



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**TEMA DE TESIS**

“Evaluación de la eficacia antihiper glucémica de *Ligusticum porteri* Coult., *Hydrangea seemannii* L. Riley y *Anoda cristata* (L.) Schltdl”

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. Fernando Gabriel Brindis Hernández



TUTOR: Dra. Rachel Mata Essayag

AÑO: 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco a CONACyT por la beca otorgada (becario 131597) para desarrollar mis estudios de doctorado.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos de CONACyT 99395 y DGAPA IN- 218-101.

Agradecer a mi comité tutor, los Doctores Rafael Castillo Bocanegra y Alfredo Ortega Hernández por todos sus valiosos comentarios para enriquecer esta tesis.

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito de tesis, así como sus valiosos comentarios y observaciones.

A los Doctores Robert Bye y Edelmira Linares por proporcionarme el material vegetal para este proyecto.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación USAI de la Facultad de Química UNAM, por el apoyo brindado para la determinación de espectros.

A la M. en C. Isabel Rivero Cruz y a la Dra. Araceli Pérez Vásquez por su apoyo técnico en el desarrollo de esta tesis

Agradecer especialmente a la Dra. Rachel Mata Essayag, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y por estar muy al pendiente del desarrollo de esta tesis.

## **JURADO**

<b>Presidente</b>	Dr. Manuel Jiménez Estrada
<b>Vocal</b>	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
<b>Vocal</b>	Dr. Andrés Navarrete Castro
<b>Vocal</b>	Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
<b>Secretario</b>	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

## **LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS**

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

A Lupita por su paciencia y amor. Gracias

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE DIAGRAMAS</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE GRÁFICAS</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ESPECTROS</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>XIV</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XVI</b>
<b>I. ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Generalidades sobre las plantas objeto de estudio</b>	<b>1</b>
<b>1.2 <i>L. porteri</i></b>	<b>2</b>
<b>1.2.1 Descripción botánica</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2 Nombres comunes y usos medicinales</b>	<b>2</b>
<b>1.2.3 Estudios farmacológicos y químicos previos</b>	<b>3</b>
<b>1.3 <i>H. seemanii</i></b>	<b>12</b>
<b>1.3.1 Descripción botánica</b>	<b>12</b>
<b>1.4 <i>A. cristata</i></b>	<b>14</b>

<b>1.4.1 Descripción botánica</b>	<b>14</b>
<b>1.4.2 Nombres comunes y usos medicinales</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Diabetes mellitus</b>	<b>17</b>
<b>1.5.1 Generalidades</b>	<b>17</b>
<b>1.5.2 Tipos de diabetes</b>	<b>20</b>
<b>1.5.3 Complicaciones de la diabetes</b>	<b>21</b>
<b>1.5.4 Tratamiento de la diabetes mellitus Tipo 2</b>	<b>22</b>
<b>1.5.5 Productos Naturales como inhibidores de las <math>\alpha</math>-glucosidasas</b>	<b>25</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>29</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>32</b>
<b>V. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Procedimientos generales</b>	<b>33</b>
<b>5.1.1 Análisis cromatográficos</b>	<b>33</b>
<b>5.2 Material vegetal</b>	<b>34</b>
<b>5.3 Preparación de los extractos orgánicos y acuosos para las evaluaciones preliminares de <i>A. cristata</i> e <i>H. seemanii</i>.</b>	<b>35</b>
<b>5.4 Aislamiento de los principios activos de <i>L. porteri</i></b>	<b>36</b>

<b>5.5 Ensayos biológicos</b>	<b>37</b>
<b>5.5.1 Determinación de la toxicidad aguda</b>	<b>37</b>
<b>5.5.2 Estudios farmacológicos y bioquímicos</b>	<b>37</b>
<b>5.5.2.1 Animales de experimentación</b>	<b>38</b>
<b>5.5.2.2 Inducción de diabetes</b>	<b>38</b>
<b>5.5.2.3 Determinación de glucosa</b>	<b>39</b>
<b>5.5.2.4 Administración de los tratamientos</b>	<b>40</b>
<b>5.5.2.5 Evaluación aguda de la actividad hipoglucemiante de los extractos</b>	<b>41</b>
<b>5.5.2.6 Efecto de los extractos íntegros sobre la tolerancia a la glucosa y sacarosa</b>	<b>42</b>
<b>5.6 Efecto de los extractos y compuestos puros sobre la actividad de las enzimas <math>\alpha</math>-glucosidasas</b>	<b>42</b>
<b>5.7. Cinética de inhibición de la enzima</b>	<b>43</b>
<b>5.8. Acoplamiento y reconocimiento molecular de los inhibidores de la <math>\alpha</math>-glucosidasa</b>	<b>44</b>
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>6.1 Evaluación de la toxicidad de las especies de estudio</b>	<b>45</b>
<b>6.2 Evaluación de la eficacia antidiabética de las especies seleccionadas</b>	<b>46</b>
<b>6.2.1 Estudios sobre <i>L. porteri</i></b>	<b>46</b>

6.2.1.1 Efecto del extracto íntegro de <i>L. porteri</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tipo agudo	46
6.2.1.2 Efecto del extracto íntegro de <i>L. porteri</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa y a la sacarosa	48
6.2.1.3 Aislamiento de los productos mayoritarios contenidos en el extracto íntegro de <i>L. porteri</i>	50
6.2.1.4 Efecto de los compuestos mayoritarios de <i>L. porteri</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa	51
6.2.1.5 Efecto de los compuestos puros sobre la actividad de las enzimas $\alpha$ -glucosidasa	52
6.2.1.6 Evaluación del probable sitio de unión de la Z-3-butilidenftálida (2) mediante estudios de acoplamiento molecular	55
6.2.1.7 Efecto de la Z-3-butilidenftálida (2) sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la sacarosa	56
6.2.2 Estudio sobre <i>H. seemanni</i>	57
6.2.2.1 Efecto del extracto íntegro de <i>H. seemannii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tipo agudo	57

6.2.2.2 Efecto del extracto íntegro <i>H. seemannii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa y sacarosa	58
6.2.2.3 Efecto de la infusión de <i>H. seemannii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tipo agudo	59
6.2.2.4 Efecto de la infusión <i>H. seemannii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa	61
6.2.2.5 Efecto de las fracciones de la infusión de <i>H. seemannii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tipo agudo	62
6.2.2.6 Efecto de la fracciones orgánica y acuosa de la infusión de <i>H. seemannii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa	65
6.2.3 Estudios sobre <i>A. cristata</i>	66
6.2.3.1 Efecto del extracto de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tipo agudo	66
6.2.3.2 Efecto del extracto íntegro de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa y sacarosa	67

<b>6.2.3.3 Efecto del extracto íntegro de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la maltosa</b>	<b>69</b>
<b>6.2.3.4 Efecto del extracto de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratas diabéticas en experimentos de tipo agudo</b>	<b>70</b>
<b>6.2.3.5 Efecto del extracto de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratas diabéticas en experimentos de tipo subcrónico</b>	<b>71</b>
<b>6.2.3.6 Efecto del extracto íntegro de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratas diabéticas en experimentos de tolerancia a la glucosa</b>	<b>72</b>
<b>6.2.3.7 Efecto del extracto íntegro de <i>A. cristata</i> sobre distintos parámetros bioquímicos en ratón</b>	<b>74</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>77</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>79</b>
<b>IX. ANEXO</b>	<b>83</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>L. porteri</i>	13
2	<i>H. seemanii</i>	13
3	<i>A. cristata</i>	15
4	Número de personas con diabetes mellitus a nivel mundial en 2009	19
5	Prevalencia comparativa de personas con diabetes para el año 2030.	19
6	Principales complicaciones de la diabetes.	23
7	Compuestos 1-5 aislados de las raíces de <i>L. porteri</i>	51
8	Acoplamiento del compuesto <b>2</b> con la enzima $\alpha$ -glucosidasa	56

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Metabolitos secundarios reportados en la especie <i>L. porteri</i>	5
2	Nombres comunes <i>A. cristata</i> en diferentes regiones de México	16
3	Medicamentos utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus	27

## LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama		Página
1	Obtención de la muestra de sangre para el análisis de los niveles de glucosa	40

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Efecto del extracto íntegro de <i>L. porteri</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo.	47
2	Efecto del extracto íntegro de <i>L. porteri</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa	49
3	Efecto del extracto íntegro de <i>L. porteri</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la sacarosa	50
4	Efecto de la diligustílida (1) obtenida de <i>L. porteri</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa	53

5	Efecto de la (Z)-3-butilidenftálida (2) obtenida de <i>L. porteri</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa	54
6	Efecto de la Z-ligustílida (3) obtenida de <i>L. porteri</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa	56
7	Inhibición de la $\alpha$ -glucosidasa a diferentes concentraciones de sustrato	55
8	Efecto de la (Z)-3-butilidenftálida (2) obtenida de <i>L. porteri</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la sacarosa	57
9	Efecto del extracto íntegro de <i>H. seemanii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo	58
10	Efecto del extracto íntegro de <i>H. seemanii</i> de sobre los niveles de glucosa en sangre en experimentos de tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos	60
11	Efecto del extracto íntegro <i>H. seemanii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la sacarosa	61
12	Efecto de la infusión de <i>H. seemanii</i> sobre los niveles de glucemia	62

	en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo	
13	Efecto de la infusión <i>H. seemannii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa	63
14	Efecto de la fracción acuosa de la infusión de <i>H. seemannii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo	64
15	Efecto de las fracción orgánica de la infusión de <i>H. seemannii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo	64
16	Efecto del extracto de la fracción acuosa de la infusión de <i>H. seemannii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa	66
17	Efecto del extracto de la fracción orgánica de la infusión de <i>H. seemannii</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa	67
18	Efecto del extracto de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo	68
19	Efecto del extracto íntegro de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa	69
20	Efecto del extracto íntegro de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la	70

	sacarosa	
21	Efecto del extracto íntegro de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la maltosa	71
22	Efecto del extracto de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratas diabéticas en experimentos de tipo agudo	72
23	Efecto antidiabético subcrónico de <i>A. cristata</i> en ratas hiperglucémicas	73
24	Efecto del extracto íntegro de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de glucemia en ratas diabéticas en experimentos de tolerancia a la glucosa	74
25	Efecto del extracto íntegro de <i>A. cristata</i> sobre distintos parámetros bioquímicos en ratones ICR	75
26	Efecto del extracto íntegro de <i>A. cristata</i> sobre los niveles de LDL en ratones ICR	75

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Material vegetal analizado en el presente trabajo	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Ad libitum</i>	A voluntad
<i>Per os</i>	Vía oral
AcOEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
Å	Amstrongs
ANADEVA	Análisis de Varianza
ADA	Asociación Americana de Diabetes
cm	Centímetro
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo Deuterado
ICDRA	Conferencia Internacional de las Autoridades Reguladoras de Drogas
IDF	Federación Internacional de la Diabetes
CG	Cromatografía de Gases
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
dL	Decilitro
δ	Desplazamiento Químico
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1

DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
E.E.M..M.	Error Estándar de la Media
EM-FAB	Espectroscopía de Masas de Bombardeo Rápido de Átomos
EM-IE	Espectroscopía de Masas de Impacto Electrónico
STZ	Estreptozotocina
IPF	Factor Promotor de la Insulina
FM	Fórmula Molecular
°C	Grado Centígrado
g	Gramos
h	Horas
IR	Espectroscopía en el Infrarrojo
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
M <sup>+</sup>	Ión Molecular
Kg	Kilogramo
MeOH	Metanol
CD <sub>3</sub> OD	Metanol Deuterado
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
mg	Miligramo

mL	Mililitro
mm	Milímetros
min	Minutos
MHz	Mega Hertz
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por Millón
PM	Peso Molecular
<i>m/z</i>	Relación Masa-Carga
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
TMS	Tetrametilsilano
<i>t<sub>R</sub></i>	Tiempo de Retención
UV	Espectroscopía en el Ultra Violeta
G <sub>i</sub>	Valor de Glucemia Inicial
G <sub>t</sub>	Valor de Glucemia Total

## RESUMEN

El presente estudio describe las propiedades antidiabéticas de tres especies de plantas de uso medicinal popular en México. Las especies objeto de estudio fueron *Ligusticum porteri* J.M. Coult. & Rose (Apiaceae), *Hydrangea seemannii* L. Riley (Hydrangeaceae) y *Anoda cristata* (L.) Schltdl (Malvaceae).

Los resultados de la investigación de *L. porteri* permitieron comprobar que el extracto íntegro es seguro hasta la dosis de 1.085 g/Kg en ratones, así como también que la especie posee propiedades antihiper glucémicas. El estudio fitoquímico de la planta permitió aislar y purificar cinco compuestos: miristicina (**4**), diligustílida (**1**), Z-ligustílida (**3**), Z-3-butilidenftálida (**2**) y el ácido ferúlico (**5**). El potencial antidiabético de los productos mayoritarios diligustílida (**1**), Z-ligustílida (**3**) y Z-3-butilidenftálida (**2**) se evaluó también en ensayos de tipo agudo y de tolerancia a la glucosa y sacarosa. Los resultados de estos ensayos permitieron descubrir los efectos antihiper glucémicos e hipoglucemiantes de la Z-3-butilidenftálida (**2**), así como los hipoglucemiantes de **1** y **3**. Por otra parte, los cinco productos fueron evaluados en un experimento enzimático *in vitro* de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa resultando inactivos la miristicina (**4**), el ácido ferúlico (**5**) y la Z-ligustílida (**3**), en tanto que la Z-3-butilidenftálida (**2**) fue activa ( $CI_{50} = 0.4$  mg/ml); de acuerdo con los experimentos de cinética este último compuesto se comporta como un inhibidor no competitivo de la enzima. Además, el análisis de acoplamiento molecular permitió predecir que el sitio de unión de la Z-3-butilidenftálida (**2**) es diferente al de la acarbosa; éste resultado es congruente con la inhibición de tipo no competitivo demostrada para el producto.

Para la especie *H. seemannii* los ensayos farmacológicos *in vivo* mostrarón que el extracto íntegro de esta especie posee propiedades antihiper glucémicas en ratones diabéticos; en el ensayo de tipo agudo, el extracto mostró un efecto hipoglucemiante significativo en ratones diabéticos. Estos resultados se encuentran en armonía con el uso popular de la especie como un agente antidiabético.

Los extractos de *A. cristata* inhibieron de manera eficiente el pico posprandial en ensayos de tolerancia a la glucosa, sacarosa y maltosa; estos resultados ponen de manifiesto sus propiedades antihiper glucémicas. En un experimento de tipo agudo fue posible comprobar también las propiedades hipoglucemiantes de la planta. Finalmente, las pruebas bioquímicas mostraron que la especie vegetal provoca una disminución de los niveles de lípidos en sangre.

Con base a los resultados globales *A. cristata*, *H. seemannii* y *L. porteri* representan una excelente alternativa para el control de la diabetes, y más importante aún los mismos permiten validar a nivel preclínico el uso popular de las especies para el tratamiento de la diabetes en las prácticas médicas populares de México. El descubrimiento de las propiedades hipoglucemiantes y/o antihiper glucémicas de las flálidas de *L. porteri* no tiene precedentes en la literatura científica.

## ABSTRACT

The present study describes the antidiabetic properties of three medicinal species widely used nowadays in Mexican folk medicine. The species analyzed were *Ligusticum porteri* J.M. Coult. & Rose. (Apiaceae), *Hydrangea seemanii* L. Riley (Hydrangeaceae) and *Anoda cristata* (L.) Schltdl (Malvaceae).

The results of the research on *L. porteri* revealed that the extract is safe for mice up to 1.085 g/kg. In addition, the organic extract from the roots of the plant showed hypoglycemic and antihyperglycemic properties. Phytochemical study of the plant led to the isolation and purification of five compounds, namely, myristicin (**4**), diligustilide (**1**), Z-ligustilide (**3**), Z-3-butylidenephthalide (**2**) and ferulic acid (**5**). The major products diligustilide (**1**), Z-ligustilide (**3**) and Z-3-butylidenephthalide (**2**) showed antihyperglycemic and hypoglycemic effects. On the other hand, the five products were evaluated *in vitro* to determine their inhibitory effect on the enzyme  $\alpha$ -glucosidase; myristicin, ferulic acid and Z-ligustilide (**3**) were inactive, while the Z-3-butylidenephthalide (**2**) was active ( $IC_{50} = 0.4$  mg / ml), acting as a noncompetitive inhibitor of this important enzyme. Furthermore, molecular docking predicted that the binding site of the Z-3-butylidenephthalide (**2**) is different to that of acarbose; this is consistent with the noncompetitive inhibitory effect of **2**.

In conclusion, the information generated hitherto indicates that *L. porteri* extract and compounds have potent antihyperglycemic effect. (Z)-3-butylidenephthalide (**2**), displayed significant antihyperglycemic effect by inhibiting the activity of intestinal and yeast  $\alpha$ -glucosidases. Ferulic acid (**5**), present in high amounts in the extract, has demonstrated in previous investigations noted stimulatory effects on insulin secretion *in vivo* and *in vitro*. Therefore, the extract of *L. porteri* represents a good phytotherapeutic

agent with active principles having different modes of action. In addition, (Z)-3-butylidenephthalide (**2**) is a new  $\alpha$ -glucosidase inhibitor potentially useful for the development of new antidiabetic, antiobesity, and antiviral agents. The present study provides scientific support of the use of *L. porteri* in Mexican folk medicine for the treatment of diabetes.

For the species *H. seemanii*, *in vivo* pharmacological tests showed that the organic extract and the infusion possesses antihyperglycemic and hypoglycemic action in diabetic mice.

*A. cristata* effectively inhibited the postprandial peak in glucose, sucrose and maltose tolerance tests; this species showed also hypoglycemic properties, both in mice and rat models. Finally, biochemical tests show that the plant has an important effect on lowering blood lipids. Thus, altogether these results make *A. cristata* an excellent candidate for developing a drug useful for controlling diabetes.

## I. ANTECEDENTES

### 1.1 Generalidades sobre las plantas objeto de estudio

Al igual que en otros países del mundo, en México un gran sector de la población que padece diabetes utiliza para su tratamiento tanto la medicina convencional como la tradicional (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Soumyanath, 2006). Normalmente, los pacientes son diagnosticados en algún centro de salud donde los médicos prescriben el tratamiento alopático apropiado. Sin embargo, una vez hecho el diagnóstico los pacientes frecuentemente recurren a los tratamientos prescritos por los curanderos locales o vendedores de hierbas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005), ello ante la creencia de que estos productos por ser naturales son inocuos; además estos tratamientos a menudo les resultan más económicos y accesibles (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Guerrero *et al.*, 2005, 2007). Tres especies que se utilizan actualmente en México para el tratamiento de la diabetes son: *Ligusticum porteri* J.M. Coulter. & Rose (Apiaceae), *Hydrangea seemannii* L. Riley (Hydrangeaceae) y *Anoda cristata* (L.) Schltldl (Malvaceae). El uso de la primera fue recientemente descrito por Andrade-Cetto y Heinrich (2005) y Oliva (1999); el uso de las otras dos plantas fue descubierto por Bye y colaboradores (2008) durante sus estudios de mercado en los Estados de Chihuahua y México. Cabe mencionar que ninguna de estas especies ha sido objeto de estudios previos en cuanto a sus propiedades antidiabéticas a nivel preclínico.

## **1.2 *Ligusticum porteri***

### **1.2.1 Descripción botánica**

*L. porteri* J.M. Coult. & Rose (Apiaceae) (Figura 1) es una hierba monoica, perenne. Su tallo es firme, caulescente, ramificado libremente, de 50 a 100 cm de altura, glabro a través de la inflorescencia puberulenta. Su raíz es axonomórfica, perenne, con pocas raíces adventicias desde la corona, fibrosas y coronadas sobre la raíz principal. Sus hojas son ovadas en el contorno general, excluyendo los pecíolos, de 15 a 28 cm de largo y de 12 a 20 cm de ancho, ternadas-pinnadas, en foliolos ovados, mayormente distintos, sésiles a peciolados, con un tamaño de 2.5 a 5 cm de largo y de 1 a 3 cm de ancho, regularmente incididos. Su inflorescencia es de umbelas compuestas, sus flores son blancas y los frutos son esquizocárpicos, oblongos, de 5 a 8 mm de largo, de 2 a 4 mm de ancho. Sus semillas son aplanadas dorsalmente en la sección transversal, acanaladas bajo los tubos (Mathias y Constance, 1944; Cronquist *et al.*, 1997).

### **1.2.2 Nombres comunes y usos medicinales**

La especie es conocida popularmente en Chihuahua y el Distrito Federal como “chuchupate”. En la región Tarahumara se denomina “wasia”, los apaches la denominan “ha-chi-de” y los Zunis la llamaban “kwimi dechi”. Otros nombres para designar la planta son: “osha”, “raíz de angélica”, “raíz de cochino”, “wadda-e-gopa”, “yerba del cochino”, así como raíz de licorice y raíz del oso (Linares y Bye, 1987).

La raíz de *L. porteri* se caracteriza por un fuerte olor y es ampliamente usada en la medicina tradicional del Norte de México y suroeste de los Estados Unidos de América;

lugar de donde es originaria la planta. En Chihuahua se toma el cocimiento de la raíz, para quitar el dolor de pulmón cuando la persona se empieza a “hacer vieja” y se manifiesta por cansancio. Los Indios Tarahumara y Zuni emplean la planta en ceremonias rituales de curación (Linares y Bye, 1987).

En el sur de Colorado y en Nuevo México, la raíz seca se mastica como aperitivo (Ford, 1975; Hicks, 1966).

En las prácticas fitoterapéuticas contemporáneas de Francia, *L. porteri* se usa por sus propiedades anestésicas y desinfectantes. Como anestésico se usa a nivel de la lengua quizás por la sensación ardiente que provoca al contacto con las mucosas. La raíz machacada en agua caliente sirve como enjuague para aliviar infecciones de la garganta y la laringe. En caso de afecciones inflamatorias de las vías respiratorias superiores también se recomienda una preparación de la raíz en miel, añejada durante seis meses (Goetz, 2005).

La primera y única descripción de su uso como antidiabético fue realizada por Andrade-Cetto y Heinrich en el año 2005. Por lo tanto, esta aplicación es reciente y posiblemente obedece a la necesidad y demanda por nuevos tratamientos para esta enfermedad de prevalencia creciente.

### **1.2.3 Estudios farmacológicos y químicos previos**

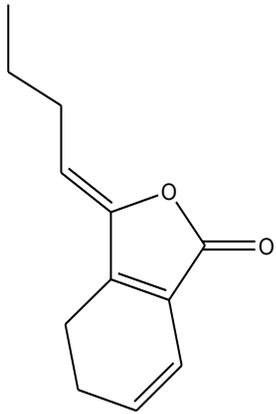
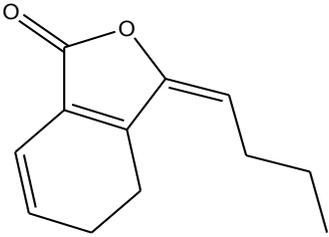
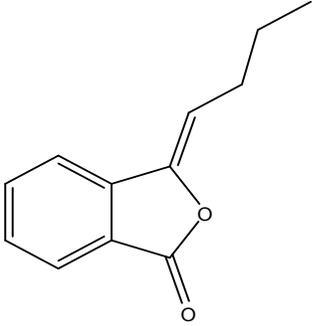
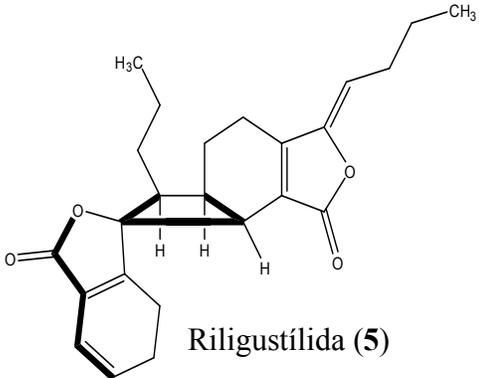
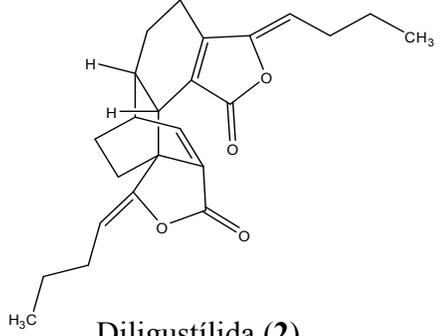
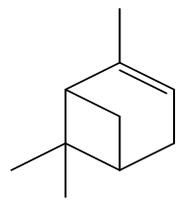
A pesar del amplio uso popular de *L. porteri* en USA y México, son relativamente poco los estudios conducentes a comprobar sus usos medicinales y a continuación se describirán brevemente los pocos estudios existentes. Así, el aceite esencial (100 mg/kg) preparado de las raíces incrementa la actividad antimicrobiana de norfloxacin en una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a dicho antibiótico; los extractos etanólico y acuoso no afectan el crecimiento de líneas celulares cancerosas humanas de mama MCF-7/A2,

HCT8/E11 y colon (Cégiela-Carlio *et al.*, 2005). Posteriormente, Déciga Campos y colaboradores (2007) comprobaron que el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) no provoca genotoxicidad y posee una dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de 1 g/kg, efectos determinados mediante las pruebas de Ames y Lorke, respectivamente.

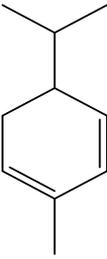
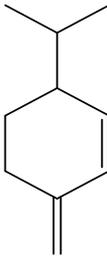
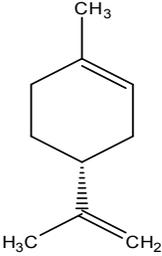
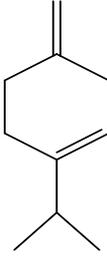
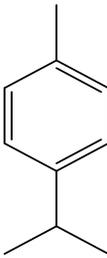
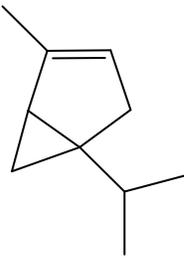
Desde el punto de vista químico, la especie *L. porteri* ha sido objeto de varias investigaciones. Los metabolitos secundarios aislados y caracterizados en estos estudios pertenecen principalmente a las categorías de las ftálicas, terpenoides y compuestos fenólicos, entre otros (Delgado *et al.*, 1988;1992; Cégiela-Carlio *et al.*, 2005; Reza, 1987). Las ftálicas aisladas incluyen *Z*-ligustílida (**1**), *E*-ligustílida (**3**), *Z*-3-butilidenftálica (**4**) (Delgado *et al.*, 1992; Cégiela-Carlio *et al.*, 2005), diligustílida (**2**) y riligustílida (**5**), (Delgado *et al.*, 1988; Reza, 1987). Los terpenoides detectados pertenecen principalmente a la categoría de los monoterpenoides como el  $\alpha$ -pineno (**6**),  $\alpha$ -felandreno (**7**),  $\beta$ -felandreno (**8**), limoneno (**9**),  $\alpha$ -terpineno (**10**), *p*-cimeno (**11**) (Delgado *et al.*, 1992),  $\alpha$ -tujeno (**12**), sabineno (**13**),  $\beta$ -pineno (**14**), mirceno (**15**),  $\gamma$ -terpineno (**16**), *cis*-tujona (**17**), 1,2-epóxido del  $\alpha$ -felandreno (**18**), sabinol (**19**),  $\alpha$ -terpineol (**20**), acetato de bornilo (**21**), metil éter del timol (**22**), metil éter del carvacrol (**23**), acetato de sabinilo (**24**), acetato de  $\alpha$ -terpinilo (**25**), acetato de isotujilo (**26**), 1,3,8-mentatrieno (**27**), terpinen-4-ol (**28**), acetato de *trans*-pinocarveilo (**29**) y el 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno (**30**). Además se ha descrito la presencia de  $\alpha$ -barbateno (**31**),  $\beta$ -barbateno (**32**),  $\beta$ -funebreno (**33**), widreno (**34**),  $\alpha$ -chamigreno (**35**),  $\alpha$ -eudesmol (**36**), kesano (**37**), ligulóxido (**38**) (Delgado *et al.*, 1992; Cégiela-Carlio *et al.*, 2005). Finalmente, los compuestos fenólicos y otros aromáticos incluyen isovainillina (**39**), ácido-4-hidroxi-3-metoxicinámico (**40**) elemicina (**41**), *o*-metileugenol (**42**), 4-vinilguayacol (**43**), pentilbenceno (**44**), miristicina (**45**), (Cégiela-Carlio *et al.*, 2005) y

ferulato de coniferilo (**46**) (Tabla 1)( Delgado *et al.*, 1988; Reza, 1987; Zschocke *et al.*, 1998).

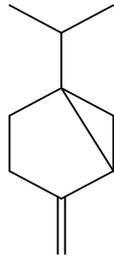
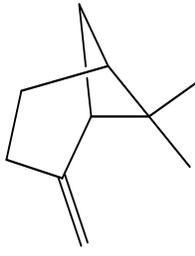
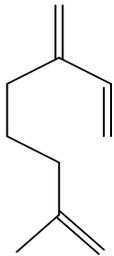
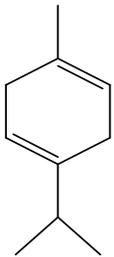
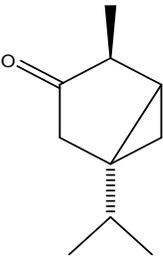
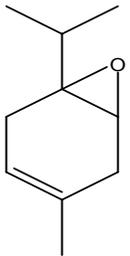
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados en la especie *L. porteri*

 <p>Z-Ligustilida (<b>1</b>)</p>	 <p>E-Ligustilida (<b>3</b>)</p>
 <p>(Z)-3-Butilidenftalida (<b>4</b>)</p>	 <p>Riligustilida (<b>5</b>)</p>
 <p>Diligustilida (<b>2</b>)</p>	 <p><math>\alpha</math>-Pino (<b>6</b>)</p>

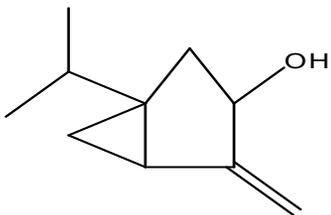
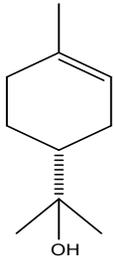
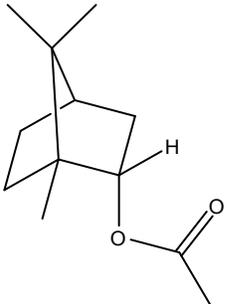
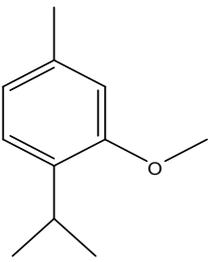
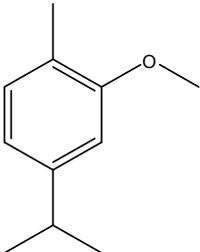
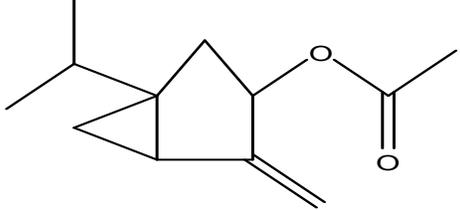
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados en la especie *L. porteri* (Continuación).

