- de las drogas crudas de *H. standleyana*, *H. latiflora* y *E. caribaeum* y hojas de *H. standleyana*. En este mismo apartado se presenta el potencial antinociceptivo de *H. standleyana*. En el tercero se describe el aislamiento y caracterización de los principales constituyentes de las dos especies de *Hintonia*. Por último se referirá a la evaluación del potencial antidiabético y antinociceptivo de los productos y sus posibles mecanismos de acción.

6.1 Pruebas de inocuidad de *H. standleyana*.

Las pruebas de inocuidad preclínica realizadas durante el estudio de *H. standleyana* consistieron en la evaluación del potencial tóxico y mutagénico del extracto íntegro preparado a partir de la droga cruda (**ECHS**), de acuerdo a los métodos de Lorke (Lorke, 1983) y Ames y Maron (1983), respectivamente. La toxicidad potencial del extracto íntegro de las hojas de *H. standleyana* (**EHHS**) también se determinó de acuerdo al procedimiento de Lorke. Estas evaluaciones se realizaron a pesar de que la especie se ha utilizado por más de un siglo sin que se hayan documentado efectos tóxicos o reacciones adversas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ensayo de Lorke para determinar la toxicidad aguda se realiza en ratones y permite calcular la DL_{50} utilizando un número pequeño de animales durante un período de tiempo relativamente corto. Los resultados de esta prueba (**Cuadro 18**) permitieron establecer que las droga cruda (corteza) y las hojas de *H. standleyana* no provocan efectos tóxicos agudos en ratones. Durante la realización de los experimentos, los animales no presentaron un comportamiento anómalo ni daños visibles. Al término del ensayo, se realizó la necropsia de los animales y se encontró que los órganos vitales no se afectaron con los distintos tratamientos. En ambos casos (corteza y hojas), el valor de DL_{50} fue > 5000 mg/Kg, por lo tanto la corteza y las hojas de *H. standleyana* se consideran no tóxicas conforme a los criterios de Lorke.

Cuadro 18. Toxicidad aguda de los extractos íntegros de *Hintonia standleyana*.

ECHS				EHHS			
Fase 1		Fase 2		Fase 1		Fase 2	
Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad
10	0/3	1600	0/3	10	0/3	1600	0/3
100	0/3	2900	0/3	100	0/3	2900	0/3
1000	0/3	5000	0/3	1000	0/3	5000	0/3

El ensayo de Ames se basa en la reversión de una mutación en el operón de histidina en distintas cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 98, 100 y 102) especialmente diseñadas para detectar productos que provoquen daño genético. Estas cepas no pueden sintetizar el aminoácido histidina. Debido a que en los últimos años se ha demostrado que algunos carcinogénicos requieren de una activación metabólica se utilizó, también, la prueba de Ames modificada. La modificación consiste en ensayar el potencial mutagénico en presencia de la fracción postmitocondrial S9. Esta fracción contiene fragmentos del retículo endoplásmico y, por lo tanto, la mayor parte de las monooxigenasas requeridas para bioactivar mutágenos y carcinógenos potenciales (Maron y Ames, 1983; Reyes-López *et al.*, 2004).

Los resultados de la **Figura 9** indican que los tratamientos con **ECHS** no provocaron la reversión de la mutación puntual de las distintas cepas de *S. typhimurium* empleadas en el presente estudio. En consecuencia, la droga cruda de *H. standleyana* no es mutagénica.

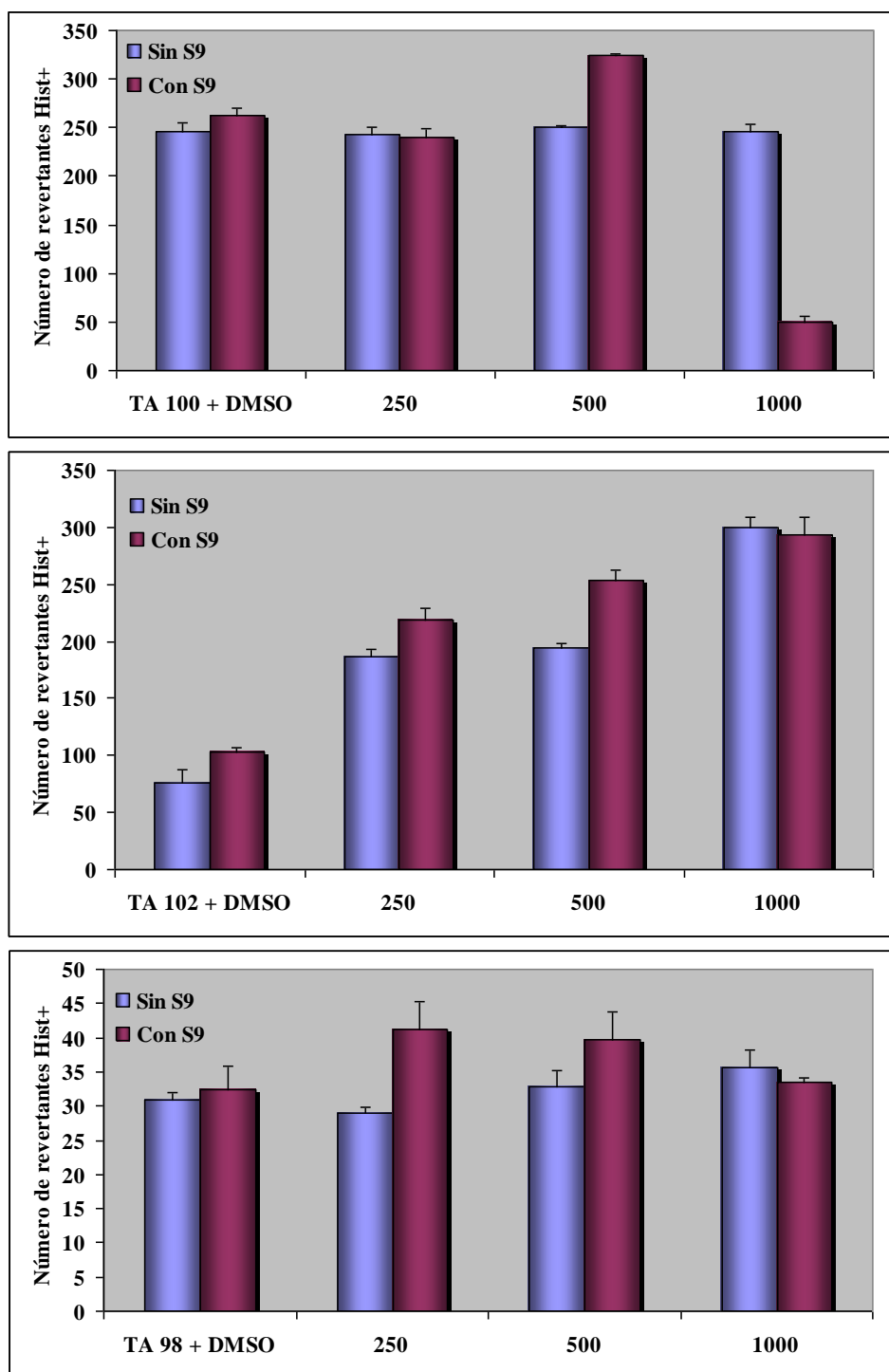


Figura 9. Efecto del ECHS sobre las cepas modificadas de *Salmonella typhimurium*: TA100, TA102 y TA98; con y sin fracción S9. El número de revertantes inducidas (His⁺) por los distintos mutágenos de referencia fueron: TA98: 382 ± 37.5 (ácido picrolónico), 5416.9 ± 726.9 (2-aminoantraceno); TA102: 3204.2 ± 359.5 (2-aminoantraceno), 3873.6 ± 187 (mitomicina C) y TA100: 826.1 ± 47.6 (ciclofosfamida), 4921.9 ± 1877.5 (etilen-nitro-guanidina).

6.2 Pruebas de eficacia de los extractos de *H. standleyana*, *H. latiflora* y *E. caribaeum*.

Para establecer la eficacia de cualquier producto de uso terapéutico deben realizarse experimentos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro* y los estudios clínicos pertinentes (OMS, 2002). Los ensayos se seleccionan de acuerdo a los usos mejor documentados de las hierbas en las prácticas médicas tradicionales. Al igual que en el caso de la toxicidad, la OMS considera que el uso prolongado de una hierba puede constituir el mejor testimonio de su eficacia. En la presente disertación, sin embargo, se decidió establecer las propiedades antidiabéticas y antinociceptivas de *H. standleyana* a través de diferentes experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Para la evaluación de las propiedades antidiabéticas de los extractos íntegros de *H. standleyana*, *H. latiflora* y *E. caribaeum* se seleccionaron y desarrollaron diferentes ensayos *in vivo* de tipo agudo y sub-agudo en ratas de la cepa Wistar normoglicémicas y diabéticas inducidas experimentalmente.

El efecto antinociceptivo se determinó para establecer si el uso *H. standleyana* para aliviar los dolores del cuerpo y malestares asociados al paludismo se encuentra relacionado a sus posibles efectos analgésicos. Para establecer el potencial antinociceptivo de la planta se utilizaron dos modelos experimentales *in vivo*: El de la placa caliente y el de estiramiento abdominal. Como animales de prueba se utilizaron ratones de la cepa ICR.

6.2.1 Potencial antidiabético de *H. standleyana*.

6.2.1.1 Efecto agudo hipoglicemiante del extracto íntegro de la corteza (ECHS).

Después de un tratamiento con agentes hipoglicemiantes, las ratas normoglicémicas, tienen la capacidad de restablecer sus niveles de glicemia a valores normales mediante diferentes mecanismos fisiológicos incluyendo la inhibición de la glucólisis y glucogénesis y/o activación de la gluconeogénesis y de la glucogenólisis (Kecskemeti *et al.*, 2002; Doyle y Egan, 2003; Ross *et al.*, 2004).

Los resultados del efecto agudo hipoglicemiante del **ECHS** se presentan en la **Figura 10**. Los valores de glicemia con respecto al tiempo se encuentran expresados como el porcentaje de variación de glicemia. El cálculo de este parámetro permite

ponderar de manera individual los resultados de las determinaciones de los niveles de glicemia a los distintos tiempos de prueba (1.5, 3, 5, 7 y 9 horas) respecto a un valor de glicemia inicial (0 horas) (Sharma *et al.*, 1997). Como se puede observar en la **Figura 8**, el extracto orgánico (100 mg/Kg) de la corteza posee un efecto hipoglicemiante significativo; a las 1.5 horas posteriores a su administración disminuye la glicemia en un -18%. Este efecto persiste durante todo el período de evaluación. La glibenclamida (control positivo) provocó el máximo efecto hipoglicemiante a las 7 horas posteriores a su administración (-33%); a las nueve horas después del tratamiento con el fármaco se observó un incremento en la glicemia (-25%) indicando que los niveles de glucosa sanguínea comienzan a restablecerse.

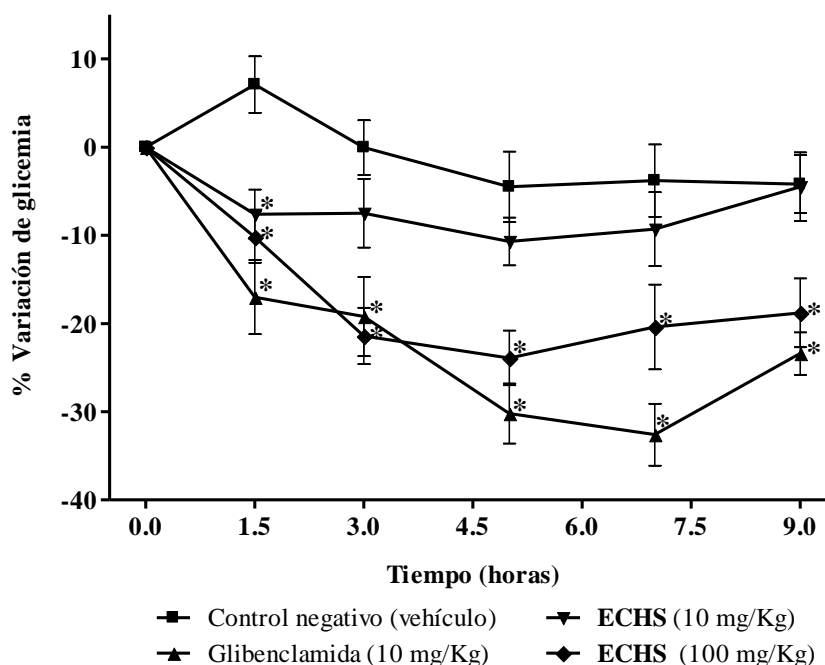


Figura 10. Efecto agudo del ECHS sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales. Cada valor es el promedio \pm el error estándar, $n = 6$ ratas. * $p < 0.05$ ANADEV A y t-Dunnnett con respecto al control negativo al mismo tiempo.

6.2.1.2 Efecto agudo antihiper glucémico del extracto íntegro de la corteza (ECHS)

La inducción experimental de la diabetes se realizó mediante la administración intraperitoneal de una dosis única de STZ (50 mg/Kg). Posteriormente la condición diabética de los animales de experimentación se comprobó mediante la medición de los niveles de glucosa (> 250 mg/dL) y la apreciación de los síntomas característicos de un estado diabético (i.e. poliuria, polifagia, polidipsia y la pérdida del peso corporal). La

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

STZ produce hiperglicemia mediante la destrucción específica de las células β del páncreas. El grado de destrucción dependerá de la dosis utilizada y de la vía de administración. En este caso se pudo comprobar la actividad pancreática residual en el lote de animales de prueba, ya que el grupo tratado con la glibenclamida respondió a este tratamiento durante el ensayo.

Los resultados del efecto agudo antihiperглиcémico del **ECHS** se presentan en la **Figura 11**. Como se puede observar, el **ECHS** (100 mg/Kg) reduce significativamente la hiperglicemia inicial a partir de las 7 horas (-27%) posteriores a su administración ($p < 0.05$). El efecto antihiperглиcémico persiste durante el experimento y a la última lectura de los niveles de glucosa sanguínea (a las 9 horas) la disminución de la glicemia fue de 32%. El grupo tratado con glibenclamida presenta un máximo efecto antihiperглиcémico a las 5 horas (-28%) y enseguida se incrementan los valores de glicemia.

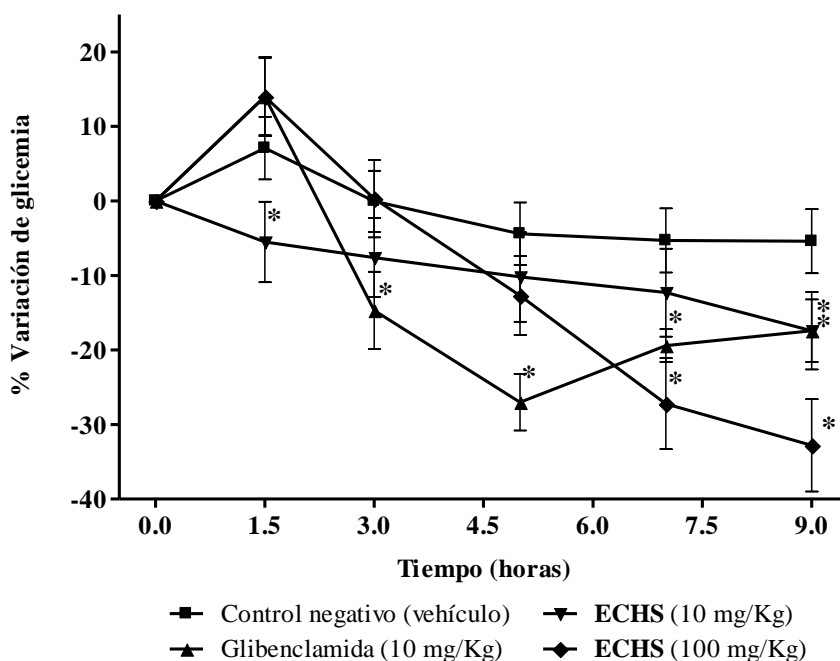


Figura 11. Efecto agudo del **ECHS** sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas diabéticas. Cada valor es el promedio \pm el error estándar, $n = 6$ ratas. * $p < 0.05$ ANADEV A y t-Dunnett con respecto al control negativo al mismo tiempo.

Los efectos antihiperглиcémicos agudos provocados por los tratamientos con **ECHS** pueden deberse a la activación de la glucólisis y de la glucogénesis, inhibición de la gluconeogénesis y de la glucogenólisis, estimulación de la secreción de insulina, sensibilización a la acción de la insulina, efectos insulinomiméticos, etc., (Keckskemeti

et al., 2002; Doyle y Egan, 2003; Ross *et al.*, 2004).

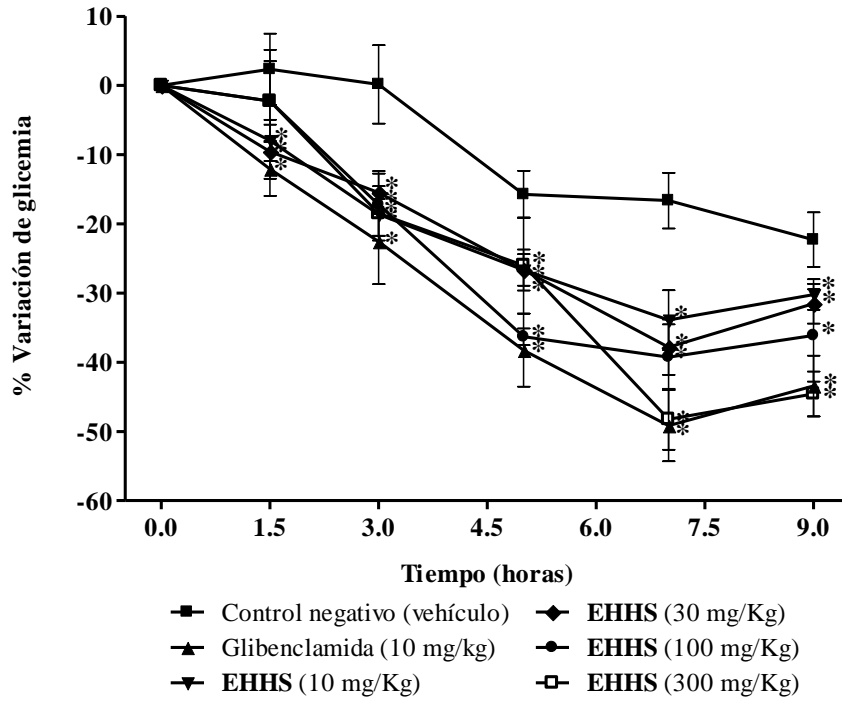
6.2.1.3 Efecto agudo hipoglicemiante y antihiperглиcémico del extracto íntegro de las hojas (**EHHS**).

A continuación se evaluó el efecto agudo hipoglicemiante y antihiperглиcémico de un extracto preparado a partir de las hojas de la planta (**EHHS**). Aunque las hojas no se utilizan para el tratamiento de la diabetes, se consideró pertinente evaluar su extracto con la finalidad de comprobar sus propiedades antidiabéticas y así evitar el uso de la droga cruda (corteza), usualmente de origen silvestre. Esta circunstancia aunada a la sobreexplotación del recurso y al daño irreversible (muerte) que la recolecta de la corteza genera sobre la planta han provocado la escasez de la planta, al punto tal de poner en peligro de extinción este valioso recurso natural. De encontrarse una actividad antidiabética comparable en las hojas, se incidiría de manera satisfactoria en la conservación de la especie ya que la recolección del follaje no repercute en la supervivencia de la planta.

Los resultados del efecto agudo hipoglicemiante y antihiperглиcémico del **EHHS** se presentan en la **Figura 12**. Como se observa en la **Figura 12**, el **EHHS** reduce la glicemia en ratas normoglicémicas (**Figura 12-A**) a partir de las 1.5 h posteriores al tratamiento ($p < 0.05$). El efecto fue dependiente de la dosis y se presentó inclusive con la menor dosis de prueba (10 mg/Kg). La acción hipoglicemiante máxima se presentó a las 7 horas posteriores a la administración de los tratamientos (extracto y controles) a la dosis de 300 mg/Kg (-45%). Este resultado fue similar al mostrado por la glibenclamida y mejor que el del extracto de la corteza. En todos los casos después de las 7 horas del tratamiento, los valores de glucosa sanguínea comienzan a restablecerse.

El efecto antihiperглиcémico del **EHHS** (**Figura 12-B**) es significativo ($p < 0.05$) a partir de las 1.5 h posteriores al tratamiento a todas la dosis evaluadas. El efecto fue dependiente de la dosis, alcanzando su valor máximo a las 9 horas después de la administración del extracto a la dosis de 300 mg/Kg (-40%).

A.



B.

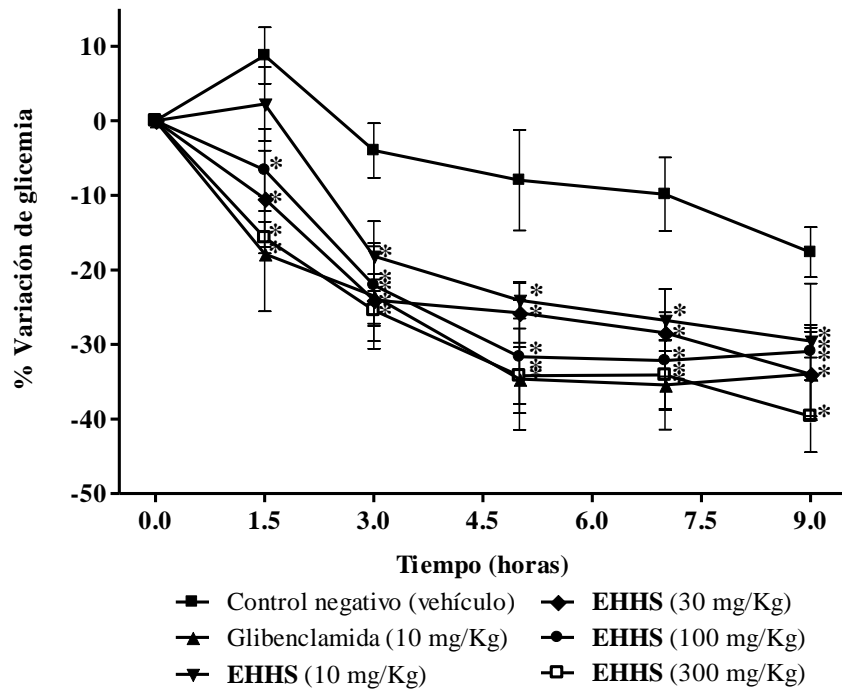


Figura 12. Efecto agudo del EHHS sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales (A) y diabéticas (B). Cada valor es el promedio \pm el error estándar, $n = 6$ ratas. $*p < 0.05$ ANADEVa y t-Dunnnett con respecto al control negativo al mismo tiempo.

6.2.1.4 Efecto de los extractos íntegros de la corteza (**ECHS**) y hojas (**EHHS**) sobre la tolerancia a la glucosa.

Una vez comprobadas las propiedades hipoglicemiantes y antihiperglicémicas de los extractos íntegros de *H. standleyana* (corteza y hojas) se decidió evaluar su efecto agudo en un estado de hiperglicemia (glucosa post-prandial) inducida en ratas normales. Para ello se determinaron los niveles de glucosa sanguínea en un ensayo de tolerancia a la glucosa (OGTT, por sus siglas en inglés) previa administración de las muestras de prueba.

En condiciones normales, las células blanco de la glucosa (músculo y tejido adiposo, principalmente) en los animales de prueba deben tener la capacidad de absorber la glucosa sanguínea circulante en un período no mayor a las dos horas posteriores a la administración oral de la carga de glucosa y restablecer la glicemia a sus valores normales (80-110 mg/dL). La curva normal de tolerancia a la glucosa presenta un máximo nivel de glicemia a los 30 y 60 minutos posteriores a la administración del bolo de glucosa; a los 120 minutos se debe observar el restablecimiento de los niveles normales del monosacárido (Kecskemeti *et al.*, 2002; Doyle y Egan, 2003; Ross *et al.*, 2004).

A los 30 minutos posteriores a la administración de la carga de glucosa (tiempo donde se presentó el máximo de glicemia), los extractos **ECHS** y **EHHS** (**Figura 13**), al igual que la glibenclamida, no disminuyeron los niveles de glucosa post-prandial. Por lo tanto, estos tratamientos no inhiben el proceso de absorción del azúcar durante su transporte desde el tracto gastrointestinal a la circulación sistémica. A los 60 minutos, la glibenclamida ejerce su efecto hipoglicemiante mismo que persiste durante el experimento. Los tratamientos con el extracto de las hojas (**EHHS**) a la dosis de 100 mg/Kg provocaron un descenso de los niveles de glucosa sanguínea significativo ($p < 0.05$) tan sólo a los 120 minutos, respecto al control negativo. En todos los casos, los niveles de glucosa se restablecieron a sus niveles iniciales.

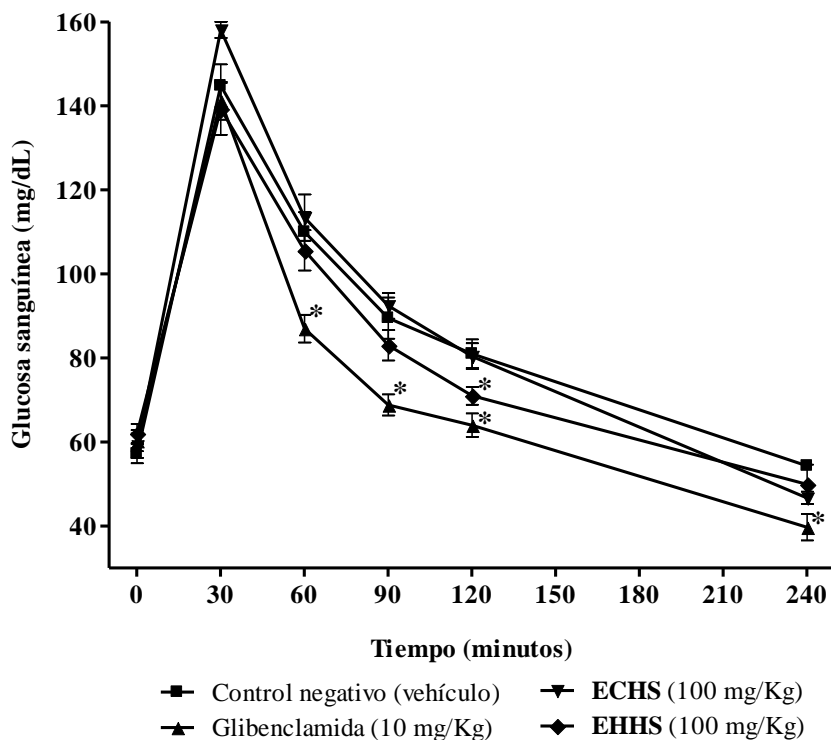
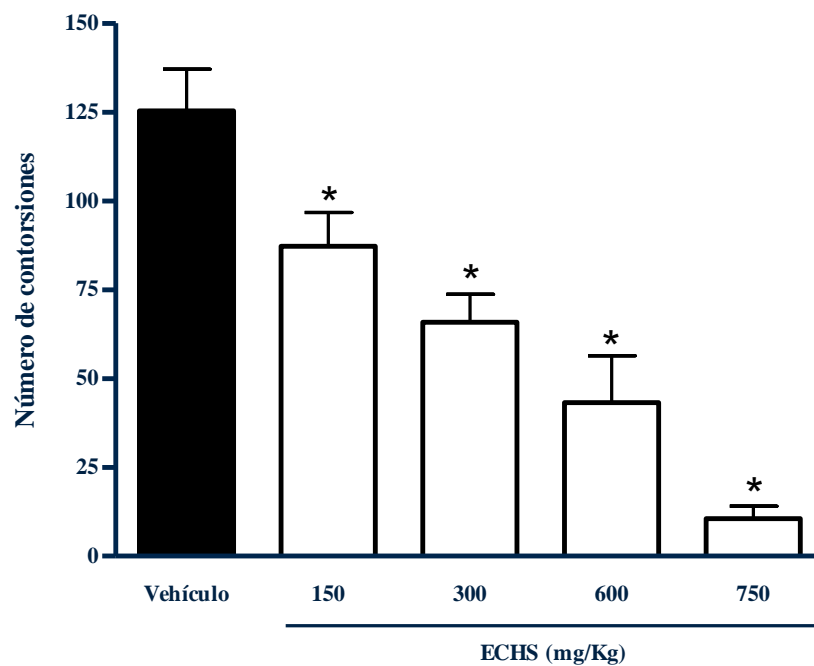


Figura 13. Efecto del **ECBS** y del **EHHS** sobre la tolerancia a la glucosa, los datos están expresados como el promedio (mg/dl) de glucosa sanguínea \pm error estándar. ANADEVIA y t-Dunnett, * $p < 0.05$ (n = 6 ratas).

6.2.2 Potencial antinociceptivo de la corteza *H. standleyana* (**ECBS**) en ratones utilizando los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal.

Los resultados de actividad antinociceptiva utilizando los modelos de estiramiento abdominal y de la placa caliente se presentan en la **Figura 14**. Como se puede observar, la administración oral del **ECBS** redujo significativamente el número de estiramientos abdominales, este efecto fue dependiente de la dosis (**Figura 14-A**). Además, el **ECBS** también fue capaz de incrementar significativamente la latencia del estímulo térmico en el ensayo de la placa caliente (**Figura 14-B**). Estos datos sugieren que el efecto analgésico provocado por el extracto de la planta es de utilidad también para el tratamiento del dolor inflamatorio y nociceptivo (Deraedt *et al.*, 1980).

A.



B.

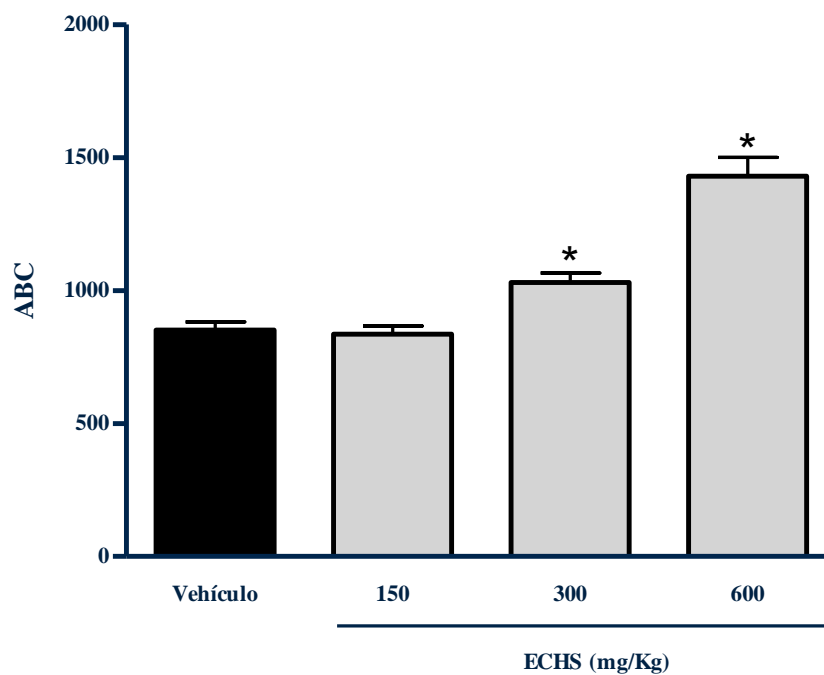


Figura 14. Efecto antinociceptivo del extracto CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) de *Hintonia standleyana* (ECHS) en ratones. En la gráfica **A** se presenta el número de contorsiones y en la gráfica **B** la latencia en el ensayo de la placa caliente. Cada valor es el promedio \pm el error estándar, $n = 6$ ratones. * $p < 0.05$ ANADEVIA y t-Dunnett con respecto al vehículo al mismo tiempo.

6.2.3 Potencial antidiabético de las cortezas de *H. latiflora* (ECHL), de *E. caribaeum* (ECEC) y de una muestra comercial de copalchi (ECMC).

En los lugares donde se acopian y expenden plantas medicinales, muchas de las drogas crudas son objeto de adulteraciones o de incorporación de sustitutos menos eficaces. Para los acopiadores y vendedores de plantas medicinales el sólo hecho de que una droga cruda tenga un mismo nombre vernáculo es motivo suficiente para comercializarla indistintamente, con los riesgos e implicaciones que esta práctica conlleva. De tal forma que sólo la experiencia de un taxónomo experto permitiría distinguir la droga cruda de las tres especies. De allí que se presume que las muestras comerciales de copalchi estén constituidas por mezclas de plantas similares, de la misma familia o que sean sustituidas por otras especies de distintas familias.

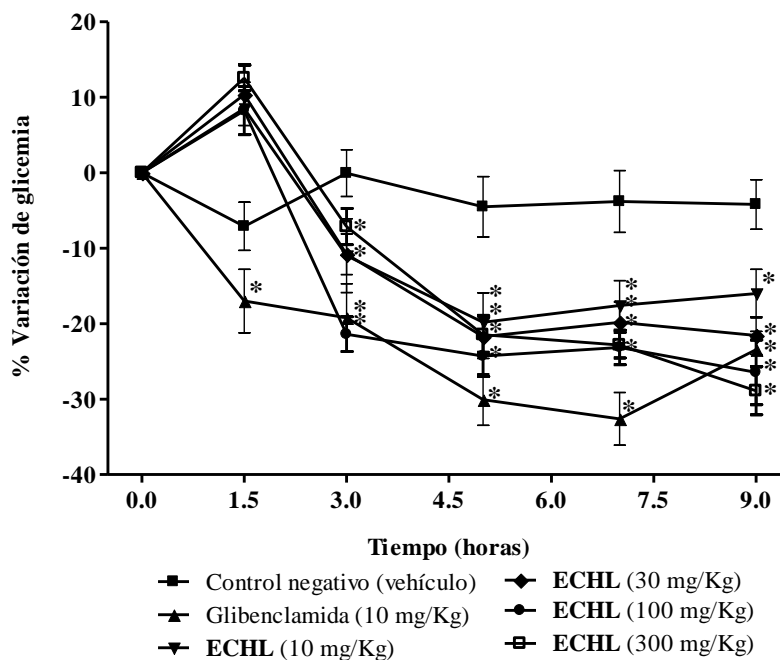
Para comprobar estas posibilidades en el presente estudio, además de *H. standleyana*, se evaluaron las cortezas de *H. latiflora*, *E. caribaeum* y de una mezcla comercial adquirida en el mercado de Sonora. Además de lo antes expuesto, la idea de evaluar la muestra comercial adquirió mayor importancia a raíz del trabajo de Pinto y colaboradores (1997) quienes señalaron que el extracto nativo de copalchi se prepara a partir de una mezcla de las cortezas de *H. latiflora* y *E. caribaeum*.

Los resultados del efecto agudo hipoglicémico y antihiper glucémico del ECHL, del ECEC y del ECMC se presentan en las **Figuras 15-17**.

Como se puede observar en la **Figura 15**, el ECHL reduce significativamente los niveles de glucosa sanguínea tanto en animales normoglicémicos (**Figura 15-A**) como en ratas diabéticas (**Figura 15-B**) respecto al grupo que recibió el vehículo ($p < 0.05$). En ambos casos el efecto observado fue dependiente de la dosis. El efecto hipoglicémico (**Figura 15-A**) se observó a las 3 horas posteriores a los tratamientos (30, 100 y 300 mg/Kg) y persistió durante todo el experimento alcanzando el máximo decremento a las 9 horas. En este tiempo, las cuatro dosis evaluadas reducen la glicemia significativamente. A la dosis de 10 mg/Kg la disminución fue del 15%; a la dosis de 30 mg/Kg de 20%; a la dosis de 100 mg/Kg de 25%; y a la dosis de 300 mg/Kg de 28%. El control positivo (glibenclamida) presentó su máximo efecto hipoglicémico a las 7 horas (-33%) disminuyendo a las nueve horas (-25%). De manera adicional, el efecto antihiper glucémico (**Figura 15-B**) del ECHL se observó a las 7 horas posteriores a la administración de las dosis de 100 y 300 mg/Kg; la disminución del azúcar fue de 18 y 20%, respectivamente. El máximo efecto antihiper glucémico se presentó a las nueve

horas del experimento (300 mg/Kg = -35%, 100 mg/Kg = -18%).

A.



B.

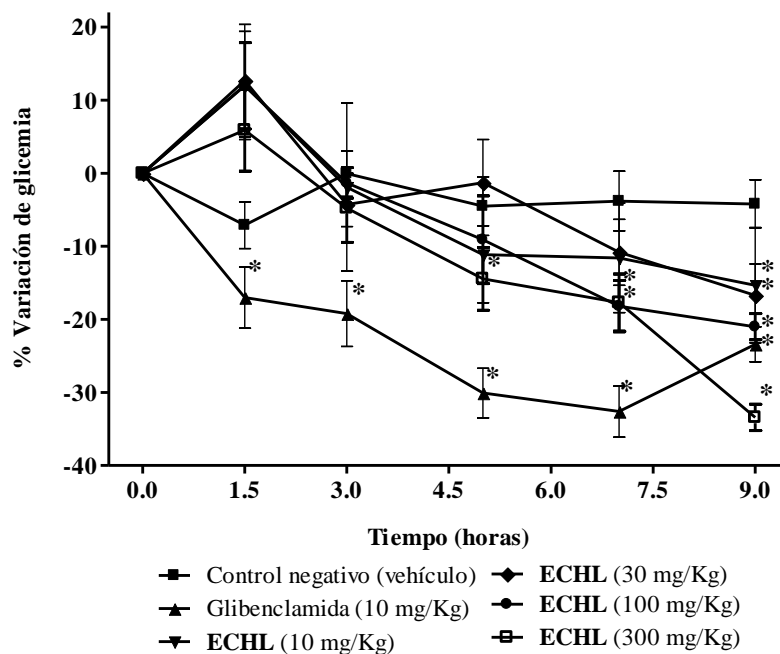
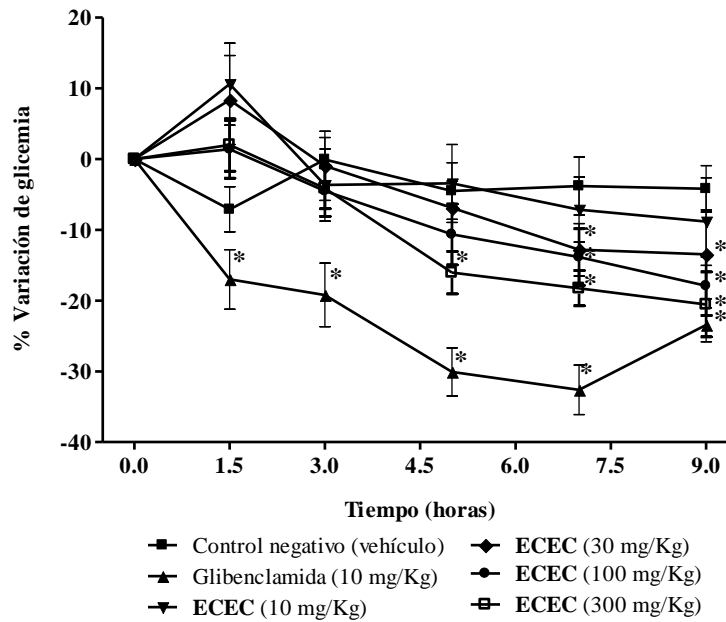


Figura 15. Efecto del ECHL sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales (A) y diabéticas (B). Cada valor es el promedio \pm el error estándar, n = 6 ratas. * p < 0.05 ANADEV A y t-Dunnett con respecto al control negativo al mismo tiempo.

A.



B.

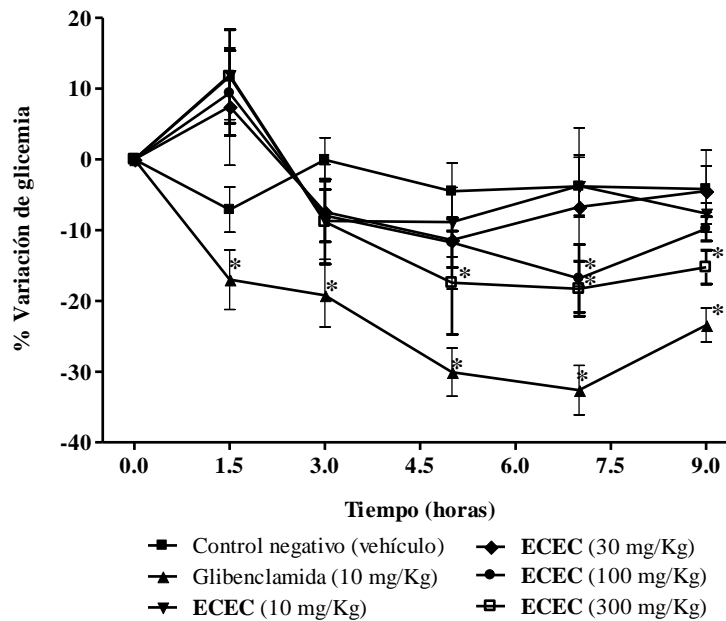


Figura 16. Efecto del ECEC sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales (A) y diabéticas (B). Cada valor es el promedio \pm el error estándar, $n = 6$ ratas. * $p < 0.05$ ANADEVIA y t-Dunnnett con respecto al control negativo al mismo tiempo.

Por otro lado, la **Figura 16** muestra los resultados del efecto hipoglicemiante y antihiperlipidémico del ECEC. Como se puede observar en la **Figura 16-A**, el ECEC posee efecto hipoglicemiante significativo a las dosis de 300, 100 y 30 mg/Kg (5 y 7

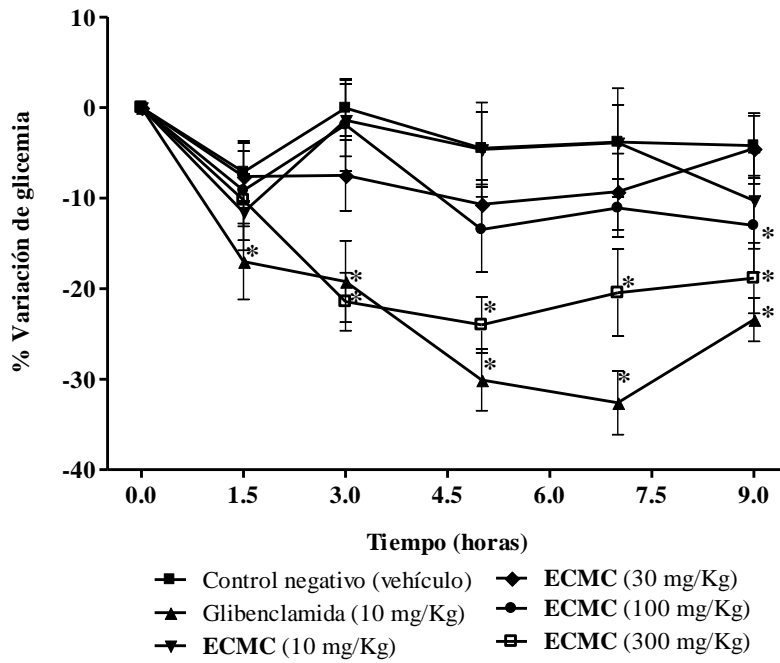
horas posteriores a la administración de las muestras). Nuevamente el efecto observado fue dependiente de la dosis y persiste durante todo el experimento, alcanzando una máxima reducción de la glicemia a las dosis de 100 y 300 mg/Kg, a las nueve horas (-18 y -20%, respectivamente).

En el caso del experimento con animales diabéticos (**Figura 16-B**), el **ECEC** mostró efecto antihiperглиcémico significativo respecto al vehículo ($p < 0.05$) a las dosis de 100 mg/Kg (-15% a las 7 horas) y 300 mg/Kg (-18% a las 5 y 7 horas y -15% a las 9 horas); contrariamente a lo observado con los extractos **ECHL** y **ECHS**, la glicemia no muestra una tendencia a continuar disminuyendo sino a incrementarse a partir de las nueve horas.

Por último, los resultados del efecto hipoglicemiante y antihiperглиcémico del **ECMC** se presentan en la **Figura 17**. En el experimento con animales normoglicémicos (**Figura 17-A**) se observó un efecto hipoglicemiante significativo ($p < 0.05$) a partir de la tercera hora del experimento (-18%) a la dosis de 300 mg/Kg; el efecto persistió durante todo el experimento, observándose una máxima reducción de la glicemia a las 5 horas (-20%) y enseguida una disminución del efecto hipoglicemiante (-18 y -15%, a las 7 y 9 horas, respectivamente). De igual manera, en el experimento con animales diabéticos (**Figura 17-B**) el **ECMC** a la dosis de 300 mg/Kg presentó una acción antihiperглиcémica significativa (-23%) a las 5 horas. En este tiempo se presentó el máximo efecto antihiperглиcémico y a continuación este efecto disminuyó.

Como se desprende de los resultados obtenidos en los experimentos de tipo agudo en ratas normales y diabéticas, los extractos íntegros preparados con las cortezas de las especies del género *Hintonia* (*H. standleyana* y *H. latiflora*) y las hojas de *H. standleyana* resultaron más eficaces en reducir la glicemia que los extractos de las cortezas de *E. caribaeum* y de la muestra comercial de copalchi.

A.



B.

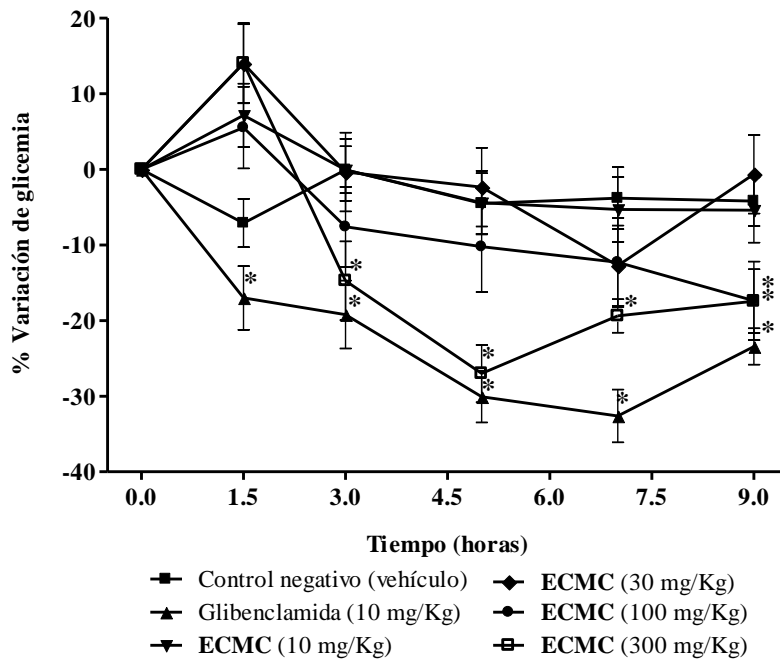


Figura 17. Efecto del ECMC sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales (A) y diabéticas (B). Cada valor es el promedio \pm el error estándar, n = 6 ratas. * p < 0.05 ANADEVa y t-Dunnett con respecto al control negativo al mismo tiempo.

6.2.4 Efecto sub-agudo antihiper glucémico de los extractos íntegros de las cortezas de *H. standleyana* (ECHS), *H. latiflora* (ECHL), *Exostema caribaeum* (ECEC) y de una muestra comercial de copalchi (ECMC).

Para evaluar el efecto antidiabético a largo plazo de los diferentes extractos íntegros de las cortezas de *H. standleyana* (ECHS), *H. latiflora* (ECHL), *Exostema caribaeum* (ECEC) y de una muestra comercial de copalchi (ECMC) se diseñó un estudio sub-agudo antihiper glucémico durante 30 días en ratas diabéticas. El estudio a largo plazo tiene como objetivo evaluar la capacidad de las sustancias de prueba para restablecer a valores normales los niveles de glucosa sanguínea de animales diabéticos y observar su efecto sobre la pérdida de peso corporal asociada con el desarrollo de la diabetes (Williamson *et al.*, 1996; Verspohl, 2002; Subash-Babu y Stanley-Mainzen, 2004; Soumyanath, 2006., *inter alia*).

Las principales diferencias entre el estudio antihiper glucémico a largo plazo y el estudio agudo antihiper glucémico (incisos 6.2.2, 6.2.3 y 6.2.5) son las siguientes:

1. De manera idónea una sustancia debería reducir hasta en un -150% la glicemia para restablecer los niveles normales de glucosa sanguínea. Este efecto es difícil de observar en un ensayo agudo aún con un fármaco tan potente como la glibenclamida. En el estudio antihiper glucémico a largo plazo es posible observar un restablecimiento de los niveles de glucosa sanguínea desde un estado diabético (glicemia > 250 mg/dL) hasta condiciones normales (glicemia ~100 mg/dL) al término del periodo de evaluación.
2. En el estudio agudo antihiper glucémico, los animales diabéticos se encuentran en un período de ayuno: antes y durante el período de evaluación. En el experimento antihiper glucémico a largo plazo, los animales de prueba se encuentran con libre acceso al alimento y por lo tanto, es posible observar la degeneración gradual de la enfermedad durante el período de evaluación (i.e. pérdida de peso corporal, poliuria, polidipsia y polifagia) (Verspohl, 2002, Subash-Babu y Stanley-Mainzen, 2004; Soumyanath, 2006., *inter alia*).
3. En el estudio agudo antihiper glucémico, los animales diabéticos son tratados con una dosis única de la sustancia de prueba (dosis administrada por vía oral al inicio del experimento). En el experimento antihiper glucémico a largo plazo, los animales son

tratados diariamente con las sustancias problema durante todo el período de evaluación; de esta manera es posible distribuir la dosis en dos o más ingestas a lo largo del día en diferentes horarios a fin de mantener el efecto terapéutico (Verspohl, 2002; Subash-Babu y Stanley-Mainzen, 2004; Soumyanath, 2006., *inter alia*).

4. Por último, en el estudio agudo antihiper glucémico se utiliza un hipoglicemiante oral (glibenclamida) como control positivo y el vehículo en el que fueron suspendidas las muestras de prueba, como control negativo. En el experimento antihiper glucémico a largo plazo se utilizan tres controles: un control negativo de diabetes el cual corresponde a un grupo de ratas normoglicémicas que son tratadas diariamente con el vehículo para establecer que el confinamiento no tiene efecto sobre la glicemia de los animales de prueba; un control positivo de diabetes el cual corresponde a un grupo de ratas diabéticas que es tratado con el vehículo, y el tercero corresponde a un grupo de animales diabéticos tratados diariamente con un agente hipoglicemiante oral que posee actividad comprobada para regular los niveles de glicemia en una condición diabética (Verspohl, 2002; Subash-Babu y Stanley-Mainzen, 2004; Soumyanath, 2006).

Como se puede observar en la **Figura 18**, la administración diaria de 100 mg/Kg de todos los extractos evaluados (**ECHS**, **ECHL**, **ECEC** y **ECMC**) produce un efecto antihiper glucémico significativo a partir de los diez días de iniciado el tratamiento ($p < 0.05$). Sin embargo, tan sólo el **ECHL** provoca una reducción de los niveles de glucosa sanguínea muy cercano a los niveles normales de glicemia (~150 mg/dL) a partir de los 15 días, efecto similar al mostrado por la glibenclamida (~170 mg/dL). A los 21 días el **ECHL** redujo a valores normales los niveles de glucosa sanguínea (~100 mg/dL); el restablecimiento de la glicemia persistió hasta los 30 días de evaluación (~95 mg/dL). De igual manera, al término del período de evaluación el grupo de animales diabéticos tratado con la glibenclamida presentó valores de glicemia normales (~95 mg/dL). Por otro lado, el **ECHS** presentó niveles de glucosa sanguínea muy cercano a los niveles normales de glicemia (~160 mg/dL).

Los extractos **ECEC** y **ECMC** aunque presentaron un efecto antihiper glucémico significativo respecto al control diabético, al término del período de evaluación ($p < 0.05$) no restablecieron los niveles de glucosa sanguínea de los animales de prueba a valores normales (~200 mg/dL). Estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos previamente en los experimento de tipo agudo (incisos 6.2.5), donde se

observó que tanto el **ECEC** y **ECMC** fueron los menos eficaces para disminuir los niveles de glucosa sanguínea en animales normales y diabéticos. De manera adicional, tanto el **ECHL** como el **ECHS** disminuyeron de manera significativa la pérdida de peso corporal de los animales diabéticos (**Cuadro 19**). Este efecto no fue observado con el grupo control tratado con glibenclamida.

Cuadro 19. Efecto sub-agudo del **ECHS**, del **ECHL**, del **ECEC** y del **ECMC** sobre los valores de peso corporal en ratas diabéticas.

Tratamientos	Dosis <i>per os</i> (mg/Kg)	Peso corporal (g)			
		Día 1	Día 7	Día 15	Día 30
Control normal	---	213.4±3.9*	249.9±3.0*	274.6±4.2*	288.2±5.5*
Control diabético	---	169.8±5.2	216.2±5.2	194.8±6.0	204.2±9.2
Glibenclamida	30	178.3±7.8	210.2±4.1	212.8±4.9	216.3±8.9
ECHL	100	182.9±7.7	227.2±8.0	238.3±12.4*	248.3±16.4*
ECEC	100	177.9±10.6	213.4±11.9	223.3±13.2	217.7±17.6
ECMC	100	173.3±9.2	214.9±5.9	220.8±15.3	223.1±20.4
ECHS	100	174.2±8.4	213.4±9.9	228.1±8.1*	249.5±7.4*

Cada valor es el promedio ± el error estándar, n = 6 ratas. *p< 0.05 ANADEVIA y t-Dunnett con respecto al control diabético al mismo tiempo.

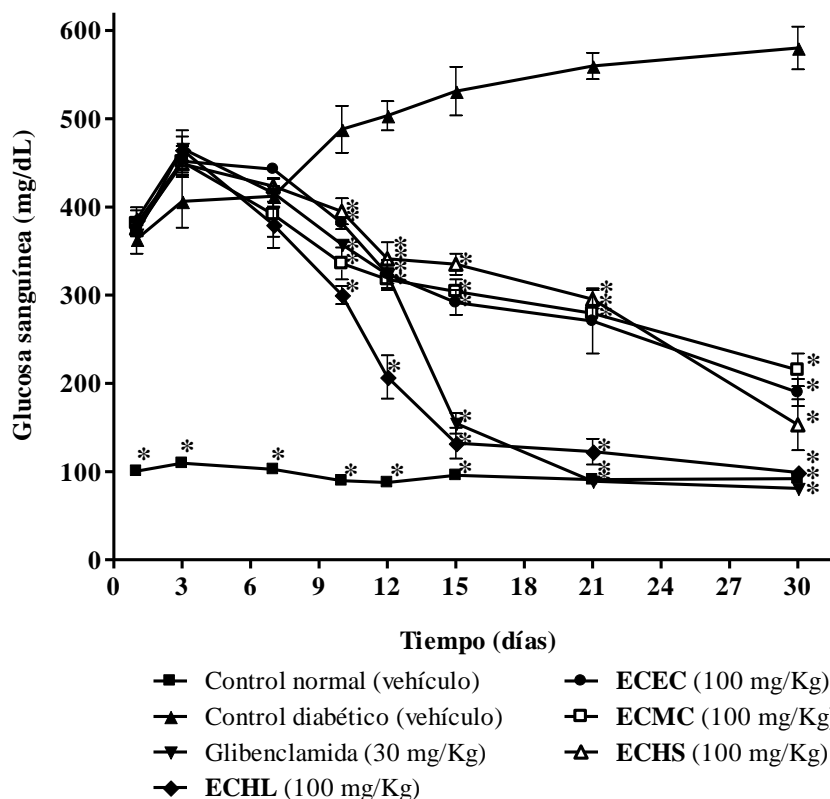


Figura 18. Efecto sub-agudo del ECHS, del ECHL, del ECEC, del ECMC sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas diabéticas. Cada valor es el promedio \pm el error estándar, $n = 6$ ratas. $*p < 0.05$ ANADEVIA y t-Dunnett con respecto al control diabético al mismo tiempo.

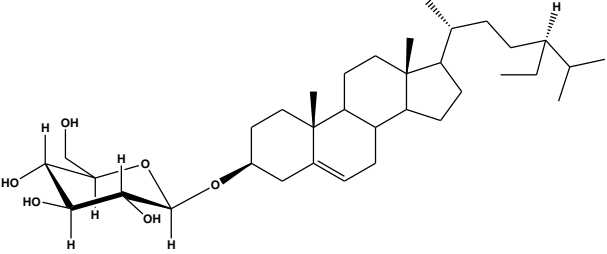
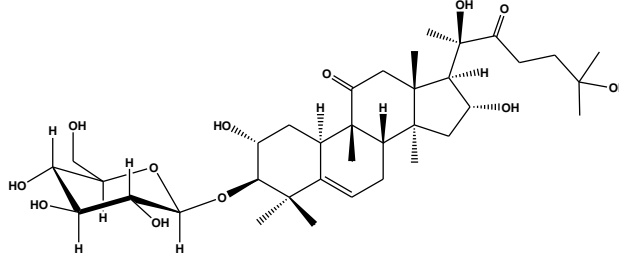
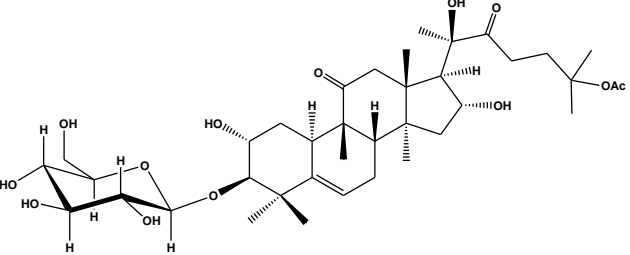
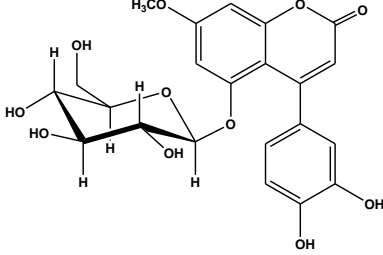
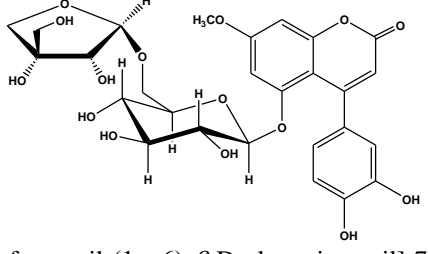
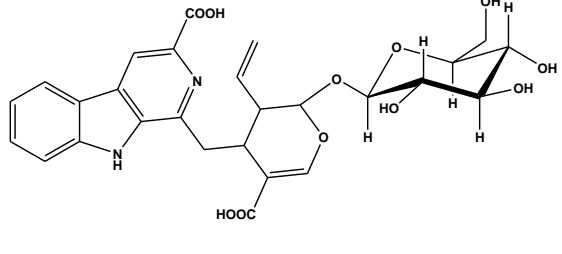
6.3 Obtención e identificación de los principales constituyentes presentes en los extractos íntegros de la corteza (ECHS) y hojas (EHHS) de *H. standleyana* y en el extracto íntegro de la corteza (ECHL) de *H. latiflora*.

Con la finalidad de obtener los constituyentes activos de la corteza y de las hojas de *H. standleyana* y de la corteza de *H. latiflora* se realizó el estudio fitoquímico. Para ello, se prepararon los extractos orgánicos [CH_2Cl_2 -MeOH (1:1)] de la corteza (ECHS) y hojas (EHHS) de *H. standleyana* y de la corteza de *H. latiflora* (ECHL); los extractos orgánicos íntegros se sometieron a un fraccionamiento preliminar mediante cromatografía en columna abierta de gel de sílice. Posteriormente, sucesivas cromatografías en columna abierta de las fracciones primarias utilizando la misma fase estacionaria permitieron el aislamiento y purificación de seis metabolitos secundarios del ECHS (compuestos 39, 40, 28, 9, 41 y 42, Cuadro 20), tres a partir del EHHS (compuestos 43, 36 y 44, Cuadro 21) y ocho a partir del ECHL (compuestos 26, 40, 28, 7, 9, 12, 42 y 15, Cuadro 22).

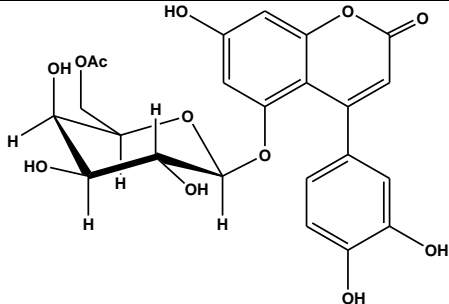
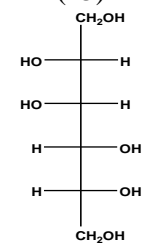
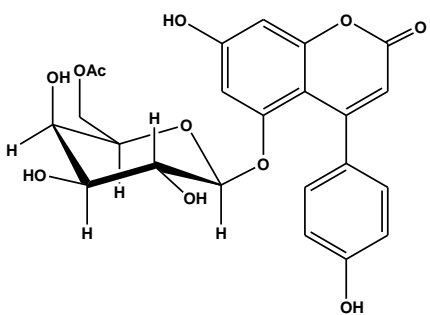
Los compuestos se caracterizaron como el 3-O- β -D-glucopiranosido del β -sitosterol (**39**), la 25-O-acetil-3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**40**), la 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**28**), la 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**9**), la 5-O- $[\beta$ -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**41**), el ácido desoxicordifolínico (**42**), la 6''-O-acetil-5-O- β -D-galactopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**43**), el manitol (**36**), la 6''-O-acetil-5-O- β -D-galactopiranosil-7,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**44**), 23,24-dihidrocucurbitacina F (**26**), 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**7**), 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**12**) y 5-O- $[\beta$ -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**15**).

Los productos **7**, **9**, **12**, **26**, **28**, **36** y **39** fueron identificados por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas de muestras auténticas previamente aisladas de *H. latiflora* y *E. caribaeum* (Mata *et al.*, 1987; 1988; Reguero *et al.*, 1987; Camacho, 1990; Mata *et al.*, 1990a; 1990b) y con los datos previamente reportados en la literatura (compuesto **15**) (Aquino *et al.*, 1988). Los productos **40**, **41**, **43** y **44** constituyen nuevos productos naturales, mientras que el compuesto **42** representa el primer alcaloide aislado y caracterizado del género *Hintonia*. La elucidación estructural de los compuestos obtenidos se realizó mediante la aplicación de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos. La caracterización de los compuestos novedosos se discutirá con detalle en las siguientes secciones.

Cuadro 20. Metabolitos secundarios aislados del extracto íntegro de la corteza de *H. standleyana* (ECHS).

Compuesto	Rendimiento (%)	Compuesto	Rendimiento (%)
 <p>3-O-β-D-glucopiranosido del β-sitosterol (39)</p>	0.011	 <p>3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (28)</p>	0.089
 <p>25-O-acetil-3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (40)</p>	0.004	 <p>5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (9)</p>	0.007
 <p>5-O-[β-D-apiofuranosil-(1\rightarrow6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (41)</p>	0.133	 <p>ácido desoxicordifolínico (42)</p>	0.033

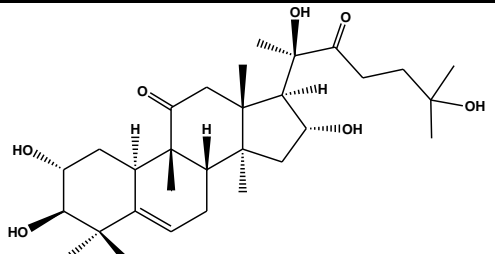
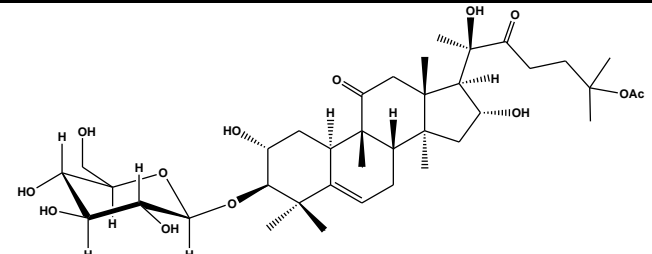
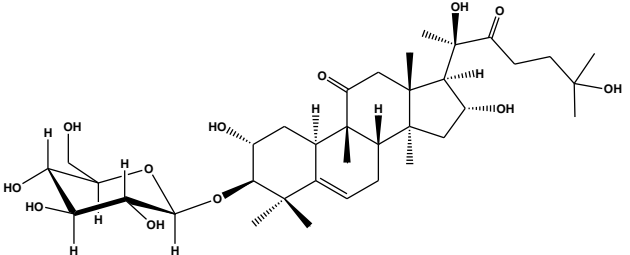
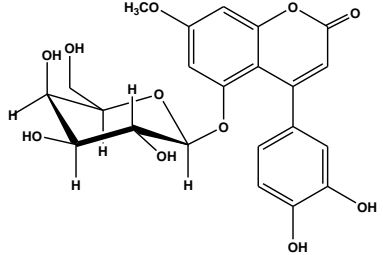
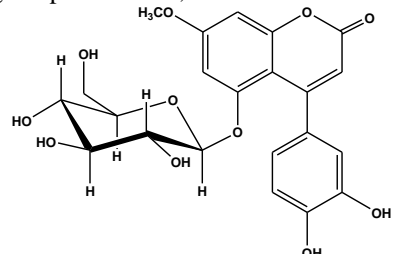
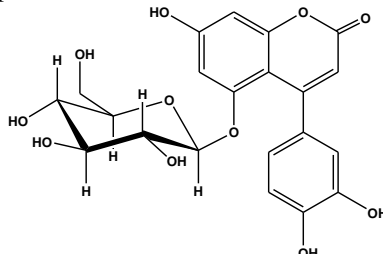
Cuadro 21. Metabolitos secundarios aislados del extracto íntegro de la hojas de *H. standleyana* (EHHS).

Compuesto	Rendimiento (%)
 <p>6''-O-acetil-5-O-β-D-galactopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (43)</p>	0.18
 <p>manitol (36)</p>	0.36
 <p>6''-O-acetil-5-O-β-D-galactopiranosil-7,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (44)</p>	0.12

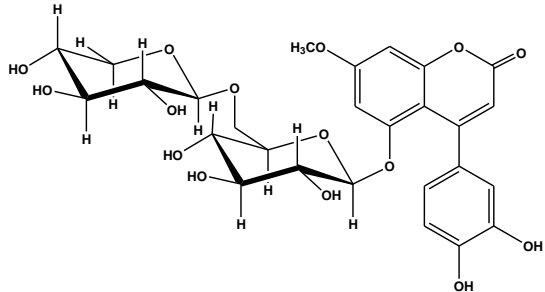
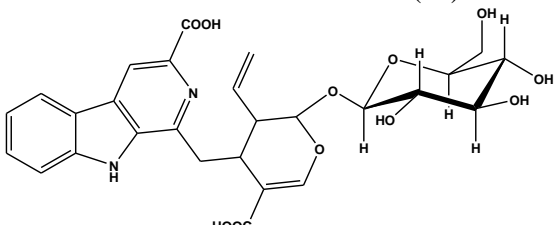
6.3.1 Identificación de la 25-O-acetil-3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (40).

La 25-O-acetil-3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (40) se obtuvo como un sólido cristalino blanco (40 mg). Su fórmula molecular se estableció por EM en su modalidad FAB positivo como $C_{38}H_{60}O_{13}$ que permite calcular un índice de deficiencia de hidrógenos de 9. Los principales fragmentos se apreciaron en una relación de masa carga (m/z) de 748 $[M + Na + H]^+$, 665 $[M - CH_3CO_2H + H]^+$, y 563 $[M - 162 + H]^+$; los dos últimos corresponden a las pérdidas consecutivas de ácido acético acetato y una unidad de hexosa a partir del ión *pseudomolecular* (Cuadro 23).

Cuadro 22. Metabolitos secundarios aislados del extracto íntegro de la corteza de *H. latiflora* (ECHL).

Compuesto	Rendimiento (%)	Compuesto	Rendimiento (%)
 <p>23,24-dihidrocurbitacina F (26)</p>	0.008	 <p>25-O-acetil-3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocurbitacina F (40)</p>	0.007
 <p>3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocurbitacina F (28)</p>	0.090	 <p>5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7)</p>	1.2
 <p>5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (9)</p>	0.15	 <p>5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (12)</p>	0.18

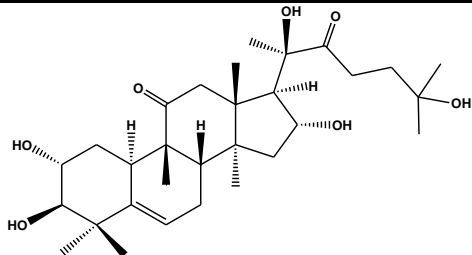
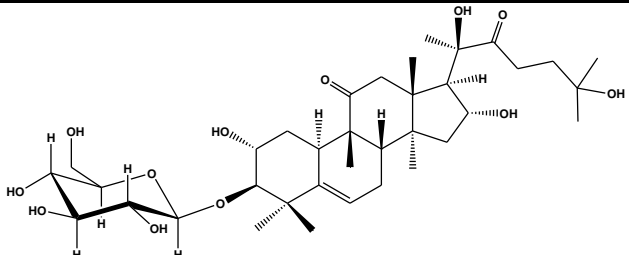
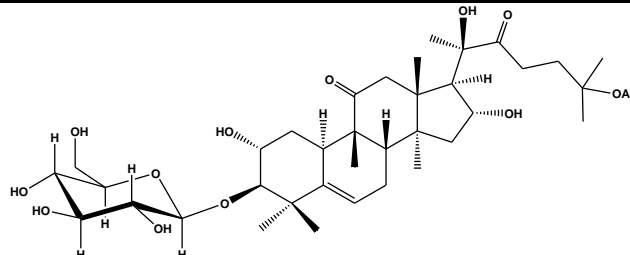
Cuadro 22. Metabolitos secundarios aislados del extracto íntegro de la corteza de *H. latiflora* (ECHL, continuación).

Compuesto	Rendimiento (%)
 5- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (15)	0.016
 \acute{a} cido desoxicordifol\acute{n}ico (42)	0.028

El espectro en el IR del compuesto **40** fue muy similar a los compuestos **26** y **28** (**Cuadro 23**), presentando bandas de absorci3n para grupos hidroxilo (3400 cm^{-1}), metilos y metilenos (2920 cm^{-1}), carbonilo de cetona (1690 cm^{-1}) y dobles enlaces (1630 cm^{-1}). La principal diferencia del espectro en el IR del compuesto **40** fue la presencia de una banda de absorci3n en 1710 cm^{-1} correspondiente a un carbonilo de \acute{e}ster.

De igual manera, el espectro de RMN ^{13}C del producto **40** (**Cuadro 24, Espectro 1**) fue muy similar al de los compuestos **26** y **28** (**Cuadro 24, Espectro 2**), ya que presento se\~nales para dos grupos carbonilos de cetona [δ_{C} 216.0 (C-11) y 216.6 (C-22)]; una doble ligadura trisustituida [δ_{C} 120.5 (C-6) -se\~nal que correlacion3 en el espectro HETCOR con δ_{H} 5.78, d, $J = 5.4$ - y 142.5 (C-5), (**Espectro 3**)]; tres carbonos terciarios unidos a funciones oxigenadas [δ_{C} 71.5 (C-2), 71.5 (C-16) y 93.8 (C-3)], dos carbonos cuaternarios unidos a funciones oxigenadas -un alcohol δ_{C} 80.9 (C-20) y un \acute{e}ster δ_{C} 83.1 (C-25)- y ocho metilos (δ_{C} 19.7-26.3) unidos a carbonos cuaternarios que correlacionaron a su vez en el espectro HETCOR con los singuletes ubicados en la regi3n δ_{H} 0.88-1.44 (**Espectro 3**). En consecuencia el producto **40** se identific3 como un tirterpenoide de tipo cucurbitano.

Cuadro 23. Constantes físicas y espectroscópicas de los productos de tipo cucurbitano **26**, **28** y **40**.

		
26	28	40
$C_{30}H_{48}O_7$	$C_{36}H_{58}O_{12}$	$C_{38}H_{60}O_{13}$
PM: 520 uma	PM: 682 uma	PM: 724 uma
p.f. 155-156°C	p.f. 199-201°C	p.f. 158-161°C
IR (KBr) ν_{max} = 3440, 2950, 1690, 1460, 1430, 1370, 1260, 1210 cm^{-1}	IR (KBr): ν_{max} = 3500, 2960, 1690, 1610, 1430, 1260, 1230 cm^{-1}	IR (KBr): ν_{max} = 3420, 2960, 1710, 1690, 1615, 1455, 1430 and 1265 cm^{-1}
EM-FAB ⁺ : m/z = 521 [M+H] ⁺ (5%), 502 [M-H ₂ O] ⁺ (2%), 484 [M-2H ₂ O] ⁺ (2%)	EM-FAB ⁺ : m/z = 706 [M+Na+H] ⁺ (1%), 683 [M+H] ⁺ (1%), 665 [M+H-H ₂ O] ⁺ (1%), 568 (1%), 520 [M-C ₆ O ₅ H ₁₁] ⁺ (2%), 463 (15%)	EM-FAB ⁺ : m/z = 748 [M+Na +H] ⁺ (3%); 706 (M-H ₂ O) ⁺ (1%), 665 [M+H-CH ₃ CO ₂ H] ⁺ (2%); 646 [M-CH ₃ CO ₂ H-H ₂ O] (1%), 563 [M+H-C ₆ O ₅ H ₁₁] ⁺ (5%)

Cuadro 24. Datos de RMN $^{13}\text{C}^*$ de los productos de tipo cucurbitano **26**, **28** y **40**.

26				28				40			
Pos	δ_{C}	Pos	δ_{C}	Pos	δ_{C}	Pos	δ_{C}	Pos	δ_{C}	Pos	δ_{C}
1	33.6	20	81.1	1	34.1	20	80.3	1	34.1	20	80.9
2	71.0	21	24.9	2	71.5	21	25.5	2	71.5	21	25.6
3	79.9	22	216.1	3	93.8	22	217.2	3	93.8	22	216.6
4	42.2	23	31.8	4	43.2	23	33.1	4	43.3	23	32.8
5	141.4	24	37.3	5	142.5	24	38.1	5	142.5	24	35.6
6	119.5	25	70.2	6	120.5	25	70.8	6	120.5	25	83.1
7	24.1	26	29.5	7	24.8	26	29.4	7	25.5	26	26.3
8	43.3	27	28.9	8	44.3	27	29.1	8	44.5	27	26.2
9	48.3	28	21.9	9	49.2	28	20.5	9	49.1	28	22.3
10	34.3	29	24.8	10	34.8	29	23.4	10	34.8	29	24.5
11	215.1	30	20.4	11	216.0	30	20.5	11	216.0	30	20.5
12	51.1	1		12	49.7	1	106.8	12	49.8	1	106.8
13	47.6	2		13	48.7	2	76.2	13	49.1	2	76.2
14	51.8	3		14	51.8	3	78.5	14	51.8	3	78.5
15	45.8	4		15	46.6	4	72.1	15	46.7	4	72.1
16	70.8	5		16	71.5	5	78.0	16	71.5	5	78.0
17	58.1	6		17	59.3	6	62.7	17	59.5	6	62.7
18	20.1	CO_2CH_3		18	20.4	CO_2CH_3		18	20.5	CO_2CH_3	172.4
19	19.4	CO_2CH_3		19	19.7	CO_2CH_3		19	19.7	CO_2CH_3	23.4

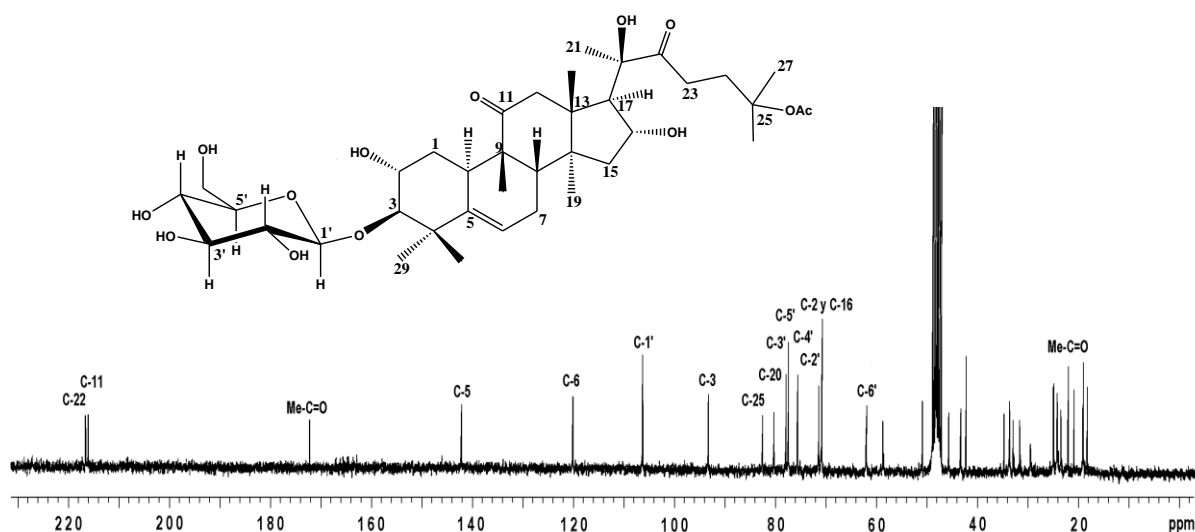
CD3OD, *75.5 MHz, δ en ppm.

Las principales diferencias mostradas por el espectro de RMN ^{13}C del compuesto **40** respecto al del compuesto **26** fueron la presencia de seis señales asignables a una unidad de glucosa [δ_{C} 106.8 (C-1'), 76.2 (C-2'), 78.5 (C-3'), 72.1 (C-4'), 78.0 (C-5') y 62.7 (C-6') mismas que correlacionaron en el espectro HETCOR con δ_{H} 4.48 (d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 3.30 (m, H-2'), 3.34 (m, H-3'), 3.32 (m, H-4'), 3.22 (m, H-5'), 3.69 (dd, $J = 5.1, 11.7$ Hz, H-6'a) y 4.06 (m, H-6'b), respectivamente]. Estas señales también se registraron en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **28** (**Espectros 3 y 4**). Además, el espectro de RMN ^{13}C del compuesto **40** presenta dos señales correspondientes a un carbonilo de éster (δ_{C} 172.4) y un grupo metilo de acetato (δ_{C} 22.3; esta última correlacionó en el espectro HETCOR con la absorción en δ_{H} 1.95). Las señales para el grupo acetoxi no están presentes en los espectros de RMN de **28** (**Espectros 2 y 4**) y **26**. Como la señal correspondiente a C-25 (δ_{C} 83.1) en **40** se encontraba paramagnéticamente (Δ_{C} -12.3 ppm) desplazada con respecto a la del compuesto **28** (δ_{C} 70.8), el grupo acetoxi se ubicó en la posición C-25 en el producto **40**. Los desplazamientos químicos de C-1' y C-3 fueron muy similares en **28** y **40** por lo tanto, el enlace glicosídico debe establecerse a través del hidroxilo ubicado en el carbono anomérico de la glucosa [δ_{C} 105.6, (C-1')] y una función alcohólica en C-3 (δ_{C}

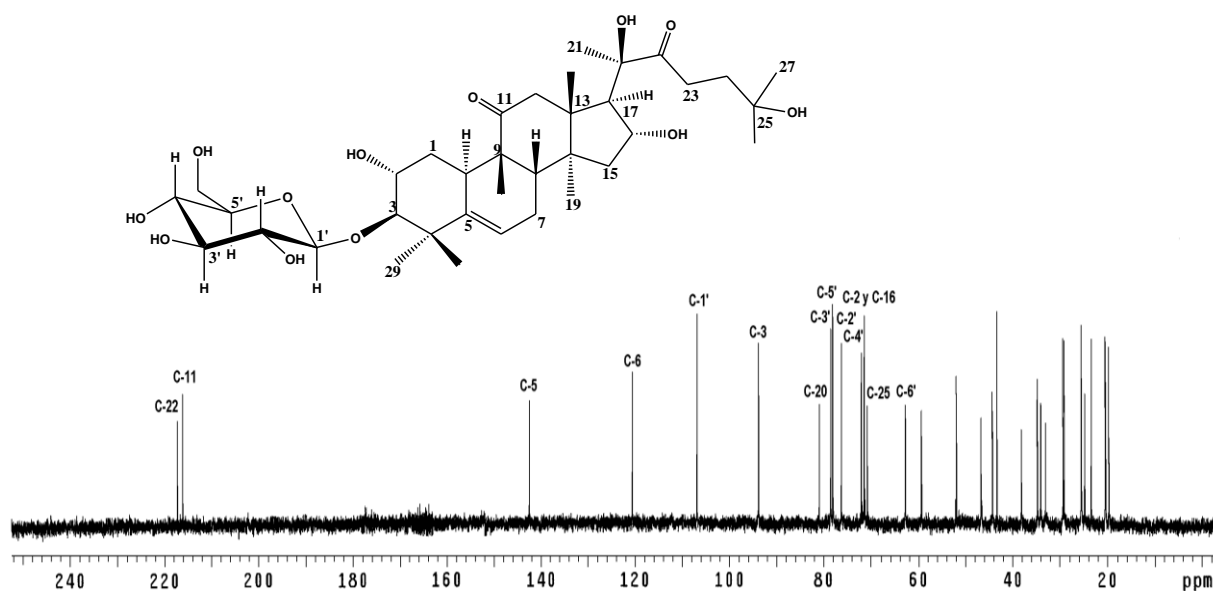
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

93.8) del núcleo cucurbitano.

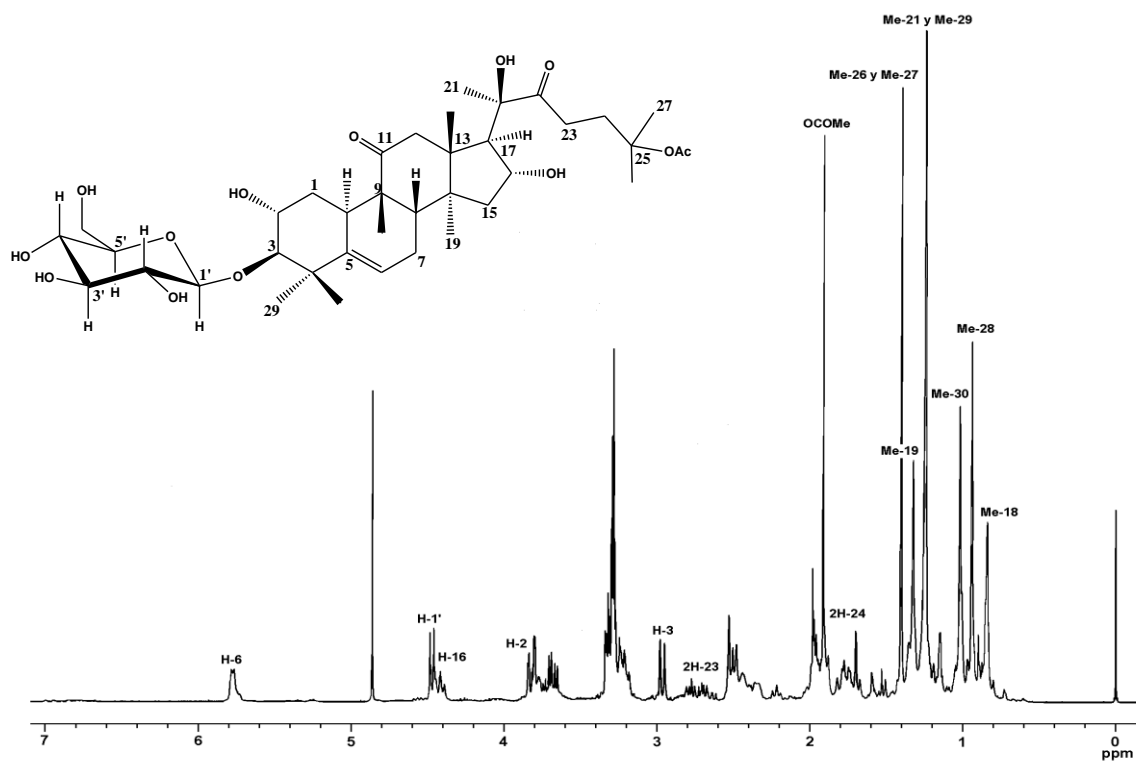
Con base en las evidencias presentadas el producto natural **40** se caracterizó como la 25-O-acetil-3-O- β -D-glucopiranosil-23, 24-dihidrocucurbitacina F, el cual constituye un metabolito secundario novedoso, análogo de la 23,24-dihidrocucurbitacina F (Reguero *et al.*, 1987; Camacho *et al.*, 1990; Mata *et al.*, 1990a).



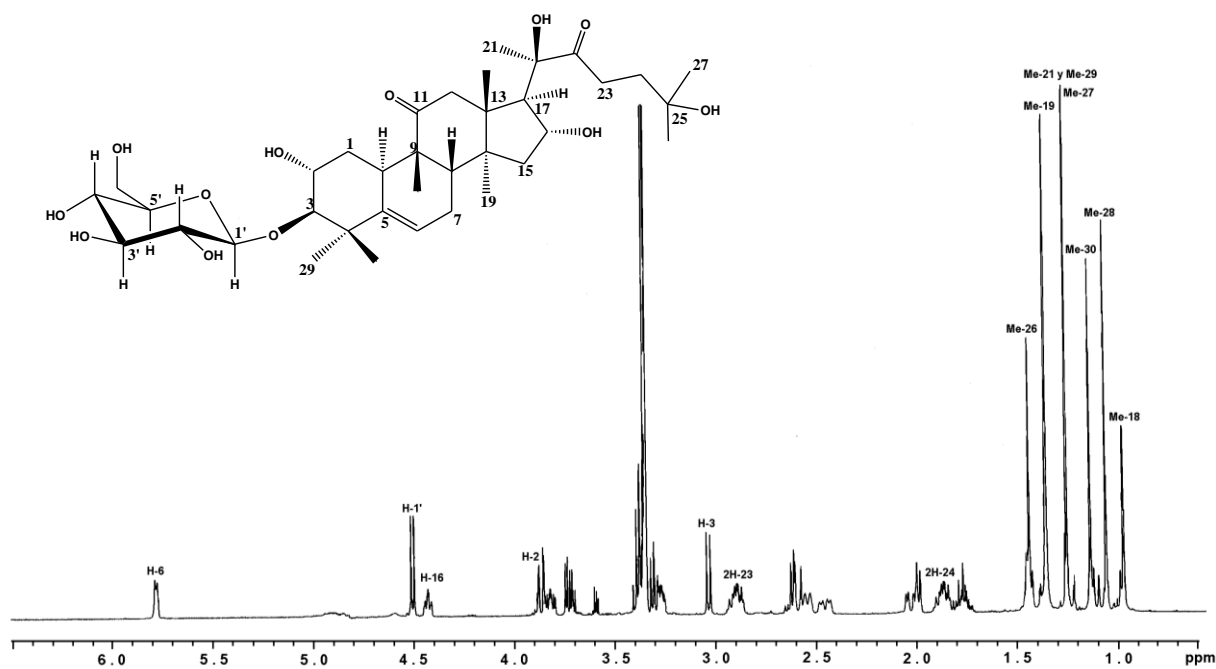
Espectro 1. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **40** (CDOD₃, 75.5 MHz).



Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **28** (CDOD₃, 75.5 MHz).



Espectro 3. Espectro de RMN ^1H del compuesto **40** (CDOD_3 , 300 MHz).



Espectro 4. Espectro de RMN ^1H del compuesto **28** (CDOD_3 , 300 MHz).

6.3.2 Identificación de los metabolitos de tipo 4-fenilcumarina (compuestos 41, 43 y 44).

Los productos **7**, **9**, **12**, **15**, **41**, **43** y **44** precipitaron como sólidos amorfos color beige o amarillo. Las fórmulas moleculares se establecieron por EM en su modalidad FAB positivo como C₂₂H₂₂O₁₁ (**7**), C₂₂H₂₂O₁₁ (**9**), C₂₁H₂₀O₁₁ (**12**), C₂₇H₃₀O₁₅ (**15**), C₂₇H₃₀O₁₅ (**41**), C₂₃H₂₂O₁₂ (**43**) y C₂₃H₂₂O₁₁ (**44**). Los espectros en el IR en todos los casos presentaron bandas de absorción características para grupos hidroxilos (~3500 cm⁻¹), carbonilo de α -pirona (~1700 cm⁻¹) y aromaticidad (~1600 y ~1400 cm⁻¹). Los valores de las constantes espectroscópicas de los compuestos **7**, **9**, **12**, **15**, **41**, **43** y **44** se presentan en los **Cuadros 25** y **26**. Los compuestos **41**, **43** y **44** se describen por vez primera en la naturaleza.

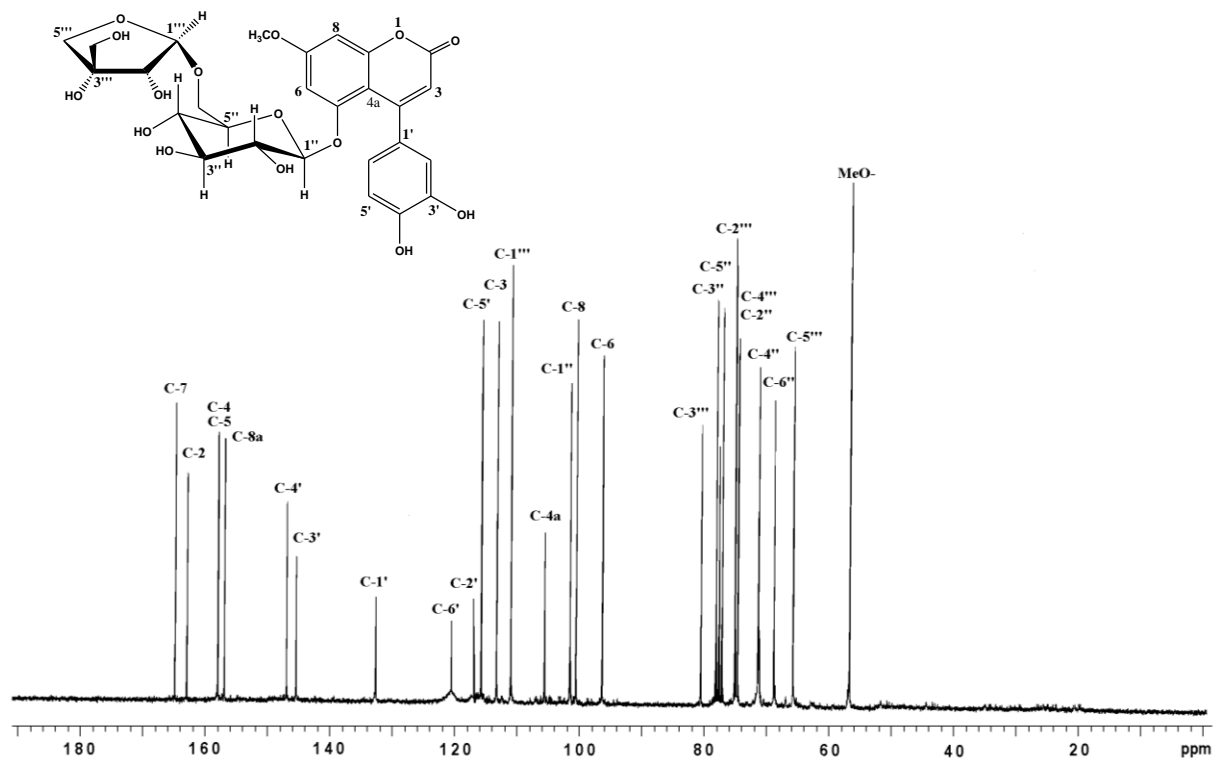
Como se puede observar en el **Cuadro 26**, los espectros de RMN ¹³C y ¹H de los compuestos **41**, **43** y **44** resultaron muy parecidos a los de los productos **7**, **9**, **12**, y **15** (Mata *et al.*, 1987; 1988; Aquino *et al.*, 1988; Camacho, 1990; Mata *et al.*, 1990a; 1990b). A continuación se describen sus principales características:

En los tres casos, en $\delta_C \sim 163.0$ se observó una señal atribuible a un carbonilo de α -pirona; en $\delta_C \sim 113.0$ (señal que correlacionó en el espectro HETCOR con una señal en $\delta_H \sim 5.90$) y $\delta_C \sim 158.0$ se registraron las señales correspondientes a una doble ligadura α , β no saturada asignables a los carbonos de las posiciones C-3 y C-4 del núcleo de las 4-fenilcumarinas, respectivamente.