 <p><math>\alpha</math>-Felandreno (7)</p>	 <p><math>\beta</math>-Felandreno (8)</p>
 <p>Limoneno (9)</p>	 <p><math>\alpha</math>-Terpineno (10)</p>
 <p><i>p</i>-Cimeno (11)</p>	 <p><math>\alpha</math>-Tujeno (12)</p>

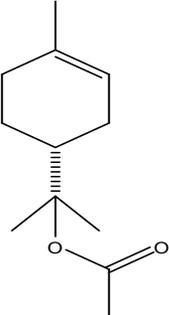
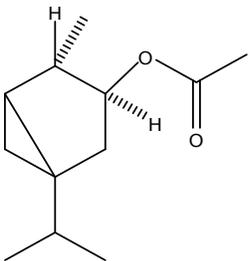
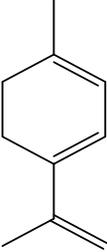
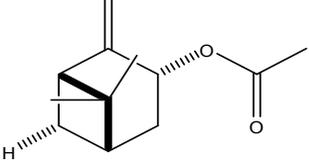
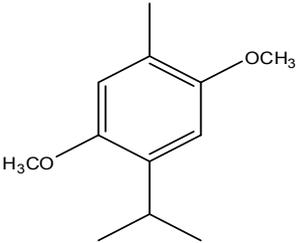
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados en la especie *L. porteri* (Continuación).

 <p>Sabineno (13)</p>	 <p><math>\beta</math>-Pineno (14)</p>
 <p>Mirceno (15)</p>	 <p><math>\gamma</math>-Terpineno (16)</p>
 <p>Tujona (17)</p>	 <p>1,2-Epoxido de <math>\alpha</math>-Felandreno (18)</p>

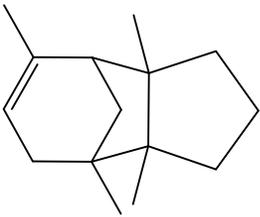
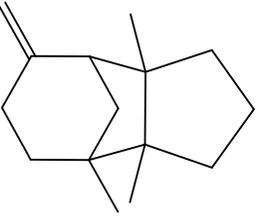
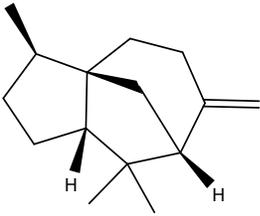
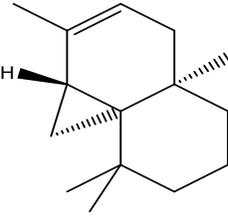
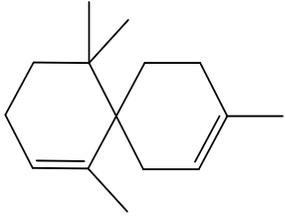
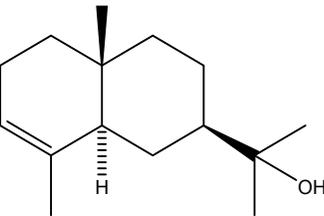
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados en la especie *L. porteri* (Continuación).

 <p>Sabinol (19)</p>	 <p><math>\alpha</math>-Terpineol (20)</p>
 <p>Acetato de Bornilo (21)</p>	 <p>Metiléter del Timol (22)</p>
 <p>Metiléter del Carvacrol (23)</p>	 <p>Acetato de Sabinilo (24)</p>

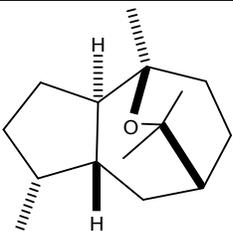
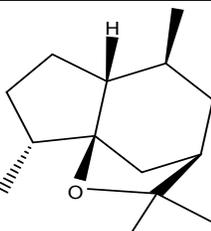
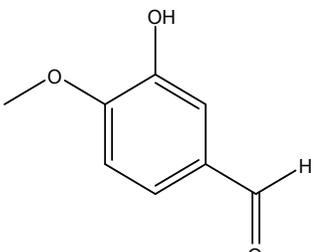
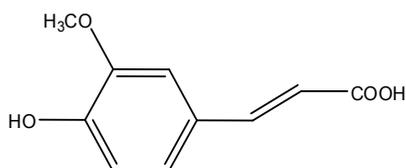
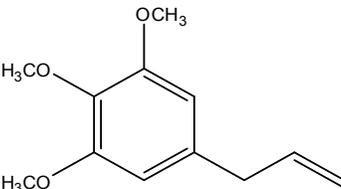
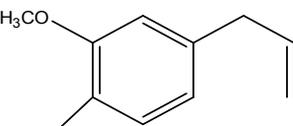
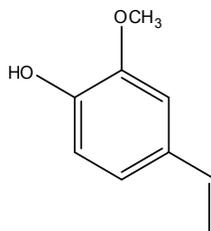
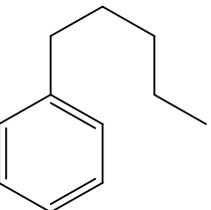
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados en la especie *L. porteri* (Continuación).

 <p>Acetato de <math>\alpha</math>-Terpinilo (25)</p>	 <p>Acetato de Isotujilo (26)</p>
 <p>1,3,8-Mentatrieno (27)</p>	 <p>Terpinen-4-ol (28)</p>
 <p>Acetato de <i>trans</i>-Pinocarveilo (29)</p>	 <p>2,5-Dimetoxi-<i>p</i>-Cimeno (30)</p>

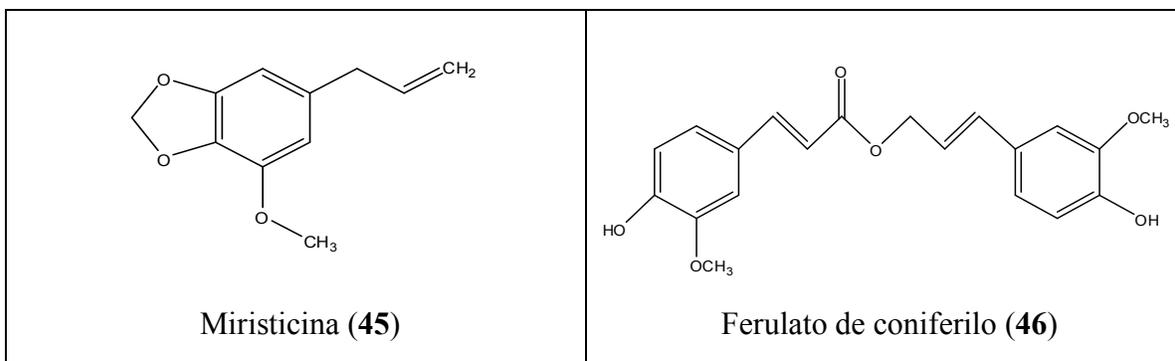
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados en la especie *L. porteri* (Continuación).

 <p><math>\alpha</math>-Barbateno (31)</p>	 <p><math>\beta</math>-Barbateno (32)</p>
 <p><math>\beta</math>-Funebreno (33)</p>	 <p>Widreno (34)</p>
 <p><math>\alpha</math>-Chamigreno (35)</p>	 <p><math>\alpha</math>-Eudesmol (36)</p>

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados en la especie *L. porteri* (Continuación).

 <p>Kesano (37)</p>	 <p>Ligulóxido (38)</p>
 <p>Isovainillina (39)</p>	 <p>Ácido-4-hidroxi-3-metoxicinámico (40)</p>
 <p>Elemicina (41)</p>	 <p><i>o</i>-Metileugenol (42)</p>
 <p>4-Vinilguayacol (43)</p>	 <p>Pentilbenceno (44)</p>

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios reportados en la especie *L. porteri* (Continuación).



### 1.3 *Hydrangea seemanii*

#### 1.3.1 Descripción botánica

*H. seemanii* L. Riley (Hydrangeaceae) (Figura 2) es nativa de la sierra madre de Durango; crece a una altitud de 1800 a 2300 metros en las barrancas y laderas de dicha sierra. La planta es una enredadera o pequeño arbusto de hojas perenes, grandes, dentadas, verde oscuro con flores brillantes grandes de un color blanco crema y perfumadas en verano.

En el estado de Chihuahua se usa la infusión para tratar la diabetes (Bye, 2009). Sin embargo, no existen reportes sobre el estudio farmacológico o químico de esta especie, solo el uso en la medicina tradicional del estado de Chihuahua (Bye, 2008).



**Figura 1.** *L. porteri*. Fuente. Forestry Images, <http://www.forestryimages.org>



**Figura 2.** *H. seemanii* Fuente. Garden world images

## 1.4 *Anoda cristata*

### 1.4.1 Descripción botánica

*A. cristata* (L.) Schltl (Malvaceae) (Figura 3) es una hierba o subarbusto erecto, rastrera, de hasta 1 m de alto, anual con hojas ovaladas, lanceoladas, de 2 a 9 cm de longitud y verdes. Las flores sobre pedúnculos largos, son axilares, con cáliz de 5 a 10 mm de longitud, lilas o moradas; el fruto es pubescente de 8 a 15 mm de diámetro. Se distribuye desde Texas hasta Bolivia. En México es abundante como maleza en todo el centro del país en cultivos y terrenos perturbados (Olivas, 1999).

### 1.4.2 Nombres comunes y usos medicinales

Los nombres populares de *A. cristata* son variados y se deben a que en las distintas zonas de uso se conoce con un nombre diferente. Así por ejemplo, en Chiapas se conoce como chalamizotz, en Michoacán como malvón de campo; en Puebla, Estado de México e Hidalgo se le llama alache, quesito y violeta; en tanto que en Veracruz, amapolita de campo. Finalmente los Tarahumaras la llaman rehueque. Otros nombres comunes de la planta se incluyen en la Tabla 2 (Rendon *et al.*, 2001).

De acuerdo con el estudio de Rendon y colaboradores (2001) el uso más común de la planta es para tratar la tos, se combinada con gordolobo, buganvilla, tejocote y canela en infusión endulzada con miel. Otros usos incluyen el tratamiento de dolor de estómago, (Olivas, 1999), hepatitis, calentura, fiebre, disentería, inflamación de estómago, afecciones pulmonares y problemas del riñón. Para el alivio de estos padecimientos la planta se

administra en forma de cocimiento de hojas, tallo y hasta la raíz. También se utiliza contra la caída del cabello, aplicando el agua de cocción de la planta en forma local. Su uso como antidiabético parece ser reciente y nos fue reportado por Bye y Linares (2008).

En la literatura especializada no se encuentran reportados estudios científicos previos que comprueben alguna de las propiedades medicinales o describan la composición química de la planta.



**Figura 3.** *A. cristata*. Fuente. <http://www.annekestuintje.nl>

**Tabla 2.** Nombres comunes de *A. cristata* en diferentes regiones de México

Nombre común	Lenguaje	Estado
Alache		Distrito Federal, Estado de México, Guerrero, Puebla
Alachi	Mixteco	Guerrero, Puebla
Altea		Michoacán, Puebla
Alushi		Puebla
Amapola de campo	Mixteco	Distrito Federal, Estado de México
Amapola o Amapolita	Mixteco	Chiapas, Veracruz
Amapola o amapolita morada		Chiapas, Distrito Federal, Estado de México, Jalisco, Puebla
Bimalva		Michoacán, Puebla
Campanita		Veracruz
Hierba del ojo		Veracruz
Itsukua tsipata	Tarasco	Michoacán
Malva		Guerrero, Michoacán, Morelos, Sonora, Jalisco, Aguascalientes
Malva chica		Guanajuato
Malva de castilla		n r
Malvavisco		Michoacán, Puebla
Momol	Tzotzil	Chiapas
Pie de gallo		Oaxaca
Quesitos		Hidalgo, Sonora
Rehué	Rarámuri	Chihuahua
Tulipancillo		Veracruz
Violeta		Distrito Federal, Guerrero, Michoacán, Morelos, Veracruz
Violeta del Campo		Veracruz
Violeta silvestre		Sinaloa
Yao nundo		Guerrero
Yax noch	Tzotzil	Chiapas
Yaxal	Tzeltal	Chiapas
Xihuitl	Mexicano	Estado de México

## 1.5 Diabetes mellitus

### 1.5.1 Generalidades

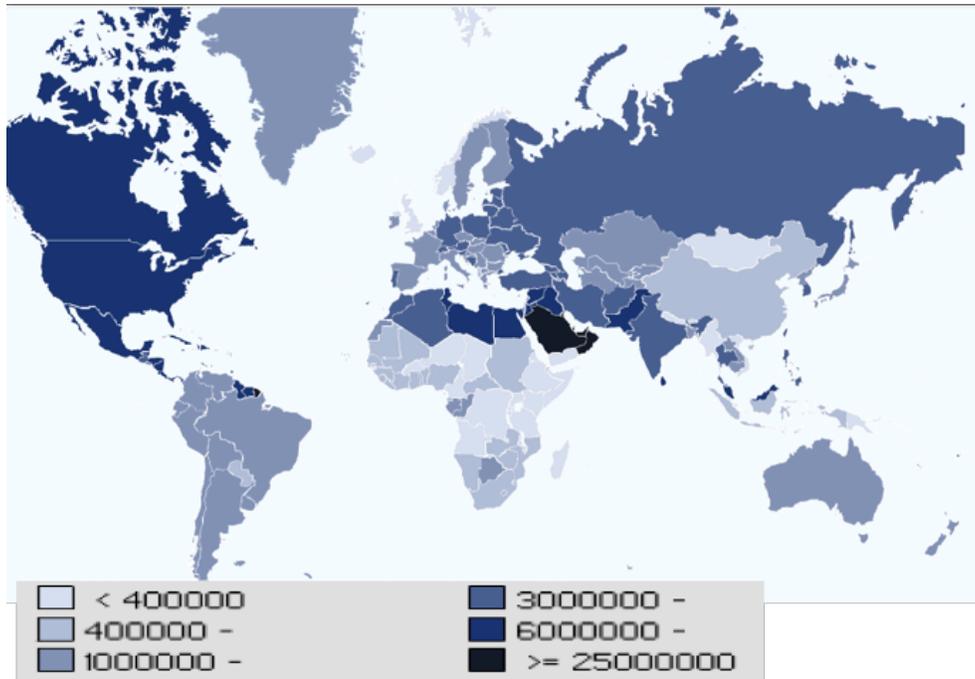
La diabetes mellitus (DM) es una afección de múltiples etiologías asociada a un defecto en la secreción de insulina y/o resistencia a la acción de esta hormona. La enfermedad se caracteriza por un estado de hiperglucemia crónico que surge como una consecuencia de una deficiencia en los mecanismos que hacen posible, o que regulan, la utilización de la glucosa en el organismo (Ross *et al.*, 2004; Aguilar-Salinas *et al.*, 2005)

En la actualidad la diabetes mellitus representa un grave problema de salud tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Figura 4). De acuerdo a la Federación Internacional de la Diabetes (IDF) el número de personas con esta enfermedad en el 2010 alcanzó niveles epidémicos con 285 millones de casos reportados, el 95% de estos con diabetes tipo II, este aumento en la prevalencia es debido a varias razones; las más comunes incluyen cambios de dieta, urbanización, incremento en la obesidad y la inactividad física (Eugede *et al* 2010; Shaw *et al.*, 2010). Estas cifras representan un incremento de 39 millones de enfermos en comparación a lo reportado en 2007. Se estima que para el 2030 habrá 439 millones de enfermos a nivel global y lo que es peor aún, se estima que el 75% de la población con diabetes residirá en países desarrollados (Figura 5).

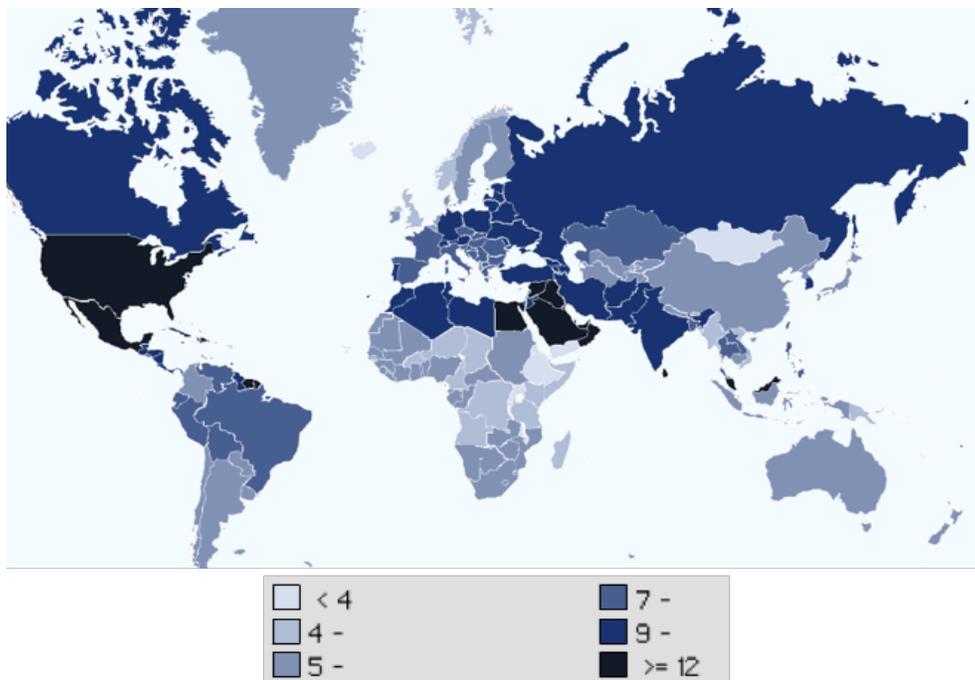
Teniendo en cuenta estas prevalencias, el costo humano, social y económico por esta enfermedad es muy alto. Así, la IDF estimó que 3.9 millones de muertes fueron causadas por la diabetes en el año 2010, lo que representa el 6.8% de la mortalidad global. En cuanto a la edad de los adultos que padecen esta enfermedad, en los países en desarrollo oscila entre 45-64 años mientras en los países desarrollados es más frecuente en pacientes

mayores de 65 años. Esta distribución de edades es importante para calcular los costos de la diabetes, lo que resulta difícil de realizar con precisión y como ejemplo podemos mencionar que para el tratamiento de esta enfermedad, que incluye consultas médicas, exámenes de laboratorio y medicamentos alópatas, puede llegar a tener un costo entre 1, 800 y 4, 000 pesos mensuales (Medina-Salgado, 2005), implicando un fuerte impacto en la economía familiar, de manera general algunas estimaciones sugieren que en 2007 se gastaron 232 billones de dólares en todo el mundo para el tratamiento y prevención de esta enfermedad y, a partir de este último dato, se estima que para el año 2025 el monto total para el tratamiento y prevención de la diabetes alcance como mínimo 300 billones de dólares (Eugede *et al.*, 2010).

En el caso particular de nuestro país podemos señalar que la frecuencia de diabetes mellitus en la población mexicana ha aumentado más de treinta veces durante los últimos 50 años. De tal forma, que esta enfermedad es la que más demanda atención médica y una de las causas más importantes de hospitalización en México (Hernández-Ávila y Olaíz, 2002). Datos de la encuesta nacional de salud indican que en el año 2000 cerca de 3.6 millones de mexicanos mayores de 20 años padecen diabetes mellitus tipo II y se estima que para el año 2030 el número de pacientes diabéticos en México se incrementará a más de seis millones (Barceló *et al.*, 2003).



**Figura 4.** Número de personas con Diabetes mellitus a nivel mundial en 2009. Fuente: IDF Diabetes atlas 4a ed. 2009.



**Figura 5.** Prevalencia comparativa de personas con diabetes, 2030. Fuente: IDF Diabetes atlas 4a ed. 2009.

### 1.5.2 Tipos de diabetes

La OMS y el Comité de Expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), han clasificado a la diabetes en cuatro grupos: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2, diabetes gestacional, y otros tipos específicos de diabetes (Cabrera *et al.*, 2000).

La diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), también llamada diabetes juvenil, usualmente se manifiesta antes de los 20 años (niños y adolescentes) de forma repentina. Esta patología, se debe a un proceso de destrucción de las células beta del páncreas provocada por alteraciones inmunológicas o de causa desconocida, y por la cual se requiere una dosis diaria de insulina para prevenir el desarrollo de cetoacidosis, coma y muerte (Cabrera-Rode *et al.*, 2000; Garduño, 2001; Hopkins, 2005). Los síntomas comunes de la DMT1 incluyen: sed excesiva, hambre continua, necesidad excesiva de orinar, pérdida de peso, respiración rápida y profunda, cambios en la visión, somnolencia y agotamiento excesivo. Estos síntomas pueden aparecer de forma repentina (OMS, 2004).

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), se presenta en un 90 a 95% de los casos de diabetes y se caracteriza por un trastorno tanto en la secreción (producción insuficiente por células beta del páncreas), como en la acción de la insulina (aprovechamiento inadecuado por el organismo); (Aguilar-Salinas *et al.*, 2003; Barceló *et al.*, 2003). Su manifestación es más gradual y los niveles de glucosa en sangre son más estables, sin embargo, se requiere el uso de agentes hipoglucemiantes orales, que son efectivos en el control de la diabetes, aunque no eliminan totalmente sus complicaciones (Garduño-Ramírez, 2001; Hopkins, 2005). Los pacientes con este tipo de diabetes, pueden tener síntomas parecidos a los que presentan los pacientes con DMT1, pero menos obvios, e incluso algunos no presentan

síntomas y sólo se les diagnostica después de varios años del inicio de la enfermedad (OMS, 2004).

La diabetes gestacional es una intolerancia a los carbohidratos que conduce a una hiperglucemia de intensidad variable durante el embarazo (OMS, 1999), y puede desaparecer después de concluida esta etapa, o bien puede desarrollarse DMT2.

La diabetes gestacional, así como otros tipos específicos de diabetes, por ejemplo la pancreatopatía fibrocalculosa (formalmente clasificada como diabetes mellitus que está relacionada con la mala nutrición, es el tipo de diabetes en que los jóvenes diabéticos de países tropicales en desarrollo poseen una historia nutricional deficiente, y los síntomas difieren de los dos tipos de diabetes anteriores) (Garduño, 2001), son padecimientos menos frecuentes generados como consecuencia de una patología primaria.

### **1.5.3 Complicaciones de la diabetes**

La diabetes es una enfermedad crónica o de largo término, y sus complicaciones están relacionadas directamente con los altos niveles de glucosa en sangre, estas incluyen daño vascular, ceguera, amputación de miembros, neuropatía, nefropatía, etc. Se ha demostrado en diversos estudios que estas complicaciones son consecuencia directa de los altos niveles de glucemia que caracterizan a la enfermedad. Las complicaciones pueden separarse en dos tipos: microvascular y macrovascular debido a que en estudios recientes se ha asociado a la hiperglucemia posprandial con el daño a estos dos tipos de vasos sanguíneos (Moreira *et al.*, 2010).

Los daños microvasculares (daño a vasos sanguíneos pequeños) incluyen principalmente a las neuropatías diabéticas, la retinopatía, la nefropatía diabética y el pie diabético. La

neuropatía diabética, que afecta aproximadamente al 50% de los pacientes, disminuye la sensibilidad y puede dañar las extremidades; los daños en los vasos sanguíneos y nervios provocan ulceraciones y subsecuentemente amputación de los miembros inferiores. Cabe mencionar que la diabetes representa la causa más común de amputación no traumática, y se puede prevenir por una regular inspección y buen cuidado de los pies (OMS, 2005). Cerca del 20-30% de pacientes con DMT1 o DMT2 desarrollan nefropatía diabética, la cual constituye la tercera parte de los casos de daños renales (Molitch *et al*, 2000). La retinopatía diabética es otra de las mayores causas de ceguera y discapacidad visual. Después de padecer por 15 años diabetes, aproximadamente el 2% de los enfermos tiende a ceguera total y un 10% desarrolla severos impedimentos visuales (OMS, 2005). Por todo lo anterior es esencial lograr que los enfermos tengan un buen control glucémico ya que con ello reducirían significativamente estas complicaciones y mejoraría su calidad de vida de manera significativa.

Las daños macrovasculares (daño a vasos sanguíneos grandes) aparecen después de varios años o décadas con diabetes. Entre estas complicaciones podemos destacar el síndrome metabólico y la enfermedad vascular periférica. En la Figura 6 se ilustran algunos de éstas complicaciones y los sistemas u órganos que afectan.

### **1.5.4 Tratamiento de la diabetes mellitus Tipo 2**

Aun cuando no se ha encontrado cura para la diabetes mellitus (exceptuando el trasplante de páncreas, realizado solo a pacientes de DMT1), se han buscado diversas alternativas para su control. El objetivo primordial del tratamiento farmacológico de la diabetes tipo 2 es conseguir un control metabólico lo más aproximado posible a los niveles

normales de azúcar sanguíneo, con el mínimo riesgo aceptable de hipoglucemia. Entre las alternativas que se tienen podemos destacar a la dieta y al ejercicio los cuales resultan ser suficientes para controlar los niveles de glucosa en DMT2. Sin embargo, cuando estas alternativas son insuficientes, se recurre el uso de hipoglucemiantes orales. En la Tabla 3 se resumen los tipos de fármacos, las estructuras químicas, los mecanismos de acción y la duración del efecto, de los 5 grupos de fármacos que se utilizan, de acuerdo a su naturaleza química.

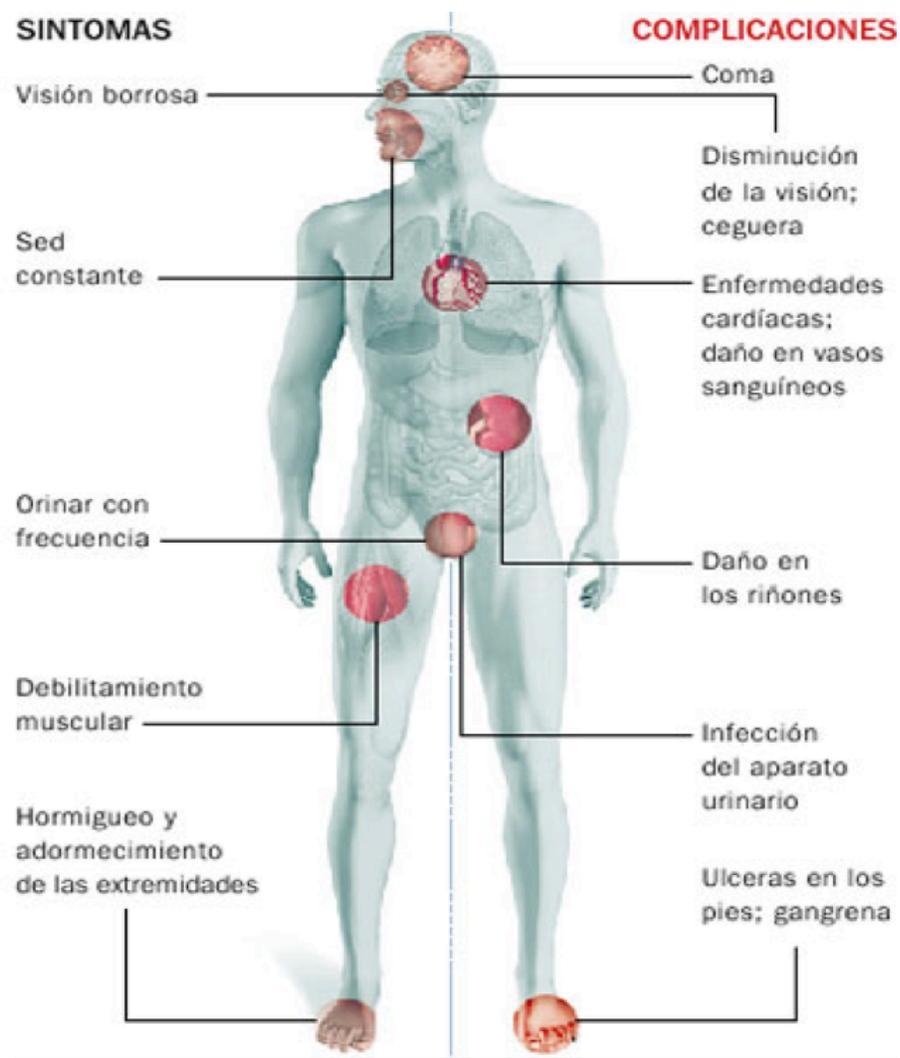


Figura 6. Principales complicaciones de la diabetes. Fuente: IDF 2010,

Los medicamentos antidiabéticos ejercen sus efectos farmacológicos por varios mecanismos (Rodbard *et al.*, 2010). Algunos, como las sulfonilureas (glibenclamida), aumentan la secreción de insulina pancreática a través del bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP en las células  $\beta$  pancreáticas. Estos fármacos son de primera elección y amplio uso. Las biguanidas como la metformina incrementan la sensibilidad a la insulina (Kecskemeti *et al.*, 2002). Desde la pasada década, las tiazolidinedionas (agonistas de un receptor nuclear de hormonas de tipo PPAR $\gamma$  receptor  $\gamma$  activado por un proliferador de peroxisomas) se están estudiando a nivel clínico para el tratamiento de la diabetes tipo 2; estos agonistas del PPAR $\gamma$  incrementan la sensibilidad a la insulina, mediante un aumento en la transcripción de ciertos genes que participan en el proceso de sensibilización. Por otra parte, investigaciones recientes dan a conocer que uno de los factores que conlleva al estado de hiperglucemia en diabetes mellitus es la afectación en el transporte de glucosa. En condiciones de salud el transporte celular de glucosa se lleva a cabo por medio de dos clases de transportadores, los transportadores facilitadores de glucosa (GLUT's por sus siglas en inglés) y los co-transportadores de glucosa dependiente de sodio (SGLT's). Estos estudios sugieren que la inhibición de SGLT2 en el riñón puede ser útil para disminuir la absorción de glucosa y aumentar la cantidad de glucosa excretada en orina; el efecto global es la disminución de la hiperglucemia en el enfermo diabético (Bailey y Day, 2010). Un ejemplo eficaz de estos fármacos es la dapagliflozina, un inhibidor competitivo de SGLT2 desarrollado por Bristol-Myers Squibb Company, que facilita la excreción de glucosa vía la orina en ensayos de tipo clínico.