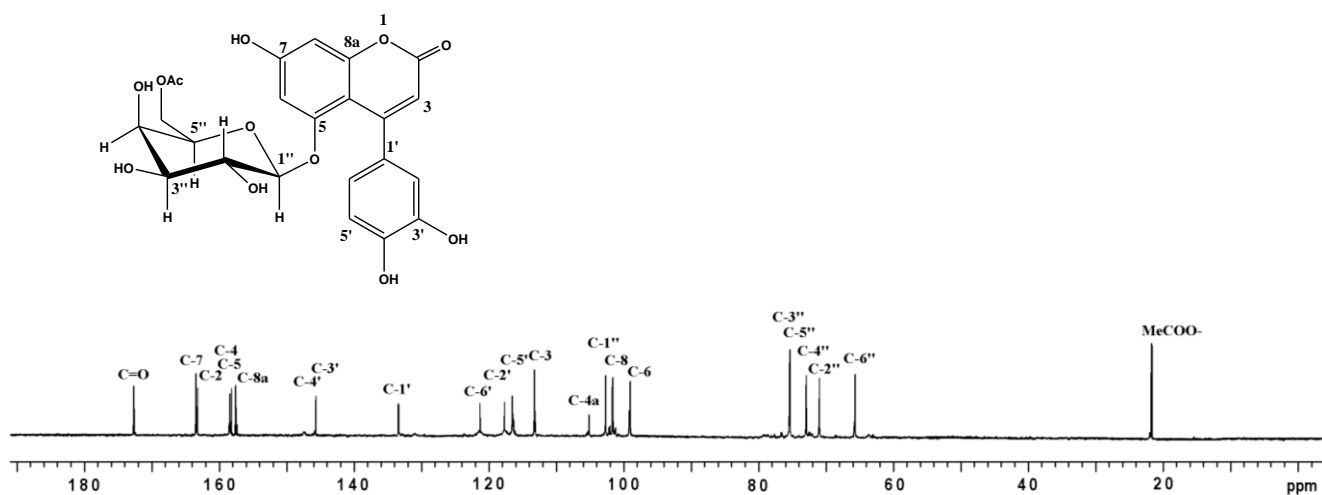
El espectro de RMN ¹³C de **41** (**Espectro 5**) presentó 27 señales, de las cuales 15 son fácilmente asignables al núcleo de una 4-fenilcumarina; 11 a una unidad disacárida y la última pertenece a un grupo metoxilo (δ_C 56.5/ δ_H 3.85). Los espectros de RMN ¹³C de los compuestos **43** y **44** (**Espectros 6** y **7**) presentaron 23 señales cada uno, de las cuales nuevamente 15 son asignables al núcleo de las 4-fenilcumarinas; seis a una unidad de galactosa (δ_C 64.5 – 101.9), y las dos restantes a un grupo acetilo (δ_C 172.7 y 20.7/ δ_H 2.07).

En la región donde resuenan los hidrógenos aromáticos, los espectros de RMN ¹H de los compuestos **41**, **43** y **44** registraron dos conjuntos de señales: Así para el compuesto **41** (**Espectro 8**) se observaron señales correspondientes a dos hidrógenos *meta*-relacionados (sistema AB) asignables a H-6 [δ_H 6.68 (1H, d, $J = 2.4$)] y H-8 [δ_H 6.65 (1H, d, $J = 2.4$)] del anillo A de una 4-fenilcumarina, y las señales

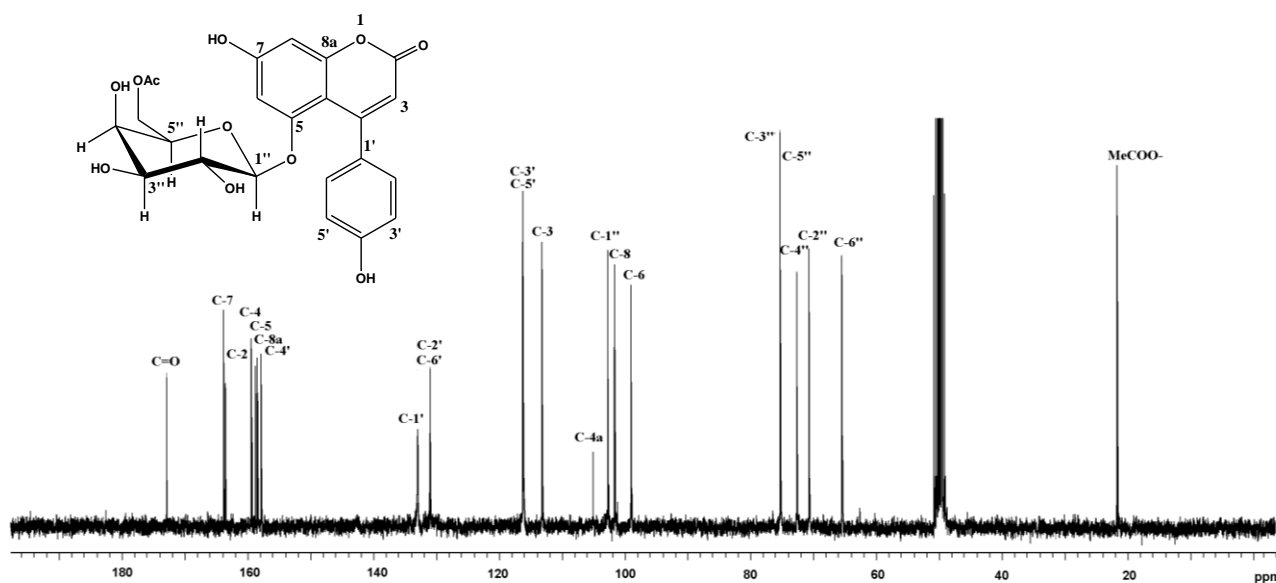
correspondientes a un sistema ABC atribuibles a los hidrógenos de las posiciones H-2' [6.83 (1H, d, $J = 2.4$), H-5' [6.83 (1H, d, $J = 7.5$)] y H-6' [6.72 (1H, dd, $J = 2.4, 7.5$)] del anillo B de la 4-fenilcumarina.



Espectro 5. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **41** (CDOD_3 , 75.5 MHz).



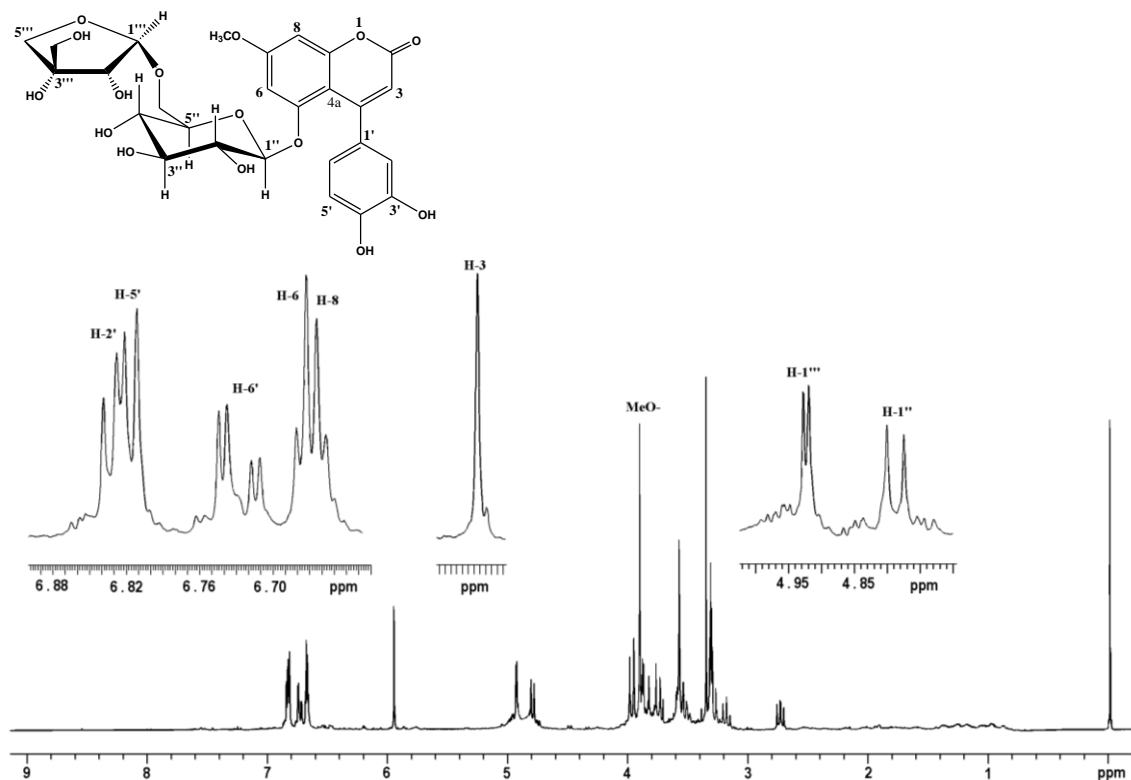
Espectro 6. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **43** (CDOD_3 , 75.5 MHz).



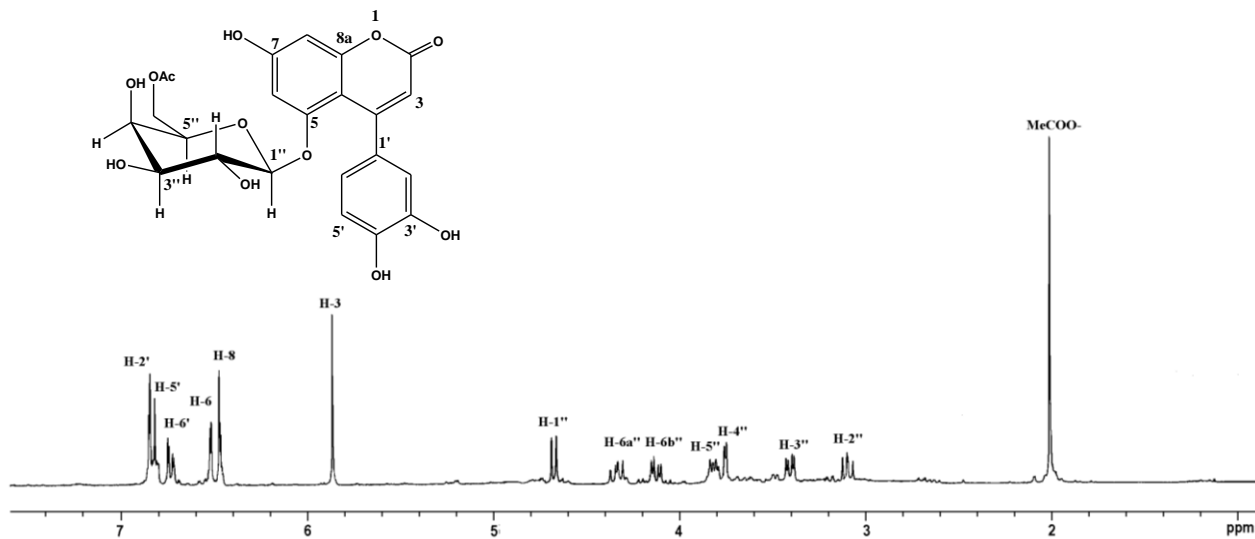
Espectro 7. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **44** (CDOD_3 , 75.5 MHz).

El espectro de RMN ^1H del compuesto **43** (**Espectro 9**) presentó los mismos conjuntos de señales [δ_{H} 6.52 (H-6, d, $J = 2.4$), δ_{H} 6.47 (H-8, d, $J = 2.4$), 6.85 (H-2', d, $J = 2.1$), 6.83 (H-5', d, $J = 7.8$) y 6.73 (H-6', dd, $J = 2.1, 8.1$)] del compuesto **41**. Sin embargo, el espectro de RMN ^1H del compuesto **44** (**Espectro 10**) presentó además de las señales atribuibles al sistema AB [δ_{H} 6.52 (H-6, d, $J = 2.2$) y 6.48 (H-8, d, $J = 2.2$)], un sistema AA'BB' [δ_{H} 7.24 (2H, d, $J = 8.8$, H-2' y H-6'), 6.85 (2H, d, $J = 8.4$, H-3' y H-5')] atribuible al anillo B *para*-sustituido.

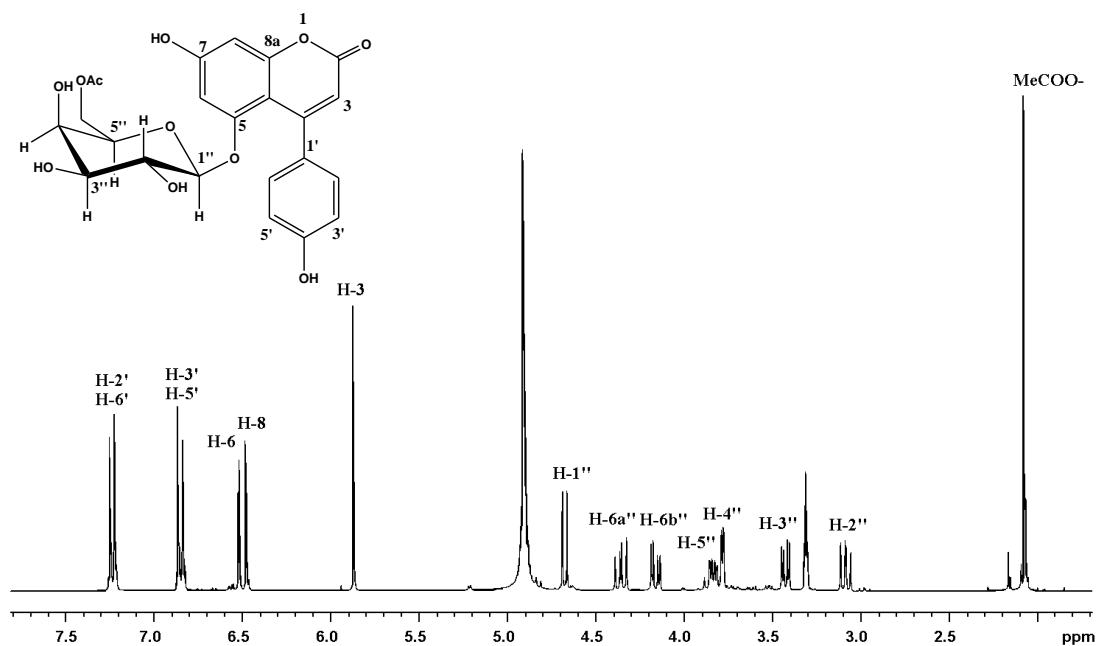
En la región donde resuenan los hidrógenos unidos a los carbonos bases de oxígeno, el espectro de RMN ^1H del producto **41** registró señales atribuibles a dos unidades de azúcar, una hexosa y una pentosa. En δ_{H} 4.79 (d, $J = 7.8$, H-1'') y δ_{H} 4.92 (d, $J = 2.4$, H-1''') se observaron dos dobletes correspondientes a los hidrógenos anoméricos. Los valores de las constantes de acoplamiento permitieron inferir las orientaciones α -axial y α -ecuatorial de estos hidrógenos (H-1'' y H-1''', respectivamente), por consiguiente las uniones glicosídicas en **41** se establecen a través de los hidroxilos β orientados.



Espectro 8. Espectro de RMN ^1H del compuesto **41** (CDOD_3 , 300 MHz).

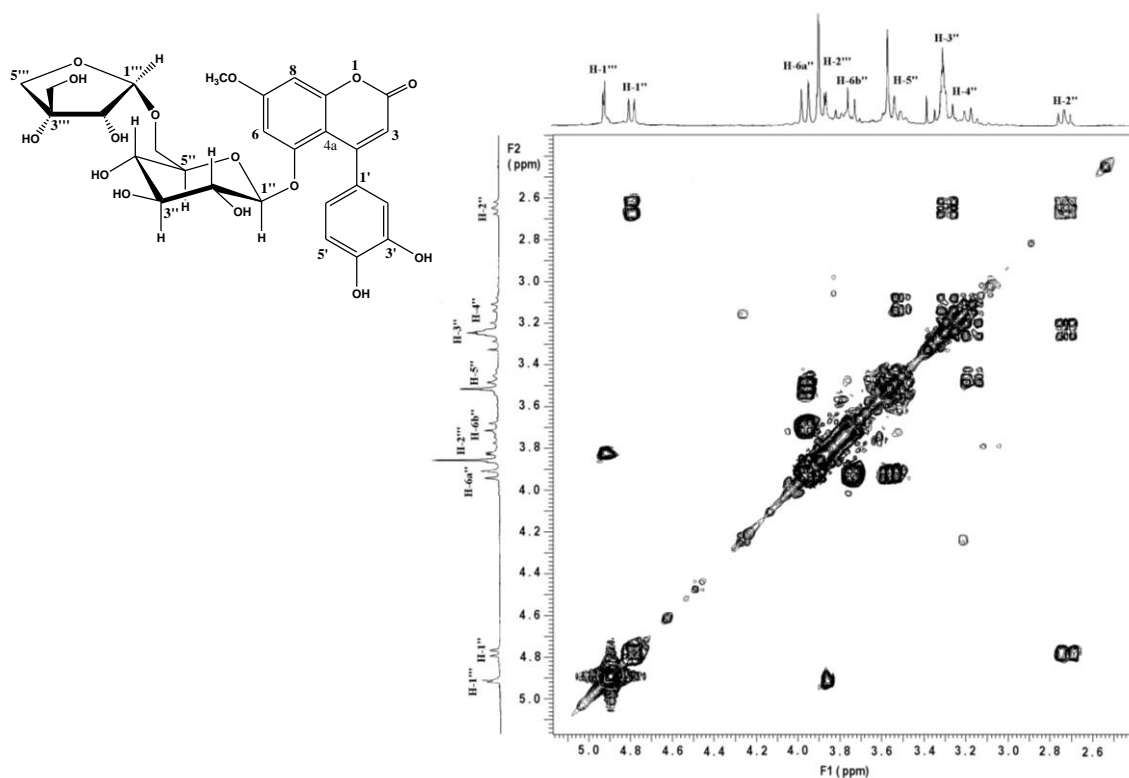


Espectro 9. Espectro de RMN ^1H del compuesto **43** (CDOD_3 , 300 MHz).



Espectro 10. Espectro de RMN ^1H del compuesto **44** (CDOD_3 , 300 MHz).

Los cuadros de conectividad observados en los espectros de correlación homonuclear (COSY) de los compuestos **41**, **43** y **44** (**Espectros 11-13**) permitieron asignar inequívocamente las señales atribuibles a los hidrógenos de las dos unidades de azúcar en el producto **41** y de la unidad de azúcar presente en los compuestos **43** y **44**.

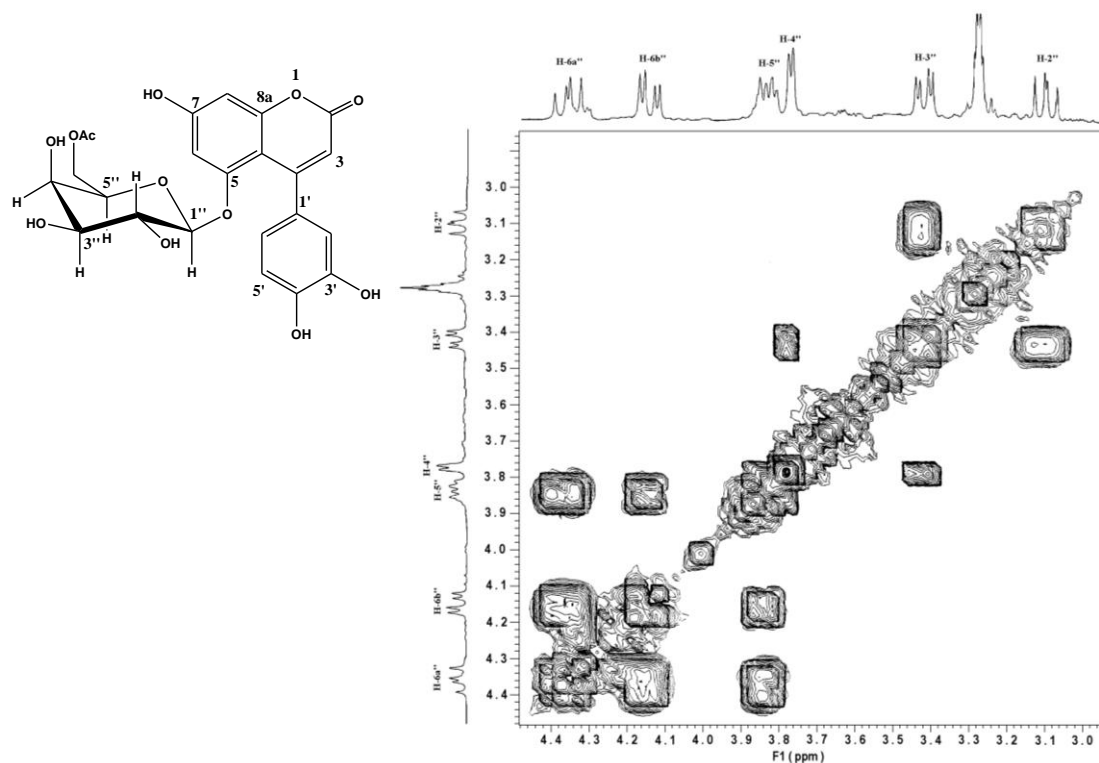


Espectro 11. Vista parcial del espectro COSY del compuesto **41** (CDOD_3 , 300 MHz).

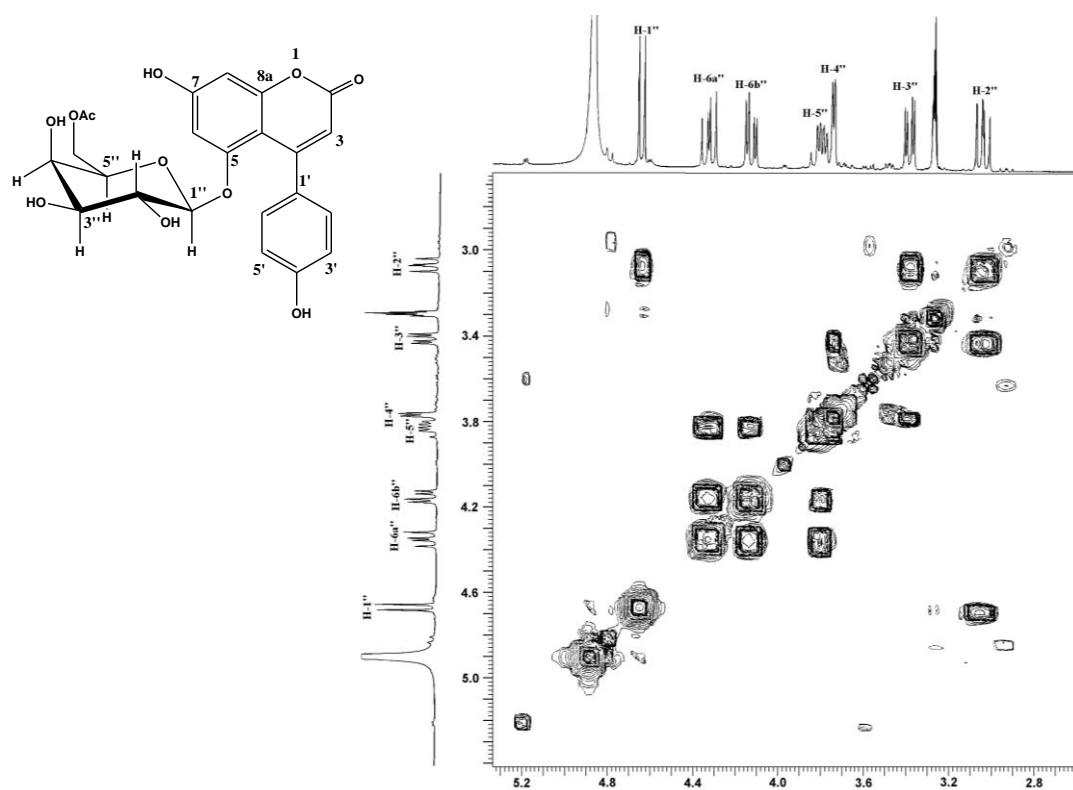
En el caso del producto **41**, las señales de los azúcares observadas en el espectro de RMN ^1H correspondieron con las de una unidad de glucosa [δ_{H} 4.79 (1H, d, $J = 7.8$, H-1''), 2.73 (1H, dd, $J = 7.8, 7.8$, H-2''), 3.3 (1H, dd, $J = 7.8, 7.8$, H-3''), 3.2 (1H, dd, $J = 7.8, 7.8$, H-4''), 3.6 (1H, m, H-5''), 3.95 (1H, brd, $J = 10.9$, H-6a''), 3.74 (1H brd, $J = 10.9$, H-6b''); estas señales correlacionaron en el espectro HETCOR con las observadas en δ_{C} 101.4 (C-1''), 74.5 (C-2''), 78.0 (C-3''), 71.3 (C-4''), 77.6 (C-5''), 68.7 (C-6''), respectivamente] y una de apiosa [δ_{H} 4.92 (1H, d, $J = 2.4$, H-1'''), 3.86 (1H, d, $J = 2.4$, H-2'''), 3.55 (2H, m, H-4a''' y H-4b'''), 3.55 (2H, m, H-5a''' y H-5b'''), señales que correlacionaron en el espectro HETCOR con las señales en δ_{C} 111.0 (C-1'''), 77.1 (C-2'''), 80.5 (C-3'''), 75.0 (C-4'''), 65.7 (C-5'''), respectivamente]. La identidad de ambos azúcares fue confirmada por el análisis en ccf de la fracción acuosa de los productos de la hidrólisis ácida del compuesto **41**, utilizando como referencias diferentes monosacáridos. Los carbohidratos presentes se identificaron como apiosa y glucosa.

Las correlaciones observadas en el espectro NOESY del producto **41** entre H-1'' (δ_{H} 4.79)/H-6' (δ_{H} 6.72), H-1''' (δ_{H} 4.92)/ H-6a'' (δ_{H} 3.95) y H-6b'' (δ_{H} 3.74), aunadas a las perdidas observadas en el espectro de masas: EM-FAB $^+$ ($m/z = [\text{M}+\text{H}-132]^+$ y 301 $[\text{M}+\text{H}-132-162]^+$) permitieron establecer que la glucosa se encuentra unida directamente a la aglicona a través del hidroxilo del carbono anomérico y del hidroxilo de la posición C-5, y que la apiosa se une a la glucosa mediante un enlace glicosídico de tipo 1 \rightarrow 6 en el compuesto **41**.

Las señales en los espectros de RMN ^1H correspondientes a los hidrógenos del azúcar presente en los productos **43** y **44** se resumen en el **Cuadro 26**. La multiplicidad y los valores de las constantes de acoplamiento de los hidrógenos H-3'', H-4'' y H-5'' (**Espectros 9-10**) permiten establecer que la unidad de azúcar presente en los compuesto **43** y **44** es la galactosa. La señal asignable a C-6'' (δ_{C} 64.5) en los espectros de RMN ^{13}C de los productos **43** y **44** se encuentra paramagnéticamente desplazada ($\Delta_{\text{C}} = \sim 2.0$ ppm) respecto al de los compuestos **7** (δ_{C} 62.4), **9** (δ_{C} 62.5) y **12** (δ_{C} 62.3) sugiriendo que el grupo hidroximetileno de la galactosa en los productos **43** y **44** se encuentra esterificado por un residuo de ácido acético.



Espectro 12. Vista parcial del espectro COSY del compuesto **43** (CDOD₃, 300 MHz).



Espectro 13. Vista parcial del espectro COSY del compuesto **44** (CDOD₃, 300 MHz).

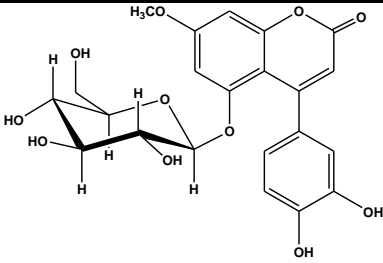
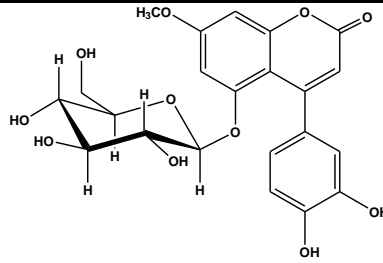
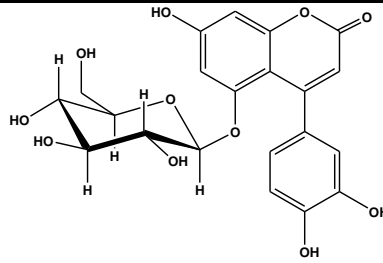
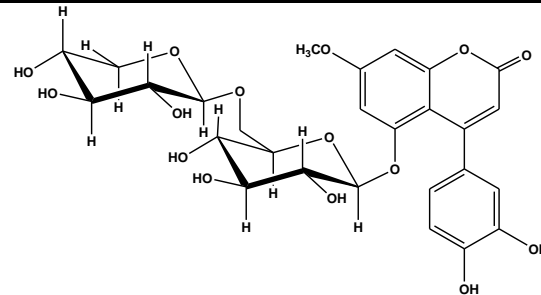
Finalmente, las correlaciones H-2'' /H-6' y Me-CO-/H-4'' (δ_H 3.78) observadas en los espectros NOESY de los productos **43** y **44** así como las pérdidas observadas en el espectro de masas modalidad FAB⁺ (m/z 431 [M+H-60]⁺, 330 [M+H-162]⁺ para **43** y 415 [M+H-60]⁺, 313 [M+H-162]⁺ para **44**) permitieron corroborar que en los productos **43** y **44** el hidroximetileno de la galactosa se encuentra acetilado y que el hidroxilo anomérico forma un enlace *O*-glicosídico con el hidroxilo en C-5 de la aglicona.

Con base en estas evidencias los productos naturales **41**, **43** y **44** se identificaron como la 5-O-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**41**), como la 6''-O-acetil-5-*O*- β -D-galactopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**43**) y como la 6''-O-acetil-5-*O*- β -D-galactopiranosil-7,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**44**), metabolitos secundarios novedosos.

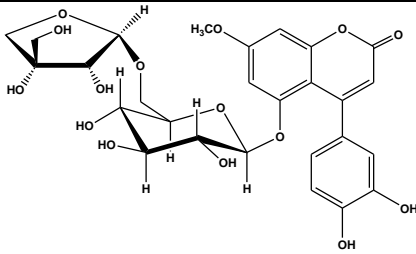
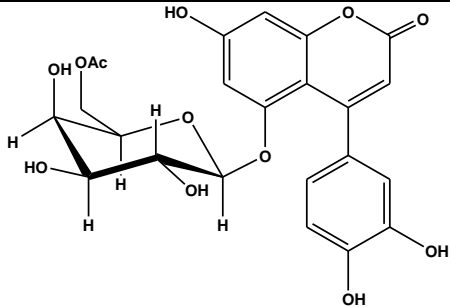
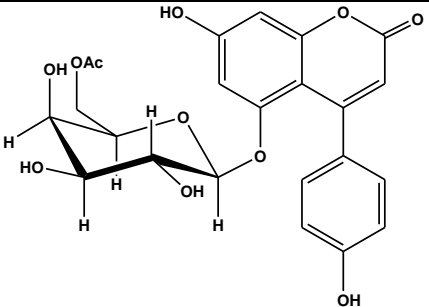
6.3.3 Identificación del ácido desoxicordifolínico (**42**).

La fórmula molecular del producto **42** se estableció por EM en su modalidad FAB positivo de alta resolución como C₂₇H₂₉N₂O₁₁. Esta fórmula permite un índice de deficiencia de hidrógeno de 14. El espectro en el IR presentó bandas de absorción características para grupos hidroxilos y amino (3412 cm⁻¹), carbonilo de ácido carboxílico (1690 cm⁻¹), doble ligadura (1389, 1080 cm⁻¹) y aromaticidad (1624, 1560 cm⁻¹). La naturaleza alcaloidea de **42** fue establecida preliminarmente por su reacción positiva frente al reactivo de Drangerdorff. Así mismo, una reacción positiva frente al reactivo de Erlich permitió proponer que el alcaloide era de tipo indólico. La naturaleza indólica se confirmó posteriormente mediante el análisis detallado de los espectros en el UV y de RMN (**Cuadro 27**) (Kerber *et al.*, 2001; Charan *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2003).

Cuadro 25. Constantes físicas y espectroscópicas de los productos de de los productos de tipo 4-fenilumarina **7**, **9**, **12**, **15**, **41**, **43** y **44**.

			
7	9	12	15
$C_{22}H_{22}O_{11}$	$C_{22}H_{22}O_{11}$	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$C_{27}H_{30}O_{15}$
PM: 462 uma	PM: 462 uma	PM: 448 uma	PM: 594 uma
p.f. 228-231°C	p.f. 237-240°C	p.f. 250-252°C	p.f. >250°C
IR (KBr) ν_{max} = 3500, 2950, 1740, 1420, 1350, 1230, 1165, 1030 cm^{-1}	IR (KBr): ν_{max} = 3500, 2960, 1750, 1430, 1360, 1240, 1160, 1040 cm^{-1}	IR (KBr): ν_{max} = 3450, 2950, 1750, 1420, 1360, 1245, 1160, 1030 cm^{-1}	IR (KBr) ν_{max} = 3410, 2910, 1700, 1610, 1550, 1510, 1350, 1230, 1075 cm^{-1}
EM-FAB ⁺ : m/z = 463 [M+H] ⁺ (5%), 301 [M+H-C ₆ O ₅ H ₁₁] ⁺ (10%)	EM-FAB ⁺ : m/z = 463 [M+H] ⁺ (3%), 301 [M+H-C ₆ O ₅ H ₁₁] ⁺ (5%)	EM-FAB ⁺ : m/z = 449 [M+H] ⁺ (1%), 287 [M+H-C ₆ O ₅ H ₁₁] ⁺ (1%)	EM-FAB ⁺ : m/z = 595[M+H] ⁺ (4 %), 462 (5 %), 301 [M+H-C ₁₁ O ₉ H ₁₈] ⁺ (10%)

Cuadro 25. Constantes físicas y espectroscópicas de los productos de de los productos de tipo 4-fenilcumarina **7**, **9**, **12**, **15**, **41**, **43** y **44** (continuación).

		
41	43	44
$C_{27}H_{30}O_{15}$	$C_{23}H_{22}O_{12}$	$C_{23}H_{22}O_{11}$
PM: 594 uma	PM: 490 uma	PM: 474 uma
p.f.= >250°C	p.f.= 155-158°C	p.f.= 153-156°C
IR (KBr) ν_{max} = 3500, 2940, 1730, 1620,1430, 1360, 1240, 1160, 1040 cm^{-1}	IR (KBr): ν_{max} = 3430, 1705, 1615, 1515,1435, 1365, 1265, 1080 cm^{-1}	IR (KBr): ν_{max} = 3450, 1705, 1620, 1510,1430, 1360, 1265, 1090 cm^{-1}
EM-FAB ⁺ : m/z= 595[M+H] ⁺ (4 %), 462 [M+H-C ₅ O ₄ H ₉] ⁺ (15 %), 301 [M+H-C ₁₁ O ₉ H ₁₈] ⁺ (40%)	EM-FAB ⁺ : m/z = 491 [M+H] ⁺ (2%), 431 [M+H-CH ₃ CO ₂ H] ⁺ (5%), (1%), 329 [M+H-C ₆ O ₅ H ₁₁] ⁺ (5%)	EM-FAB ⁺ : m/z = 475 [M+H] ⁺ (2%), 415 [M+H-CH ₃ CO ₂ H] ⁺ (1%), 313 [M+H-C ₆ O ₅ H ₁₁] ⁺ (2%).

Cuadro 26. Datos de RMN $^1H^*$ y $^{13}C^{**}$ de los productos de tipo 4-fenilcumarinas **7**, **9**, **12**, **15**, **41**, **43** y **44**.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Posición	7		9		12		15	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	162.9		162.9		163.2		163.0	
3	113.3	5.92 (1H, s)	113.1	5.94 (1H, s)	112.1	5.90 (1H, s)	113.3	5.94 (s)
4	157.3		158.1		158.3		158.2	
4a	105.1		105.3		104.4		105.6	
5	158.0		158.1		157.4		158.1	
6	99.9	6.76 (d, $J = 2.1$)	96.5	6.68 (d, $J = 2.4$)	98.3	6.76 (d, $J = 2.1$)	96.4	6.67 (d, $J = 2.4$)
7	164.9		165.9		163.4		165.1	
8	96.6	6.64 (d, $J = 2.1$)	99.7	6.66 (d, $J = 2.4$)	100.3	6.64 (d, $J = 2.1$)	100.6	6.71 (d, $J = 2.1$)
8a	158.0		157.6		158.1		157.1	
1'	132.7		132.6		132.9		132.8	
2'	115.8	6.85 (d, $J = 2.9$)	116.9	6.83 (d, $J = 2.4$)	115.7	6.82 (d, $J = 2.9$)	116.8	6.80 (d, $J = 2.1$)
3'	145.4		145.4		145.4		145.6	
4'	147.2		147.0		147.0		147.1	
5'	117.1	6.82 (d, $J = 8.1$)	115.6	6.82 (d, $J = 7.5$)	112.1	6.81 (d, $J = 7.8$)	115.8	6.81 (d, $J = 8.1$)
6'	120.7	6.71 (dd, $J = 2.1, 8.1$)	120.1	6.72 (dd, $J = 2.4, 7.5$)	115.7	6.81 (dd, $J = 2.1, 8.1$)	120.5	6.72 (dd, $J = 2.4, 7.5$)
1''	102.3	4.75 (d, $J = 7.8$)	101.2	4.83 (d, $J = 7.8$)	100.2	4.90 (d, $J = 7.8$)	101.4	4.81 (d, $J = 7.5$)
2''	72.0	3.14 (dd, $J = 9.6, 9.6$)	74.5	2.99 (dd, $J = 9, 9$)	74.5	2.72 (dd, $J = 7.8, 9$)	74.6	2.73 (dd, $J = 7.7, 7.7$)
3''	74.6	3.43 (dd, $J = 9.7, 3.6$)	78.2	2.49 (m)	77.6	3.29 (m)	77.8	3.24 (dd, $J = 6.9, 6.9$)
4''	70.1	3.79 (m)	70.1	2.55 (dd, $J = 9, 9$)	70.8	3.3 (m)	71.3	3.19 (dd, $J = 7.2, 7.2$)
5''	77.3	3.64 (m)	77.7	3.13 (m)	78.2	3.69 (dd, $J = 2.2, 11.7$)	77.3	3.6 (m)
6''	62.4	3.71 (2H, m)	62.5	3.64 (2H, m)	62.3	3.85 (2H, m)	70.4	4.03 (da, $J = 11.5$, H-6a'')
								3.79 (da, $J = 11.5$, H-6b'')
1'''							105.6	4.26 (d, $J = 7.2$)
2'''							70.5	3.21 (m)
3'''							77.7	3.26 (m)
4'''							71.2	3.48 (m)
5'''							66.9	3.08 (m, H-5a''')
								3.79 (m, H-5b''')
CH ₃ O- CO ₂ CH ₃ - CO ₂ CH ₃ -	56.5	3.87 (3H, s)	56.5	3.85 (3H, s)			56.7	3.85 (3H, s)

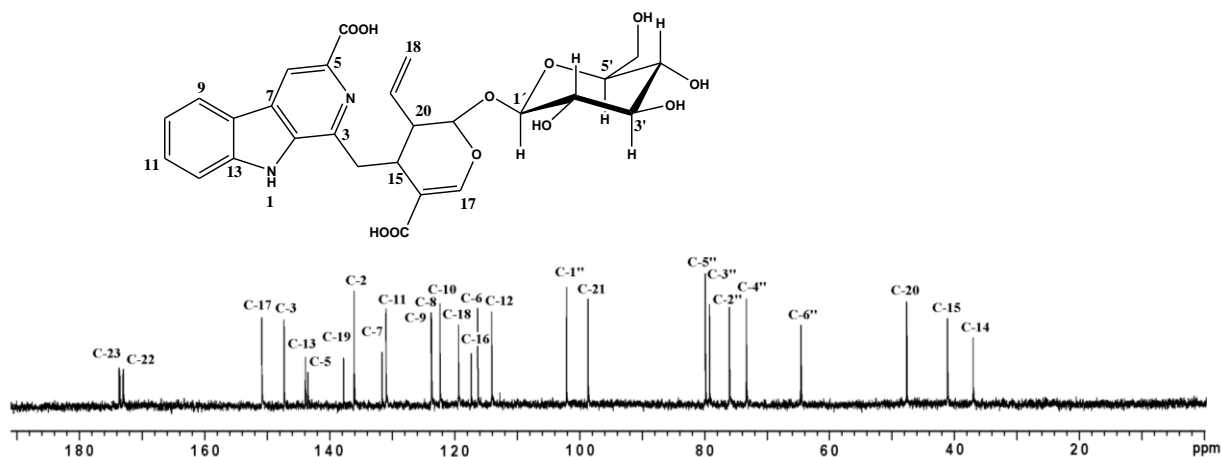
CD₃OD, * 300 MHz, J en Hz, δ en ppm; ** 75.5 MHz, δ en ppm

Cuadro 26. Datos de RMN $^1\text{H}^*$ y $^{13}\text{C}^{**}$ de los productos de tipo 4-fenilcumarinas **7**, **9**, **12**, **15**, **41**, **43** y **44** (continuación).

Posición	41		43		44	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	163.0		163.2		163.2	
3	113.2	5.94 (s)	112.5	5.87 (s)	112.5	5.87 (s)
4	158.0		158.0		158.3	
4a	105.6		104.2		104.3	
5	158.1		158.2		159.0	
6	96.3	6.68 (d, $J = 2.4$)	98.2	6.52 (d, $J = 2.4$)	98.2	6.52 (d, $J = 2.2$)
7	164.9		163.3		163.3	
8	100.5	6.65 (d, $J = 2.4$)	100.8	6.47 (d, $J = 2.4$)	100.8	6.48 (d, $J = 2.2$)
8a	157.1		157.4		158.0	
1'	133.0		132.9		132.4	
2'	116.8	6.83 (d, $J = 2.4$)	117.0	6.85 (d, $J = 2.1$)	130.4	6.85 (d, $J = 8.4$)
3'	145.5		145.3		115.5	7.24 (d, $J = 8.8$)
4'	147.0		147.1		157.4	
5'	115.7	6.83 (d, $J = 7.5$)	115.8	6.83 (d, $J = 7.8$)	115.5	6.85 (d, $J = 8.4$)
6'	120.5	6.72 (dd, $J = 2.4, 7.5$)	120.8	6.73 (dd, $J = 2.1, 8.1$)	130.4	7.24 (d, $J = 8.8$)
1''	101.4	4.79 (d, $J = 7.8$)	101.8	4.69 (d, $J = 7.8$)	101.9	4.67 (d, $J = 7.8$)
2''	74.5	2.73 (dd, $J = 7.8, 7.8$)	71.8	3.13 (dd, $J = 7.8, 7.8$)	71.8	3.08 (dd, $J = 7.8, 7.8$)
3''	78.0	3.3 (dd, $J = 7.8, 7.8$)	74.4	3.44 (dd, $J = 3.3, 9.6$)	74.4	3.42 (dd, $J = 3.4, 9.8$)
4''	71.3	3.2 (dd, $J = 7.8, 7.8$)	69.9	3.78 (da, $J = 3.3$)	69.8	3.78 (da, $J = 2.4$)
5''	77.6	3.6 (m)	74.3	3.84 (m)	74.4	3.83 (m)
6''	68.7	3.95 (da, $J = 10.9$, H-6a'')	64.5	4.36 (dd, $J = 8.2, 11.4$, H-6a'')	64.5	4.36 (dd, $J = 8.4, 11.6$, H-6a'')
		3.74 (da, $J = 10.9$, H-6b'')		4.15 (dd, $J = 4.2, 11.4$, H-6b'')		4.16 (dd, $J = 4.0, 11.6$, H-6a'')
1'''	111.0	4.92 (d, $J = 2.4$)				
2'''	77.1	3.86 (d, $J = 2.4$)				
3'''	80.5					
4'''	75.0	3.55 (2H, m)				
5'''	65.7	3.55 (2H, m)				
CH₃O-	56.5	3.85 (3H, s)				
CO₂CH₃-			20.7	2.06 (3H, s)	20.7	2.07 (3H, s)
CO₂CH₃-			172.7		172.7	

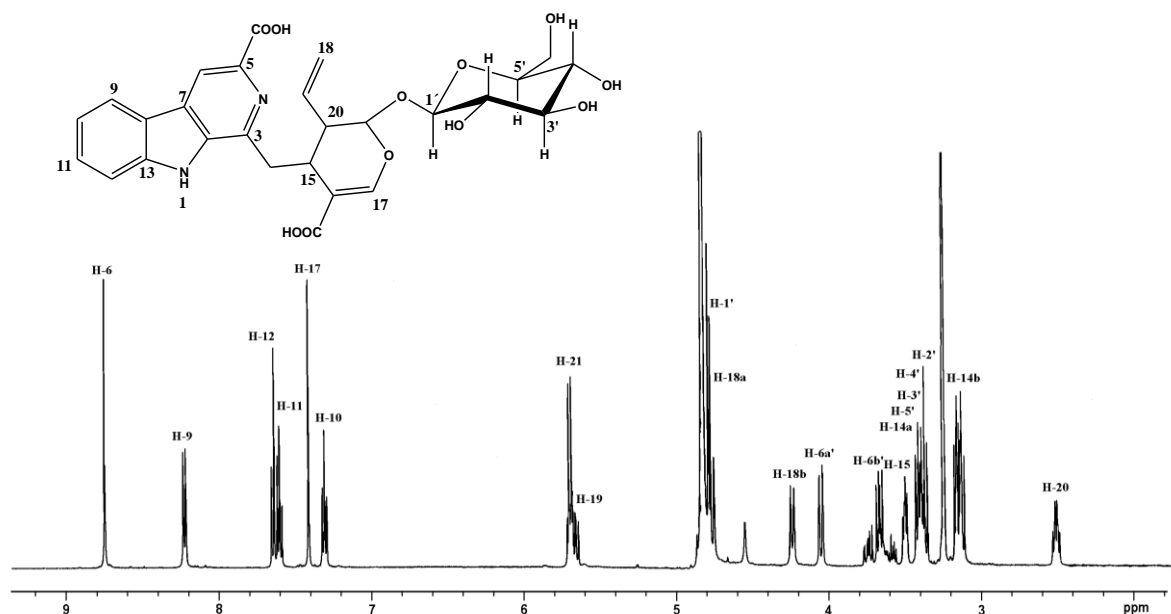
CD₃OD, * 300 MHz, J en Hz, δ en ppm; ** 75.5 MHz, δ en ppm

En los espectros de RMN (**Cuadro 27, Espectros 14 y 15**) del alcaloide **42** se observaron señales asignables a un núcleo de tipo β -carbolina, un residuo de secologanina, dos carbonilos de ácido carboxílico y a una unidad de glucosa. La asignación de estas unidades estructurales se realizó con la ayuda de los espectros DEPT y bidimensionales (COSY, HETCOR y HMBC) (Kerber *et al.*, 2001; Charan *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2003).



Espectro 14. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **42** (CDOD_3 , 75.5 MHz).