Finalmente, otros como la acarbosa y el miglitol reducen la absorción de los carbohidratos desde el lumen intestinal a través de la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -

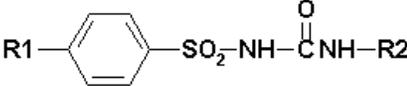
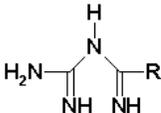
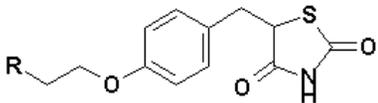
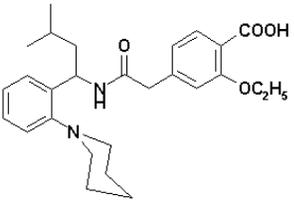
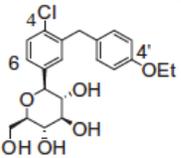
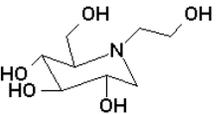
glucosidasas (Ross *et al.*, 2004). En relación a este último grupo de fármacos cabe mencionar que los seres humanos cuentan con una maquinaria enzimática para la digestión de carbohidratos. Las enzimas más relevantes son las amilasas, tanto salivares como pancreática, y las  $\alpha$ -glucosidasas (I y II) presentes en las vellosidades intestinales cuya función es convertir los  $\alpha$ -disacáridos (sacarosa, maltosa, isomaltosa) en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa), y así permitir su absorción (Borges de Melo, 2006). Al bloquear de manera reversible la actividad de estas enzimas, la digestión de carbohidratos complejos bajo la forma de monosacáridos absorbibles en el intestino delgado se retrasa. En consecuencia, los niveles plasmáticos de glucosa, y de insulina, tras las comidas (hiperglucemia posprandial) disminuyen. Entonces los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas ayudan a controlar la hiperglucemia e hiperinsulinemia posprandial.

### 1.5.5 Productos Naturales como inhibidores de las $\alpha$ -glucosidasas

Los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas de origen natural más importantes se clasifican estructuralmente en disacáridos, iminoazúcares, alcaloides polihidroxilados incluyendo piperidinas, pirrolidinas, indolizidinas y nor-tropanos, aminociclitoles, ciclitoles insaturados, tioazúcares y flavonoides (incluyendo las antocianinas) por tan solo mencionar a los más importantes (Borges de Melo *et al.*, 2006; Matsui *et al.*, 2006). Los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas más antiguos son la acarbosa (Precosa<sup>®</sup>) y la voglibosa (Basen<sup>®</sup>) los cuales se usan solos o en combinación con otros antihyperglucemiantes, o bien con hipoglucemiantes orales o insulina (Matsui, 2006). Ambos productos son aminociclitoles que se obtienen a partir del medio de cultivo del actinomiceto *Actinoplanes* SE-50.

Los principales representantes de este grupo son los productos naturales miglitol y la acarbosa. La acarbosa es un pseudotetrasacárido inhibidor competitivo reversible de las  $\alpha$ -glucosidasas que provoca una disminución de la glucemia posprandial tanto en animales de experimentación como en seres humanos sanos y diabéticos.

Desde el descubrimiento de la acarbosa, la investigación de los productos naturales de origen vegetal y microbiano como una fuente potencial valiosa para el descubrimiento de nuevos inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas se ha intensificado (Shobana *et al.*; 2009). Estos estudios han demostrado un sostenido avance tanto a nivel industrial como académico. Es importante hacer notar que muchos de los productos obtenidos de varias materias primas de origen natural presentan propiedades antihiper glucémica *per se*. Otros han constituido nuevos prototipos estructurales para el diseño y la síntesis de derivados más potentes y eficaces. Afortunadamente, para el descubrimiento de productos antidiabéticos con este y otros blancos de acción, así como para el ensayo de extractos orgánicos, acuosos y compuestos puros se han diseñado diferentes experimentos de tipo agudo y sub-agudo *in vivo*, u otros *in vitro*; los protocolos experimentales se encuentran bien descritos en la literatura (Verspohl, 2002; Soumyanath, 2006; Guerrero Analco *et al.*, 2005; 2007).

Tabla 3. Medicamentos utilizados en el tratamiento de la diabetes			
TIPOS DE FARMACO	Núcleo	Ejemplos	Mecanismo
Sulfonilureas		Glibenclamida Tolbutamida Glimepirida	Estimulan la secreción de insulina en células beta.
Biguanidas		Metformina Fenformina	Disminuye la producción de glucosa de hígado e incrementa el consumo de la glucosa de la células.
Tiazolidinedionas		Pioglitazona Rosiglitazona	Disminuye la resistencia de las células a la acción de la insulina, y disminuye la producción de glucosa por el hígado.
Meglitinidos		Repaglinida	Estimulan la liberación de insulina cerrando los canales de potasio dependientes de ATP en células beta.
Inhibidores de SLUGT-2		Dapagliflozina	Inhibe el transportador de glucosa dependiente de sodio de tipo dos en riñón, favoreciendo la excreción de glucosa.
Inhibidores de la $\alpha$ -glucosidasa	Variable. Ejemplo: Miglitol. 	Acarbosa Miglitol	Inhiben la enzima $\alpha$ -glucosidasa en el intestino disminuyendo la absorción de carbohidratos.

Fuente Goodman and Gilman's, 2007 y Hopkins, 2005.

## II. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la literatura científica especializada, en México se emplean más de 300 especies vegetales para tratar los síntomas asociados con la diabetes (Andrade-Cetto, 2005). Sin embargo, la mayoría de estas especies no ha sido objeto de estudios científicos sistemáticos, de carácter multidisciplinario, orientados a establecer su eficacia preclínica y mucho menos clínica. Entonces esta propuesta pretende validar farmacológicamente el potencial hipoglucemiante de varias especies de amplio uso en las prácticas médicas alternativas de México para el tratamiento de la diabetes. La aplicación de métodos farmacológicos utilizando modelos animales apropiados permitirá corroborar en primera instancia la eficacia atribuida a un grupo selecto de plantas. Estos resultados primarios permitirán recomendar la realización de estudios clínicos posteriores de las especies más eficaces y así promover el desarrollo de nuevos productos de amplia aceptación popular para tratar la diabetes en México y el mundo. La mejor aceptación de un tratamiento eficaz, emanado de la herbolaria tradicional tan arraigada en la cultura mexicana, contribuirá de manera importante a disminuir la aparición de complicaciones en el enfermo diabético al ofrecer a los enfermos terapias de amplia aceptación y con la ventaja de que la terapia ha sido validada científicamente.

Este proyecto pretende también descubrir nuevos hipoglucemiantes orales de utilidad potencial para el desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento de la diabetes. Esta actividad incidirá de manera importante en el campo de la química farmacéutica ya que existe la posibilidad de descubrir nuevos prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos productos hipoglucemiantes y/o antihiper glucémicos.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Establecer el potencial antihiper glucémico de extractos y productos puros obtenidos a partir de *H. seemannii* L. Riley, *A. cristata* (L.) Schltl y *L. porteri* J.M. Coult & Rose mediante estudios farmacológicos *in vivo* e *in vitro*, con la finalidad de descubrir nuevos agentes potenciales para el tratamiento de la diabetes, que de preferencia presenten un efecto sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas .

#### 3.2 Objetivos particulares

**3.2.1** Establecer de manera preliminar la inocuidad de los extractos activos derivados de las especies seleccionadas mediante la determinación de su toxicidad aguda en roedores. Esta actividad permitirá iniciar los estudios de toxicidad de las plantas.

**3.2.2** Determinar el potencial antidiabético de los extractos de las especies *Hydrangea seemannii* L Riley (Hydrangeaceae), *Ligusticum porteri* J.M. Coult & Rose (Apiaceae) y *Anoda cristata* (L.) Schltl (Malvaceae), mediante la evaluación de los efectos de sus extractos íntegros elaborados a partir de la droga cruda en los niveles de glucemia en animales normoglucémicos y diabéticos en experimentos a corto plazo.

**3.2.3** Aislar y caracterizar los principios activos de al menos una de las especies activas.

**3.2.4** Determinar el potencial antidiabético de los compuestos aislados, mediante la evaluación de su efecto en los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos.

**3.2.5** Estudiar el efecto del extracto más activo obtenido a partir de las especies seleccionadas sobre una serie de parámetros bioquímicos incluyendo niveles de colesterol y triglicéridos en animales diabetizados con NAD-STZ.

**3.2.6** Establecer el efecto de los extractos activos y principios activos que se obtengan sobre la actividad de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro*.

#### IV. HIPÓTESIS

-El uso popular de las especies *Ligusticum porteri* J.M. Coult & Rose (Apiaceae), *Hydrangea seemanii* L Riley (Hydrangeaceae) y *Anoda cristata* (L.) Schltl (Malvaceae), para el tratamiento de la diabetes sugieren la presencia en las plantas de principios hipoglucemiantes y/o antihiperoglucémicos.

-De encontrarse especies con propiedades antihiperoglucémicas en experimentos de tolerancia a la sacarosa es factible que algunos de sus componentes inhiban las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas.

## **V. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1 Procedimientos generales**

#### **5.1.1 Análisis cromatográficos**

La cromatografía por adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM). La cromatografía en columna de exclusión se realizó usando 100 g de Sephadex LH-20, de 50 cm de altura y 2.5 cm de diámetro, y se eluyó de forma isocrática con MeOH.

Los análisis de cromatografía en capa fina analítica (CCF), se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución. La CCF se realizó sobre placas de aluminio con diferentes dimensiones, recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. La visualización de las placas se realizó con luz UV (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm), y posteriormente se revelaron con sulfato cérico amoniacal, seguido de calentamiento (110 °C aprox.) hasta visualización de los compuestos.

Los análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) se realizaron en un Cromatógrafo Waters 600 (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, EUA) acoplado a un detector de absorbancia UV Waters 2487 Dual o un detector PDA Waters 996, y se utilizó una Columna Waters Symmetry® C<sub>18</sub> (tamaño de partícula 5 µm, 100 Å), de 4.6 x 250 mm. Los analitos se prepararon disolviendo 1 mg de muestra en 500 µL de metanol se inyectaron en un volumen de 10 µL. Los cromatogramas se registraron utilizando las longitudes de onda 254 y 280 nm, y se procesaron mediante un

programa de software Empower version 2 (Waters). Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente.

### 5.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fisher-Johns, y no se encuentran corregidos. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro FTIR de rejilla Modelo 1605 marca Perkin-Elmer, o en un aparato Nicolet FT-5X en pastilla o en película. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM-IE) se determinaron en un aparato JEOL JMS-SX102A Hewlett-Packard 5890 serie II mediante introducción directa a 70 eV y bombardeo rápido de átomos (EM-FAB). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-<sup>1</sup>H) y de Carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C) se generaron en un aparato Unity-Inova, marca Varian, el cual se operó a una radiofrecuencia de 300 y 75 MHz respectivamente. Los espectros se realizaron en CDCl<sub>3</sub>, y los desplazamientos químicos se designaron en unidades δ (ppm), referidas al tetrametilsilano (TMS).

Los análisis de arriba indicados se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

### 5.2 Material vegetal

Las especies vegetales para los estudios fitoquímicos y farmacológicos del presente trabajo fueron proporcionadas e identificadas por el Dr. Robert Bye, investigador del Jardín Botánico en el Instituto de Biología de la UNAM. En el Cuadro 1 se resume la información relativa al sitio y fecha de recolección. Las muestras de referencia se depositaron en el Herbario Nacional (MEXU) y los números de referencia también se indican en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Material vegetal analizado en el presente estudio

Especie	Cantidad	Número de referencia	Sitio de recolección	Parte de la planta
<i>H. seemannii</i>	3.2 Kg	MEXU 35130	San Rafael, Chihuahua	Hojas secas
<i>L. porteri</i>	0.250 Kg	MEXU 31733	Basigochi, Chihuahua	Raíz
<i>A. cristata</i>	0.5 Kg	MEXU 35273	Tepeaca, Puebla	Tallos, hojas y frutos inmaduros, flores pequeñas

### 5.3 Preparación de los extractos orgánicos y acuosos para las evaluaciones

#### preliminares de *A. cristata* e *H. seemannii*

La preparación del extracto íntegro de *H. seemannii* se realizó utilizando 1.2 kg del material vegetal seco el cual se extrajo por un proceso de maceración empleando como disolvente una mezcla de diclorometano-metanol (1:1; 15 L X 3). Los extractos resultantes se concentraron al vacío obteniéndose 150 g de extracto vegetal seco.

La infusión para *H. seemannii* se realizó por el procedimiento de infusión a partir de 1 kg de partes aéreas de la planta y 28 L agua destilada; el extracto acuoso resultante se sometió a un proceso de fraccionamiento primario vía un proceso de reparto con acetato de etilo; las fracciones primarias orgánica y acuosa obtenidas fueron concentradas al vacío obteniéndose 34 g y 3.4 g, respectivamente.

En el caso de *A. cristata* se maceraron 338 g de partes aéreas secas con 4 L de una mezcla de diclorometano-metanol (1:1); el proceso se repitió tres veces; al cabo de las extracciones, los extractos orgánicos resultantes se concentraron al vacío para generar 60 g de extracto íntegro seco.

Las raíces secas y molidas de *L. porteri* (250 g) se maceraron con diclorometano-metanol (1:1; 5 L x 2) por siete días, subsecuentemente, se evaporó el disolvente al vacío obteniéndose 87.5 g de residuo.

### 5.4 Aislamiento de los principios mayoritarios *L. porteri*

El extracto obtenido de *L. porteri* fue fraccionado por cromatografía en columna abierta en gel de sílice (1 kg, 70-230 mesh, Merck) se eluyó con hexano, hexano y cantidades crecientes de diclorometano (8:2 → 2:8), diclorometano y diclorometano – metanol (9:1) obteniéndose 10 fracciones primarias. La fracción 3 (3 g), eluida con hexano, fue separada por cromatografía en placa (hexano-diclorometano, 8:2), obteniéndose 400 mg de miristicina (4). La fracción 4 (13.5 g), obtenida con la mezcla hexano-diclorometano (1:1), contenía los componentes mayoritarios diligustílida (1), *Z*-ligustílida (3) y *Z*-3-butilidenftálida (2). Los compuestos mayoritarios fueron separados por cromatografía en placa (hexano-diclorometano) obteniéndose 5.5, 0.5, 0.6 g, respectivamente. El análisis HPLC-UV reveló la pureza de los compuestos [Hibar RT LiChrospher 100 RP C-18, 5 µm, 4 X 250 mm, Merck; acetonitrilo-agua (0.5 % ácido acético) 20:80 → 100:0, 0→40 minutos; 1 mL/min; 260-280 nm]. Finalmente se obtuvieron 7.5 g ácido ferúlico (5) precipitado en la fracción 9 (20 g), eluida con diclorometano el cual fue identificado por comparación con una muestra de referencia.

Los productos aislados se caracterizaron mediante la aplicación de las técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales (Breitmaier, 2002). En todos los casos los datos coincidieron con los previamente descritos en la literatura.

## **5.5 Ensayos biológicos**

### **5.5.1 Determinación de la toxicidad aguda**

Para la determinación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de los extractos vegetales se utilizó el protocolo experimental descrito por Lorke (1983). Se trabajó con tres grupos de tres ratones de la cepa ICR de 60 días de edad y con un peso corporal promedio en un rango de 20-30 g. En la primera fase del estudio, después de la administración *p.o.* de los extractos (10, 100 y 1000 mg/Kg), los animales se mantuvieron bajo vigilancia durante dos semanas, registrándose su comportamiento, peso corporal y algún cambio perceptible. Al finalizar el periodo de observación, se realizó un examen macroscópico general de los órganos de los animales, comparándolos contra los individuos del grupo control.

En una segunda etapa, se utilizaron nuevos grupos de ratones y las muestras se administraron por la misma vía a dosis más altas (1600, 2900 y 5000 mg/Kg), de acuerdo al protocolo de Lorke. Al finalizar el periodo de observación, se realizó un examen macroscópico general de los órganos de los animales, comparándolos contra un individuo del grupo control.

Al terminar las dos fases del método de Lorke, se determinó la dosis letal media ( $DL_{50}$ ). Este valor se calculó por medio de una media geométrica entre la dosis donde se presenta la muerte de los animales y la última dosis donde no ocasionó ninguna muerte.

### **5.5.2 Estudios farmacológicos y bioquímicos**

Para la determinación de la actividad antidiabética de los extractos orgánicos, acuosos y compuestos puros se utilizó un experimento de tipo agudo *in vivo*

implementando los protocolos experimentales ampliamente descritos en la literatura (Bailey y Flatt, 1990; Williamson *et al.*, 1996; Verspohl, 2002; Soumyanath, 2006., Guerrero Analco *et al.*, 2005; 2007).

### 5.5.2.1 Animales de experimentación

Para los ensayos de diabetes se utilizaron poblaciones homogéneas de *Mus musculus albinus* machos cepa ICR, de 55-60 días de edad y peso de 20-25 g, procedentes del Centro UNAM-Harlan (Harlan México).

Todos los procedimientos que involucraron animales y sus cuidados se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y con las reglas internacionales sobre cuidado y uso de animales de laboratorio. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio con alimento y agua *ad libitum*.

### 5.5.2.2 Inducción de diabetes.

La diabetes mellitus fue inducida de acuerdo a un modelo conocido, administrando (*i.p*) hidrato de nicotinamida adenina dinucleotido (NAD) (30 mg/Kg; Sigma. St. Louis, MO) disuelto en agua destilada y 15 minutos después una inyección *i.p* de estreptozotocina (STZ) (100 mg/Kg; Sigma. St. Louis, MO) preparada inmediatamente antes de su administración; el diabetógeno se administró disuelto en una solución amortiguadora de citratos a pH = 4.5, en un volumen de 0.1 mL/Kg. Siete días después de la administración, se registraron los niveles de glucosa sanguínea en los animales y aquellos con una glucemia mayor a 140 mg/dL fueron considerados diabéticos e incluidos en los estudios

antidiabéticos (Sharma, 1997; Acosta Patiño *et al.*, 2001). Cabe mencionar que los animales fueron pesados en balanza granataria antes de la administración del diabetógeno

### **5.5.2.3 Determinación de glucosa**

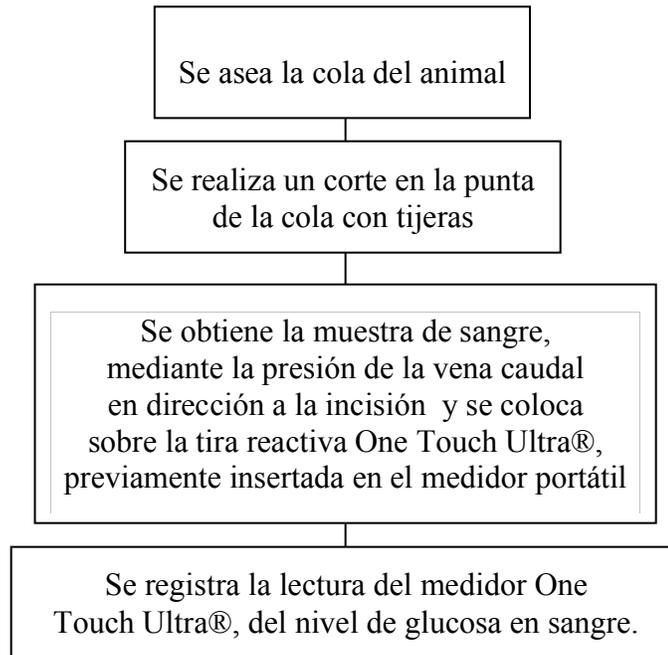
Las muestras de sangre requeridas para los ensayos biológicos durante la evaluación del efecto hipoglicemiante, se tomaron mediante una incisión en el extremo de la cola de los animales de experimentación, aproximadamente a 2 mm (Diagrama 1). La determinación de glucosa sanguínea se realizó utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra®, Jonhson-Jonhson).

Los datos experimentales de los niveles de glucosa sanguínea se procesaron para obtener los porcentajes de variación de glucemia con respecto al nivel inicial, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de variación de glucemia} = \frac{G_t - G_i}{G_i} \times 100$$

Donde,  $G_i$  es el valor de la glucemia inicial y  $G_t$  es el valor de la glucemia al tiempo de determinación (horas o días) posterior a la administración del extracto (Sharma, 1997). El porcentaje de variación de la glucemia fue graficada con respecto al tiempo de medición conjuntamente. Todas las gráficas y el análisis estadístico (análisis de varianza así como la prueba de Dunnett) se realizaron con el programa computacional GraphPad Prism Versión 5.0.

**Diagrama 1.** Obtención de la muestra de sangre para el análisis de los niveles de glucosa



#### 5.5.2.4 Administración de los tratamientos

Para todos los ensayos, los extractos fueron preparados para administrarse en un volumen de 0.2 mL/10g de peso (*p.o.*), utilizando 2 gotas de Tween 20 y agua destilada.

En los experimentos agudos y de tolerancia a la glucosa se utilizó como testigo positivo el hipoglucemiante comercial glibenclamida (10 mg/Kg; Sigma, St. Louis, MO) (Sharma, 1997), preparado de la misma forma que el extracto. Para los experimentos de tolerancia a la sacarosa y maltosa, se utilizó acarbosa (5 mg/Kg; Sigma, St. Louis, MO) como control positivo. En todos los casos el blanco se preparó con dos gotas de Tween 20 y agua destilada.

El extracto, testigo y controles, fueron preparados inmediatamente antes de los experimentos. La administración de los tratamientos, se realizó *per os*, por medio de una canula gástrica rígida para animales de laboratorio.

### **5.5.2.5 Evaluación aguda de la actividad hipoglucemiante de los extractos**

Este ensayo se llevó a cabo en dos fases, en la primera se emplearon animales normoglucémicos, en tanto que en la segunda diabéticos; en cada fase se utilizaron 30 ratones, distribuidos aleatoriamente en grupos de seis animales. Los grupos se organizaron como sigue: grupo 1 (control negativo) recibió el vehículo; grupo 2 (control positivo) se administró 10 mg/Kg de glibenclamida o 5 mg/Kg de acarbosa dependiendo del carbohidrato de carga; grupo 3 en adelante se administraron los extractos de las especies en estudio a diferentes dosis (31.6, 56.2, 100, 316 mg/Kg). Los animales se prepararon con 9 horas de ayuno y agua *ad libitum* en jaulas separadas para cada grupo. Al término de las nueve horas de ayuno, los niveles de glucosa sanguínea se midieron en los siguientes tiempos 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 glucemia aplicando la fórmula ya descrita.

### **5.5.2.6 Efecto de los extractos íntegros sobre la tolerancia a la glucosa y/o sacarosa**

De la misma manera que en el ensayo agudo hipoglucemiante se utilizaron dos grupos de 30 ratones cada uno (normoglucémicos y diabéticos); los animales fueron diabetizados como se indica en el punto 5.5.2.2 y distribuidos aleatoriamente en grupos de seis en jaulas; para los experimentos los animales se prepararon con 9 horas de ayuno y agua *ad libitum*. El procedimiento de administración de los tratamientos y la medición de glucosa en sangre para este ensayo se realizó como se muestra en el Diagrama 1. Los

grupos se organizaron como sigue: grupo 1 (control negativo) recibió el vehículo; grupo 2 (control positivo) 10 mg/Kg de glibenclamida o acarbosa 5 mg/Kg; grupos 3-6 fueron tratados con los extractos de las especies en estudio a diferentes dosis (31.6, 56.2, 100, 316 mg/Kg). Treinta minutos después de administrar los tratamientos, todos los animales recibieron por vía oral una solución glucosa anhidra (1 g/Kg) o de sacarosa (3g/Kg). Los niveles de glucosa sanguínea se determinaron como se describe en la parte de procedimientos generales a los 0, 30, 60, 90, 120 y 240 minutos posteriores a la administración de la carga del carbohidrato.

### **5.6 Efecto de los extractos y compuestos puros sobre la actividad de las enzimas $\alpha$ -glucosidasas**

La actividad inhibitoria de los extractos o compuestos puros sobre las  $\alpha$ -glucosidasas se realizó de acuerdo al método descrito por Oki y colaboradores 1999 con modificaciones de nuestro grupo de trabajo. Se utilizó la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (EC 3.2.1.20) adquirida de Sigma-Aldrich. La inhibición de la enzima se determinó por un método espectrofotométrico. El ensayo se realizó de la siguiente forma: el sustrato, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (PNGP) se disolvió en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0, a una temperatura de 37 °C; después de la incubación, se añadió a esta mezcla 0.6 unidades/ml de enzima y se incubaron nuevamente durante 35 min a 30 °C. La acarbosa (control positivo) se disolvió en la misma solución amortiguadora y se realizaron diluciones en un rango de 0.1 a 1.0 mg/ml. El ensayo se realizó en microplacas. El incremento en la absorción a 405 nm debido a la hidrólisis de PNGP por la  $\alpha$ -glucosidasa se mide espectrofotométricamente en un lector de microplacas (Bio Instruments Incorporated, EE.UU.).

Las soluciones de acarbosa o de Z-3-butilidenftálida (2) a diferentes concentraciones se incubaron durante 5 min con 20  $\mu\text{L}$  de enzima y 10  $\mu\text{L}$  de sustrato (5 mM). La concentración requerida para inhibir la actividad de la enzima al 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) se calculó mediante un análisis de regresión no lineal, utilizando las siguiente ecuación.

$$v = \frac{A_{100}}{1 + (I/\text{IC}_{50})^s}$$

Donde  $v$  es el porcentaje de inhibición,  $A_{100}$  es la inhibición máxima,  $I$  es la concentración de inhibidor,  $\text{CI}_{50}$  es la concentración requerida de compuesto para inhibir la actividad de la enzima en un 50%, y el grado de cooperatividad.

### 5.7 Cinética de inhibición de la enzima

Los parámetros cinéticos se determinaron utilizando el método gráfico de Dixon utilizando concentraciones crecientes de sustratos e inhibidores, con los resultados se trazaron pendientes utilizando el inverso de la concentración de sustrato. Todos los resultados se expresan como la media de al menos seis experimentos  $\pm$  error medio estándar (E.E.M..M.). Los parámetros cinéticos como  $V_m$ ,  $K_m$ , y  $K_i$  se evaluaron utilizando el método de regresión no lineal basado en la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_m * s}{K_m \left(1 + I/K_i\right) + s \left(1 + I/K'_i\right)}$$

Donde  $v$  es la velocidad inicial en ausencia y en presencia del inhibidor,  $I$  y  $s$  son la concentración de sustrato y el inhibidor, respectivamente,  $V_m$  es la velocidad máxima,  $K_m$

es la constante de Michaelis-Menten,  $K_i$  es la constante de inhibición competitiva y  $K_{i1}$  es la constante de inhibición no competitiva.

### 5.8. Acoplamiento y reconocimiento molecular de los inhibidores de la $\alpha$ -glucosidasa

El estudio de acoplamiento y reconocimiento molecular se realizó utilizando el programa AutoDock4 (<http://autodock.scripps.edu/>), empleando los parámetros por defecto, a excepción del número de búsquedas que fue de 100 y el número de evaluaciones energéticas en la búsqueda local que fue de 25 millones. El análisis se realizó en una supercomputadora de memoria distribuida, que contiene 1.368 procesadores AMD Opteron, 3 terabytes de memoria y 160 terabytes de almacenamiento (<http://www.super.unam.mx/>). La estructura tridimensional de la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura para realizar el acoplamiento y reconocimiento molecular se construyó por modelado por homología. La conformación inicial de cada ligando fue construida y minimiza energéticamente con la aplicación geometric optimization del programa HyperChem 8. Las estructuras de la acarbosa y Z-3-butilidenftálida (**2**) fueron preparadas para el acoplamiento y reconocimiento molecular utilizando del programa AutoDockTools 1.5.4 (<http://mgltools.scripps.edu/>), lo cual consistió en adicionar átomos de hidrógeno polar cargas parciales de Kollman a los ligandos y cargas de Gasteiger a la enzima ( $\alpha$ -glucosidasa) La macromolécula es considerada como un cuerpo rígido durante el proceso de acoplamiento y reconocimiento molecular. El tamaño de la caja la red se  $126\text{Å} \times 126\text{Å} \times 126\text{Å}$  en las dimensiones x, y, z, con el centro de la cuadrícula correspondiente a la proteína. Las dimensiones del espacio a evaluar fueron de  $126\text{Å} \times 126\text{Å} \times 126\text{Å}$  en los ejes X, Y y Z, ubicando a la proteína en el centro.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que en México existe una amplia tradición en el uso de plantas medicinales y de que es el segundo país en el mundo en especies botánicas medicinales, aún no se ha investigado el potencial terapéutico de la mayoría de estas especies. Así, este trabajo constituye el primer reporte con estudios que demuestran la eficacia como agentes antidiabéticos de las especies *L. porteri*, *H. seemannii* y *A. cristata*, cuyo uso como agentes antidiabéticos es de reciente hallazgo. En los siguientes párrafos se discutirá en detalle los resultados generados. La estrategia de estudio consistió en la determinación inicial de la toxicidad aguda potencial de las tres plantas mediante el método de Lorke. A continuación se estableció el efecto hipoglucemiante mediante un experimento de tipo agudo. Los extractos activos en este estudio se analizaron para comprobar su posible efecto antihiper glucémico mediante pruebas de tolerancia a la sacarosa y glucosa. Posteriormente, de las tres especies analizadas, se seleccionó *L. porteri*, considerando su disponibilidad en el momento de realizar el trabajo, para la obtención de principios activos con propiedades inhibitorias de las  $\alpha$ -glucosidasas, tanto *in vivo* como *in vitro*.

### 6.1 Evaluación de la toxicidad de las especies de estudio

Con la finalidad de establecer la potencial toxicidad preclínica de los extractos íntegros de las especies de estudio, se utilizó el ensayo de toxicidad aguda por el método de Lorke. Este ensayo tiene la ventaja de ofrecer un cálculo sencillo y confiable de  $DL_{50}$  utilizando solo tres ratones por dosis, reduciendo considerablemente el sacrificio innecesario de animales, tal como lo establecen las normas para el manejo de animales.

Para las especies vegetales *A. cristata* y *H. seemannii* la toxicidad aguda calculada fue mayor de 5 g/Kg de peso, confirmando que ninguno de estos extractos muestra toxicidad en ratones a las dosis utilizadas en los ensayos, por lo tanto son seguras para continuar con su estudio; en el caso de *L. porteri* la DL<sub>50</sub> calculada fue de 1085 mg/kg, la cual indica toxicidad; sin embargo, ésta dosis no se alcanza en las evaluaciones de su potencial antidiabético, ni en la ingesta de la planta en las prácticas médicas populares. Por lo tanto se continuó con el estudio de la planta.