El espectro de RMN ^1H del compuesto **42** (**Espectro 15**) presentó en la región donde resuenan los hidrógenos aromáticos las siguientes señales: en δ_{H} 8.75 (señal que correlacionó en el espectro HETCOR con δ_{C} 115.4) un singlete asignable al hidrógeno H-6 del núcleo de la β -carbolina. En δ_{H} 8.23 (H-9, da, $J = 8.0$), 7.32 (H-10, ddd, $J = 1.0, 8.0, 8.0$), 7.61 (H-11, ddd, $J = 1.0, 8.0, 8.0$) y 7.65 (H-12, ddd, $J = 1.0, 1.0, 8.0$), se registraron las señales correspondientes al anillo carbocíclico de la β -carbolina; la asignación de estas señales se corroboró a través de los cuadros de conectividad observados en el espectro de correlación homonuclear COSY. Por último en δ_{H} 7.42 (señal que correlacionó en el espectro HETCOR con δ_{C} 150.4) se observó un singlete atribuible a H-17 del residuo de secologanina. Cabe destacar, que los singletes atribuidos a H-6 y H-17 no presentaron ninguna correlación en el espectro COSY (**Espectros 16 y 17**).

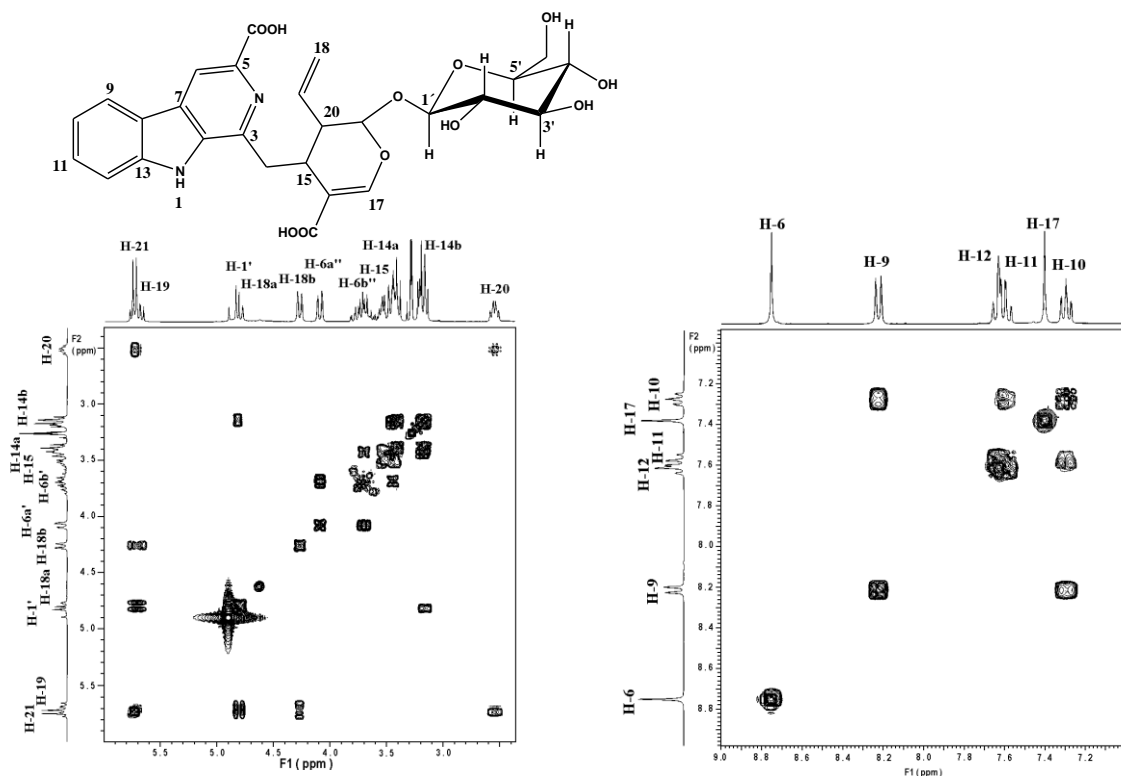


Espectro 15. Espectro de RMN ^1H del compuesto **42** (CDOD_3 , 300 MHz).

En la región donde absorben los hidrógenos vinílicos se observó un sistema AMX en δ_{H} 4.28 (1H, da, $J = 10.5$), 4.81 (1H, da, $J = 18.5$) y 5.70 (1H, ddd, $J = 18.5$, 10.5, 8.0), asignables a H-18a, H-18b y H-19, respectivamente, de la porción secologanina. Los cuadros de conectividad observados en el espectro COSY para H-18 y H-19 permitieron identificar a H-20 [δ_{H} 2.58 (1H, ddd, $J = 8.5$, 8.5, 5.5)] y H-21 [δ_{H} 5.72 (1H, d, $J = 8.5$, H-21)]. Las restantes señales observadas en el espectro de RMN ^1H [4.82 (1H, d, $J = 7.5$, H-1'), 3.18 (1H, dd, $J = 8.0$, 9.0, H-2'), 3.42 (1H, dd, $J = 9.0$, 9.0, H-3'), 3.21 (1H, dd, $J = 10.0$, 9.0, H-4'), 3.45 (1H, m, H-5'), 4.09 (1H, dd, $J = 12.0$, 2.0, H-6'a) y 3.72 (1H, dd, $J = 12.0$, 7.5, H-6'b)] correlacionan en el espectro HETCOR con las señales δ_{C} 101.1 (C-1'), 74.7 (C-2'), 78.0 (C-3'), 72.0 (C-4'), 78.6 (C-5') y 63.3 (C-6') y son asignables a una unidad de glucosa.

Las correlaciones a larga distancia observadas en el espectro de correlación heteronuclear HMBC (**Espectro 18**) H-6 (δ_{H} 8.75)/ δ_{C} 172.7 y H-17 (δ_{H} 7.42)/ δ_{C} 173.3; permitieron establecer que una de las funciones carboxílicas (δ_{C} 172.7, C-22) se encuentran unida en las posición C-5 del núcleo de la β -carbolina y la otra (δ_{C} 173.3, C-23) en la posición C-16 del residuo de secologanina. Por otro lado, las correlaciones de H-14 [δ_{H} 3.46 (14-a) y 3.20 (14-b)]/ C-3 (δ_{C} 146.8) permitieron confirmar que la unidad de secologanina se une al núcleo de β -carbolina a través de los carbonos en las posiciones C-3 y C-14. Finalmente las correlaciones H-21/C-1', H-1'/C-21 permitieron establecer que la glucosa se encuentra unida al residuo de secologanina mediante un

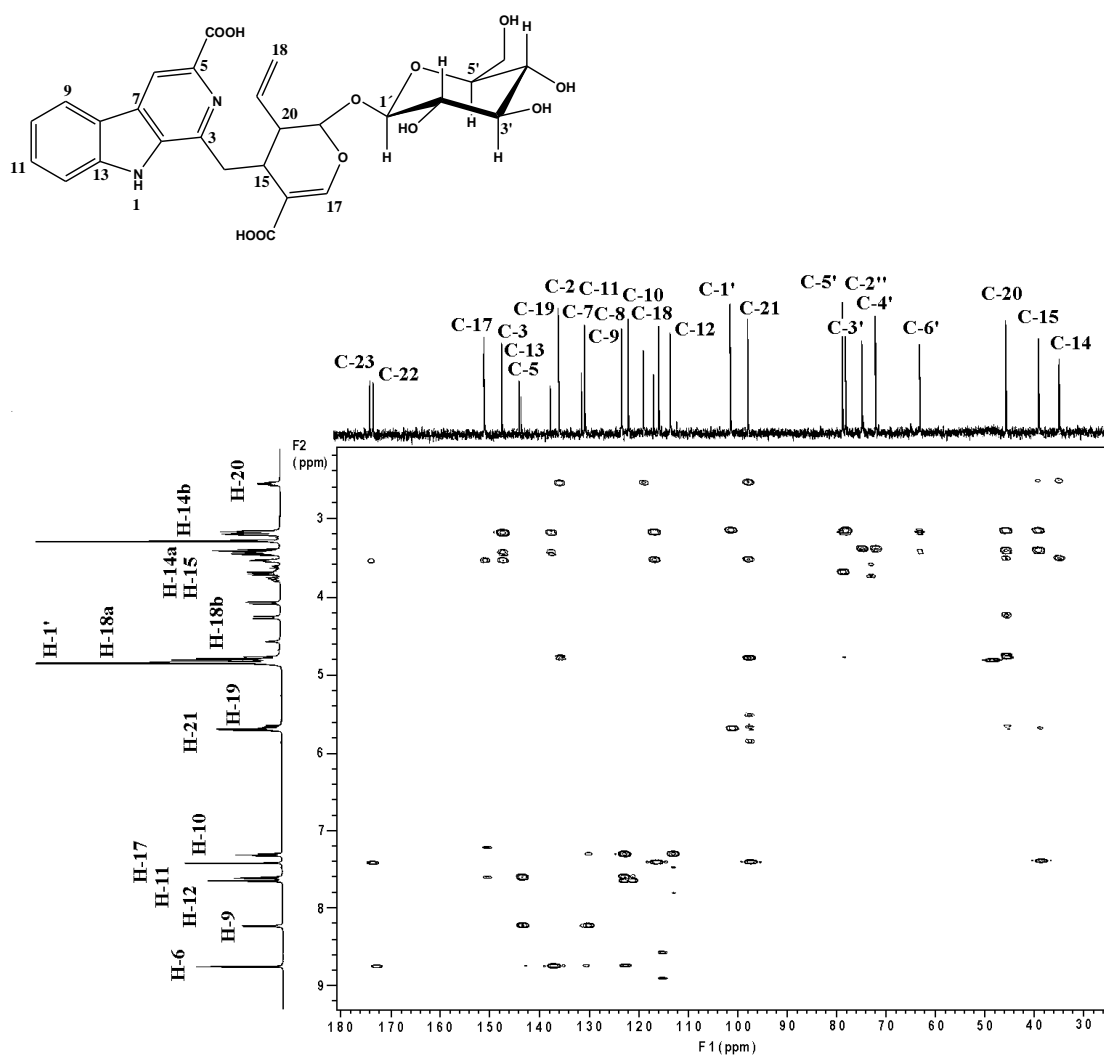
enlace de tipo *O*-glicosídico entre C-21 y C-1'; los valores de las constantes de acoplamiento en ambos casos (H-21 y H-1'), permiten inferir la orientación ecuatorial de los hidroxilos que participan en el enlace glicosídico.



Espectros 16 y 17. Vista parcial de los espectros COSY del compuesto **42** (CDOD₃, 300 MHz).

Con base en estas evidencias el producto natural **42** se identificó como el ácido desoxicordifolínico. El aislamiento del ácido desoxicordifolínico a partir de la corteza de *H. standleyana* y de *H. latiflora*, representa el segundo reporte de la presencia de este metabolito en la naturaleza (Adeoye *et al.*, 1983) y el primero que describe alcaloides en las especies del género *Hintonia*.

La presencia de alcaloides de tipo indol-monoterpenoide en *H. standleyana* y *H. latiflora* pudiera estar correlacionada con las propiedades antimaláricas reportadas para estas especies en las practicas medicas populares y que habían sido asociadas a la presencia de alcaloides de tipo quinina (Martínez, 1989). Esta suposición tiene origen en el hecho de que muchos alcaloides de tipo β -carbolina se les han demostrado propiedades anti-*Plasmodium falciparum* (Schwickard y van Heerden, 2002).

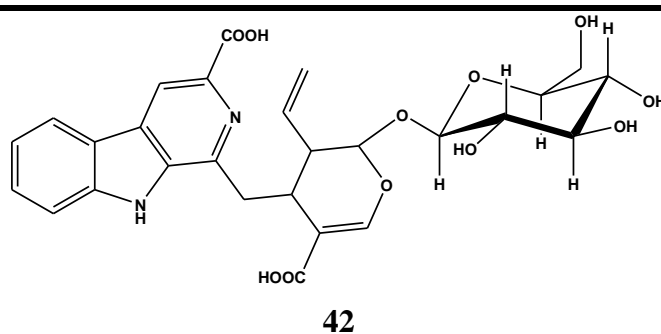


Espectro 18. Espectro HMBC del compuesto **42** (CDOD₃, 300 y 75.5 MHz).

6.4 Propiedades biológicas de los productos aislados de *H. standleyana* y *H. latiflora*.

6.4.1 Evaluación de la actividad antidiabética de los principales constituyentes.

Una vez identificados los principales constituyentes de los extractos íntegros de las drogas crudas de *H. standleyana* (ECHS) y *H. latiflora* (ECHL) y con el objetivo de establecer los principios activos responsables de las propiedades hipoglicemiantes y antihiperlipidémicas mostradas por ambos extractos (incisos 6.2.2, 6.2.3 y 6.2.5); se decidió realizar las evaluaciones biológicas tanto *in vivo* como *in vitro* de algunos de estos metabolitos con la finalidad sus efectos antidiabéticos y establecer de manera preliminar su mecanismo de acción.

Cuadro 27. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto **42**.

$C_{27}H_{28}N_2O_{11}$

PM: 556 uma

$[\alpha]_D$: +39.0° (*c* 0.02, MeOH)

UV λ_{max} (metanol) 236, 262 and 268 nm

p.f. = >250°C

IR (KBr) ν_{max} = 3412, 1690, 1624, 1593, 1560, 1389, 1324, 1250, 1080 cm^{-1}

EM-FAB⁺ alta resolución: m/z = 557.5271 [M + H]⁺ (calculado para $C_{27}H_{29}N_2O_{11}$: 557.518);
EM-FAB⁺: m/z = 579 [M+Na]⁺ (5%), 557 [M+H]⁺ (3%), 513 [M+H-CO₂]⁺ (3%), 468 [M-2CO₂]⁺ (6%), 415 [M-180 + K]⁺ (12%), 399 [M-180+Na]⁺ (8%)

RMN-[¹H] (CDOD₃, 500 MHz) δ_H = 8.75 (1H, s, H-6), 8.23 (1H, da, *J* = 8.0, H-9), 7.32 (1H, ddd, *J* = 8.0, 8.0, 1.0, H-10), 7.61 (1H, ddd, *J* = 8.0, 8.0, 1.0, H-11), 7.65 (1H, ddd, *J* = 8.0, 1.0, 1.0, H-12), 3.46 (1H, dd, *J* = 14.5, H-14a), 3.20 (1H, da, *J* = 14.5, H-14b), 3.56 (1H, dd, *J* = 8.5, 6.0, H-15), 7.42 (1H, s, H-17), 4.81 (1H, da, *J* = 18.5, H-18a), 4.28 (1H, da, *J* = 10.5, H-18b), 5.70 (1H, ddd, *J* = 18.5, 10.5, 8.0, H-19), 2.58 (1H, ddd, *J* = 8.5, 8.5, 5.5, H-20), 5.72 (1H, d, *J* = 8.5, H-21), 4.82 (1H, d, *J* = 7.5, H-1'), 3.18 (1H, dd, *J* = 8.0, 9.0, H-2'), 3.42 (1H, dd, *J* = 9.0, 9.0, H-3'), 3.21 (1H, dd, *J* = 10.0, 9.0, H-4'), 3.45 (1H, m, H-5'), 4.09 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.0, H-6'a) y 3.72 (1H, dd, *J* = 12.0, 7.5, H-6'b).

RMN-[¹³C] (CDOD₃, 125 MHz); δ_C = 137.1 (C-2), 146.8 (C-3), 142.9 (C-5), 115.4 (C-6), 130.9 (C-7), 122.9 (C-8), 123.0 (C-9), 121.6 (C-10), 130.2 (C-11), 113.1 (C-12), 143.3 (C-13), 35.5 (C-14), 39.6 (C-15), 116.5 (C-16), 150.4 (C-17), 118.6 (C-18), 135.4 (C-19), 46.2 (C-20), 97.6 (C-21), 172.7 (C-22), 173.3 (C-23), 101.1 (C-1'), 74.7 (C-2'), 78.0 (C-3'), 72.0 (C-4'), 78.6 (C-5') y 63.3 (C-6').

Para la determinación del posible mecanismo de acción antihiper glucémico al final del estudio sub-agudo en ratas diabéticas, se realizó la determinación de dos parámetros bioquímicos afectados durante la diabetes mellitus: los niveles de insulina plasmática y el contenido de glucógeno hepático. Además, durante una estancia de investigación realizada en la Universidad de Ottawa y en la Universidad de Montreal en Canadá, fue posible establecer el potencial insulinomimético y el efecto sobre la activación de la cinasa activada por AMP (AMP-K), tanto de los extractos íntegros de *Hintonia standleyana* y *H. latiflora* como de los constituyentes **28**, **41**, **42**, **7** y **12**.

En las siguientes secciones se discutirá con detalle los resultados obtenidos de estas evaluaciones.

6.4.1.1 Efecto agudo hipoglicemiante de los productos 28 y 41 aislados de la corteza de H. standleyana.

Para evaluar el efecto hipoglicemiante de los productos **28** y **41**, principales constituyentes presentes en la corteza de *H. standleyana* se utilizó nuevamente el ensayo agudo en ratas normoglicémicas. Como se puede observar en la **Figura 19** los animales tratados con los compuestos **28** (10 mg/Kg) y **41** (10 mg/Kg) no provocaron una reducción significativa en los niveles de glucosa sanguínea durante todo el periodo de evaluación. De tal manera, que no fue posible comprobar las propiedades antidiabéticas de estos productos en un experimento de tipo agudo. Sin embargo, la glibenclamida utilizada como control positivo redujo significativamente la glicemia a partir de las 1.5 horas posteriores a la administración de las muestras ($p < 0.05$). Este efecto persiste hasta las 7 horas de evaluación y enseguida (9 horas) se observa un incremento en el valor de glicemia.

6.4.1.2 Efecto sub-agudo antihiper glucémico de los compuestos puros (9, 7, 12, 28, 41 y 42) aislados de H. standleyana y H. latiflora.

Como los productos **28** y **41** no presentaron efectos significativos sobre los niveles de glucosa sanguínea en animales normoglicémicos en un experimento de tipo agudo; se decidió evaluarlos en un estudio a largo plazo durante 30 días para evaluar su efecto antihiper glucémico en ratas diabéticas. En este estudio también se evaluó el

efecto de los compuestos **9**, **7**, **12**, y **42** aislados de *H. standleyana* y *H. latiflora*. Los resultados se presentan en la **Figura 20**.

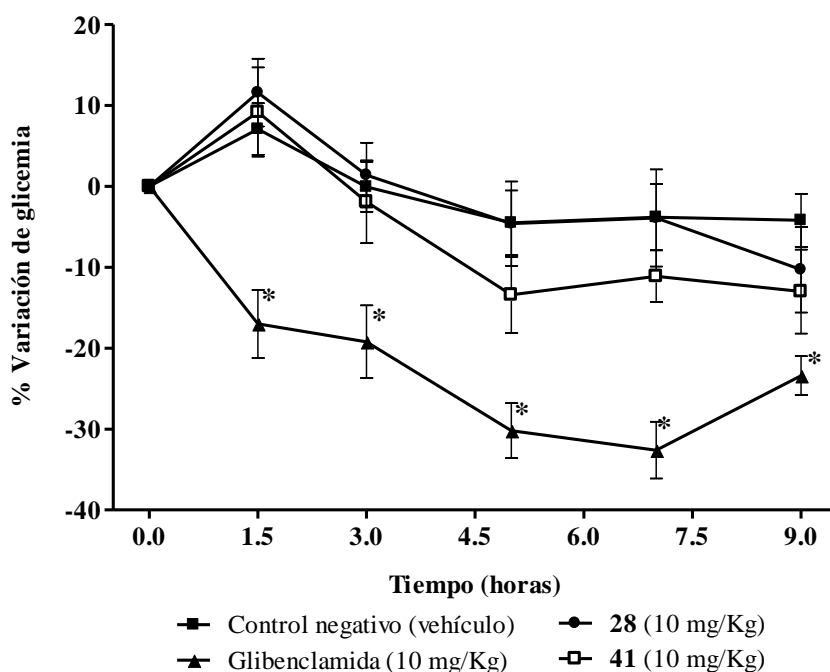


Figura 19. Efecto agudo de los productos **28** y **41** sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales. Cada valor es el promedio \pm el error estándar, $n = 6$ ratas. * $p < 0.05$ ANADEVVA y t-Dunnnett con respecto al control negativo al mismo tiempo.

Los productos **7**, **9**, **12**, **28** y **41** poseen efecto antihiperглиcémico significativo a partir de los diez días (**Figura 20**) de iniciado el estudio ($p < 0.05$). Al término, del periodo de evaluación (30 días), sólo el compuesto **12** restablece la glicemia de los animales a valores normales (~ 90 mg/dL). Sin embargo, los compuestos **28** y **41**, redujeron significativamente la hiperглиcemia ya que al cabo de los experimento los valores de glucosa sanguínea eran cercanos a los niveles normales (150 y 120 mg/dL, respectivamente). Estos productos también disminuyeron de manera importante la pérdida de peso corporal (**Cuadro 28**).

Los productos **7** y **9** ocasionaron un efecto antihiperглиcémico significativo, no obstante, los valores de glicemia de los animales tratados con estos productos no alcanzaron los niveles normales. Por último el alcaloide **42** no mostró efecto antihiperглиcémico significativo.

Cuadro 28. Efecto sub-agudo de los compuestos puros **9, 7, 12, 28, 41** y **42** sobre los valores de peso corporal en ratas diabéticas.

Tratamientos	Dosis <i>per os</i> (mg/Kg)	Peso corporal (g)			
		Día 1	Día 7	Día 15	Día 30
Control normal	---	213.4±3.9*	249.9±3.0*	274.6±4.2*	288.2±5.5*
Control diabético	---	169.8±5.2	216.2±5.2	194.8±6.0	204.2±9.2
Glibenclamida	30	178.3±7.8	210.2±4.1	212.8±4.9	216.3±8.9
28	30	173.6±15.3	216.8±9.1	228.2±12.4*	253.0±16.4*
9	30	169.7±4.8	213.3±6.6	219.2±8.1	230.3±10.0*
7	30	169.6±11.6	205.9±8.9	211.3±12.0	221.3±14.6
12	30	190.3±6.6	218.8±8.7	225.2±12.0*	241.3±12.3*
41	30	181.7±10.3	213.2±11.1	225.3±15.0*	245.7±15.2*
42	30	170.3±6.6	188.8±7.8	205.2±11.0	201.3±13.2

Cada valor es el promedio ± el error estándar, n = 6 ratas. *p< 0.05 ANADEVIA y t-Dunnett con respecto al control diabético al mismo tiempo.

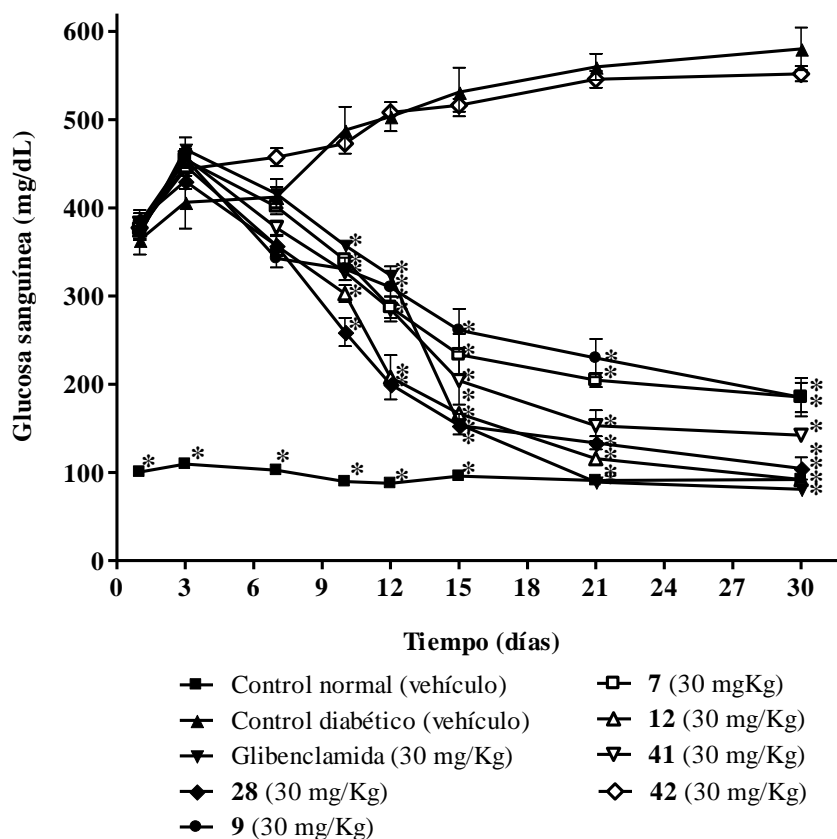


Figura 20. Efecto sub-agudo de los compuestos puros **9**, **7**, **12**, **28**, **41** y **42** sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas diabéticas. Cada valor es el promedio \pm el error estándar, $n = 6$ ratas. $*p < 0.05$ ANADEVIA y t-Dunnnett con respecto al control diabético al mismo tiempo.

6.4.1.3 Efecto de los extractos íntegros de las cortezas de *H. standleyana* (**EC**HS), *H. latiflora* (**EC**HL), *Exostema caribaeum* (**EC**EC), de una muestra comercial de copalchi (**EC**MC) y compuestos puros (**9**, **7**, **12**, **28** y **41**) aislados de *H. standleyana* y *H. latiflora* sobre los niveles de insulina plasmática y sobre el contenido de glucógeno hepático.

Con el propósito de obtener información preliminar del posible mecanismo de acción antidiabética de los extractos activos y compuestos puros evaluados en el estudio sub-agudo antihiper glucémico, los animales de los distintos grupos de tratamiento fueron sacrificados por decapitación y enseguida se colectaron muestras de sangre total para obtener el plasma y determinar las concentraciones de insulina plasmática (ng/mL) utilizando un método inmunoenzimático (Grassi y Pradelles, 1991).

Básicamente el método utilizado para la estimación de los niveles de insulina en plasma consiste en la reacción de tipo inmunológica competitiva entre la insulina de rata

no marcada (insulina libre) que se encuentra presente en las muestras y/o en los estándares, y la insulina de rata unida a la enzima acetilcolinesterasa (AChE); esta última permite monitorear la cantidad de insulina libre presentes en las muestras de prueba. El complejo anti-insulina de rata (obtenida en cobayos) y la insulina de rata libre o marcada con AChE se unen al anticuerpo anti-cobayo (IgG) fijados en los pozos de la microplaca. Después de un período de incubación, la microplaca se lava para eliminar el exceso de los reactivos y enseguida, se incorpora el reactivo de Ellman a los pozos, este reactivo es tanto el sustrato enzimático para la AChE, como el agente cromógeno. La insulina de rata marcada con AChE reacciona con el reactivo de Ellman para formar un compuesto amarillo. La intensidad del color se determina espectrofotométricamente y es proporcional a la cantidad de insulina trazadora que reaccionó con el reactivo de Ellman, e inversamente proporcional a la cantidad de insulina libre presente durante la incubación. El principio de este ensayo se resume en la **Figura 21**.

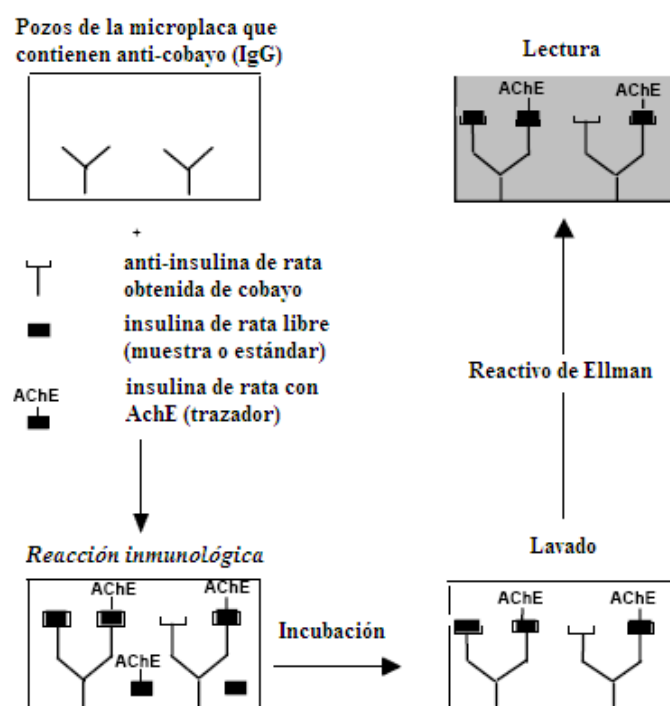


Figura 21. Ensayo inmunoenzimático para la cuantificación espectrofotométrica de insulina de rata.

A los animales del experimento sub-agudo también se les extirpó el hígado a fin de obtener muestras de tejido hepático y determinar el efecto de las distintas sustancias de prueba sobre el contenido de glucógeno hepático (mg/g tejido). La síntesis de glucógeno (glucogénesis) y la degradación del mismo (glucogenólisis) son dos de las principales vías metabólicas que participan en la homeostasis de la glucosa y que por lo tanto se encuentran también alteradas durante la diabetes (Murat y Serfaty, 1974; Ross *et al.*, 2004).

En condiciones normales, el contenido de glucógeno hepático se encuentra regulado por las concentraciones de glucosa sanguínea, insulina y glucagón. De tal manera, que cuando los niveles de glucosa sanguínea se incrementan (hiperglicemia postprandial), la insulina es liberada y la glucosa es catabolizada a través de la glucólisis, o almacenada en el hígado bajo la forma de glucógeno con el consiguiente restablecimiento de la glicemia. En el estado diabético este proceso no ocurre de manera normal, ya que las células no pueden captar la glucosa extracelular; y por lo tanto, se presenta un incremento de la glucogenólisis y gluconeogénesis, agravándose aun más la hiperglicemia (Kecskemeti *et al.*, 2002; Doyle y Egan, 2003; Ross *et al.*, 2004).

Como se puede observar en la **Figura 22-A**, al término de los 30 días de tratamiento con las distintas muestras, los animales del grupo control diabético presentaron los niveles de insulina plasmática muy por debajo (1.2 ng/mL) de los niveles mostrados por el grupo de animales normales (8.1 ng/mL); estos resultados son congruentes con los niveles de glucosa sanguínea en ambos grupos donde la glicemia del control normal permanece en ~100 mg/dL (**Figuras 18 y 20**), mientras que la glicemia del control diabético se incrementa gradualmente con el paso de los días hasta alcanzar niveles superiores a los 500 mg/dL. Además, se puede observar que la dosis utilizada del diabetógeno (STZ, 50 mg/Kg i.p.) provocó la destrucción parcial de las células β del páncreas, y que el modelo de diabetes experimental utilizado corresponde a un modelo de diabetes no insulino-dependiente (Verspohl, 2002; Ross *et al.*, 2004; Subash-Babu y Stanley-Mainzen, 2004; Soumyanath, 2006).

El grupo de animales diabéticos tratados con glibenclamida presentó los niveles de insulina plasmática cercano a los niveles normales (6.4 ng/mL); estos resultados se encuentran en armonía con los valores de glucosa normales observados para el grupo de animales correspondientes al término de los treinta días del experimento. Como se mencionó en la sección de antecedentes, el mecanismo de acción de la glibenclamida involucra la estimulación de la secreción de insulina de las células β del páncreas a

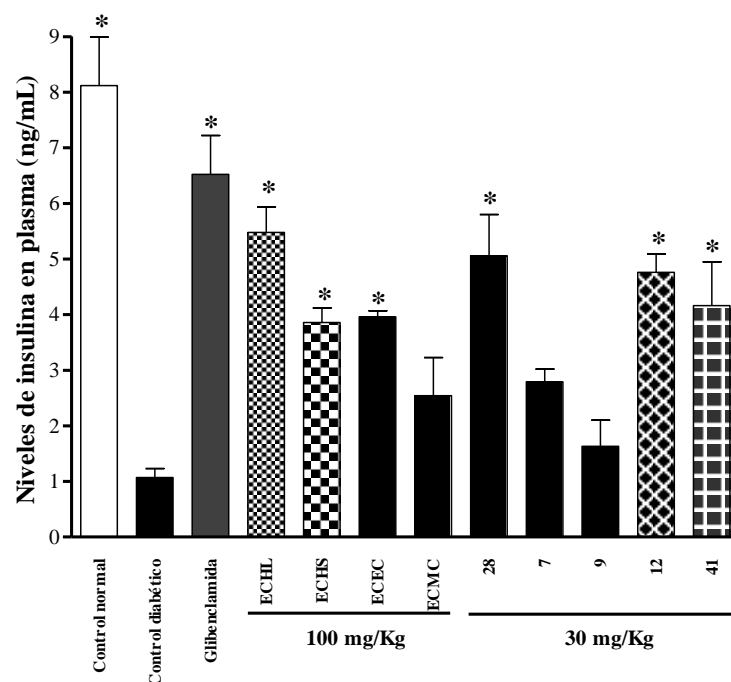
través del bloqueo de canales de K^+ dependientes de ATP; en consecuencia se produce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y la liberación de la insulina vacuolar al medio extracelular tanto en individuos normales, como en individuos con diabetes tipo 2 (Kecskemeti *et al.*, 2002; Doyle y Egan, 2003; Ross *et al.*, 2004; Soumyanath, 2006.).

El efecto de los tratamientos con los diferentes extractos y compuestos puros sobre los niveles de insulina plasmática (**Figura 22-A**) también se encuentra en concordancia con los niveles de glucosa sanguínea (**Figuras 18 y 20**) encontrados al cabo de los experimentos sub-agudos. Los extractos **ECHL**, **ECHS** y **ECEC**, así como los compuestos **28**, **12** y **41** provocaron un incremento significativo de la concentración de insulina plasmática respecto al control diabético ($p < 0.05$). Sin embargo, los niveles de insulina en plasma obtenidos con los tratamientos de **ECHL** (5.3 ng/mL), **ECHS** (3.8 ng/mL) y los productos **28** (4.9 ng/mL), **12** (4.6 ng/mL) y **41** (4.2 ng/mL) son menores a las concentraciones de insulina en plasma del control normal. Aun así, estos tratamientos provocaron un restablecimiento de los niveles de glucosa sanguínea en el experimento antihiper glucémico a largo plazo. Entonces en el efecto antidiabético de estas sustancias es probable que participen otros mecanismos de acción diferentes a la estimulación de la secreción de insulina (Kecskemeti *et al.*, 2002; Verspohl, 2002, Doyle y Egan, 2003; Ross *et al.*, 2004; Soumyanath, 2006.).

En cuanto a los resultados obtenidos sobre el contenido de glucógeno hepático (**Figura 22-B**), se puede observar nuevamente una disminución del glucógeno hepático en el control diabético (28 mg/g de tejido) respecto al control normal (58 mg/g de tejido). El grupo tratado con glibenclamida no mostró un incremento en el contenido de glucógeno hepático (33 mg/g de tejido); este resultado es congruente, ya que la insulina liberada por la acción de la glibenclamida ejerce su principal efecto sobre la captación de glucosa en las células tanto del músculo esquelético como del tejido adiposo, no así en el tejido hepático (Verspohl, 2002, Ross *et al.*, 2004; Soumyanath, 2006.). El grupo tratado con el **ECHL** presentó un incremento significativo del contenido de glucógeno hepático (43 mg/g de tejido) respecto al control diabético ($p < 0.05$). Por lo tanto, el **ECHL** pudo inhibir a la enzima responsable de la degradación del glucógeno, la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) y/o estimular la glucogénesis a través de la activación de la hexocinasa, y/o a la fosfoglucomutasa, y/o a la glucógeno sintasa (Kecskemeti *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2004; Soumyanath, 2006.). Las muestras restantes no presentaron efecto significativo sobre el contenido de glucógeno en las muestras de tejido hepático

analizadas.

A.



B.

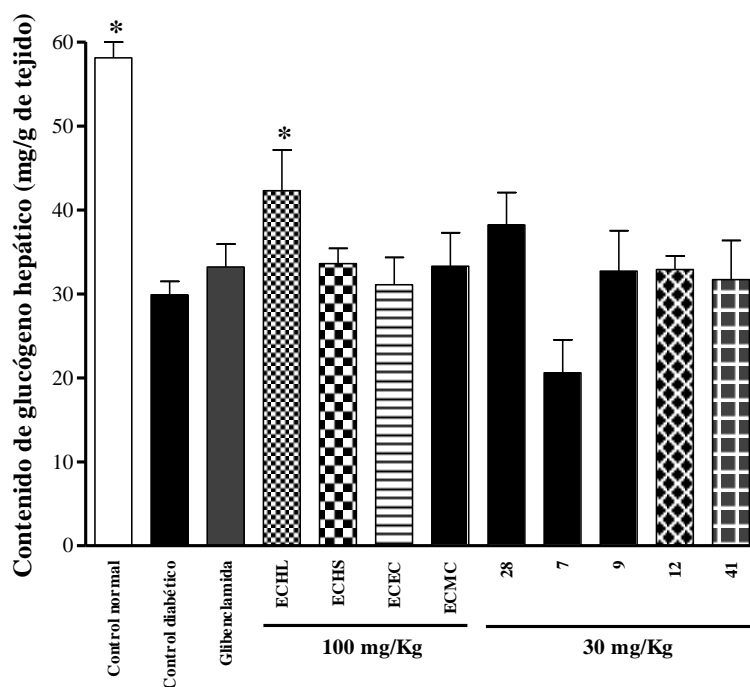


Figura 22. Efecto sub-agudo del ECHS, del ECHL, del ECEC, del ECMC y compuestos puros **9**, **7**, **12**, **28** y **41** sobre los niveles de insulina plasmática (**A**) y sobre el contenido de glucógeno hepático (**B**) en ratas diabéticas. Cada valor es el promedio \pm el error estándar, $n = 6$ ratas. * $p < 0.05$ ANADEVIA y t-Dunnnett con respecto al control diabético al mismo tiempo.

6.4.1.4 Efecto de los extractos íntegros de las cortezas de *H. standleyana* (**ECHS**), *H. latiflora* (**ECHL**), y compuestos puros (**7**, **12**, **28**, **41** y **42**) aislados de *H. standleyana* y *H. latiflora* sobre la captación de ³H-deoxiglucosa en células C2C12.

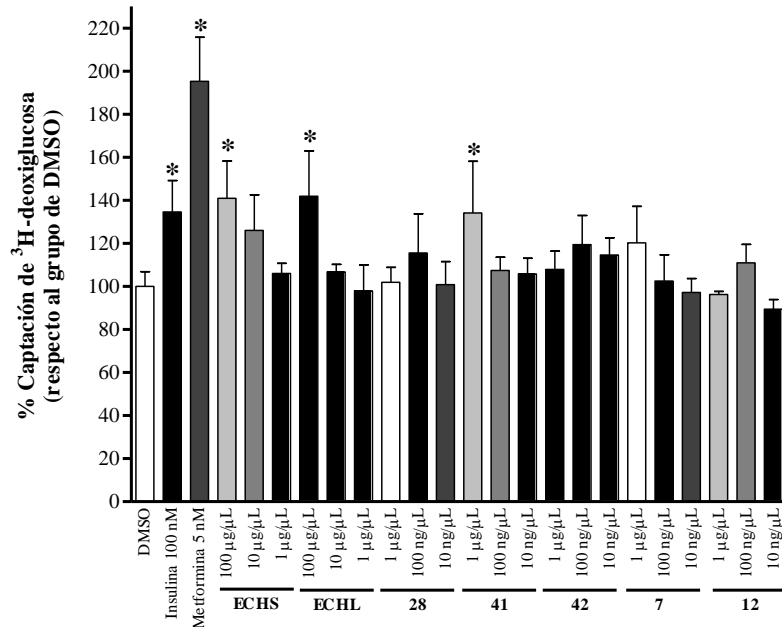
Con el propósito de obtener información adicional respecto al posible mecanismo de acción antihiper glucémico de los extractos y productos activos, los extractos íntegros de las cortezas de *H. standleyana* (**ECHS**), *H. latiflora* (**ECHL**) y compuestos aislados de estas especies (**7**, **12**, **28**, **41** y **42**) fueron evaluados en un ensayo *in vitro* de captación de ³H-deoxiglucosa en una línea comercial de células de músculo esquelético C2C12. Estas células captan la glucosa regulada por insulina ya poseen los transportadores de glucosa de tipo GLUT-1 y GLUT-4 (Klip y Paquet, 1990; Kumar y Dey, 2002; Martineau *et al.*, 2006). De tal manera, que es posible identificar a través de este ensayo sustancias que presenten actividad de tipo insulinomimética (Klip y Paquet, 1990; Kumar y Dey, 2002; Kecskemeti *et al.*, 2002; Doyle y Egan, 2003; Ross *et al.*, 2004; Martineau *et al.*, 2006).

El experimento se realizó en placas de 12 pozos y como controles positivos se utilizaron grupos de células tratadas de manera preliminar con insulina (100 nm) y metformina (5mM) (Klip y Paquet, 1990; Kumar y Dey, 2002; Martineau *et al.*, 2006). Los extractos se evaluaron a las concentraciones de 100, 10 y 1 µg/µL y los compuestos puros a las concentraciones de 1 µg/µL, 100 y 10 ng/µL. Las células se incubaron con los distintos tratamientos durante dos diferentes periodos de tiempo, 1 hora (incubación a corto plazo) y 18-21 horas (incubación a largo plazo). Los grupos controles se incubaron durante 18 h (metformina) y 30 minutos (insulina) (Klip y Paquet, 1990; Kumar y Dey, 2002; Martineau *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en este experimento se presentan en la **Figura 23**. Como se puede observar **ECHS** y **ECHL**, a la concentración de 100 µg/µL, así como el producto **41** (1 µg/µL) estimulan la captación de ³H-deoxiglucosa en ambos periodos de tratamiento [1 hora (**Figura 23-A**) y 18 horas (**Figura 23-B**)] de manera significativa ($p < 0.05$). En el caso de los extractos, el efecto fue dependiente de la concentración y similar en magnitud al mostrado por la insulina y la metformina. De manera adicional, el compuesto **42** (1 µg/µL) presentó un efecto significativo sobre la captación de la ³H-deoxiglucosa en el experimento a largo plazo. Cabe destacar, que este producto no

mostró efecto antihiperlicémico en el experimento realizado en ratas diabéticas (inciso 6.4.2), por lo que se comprueba que ciertas sustancias pueden presentar actividad importante en experimentos *in vitro*, pero resultan inactivos en experimentos *in vivo*, y viceversa (Soumyanath, 2006).

A.



B.

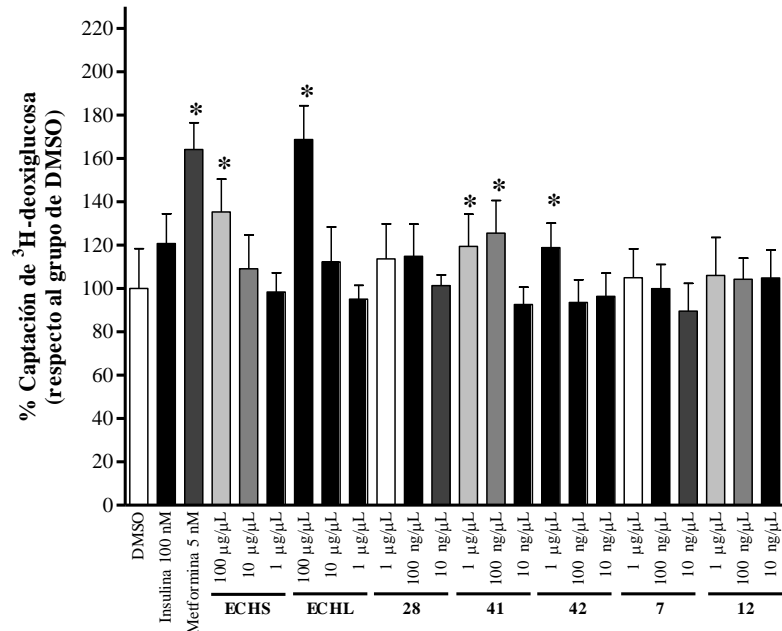


Figura 23. Efecto del ECHS, del ECHL, y compuestos puros 7, 12, 28, 41 y 42 sobre la captación de ³H-deoxiglucosa en células C2C12 de músculo esquelético con 1 (A) y 18 horas (B) de pretratamiento. Cada valor es el promedio ± el error estándar, n = 5 pozos. *p < 0.05 ANADEVa y t-Dunnnett con respecto al control diabético al mismo tiempo.

6.4.1.5 Efecto de los extractos íntegros de las cortezas de *H. standleyana* (**ECHS**), *H. latiflora* (**ECHL**), y compuestos puros (7, 12, 28, 41 y 42) aislados de *H. standleyana* y *H. latiflora* sobre la activación de la proteína-cinasa activada por AMP (AMP-K) utilizando la técnica de Western-blot.

Continuando con la búsqueda de información sobre el posible mecanismo de acción antidiabético de los extractos de *H. standleyana* (**ECHS**), *H. latiflora* (**ECHL**) y compuestos puros aislados de estas especies (7, 12, 28, 41 y 42), se evaluó su efecto sobre la activación de la proteína-cinasa activada por AMP (AMP-K) en células de músculo esquelético C2C12 utilizando la técnica de Western-blot.

La proteína-cinasa activada por AMP (AMP-K) ha llegado a ser un blanco de acción importante para el tratamiento de desordenes de tipo metabólico, incluida la diabetes mellitus, ya que ha sido implicada como un regulador clave de la dinámica energética a nivel fisiológico. Esta proteína tiene efecto sobre el transporte de glucosa, gluconeogénesis, y la lipólisis (Carling, 2004; Huypens *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006; Imai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

Uno de los eventos mas ampliamente estudiados donde la activación de la AMP-K ejerce un papel importante es en la contracción muscular. En este proceso, la AMP-K se activa tras un incremento de la relación AMP:ATP intracelular. La AMP-K es un complejo heterotrimérico comprendido por una sub-unidad catalítica (sub-unidad α) y dos sub-unidades reguladoras (β y γ). Una vez que la AMP-K se activa por una fosforilación del residuo Thr 172 de la sub-unidad α , regula un gran numero de factores transcripcionales y proteínas que participan en la transducción de señales [i.e. Acetil-CoA carboxilasa (ACC), factor nuclear hepático α (HNF α) y la proteína-cinasa activada por el mitógeno p38 (MAPK)] que tienen como consecuencia el restablecimiento de los niveles de ATP intracelular (Carling, 2004; Huypens *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006; Imai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

Entre las sustancias que activan la AMP-K se encuentran el ribósido del 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR) y la metformina. El AICAR se convierte en un análogo del AMP dentro de las células, por lo tanto es un activador de la AMP-K. La metformina ampliamente utilizada para disminuir los niveles de glucosa en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, también activa a la AMP-K, sin embargo el mecanismo

mediante el cual ejerce su efecto no ha sido establecido (Carling, 2004; Huypens *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006; Imai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

En la **Figura 24**, se representan algunas de las vías donde se sabe que la activación de la AMP-K participa en el control de la demanda energética corporal.

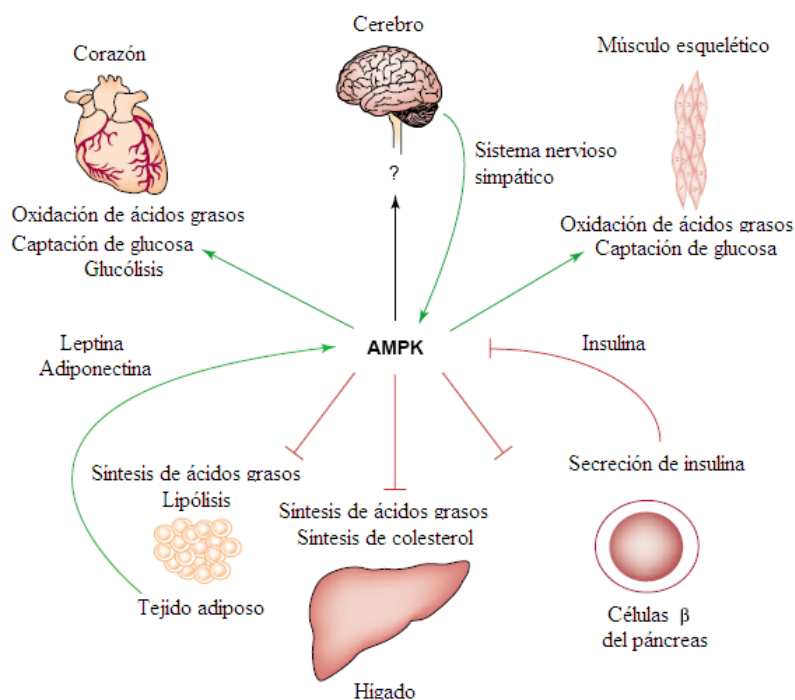


Figura 24. Vías donde participa la activación de la AMP-K; las flechas indican las rutas metabólicas donde la activación de la AMP-K estimula la generación de energía, mientras que las líneas representan las rutas metabólicas consumidoras de energía que son inhibidas por la activación de la AMP-K (Carling, 2004).

El efecto del **ECHL** y **ECHS**, así como también de los productos puros **7**, **12**, **28**, **41** y **42** sobre la activación de la AMP-K de células C2C12 se presenta en la **Figura 25**. Los extractos de *H. standleyana* y *H. latiflora* poseen un efecto moderado sobre la activación de la AMP-K a las concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente (**Figura 25-A**). Sin embargo, los compuestos puros **41** y **12** activan a la AMP-K; el efecto no fue dependiente de la concentración (**Figura 25-B**).

De tal forma que otro mecanismo mediante el cual los compuestos de tipo 4-fenilcumarina pueden ejercer su efecto antidiabético podría involucrar la activación de la cinasa AMP-K. Cabe destacar que el compuesto **42** también activa a la AMP-K, sin embargo, este producto no presentó actividad en el ensayo antihiper glucémico a largo plazo *in vivo* (inciso 6.1.4.2).

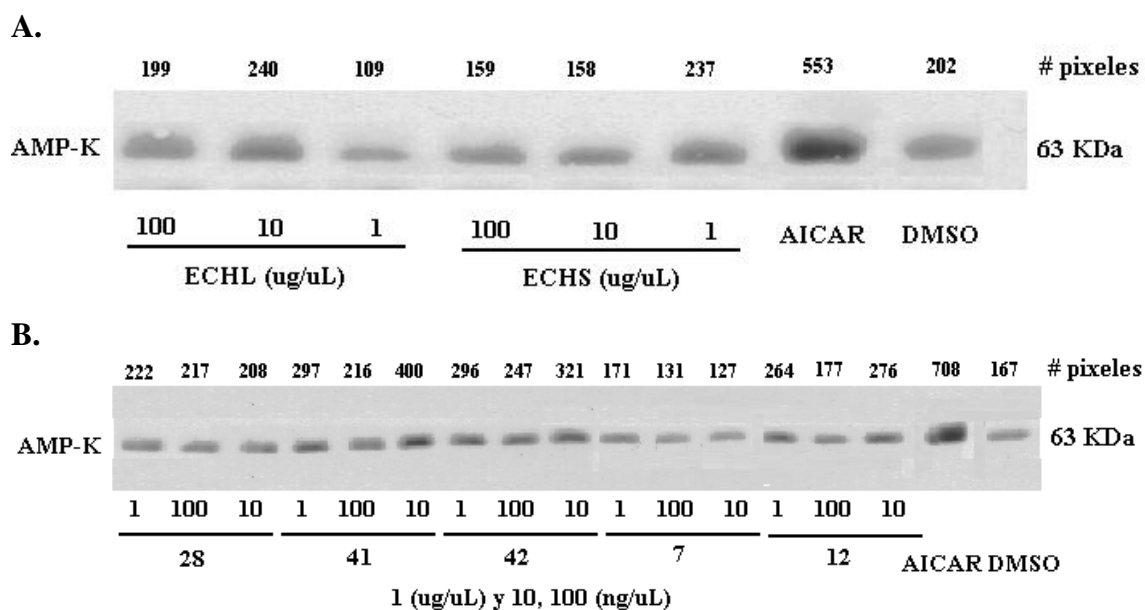


Figura 25. Efecto del ECHS, del EHL (A) y de los compuestos 28, 41, 42, 7 y 12 (B) sobre la activación de la AMP-K de células C2C12.

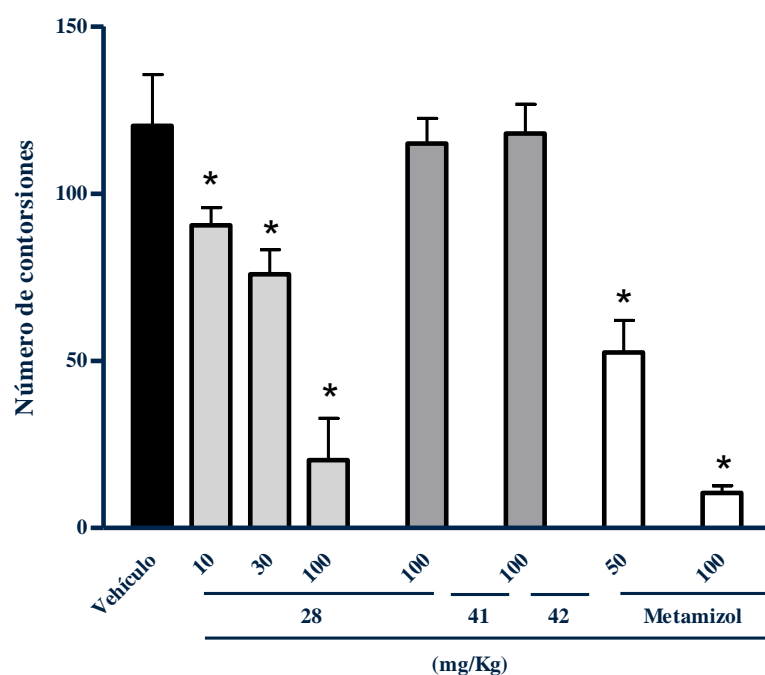
6.4.2 Evaluación del efecto antinociceptivo de los compuestos 28, 41 y 42 de *H. standleyana* en ratones utilizando los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal.

Para la determinación del efecto antinociceptivo de los metabolitos 28, 41 y 42 aislados de *H. standleyana* nuevamente se utilizaron los modelos de estiramiento abdominal y el de la placa caliente en ratones. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 26**.

Como se puede observar en la **Figura 26**, el compuesto 28 redujo significativamente el número de estiramientos en el modelo de dolor inflamatorio e incremento la latencia en el modelo térmico de nocicepción (**Figuras 26-A y 26-B**). Ambos efectos fueron también dependientes de la dosis. Cabe destacar, que el efecto del compuesto 28 (100 mg/Kg) fue similar al efecto del metamizol (100 mg/Kg) en el ensayo de estiramientos abdominales, pero fue menor a la acción antinociceptiva de la morfina (5 mg/Kg) en el modelo de la placa caliente.

Los compuestos 41 y 42, no presentaron actividad analgésica significativa cuando fueron comparados con los grupos control (vehículo, metamizol y morfina) en los dos modelos experimentales de nocicepción.

A.



B.

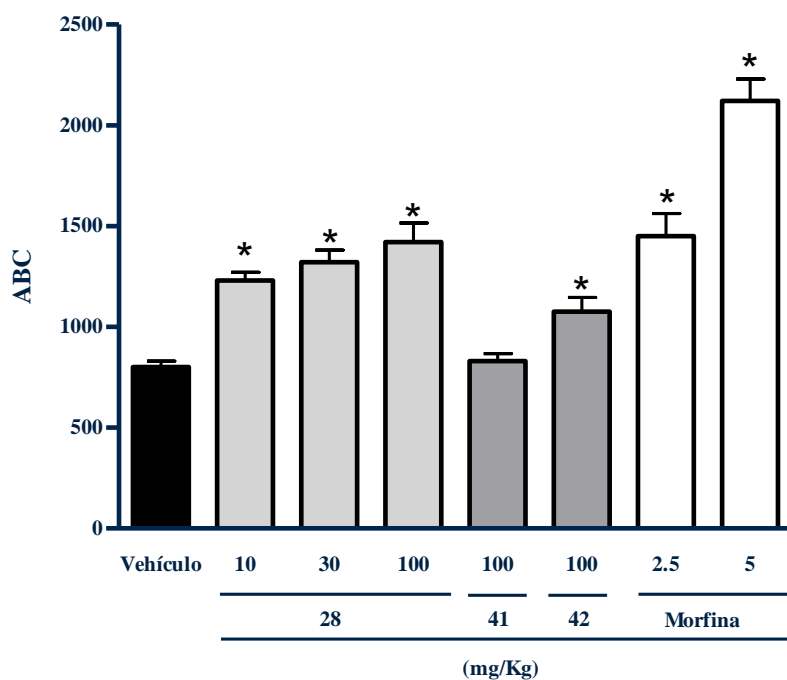


Figura 26. Efecto antinociceptivo de los compuestos **28**, **41** y **42** en ratones. La gráfica **A** corresponde al ensayo del número de contorsiones abdominales y la gráfica **B** al ensayo de la placa caliente. Como controles positivos se utilizaron metamizol y morfina, respectivamente. Cada valor es el promedio \pm el error estándar, $n = 6$ ratones. $*p < 0.05$ ANADEVa y t-Dunnett con respecto al vehículo.

6.4.3 Determinación del efecto antinociceptivo del compuesto 28 en presencia de L-NAME (éster metílico de la L-^Gnitro-arginina), glibenclamida y naloxona.

Con la finalidad de establecer el mecanismo de acción mediante el cual el producto **28** provoca analgesia se realizaron varios experimentos utilizando el modelo de placa caliente. El diseño experimental consistió en el pretratamiento de los animales, en diferentes experimentos, con naloxona (antagonista no selectivo de los opioides), L-NAME (inhibidor de la sintasa del óxido nítrico) y glibenclamida. De esta manera se bloquearían las vías de señalización más importantes que regulan la transmisión del dolor.

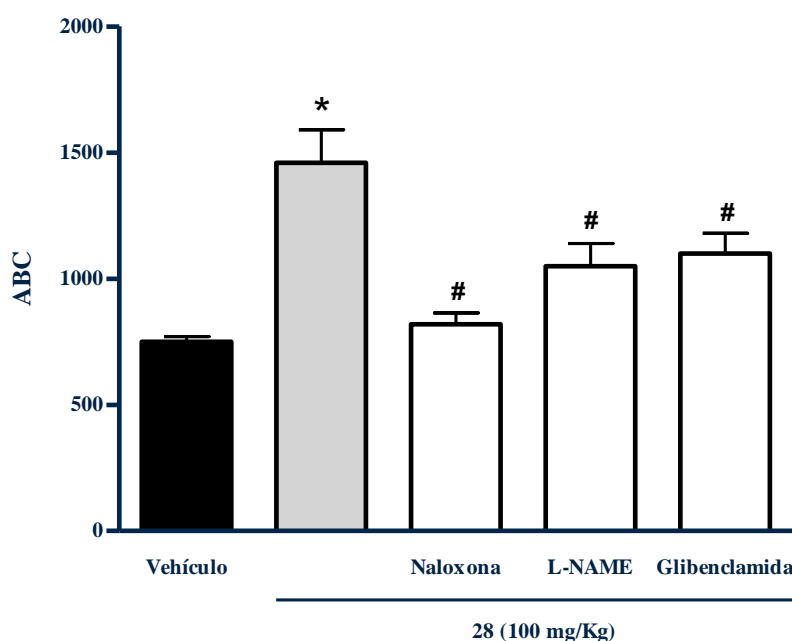


Figura 27. Efecto del pretratamiento con el éster metílico de la ^N^G-L-nitro-arginina (L-NAME), glibenclamida, y naloxona sobre la acción antinociceptiva del producto **28** (100 mg/Kg) en el ensayo de la placa caliente. Cada valor es el promedio ± el error estándar, n = 6 ratones. *p < 0.05 ANADEV y t-Dunnett con respecto al vehículo #p < 0.05 con respecto al compuesto **28**.

Los resultados del efecto antinociceptivo del compuesto **28** en presencia de L-NAME, glibenclamida y naloxona se presentan en la **Figura 27**. Como se puede observar en la **Figura 27**, el pretratamiento con un antagonista no específico de los receptores opioides como la naloxona o con un inhibidor de la sintasa del NO como el L-NAME o con un bloqueador de los canales de K⁺ sensibles a ATP como la glibenclamida, antagonizaron el efecto antinociceptivo del compuesto **28**. Por lo tanto el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

efecto analgésico de este producto podría involucrar la vía de NO-GMPc, la apertura de canales de K⁺ sensibles a ATP y/o la estimulación de los receptores opioides (Duarte *et al.*, 1990; Tonussi and Ferreira, 1994; Lorenzetti and Ferreira, 1996; Granados-Soto *et al.*, 1995; 1997; Nozaki-Taguchi and Yamamoto, 1998; Islas-Cadena *et al.*, 1999, Sandrini *et al.*, 1999, Rodrigues y Duarte, 2000; Soares *et al.*, 2000; Lázaro-Ibáñez *et al.*, 2001; Alves y Duarte, 2002; Ortiz *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2004).

VII. CONCLUSIONES

- Los resultados de las pruebas de toxicidad aguda y genotoxicidad, así como el uso continuo de *H. standleyana* en las prácticas médicas populares de México permiten inferir que el consumo de la droga cruda no ocasiona efectos tóxicos, ni provoca mutagenicidad. Estos resultados constituyen una evidencia preliminar sobre la inocuidad de esta especie. De manera adicional las hojas de *H. standleyana* no tiene efectos tóxicos.
- Los efectos hipoglicemiantes y antihiperlipidémicos de la especie *H. standleyana* comprobados en el presente estudio constituyen una aportación al conocimiento de la eficacia preclínica de la corteza de la especie.
- La demostración del efecto antidiabético significativo de las hojas de *H. standleyana* permitiría en un futuro recomendar el uso de las hojas en lugar de la corteza. Esta práctica contribuiría a fomentar la conservación de esta especie.
- Los extractos íntegros de las hojas y corteza de *H. standleyana* no afectan la absorción de la glucosa en ratas.
- El estudio químico realizado sobre los extractos íntegros de la corteza y hojas de *H. standleyana* y de la corteza de *H. latiflora* permitió la caracterización de sus principales constituyentes. A partir del extracto de la corteza *H. standleyana* se identificaron las 4-fenilcumarinas: 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**9**) y 5-O-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**41**), las cucurbitacinas: 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**28**) y 25-O-acetil-3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**40**) y el alcaloide ácido desoxicordifolínico (**42**). A partir del extracto de las hojas de esta especie se identificaron las 4-fenilcumarinas: 6''-O-acetil-5-O- β -D-galactopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**43**) y 6''-O-acetil-5-O- β -D-galactopiranosil-7,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**44**). Por último, la corteza de *H. latiflora* contiene los cucurbitanos: 23,24-dihidro-cucurbitacina F (**26**), 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**28**) y 25-O-acetil-3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**40**), las 4-fenilcumarinas: 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**7**), 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**9**), 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**12**) y 5-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-

glucopirano-sil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**15**), y el alcaloide ácido desoxicordifolínico (**42**).

- Las principales diferencias en el contenido metabólico entre las cortezas de las dos especies fueron las siguientes: La corteza de *H. standleyana* posee como constituyentes mayoritarios a la 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**28**), a la 5-O-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**41**) y al ácido desoxicordifolínico (**42**), compuestos todos ellos de naturaleza glicosídica. En tanto que los metabolitos mayoritarios de *H. latiflora* fueron la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**7**), la 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**9**), la 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**12**), la 23,24-dihidro-cucurbitacina F (**26**) y la 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**28**). Cabe destacar, que los compuestos **7**, **12** y **26** no fueron identificados en el extracto de la corteza de *H. standleyana*, por lo tanto, estos resultados son de utilidad para establecer los compuestos marcadores de ambas especies y por lo tanto para su diferenciación y pruebas de control de calidad.
- El estudio de las hojas de *H. standleyana* indicó que la composición de la corteza y de las hojas es diferente. Las hojas contienen las 4-fenilcumarinas: 6''-O-acetil-5-O- β -D-galactopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**43**), la 6''-O-acetil-5-O- β -D-galactopiranosil-7,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**44**) y grandes cantidades de manitol (**36**). La presencia de cucurbitanos en las partes áreas no se comprobó en el presente estudio.
- Los productos **40**, **41**, **43** y **44** constituyen nuevos productos naturales.
- El aislamiento del alcaloide ácido desoxicordifolínico (**42**) de la corteza de las especies del generó *Hintonia*, representa la primera descripción de alcaloides en este género y su presencia pudiera esta relacionada con el efecto antipalúdico reportado para estos copalchis.
- Los productos **28**, **12** y **41** son los principales principios antidiabéticos de los copalchis estudiados. El producto **12** provocó el restablecimiento de los niveles de glucosa sanguínea, por lo tanto, en términos de relación estructura-actividad biológica, la hidroxilación de la posición 7 del núcleo de las 4-fenilcumarinas podría ser importante para un incremento de la actividad antihiperглиcémica. La naturaleza

química del azúcar de la posición 5, sin embargo, no tiene efecto sobre la actividad antihiper glucémica.

- Los principios antidiabéticos de los copalchis mexicanos son glicósidos de tipo 4-fenilcumarina y cucurbitano. Estos últimos están presentes también en otras especies vegetales (i.e. *Momordica charantia*, *Ibervillea sonora*, *inter alia*) utilizadas para el tratamiento de la diabetes (Acosta-Patino *et al.*, 2001; Alarcón-Aguilar *et al.*, 2002a; 2002b; Grover y Yadav, 2004).
- De acuerdo a la evidencia experimental, la acción antidiabética de los extractos y principios activos de los copalchis estudiados está relacionado con un incremento en la secreción de insulina, una regulación del metabolismo del glucógeno hepático, un efecto de tipo insulinomimético (estimulando la captación de glucosa) y la activación de la enzima AMP-K. El peso específico de estas acciones constituye una perspectiva del presente trabajo.
- La presencia de los metabolitos **43** y **44** en el **EHHS** pudiera estar relacionada con el efecto hipoglicémico y antihiper glucémico del extracto en los ensayos de tipo agudo.
- Se estableció el potencial analgésico de la droga cruda de *H. standleyana* mediante los modelos de estiramiento abdominal y de la placa caliente. El producto **28** es el responsable del efecto analgésico mismo que involucra la vía de NO-GMPc, la apertura de canales de K⁺ sensibles a ATP y/o la estimulación de los receptores opioides.
- La información científica generada en el presente trabajo de tesis permitirá integrar la primera monografía de tipo OMS de la especie *H. standleyana*, especie endémica de México. Esta monografía definitivamente servirá para regular la calidad de la droga cruda derivada de la especie y/o sus derivados y contribuirá al uso racional de estas especies medicinales.

VIII. PERSPECTIVAS

- Determinar el potencial antiinflamatorio y antipirético de la droga cruda de la especie *H. standleyana*.
- Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar los principios activos y/o compuestos marcadores presentes en el extracto íntegro.
- Realizar los estudios clínicos conducentes al establecimiento de la eficacia terapéutica de la especie, efectos adversos y contraindicaciones.
- Continuar con los estudios sobre el posible mecanismo de acción antidiabética mediante el cual los productos activos ejercen su efecto.
- Completar el estudio químico del extracto íntegro de las hojas de *H. standleyana*.
- Realizar el estudio químico del extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora*.
- Integrar la monografía de tipo OMS de la especie *H. standleyana*.
- Proponer a la SAGARPA la realización de los estudios conducentes al cultivo, cosecha y manejo de *H. standleyana* a fin de garantizar el suministro eficiente y la conservación de esta importante especie medicinal.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Acosta-Patiño, J. L., Jimenez-Balderas, E., Juarez-Oropeza, M. A., y Zagoya, J. C. (2001). Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on Type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *Journal of Ethnopharmacology*. **77**, 99-101.
- ◆ Adeoye, O., Adebawale, O. A., y Waigh, R. D. (1983). Desoxycordifolinic acid from *Nauclea Diderrichii*. *Phytochemistry*. **22**, 2097-2098.
- ◆ Aguilar, Abigail., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez, P., y López, E. (1994). Plantas Medicinales del Herbario IMSS. 1ª. Edición. México, D. F.
- ◆ Akerele, O. (1988). Medicinal plants and primary health care: An agenda for action. *Fitoterapia*. **59**, 355-363.
- ◆ Alarcón-Aguilar, F. J., Hernandez-Galicia, E., Campos-Sepulveda, A. E., Xolalpa-Molina, S., Rivas-Vilchis, J. F., Vázquez-Carillo, L. I., y Román-Ramos, R. (2002a). Evaluation of the hypoglycaemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouche, (Cucurbitaceae) in different experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*. **82**, 185-189.
- ◆ Alarcón-Aguilar, F. J., Campos-Sepulveda, A. E., Xolalpa-Molina, S., Hernandez-Galicia, E., y Roman-Ramos, R. (2002b). Hypoglycaemic activity of *Ibervillea sonorae* roots in healthy and diabetic mice and rats. *Pharmaceutical Biology*. **40**, 570-575.
- ◆ Alves, D. P., y Duarte, I.D. (2002). Involvement of ATP-sensitive-K⁺ channel in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. *European Journal of Pharmacology*. **444**, 47-52.
- ◆ Alves, D. P., Tatsuo, M.A., Leite, R., y Duarte, I. D. (2004). Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K⁺ channels activation. *Life Sciences*. **74**, 2577-2591.
- ◆ Ames, B.N., y Maron, D. M. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**, 173-215.
- ◆ Anaya-Dávila, G. (1991). Estudio etnobotánico del complejo quina en México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México D. F.
- ◆ Andrade-Cetto, A., y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. **99**, 325-348.
- ◆ Aquino, R., D'Agostino, M., De Simone, Francesco., y Pizza, C. (1988). 4-aryl coumarin glycosides from *Coutarea Hexandra*. *Phytochemistry*. **27**, 1827-1830.
- ◆ Argotte-Ramos, R., Ramírez-Avila, G., Rodríguez-Gutiérrez, M. C., Ovilla-Muñoz, M., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M. H., González-Cortazar, Manasés., y Álvarez, L. (2006). Antimalarial 4-phenylcoumarins from the stem bark of *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*. **69**, 1442-1444.
- ◆ Bastien, M. (1961). Recherches sur les Copalchis, drogues hypoglycémiantes et en particulier sur le *Coutarea latiflora* DC (Rubiaceae). Dissertation. Faculté de Pharmacie de l'Université. Paris.
- ◆ Bailey, C. J., y Flatt, P. R. (1990). Models for testing new hypoglycemic drugs. En: Bailey C. J., y Flatt, P. R. (Eds). *New antidiabetic drugs*. Smith-Gordon. London. 65-82.
- ◆ Behbehani, M. M. (1995). Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology*. **46**, 575-605.
- ◆ Bennerman, R., Burton, J., y Chen, W. C. (1983). Traditional medicine and health care coverage. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- ◆ Benson, D. M. (1997). Analgesia in renal colic. *Annals of Emergency Medicine*. **29**, 297-299.

- ◆ Borhidi, A. (2006). Rubiáceas de México. *Akadémiai Kiadó*. Budapest. 340.
- ◆ Bullock. (1935). *Hintonia latiflora* var. *Leiantha* Bullock. Rubiaceae. Tribus Condaminae. *Hooker's Icones Plantarum*. **33** (4), 1-8.
- ◆ Camacho, M. R. (1990). Nuevos metabolitos secundarios de la *Hintonia latiflora* (Sesse et Mociño ex D.C.) y aislamiento de compuestos bioactivos del *Teloxys graveolens* (Wild) W. A. Weber. Tesis de Maestría (Farmacia-Química Farmacéutica), Facultad de Química, U. N. A. M. México, D. F.
- ◆ Camacho, M. R., Phillipson, J. D., Croft, S. L., Solis, P. N., Marshall, S. J., y Ghazanfar, S. A. (2003). Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*. **89**, 185-191.
- ◆ Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade –a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*. **29**, 18-24.
- ◆ Charan, R. D., McKee, T. C., Gustafson, K. R., Pannell, L. K., y Boyda, M. R. (2002). Thorectandramine, a novel β -carboline alkaloid from the marine sponge *Thorectandra* sp. *Tetrahedron Letters*. **43**, 5201–5204.
- ◆ Cheng, Z., Pang, T., Gu, M., Gao, A. H., Xie, C.M., Li, J. Y., Nan, F.J., y Li, J. (2006). Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1760**, 1682–1689.
- ◆ Delle Monache, G., Botta, B., Alves de Lima, R., y Serafim, N. A. (1983). 4-Arylcoumarins from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*. **22**, 1657-1658.
- ◆ Delle Monache, G., Botta, B., y Alves de Lima, R. (1984). 4-Arylcoumarins from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*. **23**, 1813.
- ◆ Delle Monache, G., Botta B., Delle Monache, F., y Botta, M. (1985). Synthesis of 4-arylcoumarins from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*. **24**, 1355-1357.
- ◆ Deraedt, R., Jouquey, S., Delevallee, F., y Flahaut, M. (1980). Release of prostaglandins E and F an algogenic reaction and its inhibition. *European Journal of Pharmacology*. **61**, 17-24.
- ◆ DeSmet, P. A. G. M. (2002). Herbal remedies. *The New England Journal of Medicine*. **347**, 2046–2057.
- ◆ Devor, M., Govrin-Lippmann, R., y Angelides, K. (1993). Na⁺ channel immunolocalization in peripheral mammalian axons and changes following nerve injury and neuroma formation. *Journal of Neurosciences*. **13**, 1976-1992.
- ◆ Díaz, J. L. (1976). Índice y sinonimia de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas I. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales A. C. IMEPLAM. México D. F.
- ◆ Dolphin, A. C. (1990). G protein modulation of calcium currents in neurons. *Annual Review of Physiology*. **52**, 243-255.
- ◆ Doyle M. E., y Egan, J. E. (2003). Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacological Reviews*. **55**, 105-131.
- ◆ Dray, A, y Perkins, M. (1993). Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosciences*. **16**, 99-104.
- ◆ Duarte, I. D., Lorenzetti, B.B., y Ferreira, S.H. (1990). Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *European Journal of Pharmacology*. **186**, 289-293.
- ◆ Duarte, I.D., y Ferreira, S. H. (1992). The molecular mechanisms of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *European Journal of Pharmacology*. **221**, 171-4.
- ◆ Eddy, N. N., y Leimbach, D. (1953). Synthetic analgesic: II Dithienyl-butenyl and dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **107**, 385-388.

- ◆ Eisenberg, D. M., Davis, R. B., Ettner, S. L., Appel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M., y Kessler, R. C. (1998). Trends in alternative medicine use in the United States, 1990–1997. Results of a follow-up national survey. *Journal of American Medicine Association*. **280**, 1569-1575.
- ◆ Eisenberg, D. M., Kessler, R. C., Foster, C., Norlock, F. E., Calkins, D. R., y Delbanco, T. L. (1993). Unconventional medicine in the United States-prevalence, costs, and patterns of use. *New England Journal of Medicine*. **328**, 246–252.
- ◆ FHEUM (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos). (2001). Secretaria de Salud. 1ª Edición. México, D. F.
- ◆ Farnsworth, N. R. (1998). The Napralert Database. University of Illinois at Chicago. Chicago. IL.
- ◆ Ferreira, S. H., y Nakamura, M. (1979a). I-Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins*, **18**, 179-190.
- ◆ Ferreira, S. H. y Nakamura, M. (1979b). II-Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonist. *Prostaglandins*. **18**, 191-200.
- ◆ Ferreira, S. H. y Nakamura, M. (1979c). III-Prostaglandin hyperalgesia: relevance of the peripheral effect for the analgesic action of opioid-antagonists. *Prostaglandins*. **18**, 201-208.
- ◆ Fields, H. L., Heinricher, M. M., y Mason, P. (1991). Neurotransmitters in nociceptive circuits. *Annual Review of Neuroscience*. **14**, 219-245.
- ◆ Forth, W., Martin, E., y Meter, K. (1995). Dolor En: El alivio del Dolor. Hoechst, México D. F. 1-20.
- ◆ Fozard, J. R. (1984). Neuronal 5-HT receptors in the periphery. *Neuropharmacology*. **23**, 1473-1486.
- ◆ Gavariaux-Ruff, C., y Kieffer, B. (1999). Opioids receptors: gene structure and function. En: Opioids in pain control. Christoph Stein, Cambridge University Press. London.
- ◆ Granados-Soto, V., Flores Murrieta, F. J., Castañeda-Hernández, G., y López-Muñoz, F. J. (1995). Evidence for the involvement of nitric oxide in the antinociceptive effect of ketorolac. *European Journal of Pharmacology*. **277**: 181-184.
- ◆ Granados-Soto, V., Rufino, M., Gomes-López, L. D., y Ferreira, S. H. (1997). Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *European Journal of Pharmacology*. **340**, 177-180.
- ◆ González-Chávez, L., y Hersch-Martínez, P. (1996). Investigación participativa en etnobotánica. Algunos procedimientos coadyuvantes en ella. *Dimensión Antropológica*. **3**, 129-153.
- ◆ González-Chávez L., Hersch-Martínez, P., Juárez-Miranda, A., y Pérez-Cardona A. (2000). Plantas medicinales de Copalillo y Temalac, Guerrero. Serie Patrimonio Vivo 5. Actores Sociales de la Flora Medicinal en México. INAH. México, D. F. 27-28.
- ◆ Grassi, J., y Pradelles, P. (1991). Compounds labelled by the acetylcholinesterase of *Electrophorus Electricus*. Its preparation process and its use as a tracer or marker in enzyme-immunological determinations. *United States Patent*. N° 1, 047, 330.
- ◆ Grover, K., y Yadav, S. P. (2004). Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. **93**, 123-132J.
- ◆ Hersch-Martínez, P. (1996). Destino común: los recolectores y su flora medicinal. Instituto Nacional de Antropología e Historia, México D. F.

- ◆ Huypens, P., Moens, K., Heimberg, H., Ling, Z., Pipeleers, D., y Van de Casteele, M. (2005). Adiponectin-mediated stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in pancreatic beta cells. *Life Sciences*. **77**, 1273–1282.
- ◆ Islas-Cadena, M., Aguirre-Banuelos, P., y Granados-Soto, V. (1999). Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive effect of nimesulide. *Journal of Pharmacology, Toxicology Methods*. **42**, 87-92.
- ◆ Imai, K., Inukai, K., Ikegami, Y., Awata, T., y Katayama, S. (2006). LKB1, an upstream AMPK kinase, regulates glucose and lipid metabolism in cultured liver and muscle cells. *Biochemical and Biophysics Research Communication*. **351**, 595–601.
- ◆ INI (Instituto Nacional Indigenista). Argueta, A. V., Cano, L. M., y Rodarte, M. E., Editores (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. México D. F.
- ◆ Kecskemeti, V., Bagi, Z., Pacher, P., Posa, I., Kocsis, E., y Koltai, M. Z. (2002). New trends in the development of oral antidiabetic drugs. *Current Medicinal Chemistry*. **9**, 53-71.
- ◆ Kerber, V. A., Gregianin, T. S., Paranhos, J. T., Schwambach, J., Farias, F., Fett, J. P., Fett-Neto, A. G., Zuanazzi, J. S., y Quirion, J. C. (2001). Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *Journal of Natural Products*. **64**, 677-679.
- ◆ Klip, A., y Paquet, M. R. (1990). Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care*. **13**, 228–243.
- ◆ Köhler, I., Jenett-Siems, K., Mockenhaupt, P. F., Siems, K., Jekupovic, L., y González, C. J. (2001). In vitro antiplasmodial activity of 4-phenylcoumarins from *Exostema mexicanum*. *Planta Medica*. **67**, 89-91.
- ◆ Korec, R., Heinz-Sensch, K., y Zoukas, T. (2000). Effects of the neoflavonoid coutareagenin, one of the antidiabetic active substances of *Hintonia latiflora*, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Drug Research*. **50** (I), 122-128.
- ◆ Korecova, M., Hladíková, M., y Korec, R. (2006). *Hintonia latiflora* in patients with type 2 diabetes: A long-term study. *Zeitschrift für Phytotherapie*. **27**, 272-78.
- ◆ Koster, R., Anderson, M., y De Beer, J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*. **18**, 412-417.
- ◆ Kumar, N., y Dey, C. S. (2002). Metformin enhances insulin signalling in insulin independent and-independent pathways in insulin resistant muscle cells. *British Journal of Pharmacology*. **137**, 329-336.
- ◆ Landa, E. (1913). Anales del Instituto Medico Nacional. México D. F. **12**, 146.
- ◆ Lázaro-Ibáñez, G. G., Torres-López, J. E., y Granados-Soto, V. (2001). Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K(+) channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *European Journal of Pharmacology*. **426**, 39-44.
- ◆ Linares, E., y Bye, R. (1987). A study of four medicinal plants complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*. **19**, 153-83.
- ◆ Lorence, D. H. (1999). A nomenclator of Mexican and Central American Rubiaceae. *Missouri Botanical Garden Monograph Series*. **73**, 1–177.
- ◆ Lorenzetti, B. B., y Ferreira, S.H. (1996). Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflammation Research*. **45**, 308-311.
- ◆ Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*. **54**, 275-287.
- ◆ MacLennan, A. H., Wilson, D. H., y Taylor A. W. (1996). Prevalence and cost of alternative medicine in Australia. *Lancet*. **347**, 569–573.

- ◆ Mahady, G. B. (1997) Application of the Napralert database in the study of traditional Chinese medicine. En: Proceedings of the International Symposium on Information and Publications of Traditional Chinese Medicine. China Medical College, Taichung, Taiwan. 74-89.
- ◆ Mahady, G. B. (1998) Herbal medicine and pharmacy education. *Journal American Pharmaceutical Association*. **38**, 274.
- ◆ Mahady, G. B. (2001). Global harmonization of herbal health claims. Part 1. *Journal of Nutrition*. **131**, 1120S-1123S.
- ◆ Martineau, L. C., Couturea, A., Spoor, Danielle., Benhaddou-Andaloussia, A., Harris C., Meddaha, B., Leduc, C., Burt, A., Vuong, Tri., Mai-Lea, P., Prentkie, Marc., Bennett, S., Arnason, J. T., y Haddad, P. (2006). Anti-diabetic properties of the Canadian low bush blueberry *Vaccinium angustifolium*. *Phytomedicine*. **13**, 612-623.
- ◆ Martínez, M. (1989). Las plantas medicinales de México. 6ª Edición. Ediciones Botas. México, D. F., 84-87.
- ◆ Mata, R., Calzada, F., García, M., y Reguero, M. (1987). Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, III: New 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *Journal of Natural Products*. **50**, 866-870.
- ◆ Mata, R., Calzada, F., y Garcia, M. (1988) Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, VI: Additional new 4-Phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *Journal of Natural Products*. **51**, 851-856.
- ◆ Mata, R., Albor C., Pereda-Miranda, R., y Mc Laughlin, L. (1990a). Cytotoxic constituents of *Exostema mexicanum*. *Planta Medica*, **56**, 241.
- ◆ Mata, R., Camacho, M., Cervera, E., Bye, R., y Linares, E. (1990b). Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **29**, 2037-2040.
- ◆ Mata, R., Camacho, M. R., Mendoza, S., y Cruz, M. (1992). A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **31** (9), 3199-3201.
- ◆ Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*. **57**, 1-169.
- ◆ Millar W. J. (1997). Use of alternative health care practitioners by Canadians. *Canadian Journal of Public Health*. **88**, 154-158.
- ◆ Motley, T. J., Wurdack, K. J., y Delprete, P. G. (2005). Molecular systematics of the Catesbaceae-Chiococceae complex (Rubiaceae): flower and fruit evolution and biogeographic implications. *American Journal of Botany*. **92**(2), 316-329.
- ◆ Murat, J.C., y Serfaty, A. (1974). Simple enzymatic determination of polysaccharide (glycogen) content of animal tissues. *Clinical Chemistry*. **20**, 1576-1577.
- ◆ Nance, P. W., y Sawynok, J. (1987). Substance P-induced long-term blockade of spinal adrenergic analgesia: reversal by morphine and naloxone *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **240**, 972-977.
- ◆ Nicol, G., Klingberg, D., y Vasko, M. (1992). Prostaglandin E₂ increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. *Journal of Neuroscience*. **12**, 1917-1927.
- ◆ Noster, S., y Kraus, L. (1990). In vitro Antimalarial activity of *Coutarea latiflora* and *Exostema caribaeum* extracts on *Plasmodium falciparum*. *Planta Medica*. **56**, 63-65.
- ◆ Nozaki-Taguchi, N., y Yamamoto, T. (1998). Involvement of nitric oxide in peripheral antinociception mediated by kappa and delta-opioid receptors. *Anesthesia and Analgesia*. **87**, 388-393.

- ◆ Ochoterena-Booth, H. (2000). Systematics of *Hintonia* Bullock and the *Portlandia* complex (Rubiaceae). PhD Dissertation. Cornell University, Ithaca, New York, U. S. A.
- ◆ Organización Mundial de la Salud (2002). Situación reglamentaria de los medicamentos. Una reseña mundial. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.
- ◆ Ortiz, M. I., Torres-López, J. E., Castañeda-Hernández, G., Rosas, R., Vidal-Cantu, G. C., y Granados-Soto, V. (2002). Pharmacological evidence for the activation of K(+) channel by diclofenac. *European Journal of Pharmacology*. **438**, 85-91.
- ◆ Paul, J. H. A., Maxwell, A. R., y Reynolds, W. F. (2003). Novel bis (monoterpenoid) indole alkaloids from *Psychotria bahiensis*. *Journal of Natural Products*. **66**, 752-754.
- ◆ Pinto, A., Capasso, A., y Sorrentino, L. (1997). Experimental animal studies on the hypoglycemic effects of a copalchi extract. *Drug Research*. **47** (II), 829-833.
- ◆ Reguero, M., Mata, R., Bye, R., Linares, E., y Delgado, G. (1987). Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, II: Cucurbitacins from *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*. **50**, 315-316.
- ◆ Reher, G., y Kraus, L. (1984). New neoflavonoids from *Coutarea latiflora*. *Journal of Natural Products*. **47**, 172-174.
- ◆ Reher, G., Kraus, L., Sinnwell, V., y König W. (1983). A neoflavonoid from *Coutarea hexandra* (Rubiaceae). *Phytochemistry*. **22**, 1524-1525.
- ◆ Rendón-Aguilar, B., Rebollar-Domínguez, S., Caballero-Nieto, J., y Martínez-Alfaro, M. A. (2001). Plantas, cultura y sociedad. Estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los albores del siglo XXI. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. 1ª Edición. México, D. F. 1-315.
- ◆ Reyes-López, M., Villa-Treviño, S., Arriaga-Alba, M., Alemán-Lazarini, L., Rodríguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Fattel-Fazenda, S., y De la Garza, M. (2004). The amoebicidal aqueous extract from *Castela texana* possesses antigenotoxic and antimutagenic properties. *Toxicology in Vitro*. **19**, 91-97.
- ◆ Roca, B. (2003). Rhabdomyolysis and hemolysis after use of *Coutarea latiflora*. *American Journal of Medicine*. **115**, 677.
- ◆ Rodrigues, A. R., y Duarte, I. D. (2000). The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. *British Journal of Pharmacology*. **129**, 110-114.
- ◆ Roerig, S. C., Fujimotoi, J. M., y Tseng, L. F. (1988). Comparisons of descending pain inhibitory pathways activated by beta-endorphin and morphine as characterized by supraspinal and spinal antinociceptive interactions in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **247**, 1107-1113.
- ◆ Rojas, A., Hernández, L., Pereda-Miranda, R., y Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **35**, 275-283.
- ◆ Ross, S. A., Gulve, E. A., y Wang, M. (2004). Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. *Chemical Review*. **104**, 1255-1282.
- ◆ Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Curie, M. G., Needleman, P. (1992). Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*. **90**, 7240-7244.
- ◆ Sánchez-Viesca, F. (1969). The structure of exostemin, a new 4-phenyl coumarin isolated from *Exostema caribaeum*. *Phytochemistry*. **8**, 1821-1823.

- ◆ Sandrini, M., Vitale, G., Ottani, A., y Pini, L. A. (1999). The potentiation of analgesic activity of paracetamol plus morphine involves the serotonergic system in rat brain. *Inflammation Research*. **48**, 120-127.
- ◆ Sato, J., y Perl, E. R. (1991). Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science*, **251**, 1608-1610.
- ◆ Schwikkard, S., y van Heerden, F. R. (2002). Antimalarial activity of plant metabolites. *Natural Products Reports*. **19**, 675–692.
- ◆ Sharma, S., Dwivedi, S., y Swarup, D. (1997). Hypoglycaemic, antihyperglycaemic and hypolipidemic activities of *Caesalpinia bonducella* seed in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **58**, 39-44.
- ◆ Shen, Z. X. (1996). Recent research and developments in traditional Chinese medicine in China. In: Report of the Third Meeting of Directors of WHO. Collaborating Centres for Traditional Medicine. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 7–13.
- ◆ Soares, A. C., Leite, R., Tatsuo, A. F., y Duarte, I. D. (2000). Activation of ATP-sensitive-K⁺ channel: mechanisms of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusiate, cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. *European Journal of Pharmacology*. **400**, 67-71.
- ◆ Soto, R. B., Díaz, C. F., Yañez, R.O., Collera, C.O., y Garcia, F.J. (1988). *Spectroscopy An International Journal*. **6**, 123.
- ◆ Soumyanath, A. (2006). Traditional medicines for modern times. Vol. 6. Antidiabetic plants. Taylor and Francis Group Editors. 1^a Edi. Boca Raton, Florida. 1-314.
- ◆ Subash-Babu, P., y Stanley-Mainzen, P. (2004). Antihyperglycaemic and antioxidant effect of hyponidd, an ayurvedic herbomineral formulation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **56**, 1435-1442.
- ◆ SSA. 2004. Página de la Secretaria de Salud, Gobierno de México. <http://www.ssa.gob.mx> (Enero del 2004).
- ◆ Standley, P. C. (1918–1934). Rubiaceae. *North American Flora*. **32**, 1–300.
- ◆ Standley, W., y Williams CO. (1975). Flora of Guatemala-Part XI. Numbers 1 to 3. Fieldiana. *Botany*. **24**, 1-274.
- ◆ Steen, K. H., Reeh, P. W., Anton, F., y Handwerker, H. O. (1992). Proton selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro. *Journal of Neurosciences*. **12**, 86-95.
- ◆ Stranczinger, S., Szentpéteri, J. L., y Borhidi, A. (2006). Sequence differentiation between some DNA regions of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana*. *Acta Botanica Hungarica*. **48** (3–4), 435-440.
- ◆ Taiwo, Y. O., Heller, P., y Levine, J. D. (1992). Mediation of serotonin hyperalgesia by the AMPc second messenger system. *Neurosciences*. **48**, 479-483.
- ◆ Teixidor, J., y Massó, J. (1997). Dolor: Bases Fisiopatológicas y tratamiento del paciente con dolor. En: Medicina Interna. Masson. Barcelona. 91-101.
- ◆ Terrés, J. (1913). Anales del Instituto Medico Nacional. México D.F. **12**, 103.
- ◆ Tonussi, C. R., y Ferreira, S. H. (1994). Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *European Journal of Pharmacology*. **251**, 173-179.
- ◆ Verspohl, E. J. (2002). Recommended testing in diabetes research. *Planta Medica*. **68**, 581-90.
- ◆ Wang, X., Zhou, L., Li, G., Luo, T., Gu, Y., Qian, L., Fu, X., Li, F., Li, J., y Luo, M. (2007). Palmitate activates AMP-activated protein kinase and regulates insulin

- secretion from β cells. *Biochemical and Biophysics Research Communication*. **352**, 463–468.
- ◆ Weinreich, D., y Wonderlin, W. F. (1987). Inhibition of calcium-dependent spike after-hyperpolarization increases excitability of rabbit visceral sensory neurones. *Journal of Physiology*. **394**, 415-427.
 - ◆ Williamson, E. M., Opako, D. T., y Evans, F. J. (1996). Pharmacological methods in phytotherapy research. Volume 1. Ed. Jonh Wiley & Sons. New York. 1-228.
 - ◆ WHO-TRM (World Health Organization-Traditional Medicine). (1998). Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. WHO, Geneva, Switzerland. 1-5.
 - ◆ World Health Organization. (1999). *Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
 - ◆ WHO-TRM (World Health Organization-Traditional Medicine). (1999). WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume I. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
 - ◆ World Health Organization. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of WHO consultation. Geneva, Switzerland. 66.
 - ◆ World Health Organization (2001). WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume 2. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
 - ◆ World Health Organization. (2004). <http://www.who.org> (Enero del 2004).
 - ◆ Yaksh, T. L. (1997). Biologic foundations; an introductory perspective on the study of nociception and its modulation. *Anesthesia*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, USA. 471-482.

X. APÉNDICE

José A. Guerrero-Analco^{1,3}
 Paul Hersch-Martínez²
 José Pedraza-Chaverri¹
 Andrés Navarrete¹
 Rachel Mata¹

Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Original Paper

Abstract

An extract (100 mg/kg) of the stem bark of *Hintonia standleyana* caused a significant decrease in blood glucose levels in both normal and streptozotocin (STZ)-diabetic rats when compared with vehicle-treated groups ($p < 0.05$). From the active extract, 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-2,3,24-dihydrocucurbitacin F (**1**), 5-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**2**) and 5-*O*-[β -*D*-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**3**) were isolated. Coumarin **3** is a new natural product and was identified by spectroscopic methods. Compounds **1** and **3** did not decrease blood glucose levels in normal rats. However, in two different long-term subacute experiments, using animals with a developing diabetes condition and with STZ-induced diabetes, both compounds at daily doses of 10 mg/kg (developing diabetes condition) or

30 mg/kg (STZ-induced diabetes condition) provoked a significant antihyperglycemic activity ($p < 0.05$). Furthermore, compound **3** restored normal blood glucose levels in STZ-induced diabetic rats. In all cases, the groups treated with the active principles and the extract showed less body weight lost than the glibenclamide-treated and diabetic control groups ($p < 0.05$). These results showed that the antihyperglycemic active principles of *H. standleyana* are both 4-phenylcoumarins and cucurbitacin glycosides.