Los resultados de las evaluaciones de toxicidad aguda parecen indicar *a priori* que las plantas no son tóxicas. Estos hallazgos indican una vez más que el hombre en su afán de encontrar nuevas alternativas terapéuticas discrimina las plantas dañinas de las que no lo son, y proveen una evidencia adicional de que el uso prolongado de las especies en las prácticas médicas populares sin que existan registros de aspectos tóxicos constituye una evidencia valiosa acerca de su seguridad.

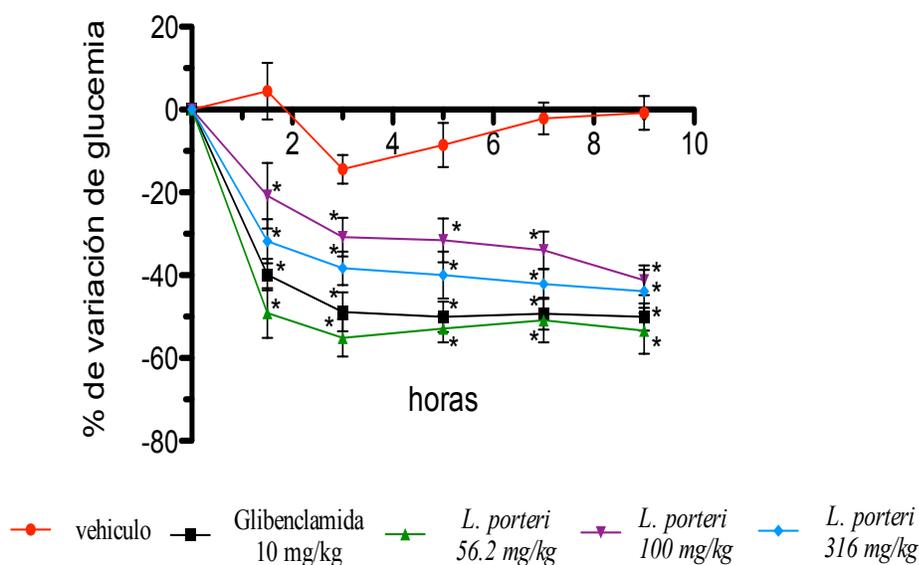
## **6.2 Evaluación de la eficacia antidiabética de las especies seleccionadas**

### **6.2.1 Estudios sobre *L. porteri***

#### **6.2.1.1 Efecto del extracto íntegro de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tipo agudo**

El análisis de los datos revela que el extracto de *L. porteri* no tiene efecto hipoglucemiante en ratones normoglucémicos (ver Tabla 1 anexo), sin embargo, como se observa en la Gráfica 1, posee actividad hipoglucemiante significativa ( $P < 0.05$ ) a todas las dosis ensayadas (56.2, 100, 316.2 mg/kg) en ratones diabéticos; el efecto comienza a la 1.5 h del ensayo y se conserva hasta el final del mismo. Es necesario subrayar que de acuerdo a un ANADEVA ( $P < 0.05$ ), el tratamiento a la dosis de 56.2 mg/kg tiene un efecto similar al de la glibenclamida, uno de los fármacos de elección en la terapia de esta enfermedad, y utilizado como control positivo en el ensayo. El

efecto del extracto no es dependiente de la dosis, ya que existe un efecto más pronunciado a la dosis de 56.2 mg/kg lo cual puede deberse a varios factores, incluyendo el fenómeno de hormesis, problemas de solubilidad, concentración de los ingredientes activos vs no activos y/o mala absorción de los ingredientes activos, por tan sólo mencionar algunos (Calabrese *et al*; 2003). Este mismo tipo de efecto dosis-no dependiente ha sido descrito para varios extractos vegetales, de tal forma que recientemente se comprobó que el extracto acuoso preparado a partir de las hojas de *Anona squamosa* provoca una disminución de los niveles de glucosa en ratas diabéticas de manera no dependiente de la concentración en experimentos de tipo agudo, crónico y de tolerancia a la glucosa (Shirwaikar *et al.*, 2004). Los mismos resultados se han encontrado para preparados de las especies *Vatairea macrocarpa* (Oliveira *et al*; 2008), *Garuga pinnata* Roxb (Shirwaikar *et al*; 2006) y *Gossypium herbaceum* (Sadique *et al.*, 1987).



**Gráfica 1.** Efecto del extracto íntegro de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo

---

---

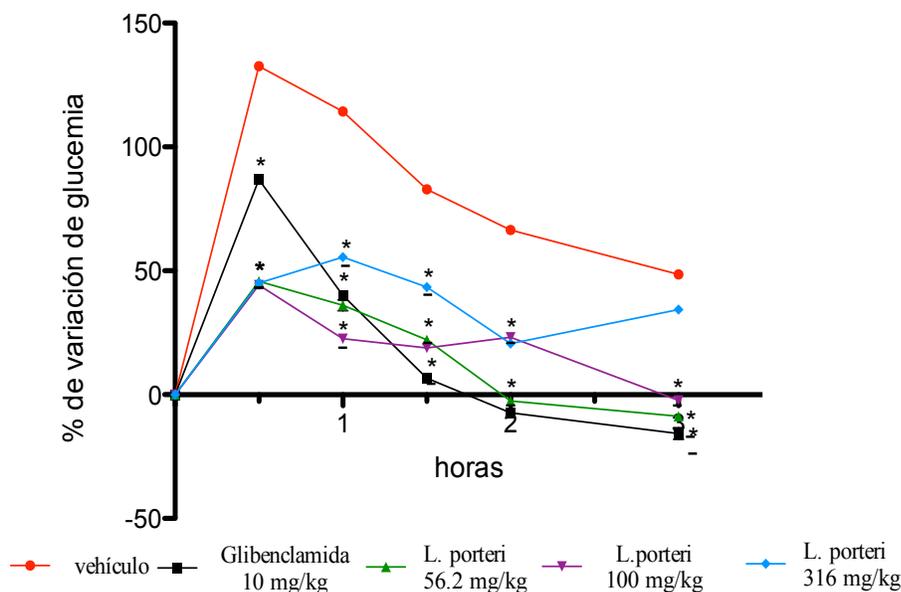
fueron determinadas por un análisis ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet \*P < 0.05.

### **6.2.1.2 Efecto del extracto íntegro de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa y a la sacarosa**

En la Tabla 2 (ver Anexo) se ilustra el efecto del extracto íntegro de *L. porteri* en ratones normoglucémicos en un ensayo de tolerancia a la glucosa y claramente se aprecia que a las dosis evaluadas (31.6, 56.2 y 100 mg/kg) no hubo modificación del pico posprandial de los tratamientos con respecto del grupo tratado con el vehículo (P < 0.05) , lo que nos lleva a pensar que en ratones normoglucémicos el extracto no tiene un efecto negativo sobre la absorción de glucosa. Por el contrario, en ratones hiperglucémicos (Gráfica 2) todos los tratamientos provocaron una importante disminución del pico posprandial. Estos resultados sugieren que el extracto modifica el transporte del monosacárido de alguna forma (Ortíz-Andrade, 2006), probablemente relacionada con la secreción de insulina pues como se observa en la Grafica 2 a partir de los 60 minutos de ensayo, las tres dosis utilizadas muestran una tendencia similar al grupo de glibenclamida fármaco que tiene como mecanismo de acción la estimulación de las células beta pancreáticas para la secreción de insulina.

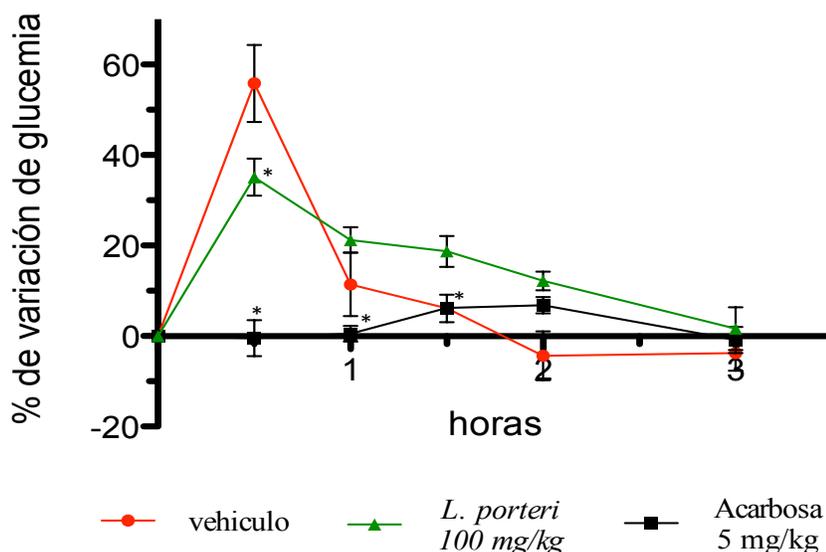
En los ensayos de tolerancia a la sacarosa, los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos no sufrieron cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) ( ver Anexo Tabla 3), respecto al vehículo; sin embargo, en ratones diabéticos el extracto de *L. porteri* (Gráfica 3) disminuyó de manera importante el pico posprandial a la dosis de 100 mg/kg; este efecto está en relación directa con la hidrólisis y posterior absorción del carbohidrato de carga, y por ende con una afectación de actividad de las  $\alpha$ -glucosidasas. Cabe mencionar que el análisis del curso temporal de la acción del extracto no reveló una disminución pronunciada de la glucemia como en el caso de la acarbosa; sin

embargo, en comparación con el grupo vehículo se detectan cambios de pendiente congruentes con un mejor control de la glucemia por parte del extracto.



**Gráfica 2.** Efecto del extracto íntegro de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

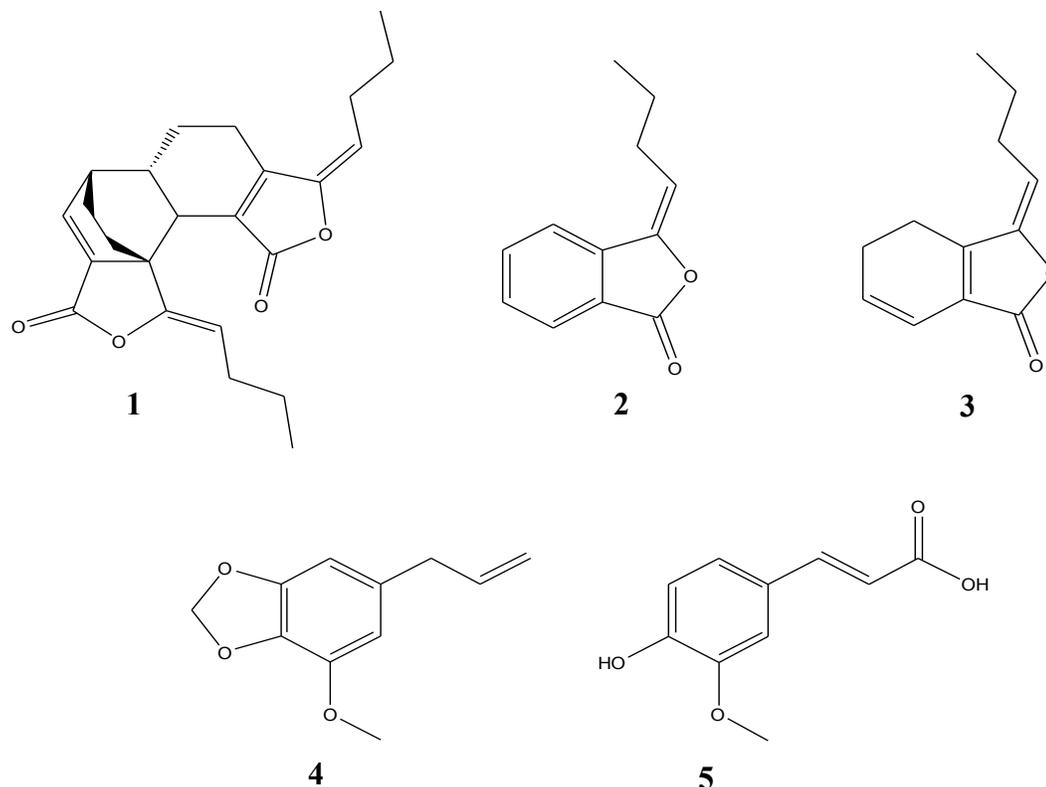
Un efecto similar fue descrito por Abeywickrama y colaboradores (2008) quienes reportaron que el té negro (*Camelia sinensis*) provoca una disminución de los niveles de glucosa en un experimento de tolerancia a la sacarosa con una tendencia similar al encontrado en el presente trabajo para el extracto íntegro de *L. porteri* y concluyen que el extracto presenta componentes que además de inhibir las  $\alpha$ -glucosidasas interfieren con el transporte de glucosa, esta observación es congruente con el efecto antihiperoglucémico del extracto de *L. porteri* en el experimento de tolerancia a la glucosa (Gráfica 2).



**Gráfico 3.** Efecto del extracto íntegro de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la sacarosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

### 6.2.1.3 Aislamiento de los productos mayoritarios contenidos en el extracto íntegro de *L. porteri*

Para aislar los principios responsables de los efectos antihiper glucémico e hipoglucémico del extracto íntegro de *L. porteri*, el mismo se sometió a un fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Posteriormente, los productos mayoritarios se separaron mediante diversos procesos cromatográficos. Como resultado de estos experimentos fue posible separar y purificar cinco metabolitos secundarios. Los productos se caracterizaron como diligustílida (1), Z-3-butilidenftálida (2), Z- ligustílida (3), miristicina (4), y ácido ferúlico (5). Todos se caracterizaron por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las descritas en la literatura (Figura 7). Cabe mencionar que todos los productos se habían descrito con anterioridad en la planta.



**Figura 7.** Compuestos **1-5** aislados de las raíces de *L. porteri*.

#### **6.2.1.4 Efecto de los compuestos mayoritarios de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa**

Con la finalidad de establecer el efecto antihiperoglucémico de los compuestos se realizó el ensayo de tolerancia a la glucosa en ratones normoglucémicos y diabéticos. Los resultados para la diligustílida (**1**) indicaron propiedades antihiperoglucémicas a las dosis de 10 y 31.2 mg/kg, en animales normoglucémicos y diabéticos respectivamente (Gráfica 4 y Tabla 4); el abatimiento del pico posprandial podría ser resultado de una interferencia del transporte de glucosa por parte del producto natural. El efecto antihiperoglucémico de **1** se observó solo a las dosis más pequeñas, lo cual coincide con la baja solubilidad de dicho compuesto en soluciones acuosas. Resultados similares se obtuvieron para la *Z*-3-butilidentfálida (**2**), la cual tiene también un efecto

---

---

antihipercolecémico significativo ( $p < 0.05$ ) a las dosis de 31.6 y 56.2 mg/Kg respecto al grupo vehículo en ratones diabéticos (Gráfica 5).

La Z-ligustílida (**3**) a las dosis de 10 y 20 mg/kg, provocó una disminución en el pico posprandial en ratones normoglucémicos (Tabla 4, ver Anexo) y diabéticos (Gráfica 6); el análisis estadístico mostró que existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a los vehículos correspondientes. En ratones diabéticos, **3** provocó una disminución en la absorción de glucosa a los 30 minutos y con ello generó un efecto antihipercolecémico cuyo mecanismo puede involucrar una interferencia con el transporte y/o absorción de glucosa.

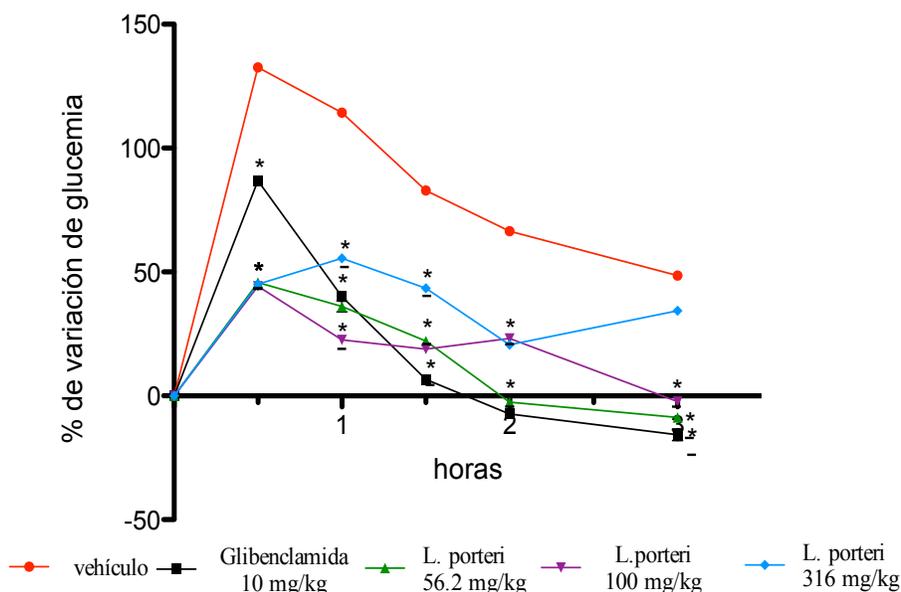
#### **6.2.1.5 Efecto de los compuestos puros sobre la actividad de las enzimas $\alpha$ -glucosidasas**

Como el extracto de *L. porteri* presentó efecto antihipercolecémico también en la prueba de tolerancia a la sacarosa, el paso siguiente fue comprobar si los productos modificaban la actividad de las  $\alpha$ -glucosidasas. Para ello se procedió a evaluar los productos aislados sobre la actividad de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de levadura mediante un experimento *in vitro*. Aquellos que resultasen activos en la prueba *in vitro* se evaluarían a continuación *in vivo*.

El ensayo enzimático utilizado consiste en determinar la cantidad de sustrato que se hidroliza por acción de una  $\alpha$ -glucosidasa en presencia del potencial inhibidor de la actividad enzimática. En este caso se utilizó un método espectrofotométrico basado en el descrito por Oki y colaboradores (1999). Como sustrato se utilizó, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (PNGP) y como control, positivo la acarbosa.

De acuerdo a los resultados, de las dos ftálicas monómeros solo la Z-3-butilidenoftálica (**2**) inhibió la actividad de la enzima con un valor de  $CI_{50} = 0.4$  mg/mL

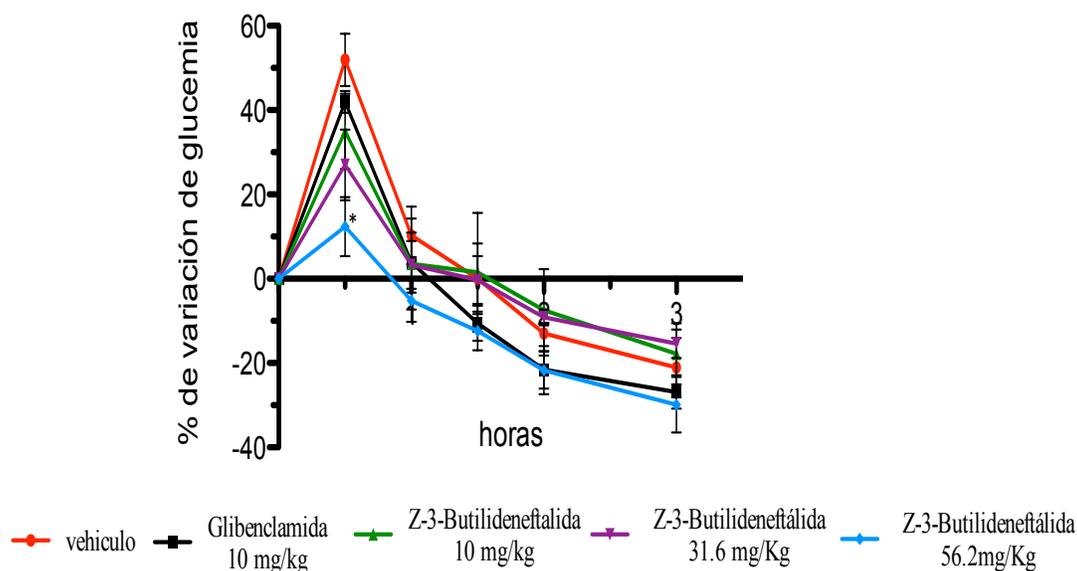
( $CI_{50}$  de la acarbosa= 0.27 mg/mL). En el caso de la diligustílida (**1**) fue imposible su evaluación debido a que siempre precipitó en el medio de reacción.



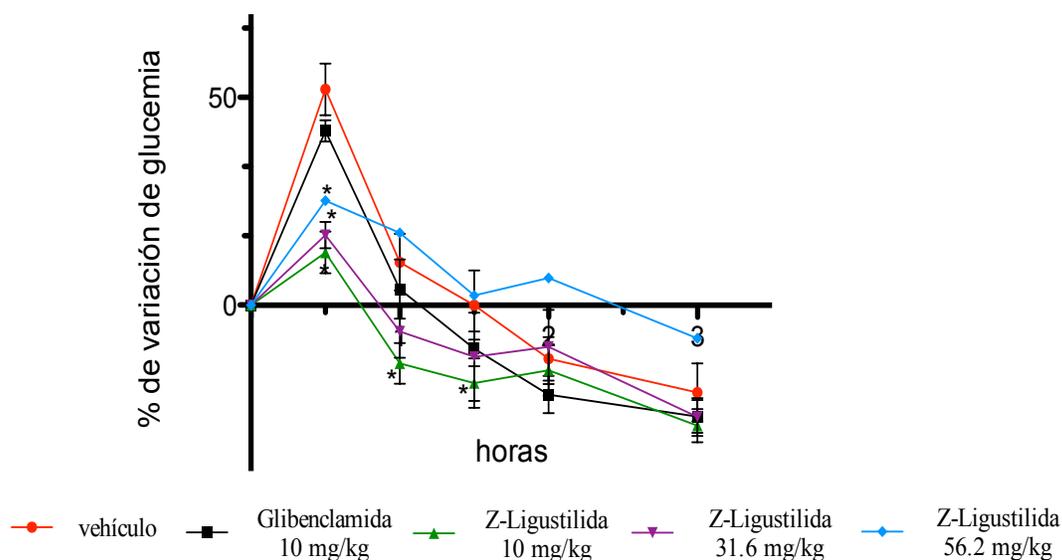
**Gráfica 4.** Efecto de la diligustílida (**1**) obtenida de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

Los otros compuestos aislados en el presente estudio, es decir, el ácido ferúlico (**5**), miristicina y la (**4**) fueron inactivos.

Una vez confirmada la actividad inhibitoria de la Z-3-butilidenftálida (**2**) se estableció la naturaleza de la inhibición mediante un análisis cinético (Gráfica 7) utilizando diferentes cantidades de la ftálida y de acarbosa. Esta última es un inhibidor competitivo de las  $\alpha$ -glucosidasas. Los resultados permitieron calcular una constante de inhibición ( $K_i$ ) para la Z-3-butilidenftálida (**2**) de 4.8 mM y para la acarbosa de 0.46 mM. Los resultados permitieron sugerir que el antagonismo provocado por la Z-butilidenftálida (**2**) es de tipo no competitivo.



**Gráfica 5.** Efecto de la (*Z*)-3-butilideneftálica (**2**) obtenida de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

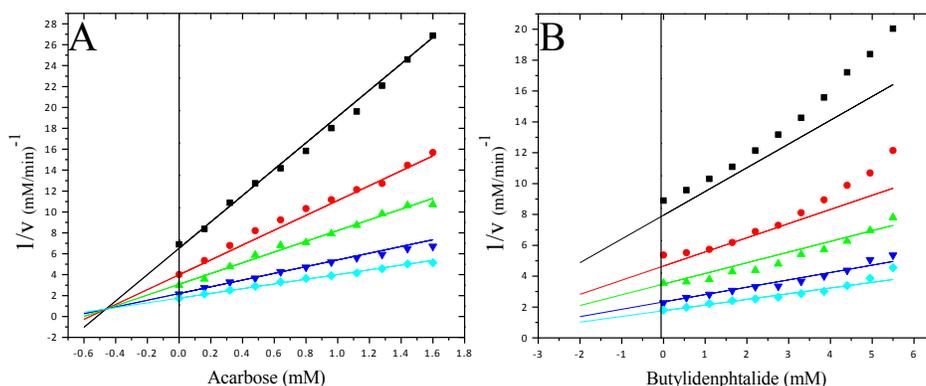


**Gráfica 6.** Efecto de la *Z*-ligustilida (**3**) obtenida de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

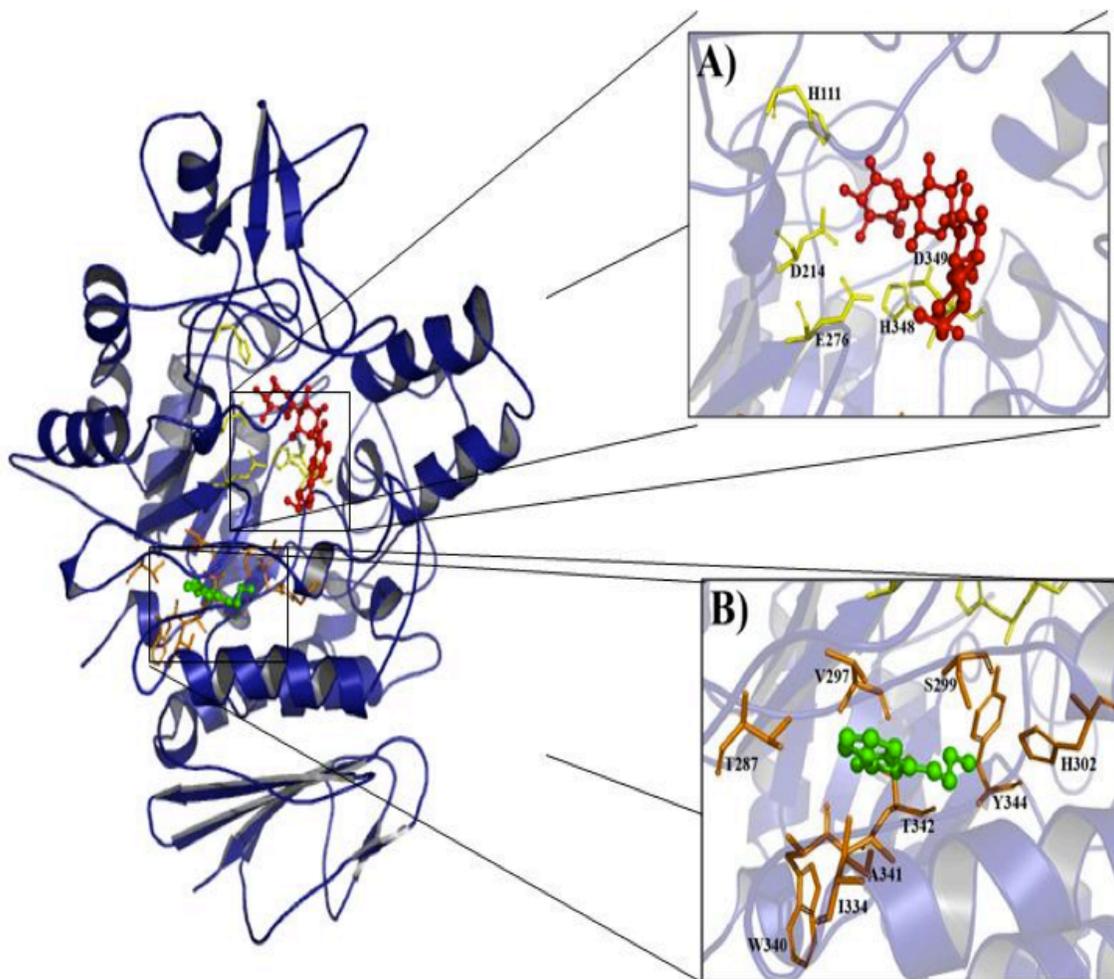
### 6.2.1.6 Evaluación del probable sitio de unión de la Z-3-butilidenftálida (2) mediante estudios de acoplamiento molecular

Para predecir el sitio de unión de la Z-3-butilidenftálida (2) con la  $\alpha$ -glucosidasa se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular (docking) utilizando el programa AutoDock4 (<http://autodock.scripps.edu/>). El acoplamiento se realizó con un modelo construido por homología con la  $\alpha$ -glucosidasa de *Bacillus cerus* (1UOK.pdb), el cual posee la secuencia de identidad más alta (38.9%) con respecto a la  $\alpha$ -glucosidasa de levadura, ya que los residuos conservados en el sitio catalítico de la  $\alpha$ -glucosidasa son H111, D205, E276, H348 y D349 los cuales están presentes en ambos organismos.

Los resultados de este experimento confirmaron los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* y permiten proponer que la Z-3-butilidenftálida (2) se une a un sitio distinto al de la acarbosa. El sitio de unión del compuesto 2 es cercano al sitio catalítico de la enzima y está formado por los residuos Ser299, Thr287, Val297, Trp340, His302, Ala341, Thr342, Ile334 y Tyr344 con una  $K_i$  de 11.48 mM. De acuerdo al sitio de unión propuesto, la interacción de 2 con la enzima parece ser de naturaleza alostérica, congruente con una inhibición de tipo no competitivo (Figura 8).



**Gráfica 7.** Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa a diferentes concentraciones de sustrato (■) 0.19 mM, (●) 0.37 mM, (▲) 0.56 mM, (▼) 1.12 mM y (◆) 2.24 mM. A) acarbose. B) Z-3-butilidenftálida (2).

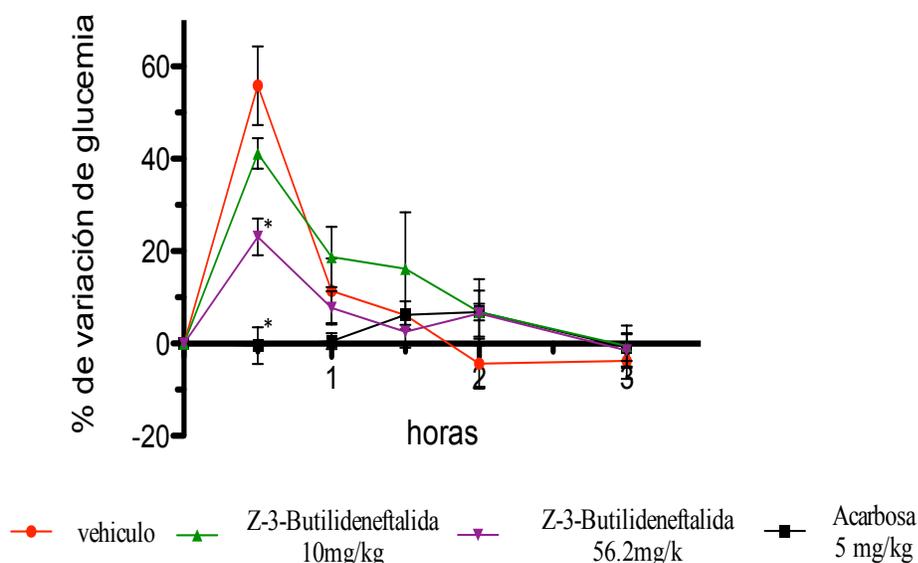


**Figura 8.** Acoplamiento del compuesto **2** con la enzima  $\alpha$  glucosidasa. A. Unión de la acarbosa en el sitio catalítico de la enzima. B. unión de la Z-3-butilidenftálida (**2**) en un sitio diferente al catalítico.

#### 6.2.1.7 Efecto de la Z-3-butilidenftálida (**2**) sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la sacarosa

Con base en los resultados del ensayo enzimático, a continuación se procedió a ensayar la Z-3-butilidenftálida (**2**) en la pruebas de tolerancia a la sacarosa *in vivo*, y dada la cantidad disponible, solo se ensayó con animales hiperglucémicos. Como se puede advertir en la Gráfica 8, cuando el ensayo se realizó en ratones diabéticos la inhibición del pico posprandial provocado por la Z-3-butilidenftálida (**2**) a la dosis de 56.2 mg/kg fue mayor que la del extracto orgánico a la dosis de 100 mg/kg.

Estos resultados indican primero que la Z-3-butilidenftálida (**2**) posee un efecto antihiperoglucémico y que el mismo parece estar mediado por la inhibición de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales; y segundo, que el compuesto **2** es uno de los principios antihipeglucemicos del extracto de *L. porteri*.



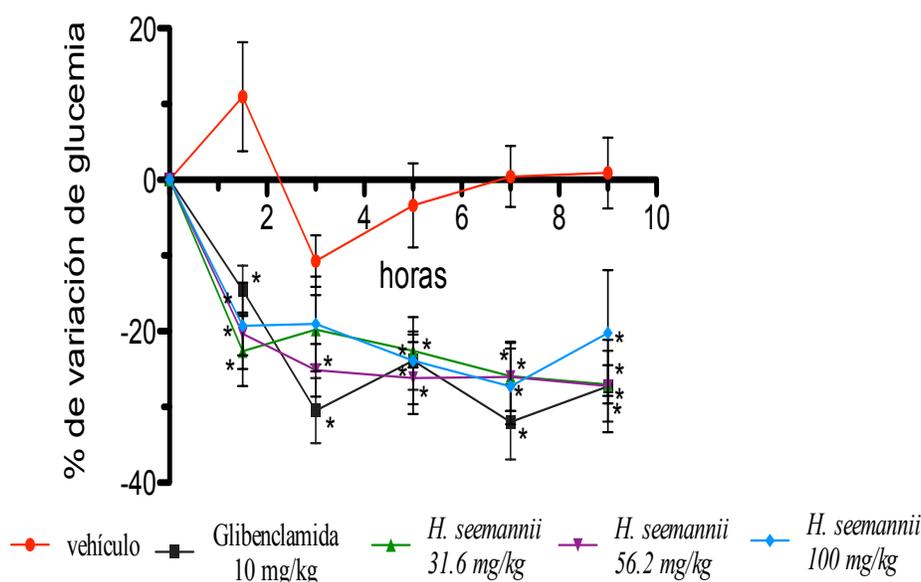
**Gráfica 8.** Efecto de la Z-3-butilidenftálida (**2**) obtenida de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la sacarosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVA seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

## 6.2.2 Estudio sobre *H. seemanni*

### 6.2.2.1 Efecto del extracto íntegro de *H. seemanni* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tipo agudo.

El extracto íntegro de *H. seemanni* no provocó efecto alguno en ratones normoglucémicos, lo que eventualmente podría ser beneficioso si el extracto es consumido por individuos sanos (Tabla 5, ver Anexo). Sin embargo, en ratones diabéticos los tratamientos a diferentes dosis provocan una disminución de los niveles de glucosa en sangre (Gráfica 9), mismos que presentaron una diferencia estadística

significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al vehículo. Sin embargo, cuando se realizó un análisis de varianza para comparar las tres dosis utilizadas no se encontraron diferencias estadísticas por lo que se puede deducir que el efecto hipoglucemiante fue similar en todas las dosis ensayadas y apareció a las 1.5 horas, continuando hasta el final del experimento.



**Gráfica 9.** Efecto del extracto íntegro de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

#### 6.2.2.2 Efecto del extracto íntegro *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa y sacarosa

En la Tabla 6 (ver anexo) se encuentran los resultados del experimento de tolerancia a la glucosa en animales normoglucémicos como se aprecia el extracto íntegro de *H. seemannii* a la dosis de 100 mg/kg provoca una disminución del pico posprandial, sin embargo, a la dosis de 500 mg/Kg provocó un incremento del pico

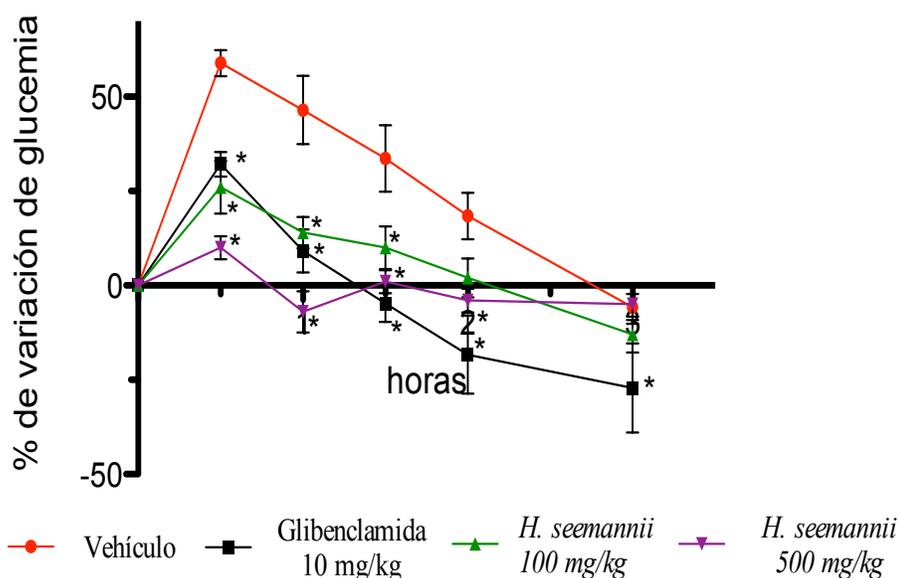
posprandial sugiriendo que el extracto a una dosis elevada estimula la entrada de glucosa al torrente sanguíneo. En animales diabéticos (Gráfica 10), por el contrario, el extracto de *H. seemannii* a las dosis de 100 y 500 mg/kg inhibe de manera importante y significativa ( $p < 0.05$ ) la aparición del pico posprandial. De acuerdo a la forma de la gráfica, el tratamiento a la dosis de 500 mg/kg, no solo disminuye el pico posprandial, y por tanto la absorción de glucosa, sino que controla los niveles de glucemia, manteniendo el porcentaje de variación constante durante todo el tiempo del ensayo.

Los experimentos de tolerancia a la sacarosa, de nueva cuenta, se realizaron para determinar si el mecanismo de acción antihiper glucemiante de esta especie estaba relacionado con una inhibición de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales. Los resultados se muestran en la Gráfica 11 y Tabla 7.

En ratones normoglucémicos sólo la dosis de 31.6 tuvo una diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. En animales diabéticos (Gráfica 11), a las dosis de 31.2 y 100 mg/kg, el extracto ocasionó una disminución significativa, de los niveles de glucosa. Por lo tanto, el extracto de *H. seemannii* inhibe las  $\alpha$ -glucosidasas en los animales diabéticos.

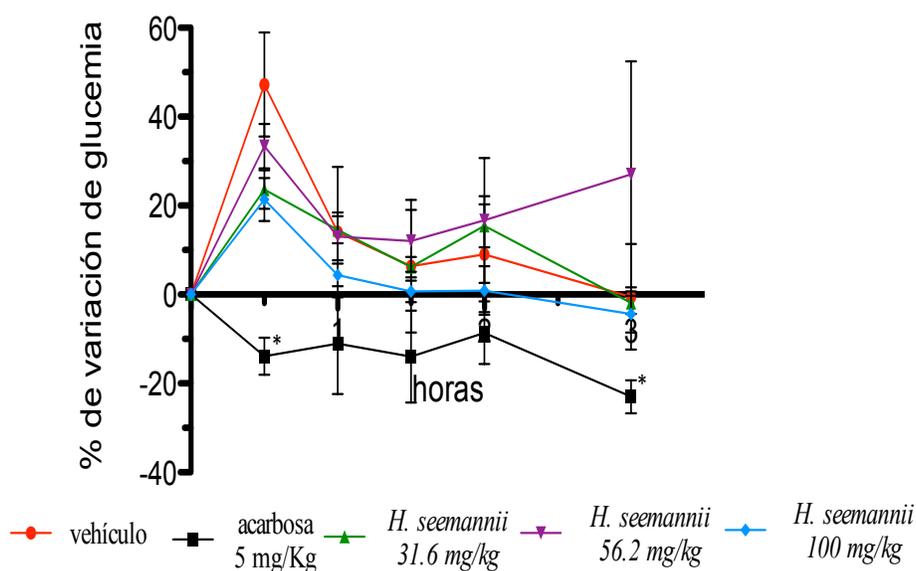
#### **6.2.2.3 Efecto de la infusión de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tipo agudo**

Para determinar el posible efecto hipoglucemiante de la infusión se realizaron los ensayos agudos correspondientes en animales normoglucémicos y diabéticos.



**Gráfica 10.** Efecto del extracto íntegro de *H. seemannii* de sobre los niveles de glucosa en sangre en experimentos de tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $p < 0.05$ .

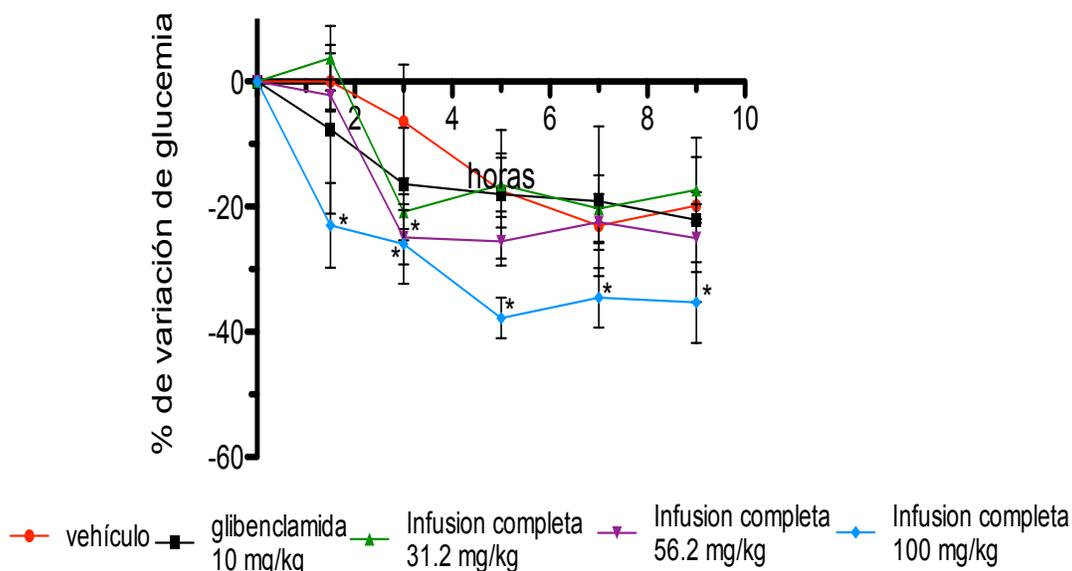
El análisis estadístico de los resultados de la Tabla 8 muestra que no existe una diferencia de los tratamientos con respecto al control ( $p < 0.05$ ), concluyendo que la infusión completa no provoca un efecto hipoglucemiante en ratones normoglucémicos, pero en ratones diabéticos (Gráfica 12); el tratamiento estadístico mostró una diferencia ( $p < 0.05$ ) en la dosis de 100 mg/kg a la hora y media de haber administrado la infusión, este resultado se relaciona con un claro efecto hipoglucemiante que se conserva hasta el término del experimento. A partir de la hora cinco, el efecto se ve acentuado, incluso es mayor que el de la glibenclamida al mismo tiempo de medición.



**Gráfica 11.** Efecto del extracto íntegro *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la sacarosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

#### 6.2.2.4 Efecto de la infusión *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa

Para determinar el efecto antihiperoglucémico de la infusión de *H. seemannii* se realizó el ensayo de tolerancia a la glucosa en ratones normoglucémicos (Tabla 9) e hiperoglucémicos (Gráfica 13). El análisis de los resultados para estos experimentos indican que la actividad de la infusión solamente se presenta en ratones diabéticos y a las dosis ensayadas (31.6, 56.2 mg/Kg) disminuyen el pico posprandial significativamente ( $p < 0.05$ ). De manera adicional, podemos visualizar que los tratamientos parecen provocar un retraso en la absorción de glucosa ya que el pico posprandial se ve desplazado a la derecha, provocando que el pico posprandial se mantuviera 1.5 h para la dosis de 31.2 mg/Kg y 2 h en el caso de la dosis de 56.2 mg/Kg.

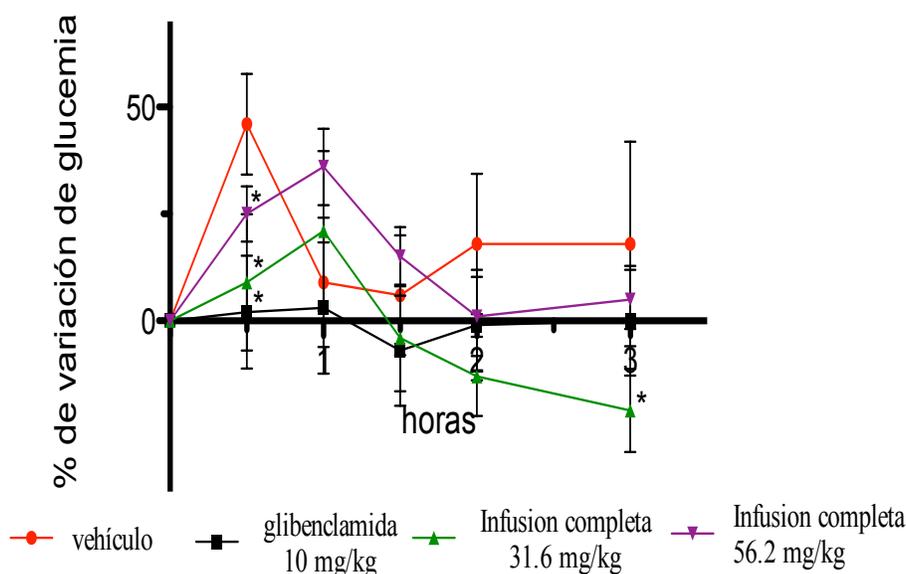


**Gráfica 12.** Efecto de la infusión de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

#### 6.2.2.5 Efecto de las fracciones de la infusión de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tipo agudo

En las Tabla 10 y 11 se puede observar que la fracción acuosa posee un efecto hipoglucemiante a todas las dosis utilizadas (31.6, 56.2 y 100 mg/Kg) en ratones normoglucémicos; cuando se comparan estos resultados con el grupo tratado con la glibenclamida, y sí bien no se puede asegurar que tengan el mismo mecanismo de acción, los niveles de glucemia disminuyen de manera similar a las cinco horas del ensayo. En cuanto a los experimentos de tipo agudo con ratones hiperglucémicos se obtuvieron los resultados que se muestran en las Gráficas 14 y 15. El efecto hipoglucemiante de la fracción orgánica fue mejor que el de la fracción acuosa lo que

podría estar relacionado con la extracción de los principios activos con el disolvente orgánico.

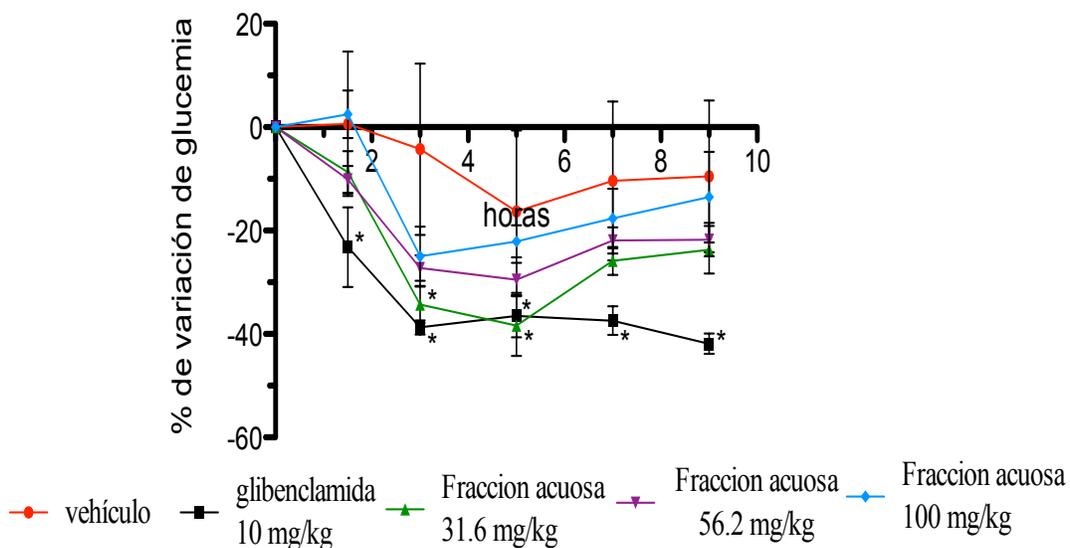


**Gráfica 13.** Efecto de la infusión *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

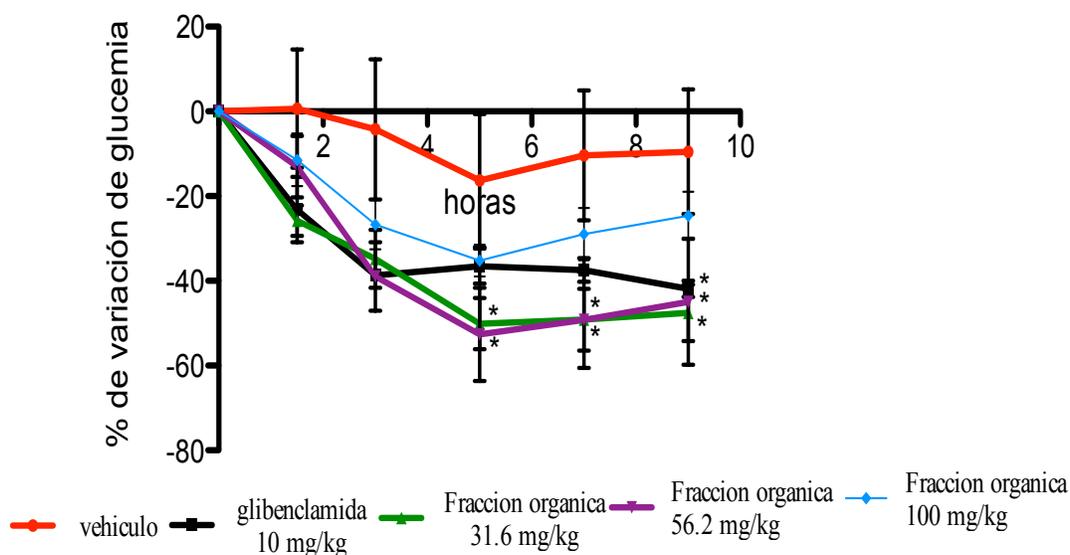
La fracción acuosa a las dosis de 31.6 mg/kg en la hora 3 y 5 del ensayo ejercen un efecto hipoglucemiante igual al de la glibenclamida, por lo que podemos suponer que los principios activos se redistribuyen en las dos fases resultantes del proceso de reparto.

En la Gráfica 15 se aprecia que la fracción orgánica tiene efecto hipoglucemiante y un comportamiento similar al de la glibenclamida a las dosis de 31.6 y 56.2 mg/Kg teniendo su efecto máximo a las cinco horas del ensayo; cabe subrayar que la dosis de 100 mg/kg no provocó efecto alguno, posiblemente debido a los mismos factores mencionados en este mismo trabajo para la especie *L. porteri*. Con estos

resultados se confirma el potencial hipoglucemiante del extracto íntegro e infusión de *H. seemanii*.



**Gráfica 14.** Efecto de la fracción acuosa de la infusión de *H. seemanii* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .



**Gráfica 15.** Efecto de las fracción orgánica de la infusión de *H. seemanii* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

---

---

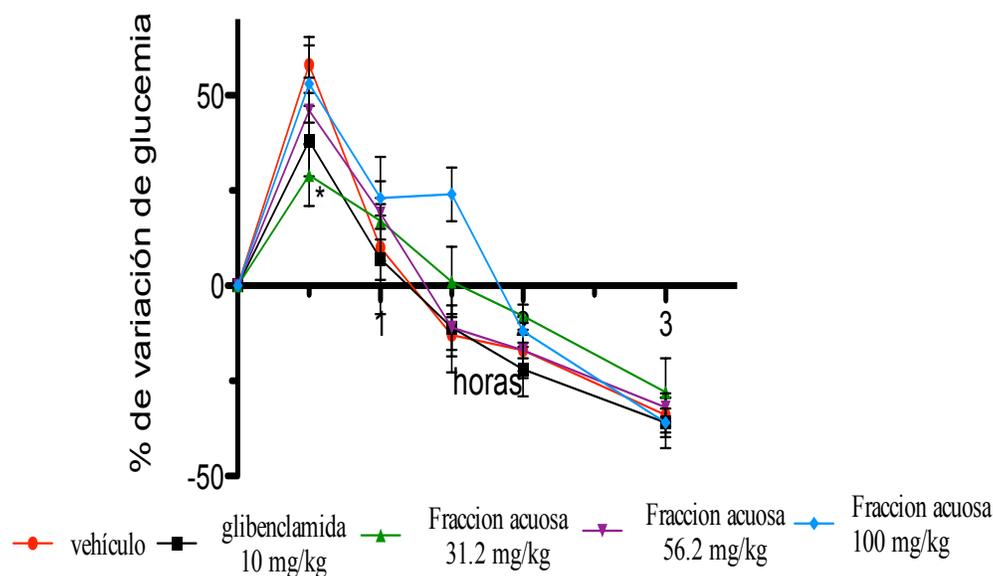
#### **6.2.2.6 Efecto de las fracciones orgánica y acuosa de la infusión de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa**

Para determinar que parte de la infusión es la más activa (polar vs menos polar), los experimentos descritos en los incisos anteriores se repitieron con las fracciones resultantes del reparto de la infusión con acetato de etilo. Los experimentos los ratones normoglucémicos se muestran en las Tablas 12 y 13 en las cuales se puede notar que la fracción acuosa no inhibe la aparición del pico posprandial a las dosis utilizadas (31.6, 56.2 y 100 mg/kg), mientras que la fracción orgánica (de acetato de etilo) solo inhibe la aparición del pico posprandial de manera significativa a la dosis de 56.2 mg/kg.

En el caso con los experimentos en ratones diabéticos, se obtuvieron los resultados que se resumen las Gráficas 16 y 17. En la Gráfica 16 advertimos que la fracción acuosa tiene un efecto de inhibición del pico posprandial a la dosis 31.6 mg/kg. En la Gráfica 17 se aprecia que la fracción orgánica no presenta un diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la inhibición del pico posprandial. El efecto de esta fracción fue mucho mejor sobre los ratones normoglucémicos, pero aun así podemos notar que las propiedades antihiperoglucémicas de las dos fracciones obtenidas de la infusión no son tan marcadas como las hipoglucemiantes.

Si bien para esta especie no fue posible realizar el estudio fitoquímico por no contar con la cantidad de material adecuado se puede proponer con base en consideraciones de tipo quimiotaxonómico que los metabolitos secundarios responsables de los efectos farmacológicos demostrados son del tipo dihidroisocumarina, ftálicas y/o estilbenos ya que la especie relacionada *H. macrophilla* biosintetiza y acumula en sus hojas estos tipos de sustancias (Matsuda *et al.*, 1999). Aún

más, el hidrangenol, una dihidroisocumarina presente en *H. macrophylla*, es capaz de disminuir la glucosa en ratones KK-A<sup>Y</sup> (Zang *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 1987).



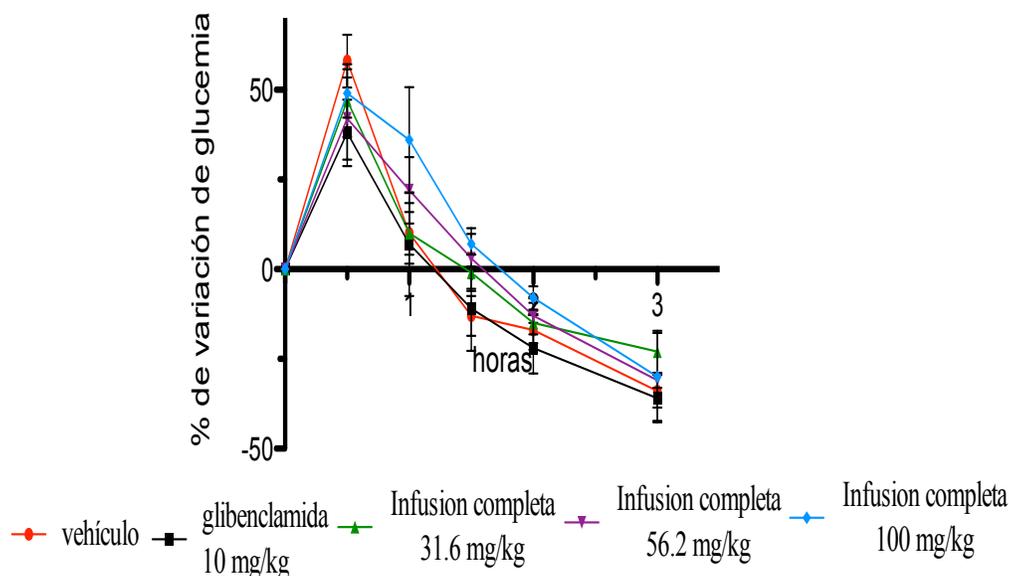
**Gráfica 16.** Efecto del extracto de la fracción acuosa de la infusión de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

### 6.2.3 Estudios sobre *A. cristata*

#### 6.2.3.1 Efecto del extracto de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tipo agudo

Para completar la evaluación de la eficacia antihiper glucémica de *A. cristata* se realizaron los experimentos de tipo agudo en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos. De acuerdo a los resultados que se integran en la Tabla 14 (ver Anexo), el extracto no induce un efecto hipoglucémico en ratones normoglucémicos; esto seguramente debido a que los mecanismos de compensación en el manejo de glucosa de los animales sanos están funcionando adecuadamente y por ello no se observa una diferencia significativa con respecto al grupo control tratado con el

vehículo. En contraste, al analizar la Gráfica 18 se observa que a todas las dosis ensayadas a partir de la hora 5 existe un efecto hipoglucemiante estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). Si se observa la tendencia de la gráfica correspondiente a la dosis de 31.6 mg/kg, el efecto es igual al de la glibenclamida a la dosis de 10 mg/kg.



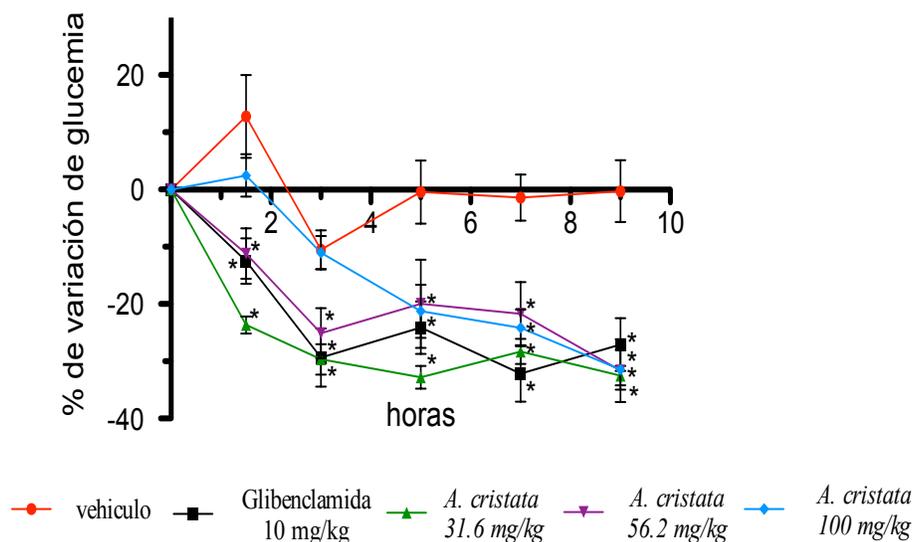
**Gráfica 17.** Efecto del extracto de la fracción orgánica de la infusión de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

Estos resultados son muy valiosos pues no solo validan el uso popular de *A. cristata*, sino que también indican el gran potencial antidiabético que tiene esta planta ya que tiene efectos tanto hipoglucemiante como antihiper glucémico.

### 6.2.3.2 Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa y sacarosa

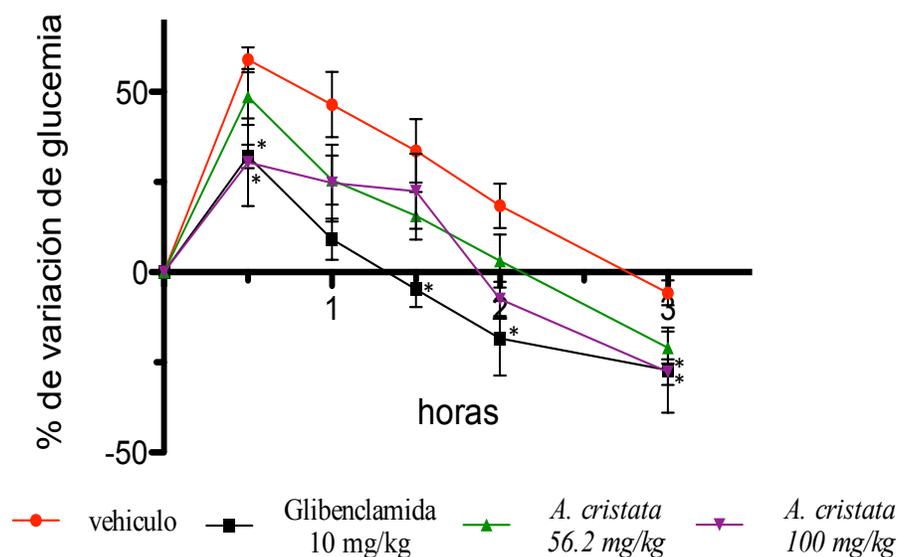
En el caso de *A. cristata* los resultados de la evaluación de la tolerancia a la glucosa utilizando ratones normoglucémicos (Tabla 15) las dos dosis utilizadas tienen un efecto negativo en la absorción de la glucosa, esto se concluye al realizar el análisis

estadístico y corroborar la inhibición del pico posprandial, como se muestra en la Gráficas 19 el extracto de *A. cristata* inhibe la aparición del pico posprandial a la dosis de 100 mg/Kg,



**Gráfica 18.** Efecto del extracto de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tipo agudo. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

Como se puede apreciar en la Tabla 16 (ver Anexo) los resultados de la tolerancia a la sacarosa en animales normoglucémicos sugieren que el pico posprandial sólo es inhibido a la dosis más alta. En la Gráfica 20 se puede apreciar que el extracto de *A. cristata* ejerce una inhibición del pico posprandial a todas las dosis ensayadas en animales diabéticos ( $p < 0.05$ ) por lo tanto es factible que la acción antihiper glucémica de este extracto se deba a un conjunto de efectos como pueden ser la inhibición en el transporte de glucosa (de acuerdo al experimento de tolerancia a la glucosa) y/o una inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (de acuerdo al experimento de tolerancia a la sacarosa).