Key words

Hintonia standleyana · Rubiaceae · 4-phenylcoumarins · cucurbitacins; 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-2,3,24-dihydrocucurbitacin F · 5-*O*-[β -*D*-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin · antihyperglycemic

1099

Introduction

According to the World Health Organization (WHO) and the International Diabetes Federation (IDF), 3.2 million deaths can be attributed to diabetes each year, having the biggest impact in the developing countries [1], [2]. In spite of the introduction and extensive utilization of oral hypoglycemic agents, a variety of plant preparations used in folk medicine world-wide have played an important role in the treatment of patients with type 2 diabetes [3], [4]. However, the medicinal value and the active principles of many of these species are not known. *Hintonia*

standleyana Bullock (Rubiaceae) is one such species, although, the antidiabetic properties of the related plants *H. latiflora* (Sesse et Mociño ex DC.) Bullock (*Coutarea latiflora* Sesse et Mociño ex DC.) and *Exostema caribeum* (Jacq.) Roem et Schult have been extensively demonstrated, the earliest works being carried out at the beginning of the 20th century at the "Instituto Médico Nacional" in Mexico City [5], [6], [7]. Later on, researchers in Germany [8], [9], [10], [11], France [12] and Italy [13] corroborated the work of Mexican scientists using different animal models. Because of the antidiabetic effect of these species, in Germany an ethanol aqueous extract prepared from a mixture of the stem

Affiliation

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México DF, México

² Instituto Nacional de Antropología e Historia, Cuernavaca, Morelos, México

³ Taken in part from the PhD thesis of J. A. Guerrero-Analco submitted to Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, 2005

Correspondence

Dr. Rachel Mata · Facultad de Química · Universidad Nacional Autónoma de México · Coyoacán 04510 · México City · México · Phone: +52-5-5622-5289 · Fax: +52-5-5622-5329 · E-mail: rachel@servidor.unam.mx

Received January 19, 2005 · Accepted May 27, 2005

Bibliography

Planta Med 2005; 71: 1099–1105 · © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
 DOI 10.1055/s-2005-873137 · Published online November 10, 2005
 ISSN 0032-0943

bark of *H. latiflora* and *E. caribaeum* has been commercialized under the trade name of Sucontral® [14]. The most recent study on the antidiabetic activity of copalchi was performed by Korec and co-workers [9] in Germany who demonstrated that a native extract prepared from the stem-bark of *H. latiflora* as well as a synthetic sample of 5-hydroxy-7-methoxy-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2H-benzof[1]pyran-2-one decreased the levels of glucose in the blood of streptozotocin (STZ)-diabetic rats; in this study, the source of the plant material used was not indicated and the active principles were not determined [9]. The authors evaluated a synthetic aglycone which, according to the extensive chemical investigations previously carried out on *H. latiflora* and *E. caribaeum*, has not been yet found free in the crude extracts but only as a glycoside [15], [16], [17] or as 4-phenyl-5,2'-oxido-coumarin [18]. Thus, the active principles of the Mexican "copalchis" remain to be determined, although, as Korec et al. [9] pointed out, the 4-phenylcoumarin glycosides previously isolated and characterized from these species could be among the active principles. *H. standleyana*, known in Mexico with the vernacular names of "copalchi" and "quina amarilla", among others, is also used to treat malaria and fevers [19]. To the best of our knowledge this species has not been investigated, however, several phytochemical studies carried out on the related species *H. latiflora*, *E. caribaeum* and *E. mexicanum* Gray resulted in the isolation and identification of several cucurbitacins, 4-phenylcoumarins, flavonoids and a novel phenylstyrene [15], [16], [17], [20], [21], [22]. In addition, Reher and Kraus reported the isolation of three 4-phenylcoumarins from *H. latiflora* [18]. According to Bullock [23], *H. standleyana* is distinguished from *H. latiflora* by the small, almost smooth fruit, which is not lenticellate like that of *H. latiflora*, and by the absence of bracteoles. On the basis of the above considerations, the present study was undertaken to evaluate the protective, hypoglycemic and antihyperglycemic effects of crude extracts from *H. standleyana* and to define the major active principles.

Materials and Methods

General experimental procedures

Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded as KBr pellets or films on a Perkin-Elmer 59913 spectrophotometer. Optical rotations

were registered on a Perkin-Elmer 241 digital polarimeter. NMR spectra were recorded on a Varian VXR-300S spectrometer in CD₃OD, either at 300 MHz (¹H) or 75 MHz (¹³C), using tetramethylsilane (TMS) as internal standard. EI-MS were obtained on a JMS-AX505HA mass spectrometer. Positive FAB-MS data were obtained in a JEOL SX 102 mass spectrometer using an NBA matrix. TLC analyses were performed on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck), and visualization of plates was carried out using a ceric sulfate (10%) solution in H₂SO₄ or anisaldehyde-H₂SO₄ reagent (for sugars).

Plant material

The stem bark of *H. standleyana* Bullock was collected in Atenango del Rio, Guerrero, in January 2003 and identified by Celso Guerrero and Francisco Ramos from the National Herbarium (MEXU). A voucher specimen (P. Hersch No 824) is deposited at the ASFM-INAH Herbarium, Cuernavaca.

Extraction and isolation

Dried and shredded stem bark (900 g) was macerated with CH₂Cl₂-MeOH (1:1) (5 L×3) during 6 days at room temperature. The combined extracts were evaporated under vacuum to yield 200g of a brown residue. The dried extract was chromatographed in a glass column packed with silica gel (2 kg) eluting with hexane-EtOAc (1:1 → 0:1) and EtOAc-MeOH (1:0 → 0:1) to yield eleven primary fractions (FH1–FH11). Fraction FH4 (8.5g), eluted with EtOAc-MeOH (9:1), was further chromatographed over a silica gel column using CHCl₃-EtOAc-MeOH (47.5:47.5:5) as a mobile phase to give ten fractions (FH4I–FH4X). From fraction FH4V spontaneously crystallized 300 mg of **1** (Fig. 1), m.p. 199–204 °C, identical to an authentic sample isolated from *H. latiflora* [15]; from fraction FH4X precipitated 60 mg of compound **2** (Fig. 1), m.p. 236–240 °C, identified as 5-O-β-D-glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin [16]. Further column chromatography over silica gel (190 g) of FH8 (10 g), eluted with CH₂Cl₂-MeOH (7:3), using CH₂Cl₂-MeOH (9.5:0.5 → 0:1) as mobile phase yielded seven secondary fractions, FH8I–FH8VII. From fraction FH8IV, eluted with CH₂Cl₂-MeOH (7:3), crystallized 1.2g of compound **3** (Fig.1), m.p. > 300 °C, identified as 5-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin.

In order to perform the chronic antihyperglycemic assays of the pure compounds at higher doses, a second batch of 6 kg of the

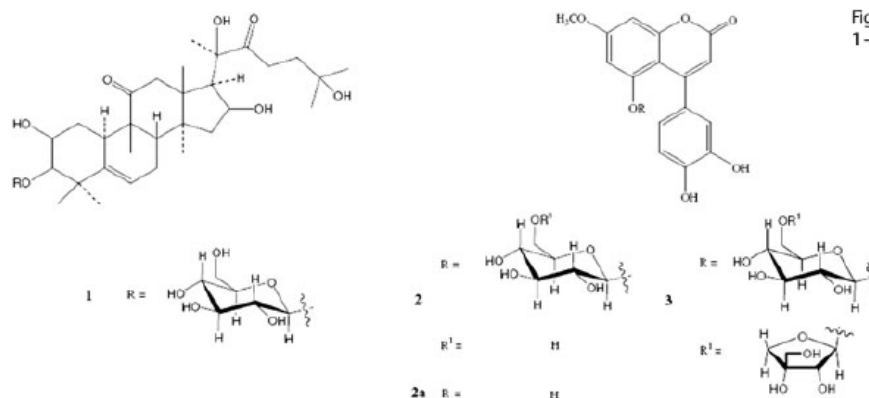


Fig. 1 Structures of compounds **1–3** isolated from *H. standleyana*.

same plant material was identically processed to render 2.3 g of compound **1** and 6 g of compound **3**.

Acid hydrolysis of **3**

Compound **3** (50 mg) was refluxed for 2 h with 10 mL of 2 M HCl. A yellow powder precipitated from the acid solution and after usual work-up, 20 mg of aglycone **2a** were obtained [16]; glucose and apiose were identified (TLC) by comparison with authentic samples.

5-O-[[β -D-Apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**3**): glassy brown solid; $[\alpha]_D^{20}$: -20° (c 0.02, MeOH); UV (MeOH): λ_{max} (log ϵ) = 319 (4.05); 327 (4.08) nm; IR (KBr): ν_{max} = 3500, 2940, 1730, 1620, 1430 cm^{-1} ; HR-FAB-MS: m/z = 595.1585 [M + H]⁺ (calcd. for C₂₇H₃₀O₁₅: 595.1581); FAB-MS: m/z = 595 [M + H]⁺; 463 [M + H - 132]⁺, 301 [M + H - 132 - 162]⁺.

Acute hypoglycemic assay

Male Wistar normoglycemic rats, 55–60 days old, weighing 180–220 g, were obtained from Centro UNAM-Harlan (Harlan México, S.A. e C.V.). Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with international rules on care and use of laboratory animals. The animals were housed under standard laboratory conditions and maintained on standard pellet diet and water ad libitum. Rats were placed in single cages with wire-net floors and deprived of food for 18 h before experimentation but allowed free access to tap water throughout. The crude extract as well as compounds **1** and **3** were suspended in 0.05% tween 80 in saline solution. Glibenclamide (10 mg/kg; Sigma Co., St. Louis, MO) was used as a hypoglycemic model drug [24]. The extract (10 and 100 mg/kg) and compounds **1** and **3** (10 mg/kg) were prepared freshly immediately before experimentation and administered by the intragastric route. Control rats received the vehicle (0.05% Tween 80 in saline solution) in the same volume (0.5 mL of vehicle/100 g of body weight) by the same route.

Acute antihyperglycemic assay

Diabetes mellitus was induced in rats by a single intraperitoneal injection of freshly prepared STZ (70 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO) dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5, in a volume of 1 mL/kg. After 7 days of STZ administration, blood glucose levels of each rat were determined. Rats with blood glucose higher than 250 mg/dL were considered diabetic and included in the study [24]. Thereafter, the extract, glibenclamide and control were administered at the same dosages.

Determination of blood glucose

Blood samples were collected from the caudal vein by means of a small incision in the end of the tail at 0, 1.5, 3, 5, 7, 9 h after drug administration. Blood glucose was estimated by the enzymatic glucose oxidase method using a commercial glucometer (*One Touch Basic I*, Johnson-Johnson). Percentage variation of glycemia for each group was calculated with respect to the initial (0 h) level according to:

$$\% \text{ variation of glycemia} = [(G_i - G_t)/G_i] \times 100\%$$

where G_i is initial glycemia values and G_t is the hypoglycemia value at 1.5, 3, 5, 7, and 9 h [25].

Effects of daily treatment with crude extract and pure compounds in a developing diabetic situation in rats

Sixty rats with normal levels of glucose, measured as described above, were used and divided into 10 groups as follows: group I, normal control STZ-untreated; groups II–VI and IIIa–VIa were given STZ (70 mg/kg *i.p.*). Groups I and II (diabetic control) received the vehicle (0.05% Tween 80 in saline solution) through an intragastric tube daily for 15 days. Groups III and IIIa received glibenclamide (10 and 100 mg/kg, respectively); groups IV and IVa were treated with the extract (10 and 100 mg/kg, respectively); groups V and Va received compound **1** (10 and 100 mg/kg) and groups VI and VIa compound **3** (10 and 100 mg/kg) [24]. All tested materials were suspended in the same vehicle and administered using an intragastric tube daily for 15 days. The animals were housed under standard laboratory conditions and maintained with free access to water and food during all the experiments. Blood glucose concentration was estimated at 3, 7, 10, 15 days after STZ administration. Percentage variation of glycemia for each group was calculated. The body weights of the animals were measured parallel to the blood glucose analyses. All experiments were carried out using six animals per group and the treatments were daily administered at 10 AM.

Effects of daily treatment with crude extract and pure compounds in STZ-induced diabetic rats

Diabetes mellitus was induced in 30 rats by a single intraperitoneal injection of freshly prepared STZ (50 mg/kg) dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5, in a volume of 1 mL/kg. After 7 days of STZ administration, blood glucose levels of each rat were determined. Rats with blood glucose higher than 250 mg/dL were considered diabetic and included in the study [24]. Thereafter, the extract, pure compounds and glibenclamide were administered twice (9 AM and 6 PM) on a daily basis, during 30 days, to STZ-diabetic rats which were divided into five groups (A–E). A sixth group of normal rats (group F) was used as control. Groups E (diabetic control) and F received the vehicle (0.05% Tween 80 in saline solution) *per os* during 30 days. Group A received glibenclamide (15 mg/kg; 30 mg/kg daily); groups B (50 mg/kg; 100 mg/kg daily), C (15 mg/kg; 30 mg/kg daily) and D (15 mg/kg; 30 mg/kg daily) were treated with the extract and compounds **1** and **3**, respectively [24]. All tested materials were suspended in the same vehicle and administered *per os* daily for 30 days. The animals were housed under standard laboratory conditions and maintained with free access to water and food during all the experiment. Blood glucose concentrations in diabetic animals (groups A–E) and those of the control group (F) were estimated at days 0, 3, 7, 10, 12, 15, 21, 30. The body weights of the animals were measured parallel to the blood glucose analyses. All experiments were carried out using six animals per group.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM for the number ($n = 6$) of animals in the group as indicated in the tables. Repeated measurement analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the changes in blood glucose and other parameters. Dunnett range

post-hoc comparisons were used to determine the source of significant differences where appropriate; $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results and Discussion

As shown in Tables 1 and 2, a CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) extract (100 mg/kg) of the stem-bark of *H. standleyana* caused a significant decrease in blood glucose levels in both normal and STZ-diabetic rats when compared with vehicle-treated groups ($p < 0.05$). In normoglycemic animals, the hypoglycemic effect (-10.22%) of the extract was only observed at a dose of 100 mg/kg of body weight and as early as 1.5 h after the treatment (Table 1); the effect lasted during the period of evaluation (-24% at 5 h and -18.83% at 9 h). Glibenclamide (10 mg/kg) showed a maximum hypoglycemic effect at 7 h in normoglycemic (Table 1) and at 5 h in STZ-induced diabetic rats (Table 2); in each case after this period a clear reduction of the effect was observed (Tables 1 and 2); on the other hand, the extract (100 mg/kg) provoked a significant reduction of the glucose level after 7 h of treatment in diabetic animals; this lowering effect persisted during all the experiment. In hyperglycemic rats, the re-

duction (-27.21%) of blood glucose levels was significant after 7 h of the treatment (Table 2).

Thereafter, fractionation of the active extract by extensive column chromatography on silica gel led to the isolation and identification of the compounds shown in Fig. 1, namely, 3-O- β -D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (1), 5-O- β -D-glucopyranosyl-7,3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (2) and 5-O-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (3). Compound 3 is a new natural product.

The HR-FAB mass spectrum (positive mode) of 3 showed a quasi-molecular ion at $m/z = 595.1585$ [M + H]⁺ consistent with a molecular formula of $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$. The NMR spectra (CDOD₃, Table 3) were very similar to those of compound 2 and other 4-phenylcoumarins glycosides isolated from *H. latiflora* and *E. caribaeum* [15], [16], [17]. Furthermore, acid hydrolysis of compound 3 yielded the same aglycone as compound 2, namely 7-methoxy-5,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (2a), glucose and apiose. Like compounds 2 and 2a, the aromatic region of the ¹H-NMR spectrum of 3 (Table 3), displayed a pair of *meta* coupled doublets attributed to H-6 and H-8, respectively; an ABX system for H-2', H-

Table 1 Effect of the extract and compounds 1 and 3 on blood glucose levels in normal rats

Groups	Blood Glucose (mg/dL)					
	0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehicle)	96.35 ± 5.32	103.19 ± 3.2 (7.1)	96.3 ± 3.1 (-0.05)	92.01 ± 4.0 (-4.5)	92.68 ± 4.1 (-3.8)	92.30 ± 3.3 (-4.2)
Glibenclamide (10 mg/kg)	98.57 ± 6.41	81.76 ± 4.2* (-17.05)	79.64 ± 4.5* (-19.20)	68.92 ± 3.4* (-30.08)	66.42 ± 3.5* (-32.61)	75.48 ± 2.4* (-23.42)
Extract (10 mg/kg)	96.73 ± 4.47	89.36 ± 2.8 (-7.61)	89.48 ± 3.9 (-7.49)	86.39 ± 2.7 (-10.68)	87.75 ± 4.2 (-9.28)	92.35 ± 3.9 (-4.52)
Extract (100 mg/g)	97.92 ± 8.74	87.83 ± 2.9* (-10.22)	76.92 ± 3.2* (-21.44)	74.42 ± 3.1* (-23.99)	77.90 ± 4.8* (-20.44)	79.48 ± 3.9* (-18.83)
Compound 1 (10 mg/kg)	98.72 ± 6.28	110.14 ± 4.2 (11.57)	100.10 ± 4.0 (1.40)	94.14 ± 5.2 (-4.63)	94.89 ± 6.0 (-3.87)	88.58 ± 5.3 (-10.27)
Compound 3 (10 mg/kg)	97.98 ± 6.68	106.95 ± 5.5 (9.16)	96.11 ± 5.1 (-1.91)	84.78 ± 4.7 (-13.47)	87.11 ± 3.2 (-11.09)	85.23 ± 5.2 (-13.01)

Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group.

* $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for comparison with respect to initial levels in each group.

% Variation of glycemia are in parentheses.

Table 2 Effect of the extract on blood glucose levels in diabetic rats

Groups	Blood Glucose (mg/dL)					
	0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehicle)	329.83 ± 15.09	353.41 ± 4.2 (7.15)	329.66 ± 4.1 (-0.05)	315.31 ± 4.2 (-4.40)	312.34 ± 4.3 (-5.30)	312.08 ± 4.3 (-5.38)
Glibenclamide (10 mg/kg)	343.71 ± 21.05	391.96 ± 5.3 (14.04)	293.08 ± 5.2* (-14.73)	250.90 ± 3.8* (-27.0)	277.09 ± 2.2* (-19.38)	283.83 ± 4.2* (-17.42)
Extract (10 mg/kg)	337.57 ± 17.29	318.86 ± 5.4 (-5.54)	311.91 ± 5.3 (-7.60)	303.07 ± 6.0 (-10.22)	296.04 ± 5.9* (-12.30)	278.90 ± 5.2* (-17.38)
Extract (100 mg/kg)	334.51 ± 16.68	381.34 ± 5.2 (14.0)	335.64 ± 5.2 (0.34)	291.89 ± 5.3* (-12.74)	243.48 ± 6.1* (-27.21)	224.65 ± 6.2* (-32.84)

Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group.

* $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for comparison with initial levels of glucose in each group.

% Variation of glycemia are in parentheses.

Table 3 ¹³C (75.5 MHz) and ¹H (300 MHz) NMR data of compound 3 (CD₃OD)*

C/H	δ _c	δ _H	C/H	δ _c	δ _H
2	163.0		6'	120.5	6.72 (dd, <i>J</i> = 2.4, 7.5)
3	113.2	5.94, <i>s</i>	OMe	56.5	3.85, <i>s</i>
4	158.0		1''	101.4	4.79 (d, <i>J</i> = 7.8)
4a	105.6		2''	74.5	2.73 (dd, <i>J</i> = 7.8, 7.8)
5	158.1		3''	78.0	3.3 (dd, <i>J</i> = 7.8, 7.8)
6	96.3	6.68 (d, <i>J</i> = 2.4)	4''	71.3	3.2 (dd, <i>J</i> = 7.8, 7.8)
7	164.9		5''	77.6	3.6, <i>m</i>
8	100.5	6.65 (d, <i>J</i> = 2.4)	6''	68.7	3.95 (br d, <i>J</i> = 10.9) 3.74 (br d, <i>J</i> = 10.9)
8a	157.1		1'''	111.0	4.92 (d, <i>J</i> = 2.4)
1'	133.0		2'''	77.1	3.86 (d, <i>J</i> = 2.4)
2'	116.8	6.83 (d, <i>J</i> = 2.4)	3'''	80.5	–
3'	145.5		4'''	75.0	3.55, <i>m</i>
4'	147.0		5'''	65.7	3.55, <i>m</i>
5'	115.7	6.82 (d, <i>J</i> = 7.5)			

*Coupling constants in Hz are in parentheses.

5' and H-6'; finally, the hydrogen of the α-pyrone ring system (H-3) was observed as a singlet [16]. In addition, the spectrum displayed a singlet for a methoxy group and the resonances for the sugar moieties. The carbon resonances (Table 3) of the 4-phenylcoumarin portion were assigned through an analysis of the HETCOR and HMBC experiments and by comparison with suitable models [15], [16], [17], [26]. The ¹³C-NMR chemical shifts (Table 3) observed in the sugar region of 3 confirmed the presence of one glucose and one apiose moiety in the molecule. The existence of ion fragments at *m/z* = 463 [(M + H) – 132]⁺ and 301 [463 – 162] in the FAB mass spectrum indicated consecutive loss of an apiosyl and one glucosyl unit from the molecular ion; thus, the β-D-glucopyranose moiety was attached directly to the aglycone while β-D-aposio was terminal. Furthermore, the HMBC correlations between C-5 and the anomeric hydrogen of glucose (H-1'') clearly indicated that the glucosyl unit was attached to the hydroxy at C-5 of the aglycone. The upfield shift of H-2'', due to the protection exerted by the phenyl group at C-4 of the phenylcoumarin core, was consistent with this proposal. On the other hand, the HMBC correlation between C-6'' and the anomeric hydrogen of the apiosyl unit (H-1''') revealed that both sugars were linked through a 1'''→6'' glycosyl linkage. The value of the coupling constants (Table 3) of both anomeric hydrogens revealed their β configuration. On the basis of these considerations compound 3 was characterized as 5-O-[β-D-aposiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin.

The acute hypoglycemic effect of compounds 1 and 3 was also tested in normoglycemic rats; the results (Table 1) indicated that oral administration of both compounds at the dose of 10 mg/kg did not provoke significant hypoglycemic activity when compared with the glibenclamide (10 mg/kg) treated group.

Next, two sets of longer-term experiments were designed; the first one was aimed to determine the potential of the extract and pure compounds to prevent a hyperglycemic condition in a developing diabetic situation. The second, on the other hand, was used to assess the antidiabetic effect of the extract and pure

compounds using a classical chronic experiment with STZ-induced diabetic rats.

In the first subacute experiment, the STZ-treated rats with a developing diabetic situation used as a control group (Group II) showed a continuous augmentation in glucose blood levels, even at the end of the experiment (432.9 mg/dL, day 15, Table 4). However, when compounds 1 and 3 were daily administered over a period of 15 days *per os* to STZ-treated rats (Table 4), at the doses of 10 or 100 mg/kg per day, they prevented significantly the increase in glucose level, with the 4-phenylcoumarin 3 being more potent than the cucurbitacin 1. At day 15 both compounds (Table 4) at a dose of 10 mg/kg provoked a significant decrease in glucose level with respect to the diabetic control from 432.98 mg/dL to 237.96 mg/dL and 301.98 mg/dL, respectively. At 100 mg/kg the effect of both compounds (Table 4) was higher (from 432.98 mg/dL to 214.56 mg/dL and 268.26 mg/dL, respectively), revealing that the effect of the extract and compounds from *H. standleyana* to prevent the development of an extreme hyperglycemic situation is dose-dependent and comparable to that of glibenclamide. In addition, the results revealed that the groups treated with compounds 1 and 3 or the extract showed significant (*p* < 0.05) augmentation in body weight compared with untreated diabetic rats, after 7, 10 and 15 days of treatment (Table 5). This suggests that the extracts and compounds can prevent weight lost in hyperglycemic rats; this effect was higher than that of glibenclamide.

In the second set of subacute experiments, daily oral administration, of the extract (50 mg/kg each time) and compounds 1 (15 mg/kg each time) and 3 (15 mg/kg each time), twice a day during 30 days, provoked a significantly more pronounced anti-hyperglycemic effect in STZ-diabetic rats (Table 6). Both compounds restored blood glucose levels near to the normal values. These treatments also prevented weight lost in hyperglycemic rats (Table 7); once more, this effect was higher than that of glibenclamide. The doses of the pure compounds were increased up to 30 mg/kg in this experiment to assure a therapeutic effect in an established diabetic condition [24].

Table 4 Effect of the extract, and compounds 1 and 3 on blood glucose levels in a developing diabetes condition in STZ-treated rats

Groups	Blood Glucose (mg/dL)				
	Day 0	Day 3	Day 7	Day 10	Day 15
Normal Control (vehicle)	93.28 ± 4.8	84.93 ± 4.3*	94.67 ± 4.9*	95.64 ± 4.8*	100.72 ± 5.3*
Diabetic Control (Vehicle)	93.33 ± 7.5	187.08 ± 3.8	288.63 ± 30.5	345.69 ± 27.3	432.98 ± 33.2
Glibenclamide (10 mg/kg)	98.72 ± 13.1	168.65 ± 13*	238.25 ± 12.4*	317.66 ± 20.5*	331.39 ± 25.4*
Glibenclamide (100 mg/kg)	93.66 ± 6.59	118.22 ± 4.48*	191.58 ± 10.8*	219.29 ± 7.05*	245.58 ± 13.99*
Extract (10 mg/kg)	98.31 ± 14.8	160.52 ± 18.5*	231.59 ± 21.5	260.25 ± 22.4*	373.57 ± 25.6*
Extract (100 mg/kg)	95.27 ± 5.56	110.56 ± 8.6*	187.95 ± 8.1*	200.52 ± 14.2*	280.65 ± 8.32*
Compound 1 (10 mg/kg)	98.94 ± 11.3	132.62 ± 18.0*	208.06 ± 5.7*	252.69 ± 26.3*	302.80 ± 30.2*
Compound 1 (100 mg/kg)	94.99 ± 7.98	103.26 ± 16.26*	168.45 ± 12.5*	192.85 ± 18.4*	268.26 ± 14.72*
Compound 3 (10 mg/kg)	98.12 ± 12.5	104.18 ± 5.7*	166.04 ± 15.2*	172.9 ± 16.4*	237.14 ± 25.6*
Compound 3 (100 mg/kg)	97.52 ± 7.39	103.51 ± 8.42*	146.52 ± 12.6*	163.41 ± 9.8*	214.56 ± 9.7*

Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group.

* p < 0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's t-test for comparison with the diabetic control group at same time.

Table 5 Effect of the extract, and compounds 1 and 3 on body weight in a developing diabetes condition in STZ-treated rats

Groups	Body Weight (g)				
	Day 0	Day 3	Day 7	Day 10	Day 15
Normal Control (vehicle)	177.5 ± 2.2	171.7 ± 1.5*	201.7 ± 2.8*	219.6 ± 3.2*	234 ± 4.4*
Diabetic Control (Vehicle)	179.6 ± 2.2	154 ± 2.4	165.6 ± 2.3	184.1 ± 3.8	181.8 ± 4.1
Glibenclamide (10 mg/kg)	173.8 ± 1.9	156.8 ± 3.8	173.3 ± 3.8*	195.8 ± 5.2*	199.5 ± 4.8*
Glibenclamide (100 mg/kg)	175.97 ± 3.1	160.4 ± 4.2*	178.78 ± 4.1*	204.87 ± 6.45*	206.91 ± 8.5*
Extract (10 mg/kg)	176 ± 1.1	161.8 ± 3.0*	176.2 ± 5.9*	196.6 ± 6.8*	203.1 ± 6.3*
Extract (100 mg/kg)	178 ± 2.4	166.8 ± 3.8*	180.94 ± 6.4*	207.53 ± 8.2*	209.71 ± 7.5*
Compound 1 (10 mg/kg)	178.6 ± 1.1	162.5 ± 3.5*	181.8 ± 6.9*	208.3 ± 7.9*	215.3 ± 6.5*
Compound 1 (100 mg/kg)	183 ± 3.2	168.34 ± 5.1*	188.69 ± 6.2*	213.75 ± 8.6*	219.64 ± 9.1*
Compound 3 (10 mg/kg)	173.5 ± 2.2	165.6 ± 1.7*	191.6 ± 2.1*	213.6 ± 2.8*	222.3 ± 2.7*
Compound 3 (100 mg/kg)	184 ± 2.5	170.47 ± 4.8*	194.54 ± 4.1*	218.54 ± 5.2*	228.74 ± 4.8*

Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group.

* p < 0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's t-test for comparison with the diabetic control group at the same time.

Table 6 Effect of the extract, and compounds 1 and 3 on blood glucose levels in STZ-induced diabetic rats

Groups	Blood Glucose (mg/dL)							
	Day 0	Day 3	Day 7	Day 10	Day 12	Day 15	Day 21	Day 30
Normal Control (vehicle)	100.5 ± 4.6*	109.7 ± 6.1*	102.7 ± 6.2*	89.6 ± 2.4*	87.7 ± 4.2*	95.8 ± 1.4*	91.0 ± 1.9*	92.0 ± 2.5*
Diabetic Control (Vehicle)	363.3 ± 16.1	406.3 ± 29.9	412.0 ± 11.4	488.0 ± 26.5	503.3 ± 16.5	531.3 ± 27.5	559.6 ± 14.7	580.3 ± 24.1
Glibenclamide (30 mg/kg)	369.3 ± 5.7	466.3 ± 13.5	416.0 ± 16.5	357.6 ± 2.5*	323.3 ± 10.2*	154.6 ± 11.6*	89.0 ± 4.3*	81.0 ± 3.1*
Extract (100 mg/kg)	376 ± 7.9	449.0 ± 10.0	423.6 ± 8.5	395.0 ± 14.8*	341.3 ± 18.5*	335 ± 12.0*	295.3 ± 10.3*	153 ± 29.0*
Compound 1 (30 mg/kg)	386.3 ± 11.1	430.3 ± 9.0	357.3 ± 10.6*	259.3 ± 16.1*	200 ± 11.8*	153.3 ± 5.9*	133.6 ± 7.4*	104.6 ± 12.5*
Compound 3 (30 mg/kg)	382.6 ± 11.3	457.0 ± 7.2	377.3 ± 8.2	327.6 ± 6.9*	285.3 ± 14.1*	204 ± 27.1*	153 ± 17.5*	142.3 ± 4.38*

Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group.

* p < 0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's t-test for comparison with the diabetic control group at same time.

In conclusion, our results demonstrated that the active principles of the Mexican copalchis species of the Rubiaceae family are not only 4-phenylcoumarins glycosides, as previously suggested [9], but also cucurbitacins. The extract and the pure tested compounds were effective for regulation of blood glucose levels in hyperglycemic conditions, both in developing diabetic and dia-

betic situations. In the case of compound 3 a reestablishment of normal blood glucose levels was observed (Table 6). Currently further work is in process to determine the mode of action of these compounds. To our knowledge this is the first report of the antihyperglycemic properties of cucurbitacins, and it is highly probable that the antidiabetic effect exerted by several Cucur-

Table 7 Effect of the extract, and compounds 1 and 3 on body weight in STZ-induced diabetic rats

Groups	Body Weight (g)							
	Day 0	Day 3	Day 7	Day 10	Day 12	Day 15	Day 21	Day 30
Normal Control (vehicle)	213.4 ± 3.8*	241.3 ± 1.5*	249.9 ± 2.9*	256.0 ± 2.7*	265.9 ± 3.5*	274.6 ± 4.2*	281.3 ± 4.48*	288.2 ± 5.47*
Diabetic Control (vehicle)	169.7 ± 5.2	195.8 ± 4.0	207.2 ± 4.7	208.4 ± 4.6	200.1 ± 6.7	198.2 ± 6.3	201.6 ± 7.7	204.2 ± 9.49
Glibenclamide (30 mg/kg)	178.2 ± 7.7	195.8 ± 4.0	210.2 ± 4.0	209.6 ± 3.48	209.1 ± 4.2	212.8 ± 4.9*	211.2 ± 5.4*	216.3 ± 8.89*
Extract (100 mg/kg)	174.2 ± 8.4	200.8 ± 5.9	213.4 ± 9.9	214.2 ± 7.4	223.3 ± 7.0*	228.1 ± 8.1*	235.3 ± 14.2*	249.5 ± 7.4*
Compound 1 (30 mg/kg)	173.6 ± 15.3	205.7 ± 9.42	216.8 ± 9.1	219.3 ± 9.6	224.4 ± 11.28*	228.2 ± 12.4*	245.8 ± 14.8*	253.0 ± 16.4*
Compound 3 (30 mg/kg)	181.7 ± 10.3	200.2 ± 10.3	213.2 ± 11.1	216.5 ± 9.5	221.6 ± 14.1*	225.3 ± 15.0*	231.2 ± 18.1*	245.7 ± 15.2*

Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group.

* p < 0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's t-test for comparison with the diabetic control group at same time.

bitaceae species known to be rich in cucurbitacins, including the extensively investigated *Momordica charantia* L. [3], [27], is due to the presence of such a type of compounds [3], [27], [28], [29], [30], *inter alia*. Finally, our results support the popular use of this Mexican plant to treat diabetes.

Acknowledgements

This work was supported by grants of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Proyecto C01-018) and DGAPA-UNAM IN212005. We are indebted to Jesús Arrieta for his assistance during the performance of the acute antidiabetic assays, and to Celso Guerrero for recollecting and identifying the plant material. The technical assistance of Isabel Rivero-Cruz, Laura Acevedo, Rosa del Villar, Marisela Gutiérrez and Georgina Duarte-Lisci is also recognized. We also acknowledge one of the referees of this manuscript for valuable suggestions. J. A. Guerrero-Analco acknowledges fellowships from CONACyT and Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM, to carry out graduate studies.

References

¹ Burke JP, Williams K, Narayan KMV, Leibson C, Haffner SM, Stern MP. A population perspective on diabetes prevention: whom should we target for preventing weight gain?. *Diabetes Care* 2003; 26: 1999-2004

² Kecskemeti V, Bagi Z, Pacher P, Posa I, Kocsis J, Koltai MZ. New trends in the development of oral antidiabetic drugs. *Curr Med Chem* 2002; 9: 53-71

³ Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 1995; 2: 137-89

⁴ Subash-Babu P, Mainzen-Prince PS. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of hyponid, an ayurvedic herbomineral formulation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 1435-42

⁵ Landa E. *Anales del Instituto Medico Nacional*. Mexico 1913; 12: 146

⁶ Terres J. *Anales del Instituto Medico Nacional*. Mexico 1913; 12: 109

⁷ Martinez M. *Las Plantas Medicinales de Mexico*; 6ª Ed Mexico: Ediciones Botas, 1989; pp 85-7

⁸ Kaiser H, Geyer H. Zur Pharmakognosie der Rinde von *Coutarea latiflora* D. C. *Arch Pharm*, 1955: 535 (Chemie); 595 (Pharmakologie)

⁹ Korec R; Heinz-Sensch K, Zoukas T. Effects of the neoflavonoid coutareagenin, one of the antidiabetic active substances of *Hintonia latiflora*, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Drug Research* 2000; 50: 122-8

¹⁰ Slijepcevic M, Kraus L. Diabetische Mäuse als Prüfmodell für hypoglykämische Aktivitäten von Pflanzenextrakten und Insulinpräparaten. *Acta Ther* 1997; 23: 47

¹¹ Khur R. *Orale Diabetestherapie mit einem Euphorbiaceenextrakt*. Landarzt 1953; 29: 1

¹² Bastien M. *Recherches sur les copalchis, drogues hypoglycémiantes et en particulier sur le Coutarea latiflora DC (Rubiaceae)*. Dissertation Faculté de Pharmacie de l'Université Paris, 1961

¹³ Pinto A, Capasso A, Sorrentino L. Experimental animal studies on the hypoglycemic effects of a copalchi extract. *Drug Research* 1997; 47: 829-33

¹⁴ Schimid P. *Bericht über die Behandlung mit dem peroralen Antidiabetikum Sucontral*. Konstanz: Sonderdruck, 1951

¹⁵ Mata R, Camacho M, Cervera E, Bye R, Linares E. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 1990; 29: 2037-40

¹⁶ Mata R, Calzada F, Garcia M. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine. VI: Additional new 4-phenylcoumarins from *Exostema caribeum*. *J Nat Prod* 1988; 51: 851-6

¹⁷ Mata R, Calzada F, Garcia M, Reguero M. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine. III: New 4-phenylcoumarins from *Exostema caribeum*. *J Nat Prod* 1987; 50: 866-70

¹⁸ Reher G, Kraus L. New neoflavonoids from *Coutarea latiflora*. *J Nat Prod* 1984; 47: 172-4

¹⁹ González Chévez L, Hersch Martínez P, Juárez Miranda A, Pérez Cardona A. *Plantas Medicinales de Copalillo y Temalac, Guerrero, Serie Patrimonio Vivo 5*. Mexico: Actores Sociales de la Flora Medicinal en México, 2000; pp 27-8

²⁰ Reguero M, Mata R, Bye R, Linares E, Delgado G. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine. II: Curcubitacins from *Hintonia latiflora*. *J Nat Prod* 1987; 50: 315-6

²¹ Mata R, Camacho M, Mendoza S, Cruz MC. A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 1992; 31: 3199-201

²² Mata R, Albor C, Pereda-Miranda R, McLaughlin JL. Cytotoxic constituents of *Exostema mexicanum*. *Planta Med* 1990; 56: 241

²³ Bullock A. A. *Hooker's Icones Plantarum, Tabula 3295*. London: 1935; pp 1-8

²⁴ Verspohl EJ. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med* 2002; 68: 581-90

²⁵ Sharma SR, Dwivedi SK, Swarup D. Hypoglycaemic antihyperglycaemic and hypolipidemic activities of *Caesalpinia bonducella* seeds in rats. *J Ethnopharmacol* 1997; 58: 39-44

²⁶ Aquino R, D'Agostino M, De Simone F, Pizzi C. 4-Arylcoumarin glycosides from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry* 1988; 27: 1827-30

²⁷ Virdi J, Sivakami S, Shahani S, Suthar AC, Banavalikar MM, Biyani MK. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. *J Ethnopharmacol* 2003; 88: 107-11

²⁸ Perez RM, Zavala MA, Perez S, Perez C. Antidiabetic effect of compounds isolated from plants. *Phytomedicine* 1998; 5: 55-75

²⁹ Alarcon-Aguilar FJ, Hernandez-Galicia E, Campos-Sepulveda AE, Xolapa-Molina S, Rivas-Vilchis JF, Vazquez-Carrillo Llet al. et al. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. *J Ethnopharmacol* 2002; 82: 185-9

³⁰ Diatewa M, Badila-Samba C, Hondi-Assah CH, Abena AA. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of diethyl ether fraction isolated from the aqueous extract of the leaves of *Cogniauxia podoleana* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2004; 92: 229-32



Antinociceptive activity of 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae)[☆]

Myrna Déciga-Campos^{a,b}, José A. Guerrero-Analco^b, Leovigildo Quijano^c, Rachel Mata^{b,*}

^a Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos, 1210, Mexico

^b Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma de México, Mexico City, D.F. 04510, Mexico

^c Instituto de Química, Universidad Autónoma de México, Mexico City, D.F. 04510, Mexico

Received 18 November 2005; received in revised form 13 February 2006; accepted 18 February 2006

Abstract

Oral administration of a MeOH–CH₂Cl₂ (1:1) extract of the stem bark of *Hintonia standleyana* (HSE) produced a dose-dependent antinociceptive effect when tested in mice using the writhing (150–750 mg/kg) and the hot-plate (150–600 mg/kg) models. From the active extract 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (GDHCF), 5-*O*-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (AG4-PC) and desoxycordifolinic acid (DCA) were isolated. GDHCF (10–100 mg/kg, p.o.) significantly reduced acetic acid-induced abdominal contortions and increased the hot-plate latency in comparison to vehicle-treated mice. Metamizol (50–100 mg/kg) and morphine (2.5–5 mg/kg) were used as positive controls, respectively. GDHCF-induced antinociception was partially blocked by naloxone (1 mg/kg, i.p.), L-NAME (150 mg/kg, i.p.) and glibenclamide (10 mg/kg, i.p.) suggesting that its pharmacological effect could be due to the activation of the nitric oxide pathway, followed by the opening of the ATP-sensitive K⁺ channels, as well as an activation of the opioid receptors. © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Hintonia standleyana*; Rubiaceae; Cucurbitacins; Antinociception; 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F; Desoxycordifolinic acid; Inflammatory pain

1. Introduction

Hintonia standleyana Bullock (Rubiaceae), known in Mexico with the popular names of “copalchi”, “quina amarilla” and “falsa quina” (false quina), is used to treat diabetes and complains associated with malaria (González-Chevez et al., 2000). According to Bullock (Bullock, 1935), *H. standleyana* is distinguished from the related species *Hintonia latiflora* by the small, almost smooth fruit, which is not lenticellate as that of *H. latiflora*, and by the absence of bracteoles. In a previous investigation, it was demonstrated that an extract (100 mg/kg) of the stem bark of *H. standleyana* did cause a significant decrease in blood glucose levels, in both normal and streptozotocin (STZ)-diabetic rats when compared with vehicle-treated groups (Guerrero-Analco et al., 2005). 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (GDHCF), 5-*O*-β-D-glucopyranosyl-

7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin and 5-*O*-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (AG4-PC) were isolated from the active extract (Guerrero-Analco et al., 2005). GDHCF and AG4-PC did not decrease blood glucose levels in normal rats. However, in two different long term subacute experiments, using animals with a developing diabetes condition and with STZ-induced diabetes, both compounds at daily doses of 10 mg/kg (developing diabetes condition) or 30 mg/kg (STZ-induced diabetes condition) provoked a significant antihyperglycemic activity. Furthermore, AG4-PC restored near to normal the blood glucose levels in STZ-induced diabetic rats. In all cases, the groups treated with the active principles and the extract showed less body weight lost than the glibenclamide-treated and diabetic control groups.

The use of *H. standleyana* for treating the symptoms of malaria (fevers, pains and chilling) in folk medicine suggested the presence of compounds with analgesic/and or anti-inflammatory properties; in order to corroborate this hypothesis the present investigation was undertaken to establish the

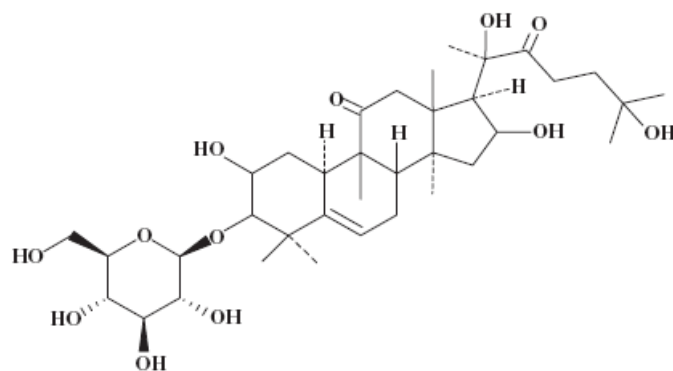
[☆] This work was taken in part from the PhD thesis of J.A. Guerrero-Analco.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5289.

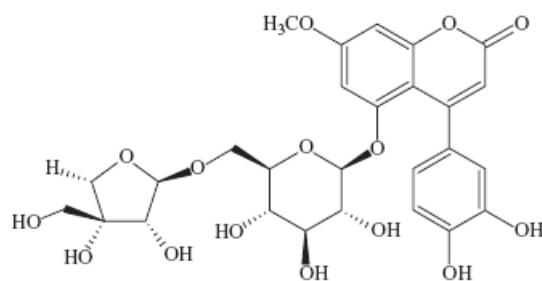
E-mail address: rachel@servidor.unam.mx (R. Mata).

antinociceptive effect of an extract and constituents of the plant. Two well known animal models were used in this study to accomplish such endeavor, the writhing and the hot-plate tests (Woolfe and MacDonald, 1944; Eddy and Leimbach, 1953; Collier et al., 1968; Chiang and Zhuo, 1989; Le Bars et al., 2001). The methods were selected because of their usefulness to investigate peripheral and central mediated effects, respectively. In addition, this work was carried out to complete the pharmacological profile of *H. standleyana* in

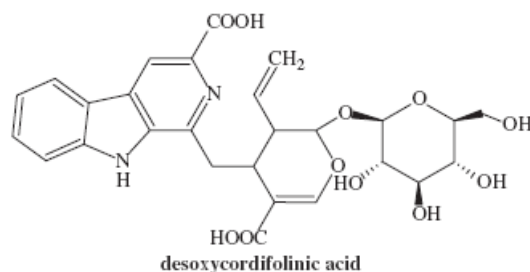
order to integrate a scientific monograph on this plant; such monograph, alike to those published by the American Herbal Pharmacopoeia, the European Scientific Cooperative of Phytotherapy and the World Health Organization for several medicinal plants, would permit better assessment of this very Mexican plant. Herein, we report the analgesic effect of a crude extract and some metabolites isolated from the plant namely, GDHCF, AG4-PC as well as desoxycordifolinic acid (DCA) (Fig. 1).



3-O- β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F



5-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)- β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin



desoxycordifolinic acid

Fig. 1. Chemical structures of 3-O-β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (GDHCF), 5-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (AG4-PC), desoxycordifolinic acid (DCA) obtained from the extract of *Hintonia standleyana*.

2. Methods

2.1. Plant material

The stem bark of *H. standleyana* Bullock was collected in Atenango del Rio, Guerrero (Mexico) in January 2003. A voucher specimen (P. Hersch No 824) was deposited at the ASFM-INAH Herbarium, Cuernavaca, Mexico.

2.2. General procedures

Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded as KBr pellets or films on a Perkin-Elmer 59913 spectrophotometer. Optical rotations were registered on a Perkin-Elmer 241 digital polarimeter. NMR spectra were recorded on a Varian Unity Plus-500 spectrometer in CD₃OD, either at 500 MHz (¹H) or 125 (¹³C) MHz, using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. EIMS were obtained on a JMS-AX505HA mass spectrometer. Positive FABMS data were obtained in a JEOL SX 102 mass spectrometer using a NBA matrix. HPLC was carried out with a Waters instrument equipped with Waters 996 UV photodiode array detector (900) set at 208–215 nm, using a Symmetry® C-18 5 μ column (4.6 mm i.d. × 250 mm) at a flow rate of 0.4 mL/min. Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic information were performed by the Millennium 2000 software program (Waters). The analyses were achieved using CH₃CN–H₂O (8:2) as mobile phase. TLC analyses were performed on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck), and visualization of plates was carried out using ceric sulfate (10%) or *N,N'*-dimethyl-aminebenzaldehyde (10% in EtOH) reagents.

2.3. Extraction and isolation of compounds GDHCF, AG4-PC and DCA

Dried and shredded stem bark (900 g) was macerated with CH₂Cl₂–MeOH (1:1) (5L × 3) during 6 days at room temperature. The combined extracts were evaporated in vacuo to yield 200 g of a brown residue. The dried extract was chromatographed in a glass column packed with silica gel (2 kg) eluting with hexane–EtOAc (1:1 → 0:1) and EtOAc–MeOH (1:0 → 0:1) to yield ten primary fractions (FH1–FH10). Fraction FH4 (8.5 g), eluted with EtOAc–MeOH (9:1), was further chromatographed over a silica gel column using CH₂Cl₂–EtOAc–MeOH (47.5:47.5:5) as a mobile phase to give ten fractions (FH4I–FH4X). From fraction FH4V spontaneously crystallized 300 mg of pure GDHCF (Fig. 1), mp = 199–204 °C, identical to an authentic sample isolated from *H. latiflora* (Mata et al., 1990). After elimination of the solvent from the mother liquors of fraction FH4V, 3.6 g of a white crystal containing mainly GDHCF was obtained. HPLC analysis of this material revealed that GDHCF [*R*_t (retention time) = 9.0 min] represented ~75% of fraction FH4V. Thus, the total yield of GDHCF was ~0.3% of the dry plant material. Further column chromatography over silica gel (190 g) of FH8 (10 g), eluted with CH₂Cl₂–MeOH (7:3), using CH₂Cl₂–MeOH (9.5:0.5 → 0:1) as mobile phase

yielded seven secondary fractions, FH8I–FH8VII. From fraction FH8IV eluted with CH₂Cl₂–MeOH (7:3), crystallized 1.2 g of AG4-PC (Fig. 1), mp > 300 °C (Guerrero-Analco et al., 2005). From primary fraction X (30 g), eluted with CH₂Cl₂–MeOH (1:1), was purified by column chromatography on silica gel (300 g) using a gradient of CH₂Cl₂–MeOH (9:1 → 1:1) to yield thirteen secondary fractions (FHX-I–FHX-XIII). Fraction XII eluted with CH₂Cl₂–MeOH (1:1), yielded 300 mg of DCA (Fig. 1), mp > 300 °C.

2.4. Identification of GDHCF, AG4-PC and DCA

All the spectra of GDHCF and AG4-PC were identical to those of authentic samples (Guerrero-Analco et al., 2005). DCA was characterized by comparison of its spectral data with those previously described (Adeoye and Waigh, 1983): Glassy white solid; [α]_D: –80.5° (c 0.02, MeOH); UV λ_{\max} (methanol) 236, 262 and 268 nm; IR (KBr): ν_{\max} = 3412, 1690, 1624, 1593, 1560, 1389, 1324, 1250, 1080 cm⁻¹ [¹³C]-NMR (CDOD₃, 125 MHz); δ_C 137.1 (C-2), 146.8 (C-3), 142.9 (C-5), 115.4 (C-6), 130.9 (C-7), 122.9 (C-8), 123.0 (C-9), 121.6 (C-10), 130.2 (C-11), 113.1 (C-12), 143.3 (C-13), 35.5 (C-14), 39.6 (C-15), 116.5 (C-16), 150.4 (C-17), 118.6 (C-18), 135.4 (C-19), 46.2 (C-20), 97.6 (C-21), 172.7 (C-22), 173.3 (C-23), 101.1 (C-1'), 74.7 (C-2'), 78.0 (C-3'), 72.0 (C-4'), 78.6 (C-5') and 63.3 (C-6'); [¹H]-NMR (CDOD₃, 500 MHz) δ_H 8.75 (1H, s, H-6), 8.23 (1H, brd, *J* = 8.0, H-9), 7.32 (1H, ddd, *J* = 8.0, 8.0, 1.0, H-10), 7.61 (1H, ddd, *J* = 8.0, 8.0, 1.0, H-11), 7.65 (1H, ddd, *J* = 8.0, 1.0, 1.0, H-12), 3.46 (1H, dd, *J* = 14.5, H-14a), 3.20 (1H, brd, *J* = 14.5, H-14b), 3.56 (1H, dd, *J* = 8.5, 6.0, H-15), 7.42 (1H, s, H-17), 4.28 (1H, brd, *J* = 10.5, H-18a), 4.81 (1H, brd, *J* = 18.5, H-18b), 5.70 (1H, ddd, *J* = 18.5, 10.5, 8.0, H-19), 2.58 (1H, ddd, *J* = 8.5, 8.5, 5.5, H-20), 5.72 (1H, d, *J* = 8.5, H-21), 4.82 (1H, d, *J* = 7.5, H-1'), 3.18 (1H, dd, *J* = 8.0, 9.0, H-2'), 3.42 (1H, dd, *J* = 9.0, 9.0, H-3'), 3.21 (1H, dd, *J* = 10.0, 9.0, H-4'), 3.45 (1H, m, H-5'), 4.09 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.0, H-6'a) and 3.72 (1H, dd, *J* = 12.0, 7.5, H-6'b); HRFABMS: *m/z* = 557.5271 [M+H]⁺ (calcd. for C₂₇H₂₉N₂O₁₁: 557.518); FABMS: *m/z* = 579 [M+Na], 557 [M+H], 513 [M-CO₂], 468 [M-2CO₂], 415 [M-180+K], 399 [M-180+Na].

2.5. HPLC analysis of an infusion of the stem bark of *H. standleyana*

Dried and shredded stem bark (20 g) was treated with boiling water (250 mL) during 30 min. The resulting extract was analyzed by HPLC using the same conditions above indicated; the resulting analytical chromatogram revealed the presence of three major organic compounds: AG4-PC (*R*_t = 20.0 min), GDHCF (*R*_t = 8.0 min) and DCA (*R*_t = 8.5 min) in a ratio of 3:1:1 approximately. The peaks were identified by coelution with authentic samples.

2.6. Drugs

HSE, GDHCF, AG4-PC and DCA were isolated from *H. standleyana*. *N*^G-L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME),

glibenclamide, and naloxone were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The extract, GDHCF, AG4-PC and DCA were suspended in 0.2% Tween-80. Morphine was purchased from Laboratorios Pisa (Mexico City). Metamizol was a gift of Aventis Pharma (Mexico City). L-NAME, naloxone, morphine and metamizol were dissolved in saline solution. Glibenclamide was dissolved in a saline solution of dimethylsulfoxide (DMSO 2%).

2.7. Animals

Experiments were performed on male mice ICR (body weight range, 25–30 g), from Centro UNAM/Harlan (Harlan Mexico, S.A. de C.V). All experiments followed the Guidelines on Ethical Standards for Investigation of Experimental Pain in Animals (Zimmerman, 1983) and Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999). Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Mice were only used one time. Mice were housed in a climate-and light-controlled room with a 12-h light/dark cycle. Twelve hours before experiments, food was withheld, but animals had free access to drinking water. The CH₂Cl₂–MeOH (1:1) extract of *H. standleyana* and isolated compounds were suspended in vehicle (Tween-80, 2% in saline solution). At the end of the experiment, animals were euthanized. No side effects were observed in any of the studied groups of animals.

2.8. Measurement of antinociceptive activity

2.8.1. Acetic acid-induced writhing

The acetic acid-induced writhing test was performed in mice as previously described (Koster et al., 1959). The CH₂Cl₂–MeOH (1:1) extract of *H. standleyana* (100–750 mg/kg in 0.2% Tween-80) or isolated compounds (GDHCF: 10–100 mg/kg; AG4-PC: 100 mg/kg and DCA: 100 mg/kg) were administered 30 min before intraperitoneal (i.p.) injection of 0.6% acetic acid (10 ml/kg). Control animals received a similar volume of vehicle (0.2% Tween-80) or the positive control (metamizol, 50–100 mg/kg, p.o.). Animals were then placed in an observation box, and the abdominal constrictions were counted cumulatively over a period of 30 min. Antinociceptive activity was expressed as the reduction in the number of abdominal constrictions, i.e., the differences between control animals and animals pretreated with the extract or pure compounds.

2.8.2. Hot-plate test

The conventional hot-plate apparatus (Ugo Basile, Italy) was also used to measure the nociceptive response (Woolfe and MacDonald, 1944; Eddy and Leimbach, 1953). Mice were placed into an acrylic cylinder on the heated surface (55.5 ± 0.2 °C), and the time between placement and shaking or licking of the paws, or jumping was recorder as the response latency. The extract (150–600 mg/kg) and all substances (GDHCF: 10–100 mg/kg; AG4-PC: 100 mg/kg and DCA: 100 mg/kg) were administered 30 min before beginning the experiment. Mice were observed before and at 30, 60, 90 and

120 min after drugs administration. A cutoff of 30 s was used to avoid injury. Morphine (2.5–5 mg/kg, p.o.) was used as positive control.

2.9. Analysis of possible mechanism of action of GDHCF

The possible mechanisms by which GDHCF caused antinociception in the hot-plate test were investigated pre-treating (–15 min) mice with L-NAME (150 mg/kg, i.p. in saline solution), glibenclamide (10 mg/kg, i.p. in DMSO 2%) or naloxone (1 mg/kg, i.p. in saline solution); then, GDHCF (100 mg/kg, p.o.) was administered and the antinociceptive effect recorded as described above.

2.10. Acute toxicity study in mice

Mice were treated with doses of 10, 100, 1000, 1600, 2900 and 5000 mg/kg of the crude extract. The animals were kept under close observation over a period of 14 days as described elsewhere (Lorke, 1983). Restlessness, respiratory distress, convulsions, diarrhea, motor activity, posture and reflexes were qualitatively determined. In addition, internal organs (stomach, heart, lung, liver, kidneys, etc.) were removed and examined under dissecting microscope to detect internal lesions. Finally, the weight of the animals was monitored throughout the experiments.

2.11. Statistical analysis

All experimental results are given as the mean ± S.E.M. of the data obtained in 6 animals per group. Curves were constructed plotting the number of writhes or latency as a function of time. The area under the latency against time curves (AUC), an expression of the duration and intensity of the effect, was calculated by the trapezoidal rule. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test was used to compare differences between treatments. Differences were considered to reach statistical significance when $P < 0.05$.

3. Results and discussion

In order to assess any potential toxic effects of *H. standleyana*, mice were treated orally with increasing doses (10–5000 mg/kg) of its crude extract (Lorke, 1983). Treated mice did not present behavioral alterations during the experiment. In addition, no lesions or bleedings were observed in the organs removed. Since no death or damage was observed throughout the experiment, the LD₅₀ of the extract must be higher than 5000 mg/kg. The lack of toxicity of the extract in mice, the long term use of *H. standleyana* in Mexican folk medicine as well as our previous enduring experiments on diabetic rats are good indicators of the safety of the herbal preparations made up with the plant.

Oral administration of an extract *H. standleyana* significantly reduced ($P < 0.05$) the number of abdominal constrictions in a dose-dependent manner when tested in the writhing model (Fig. 2A). The effect was similar to that of metamizol, a

standard analgesic drug used as a positive control (Abbott and Hellemans, 2000). Moreover, the extract was also able to significantly increase ($P < 0.05$) latency to thermal stimuli in the hot-plate test (Fig. 2B) but in this case the pharmacological action was lower than that of morphine (positive control). Altogether, these results supported that *H. standleyana* reduce inflammatory and nociceptive pain in mice.

In order to determine the analgesic principles of the plant, the effect of some compounds isolated from the active extract was determined in both nociceptive models. The tested substances included GDHCF, AG4-PC and DCA. Compounds AG4-PC and DCA were not active in both pain models. On the other hand, oral administration of GDHCF reduced acetic acid-induced abdominal contractions (Fig. 3A) in a dose-related fashion. The effect produced by GDHCF at 100 mg/kg was comparable to that of metamizol (100 mg/kg) (Fig. 3B). The level of activity displayed by GDHCF in this model could be related with the ability of some triterpenoids to inhibit the synthesis of prostaglandin E_{21} (Peters et al., 1999). Further work is in progress to evaluate this possibility.

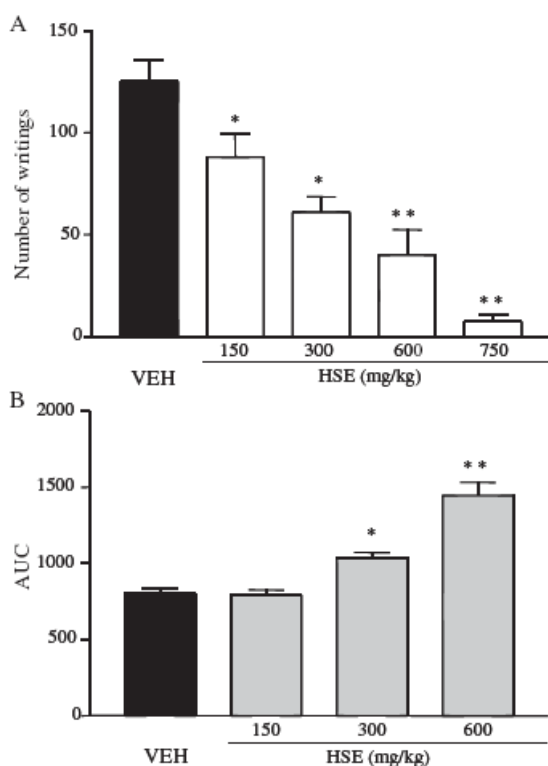


Fig. 2. Antinociceptive effect of the CH_2Cl_2 -MeOH extract of *Hintonia standleyana* (HSE) in mice submitted to the writhing (panel A) and hot-plate (panel B) tests. The extract was administered orally 30 min before the tests. Number of writhes was counted over a 30-min period following the injection of 0.6% acetic acid. Thermal latency was assessed during 2 h. Data in the writhing test are the total number of writhes in 30 min, whereas that data in the hot-plate test are the area under the latency against time curve (AUC). In both cases bars are the means of six mice \pm S.E.M. *Significantly different from vehicle group ($P < 0.05$) and **significantly different from the vehicle (VEH) group ($P < 0.01$), as determined by analysis of variance followed by the Tukey's test.

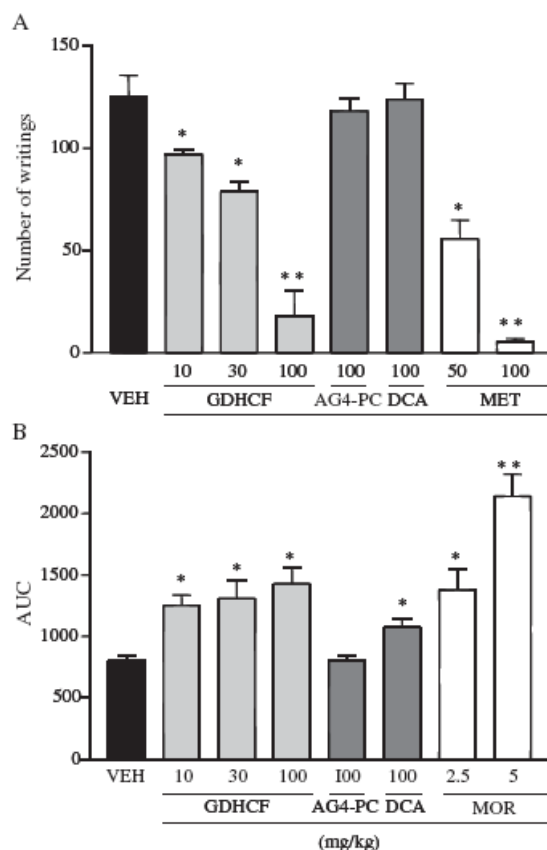


Fig. 3. Antinociceptive effect of 3-O- β -D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocurbitacin F (GDHCF), 5-O-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (AG4-PC) and desoxycordifolinic acid (DCA) in mice submitted to the writhing (panel A) and hot-plate (panel B) tests. Drugs were administered orally 30 min before the tests. Metamizol (MET, used as positive control in the writhing test) and morphine (MOR, used as positive control in the hot-plate test) were given 15 min before the noxious stimulation. Number of writhes was counted over a 30-min period following the injection of 0.6% acetic acid. Thermal latency was assessed during 2 h. Data in the writhing test are the total number of writhes in 30 min, whereas that data in the hot-plate test are the area under the latency against time curve (AUC). In both cases bars are the means of six mice \pm S.E.M. *Significantly different from vehicle (VEH) group ($P < 0.05$) and **significantly different from the vehicle group ($P < 0.01$), as determined by analysis of variance followed by the Tukey's test.

In the hot-plate model, GDHCF (100 mg/kg) increased the pain latency (Fig. 3B) but its action was lower than that provoked by morphine (5 mg/kg). Thus, the results clearly reveal that GDHCF is able to produce antinociception in central and peripheral pain models in mice.

HPLC analysis of the infusion of the plant revealed the presence of three major organic compounds in a ratio \sim 3:1:1. The compounds were identified by coelution with authentic samples as AG4-PC, DCA and GDHCF, respectively. AG4-PC and DCA were not active in both assays performed in this investigation therefore the major antinociceptive active principle of the plant is GDHCF. Considering the total yield of GDHCF in the crude extract, the doses used for testing seems to

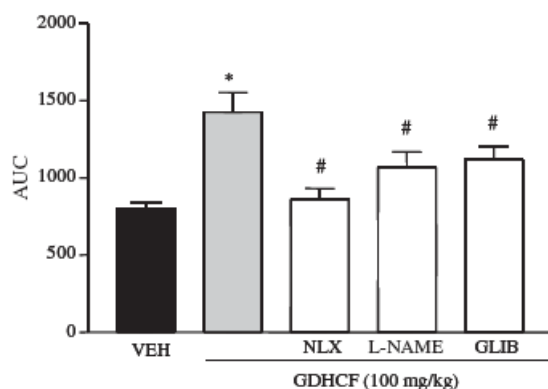


Fig. 4. Effect of naloxone (NLX), N^G -L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME), and glibenclamide (GLIB) on the antinociceptive effect produced by 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-23 24-dihydrocucurbitacin F (GDHCF) in the hot-plate test. Mice were pretreated (–15 min) with either L-NAME (10 mg/kg, i.p.), glibenclamide (10 mg/kg, i.p.) or naloxone (1 mg/kg, i.p.) before 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-23 24-dihydrocucurbitacin F (GDHCF) (100 mg/kg) administration and 30 min after the thermal latency was assessed. Data are expressed as the area under the latency response to 55.5°C against time curve (AUC). Each point indicates the mean of six mice \pm S.E.M. *Significantly different from vehicle (VEH) group ($P < 0.05$) and #significantly different from the 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-23 24-dihydrocucurbitacin F (GDHCF) group ($P < 0.05$), as determined by analysis of variance followed by the Tukey's test.

be in agreement with the amount detected of this compound in the traditional preparation (i.e. infusion).

To our knowledge this is the first report on the antinociceptive effect of cucurbitacin-type of compounds, which then represent new leads for the development of analgesic drugs. Furthermore, 23,24-dihydrocucurbitacins did not exhibited the cytotoxic properties of the related analogs possessing a 23,24 double bond (Rahman et al., 1973; Fang et al., 1984; Mata, 1993).

Next, to asses the possible mode of action of GDHCF, its antinociceptive action was determined in mice pretreated with L-NAME, glibenclamide or naloxone, using the hot-plate model. According to the results shown in Fig. 4, the effect of GDHCF (100 mg/kg) was blocked by the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME, suggesting that its action involves the activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway at peripheral and/or central levels (Duarte et al., 1990; Duarte and Ferreira, 1992; Tonussi and Ferreira, 1994; Lorenzetti and Ferreira, 1996; Granados-Soto et al., 1995; 1997; Nozaki-Taguchi and Yamamoto, 1998; Islas-Cadena et al., 1999).

The analgesic activity of GDHCF was also blocked by glibenclamide, an ATP-sensitive K^+ channel blocker. It has been reported that glibenclamide specifically blocks ATP-sensitive K^+ channels, with no effect on Ca^{2+} - or voltage-dependent K^+ channels (Amoroso et al., 1990; Davies et al., 1991; Edwards and Weston, 1993). Therefore, our data suggest that opening of ATP-sensitive K^+ channels might be related with the analgesic action of this cucurbitacin.

It is likely that GDHCF could have a mechanism of action similar to diclofenac, metamizol, ketorolac, sodium nitropruside and morphine all of which activate the nitric oxide-cyclic

GMP- K^+ channel pathway. (Carrier et al., 1997; Rodrigues and Duarte, 2000; Soares et al., 2000; Lázaro-Ibáñez et al., 2001; Alves and Duarte, 2002; Ortiz et al., 2002; Alves et al., 2004).

Finally, the opiate receptor antagonist naloxone (1 mg/kg) significantly reversed GDHCF-induced antinociception, suggesting an activation of opioid receptors and/or an increment of endogenous opioids might be involved in the antinociceptive effect of GDHCF, as well (Bjorkman et al., 1990).

The information generated in this study indicates that *H. standleyana* and one of its major metabolite, namely GDHCF, have antinociceptive effect in the writhing and hot-plate tests in mice. The antinociceptive mode of action of this compound seems to be due to the activation of the nitric oxide pathway, followed by the opening of the ATP-sensitive K^+ channels, as well as an activation of the opioid receptors. The results also tend to support the popular use of the species in folk medicine for the treatment of painful complaints.

From the chemotaxonomic point of view this work represents the first report of alkaloids in the genus *Hintonia*. The presence of this type of compounds in this genus was questioned for several years because the antipaludic alkaloid quinine could not be found in the related species *H. latiflora*. The involvement of the alkaloid DCA in the claimed antipaludic effect of this plant remains an open question.

Acknowledgements

This research was supported by a CONACYT grant (COI-018) and DGAPA IN212005. Myrna Déciga-Campos is a DGAPA-UNAM postdoctoral fellow. We are indebt to Dr. Vinicio Granados-Soto for valuable discussion and suggestions. We also are grateful to Dr. Jorge E. Torres-López for facilitating the hot plate equipment and to Isabel Rivero, Laura Acevedo, Guadalupe Ángeles and Gabriela Castañeda for technical assistance.

References

Abbott FV, Hellems KG. Phenacetin, acetaminophen and dipyrone: analgesic and rewarding effects. *Behav Brain Res* 2000;112:77–186.

Adeoye A, Waigh R. Desoxycordifolinic Acid from *Nauclea diderrichii*. *Phytochemistry* 1983;22:2097–8.

Alves DP, Duarte ID. Involvement of ATP-sensitive- K^+ channel in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. *Eur J Pharmacol* 2002;444:47–52.

Alves DP, Tatsuo MA, Leite R, Duarte ID. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K^+ channels activation. *Life Sci* 2004;74:2577–91.

Amoroso S, Schmid-Antomarchi H, Fossier M, Lazdunski M. Glucose, sulfonyleureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K^+ channels. *Science* 1990;247:52–4.

Bjorkman R, Hedner J, Hedner T, Henning M. Central, naloxone-reversible antinociception by diclofenac I the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1990;342(2):171–6.

Bullock A. A. Hooker's *Icones Plant* 1935;33:1–8.

Carrier GO, Fuchs LC, Winecuff AP, Giulianum AD, White RE. Nitrovasodilator relax mesenteric microvessels by cGMP-induced-stimulation of Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Am J Physiol* 1997;273:H76–83.

Chiang CY, Zhuo M. Evidence for the involvement of a descending cholinergic pathway in systemic morphine analgesia. *Brain Res* 1989;478:293–300.

- Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesics drugs in the mouse. *Br J Pharmacol* 1968;32:295–310.
- Davies NM, Petti AI, Agarwal R, Tanden NB. The flickery block of ATP-dependent potassium channels of skeletal muscle by internal 4-aminopyridine. *Pflugers Arch* 1991;419:25–31.
- Duarte ID, Ferreira SH. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1992;221:171–4.
- Duarte ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1990;186:289–93.
- Eddy NN, Leimbach D. Synthetic analgesic: II. Dithienyl-butenyl and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1953;107:385–8.
- Edwards G, Weston AH. Induction of a glibenclamide-sensitive K-current by modification of a delayed rectifier channel in rat portal vein in insulinoma cells. *Br J Pharmacol* 1993;110:1280–1.
- Fang X, Phoebe CH, Pezzuto JM, Fong HHS, Farnsworth NR, Yellin B, et al. Plant anticancer agents: XXXIV. Cucurbitacins from *Elaeocarpus dolichostylus*. *J Nat Prod* 1984;47:988–93.
- González-Chevez I, Hersch-Martínez P, Juárez Miranda A, Pérez Cardona A. Plantas medicinales de Copalillo y Temalac, Guerrero. Serie Patrimonio Vivo 5, México: Actores Sociales de la Flora Medicinal en México; 2000. p. 27–8.
- Granados-Soto V, Flores Murieta FJ, Castañeda-Hernández G, López-Muñoz FJ. Evidence for the involvement of nitric oxide in the antinociceptive effect of ketorolac. *Eur J Pharmacol* 1995;277:281–4.
- Granados-Soto V, Rufino M, Gomes-López LD, Ferreira SH. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 1997;340:177–80.
- Guerrero-Analco JA, Hersch-Martínez P, Pedraza-Chaverri J, Navarrete A, Mata R. Antihyperglycemic effect of constituents from *H. standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med* 2005;71:1099–105.
- Islas-Cadena M, Aguirre-Banuelos P, Granados-Soto V. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive effect of nimesulide. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1999;42:87–92.
- Koster R, Anderson M, De Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 1959;18:412.
- Lázaro-Ibáñez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V. Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K(+) channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol* 2001;426:39–44.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001;53:597–652.
- Lorenzetti BB, Ferreira SH. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm Res* 1996;45:308–11.
- Lorke D. A new approach to partial acute toxicity testing. *Arch Toxicol* 1983;54:275–87.
- Mata R. Chemical studies and biological aspects of some Mexican plants used in traditional medicine. In: Downum KR, Romeo JT, Stafford HA, editors. Photochemical potential of tropical plants. Recent Advances in Phytochemistry. New York: Plenum Press; 1993. p. 41–64.
- Mata R, Camacho M, Cervera E, Bye R, Linares E. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 1990;29:2037–40.
- Nozaki-Taguchi N, Yamamoto T. Involvement of nitric oxide in peripheral antinociception mediated by kappa and delta-opioid receptors. *Anesth Analg* 1998;87:388–93.
- Ortiz MI, Torres-López JE, Castañeda-Hernández G, Rosas R, Vidal-Cantu GC, Granados-Soto V. Pharmacological evidence for the activation of K(+) channel by diclofenac. *Eur J Pharmacol* 2002;438:85–91.
- Peters RR, Saleh TF, Lora M, Patry C, de Brum-Fernandes AJ, Farias MR, et al. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. *Life Sci* 1999;64:2429–37.
- Rahman AU, Ahmed VU, Khan MA, Zehra F. Isolation and structure of cucurbitacin Q1. *Phytochemistry* 1973;12:2741–3.
- Rodrigues AR, Duarte ID. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. *Br J Pharmacol* 2000;129:110–4.
- Soares AC, Leite R, Tatsuo AF, Duarte ID. Activation of ATP-sensitive-K⁺ channel: mechanisms of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusiate, cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. *Eur J Pharmacol* 2000;400:67–71.
- Tonussi CR, Ferreira SH. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* 1994;251:173–9.
- Woolfe G, MacDonald A. The evaluation of analgesic of phetidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther* 1944;80:300–5.
- Zimmerman M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.

Date: May 04, 2007
To: "Rachel Mata" rachel@servidor.unam.mx
From: phytochem@wsu.edu
Subject: Decision on Your Submission PHYTOCHEM-D-06-00847R1

Ms. Ref. No.: PHYTOCHEM-D-06-00847R1
Title: ANTIDIABETIC PROPERTIES OF SELECTED MEXICAN COPALCHIS OF THE
RUBIACEAE FAMILY
Phytochemistry

Dear Dr. Mata,

Your manuscript entitled, "Antidiabetic Properties of Selected Mexican Copalchis of the Rubiaceae Family" was received in revised form on 4/18/2007 and has been scientifically edited and sent to press.

With my very best wishes.

Yours sincerely,

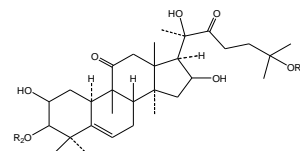
Norman G. Lewis
Regional Editor
The Americas and Asia

Revised PHYTO-D-06-00847

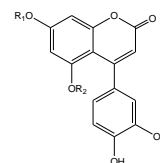
ANTIDIABETIC PROPERTIES OF SELECTED MEXICAN COPALCHIS OF THE RUBIACEAE FAMILY

José Guerrero-Analco, Omar Medina-Campos, Fernando Brindis, Robert Bye, José Pedraza-Chaverri, Andrés Navarrete, Rachel Mata*

The extracts prepared from the stem barks of several Mexican copalchis (*Hintonia latiflora*, *Exostema caribaeum* and a commercial mixture of *H. standleyana* and *E. caribaeum*) showed significant ($p < 0.05$) antihyperglycemic effects. From *H. latiflora*, the cucurbitacin **1**, and several other known compounds, were isolated. Oral administration of *H. latiflora* extract [100 mg/Kg] and **5** (30 mg/Kg) to STZ- diabetic rats over a 30 day duration restored normal blood glucose levels. It was also demonstrated that the extract of *H. latiflora* regulated hepatic glycogen and plasma insulin levels.



1 R₁=Ac; R₂ = -β-D-glucopyranosyl



5 R₁=H; R₂ = -β-D-glucopyranosyl

**ANTIDIABETIC PROPERTIES OF SELECTED MEXICAN COPALCHIS OF THE
RUBIACEAE FAMILY**

José Guerrero-Analco ^a, Omar Medina-Campos ^a, Fernando Brindis ^a, Robert Bye ^b, José Pedraza-Chaverri ^a, Andres Navarrete ^a, Rachel Mata ^a.

^aFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, 04510, México.

^bInstituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, 04510, México.

‡Taken in part from the PhD thesis of J. A. Guerrero-Analco.

Corresponding author: Dr. Rachel Mata. Tel: + 52-5-5622 5289; Fax: +52-5-5622 5329;
E-mail: rachel@servidor.unam.mx.

Abstract

The extracts prepared from the stem barks of several Mexican copalchis species, including *Hintonia latiflora*, *Exostema caribaeum* and a commercial mixture of *H. standleyana* and *E. caribaeum* (CM) showed significant hypoglycemic and antihyperglycemic effects. The extracts were tested in three different *in vivo* models using normal and streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. From the active extract of *H. latiflora*, 25-acetyl-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (**1**), an analog of 23,24-dihydrocucurbitacin F, and several known compounds (**2-8**) were isolated; cucurbitacin **1** was also isolated from *H. standleyana*. Oral administration of *H. latiflora* extract [100 mg/Kg of body weight (bw)] and 5-*O*- β -D-glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (**5**) (30 mg/Kg of bw) to STZ-induced diabetic rats, for a 30 day duration, restored blood glucose levels to normal values. The groups treated either with the active principle **5**, or the extract of *H. latiflora*, showed less body weight loss than glibenclamide-treated and diabetic control groups ($p < 0.05$). It was also demonstrated that the extract of *H. latiflora* regulated hepatic glycogen and plasma insulin levels ($p < 0.05$). These data suggest that its antihyperglycemic effect is due in part to stimulation of insulin secretion and regulation of hepatic glycogen metabolism.

Key Words

Hintonia latiflora; *Hintonia standleyana*; *Exostema caribaeum*; copalchi; Rubiaceae; 4-phenylcoumarins; cucurbitacins; STZ-induced diabetic rats; diabetes mellitus

1. Introduction

In Mexico, circa 10% of the population suffers non insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). As in other regions of the world, most of the Mexican people employ a variety of plant preparations for treatment of this illness (Subash-Babu and Mainzen-Prince, 2004). Among the plants highly valued for treatment of NIDDM are several of the Rubiaceae with extremely bitter stem barks. These species are commonly regarded as “copalchis” and the most important are *Hintonia latiflora* (Sesse et Mociño ex DC.) Bullock (synonym: *Coutarea latiflora* Sesse et Mociño ex DC.), *H. standleyana* Bullock, *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem et Schult and *E. mexicanum* Gray. Previous chemical investigation of these species resulted in isolation and identification of several cucurbitacins and 4-phenylcoumarins (Reher and Kraus, 1984, Mata et al., 1987, 1988, 1990a, 1990b, 1992; Reguero et al., 1987; Guerrero-Analco et al., 2005, Argotte-Ramos et al., 2006), a phenylstyrene (Mata et al., 1992), as well as an indole monoterpenoid alkaloid (Déciga-Campos et al., 2006). From a pharmacological point of view, the antimicrobial (Rojas et al., 1992) and antiplasmodial properties of the extracts and some 4-phenylcoumarins from *H. latiflora*, *E. caribaeum* and *E. mexicanum* were also demonstrated (Noster and Kraus., 1990; Kohler et al., 2001). Additionally, the extract of *H. standleyana*, as well as its cucurbitans, induced antinociceptive effects in mice. We also demonstrated that the extracts of both *Hintonia* species are non-toxic to mice when tested according to the Lorke procedure (Déciga-Campos et al., 2006; Déciga Campos et al., 2007); however, the extract of *E. caribaeum* result in various toxic effects such as inducing tremor, respiratory distress as well as a decrease in motor activity (Déciga Campos et al., 2007).

The antidiabetic properties of *H. latiflora* have been extensively investigated, with the earliest work carried out at the beginning of the 20th century at the Instituto Médico Nacional in Mexico City (Martínez, 1989). Later, researchers in Germany (Khur, 1953; Kaiser and Geyer, 1955; Slijepcevic and Kraus, 1997; Korec et al., 2000), France (Bastien, 1961), and Italy (Pinto et al., 1997) corroborated the work of the Mexican scientists using short term animal experiments. Recently, Korec and coworkers (2000), using short term experiments, reported that oral administration of an extract prepared from a commercial mixture of the stem barks of *H. latiflora* and *E. caribaeum* (CM) of uncertain origin decreased glucose levels in streptozotocin (STZ)-diabetic rats. In that study, however the natural active principles contributing to this activity were not determined. More recently, our research group studied the antidiabetic potential of *H. standleyana* (Guerrero-Analco et al., 2005); these results demonstrated the antihyperglycemic effect of an organic extract of the stem bark of *H. standleyana* and compounds **2** and **6** (Guerrero-Analco et al., 2005). The relevant issues raised in this study were: i) the establishment of active principles of a Mexican copalchi, which turned out to be 4-phenylcoumarin glycosides and cucurbitacins, and ii) the demonstration in a long term assay that compounds **2** and **6** reduced blood glucose levels near to normal values in STZ-induced diabetic rats.

Continuing our work on Mexican copalchis of the Rubiaceae family (Guerrero-Analco et al., 2005), we describe herein the long term antihyperglycemic effect of the extracts prepared from *H. latiflora*, *E. caribaeum* and a commercial mixture of *E. caribaeum* and *H. standleyana* (CM) that were purchased in local markets. Finally, the effect of copalchis extracts and their antihyperglycemic compounds on plasma insulin and hepatic glycogen levels were assessed on STZ-induced diabetic rats. These two experiments were performed

in order to initiate the studies regarding the antidiabetic mode of action of Mexican copalchis herbal preparations and their active principles.

2. Results and Discussion

As shown in Tables 1 and 2, the organic extracts (100 mg/Kg and 300 mg/Kg of bw) of the stem-barks of *H. latiflora*, *E. caribaeum* and CM caused significant decreases in blood glucose levels, in both normal and STZ-diabetic rats when compared with vehicle-treated groups ($p < 0.05$). The results of *H. latiflora* are thus in agreement with those previously described by Bastien (1961) and Pinto et al. (1997). In normoglycemic animals, the hypoglycemic effect of *H. latiflora* was around 24% and persisted throughout the experiment (Table 1). In diabetic animals, the highest antihyperglycemic effect of the *H. latiflora* extract was observed at doses of 100 and 300 mg/Kg at 9 h (-21.0 and -33.4%, respectively) (Table 2). In the case of the extract of *E. caribaeum*, the hypoglycemic effect was around 17% in both models (Tables 1 and 2) at doses of 100 and 300 mg/Kg at 7 h (-18.3 and -16.8%, respectively). Glibenclamide (10 mg/Kg), used as positive control, showed maximum hypoglycemic effect at 7 h in normoglycemic animals (Table 1) and at 5 h in STZ-induced diabetic rats (Table 2).

In order to isolate the major active principles, the extract of *H. latiflora* was subjected to an extensive chromatographic fractionation. This process led to the isolation of compounds **1-8** identified as 25-acetyl-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-23, 24-dihydrocucurbitacin F (**1**), a previously no described cucurbitacin glycoside, 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (**2**), 5-*O*- β -D-glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-

phenylcoumarin (3) 5-*O*- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (4), 5-*O*- β -D-glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (5), 5-*O*-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (6), 5-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (7), and the alkaloid desoxycordifolinic acid (8). Compound **1** was also isolated from the related species *H. standleyana*. The structure of compound **1** was elucidated using spectrometric and spectroscopic methods including uni- and bi-dimensional NMR spectroscopic techniques. Compounds **2-8** were characterized by comparison with authentic samples (Aquino et al., 1987; Mata et al., 1987, 1988, 1990a, 1992; Reguero et al., 1987; Guerrero-Analco et al., 2005; Déciga-Campos et al., 2006).

The HRFAB mass spectrum (positive mode) of **1** showed a *quasi*-molecular ion at m/z 725.8731 $[M+H]^+$ consistent with the molecular formulae $C_{38}H_{60}O_{13}$. The NMR spectra (CDOD₃) were very similar to 23,24-dihydrocucurbitacin F glucoside previously isolated from *H. latiflora* and *H. standleyana* (Mata et al., 1990a; Guerrero-Analco et al., 2005). Furthermore, acid hydrolysis of compound **1** yielded 25-acetyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (**1a**) (Reguero et al., 1987) and glucose. The ¹³C-NMR chemical shifts observed in the region of the spectrum between δ_C 107 and 60 confirmed the presence of glucose [δ_C 106.8 (C-1'), 76.2 (C-2'), 78.5 (C-3'), 72.1 (C-4'), 78.0 (C-5'), 62.7 (C-6')] in the molecule. The value of the coupling constant ($J = 7.5$ Hz) of the signal for the anomeric hydrogen (δ_H 4.48) established a β configuration. On the other hand, the chemical shift values of C-3 (δ_C 93.8) and C-2 (δ_C 71.5) indicated that the sugar moiety was linked to the cucurbitacin aglycone through the hydroxyl group at C-3. Furthermore, the HMBC correlation between C-3 and the anomeric hydrogen is consistent with this proposal. On the basis of these

considerations, compound **1** was characterized as 25-acetyl-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F.

The long term antihyperglycemic effect of the three extracts (*E. caribaeum*, CM and *H. latiflora*) and pure compounds **2-6** and **8**, using a classical chronic experiment with STZ-induced diabetic rats (Verspohl, 2002; Subash-Babu and Mainzen-Prince, 2004; Sezick et al., 2005; Jong-Yuh and Mei-Fen, 2005), was next performed. The results demonstrated that daily oral administration of the extract (50 mg/Kg each time) of *H. latiflora*, *H. standleyana* and compounds **2-6** and **8** (15 mg/Kg each time), twice a day, for 30 days, induced a significantly more pronounced antihyperglycemic effect in the STZ-diabetic rats (Figures 1 and 2). The extracts of CM and *E. caribaeum* were less efficient in decreasing blood glucose levels in diabetic rats (Figure 1), and compound **8** was inactive (Figure 2). Compounds **3** and **4** also restored blood glucose levels to near normal values at the end of the experiment [Figure 2 (30 days)]. However, the extract of *H. latiflora* (Figure 1) and compound **5** (Figure 2) brought back normal blood glucose levels, and the effect was comparable to that of the glibenclamide used as a positive control (Verspohl, 2002; Subash-Babu and Mainzen-Prince, 2004). The treatments with *H. latiflora* extract, as well as those with compounds **2** and **6** (Guerrero-Analco et al., 2005), also prevented body weight loss in hyperglycemic rats (Table 3); however, the effect was higher than that of glibenclamide. *E. caribaeum* and CM extracts, on the other hand, did not prevent weight loss in diabetic rats. In our previous study on the extract of *H. standleyana* and compound **2** and **6**, we had found that they prevented body weight loss in diabetic rats (Guerrero-Analco et al., 2005); therefore, the inefficacy of the CM extract to prevent body weight loss could be attributed to the presence of *E. caribaeum*.

Comparison of the antihyperglycemic activity of compounds **3-5** established that the most active compound possesses a free hydroxyl group at C-7 in the 4-phenylcoumarin core. On the other hand, the comparison of the activity of compounds **3** and **4** indicates that the nature of the sugar moiety (glucose vs galactose) does not influence biological activity.

One of the possible mechanisms by which the copalchis extracts and active principles exert their antihyperglycemic action in rats could be due to an insulin-release stimulatory effect; therefore, their action on plasma insulin on STZ-induced diabetic rats was investigated. This model was used because the induction of diabetes with a lower dose of STZ (50 mg/Kg) produced an incomplete destruction of pancreatic β -cells even though the rats become permanently diabetic (Subash-Babu and Mainzen-Prince, 2004). Thus, after treatment with 50 mg/Kg of STZ there should be some surviving β -cells. Furthermore, with some treatments their regeneration is also possible. The results summarized in Figure 3 clearly demonstrate that the extracts of *H. latiflora* and *H. standleyana* as well as compounds **2**, **5** and **6** induced the secretion of insulin in a similar way to the positive control glibenclamide. Given that the treatments induced an increment in plasma insulin levels, they might increase the renewal of β -cells in the pancreas or permit the recovery of partially destroyed β -cells and stimulates pancreatic insulin secretion (Subash-Babu and Mainzen-Prince, 2004). Since the treatments with the *Hintonia* extracts and compounds **2**, **5** and **6** did not restore to normal values the insulin levels, it is highly possible that they exert their antihyperglycemic through an insulinomimetic mode of action (Verspohl, 2002).

The extract of *H. latiflora* significantly improved hepatic glycogen content in STZ-diabetic rats (Figure 4) as well suggesting that it might modulate glycogen breakdown by inhibiting glucose-6-phosphatase (G6Pase), a crucial enzyme for the final step of gluconeogenesis or

glycogenolysis. Several antidiabetic agents, such as metformin and *p*-methoxycinnamic acid, a natural product, also inhibit glucose production by suppressing G6Pase activity. Alternatively, the extract could induce an increment in glucokinase activity in diabetic rats, which in turn regulated glycogen metabolism (Adisakwattana et al., 2005).

4. Conclusions

Our results corroborated further that the active principles of the Mexican copalchis of the Rubiaceae family are both 4-phenylcoumarins glycosides and cucurbitacins. This is thus the first report describing the antidiabetic principles of *H. latiflora* and beyond any doubt answers any questions raised by many researchers concerning the nature of the active principles of this Mexican plant species. The extract of *H. latiflora* and compound **5** were also the most effective in regulating blood glucose levels in hyperglycemic conditions, using both short and long term assays; their mode of action involves stimulatory effect on insulin secretion by β -cells in the pancreas. *H. latiflora* extract also stimulate hepatic glycogen metabolism. As for *H. standleyana*, *H. latiflora* biosynthesizes indole-monoterpenoid type alkaloids. The lack of efficacy of *E. caribaeum*, as well as the toxic effects previously demonstrated, should cause Mexican Health Authorities to alert local consumers about the risks in using this plant.

4. Experimental

4.1 General experimental procedures

Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded as KBr pellets or film on a Perkin-Elmer 59913 spectrophotometer. Optical rotations were registered on a Perkin-Elmer 241 digital polarimeter. NMR spectra were recorded on a Varian VXR-300S spectrometer in CD₃OD, either at 300 MHz (¹H) or 75 (¹³C) MHz, using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. EIMS were obtained on a JMS-AX505HA mass spectrometer, whereas positive FABMS data were obtained using a JEOL SX 102 mass spectrometer with a NBA matrix. Open column chromatography (CC) was carried out on silica gel 60 (70-230 mesh, Merck). TLC analyses were performed on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck), and visualization of the plates was carried out using a ceric sulfate (10%) solution in H₂SO₄ or anisaldehyde-H₂SO₄ reagent (for sugars).

4.2 Plant material

The stem bark of *H. latiflora* was collected in Chihuahua in June 2003 and identified by Dr. Robert Bye (Jardín Botánico, UNAM). A voucher specimen (Bye No 31, 735) is deposited at the National Herbarium (MEXU), Mexico City. The stem bark of *H. standleyana* Bullock was collected in Atenango del Rio, Guerrero, in January 2003 and identified by Celso Guerrero and Francisco Ramos from the National Herbarium (MEXU); a voucher specimen (P. Hersch No 824) is deposited at the ASFM-INAH Herbarium, Cuernavaca. The stem bark of *E. caribeaum* was collected in Atenango del Rio, Guerrero, in January

2003 and identified by Celso Guerrero and Francisco Ramos from the National Herbarium (MEXU). A voucher specimen (Marchena 1167098) is deposited at the ASFM-INAH Herbarium, Cuernavaca, State of Morelos. A commercial sample (CM) of “copalchi” composed by the stem barks of *H. standleyana* and *E. caribaeum* in a 1:4 ratio was purchased from the popular market of Sonora in Mexico City.

4.3 Extraction of stem bark of H. latiflora and isolation of compounds 1-8.

The air-dried and pulverized material (3.0 Kg) was macerated with CH₂Cl₂-MeOH (6 l x 3, 1:1) at room temperature for a duration of 6 days, evaporation of the solvent *in vacuo* afforded a crude extract (160 g). An aliquot of this (115 g) was then dissolved in a minimal amount of MeOH, and from this solution compound **4** (36 g) crystallized, mp 230°C (lit mp 228-231°C; Mata et al., 1987). The mother liquors were next subjected to silica gel (1.0 Kg) CC in a glass column using CHCl₃ with increasing amounts of MeOH as eluents to yield 12 primary fractions (FH1-FH12). Fraction FH2 (2 g), eluted with CHCl₃-MeOH (92:8), was further applied to a second silica gel column using CHCl₃-EtOAc-MeOH (47.5:47.5:5) as a mobile phase to give nine fractions (FH2I-FH2IX). From fraction FH2III, compound **1** (200 mg) spontaneously crystallized. From fraction FH2V, compound **2** (1.0 g) crystallized, mp 201°C (lit mp 199-201°C; Mata et al., 1990). From fraction FH5, eluted with CHCl₃-MeOH (9:1), compound **3** (4.5 g), mp 238°C (lit mp 237-238°C; Mata et al., 1988). Fraction FH9 eluted with CHCl₃-MeOH (85:15), yielded compound **5** (6.5 g), mp 251°C (lit mp 250-252°C; Mata et al., 1990). Column chromatography over silica gel (600 g) of fraction FH10 (15 g), eluted with CHCl₃-MeOH (75:25), using CHCl₃-MeOH (9.5:0.5 → 0:1) as mobile phase yielded eight secondary fractions, FH10I-FH10VIII. From

fraction FH10IV (1 g), eluted with CHCl₃-MeOH (8:2), compound **6** (100 mg), mp > 300°C (lit mp > 300°C; Guerrero-Analco et al., 2005) was obtained by crystallization (CHCl₃-MeOH 8:2). From fraction FH10VI (3.6 g) eluted with CHCl₃-MeOH (7:3), compound **7** (468 mg) crystallized. Finally, column chromatography over silica gel (100 g) of FH12 (2 g), eluted with CHCl₃-MeOH (6:4), using CH₂Cl₂-MeOH (8:2 → 0:1) as mobile phase yielded five secondary fractions, FH12I-FH12V. From fraction FH12III (10 g), eluted with CHCl₃-MeOH (4:6), compound **8** (1 g) crystallized, mp > 300°C (lit mp > 300°C; Deciga-Campos et al., 2006).