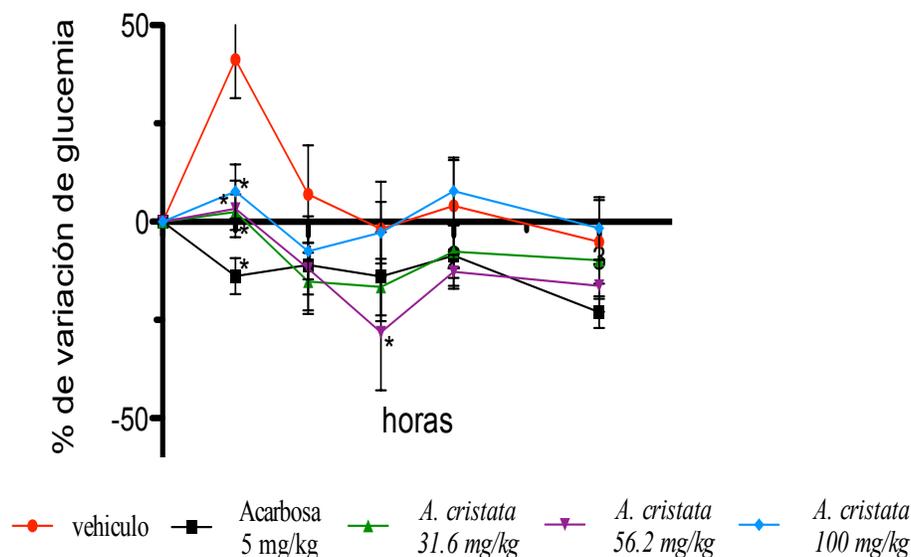
**Gráfico 19.** Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la glucosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

Estos resultados son de gran importancia pues los dos mecanismos fuera de contraponerse pueden sumarse e incrementar la eficacia de la planta como agente antihiper glucémico.

### 6.2.3.3 Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la maltosa

Para validar los resultados obtenidos en el ensayo de tolerancia a la sacarosa se realizó un experimento de tolerancia a la maltosa cuyos resultados se muestran en la Gráfica 21. Analizando las gráficas correspondientes se puede observar que efectivamente el extracto tiene un fuerte efecto sobre el pico posprandial y por lo tanto sobre las enzimas maltasas. El conjunto de resultados farmacológicos realizados sobre *A. cristata* indican que la planta es un excelente antidiabético. El efecto antihiper glucémico encontrado en los experimentos de tolerancia a la sacarosa y

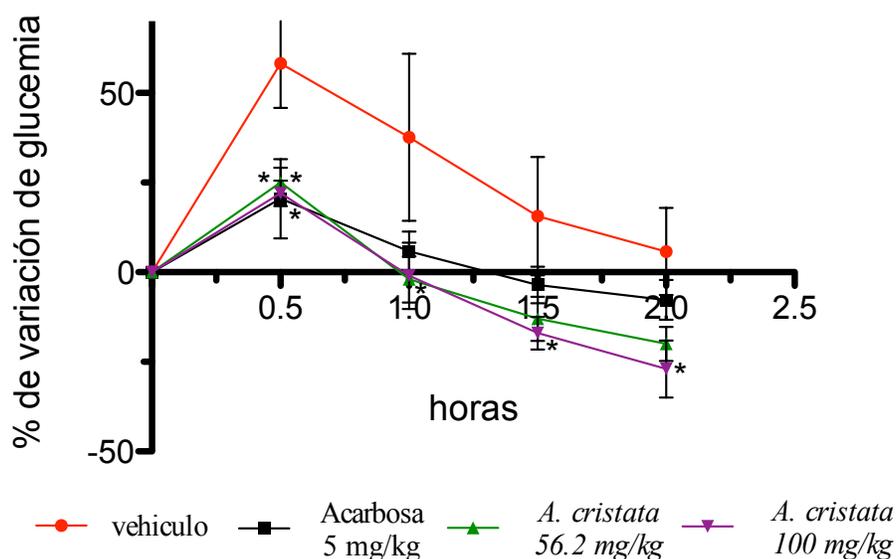
maltosa puede deberse no solo a la inhibición de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales sino también al alto contenido de fibra de la planta (Rendon *et al.*, 2001), misma que ocasiona un retraso de la absorción de glucosa (Abeywickrama *et al.*, 2011).



**Gráfica 20.** Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la sacarosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

#### 6.2.3.4 Efecto del extracto de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratas diabéticas en experimentos de tipo agudo

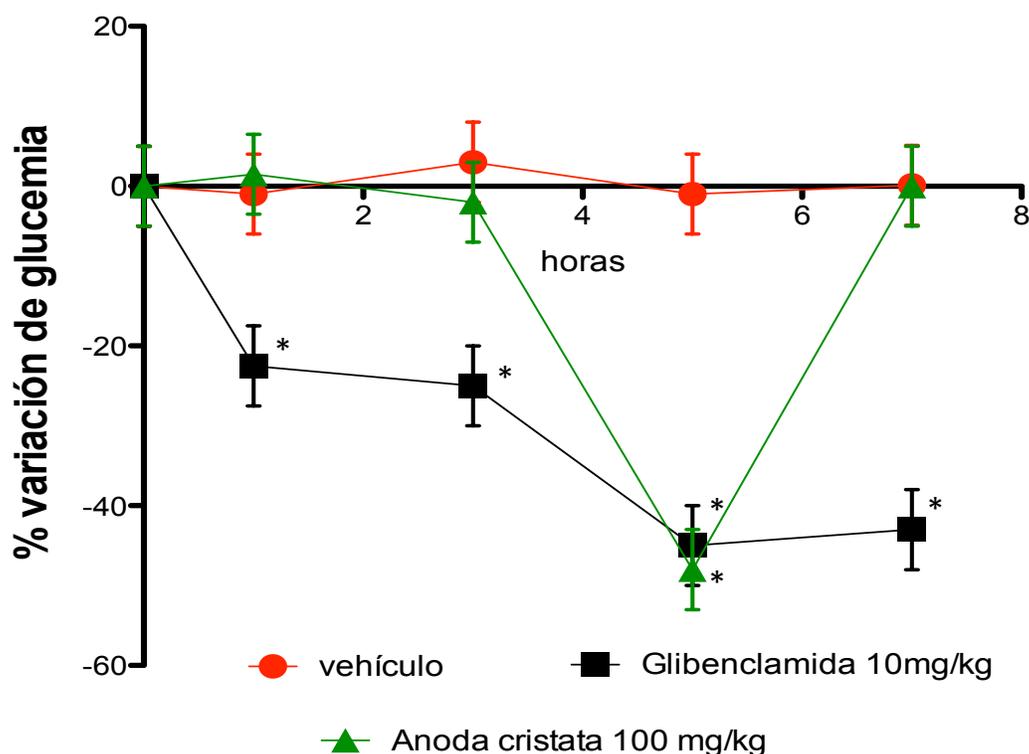
Los resultados de este ensayo se encuentran plasmados en la Gráfica 22 y como se puede observar estos tienen la misma tendencia que los obtenidos en el modelo con ratones. El efecto máximo se apreció a las 5 horas de experimentación y fue comparable al de la glibenclamida.



**Gráfica 21.** Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratones diabéticos en experimentos de tolerancia a la maltosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

#### 6.2.3.5 Efecto del extracto de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratas diabéticas en experimentos de tipo subcrónico

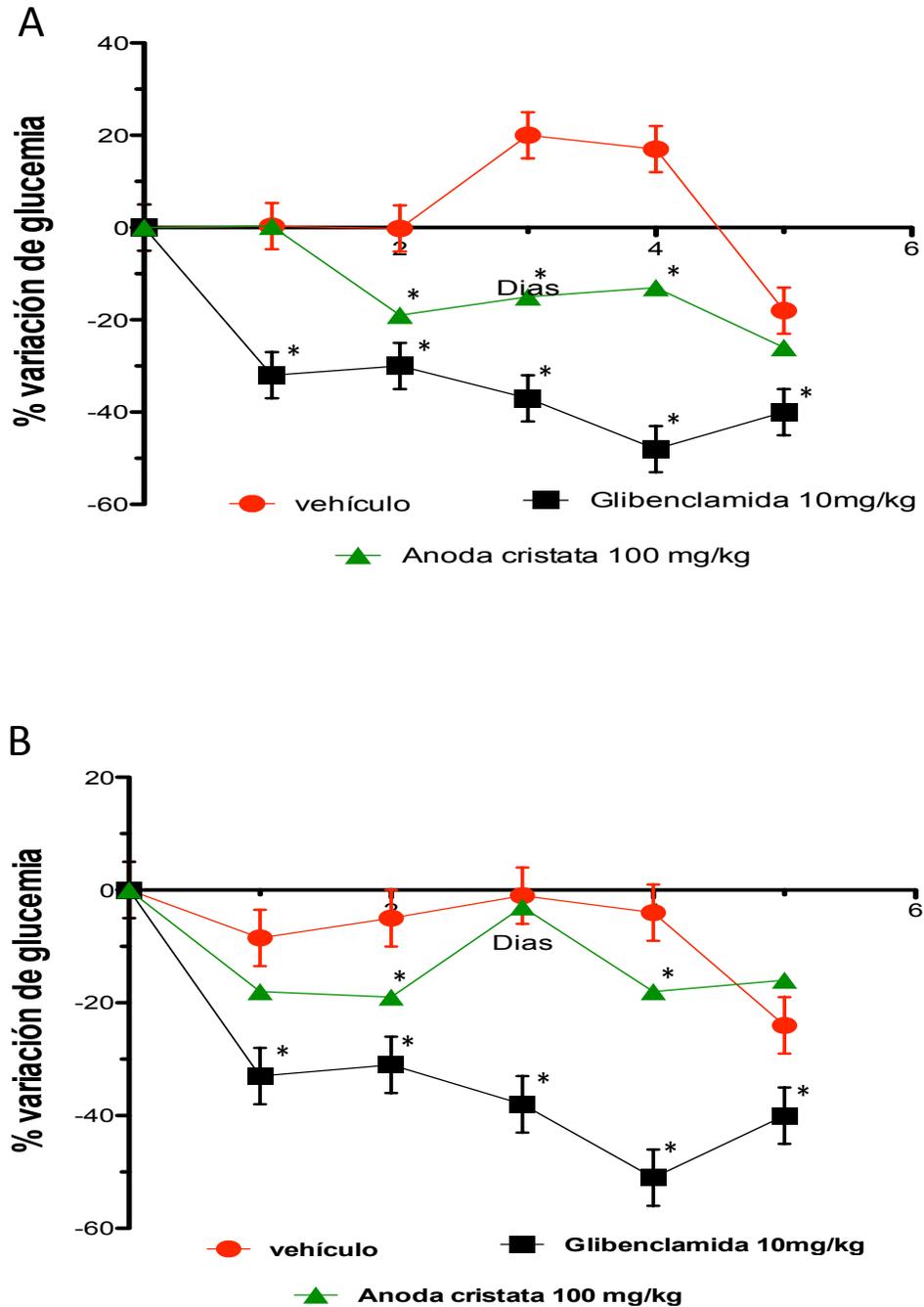
Con la finalidad de investigar si el efecto del extracto de *A. cristata* era constante se realizó un ensayo subcrónico de cinco días, la glucemia se determinó antes de administrar los tratamientos y cinco horas después de dicha administración. Los resultados se sintetizan en las Gráficas 23 A y B; es importante destacar que el efecto hipoglucemiante de *A. cristata* se conservó a lo largo de los cinco días que duró el ensayo.



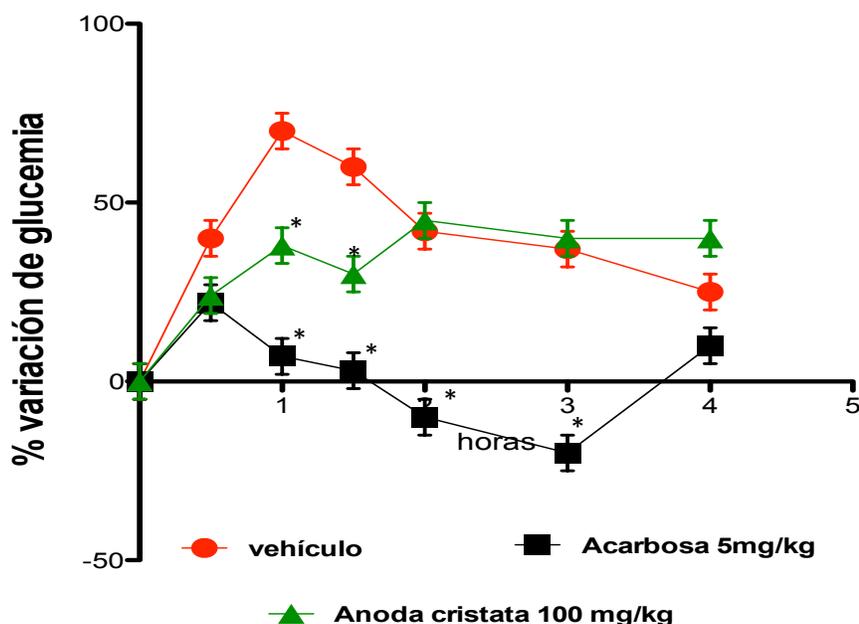
**Gráfica 22.** Efecto del extracto de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratas diabéticas en experimentos de tipo agudo. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

#### 6.2.3.6 Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratas diabéticas en experimentos de tolerancia a la glucosa

Para completar esta parte del proyecto se decidió ensayar el extracto de *A. cristata* en otro modelo animal, así que se realizaron diferentes ensayos en ratas hiperglucémicas. Se realizaron experimentos de tolerancia a la glucosa, de tipo agudo y un ensayo subcrónico, todos a una sola dosis (100 mg/kg). Como se puede observar en la Gráfica 24 la eficacia de *A. cristata* como antidiabético se confirma en el modelo con ratas pues los resultados son similares que los obtenidos en ratones.



**Gráfica 23.** A. Efecto antidiabético subcrónico (5 días) en ratas hiperglucémicas glucosa medida a las 0 horas (antes de la administración de las muestras). B. Efecto antidiabético subcrónico (5 días) ratas hiperglucémicas glucosa medida a las 5 horas después de la administración de las muestras. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

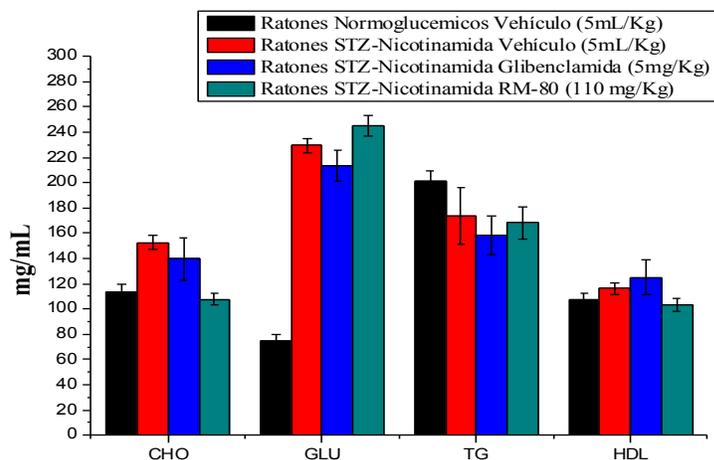


**Gráfica 24.** Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratas diabéticas en experimentos de tolerancia a la glucosa. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

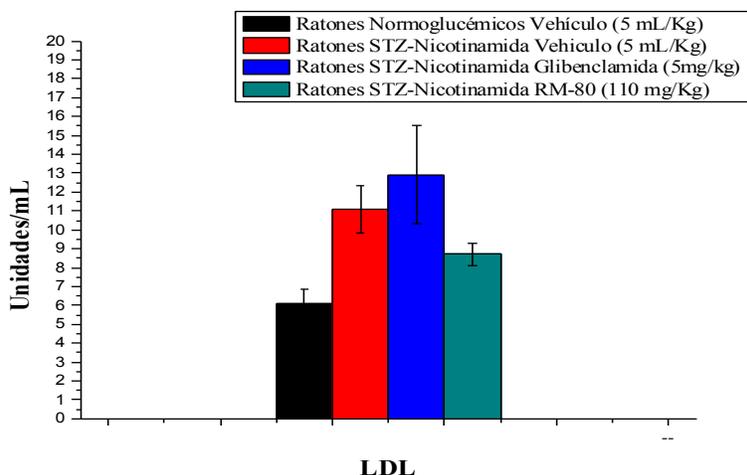
#### 6.2.3.7 Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre distintos parámetros bioquímicos en ratones

Continuando con los ensayos biológicos para *A. cristata* se realizó un ensayo de tipo subcrónico con ratones macho de la cepa ICR para determinar el efecto del extracto total a una dosis de 100 mg/kg sobre los niveles de colesterol, triglicéridos, glucosa, HDL y LDL. Como se aprecia en las Gráficas 25 y 26, el extracto de *A. cristata* disminuye los niveles de colesterol y lípidos de baja densidad (LDL) con respecto a los controles hiperglucémicos tratados con el vehículo. Este hallazgo es de suma importancia debido a que los niveles altos de colesterol y LDL causan muchas complicaciones a los pacientes diabéticos. Entonces, el extracto de esta planta tiene actividad no sólo como agente hipoglucemiante y antihiperglucémico sino también

como hipolipidémico. Con estos resultados se puede proponer que la planta podría ser un buen complemento terapéutico para tratar el síndrome metabólico.



**Gráfica 25.** Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre distintos parámetros bioquímicos en ratones ICR. Los tratamientos se administraron diariamente durante siete días. CHO=colesterol, GLU=glucosa, TG= triglicéridos., HDL=lípidos de alta densidad. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo con STZ-NAD fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .



**Gráfica 26.** Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre los niveles de LDL en ratones ICR. Los tratamientos se administraron diariamente durante siete días. LDL= Lípidos de baja densidad. Cada punto es la media  $\pm$  E.E.M. de  $n = 6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo con STZ-NAD fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet  $*p < 0.05$ .

El conjunto de resultados obtenidos para *A. cristata* indican que los preparados de la planta constituyen agentes potenciales para el tratamiento del síndrome metabólico ya que no solo parece regular los niveles de azúcar, a través de efectos hipoglucemiantes y antihiper glucémicos importantes, sino que también modula otros parámetros bioquímicos como los niveles de lípidos sanguíneos. Los efectos recién descritos guardan cierta analogía con el nopal, incluyendo el hecho de que esta malvácea posee una alta cantidad de fibras vegetales. Como es bien conocido, las fibras retrasan la absorción de azúcares y lípidos. Por otro lado, los resultados de los experimentos de tolerancia a la glucosa apuntan a la presencia en la planta de sustancias capaces de regular el transporte de glucosa. Entonces, *A. cristata* constituye un agente medicinal que reúne las bondades de un agente fitoterapéutico convencional cuyos principios activos interactúan con varios blancos de acción a nivel molecular y que se traduce en un efecto sinérgico de sus principales constituyentes.

## VII. CONCLUSIONES

El criterio de selección etnomédico resulta eficiente para descubrir productos con un potencial terapéutico ya que el estudio de *L. porteri* permitió no solo demostrar su eficacia preclínica como agente antidiabético, sino también descubrir nuevos inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas; este blanco de acción, a diferencia de otros antidiabéticos, disminuyen la digestión de carbohidratos a nivel intestinal, dando un nuevo enfoque terapéutico independiente del incremento en la secreción de insulina, mecanismo que pierde su eficacia con el tiempo, ya que las células beta “sanas” degeneran; este efecto conduce a mediano plazo al fracaso del tratamiento y a la necesidad de suministrar al paciente insulina, terapia que tiene muchas desventajas. Entonces, los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas ayudan a preservar las células  $\beta$  pancreáticas que aún funcionan al evitar la sobreproducción de insulina. Para la especie *L. porteri* el principal producto activo la Z-3-butilidenftálida (**2**) resulto ser un inhibidor alostérico de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y constituye, junto con la Z-ligustílida (**3**) el producto más abundante del aceite esencial. La Z-ligustílida (**3**) no afecto la actividad de la enzima, sin embargo, parece afectar otro blanco de acción relacionado con el transporte y/o absorción de glucosa el cual no pudo ser determinado en este estudio. Cabe mencionar que la presencia en un extracto de sustancias con diferentes mecanismos de acción se traduce en un efecto sinérgico como se apreció en este caso ya que el extracto íntegro mostro un mayor efecto antihiper glucémico que los productos por separado.

De manera adicional este trabajo constituye el primer reporte de las ftálidas con actividad antidiabética.

Los efectos hipoglucemiantes y antihiper glucémicos de las especies *H. seemannii* y *A. cristata* comprobadas en el presente estudio constituyen una aportación al conocimiento de la eficacia preclínica de las especies. *A. cristata* constituye un candidato idóneo para el desarrollo de un fitofármaco debido a que presenta propiedades hipoglucemiantes, antihiper glucémicas e hipolipidémicas, esto aunado a los resultados de las pruebas de toxicidad que evidencian que el uso de esta especie no ocasiona efectos tóxicos en roedores, la especie se usa como alimento sin que se hayan reportado efectos adversos o tóxicos, y por último, pero no menos importante, su condición de maleza garantiza su abastecimiento continuo.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abeywickrama, K.R.W., Ratnasooriya, W.D., Amarakoon, A.M.T. (2011). Oral hypoglycaemic, antihyperglycaemic and antidiabetic activities of Sri Lankan Broken Orange Pekoe Fannings (BOPF) grade black tea (*Camellia sinensis* L.) in rats. *J Ethnopharmacol*, **135**, 278-286.
- Acosta-Patiño, J.L., Jiménez-Balderas, E., Juárez-Oropeza, M.A., Zagoya, J.C. (2001). Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on Type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *J Ethnopharmacol*, **77**, 99-101.
- Aguilar-Salinas, C., Velásquez-Monroy, O., Gómez-Pérez, F., González-Chávez, A., Lara-Esqueda, A., Molina-Cuevas, V., Rull-Rodrigo, J.A., Tapia-Conyer, R. Characteristics of patients with type 2 diabetes in Mexico (2003). *Diabetes Care*, **26**, 2021-2026.
- Aguilar-Salinas, C.A., Rojas, R., Gómez-Pérez, F.J., Mehta, R., Franco, A., Olaíz, G., Rull, J.A. (2005). The Metabolic syndrome: A concept hard to define *Arch Med Res*, **36**, 223–231.
- Alarcón-Aguilar, F.J., Roman-Ramos, R. (2006). Antidiabetic plants in Mexico and Central America. En: Traditional Medicines for Modern Times. Vol. 6. Antidiabetic Plants. Ed.: Soumyanath, A. Boca Ratón: Florida.
- Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J., Cárdenas-Vázquez, R. (2008). Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican Plants used in the treatment of type 2 diabetes. *J Ethnopharmacol*, **116**, 27-32.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*, **99**, 325-348.
- Bailey, C.J., Flatt, P.R. (1990). Models for testing new hypoglycemic drugs. En: Bailey C.J., Flatt, P.R. (Eds). New Antidiabetic Drugs. Smith-Gordon. London. 65-82.
- Barceló, A., Aedo, C., Rajpathak, S., Robles, S. (2003). The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean *Bull. WHO*, **81**, 19-27.
- Borges de Melo, E., da Silveira Gomez, A., Carvalho, I. (2006).  $\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, **62**, 1027-1032.
- Breitmaier, E. (2002). Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry. A practical Guide. 3a edición. Edit. John Wiley and Sons, LTD.
- Bye, R. 2008. Observaciones no publicadas. Comunicación personal.
- Bye, R. 2009. Observaciones no publicadas. Comunicación personal.
- Cabrera-Rode, E.;Suárez-Fonzeca, L.; Díaz-Horta, O.; Díaz-Díaz, O. (2000). Nuevos criterios para clasificar la diabetes mellitus. *Rev Cub Endocrinol*. **11**. 51-55.
- Cégiéla-Carlio, P., Bessiere, JM., David, B., Mariotte, AM., Gibbons, S y Dijoux-Franca, MG. (2005). Modulation of multi-drug resistance (MDR) in

- Staphylococcus aureus by Osha (*Ligusticum porteri* L., Apiaceae) essential oil compounds. *Flavour Frag J*, **20**, 671-675.
- Cronquist, A., Holmgren, NH y Holmgren, PK. (1997). USA. Vol. 3 Part A. Subclass Rosidae (except Fabales). The New York Botanical Garden Bronx, New York. USA. 340-341, 365-367.
  - 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**, 334-342.
  - Delgado, G., Reza-Garduño, RG., Ríos, MY and Del Río, F. (1992). Phthalides and monoterpenes of the hexane extract of the roots of *Ligusticum porteri*. *Planta med.* **58**, 570-571.
  - Delgado, G., Reza-Garduño, RG., Toscano, RA., Bye, RA y Linares, E. (1988). Secondary metabolites from the roots of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae). X-ray structure of Z-6,6',7.3a'-diligustilide. *Heterocycles*, **27**, 1305-1312.
  - Egede, L.E, Ellis, C. (2010). Diabetes and depression: global perspectives. *Diabetes Res Clin Pract*, **87**, 302-312.
  - Ford, K.C. (1975). Las Yervas de la Gente: A Study of Hispano- American Medicinal Plants. University of Michigan. Anthropological papers n° 60.
  - Garduño-Ramírez, M. L. C. (2001). Tesis Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM, México.
  - Goetz, P. (2005). Plantes médicinales d'Amérique du Nord: apport à la phytothérapie française du traitement des affections des voies respiratoires. *Phytothérapie*. **1**, 19-27.
  - 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**, 1099-1105.
  - Guerrero-Analco, J.A., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R. (2007). Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry*, **68**, 2087-2095.
  - Hashimoto, T., Tori, M., Asakawa, Y. (1987). Three dihydroisocoumarin glucosides from *Hydrangea macrophylla* subsp. serrata. *Phytochemistry*, **26**. 3323- 3330.
  - Hernández-Avila, M., Olaíz-Fernández, G. (2002). La diabetes y el mexicano: un reto para la salud pública. *Ciencias*, **58**, 8-16.
  - Hopkins Johns University. USA. Press. (2005).
  - Kecskemeti, V., Bagi, Z., Pacher, P., Posa, I., Kocsis, E., Koltai, M.Z. (2002). New trends in the development of oral antidiabetic drugs. *Curr Med Chem*, **9**, 53-71.
  - Linares, E y Bye, RA. (1987). A study of four medicinal plants complexes of Mexico and adjacent United States. *J Ethnopharmacol*, **19**, 153-183.

- Lorke, D. (1983). A new approach to partial acute toxicity testing. *Arch Toxicol*, **54**, 275-287.
- Mathias, ME y Constance, L. (1944). Umbelliferae. N. Amer. Fl. 28 B(1): 43-160. (Aethusa, p. 159).
- Matsuda, H., Shimuda, H., Yoshikawa, M. (1999). Structure-requirements of isocoumarins, phthalides, and stilbenes from *Hydrangeae Dulcis Folium* for inhibitory activity on histamine release from rat peritoneal mast cells. *Bioorgan Med Chem*, **7**, 1445 – 1450.
- Matsui, T., Ogunwande, K.J.M., Abesundara, Matsumoto, K. (2006). Anti-hyperglycemic potential of natural products. *Mini-Rev Med Chem*, **6**, 349-356.
- Medina-Salgado, C. (2005). Diabetes Mellitus. *Revista de ciencia y desarrollo*, **30**, 6-14.
- Molitch, M. E.; DeFronzo, R. A.; Franz, M J.; Keane, W. F. (2000). Diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, **23**, S69-S72.
- Moreira Jr, E.D., Silva, R.C., Onofre, Z., Chagas de Almeida, M.C., Valverde Mendes, A.B., Saraiva, J.A., Ablan, F. (2010). Glycemic control and its correlates in patients with diabetes in Venezuela: results from a nationwide survey. *Diabetes Res Clin Pract*, **87**, 407-414.
- Oki, T.; Matsui, T.; Osajima, Y.. (1999). Inhibitory effect of  $\alpha$ -glucosidase, inhibitors varies according to its origin. *J Agric Food Chem*, **47**, 550-553
- Olivas Sánchez, M. P. (1999) Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Ed. 1.13-14.
- Oliveira, H., Dos Santos., M.P., Grugulo, R., Lima, L., Martins, D.T.O., Lima, J. C.S., Stoppiglia, L.F., Lopes, C.F., Kawashita, N.H. (2008). Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. *J Ethnopharmacol*, **115**, 515-519.
- Organización Mundial de la Salud (2004). Marketing and Dissemination, World Health Organization, Geneva Switzerland
- Organización Mundial de la Salud. (1999). World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva, Switzerland.
- Rendón, B. Bye, R.; Núñez-Farfán (2001) Ethnobotany of *Anoda cristata* (L.) Schl. (Malvaceae) in the central region of Mexico: uses, management and population differentiation in the community of Santiago Mamalhuazucan, Ozumba, Estado de Mexico. *Econ Bot*, **55**, 546-554.
- Reza-Garduño, RG. (1987). Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Rodbard, H. W., Green, A.J., Fox, K.M., Grandy, S. (2010). Impact of type 2 diabetes mellitus on prescription medication burden and out-of-pocket healthcare expenses. *Diabetes Res Clin Pract*, **87**, 360-365.
- Ross, S.A., Gulve, E.A., Wang, M. (2004). Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. *Chem Rev*, **104**, 1255-1282.
- Sadique V., Hazeena B., Thenmozhi, V., Elango, V. (1987). Hypoglycemic Effect of Cotton Seed Aqueous Extract in Alloxan- Induced Diabetes Mellitus in Rats. *Biochem Med Met Biol*, **38**, 104-110.