4.4 Extraction of 25-acetyl-3-O-β-D-glucopyranosyl-23, 24-dihydrocucurbitacin F (1) from the stem bark of H. standleyana

Dried and shredded stem bark (300 g) was macerated with CH₂Cl₂-MeOH (2 l x 3, 1:1) for 6 days at room temperature. The combined extracts were evaporated *in vacuo* to yield a brown residue (80 g), which was applied to a glass column packed with silica gel (800 g). This was next eluted with hexane-EtOAc (1:1 → 0:1) and EtOAc-MeOH (1:0 → 0:1) to give five fractions (FS1-FS5). Fraction FS2 (2.0 g), eluted with EtOAc-MeOH (9:1), was further subjected to silica gel CC using CHCl₃-EtOAc-MeOH (47.5:47.5:5) as mobile phase to give ten fractions (FS4I-FS4X). From fraction FH4V, compound **1** (30 mg) spontaneously crystallized; from fraction FH4X precipitated compound **2** (120 mg), mp 201-203°C (lit mp 199-201 °C; Guerrero-Analco et al., 2005).

4.5 25-acetyl-3-O- β -D-glucopyranosyl-23, 24-dihydrocucurbitacin F (I)

Glassy white solid; mp 158-161 °C, $[\alpha]_D^{25} +45$ (c = 0.2, MeOH); IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3400, 2920, 1710, 1690, 1630, 1455, 1430 and 1255; HRFABMS: $m/z = 725.8731$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{O}_{13}$: 725.8752); FABMS: $m/z = 748$ $[\text{M} + \text{Na} + \text{H}]^+$; 665 $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{H}]^+$; 563 $[\text{M} - 162 + \text{H}]^+$. NMR-Data [^{13}C (75.5 MHz, CDOD_3) / ^1H (300 MHz, CDOD_3): C-1 [δ_{C} 34.1 / δ_{H} 1.78 (1H, m), 2.23 (1H, m)], C-2 [δ_{C} 71.5 / δ_{H} 3.84 (1H, m)], C-3 [δ_{C} 93.8 / δ_{H} 2.99 (1H, d, $J = 9$ Hz)], C-4 (δ_{C} 43.3), C-5 (δ_{C} 142.5), C-6 [δ_{C} 120.5 / δ_{H} 5.78 (1H, bd, $J = 5.4$ Hz)], C-7 [δ_{C} 25.5 / δ_{H} 1.21 (1H, dd, $J = 13.2, 2.1$ Hz), 1.37 (1H, m)], C-8 [δ_{C} 44.3 / δ_{H} 1.93 (1H, m)], C-9 (δ_{C} 49.1), C-10 [δ_{C} 34.8 / δ_{H} 2.46 (1H, m)], C-11 (δ_{C} 216.0), C-12 [δ_{C} 49.8 / δ_{H} 3.22 (2H, m)], C-13 (δ_{C} 48.7), C-14 (51.8), C-15 [δ_{C} 46.7 / δ_{H} 1.93 (2H, m)], C-16 [δ_{C} 71.5 / δ_{H} 3.30 (1H, m)], C-17 [δ_{C} 59.5 / δ_{H} 2.52 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)], C-18 [δ_{C} 20.5 / δ_{H} 0.88 (3H, s)], C-19 [δ_{C} 19.7 / δ_{H} 1.36 (3H, s)], C-20 (δ_{C} 80.9), C-21 [δ_{C} 25.6 / δ_{H} 1.28 (3H, s)], C-22 (δ_{C} 216.6), C-23 [δ_{C} 32.8 / δ_{H} 1.58 (2H, m)], C-24 [δ_{C} 35.8 / δ_{H} 2.02 (2H, m)], C-25 (δ_{C} 83.1), C-26 [δ_{C} 26.2 / δ_{H} 1.44 (3H, s)], C-27 [δ_{C} 26.2 / δ_{H} 1.44 (3H, s)], C-28 [δ_{C} 23.4 / δ_{H} 0.99 (3H, s)], C-29 [δ_{C} 24.8 / δ_{H} 1.28 (3H, s)], C-30 [δ_{C} 20.4 / δ_{H} 1.1 (3H, s)], C-1' [δ_{C} 106.8 / δ_{H} 4.48 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)], C-2' [δ_{C} 76.2 / δ_{H} 3.30 (1H, m)], C-3' [δ_{C} 78.5 / δ_{H} 3.34 (1H, m)], C-4' [δ_{C} 72.1 / δ_{H} 3.32 (1H, m)], C-5' [δ_{C} 78.0 / δ_{H} 3.22 (1H, m)], C-6' [δ_{C} 62.7 / δ_{H} 3.69 (1H, dd, $J = 11.7, 5.1$ Hz), 4.06 (1H, m)], $\text{CH}_3\text{-C=O}$ [δ_{C} 22.3 / δ_{H} 1.95 (3H, s)], $\text{CH}_3\text{-C=O}$ (δ_{C} 172.4).

4.6 Acid hydrolysis of **1**

Compound **1** (5 mg), dissolved in 2 M HCl (10 ml) was heated until reflux began, this being held for 2 h. A white powder precipitated from the acid solution and after usual work-up, aglycone **1a** (2 mg) was obtained (Reguero et al., 1987); glucose was identified by TLC following comparison with an authentic sample.

4.7 Extraction of the stem bark of *E. caribeaum* and CM (commercial mixture of copalchi)

Dried and shredded stem bark (250 g) of *E. caribeaum* was macerated with CH₂Cl₂-MeOH (6 l x 3, 1:1) for 6 days at room temperature. The combined extracts were evaporated *in vacuo* to give a light brown residue (80 g). Dried and shredded stem bark (300 g) of CM was macerated with CH₂Cl₂-MeOH (1:1) (6 l x 3) for 6 days at room temperature. The combined extracts were evaporated *in vacuo* to yield a brown residue (90 g).

4.8 Biological assays

4.8.1 Test animals

Male Wistar normoglycemic rats, 55-60 day old, weight 180-220 g, were obtained from Centro UNAM-Harlan (Harlan México, SA de CV). Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with international rules on care and use of laboratory animals. The animals were housed under standard laboratory conditions and maintained on a standard pellet diet and water *ad libitum*.

4.8.2 Preparation of the test samples

Samples were suspended in 0.05% Tween[®] 80 in saline solution. Glibenclamide (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) was used as a hypoglycemic model drug (Verspohl, 2002). Control rats group only received the vehicle (0.05% Tween[®] 80 in saline solution) in the same volume (0.5 ml of vehicle/100 g of bw) by the same route.

4.8.3 Collection of blood samples and determination of blood glucose levels

Blood samples were collected from the caudal vein by means of a little incision at the end of the tail. Blood glucose levels (mg/dl) were estimated by enzymatic glucose oxidase method using a commercial glucometer (*One Touch Ultra*, Jonhson-Jonhson, California, USA). The percentage variation of glycemia for each group was calculated with respect to initial (0 h) level according to:

$$\% \text{ Variation of glycemia} = [(G_i - G_t) / G_i] \times 100\%$$

Where G_i is initial glycemia values and G_t is the glycemia value after samples administration.

4.8.4 Acute hypoglycemic assay

Normal rats were placed in single cages with wire-net floors and deprived of food for 12 h before experimentation but allowed free access to tap water throughout. The crude extracts (at the dose of 10, 30, 100 and 300 mg/Kg of bw) of *H. latiflora* and *E. caribaeum* were suspended in 0.05% Tween[®] 80 in saline solution. Glibenclamide (10 mg/Kg of bw) was suspended in the same vehicle. The samples were freshly prepared immediately before experimentation and administered by the intragastrical route. Control rats received only the

vehicle (0.05% Tween[®] 80 in saline solution) by the same route. Blood samples were collected at 0, 1.5, 3, 5, 7, 9 h after drugs administration.

4.8.5 Effect on diabetic animals (non-insulin dependent diabetes model-NIDDM)

4.8.5.1 Induction of experimental diabetes

Diabetes mellitus type 2 was induced in rats by a single intraperitoneal injection of freshly prepared STZ (50 mg/Kg; Sigma. St. Louis, MO, USA) dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5, in a volume of 1 ml/Kg of bw. After 7 days of STZ administration, blood glucose levels of each rat were determined. Rats with blood glucose levels higher than 250 mg/dl were considered diabetic and were included in the study (Verspohl, 2002, Guerrero-Analco et al., 2005).

4.8.5.2 Acute antihyperglycemic assay

Diabetic rats were treated exactly as the normal rats (see section 4.8.4).

4.8.6 Effects of daily treatment with crude extracts and pure compounds in STZ-induced diabetic rats

DM was induced in 66 rats by the same method showed in the section of the induction of experimental diabetes. Thereafter, the extracts, pure compounds and glibenclamide were administered twice (9 AM and 6 PM) on a daily basis, for a period of 30 days, to STZ-diabetic rats which were divided into eight groups (A-H). A nine group of normal rats (Group I) was used as a control. Groups H (diabetic control) and I received vehicle (0.05% Tween[®] 80 in saline solution) *per os* during 30 days. Group A received

glibenclamide (15 mg/Kg; 30 mg/Kg daily). Groups B to G received different treatments: B, *H. latiflora* extract (50 mg/Kg; 100 mg/Kg daily); C, *E. caribaeum* extract (50 mg/Kg; 100 mg/Kg daily); D, CM of “copalchi” (50 mg/Kg; 100 mg/Kg daily); E, compound **3** (15 mg/Kg; 30 mg/Kg daily); F, compound **4** (15 mg/Kg; 30 mg/Kg daily) and G, compound **5** (15 mg/Kg; 30 mg/Kg daily). Compounds **2**, **6** (15 mg/Kg; 30 mg/Kg daily) and *H. standleyana* extract (50 mg/Kg; 100 mg/Kg daily) were also included in the experiments for comparative purposes. All tested materials were suspended in the same vehicle and administered *per os* daily for 30 days. The animals were housed under standard laboratory conditions and maintained with free access to water and food during all the experiment. Blood glucose concentration on both diabetic (groups A-H) and control group (I) animals was estimated at days 0, 3, 7, 10, 12, 15, 21 and 30. The body weights of the animals were measured concomitantly to the blood glucose analyses. All experiments were carried out using six animals per group.

4.8.7 Determination of hepatic glycogen and plasma insulin levels

After 30 days of treatment with any of the extracts (*H. standleyana*; *H. latiflora*; *E. caribaeum* and CM) or tested compounds (**2-6**; **8**), the animals (normal and diabetic) were decapitated after an overnight fast. Blood was collected in heparinized tubes and plasma was separated after centrifugation. Liver tissues were excised immediately and stored in ice-cold containers. Hepatic glycogen content was measured according to Murat and Serfaty (1974). Briefly, liver samples (100 mg) were homogenized in 2 ml of ice-cold citrate buffer (0.1 M, pH 4.2). Immediately after homogenization, 10 μ l of the sample was used to determine free glucose in the tissue. Amyloglucosidase (exo-1,4- α -glucosidase, EC

3.2.1.3, Cat #A9228, Sigma Chemical, Co, St Louis, MO, USA) dry powder was then mixed with the homogenate (1 mg/ml) and allowed to stand at room temperature for 2 h. A 10 µl sample was then used to determine total glucose amounts. Initial free glucose values were subtracted, with the difference being the value used to calculate the glycogen content in the tissue. Glucose was determined using a commercial kit (Glucose TR, Cat 1001190, Spinreact, Girona, Spain). Plasma insulin levels were estimated by the Rat Insulin Enzyme Immunoassay Method using a SpiBio Kit (Microplate Reader BIO-RAD Model 680) (Grassi and Pradelles, 1991).

4.9 Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM for the number (n = 6) of animals in each group. Repeated measurement analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the changes in blood glucose and other parameters. Dunnett range post-hoc comparisons were used to determine the source of significant differences where appropriate; $p < 0.05$ was considered statistically significant. Sigma plot and Sigma Stat (version 9.0) software were used for statistics and plotting.

Acknowledgments

This work was supported by grants of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Proyecto C01-018) and DGAPA-UNAM IN212005. We are indebted to Alejandro Urzua, Victor Lemus and Chabetty Vargas for their collaboration in this work. The technical assistance of Isabel Rivero-Cruz, Laura Acevedo, Rosa del Villar, Marisela

Gutiérrez and Georgina Duarte-Lisci is also recognized. J.A. Guerrero-Analco acknowledges fellowships from CONACyT and Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM, to support graduate studies.

References

Adisakwattana, S., Roengsamran, S., Hsu, W.H., Yibchok-anun, S., 2005. Mechanisms of antihyperglycemic effect of *p*-methoxycinnamic acid in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 78, 406-412.

Aquino, R., D'Agostino, M., De Simone, F., Pizza, C., 1987. 4-Arylcoumarin glycosides from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry.* 27, 1827-30.

Argotte-Ramos, R., Ramírez-Avila, G., Rodríguez-Gutiérrez, MC., Ovilla-Muñoz, M., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M., González-Cortazar M., Alvarez, Laura., 2006. Antimalarial 4-phenylcoumarins from the stem bark of *Hintonia latiflora*. *J Nat Prod.* 69, 1442-44.

Bastien, M., 1961. Recherches sur les copalchis, drogues hypoglycémiantes et en particulier sur le *Coutarea latiflora* DC (Rubiaceae). Dissertation, Faculté de Pharmacie de l'Université. Paris.

Déciga-Campos, M., Guerrero-Analco, JA., Quijano, L., Mata, R., 2006. Antinociceptive activity of 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 342-48.

Déciga-Campos, M., Arriaga-Alba, M., Rivero-Cruz, I., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G., Navarrete, A., Mata, R., 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 110, 334-42.

Grassi, J., Pradelles, Ph., 1991. Compounds labelled by the acetylcholinesterase of *Electrophorus electricus*. Its preparation process and its use as a tracer or marker in enzymo-immunological determinations. United States Patent, N° 1, 047, 330.

Guerrero-Analco, J.A., Hersch-Martínez, P., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R., 2005. Antihyperglycemic Effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med.* 71, 1099-105.

Jong-Yuh, C., Mei-Fen, S., 2005. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sci.* 77, 980-990.

Kaiser, H., Geyer, H., 1955. Zur pharmakognosie der rinde von *Coutareae latiflora* D. C. *Arch. Pharm.* 535 (Chemie), 595 (Pharmakologie).

Khur, R., 1953. Orale diabetestherapie mit einem euhporbiaceenextrakt. *Landarzt* 29, 1.

Köler, I., Jenett-Siems, K., Mockenhaupt, F.P., Siems, K., Jakupovic, J., González J.C., Hernandez, M.A., Ibarra, R.A., Berendsohn, W.G., Bienzle, U., Eich, E., 2001. *In vitro* antiplasmodial activity of 4-phenylcoumarins from *Exostema mexicanum*. *Planta Med.* 67, 89-91.

Korec, R., Heinz-Sensch, K., Zoukas, T., 2000. Effects of the neoflavonoid coutareagenin, one of the antidiabetic active substances of *Hintonia latiflora*, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Drug Res.* 50, 122-8.

Martínez, M., 1989. *Las Plantas Medicinales de México*. 6ª Ed. Ediciones Botas, México D. F. pp. 85-7.

Mata, R., Calzada, F., Garcia, M., Reguero, M., 1987. Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine III: New 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *J. Nat. Prod.* 50, 866-70.

Mata, R., Calzada, F., Garcia, M., 1988. Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine VI: Additional new 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. J. Nat. Prod. 51, 851-56.

Mata, R., Camacho, M., Cervera, E., Bye, R., Linares, E., 1990a. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. Phytochemistry. 29, 2037-40.

Mata, R., Albor, C., Pereda-Miranda, R., McLaughlin, J.L., 1990b. Cytotoxic constituents of *Exostema mexicanum*. Planta Med. 56, 241.

Mata, R., Camacho, M., Mendoza, S., Cruz, M.C., 1992. A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. Phytochemistry. 31, 3199-01.

Murat, J.C., Serfaty A., 1974. Simple enzymatic determination of polysaccharide (glycogen) content of animal tissues. Clin. Chem. 20, 1576-77.

Noster, S., Kraus, L., 1990. *In vitro* antimalarial activity of *Coutarea latiflora* and *Exostema caribaeum* extracts on *Plasmodium falciparum*. Planta Med. 56, 63-5.

Pinto, A., Capasso, A., Sorrentino, L., 1997. Experimental animal studies on the hypoglycemic effects of a copalchi extract. Drug Res. 47, 829-33.

Reguero, M., Mata, R., Bye, R., Linares, E., Delgado, G., 1987. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine II: Curcubitacins from *Hintonia latiflora*. J. Nat. Prod. 50, 315-6.

Reher, G., Kraus, L., 1984. New neoflavonoids from *Coutarea latiflora*. J. Nat. Prod. 47, 172-4.

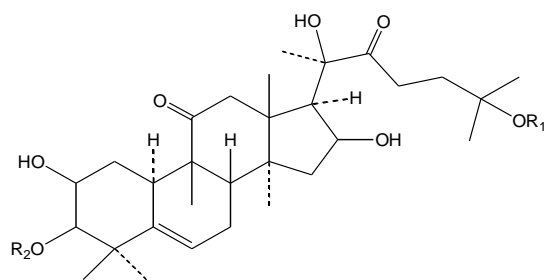
Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R., Mata R., 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 35, 275-83.

Sezick, E., Aslan, M., Yesilada, E., Ito, S., 2005. Hypoglycaemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of active constituent through bioassay- directed fractionation techniques. *Life Sci.* 76, 1223-1238.

Slijepcevic, M., Kraus, L., 1997. Diabetische mäuse als prüfmodell für hypoglykämische aktivitäten von pflanzenextrakten und insulinpräparaten. *Act. Ther.* 23, 47-58.

Subash-Babu, P., Mainzen-Prince, P.S., 2004. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of hyponidd, an ayurvedic herbomineral formulation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1435-42.

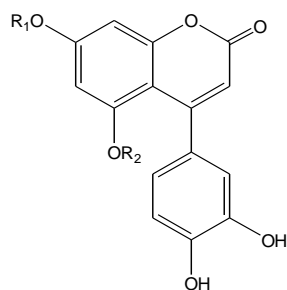
Verspohl, E.J., 2002. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med.* 68, 581-90.



1 R₁ = Ac R₂ = -β-D-glucopyranosyl

1a R₁ = Ac R₂ = H

2 R₁ = H R₂ = -β-D-glucopyranosyl



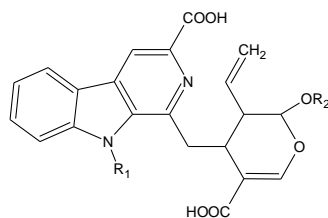
3 R₁ = Me R₂ = -β-D-glucopyranosyl

4 R₁ = Me R₂ = -β-D-galactopyranosyl

5 R₁ = H R₂ = -β-D-glucopyranosyl

6 R₁ = Me R₂ = -[β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]

7 R₁ = Me R₂ = -[β-D-xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]



8 R₁ = H R₂ = -β-D-glucopyranosyl

Table 1
Acute effect of the extracts of *H. latiflora*, *E. caribaeum* and CM (commercial mixture of copalchi) on blood glucose levels in normal rats

Test samples	Dose (per os) mg/Kg of bw	Blood glucose concentration (mg/dl)					
		0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (Vehicle)	---	92.5±2.85	99.1±3.2 (7.10)	92.4±3.1 (-0.05)	88.3±4.0 (-4.50)	88.9±4.1 (-3.80)	88.6±3.3 (-4.2)
Glibenclamide	10	89.6±6.00	74.3±4.2* (-17.00)	72.4±4.5* (-19.20)	62.6±3.4* (-30.08)	60.4±3.5* (-32.61)	68.6±2.4* (-23.42)
Extract of <i>H. latiflora</i>	300	88.6±1.20	99.7±1.7 (12.56)	82.3±2.4 (-7.13)	69.6±2.5* (-21.48)	68.4±1.7* (-22.84)	63.0±3.2* (-28.89)
Extract of <i>H. latiflora</i>	100	93.8±1.34	101.5±3.2 (8.24)	73.7±2.3* (-21.40)	71.0±2.7* (-24.29)	72.1±2.3* (-23.15)	69.0±4.3* (-26.45)
Extract of <i>H. latiflora</i>	30	93.3±1.45	103.0±4.1 (10.36)	83.2±2.7 (-10.78)	73.0±2.9* (-21.71)	74.8±2.7* (-19.83)	73.2±2.5* (-21.57)
Extract of <i>H. latiflora</i>	10	98.3±3.50	106.7±3.5 (8.51)	87.5±4.9 (-10.98)	78.8±3.9* (-19.80)	81.1±3.3* (-17.60)	82.6±3.2* (-16.01)
Extract of <i>E. caribaeum</i>	300	94.6±4.51	96.4±3.7 (2.00)	90.6±2.9 (-4.12)	79.4±3.0* (-16.05)	77.3±2.5* (-18.25)	75.1±4.6* (-20.53)
Extract of <i>E. caribaeum</i>	100	94.3±2.52	95.6±4.1 (1.40)	90.0±3.6 (-4.50)	84.2±4.3 (-10.64)	81.2±4.0* (-13.83)	77.4±4.2* (-17.91)
Extract of <i>E. caribaeum</i>	30	90.0±2.96	97.5±6.3 (8.36)	89.1±4.9 (-0.95)	83.7±3.8 (-6.90)	78.4±3.7* (-12.80)	77.8±6.3* (-13.46)
Extract of <i>E. caribaeum</i>	10	94.0±2.84	103.9±5.8 (10.60)	97.4±5.1 (3.66)	90.7±5.5 (-3.44)	87.2±4.6 (-7.13)	85.7±6.2 (-8.82)
Extract of CM	300	97.9 ±8.7	87.8±2.9* (-10.22)	76.9±3.2* (-21.44)	74.42±3.1* (-23.99)	77.90±4.8* (-20.44)	79.48±3.9* (-18.83)
Extract of CM	100	97.9±6.6	106.9±5.5 (9.16)	96.1±5.1 (-1.91)	84.78±4.7* (-13.47)	87.11±3.2* (-11.09)	85.23±5.2* (-13.01)
Extract of CM	30	96.7±4.4	89.3±2.8 (-7.61)	89.4±3.9 (-7.49)	86.39±2.7* (-10.68)	87.75±4.2 (-9.28)	92.35±3.9 (-4.52)
Extract of CM	10	98.7±6.2	110.1±4.2 (11.57)	100.1±4.0 (1.40)	94.14±5.2 (-4.63)	94.89±6.0 (-3.87)	88.58±5.3* (-10.27)

Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group. * p < 0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for comparison with respect to initial levels in each group. % Variation of glycemia are in parentheses.

Table 2
Acute effect of the extracts of *H. latiflora*, *E. caribaeum* and CM (commercial mixture of copalchi) on blood glucose levels in STZ-diabetics rats

Test samples	Dose (per os) mg/Kg of bw	Blood glucose concentration (mg/dl)					
		0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (Vehicle)	---	248.0±9.1	290.4±4.3 (17.11)	284.7±3.6 (14.81)	258.9±7.4 (4.37)	229.3±6.7 (-7.55)	226.6±5.2 (-8.64)
Glibenclamide	10	269.7±9.0	271.2±2.6 (0.52)	198.7±6.1* (-26.34)	173.5±5.5* (-35.68)	195.1±3.9* (-27.68)	208.9±2.4* (-22.57)
Extract of <i>H. latiflora</i>	300	271.2±9.8	299.2±5.6 (5.90)	269.0±4.7* (-4.76)	241.7±4.3* (-14.45)	232.5±3.9* (-17.70)	188.1±1.8* (-33.42)
Extract of <i>H. latiflora</i>	100	262±3.5	290.3±5.9 (11.98)	262.7±2.1 (1.33)	235.6±6.0 (-9.10)	212.1±3.5* (-18.19)	204.8±1.8* (-21.00)
Extract of <i>H. latiflora</i>	30	259.2±12.4	295.3±7.7 (12.69)	273.3±3.0 (4.29)	265.4±5.9 (1.28)	233.6±4.5 (-10.82)	218.2±4.3* (-16.72)
Extract of <i>H. latiflora</i>	10	282.5±6.5	303.9±7.4 (12.03)	266.1±11.5 (-1.90)	241.1±6.6 (-11.12)	239.8±7.5 (-11.58)	229.7±7.9* (-15.32)
Extract of <i>E. caribaeum</i>	300	275.7±2.2	304.5±6.6 (11.73)	248.5±6.0 (-8.81)	225.0±7.3* (-17.44)	222.7±3.9* (-18.28)	231.0±2.4* (-15.23)
Extract of <i>E. caribaeum</i>	100	277.7±7.6	289.0±6.0 (9.38)	243.2±3.7 (-7.95)	233.2±3.5* (-11.76)	219.8±4.8* (-16.82)	238.3±1.7 (-9.81)
Extract of <i>E. caribaeum</i>	30	264.2±5.5	298.5±8.3 (7.47)	257.1±6.7 (-7.42)	246.1±6.9* (-11.41)	259.0±11.2 (-6.74)	265.3±5.8 (-4.48)
Extract of <i>E. caribaeum</i>	10	272.5±3.2	308.6±6.3 (11.93)	251.8±6.0 (-8.69)	251.3±4.9 (-8.87)	265.4±4.4 (-3.75)	254.7±1.5 (-7.65)
Extract of CM	300	293.7±2.05	341.9±5.3 (14.04)	243.0±5.2* (-14.73)	200.9±3.8* (-27.0)	227.0±2.2* (-19.38)	233.8±4.2* (-17.42)
Extract of CM	100	287.5±7.29	268.8±5.4 (-5.54)	261.9±5.3 (-7.60)	253.0±6.0 (-10.22)	246.0±5.9* (-12.30)	228.9±5.2* (-17.38)
Extract of CM	30	284.5±16.6	331.3 ± 5.2 (14.0)	285.64±5.2 (0.34)	275.64±5.2 (-2.34)	241.8±5.3* (-12.74)	286.64±5.2 (0.64)
Extract of CM	10	279.8±15.0	303.4±4.2 (7.15)	279.6±4.1 (-0.05)	265.3±4.2 (-4.40)	262.3±4.3 (-5.30)	262.0±4.3 (-5.38)

Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group. * p < 0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for comparison with respect to initial levels in each group. % Variation of glycemia are in parentheses.

Table 3
 Long-term effect of the extracts of *H. latiflora*, *E. caribeaum*, CM (commercial mixture of copalchi) and compounds **3-5** and **8** on body weight, in STZ-diabetic rats

Test samples	Dose (per os) mg/Kg of bw	Body weight (g)			
		1st day	7th day	15th day	30th day
Normal control (vehicle)	---	213.4±3.9*	249.9±3.0*	274.6±4.2*	288.2±5.5*
Diabetic Control (vehicle)	---	169.8±5.2	216.2±5.2	194.8±6.0	204.2±9.2
Glibenclamide	30	178.3±7.8	210.2±4.1	212.8±4.9	216.3±8.9
Extract of <i>H. latiflora</i>	100	182.9±7.7	227.2±8.0	238.3±12.4*	248.3±16.4*
Extract of <i>E. caribeaum</i>	100	177.9±10.6	213.4±11.9	223.3±13.2	217.7±17.6
Extract of CM	100	173.3±9.2	214.9±5.9	220.8±15.3	223.1±20.4
Compound 3	30	169.7±4.8	213.3±6.6	219.2±8.1	230.3±10.0*
Compound 4	30	169.6±11.6	205.9±8.9	211.3±12.0	221.3±14.6
Compound 5	30	190.3±6.6	218.8±8.7	225.2±12.0*	241.3±12.3*
Compound 8	30	170.3±6.6	188.8±7.8	205.2±11.0	201.3±13.2

Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group. * $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for comparison with the diabetic control group at same time.

Figures

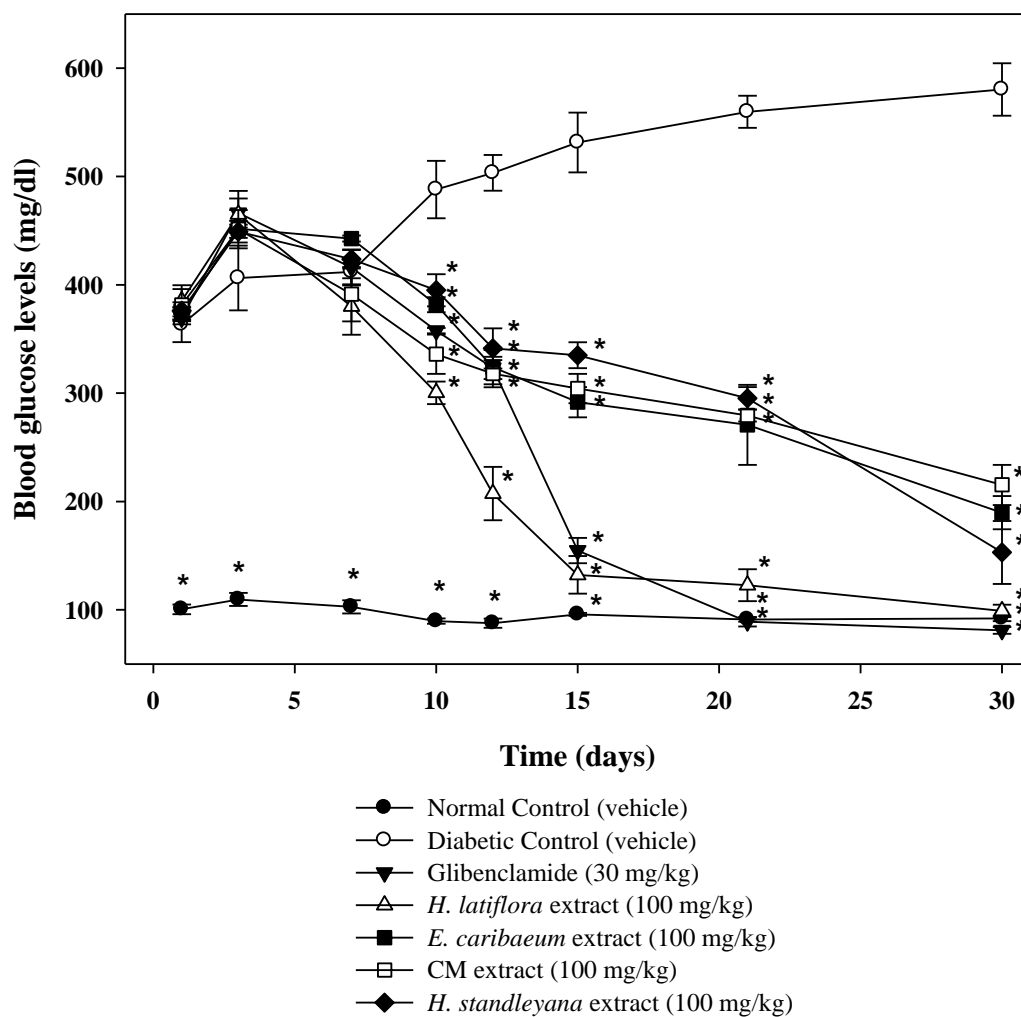


Figure 1. Long-term effect of the extracts of *H. latiflora*, *E. caribaeum*, *H. standleyana*, CM (commercial mixture of copalchi) on blood glucose levels in STZ-diabetic rats. Each value is the mean \pm SEM for 6 rats in each group. * $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for comparison with the diabetic control group at same time.

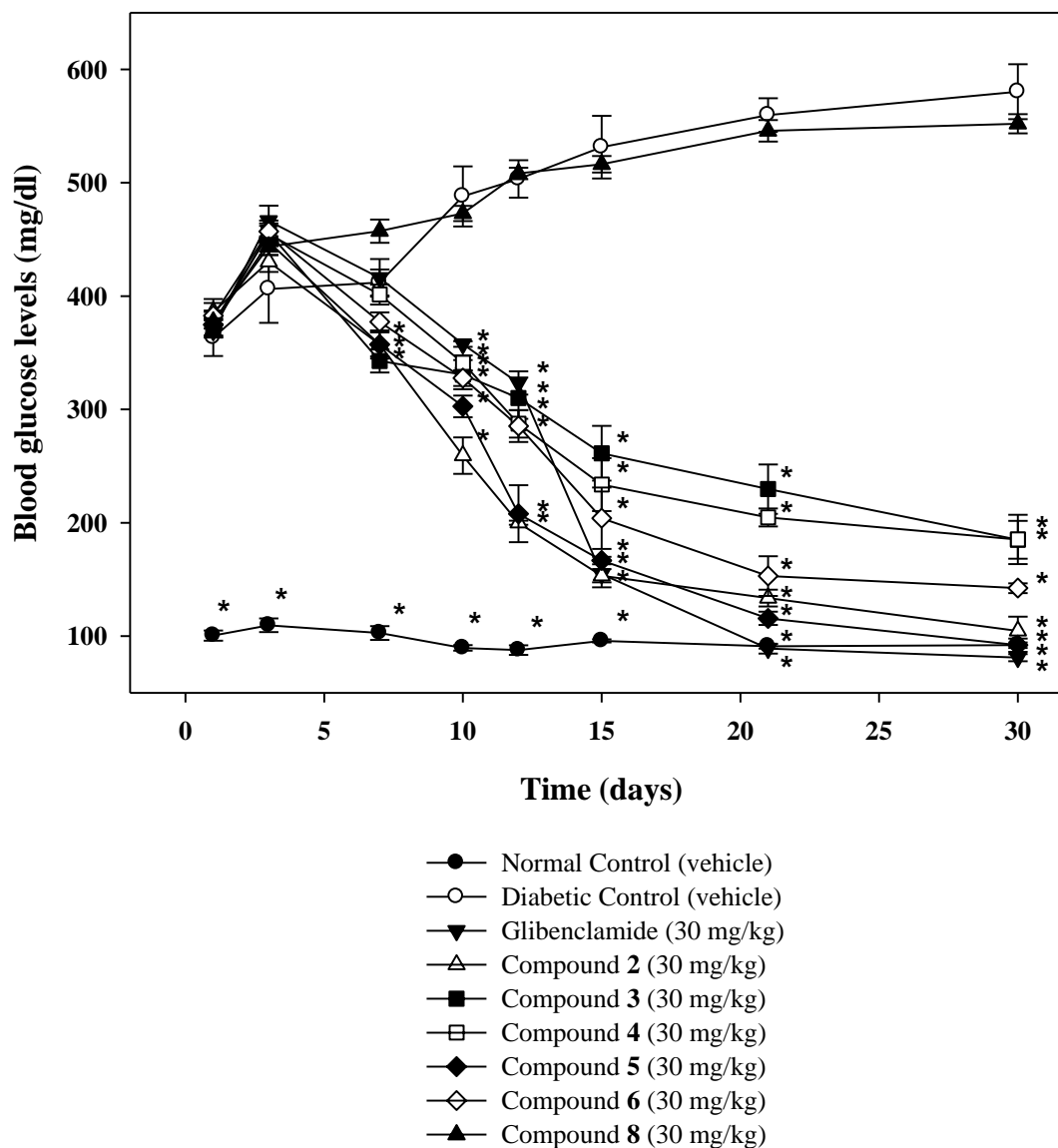


Figure 2. Long-term effect of compounds 2-6 on blood glucose levels in STZ-diabetic rats. Each value is the mean \pm SEM for 6 rats in each group. * $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's t -test for comparison with the diabetic control group at same time.

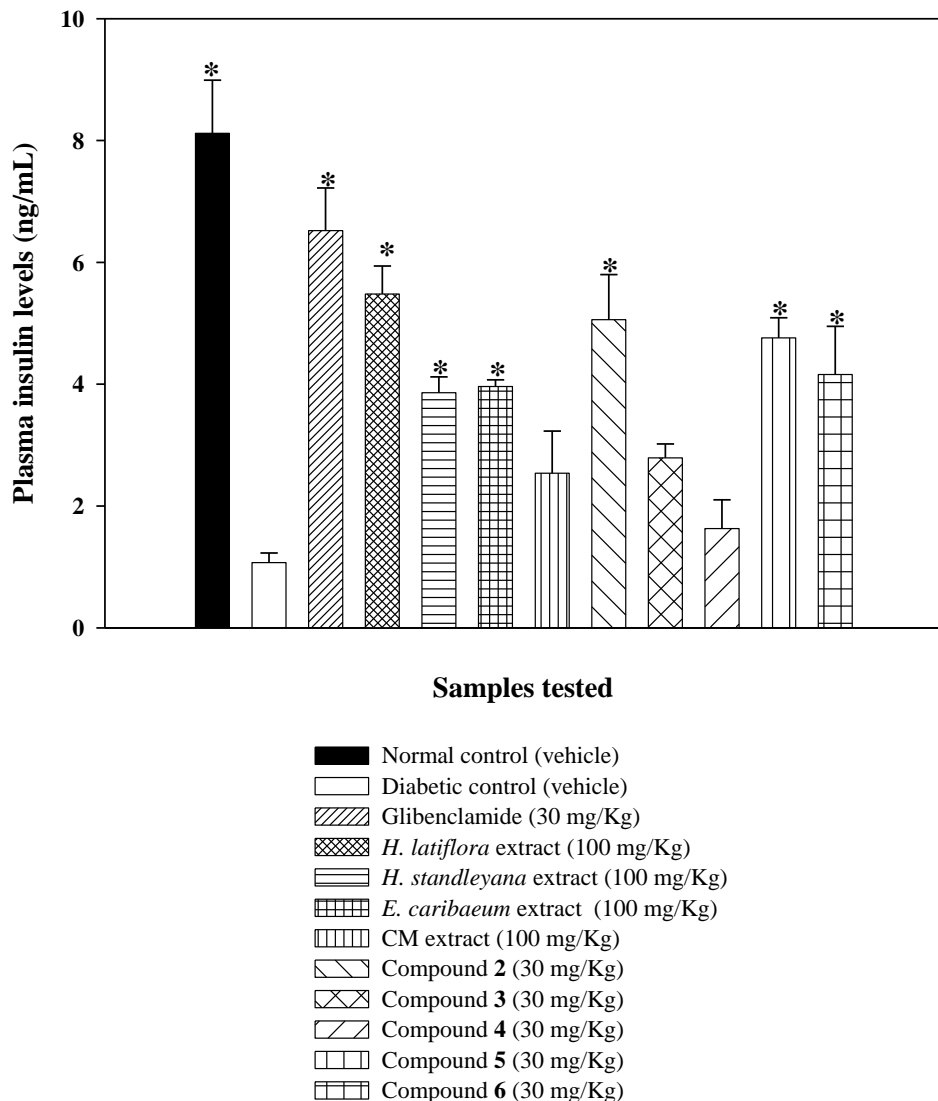


Figure 3. Effect of the extracts of *H. latiflora*, *H. standleyana*, *E. caribaeum*, CM (commercial mixture of copalchi), and compounds 2-6 on plasma insulin levels in STZ-diabetic rats. Each value is the mean \pm SEM for 6 rats in each group. * $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test vs. the diabetic control group at same time.

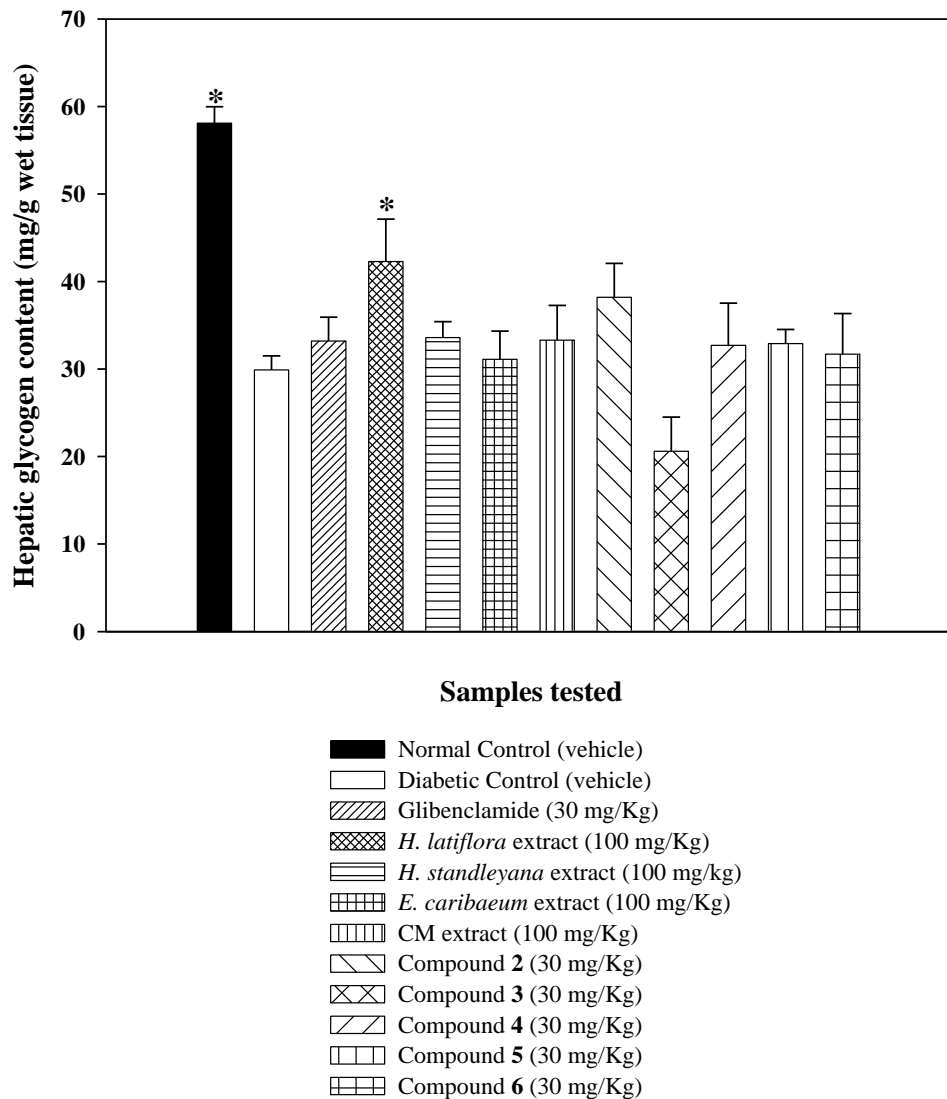


Figure 4. Effect of the extracts of *H. latiflora*, *H. standleyana*, *E. caribaeum*, CM (commercial mixture of copalchi), and compounds 2-6 on glycogen hepatic content in STZ-diabetic rats. Each value is the mean \pm SEM for 6 rats in each group. * $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test vs. the diabetic control group at same time.

DIFUSIÓN CIENTÍFICA

Los resultados obtenidos de la presente tesis doctoral fueron exhibidos en diferentes foros de difusión científica tanto nacionales como internacionales. A continuación se enlistan los trabajos presentados en estos espacios.

	Nombre del Congreso	Lugar donde se realizó el evento	Título del trabajo presentado	Fecha
1.	2ª Reunión Nacional de Química de Productos Naturales	Cocoyoc, Morelos, México	Efecto antihiperglicémico de los constituyentes de <i>Hintonia standleyana</i> en ratas diabéticas inducidas con streptozotocina	Mayo-2005
2.	2ª Reunión Nacional de Química de Productos Naturales	Cocoyoc, Morelos, México	Identificación de la 5-O-[β -D-apiofuranosil-(1 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3,4-dihidroxi-4-fenilcumarina y del ácido desoxicordifolínico, metabolitos novedosos de la especie <i>Hintonia standleyana</i> Bullock (Rubiaceae)	Mayo-2005
3.	46th Annual Meeting "Frontiers in Bioorganic and Natural Products Chemistry" organizado por la American Society of Pharmacognosy"	Corvallis, Oregón, EE.UU.	Antihyperglycemic effect of constituents from <i>Hintonia standleyana</i> in streptozotocin-induced diabetic rats	Julio-2005
4.	46th Annual Meeting "Frontiers in Bioorganic and Natural Products Chemistry" organizado por la American Society of Pharmacognosy"	Corvallis, Oregón, EE.UU.	Antihyperglycemic effect of constituents from <i>Hintonia latiflora</i> in streptozotocin-induced diabetic rats	Julio-2005
5.	46th Annual Meeting "Frontiers in Bioorganic and Natural Products Chemistry" organizado por la American Society of Pharmacognosy"	Corvallis, Oregón, EE.UU.	Antinociceptive effect of <i>Hintonia standleyana</i>	Julio-2005
6.	XIV Congreso de la Sociedad Italo-Latinoamericana de Etnomedicina	México D.F., México	Efecto antinociceptivo de <i>Hintonia standleyana</i> (Rubiaceae)	Septiembre-2005

	Nombre del Congreso	Lugar donde se realizó el evento	Título del trabajo presentado	Fecha
7.	XIV Congreso de la Sociedad Italo-Latinoamericana de Etnomedicina	México D.F., México	Efecto antihiperглиcémico de los constituyentes de <i>Hintonia standleyana</i> en ratas diabéticas.	Septiembre-2005
8.	49th Western Pharmacology Society Meeting y XXIX Congreso Nacional de Farmacología	Puerto Vallarta, Jalisco, México	Antidiabetic metabolites from the stem bark of two species of genus <i>Hintonia</i> (Rubiaceae)	Enero-2006
9.	3ª Reunión Nacional de Química de Productos Naturales y 1ª Reunión Nacional de Investigación en Productos Naturales	Juriquilla, Querétaro, México	Estudio <i>in vitro</i> del modo de acción antidiabético de los constituyentes activos de <i>Hintonia standleyana</i>	Mayo-2006
10.	3ª Reunión Nacional de Química de Productos Naturales y 1ª Reunión Nacional de Investigación en Productos Naturales	Juriquilla, Querétaro, México	Efecto hipoglicemiante de un extracto orgánico de las hojas de <i>Hintonia standleyana</i>	Mayo-2006
11.	47th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy”	Washington, D.C., EE.UU.	Chemical and biological studies of Mexican Rubiaceae used for the treatment of Diabetes mellitus type 2	Julio-2006
12	XXX Congreso Nacional de Farmacología	Culiacán, Sinaloa, México	Efecto antihiperглиcémico de los extractos orgánicos de Rubiáceas mexicanas selectas del complejo Copalchi	Marzo-2007