- 
- 
- Sharma, S. R.; Dwivedi, S.K.; Swarup, D. (1997). The antidiabetic and antilipidemic activity of aqueous extract of *urtica dioica* L. on type2 diabetic model rats. *J Ethnopharmacol*, **58**, 39-44.
  - Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, D.Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*, **87**, 4-14.
  - Shirwaikar, A., Rajendran, K., Dinesh Kumar, C., Bodla, R. (2004). Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona Squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, **91**, 171-175.
  - Shirwaikar, A., Rajendran, K., Barik, R. (2006). Effect of aqueous bark extract of *Garuga pinnata* Roxb. In streptozotocin-nicotinamide induced type-II diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol*, **107**, 285-290.
  - Shobana, S., Screerama, Y.N., Malleshi. N.G. (2009). Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chem*, **115**, 1268-1273.
  - Soumyanath, A. (Editora). (2006). Traditional Medicines for Modern Times. Vol. 6. Antidiabetic Plants. Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, p 314.
  - SSA. (2004). Página de la Secretaria de Salud, Gobierno de México. <http://www.ssa.gob.mx> (Enero del 2004).
  - Verspohl, E. J. (2002). Recommended testing in diabetes research. *Planta Med*, **68**, 581-90.
  - Williamson, E.M., Opako, D.T., Evans, F.J. Pharmacological Methods in Phytotherapy. Research, John Wiley & Sons, (1996), New York, p 228.
  - World Health Organization. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of WHO consultation. Geneva, Switzerland, **66**.
  - Zhang, H., Matsuda, H., Kamuhara, A., Ito, Y., Nakumura, S., Yoshikawa, M. (2007). New type of anti-diabetic compounds from the processed leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* (*Hydrangeae Dulcis* Folium). *Bioorgan Med Chem Lett*, **17**. 4972- 4976.
  - Zschoke, S., Liu, J-H. Stuppner, H y Bauer, R. (1998). Comparative study of roots of *Angelica sinensis* and related umbelliferous drugs by thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, and liquid chromatography–mass spectrometry. *Phytochem Analysis*, **9**, 283-290.

⋮

# ANEXO

⋮

**Tabla 1.** Efecto del extracto íntegro de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos en experimentos de tolerancia a la glucosa (1 g/kg).

Muestra	Dosis mg/kg	Glucemia mg/dL				
		0h	0.5h	1h	1.5h	2h
<b>Vehículo</b>	--	43±7.1	83±22.2(79.5)	61±18.6(29.2)	43.6±6.8(2.9)	37±4.9(-10.3)
<b>GLB</b>	10	60±6.7	164±9.8(181)	118±6.5(104.7)	75.1±5.4(31.2)	58.5±5.8(3.4)
<b><i>L. porteri</i></b>	56.2	53±3.2	179±14.2(235)	128±10.5(140)	89±6.9(69.2)	77±6.7(45.7)
<b><i>L. porteri</i></b>	100	62±3.1	201±12.1(221)	135±7.1(115.2)	101±9.5(61.9)	74±7.6(19.7)
<b><i>L. porteri</i></b>	316	68±3.0	155±7.1(131)	129±6.9(90.9)	113±5.8(66.8)	87±2.9(29.2)

**Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet \*p < 0.05. % de variación de glucemia esta en paréntesis**



•

•  
•  
•

• **Tabla 3.** Efecto del extracto íntegro de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos en experimentos de tolerancia a la sacarosa.

Muestra	Dosis mg/kg	Glucemia mg/ dL				
		0h	0.5h	1h	1.5h	2h
<b>Vehículo</b>	--	94±8.1	122±7.7(29)	114±7.5(21)	100±8.8(6.3)	95±8.0(1)
<b>Acarbosa</b>	5	100±4.9	94±3.7(-6.3)*	109±16.6(9)	103±10.9(3)	105±13.2(5)
<b><i>L. porteri</i></b>	31.2	86±4.8	92±6.6(7.3)*	90±3.8(6.5)*	89±10.3(5.4)	67±3.9(-20)*
<b><i>L. porteri</i></b>	56.2	98±3.7	103±8.1(4)*	89±5.2(-9)*	78.5±5.6(-19)*	73±4.6(-25)*
<b><i>L. porteri</i></b>	100	86±5.3	104±7.8(20)	90±5.8(4.9)	94±6.4(9.2)	81±6.4(-6.4)

**Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet \*P < 0.05.% variación de glucemia esta en paréntesis**

**Tabla 4.** Efecto de los compuestos 1-3 de *L. porteri* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos en experimentos de tolerancia a la glucosa (1 g/kg).

Muestra	Dosis mg/kg	Glucemia mg/dL				
		0h	0.5	1h	1.5h	2h
<b>Vehículo</b>	-	108±5.3	172±10.6(59)	109±15.8(1.5)	110±13.2(2.5)	94±7.7(-12)
<b>GLB</b>	10	121±7.0	71±7.1(-42)*	43±8.0(-65)*	37±3.5(-69)*	39±6.2(-68)*
<b>1</b>	31.2	93±6.8	97±8.3(3.8)*	66±9.5(-28)*	61±8.9(-35)*	46±8.1(-50)*
<b>1</b>	56.2	95±4.3	135±8.7(41)*	92±8.8(-3.8)	84±13.1(-13)*	69±9.0(-27)*
<b>2</b>	10	109±2.9	151±3.0(42)	130±5.1(25)	113±1.8(7)	96±1.7(-8)
<b>2</b>	20	134±4.9	187±10.0(40)	150±3.6(14)	126±5.6(-3.5)	109±6.9(-16)
<b>3</b>	10	122±4.0	110±10(-9)*	93±6.9(-24)*	70±10(-41)*	71±9.4(-42)*
<b>3</b>	20	129±8.6	153±3.0(20)*	117±3.7(-6.9)	103±2.6(-18)*	98±7.3(-23)*

**Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet \*P < 0.05.% variación de glucemia esta en paréntesis**

- 
- 
- 
- 

- **Tabla 5.** Efecto del extracto de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos en experimentos de tipo agudo

Glucemia mg/dL

Muestra	Dosis mg/Kg	0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
<b>Vehículo</b>	--	145±3.9	118±5.1(-18)	110±7.6(-24)	102±7.3(-29)	106±4.3(-26)	97±8.7(-33)
<b>GLB</b>	10	159±1.8	133±2.0(-16)	114±3.4(-28)	96±2.4(-39)	117±2.3(-26)	114±1.6(-28)
<i>H. seemannii</i>	31.6	154±6.0	134±5.3(-13)	133±6.0(-14)	119±5.5(-23)	135±7.2(-12)	119±8.2(-23)
<i>H. seemannii</i>	56.2	157±6.6	140±7.2(-11)	123±8.3(-22)	116±6.3(-26)	129±9.3(-17)	115±4.6(-26)
<i>H. seemannii</i>	100	156±6.3	117±9.8(-27)	112±7.9(-29)	111±6.0(-29)	111±9.6(-30)	106±7.0(-32)

Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet \*P < 0.05. % de variación de glucemia esta en parentesis

- 

-

**Tabla 6.** Efecto del extracto íntegro de *H. seemanii* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos en experimentos de tolerancia a la glucosa (1 g/kg)

Muestra	Dosis mg/Kg	Glucemia mg/dL					
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
<b>Vehículo</b>	--	97±14.1	172±26.8(76)	106±20(27)	91±11.3(5.8)	85±6(4.4)	78±5.9(-17)
<b>GLB</b>	10	91±14.8	145±23.7(58)	78±7.6(4.2)	66±6.9(-19)	55±6.2(-29)	51±5.5(-39)
<i>H. seemanii</i>	100	114±9.5	158±14.7(38)*	131±13(12)	114±11(2.2)	106±9.3(-5.3)	73±5.9(-35)
<i>H. seemanii</i>	500	69±5.3	137±14(106)	113±7.8(73)	100±8.2(46)	87±5.1(32)	65±5(-6.0)

**Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet \*P < 0.05. % de variación de glucemia esta en parentesis**

**Tabla 7.** Efecto del extracto íntegro de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos en experimentos de tolerancia a la sacarosa (1 g/kg)

Muestra	Dosis mg/Kg	Glucemia mg/dL					
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	5 h	3 h
<b>Vehículo</b>	--	166±2.5	193±3.4(16)	157±1.9(-7.7)	158±2.8(-6.9)	157±4.5(-4.9)	124±2.7(-26)
<b>GLB</b>	10	143±6.8	149±13(3.0)	146±6.0(2.3)	137±5.2(-4.2)	139±9.3(-1.0)	137±11(-4.5)
<i>H. seemannii</i>	31.6	151±9.1	174±6.4(18)	141±6.7(-4.0)	133±4.5(-8.7)	138±6.0(-5.5)	120±8.3(-19)
<i>H. seemannii</i>	56.2	173±9.9	177±4.3(4.1)*	172±10(2.2)	165±10(-3.8)	156±11(-9.1)	157±5.2(-8.7)
<i>H. seemannii</i>	100	161±3.5	176±4.5(10)	159±5.5(-2.3)	161±11(4.6)	140±2.2(-9.8)	138±10(-10)

**Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet \*P< 0.05. % de variación de glucemia esta en parentesis**

- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 

- **Tabla 8.** Efecto de la infusión de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos en experimentos de tipo agudo.

Muestra	Dosis mg/Kg	Glucemia mg/dL					
		0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
<b>Vehículo</b>	--	158±8.1	194±8.8(23)	148±7.6(-5.6)	144±8.3(-8.8)	133±7.0(-15)	115±7.0(-26)
<b>Gliben</b>	10	161±7.2	147±5.1(-8.1)	110±4.5(-31)	117±6.5(-27)	109±10(-32)	96±8.1(-40)
<i>H. seemannii</i>	31.6	148±8.3	168±9.9(14)	128±5.5(-13)	132±4.2(-9.3)	120±2.5(-17)	106±2.7(-27)
<i>H. seemannii</i>	56.2	147±6.0	179±7.4(22)	142±4.1(-2.6)	134±3.1(-8.5)	129±7.0(-11)	116±6.8(-20)
<i>H. seemannii</i>	100	150±6.9	158±8.4(5.9)	124±7.9(-17)	124±9.9(-26)	112±11(-26)	93±9.4(-38)

**Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet \*P < 0.05. % de variación de glucemia esta en parentesis**

- 
- 
-

•  
•  
•  
•  
•  
•  
•

- **Tabla 9.** Efecto de la infusión de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglicémicos en experimentos de tolerancia a la glucosa (1g/Kg) .

Muestra	Dosis mg/Kg	Glucemia mg/dL					
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
<b>Vehículo</b>	--	137±2.6	206±6.4(51)	180±9.5(33)	142±4.6(4.1)	128±5.0(-6.0)	127±2.4(-7.6)
<b>Gliben</b>	10	142±9.6	211±10.1(51)	154±7.3(9.9)	143±5.5(2.9)	133±3.6(-4.6)	124±6.7(-12)
<i>H. seemannii</i>	31.6	149±5.1	210±9.7(41)	182±16(21)	167±9.7(11)	155±12(3.6)	134±8.8(-10)
<i>H. seemannii</i>	56.2	154±8.7	247±26(59)	176±8.5(15)	172±7.1(12)	154±5.8(1.0)	138±5.8(-9.0)
<i>H. seemannii</i>	100	146±2.7	206±13(42)	159±7.1(9.3)	151±7.2(3.6)	144±7.6(-0.9)	122±3.8(-16)

**Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet \*P < 0.05. % de variación de glucemia esta en parentesis**

•  
•  
•



- 
- 
- 
- 
- 
- **Tabla 11.** Efecto de la fracción orgánica de la infusión de *H. seemannii* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos en experimentos de tipo agudo

Muestra	Dosis mg/Kg	Glucemia mg/dL					
		0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
<b>Vehículo</b>	--	142±7.2	130±5.2(-6.7)	124±5.1(-11)	116±9.2(-16)	123±6.0(-12)	104±6.4(-25)
<b>GLB</b>	10	156±6.1	122±6.5(-22)*	109±5.9(-30)*	110±6.0(29)	102±8.9(-34)*	89±6.7(-43)*
<i>H. seemannii</i>	31.6	170±6.6	132±3.3(-21)*	137±6.5(-19)	113±7.9(-33)*	118±8.3(-30)*	105±4.8(-38)*
<i>H. seemannii</i>	56.2	164±7.0	124±3.1(-24)*	129±2.0(-21)*	119±4.5(-26)*	115±3.2(-29)*	106±2.4(-34)*
<i>H. seemannii</i>	100	177±8.3	133±4.7(-24)*	125±3.6(-28)*	102±1.5(-41)*	114±3.1(-34)*	108±5.2(-38)*

**Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet \*P < 0.05. % de variación de glucemia esta en parentesis**

- 
- 
-





- **Tabla 14.** Efecto del extracto de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos en experimentos de tipo agudo

Muestra	Dosis mg/kg	Glucemia mg/dL					
		0h	1.5h	3h	5h	7h	9h
<b>Vehículo</b>		145±4	118±5.1(-18)	109±7.6(-24)	102.5± (-29)	106±4.3(-26)	97±8.7(-32)
<b>GLB</b>	10	160±4.4	133±5.1(-16)	114±8.3(-28)	96±6(-39)	117±5.7(-26)	114±4.1(-28)
<i>A cristata</i>	31.6	138±7.7	119±6.4(-14)	106±4(-22)	104±6.2(-24)	94±6(-31)	81±2.4(-40)
<i>A cristata</i>	56.2	157±5.4	139±7(-11)	138±7(-11)	137±9(-11)	125±6.4(-19)	110±8(-28)
<i>A cristata</i>	100	144±6.3	145±5.3(0.9)	135±9(-6.4)	128±10(-11)	139±9(-3)	103±7(-28)

**Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet \*P < 0.05.% variación de glucemia esta en paréntesis**

•  
•  
•  
•  
•

- **Tabla 15.** Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos en experimentos de tolerancia a la glucosa (1 g/kg)

•

•

Muestra	Dosis mg/kg	Glucemia mg/dL				
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
<b>Vehículo</b>	-	97±14	172±27(76)	106±20(27)	91±11(6)	85±6(-4.4)
<b>GLB</b>	10	91±15	145±24(58)*	78±7(4)	66±7(-18)	55±6(-29)
<i>A.cristata</i>	56.2	109±1	152±26(36)*	106±11(-2)*	87±8(-18)	86±14(-22)
	2					
<i>A. cristata</i>	100	93±5	135±8(44)*	112±6(21)	90±5(-3.3)	74±6(-21)

**Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet \*P < 0.05.% variación de glucemia esta en paréntesis**



•  
•  
•  
•  
•  
•  
•

- **Tabla 17.** Efecto del extracto íntegro de *A. cristata* sobre los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos en experimentos de tolerancia a la maltosa (3 g/kg)

•  
•  
•  
•  
•  
•  
•  
•  
•  
•  
•  
•

Muestra	Dosis mg/kg	Glucemia mg/dL				
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
<b>Vehículo</b>	--	142±7	205±8(45)	160±5(14)	143±5(1)	135±7(-5)
<b>Acarbosa</b>	5	154±2	186±16(20)	163±9(6)	149±8(-4)	142±8(-8)
<i>A. cristata</i>	31.6	160±6	179±16(10)*	153±9(-4)*	139±9(-13)*	135±4(-15)*
<i>A. cristata</i>	56.2	131±5	174±11(33)	143±7(9)*	144±6(10)	123±6(-6)
<i>A. cristata</i>	100	151±8	204±18(34)	151±8(0.4)*	146±7(-2)	132±11(-13)

**Cada punto es la media ± E.E.M. de n = 6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet \*P < 0.05.% variación de glucemia esta en paréntesis**

## CONGRESOS

6 Reunión Internacional de Investigación en productos Naturales, CINVESTAV IPN, Irapuato Guanajuato 21 al 23 de Octubre , 2009. Modalidad Cartel. **“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIHIPERGLUCEMICA DE *Hydrangea seemanii* L. Riley”** Brindis, Fernando; Bye, Robert. y Mata, Rachel

51 reunión anual de la American Society of Pharmacognosy en conjunto con la Phytochemical Society of North America, Julio 10 - 14, 2010, Saint Petersburg Beach, FL. Modalidad Cartel **“COMPOUNDS FROM *LIGUSTICUM PORTERI*, NEW  $\alpha$ -GLUCOSIDASE INHIBITOR.”** Fernando Brindis, Martin González and Rachel Mata, y **“(Z)-3-BUTILIDENEPHFHTÁLIDE FROM *LIGUSTICUM PORTERI*, AN  $\alpha$ -GLUCOSIDASE INHIBITOR.”** Fernando Brindis, Martin González-Andrade, Rogelio Rodríguez-Sotres and Rachel Mata

QumiUNAM 2010 Auditorio Alfonso Caso, Universidad Nacional Autónoma de México, Noviembre 24-26 , 2010. Modalidad Cartel. **“Z-3-BUTILIDENEPHFHTÁLIDE FROM *LIGUSTICUM PORTERI*, AN  $\alpha$ -GLUCOSIDASE INHIBITOR.”** Fernando Brindis, Martin González-Andrade, Rogelio Rodríguez-Sotres and Rachel Mata.

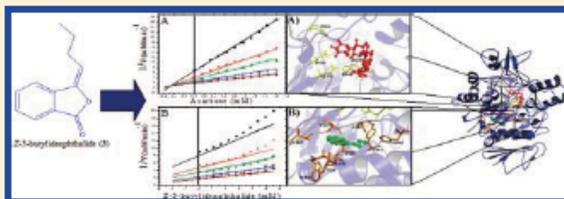
## (Z)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor

Fernando Brindis,<sup>†§</sup> Rogelio Rodríguez,<sup>†</sup> Robert Bye,<sup>‡</sup> Martín González-Andrade,<sup>†</sup> and Rachel Mata<sup>\*†</sup>

<sup>†</sup>Facultad de Química and <sup>‡</sup>Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** An extract from the roots of *Ligusticum porteri*, orally administered to groups of normal and diabetic mice, showed significant hypoglycemic and antihyperglycemic effects. Experimental type-II DM was achieved by treating mice with streptozotocin 15 min after an injection of  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide. (Z)-6,6',7,3'-Diligustilide (1), (Z)-ligustilide (2), 3-(Z)-butylidenephthalide (3), myristicin (4), and ferulic acid (5) were isolated from the active extract. When tested In Vivo, compounds 1–3 showed antihyperglycemic activity, with 3 being the most active. Compound 3 (56.2 mg/kg) decreased blood glucose levels in NAD-STZ-diabetic mice after an oral sucrose load, suggesting that its antihyperglycemic effect is due to inhibition of  $\alpha$ -glucosidase at the intestinal level. Furthermore, 3 inhibited the activity of yeast- $\alpha$ -glucosidase (IC<sub>50</sub> 2.35 mM) in a noncompetitive fashion with a K<sub>i</sub> of 4.86 mM. Docking analysis predicted that 3 binds to the enzyme in a pocket close to the catalytic site, but different from that for acarbose, with a K<sub>i</sub> of 11.48 mM. Compounds 1 and 2 did not affect  $\alpha$ -glucosidase In Vivo, but altered glucose absorption by a mechanism yet to be determined. The stimulatory effect of 5 on insulin secretion, present in high amounts in the extract, has been demonstrated in previous investigations. The present study provides scientific support of the use of *L. porteri* in Mexican folk medicine for the treatment of diabetes.



Type-II diabetes mellitus (DM) is a chronic disease associated with abnormally high blood glucose levels (hyperglycemia) due to defects in insulin secretion, or action, or both. Hyperglycemia provokes protein glycation, which cause tissue damage and devastating complications including heart and peripheral vascular complaints, retinopathy, nephropathy, and neuropathy.<sup>1,2</sup>

According to the World Health Organization, at least 2.8% of the world population suffered from type-II DM in 2000. The incidence of this illness is increasing rapidly, and it is estimated that by 2030 this figure will almost double. Type-II DM occurs throughout the world, but is more common in developed countries. The greatest increase in prevalence is, however, expected to occur in developing countries, where most patients will probably be found by 2030.<sup>1</sup>

There is currently no cure for diabetes, but the condition can be managed so that patients can live a relatively normal life. Treatment of diabetes focuses on two goals: keeping blood glucose within the normal range, thus preventing the development of long-term effects, and changes in diabetic patients' lifestyle. Oral medications are available to lower blood glucose in type-II diabetics, but most of these products possess side effects after prolonged use.<sup>3</sup> In consequence, the search for new therapeutic agents for treating type-II DM, including plants used in folk medicine, has increased notably in recent years.<sup>4</sup>

Mexico is rich in medicinal plants highly prized by the population for the treatment of diabetes, and according to a recent review, there are about 306 species from 235 genera and 93

families used as hypoglycemic agents. *Ligusticum porteri* Coult. & Rose (Apiaceae) is one of these.<sup>5</sup> Roots and leaves from this herb, commonly referred to as "osha", Porter's licorice-root, or "chuchupate", are employed to treat inflammatory, respiratory, gastrointestinal, and infectious complaints.<sup>5–7</sup> More recently, its use as an antidiabetic drug has been described.<sup>4</sup> The essential oil (100  $\mu$ g/mL) prepared from the roots increased the antimicrobial activity of norfloxacin against a norfloxacin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*.<sup>8</sup> Ethanolic and aqueous extracts did not affect the growth of human MCF-7/AZ breast or HCT8/E11 colon cancer cells.<sup>9</sup> A CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (1:1) extract of roots of *L. porteri* exhibited a significant antinociceptive effect, as detected by the writhing test in mice.<sup>10</sup> On the other hand, toxicity studies of the same extract according to the Lorke<sup>11</sup> and Ames<sup>12</sup> procedures revealed that the plant was devoid of genotoxic effects and allowed calculation of a medium lethal dose (LD<sub>50</sub>) of 1 g/kg for mice.<sup>13</sup>

Chemical investigation of *L. porteri* led to the isolation and identification of secondary metabolites such as phenylpropanoids, terpenoids, and several phthalides including (Z)-6,6',7,3'-diligustilide (1), (Z)-ligustilide (2), and (Z)-3-butylidenephthalide (3).<sup>14–19</sup>

**Special Issue:** Special Issue in Honor of Koji Nakanishi

**Received:** July 2, 2010

**Published:** September 29, 2010

Table 1. Effect of Compound 3 and Crude Extract of the Roots of *L. porteri* on Blood Glucose Levels in STZ-Diabetic Mice after an Oral Load of Sucrose (2 g/kg)<sup>a</sup>

test sample	dose, mg/kg	blood glucose concentration				
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
vehicle		155 ± 4.7	236 ± 9.4(56)	169 ± 14.0(11.4)	163 ± 4.9(6.1)	145 ± 6.0(-4.3)
acarbose	5	153 ± 7.4	152 ± 8.3(-0.4) <sup>b</sup>	157 ± 7.9(0.5) <sup>b</sup>	159 ± 6.5(6.2)	158 ± 6.3(6.8)
extract	100	143 ± 3.7	194 ± 6.8(35) <sup>b</sup>	173 ± 2.1(21)	170 ± 6.0(19)	161 ± 3.9(12)
3	10	152 ± 8.7	214 ± 12.0(41)	180 ± 13.8(19)	173 ± 11.9(16)	163 ± 15.4(6.7)
3	56.2	149 ± 5.0	184 ± 7.3(23) <sup>b</sup>	161 ± 6.1(7.6)	153 ± 6.9(2.5)	159 ± 6.8(6.4)

<sup>a</sup> Each value is the mean ± SEM for six mice in each group. Percent variations of glycemia are in parentheses. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t* test for comparison with respect to control group.

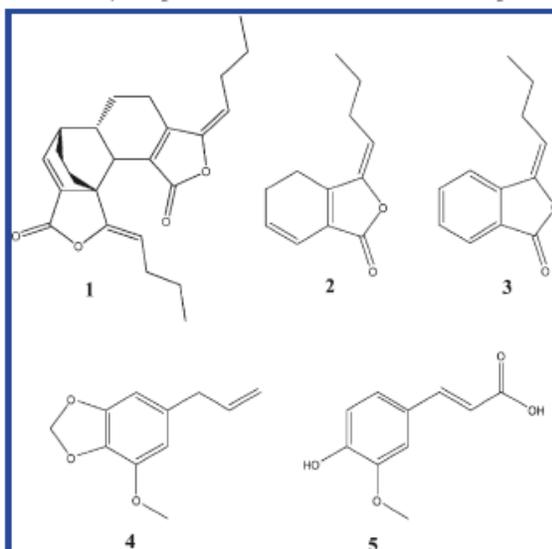
Since the pharmacological investigation of plants used in folk medicine could lead to the discovery of new antidiabetic agents and/or to the proposal of therapeutic alternatives for correcting impaired glucose homeostasis, the objectives of the present study were to ascertain if *L. porteri* had blood glucose lowering activity and to identify new  $\alpha$ -glucosidase inhibitors that could effectively control postprandial glucose levels. Such control has been shown to be essential in preventing the progress of impaired glucose tolerance toward type-II DM by decreasing the incidence of hyperglycemia.

## RESULTS AND DISCUSSION

The use of *L. porteri* in Mexican folk medicine prompted us to determine its efficacy as an antidiabetic agent using well-known animal models. First, an organic extract (56.2, 100, and 316 mg/kg) of the roots was tested using the oral glucose tolerance test (OGTT) in two sets of animals: normal and diabetic. Experimental type-II DM was achieved by treating mice with streptozotocin (STZ, 100 mg/kg) 15 min after an injection of  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD, 40 mg/kg).<sup>20</sup> This preliminary treatment with NAD provokes partial protection against the cytotoxic action of STZ by scavenging free radicals and causes only minor damage to pancreatic  $\beta$ -cell mass, creating a diabetic syndrome close to type-II DM. This model has recently proven to be a valuable tool for investigation of new antidiabetic agents.<sup>20</sup> In normal mice, the crude extract (Table S1, Supporting Information) did not affect the postprandial peak at all doses tested, but when assessed in NAD-STZ-diabetic mice, a significant decrease ( $p < 0.05$ ) of the postprandial peak was observed (Figure S1 and Table S2, Supporting Information). The glucose-lowering effect (~45% at all doses tested) was noticed after 30 min and persisted throughout the experiment, suggesting that the extract was not only antihyperglycemic but also hypoglycemic. Next, in order to confirm the hypoglycemic action of the extract, its acute effect was evaluated in normal (Table S3, Supporting Information) and diabetic animals (Table S4, Supporting Information). The results revealed that the extract (56.2, 100, and 316 mg/kg) caused significant decreases in blood glucose levels only in NAD-STZ-diabetic mice when compared with vehicle-treated groups ( $p < 0.05$ ). The effect of the extract was attained after 1.5 h and was maintained all through the experiment; in the case of glybenclamide (Gly), used as positive control, the initial effect was observed after 3 h of treatment and lasted throughout the experiment. Furthermore, the action of the lowest dose of extract tested was comparable to that of Gly. Finally, an oral sucrose tolerance test (OSTT), both in normal (Table S5,

Supporting Information) and diabetic (Table 1) mice, was carried out. This test is usually performed to evaluate if the antihyperglycemic action of a drug involves inhibition of intestinal  $\alpha$ -glucosidase; this enzyme reduces the rate of digestion of carbohydrates by preventing their immediate breakdown into monosaccharides, which then would be absorbed quickly into the bloodstream. Slowing the absorption of carbohydrates gives the  $\beta$ -cells in the pancreas more time to secrete adequate insulin to cover the meal.<sup>21</sup> The extract (31.6 and 56.2 mg/kg) lowered glucose levels in both diabetic and normal mice, revealing that inhibition of  $\alpha$ -glucosidase was mediating the observed antihyperglycemic effect. The activity was compared with that of acarbose (5 mg/kg), a natural  $\alpha$ -glucosidase inhibitor currently used to control blood glucose levels.

In order to determine the antidiabetic principle(s) of the plant, the active extract was subjected to chromatographic fractionation to yield compounds 1–5. Phthalides 1–3 were identified by comparison of their spectroscopic and spectrometric data with those described previously,<sup>16,22,23</sup> and compounds 4 and 5 were identified by comparison with commercial authentic samples.



In the OGTT with normal mice, administration of compounds 1 (31.2 and 56.2 mg/kg) and 3 (10 and 20 mg/kg) displayed significant ( $p < 0.05$ ) antihyperglycemic activity, provoking a decrease of the postprandial peak in comparison with the vehicle, whereas 2 (10 and 20 mg/kg), the most abundant

Table 2. Effect of Compounds 1–3 from the Roots of *L. porteri* on Blood Glucose Levels in Normal Mice after an Oral Load of Glucose (1 g/kg)<sup>a</sup>

test sample	dose mg/kg	blood glucose concentration				
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
vehicle		108 ± 5.3	172 ± 10.6(59)	109 ± 15.8(1.5)	110 ± 13.2(2.5)	94 ± 7.7(−12)
Gly	10	121 ± 7.0	71 ± 7.1(−42) <sup>b</sup>	43 ± 8.0(−65) <sup>b</sup>	37 ± 3.5(−69) <sup>b</sup>	39 ± 6.2(−68) <sup>b</sup>
1	31.2	93 ± 6.8	97 ± 8.3(3.8) <sup>b</sup>	66 ± 9.5(−28) <sup>b</sup>	61 ± 8.9(−35) <sup>b</sup>	46 ± 8.1(−50) <sup>b</sup>
1	56.2	95 ± 4.3	135 ± 8.7(41) <sup>b</sup>	92 ± 8.8(−3.8)	84 ± 13.1(−13) <sup>b</sup>	69 ± 9.0(−27) <sup>b</sup>
2	10	109 ± 2.9	151 ± 3.0(42)	130 ± 5.1(25)	113 ± 1.8(7)	96 ± 1.7(−8)
2	20	134 ± 4.9	187 ± 10.0(40)	150 ± 3.6(14)	126 ± 5.6(−3.5)	109 ± 6.9(−16)
3	10	122 ± 4.0	110 ± 10(−9) <sup>b</sup>	93 ± 6.9(−24) <sup>b</sup>	70 ± 10(−41) <sup>b</sup>	71 ± 9.4(−42) <sup>b</sup>
3	20	129 ± 8.6	153 ± 3.0(20) <sup>b</sup>	117 ± 3.7(−6.9)	103 ± 2.6(−18) <sup>b</sup>	98 ± 7.3(−23) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Each value is the mean ± SEM for six mice in each group. Percent variations of glycemia are in parentheses. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t* test for comparison with respect to control group.

Table 3. Effect of Compounds 2 and 3 from Roots of *L. porteri* on Blood Glucose Levels in STZ-Diabetic Mice after an Oral Load of Glucose (1 g/kg)<sup>a</sup>

test sample	dose mg/kg	blood glucose concentration				
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
vehicle		218 ± 50.5	320 ± 59.3(51.9)	229 ± 39.0(10.3)	217 ± 49.5( $5 \times 10^{-3}$ )	193 ± 49.4(−12.9)
Gly	10	163 ± 16.4	250 ± 31.1(42)	182 ± 27.7(3.8)	147 ± 17.6(−10)	130 ± 19.0(−21.5)
2	10	172 ± 6.0	192 ± 5.4(13) <sup>b</sup>	146 ± 6.0(−14) <sup>b</sup>	138 ± 6.7(−19) <sup>b</sup>	143 ± 8.6(−15.6)
2	31.2	185 ± 10.5	217 ± 14.2(17) <sup>b</sup>	170 ± 7.0(−6.3) <sup>b</sup>	160 ± 16.6(−12) <sup>b</sup>	165 ± 14.0(−10.0)
2	56.2	149 ± 1.6	186 ± 2.6(25) <sup>b</sup>	173 ± 2.1(17.1)	151 ± 2.2(2.1)	157 ± 1.0(6.5)
3	10	225 ± 15.4	295.6 ± 17.4(35)	229 ± 16.6(3.5)	214 ± 12.4(1.5)	206 ± 15.8(−7.4)
3	31.2	284 ± 52.1	356 ± 63.7(27) <sup>b</sup>	292 ± 53.1(3.3)	290 ± 58.3(−0.3)	259 ± 48.4(−9.1)
3	56.2	429 ± 59.4	467 ± 52.8(12) <sup>b</sup>	413 ± 62.3(−5.2)	387 ± 62.4(−12)	352 ± 62.1(−21.7)

<sup>a</sup> Each value is the mean ± SEM for six mice in each group. Percent variations of glycemia are in parentheses. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t* test for comparison with respect to control group.

Table 4. Effect of 1 from the Roots of *L. porteri* on Blood Glucose Levels in STZ-Diabetic Mice after an Oral Load of Glucose (1 g/kg)<sup>a</sup>

test sample	dose mg/kg	blood glucose concentration				
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
vehicle		218.5 ± 50.5	320 ± 59.3(51.9)	229.8 ± 39.0(10)	217 ± 49.5(0.005)	193 ± 49.4(−13)
Gly	10	163.5 ± 16.4	250.8 ± 31.1(42)	182 ± 27.7(3.8)	147.5 ± 17.6(−10)	130.6 ± 19.0(−21)
1	10	330.1 ± 77.0	391.6 ± 64.8(32)	331.1 ± 67.1(5.7)	334.6 ± 68.0(5.7)	304.1 ± 65.2(−5.5)
1	31.2	176.1 ± 11.5	248.1 ± 13.7(44)	218.5 ± 8.9(32)	205.3 ± 9.4(23)	179.1 ± 7.5(8.8)
1	56.2	208 ± 18.4	344 ± 50.2(57)	320 ± 38.1(52)	265 ± 31.7(25)	237 ± 28.2(8.9)

<sup>a</sup> Each value is the mean ± SEM for six mice in each group. Percent variations of glycemia are in parentheses.  $p < 0.05$  significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t* test for comparison with respect to control group.

compound in the organic extract, did not affect blood glucose levels after the glucose challenge (see Table 2). In NAD-STZ-diabetic mice, compound 2 (10, 31.2, and 56.2 mg/kg) induced a significant ( $p < 0.05$ ) and dose-dependent decrease of the postprandial peak, suggesting that its mode of action did not involve inhibition of glucose absorption, but that it had a different mechanism yet to be demonstrated (Table 3). In contrast, compound 1 (10, 31.2, and 56.2 mg/kg), which affected the glucose level in normal mice, did not lower the postprandial peak in NAD-STZ-diabetic mice, indicating that its effect is mediated by an insulin-dependent mechanism. Finally, compound 3 (10, 31.2, and

56.2 mg/kg) inhibited (Table 4) the postprandial peak after the glucose load in NAD-STZ-diabetic mice at the two highest doses tested. The latter result was consistent with compound 3 being an inhibitor of glucose absorption. Since compound 3 was the only one lowering the postprandial peak in both normal and diabetic animals, its effect on glucose absorption *In Vivo* using the OSTT was investigated. The assay was performed only in NAD-STZ-diabetic mice due to scarcity of sample. Thus, administration of 3-(*Z*)-butylideneephthalide (3) (10 and 56.2 mg/kg) to NAD-STZ-diabetic mice provoked a decrement of 50% of the postprandial peak ( $p < 0.05$ ) at a dose of 56.2 mg/kg (Figure 1).

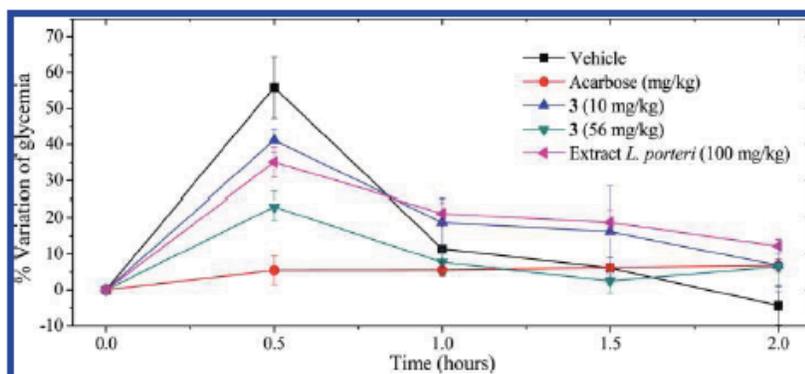


Figure 1. Effects of the crude extract of the roots of *L. porteri* and compound 3 on blood glucose levels in NAD-STZ-diabetic mice using the OST test. Each value is the mean  $\pm$  SEM for 6 rats in each group. \* $p < 0.05$  significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for comparison with respect to negative control values at the same time.

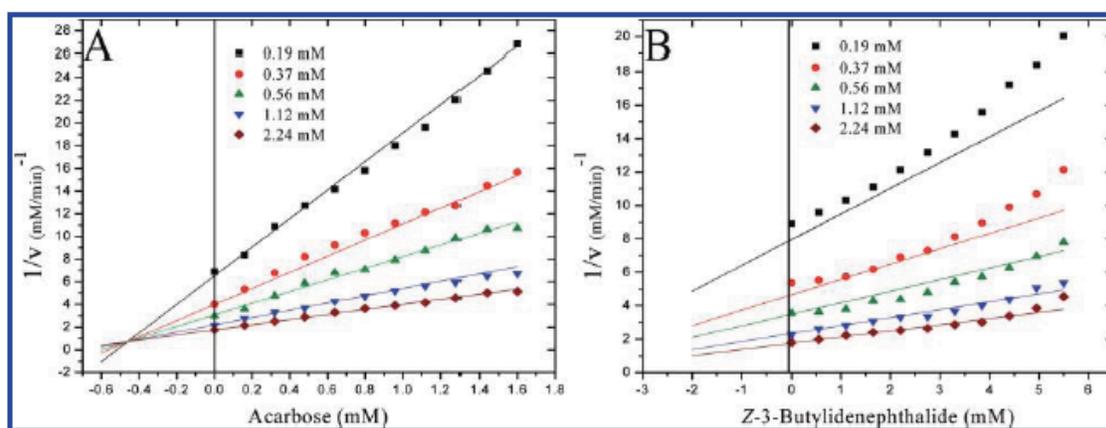


Figure 2. Plots of  $\alpha$ -glucosidase inhibition at different concentrations of substrate: (A) acarbose; (B) (Z)-3-butylidenecephthalide (3).

These results clearly revealed that compound 3 is able to inhibit  $\alpha$ -glucosidase at the intestinal level with consequent decrease of the postprandial peak in NAD-STZ-diabetic mice.

Compounds 4 and 5 were not tested because their antidiabetic properties *In Vivo* and *in vitro* have been previously demonstrated. Ferulic acid (5) at a concentration of 25  $\mu$ M causes a 2.98-fold increase in 2-deoxyglucose transport into the L6 myotubes; its performance was comparable to commercial oral hypoglycemic drugs.<sup>24</sup> Expression of GLUT4 and PI3K transcripts was also elevated in ferulic acid (5)-treated cells. In addition, 5 possesses stimulatory effects on insulin secretion *in vitro* in a concentration-dependent manner.<sup>25</sup> In other tests, ferulic acid (5) administered orally at low dosage (0.1% or 0.01%) suppressed hyperglycemia associated with induced diabetes in the model of KK-Ay mice.<sup>26</sup> Finally, ferulic acid (5) was the most potent insulin-secreting agent among several cinnamic acid derivatives, and its *in vivo* administration at a dose of 5 mg/kg significantly decreased plasma glucose and increased insulin concentration in normal rats.<sup>27</sup>

Myristicin (4) and some analogues from *Myristica fragrans* fruit are claimed as adiponectin production stimulators and health foods for prevention and treatment of type-II diabetes, hyperlipidemia, hypertension, obesity, and arteriosclerosis.<sup>28</sup>

The effects of compounds 1–5 on the activity of  $\alpha$ -glucosidase was also tested *in vitro* according to a well-known procedure

using *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG) as substrate and yeast  $\alpha$ -glucosidase.<sup>29</sup> The results were also compared with those of acarbose (Figure 2), revealing that 3 inhibited the activity of yeast  $\alpha$ -glucosidase in a concentration-dependent manner. The  $IC_{50}$  calculated was 2.35 mM (acarbose = 0.42 mM). As expected from the *In Vivo* experiments, compounds 1 and 2 were not  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and neither were compounds 4 and 5.

In order to obtain further evidence of the nature of inhibition exerted by compound 3, a kinetic analysis of the enzyme inhibition activity was assessed using different amounts of compound 3 and acarbose. The results showed that 3 inhibited activity of the enzyme with a  $K_i$  of 4.86 mM vs  $K_i$  of 0.46 mM for acarbose. Dixon plots<sup>30</sup> for  $\alpha$ -glucosidase from yeast in the presence of acarbose and 3-(Z)-butylidenecephthalide (3) at different concentrations (Figure 2) revealed typical curves for competitive and mixed-type noncompetitive inhibitors, respectively. According to Figure 2, the increment in acarbose concentration resulted in lowering the slope of the lines, in agreement with a reversible inhibitor. On the other hand, compound 3 displayed an inhibition profile for a mixed-type inhibitor since the corresponding graphic showed a series of lines intersecting to the left of the vertical and above the horizontal axes.<sup>28</sup>

Altogether these results suggest that compound 3 does not bind to the same catalytic site as acarbose in  $\alpha$ -glucosidase.

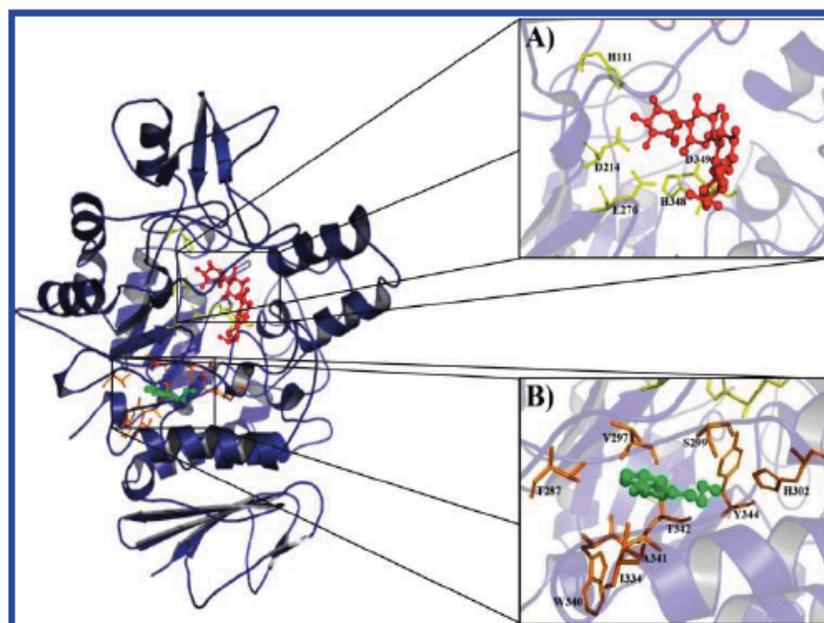


Figure 3. Docking results using the structural model of the  $\alpha$ -glucosidase: (A) site of binding of acarbose, which comprises the catalytic site of the enzyme; (B) binding conformation of (Z)-3-butylidenephthalide (3).

Indeed, the docking analysis predicts that 3 binds to the enzyme in a different pocket than acarbose; the binding site for 3 is close to the catalytic site and is formed by residues Ser299, Thr287, Val297, Trp340, His302, Ala341, Thr342, Ile334, and Tyr344 (Figure 3), with a predicted  $K_i$  of 11.48  $\mu$ M. As indicated in the Experimental Section, the docking was performed with a model built by homology with *Bacillus cereus* (1UOK.pdb)  $\alpha$ -glucosidase, which possessed the highest sequence identity (38.9%) with  $\alpha$ -glucosidase from yeast,<sup>31</sup> thus conserving the catalytic residues in most  $\alpha$ -glucosidases (His111, Asp205, Glu276, His348, and Asp349). The docking study was validated with acarbose.

In conclusion, the information generated hitherto indicates that *L. porteri* extract and compounds have potent antihyperglycemic effect. One of its metabolites, (Z)-3-butylidenephthalide (3), displayed significant antihyperglycemic effect by inhibiting the activity of intestinal and yeast  $\alpha$ -glucosidases In Vivo and in vitro. According to the in vitro studies, this compound acts as a noncompetitive, therefore allosteric, inhibitor of this important enzyme. This type of inhibitor has several advantages over competitive ones since their effects lasted for longer periods of time.<sup>32</sup> The related compounds, (Z)-6,6',7,3'-diligustilide (1) and (Z)-ligustilide (2), however, did not affect  $\alpha$ -glucosidases In Vivo but affected glucose absorption by a mechanism yet to be determined. Finally, ferulic acid (5), present in high amounts in the extract, has demonstrated in previous investigations noted stimulatory effects on insulin secretion In Vivo and in vitro. Therefore, the extract of *L. porteri* represents a good phytotherapeutic agent with active principles having different modes of action. In addition, (Z)-3-butylidenephthalide (3) is a new  $\alpha$ -glucosidase inhibitor potentially useful for the development of new anti-diabetic, antiobesity, and antiviral agents. The present study provides scientific support of the use of *L. porteri* in Mexican folk medicine for the treatment of diabetes.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Plant Material and Extract.** The roots of *L. porteri* were collected in Basigochi (Chihuahua, Mexico) in October 2003. A voucher specimen (No. 31733) is deposited at the National Herbarium (MEXU), Mexico City. The air-dried and pulverized (250 g) roots were macerated with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1; 5 L  $\times$  2) at room temperature during 7 days, with subsequent evaporation of the solvent in vacuo to yield 87.5 g of a yellow residue.

**Isolation of Compounds 1–5.** The extract (87.5 g) was fractionated by column chromatography on silica gel (1 kg, 70–230 mesh, Merck) eluting with hexane, hexane with increasing amounts of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8:2  $\rightarrow$  2:8),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (9:1) to yield 10 primary fractions. Fraction 3 (3 g), eluted with hexane, was further separated by TLC on silica gel (hexane- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 8:2) to yield 400 mg of myristicin (4). Fraction 4 (3.5 g), eluted with hexane- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1), contained the major components (Z)-6,6',7,3'-diligustilide (1), (Z)-ligustilide (2), and (Z)-3-butylidenephthalide (3). Compounds 1–3 were separated by extensive TLC on silica gel (hexane- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1:1) to yield 5.5, 0.5, and 0.6 g, respectively. HPLC-UV analysis revealed the purity of the components [silica gel Hibar RT LiChrospher 100 RP C-18, 5  $\mu$ m, 4  $\times$  250 mm, Merck; ACN- $\text{H}_2\text{O}$  (0.5% AcOH) 20:80  $\rightarrow$  100:0, 0–40 min; flow rate 1 mL/min; detecting at 260 and 280 nm]. The structures of compounds 1–3 were characterized as (Z)-6,6',7,3'-diligustilide, (Z)-ligustilide, and (Z)-3-butylidenephthalide by spectroscopic and spectrometric analyses and comparison with literature data.<sup>16,22</sup> Finally, 7.5 g of ferulic acid (5) precipitated from fraction 9 (20 g), eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , which was identical to a reference sample.

**Experimental Animals.** Male ICR normoglycemic mice, weighing 20–25 g, 20–25 days old, 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. Furthermore, clearance for conducting the studies was obtained from the Ethics Committee for the Use of Animals in Pharmacological and

Toxicological Testing, Facultad de Química, UNAM. For the pharmacological studies, groups of six animals were used. All doses are in mg/kg of body weight. The animals were housed in groups of eight under standard laboratory conditions (12 h light–dark cycle under controlled temperature,  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and maintained on a standard pellet diet and water ad libitum.<sup>33</sup>

**Preparation of Test Samples.** All samples were suspended in 0.05% Tween 80 in saline solution and administered by intragastrical route. Gly (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) was used as a hypoglycemic model drug. Acarbose (Sigma-Aldrich) was used as an antihyperglycemic drug. Glucose and sucrose (Sigma-Aldrich) were used as carbohydrates to carry out the glucose and sucrose tolerance tests. Control group mice received only the vehicle (0.05% Tween 80 in saline solution) in the same volume (0.2 mL of vehicle/10 g of body weight) by the same route.<sup>33</sup>

**Induction of Experimental Diabetes.** Diabetes mellitus type-II was induced by a single intraperitoneal injection of freshly prepared STZ (100 mg/kg, Sigma-Aldrich) dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5, in a volume of 10 mL/kg, 15 min after an injection of NAD (40 mg/kg, Sigma-Aldrich) dissolved in distilled water, in a volume of 10 mL/kg. After 7 days of STZ administration, blood glucose levels of each mouse were determined. Mice with blood glucose levels higher than 140 mg/dL were considered diabetic and included in the study.<sup>33</sup>

**Collection of Blood Samples and Determination of Blood Glucose Levels.** Blood samples were collected from the caudal vein by means of a small incision at the end of the tail. Blood glucose levels (mg/dL) were estimated by the enzymatic glucose oxidase method using a commercial glucometer (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, CA, USA). The percentage variation of glycemia for each group was calculated with respect to the initial (0 h) level, according to the following equation, where  $G_i$  is initial glycemia value and  $G_t$  is the glycemia value after treatment administration:

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

**Acute Hypoglycemic Assay in Normal and Diabetic Animals.** Normal or NAD-STZ-diabetic mice, placed in acrylic boxes in groups of six animals, were deprived of food for 12 h before experimentation, but allowed free access to tap water throughout. The crude extract of *L. porteri* was freshly prepared before experimentation and tested at doses of 56.2, 100, and 316.2 mg/kg. Blood samples were collected at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h after treatment administration. Gly was used as positive control.<sup>33</sup>

**Oral Glucose Tolerance Test (OGTT).** Normal or NAD-STZ-diabetic mice were placed in groups of six animals each. Mice were put on fast for 12 h before the experiment, with water ad libitum. In the normal and diabetic animals, the crude extract of *L. porteri* was tested at doses of 56.2, 100, and 316 mg/kg. Compound 1 was assayed at doses of 31.2 and 56.2 mg/kg in the case of normal mice, whereas diabetic animals were tested at doses of 10, 31.2, and 56.2 mg/kg. Compounds 2 and 3 were tested at doses of 10 and 20 mg/kg in normal animals, and in diabetic animals they were tested at doses of 10, 31.2, and 56.2 mg/kg. Gly (10 mg/kg) was suspended in the same vehicle. Time 0 min was set before treatment with the extract or compounds; 30 min later a glucose load (1 g/kg) was given to the animals. Blood samples were obtained 30, 60, 90, 120, and 180 min after the carbohydrate load.<sup>33</sup>

**Oral Sucrose Tolerance Test (OSTT).** The assay was performed exactly as described for the OGTT but using sucrose as the carbohydrate. In this experiment only the extract was tested in both normal and diabetic animals. In the case of normal mice the doses were 31.2, 56.2, and 100 mg/kg. For diabetic animals, however, the extract was tested at a single dose of 100 mg/kg. Finally, compound 3 was assayed at doses of 10 and 56.2 mg/kg, but only in diabetic animals. Acarbose was used as positive control.

**Statistical Analysis.** Data are expressed as the means  $\pm$  SEM of the number ( $n = 6$ ) of animals in each group. ANOVA was used to analyze the changes in blood glucose. Dunnett range posthoc comparisons were used to determine the source of significant differences where appropriate;  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant. Sigma Stat software was used for statistical analyses.

**In Vitro  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition Study.** The  $\alpha$ -glucosidase inhibition assay was performed according to Oki et al., with modifications of our own.<sup>29</sup>  $\alpha$ -Glucosidase (EC 3.2.1.20) from baker's yeast was purchased from Sigma-Aldrich. The inhibition was measured spectrophotometrically at pH 7.0 and  $37^\circ\text{C}$  using 0.25 mM *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG) as a substrate and 0.6 units/mL of enzyme, in 100 mM sodium phosphate buffer. Acarbose was dissolved in phosphate buffer, and serial dilutions from 0.1 to 1.0 mg/mL were made and used as positive control. The increments in absorption at 405 nm due to the hydrolysis of pNPG by  $\alpha$ -glucosidase were determined spectrophotometrically on a microplate reader (Bio Instruments Incorporated, USA). A 10  $\mu\text{L}$  amount of acarbose or 3-(*Z*)-butylidenephthalide (3) solution was incubated for 5 min with 20  $\mu\text{L}$  of enzyme stock. After incubation, 10  $\mu\text{L}$  of substrate (5 mM) was added and further incubated for 35 min at  $30^\circ\text{C}$ . The concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) was calculated by regression analysis, using the following equation, where  $v$  is the percentage of inhibition,  $A_{100}$  is the maximum inhibition,  $I$  is the inhibitor concentration,  $\text{IC}_{50}$  is the concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50%, and  $s$  is the cooperative degree:

$$v = \frac{A_{100}}{1 + (I/\text{IC}_{50})^s}$$

**Kinetics of Enzyme Inhibition.** Kinetic parameters were determined using the Dixon plot method at increasing concentrations of substrates and inhibitors, plotting slopes versus the reciprocal of the substrate concentration. All results are expressed as the mean of at least six experiments  $\pm$  EM. Kinetic parameters such as  $V_m$ ,  $K_m$ , and  $K_i$  were evaluated using the nonlinear regression method based on the following inhibition equation, where  $v$  is the initial velocity in the absence and presence of the inhibitor,  $s$  and  $I$  respectively are the concentration of substrate and inhibitor,  $V_m$  is the maximum velocity,  $K_m$  is the Michaelis–Menten constant,  $K_i$  is the competitive inhibition constant, and  $K'_i$  is the uncompetitive inhibition constant:

$$v = \frac{V_m S}{K_m(1 + I/K_i) + s(1 + I/K'_i)}$$

**Homology Modeling of Yeast  $\alpha$ -Glucosidase.** Although the X-ray crystal structures of a few bacterial  $\alpha$ -glucosidases have been reported, structural information is still unavailable for most eukaryotic  $\alpha$ -glucosidases commonly used in biological assays, such as that from baker's yeast. Therefore, we carried out homology modeling of  $\alpha$ -glucosidase from baker's yeast to obtain its structure. This homology modeling started with the retrieval of the amino acid sequence of  $\alpha$ -glucosidase MAL12 (EC 3.2.1.20) from baker's yeast that comprises 584 amino acid residues from the UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>). Using the program CPH models (automated neural-network based protein modeling server; <http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>), the structural model was built based on the structure of oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus cereus* (1UOK.pdb),<sup>34</sup> which revealed the highest sequence identity (38.9%) with the target. This model was then optimized geometrically with the program HyperChem 8 release, with the intention of correcting all the links and angles of the model and validated using the ProCheck (stereochemical quality analysis software),<sup>31</sup> Verify-3D (structure evaluation software),<sup>35</sup> and Whatcheck (protein verification tools software)<sup>36</sup> computer programs.

**Docking of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor.** Blind docking was carried out with AutoDock4 software (<http://autodock.scripps.edu/>)<sup>37,38</sup> using the default parameters, except for the number of GA runs (100) and the Lamarckian genetic algorithm with local search and 25 million energy evaluations (Long. Evals.) per run, on a parallel supercomputer of distributed memory; it contains 1368 processors AMD Opteron, around 3 terabytes of memory, and 160 terabytes of storage (<http://www.super.unam.mx/>). The target in each docking run was obtained from homology modeling of  $\alpha$ -glucosidase. The starting conformation of the ligand was an energy-minimized form with geometric optimization using the program HyperChem 8 release. Acarbose and 3-(Z)-butylideneephthalide (3) molecules were first prepared by AutoDockTools 1.5.4 (<http://mglttools.scripps.edu/>), adding polar hydrogen atoms and Kollman charges to  $\alpha$ -glucosidase and computing Gasteiger charges for acarbose and 3-(Z)-butylideneephthalide (3). The protein was held rigid during the docking process while the ligands were allowed to be flexible. The grid box size was  $126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA}$  in the  $x$ ,  $y$ , and  $z$  dimensions, with the center of the grid corresponding to the protein.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

**S** Supporting Information. Figure S1 and the Tables S1–S5 are available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel: 525-556225289. Fax: 525-556225329. E-mail: [rachel@servidor.unam.mx](mailto:rachel@servidor.unam.mx).

### Notes

<sup>§</sup>This paper is taken in part from the Ph.D. thesis of F.B.

## ■ ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by grants from DGAPA-UNAM (IN218110-3) and CONACyT (99395). We thank G. Duarte, M. Guzmán, N. Esturay, M. Gutierrez, I. Rivero, and A. Pérez for their valuable technical assistance. F.B. acknowledges a fellowship from CONACyT; M.G.-A. acknowledges a postdoctoral fellowship by DGAPA-UNAM. We are indebted to Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (DGSCA), UNAM, for providing the resources to carry out computational calculations through the KanBalam System.

## ■ DEDICATION

This paper is dedicated to Dr. Koji Nakanishi from Columbia University for his pioneering work on bioactive natural products.

## ■ REFERENCES

- Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H. *Diabetes Care* 2004, 27, 1047–1053.
- Kerner, W.; Bruckel, J. *Diabetol. Stoffwech.* 2009, 4, S115–S117.
- Crepaldi, G.; Carruba, M.; Comaschi, M.; Del Prato, S.; Frajese, G.; Paolisso, G. *J. Endocrinol. Invest.* 2007, 30, 610–614.
- Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 99, 325–348.
- Bye, R. A. *Econ. Bot.* 1986, 40, 103–124.
- Linares, E.; Bye, R. A., Jr. *J. Ethnopharmacol.* 1987, 19, 153–183.
- Appelt, G. *J. Ethnopharmacol.* 1985, 13, 51–55.
- Cegiela-Carlio, P.; Bessiere, J. M.; David, B.; Mariotte, A. M.; Gibbons, S.; Dijoux-Franca, M. G. *Flavour Fragrance J.* 2005, 20, 671–675.
- Daniels, A. L.; Van Slambrouck, S.; Lee, R. K.; Arguello, T. S.; Browning, J.; Pullin, M. J.; Kornienko, A.; Steelant, W. F. *Oncol. Rep.* 2006, 15, 1327–1331.
- Deciga-Campos, M.; Gonzalez-Trujano, E.; Navarrete, A.; Mata, R. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 2005, 48, 70–72.
- Lorke, D. *Arch. Toxicol.* 1983, 54, 275–287.
- Ames, B. N.; Durston, W. E.; Yamasaki, E.; Lee, F. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1973, 70, 2281–2285.
- Deciga-Campos, M.; Rivero-Cruz, I.; Arriaga-Alba, M.; Castaneda-Corral, G.; Angeles-Lopez, G. E.; Navarrete, A.; Mata, R. *J. Ethnopharmacol.* 2007, 110, 334–342.
- Delgado, G.; Garcia, P. E.; Roldan, R. I.; Bye, R.; Linares, E. *Nat. Prod. Lett.* 1996, 8, 145–150.
- Delgado, G.; Reza-Garduno, R. G.; Rios, M. Y.; Del Rio, F. *Planta Med.* 1992, 58, 570–571.
- Delgado, G.; Rezagarduno, R. G.; Toscano, R. A.; Bye, R.; Linares, E. *Heterocycles* 1988, 27, 1305–1312.
- Gillespie, S. G.; Duszynski, J. N. *Planta Med.* 1998, 64, 392–392.
- Huang, Y.; Pu, F. *Zhongguo Zhong Yao Zhi* 1990, 15, 422–423.
- Zschocke, S.; Liu, J. H.; Stuppner, H.; Bauer, R. *Phytochem. Anal.* 1998, 9, 283–290.
- Masiello, P.; Broca, C.; Gross, R.; Roye, M.; Manteghetti, M.; Hillaire-Buys, D.; Novelli, M.; Ribes, G. *Diabetes* 1998, 47, 224–229.
- Duran, T. A.; Derojas, J. F. *Diabetes* 1973, 22, 318–318.
- Beck, J. J.; Stermitz, F. R. *J. Nat. Prod.* 1995, 58, 1047–1055.
- Gijbels, M. J. M.; Scheffer, J. J. C.; Svendsen, A. B. *Planta Med.* 1982, 44, 207–211.
- Prabhakar, P. K.; Doble, M. *Phytomedicine* 2009, 16, 1119–1126.
- Nomura, E.; Kashiwada, A.; Hosoda, A.; Nakamura, K.; Morishita, H.; Tsuno, T.; Taniguchi, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 3807–3813.
- Ohnishi, M.; Matuo, T.; Tsuno, T.; Hosoda, A.; Nomura, E.; Taniguchi, H.; Sasaki, H.; Morishita, H. *Biofactors* 2004, 21, 315–319.
- Adisakwattana, S.; Moonsan, P.; Yibchok-Anun, S. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 7838–7844.
- Kono, Y.; Yamazaki, Y.; Maruyama, S. JP patent JKXXAF JP 2007261993 A, 2007.
- Oki, T.; Matsui, T.; Osajima, Y. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 550–553.
- Kim, M. J.; Lee, S. B.; Lee, H. S.; Lee, S. Y.; Baek, J. S.; Kim, D.; Moon, T. W.; Robyt, J. F.; Park, K. H. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, 371, 277–283.
- Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. *J. Appl. Crystallogr.* 1993, 26, 283–291.
- Christopoulos, A. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2002, 1, 198–210.
- Cristians, S.; Guerrero-Analco, J. A.; Perez-Vasquez, A.; Palacios-Espinosa, F.; Ciangherotti, C.; Bye, R.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 408–413.
- Watanabe, K.; Hata, Y.; Kizaki, H.; Katsube, Y.; Suzuki, Y. *J. Mol. Biol.* 1997, 269, 142–153.
- Luthy, R.; Bowie, J. U.; Eisenberg, D. *Nature* 1992, 356, 83–85.
- Hooft, R. W.; Vriend, G.; Sander, C.; Abola, E. E. *Nature* 1996, 381, 272.
- Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Bewle, R. K. *J. Comput. Chem.* 1998, 19, 1639–1662.
- Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. *J. Comput. Chem.* 2007, 28, 1145–1152.