



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EFFECTOS HIPOGLUCEMIANTES Y ANTIHIPERGLUCÉMICOS
DE PREPARADOS Y COMPUESTOS DE LA ESPECIE
Brickellia cavanillesii (Cass.) A. Gray (Asteraceae)**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. SONIA MARLEN ESCANDÓN RIVERA

**TUTORA
Dra. Rachel Mata Essayag
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR
Dr. Andrés Navarrete Castro, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
Dr. Manuel Jiménez Estrada, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

MÉXICO, D.F. (AGOSTO) 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

A CONACyT por la beca otorgada (becario 329990) para desarrollar mis estudios de doctorado.

A CONACyT (Proyectos 150966; 99395) y DGAPA (Proyecto IN-212913) por el apoyo económico que permitió la realización del presente trabajo.

A mi comité tutor integrado por los Doctores Andrés Navarrete Castro y Manuel Jiménez Estrada por sus valiosos comentarios y orientación a lo largo del desarrollo del presente trabajo.

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

A los Doctores Robert Bye y Edelmira Linares por proporcionar 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 el registro de los diferentes espectros utilizados para la caracterización de los compuestos aislados.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz y a la Dra. Araceli Pérez Vásquez por su apoyo técnico en el desarrollo de esta tesis; y al Dr. Martín González Andrade, posdoctorante adscrito al Laboratorio 124, por sus enseñanzas para realizar los estudios de acoplamiento molecular y cinética enzimática.

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación, UNAM, por permitir el uso de la súper computadora Kanbalam para realizar los cálculos de docking.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por su gran apoyo, orientación y supervisión constante en el desarrollo de esta tesis.

JURADO

Presidente	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dr. Fernando Calzada Bermejo
Vocal	Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Secretario	Dr. Andrés Navarrete Castro

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

PUBLICACION

α -Glucosidase Inhibitors From *Brickellia Cavanillesii*. *Journal Of Natural Products*; 75: 968-974, 2012. Sonia Escandón-Rivera, Martin González-Andrade, Robert Bye, Edelmira Linares, Andrés Navarrete, y Rachel Mata.

CONGRESOS

Universidad Nacional Autonoma de Mexico. México Df. 2012. Póster “Compuestos Inhibidores de α -Glucosidasas De *Brickellia Cavanillesii*”, QUIMIUNAM.

The International Congress On Natural Products Research New York City, 2012. Póster “6-Hidroxyacetyl-5-Hydroxy-2,2-Dimethyl-2h-Chromene (1), a New α -Glucosidase Inhibitor From *Brickellia Cavanillesii*”.

Natural Products: New Waves Of Innovation 52nd Annual Asp. San Diego 2011. Póster “Calein C, An α -Glucosidase Inhibitor From *Brickellia Cavanillesii*”.

RESUMEN

El presente estudio describe los efectos hipoglucemiantes y antihiperoglucémicos de *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray especie de uso en la medicina tradicional mexicana. Se comprobó que el extracto acuoso es eficaz para disminuir los niveles de glucosa tanto en ayunas como posprandial en ratones diabéticos. Además, este preparado inhibió de manera significativa la actividad de las α -glucosidasas *in vitro*, en congruencia con el efecto antihiperoglucémico encontrado mediante una prueba de tolerancia a la sacarosa *in vivo*. El estudio biodirigido del extracto acuoso de *B. cavanillesii* mediante el ensayo *in vitro* permitió aislar y purificar 13 compuestos que incluyen tres cromenos [6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (**31**) 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (**44**) y 6-acetil-5-hidroxi-2-hidroximetil-2-metil-2*H*-cromeno (**45**)], tres lactonas sesquiterpénicas [caleína A (**46**), caleína C (**47**) y calealactona C (**48**)], cinco flavonoides [quercetina (**43**), acetina (**51**), genkwanina (**52**), camperol (**53**) e isoramnetina (**54**)], el ácido 3,5-dicafeoilquínico (**50**) y una cumarina [herniarina (**49**)]. El cromeno **44** es un producto natural novedoso. La estructura de la caleína C se corroboró mediante un análisis por difracción de rayos-X. Por otra parte, todos los productos aislados se evaluaron *in vitro* contra la enzima α -glucosidasa de levadura; los productos más activos fueron la isoramnetina (**54**), la caleína C (**47**) y el cromeno **44**. Los ensayos de cinética enzimática de estos tres compuestos permitieron determinar que la caleína C (**47**) y la isoramnetina (**54**) se comportan como inhibidores mixtos, en tanto que el cromeno **44** es un inhibidor no competitivo. Los compuestos mayoritarios de *B. cavanillesii* se evaluaron en ensayos de tipo agudo y de tolerancia a la sacarosa. Los resultados de estos ensayos permitieron descubrir los efectos antihiperoglucémicos e hipoglucemiantes del cromeno **31** y las caleínas A y C. Además de los compuestos evaluados *in vivo*, otros productos conocidos aislados de la infusión de *B. cavanillesii* contribuyen con la actividad de inhibición de α -glucosidasas. Los resultados generados se encuentran en armonía con el uso popular de la especie como un agente antidiabético. El descubrimiento de las propiedades hipoglucemiantes y/o antihiperoglucémicas de la planta *B. cavanillesii* y sus compuestos mayoritarios no tiene precedentes en la literatura científica.

ABSTRACT

The present study describes the hypoglycemic and antihyperglycemic effects of *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray, a species widely used in Mexican folk medicine to treat diabetes. An aqueous extract from the aerial parts of the plant, orally administered to normal and diabetic mice, showed significant antihyperglycemic effect. The extract attenuated postprandial hyperglycemia in diabetic mice during oral glucose and sucrose tolerance tests (OGTT and OSTT). Bioassay guided fractionation of the active extract using the α -glucosidase inhibitory assay led to the isolation of several compounds including three chromenes [6-acetyl-5-hydroxy-2,2-dimethyl-2*H*-chromene (**31**), 6-hydroxyacetyl-5-hydroxy-2,2-dimethyl-2*H*-chromene (**44**) and 6-acetyl-5-hydroxy-2-hydroxymethyl-2-methyl-2*H*-chromene (**45**)] three sesquiterpene lactones [caleins A (**46**), C (**47**) and caleactone C (**48**)], several flavonoids [acacetin (**51**), genkwanin (**52**) isorhamnetin (**54**), kaempferol (**53**), and quercetin (**43**)], a coumarin [herniarin (**49**)] and 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (**50**). Chromene **44** is a new chemical entity and was identified by spectral means. The structure of calein C (**47**) was corroborated X-ray diffraction analysis. Moreover, all the isolates were tested *in vitro* against α -glucosidase from yeast; the more active products were isorhamnetine (**54**), calein C (**47**) and chromene **44**. Enzyme kinetic analysis of these compounds revealed that calein C (**47**) and isorhamnetin (**54**) behaved as mixed inhibitors, whereas chromene **44** was a noncompetitive inhibitor. The major compounds of *B. cavanillesii* were next evaluated in using an acute OST tests. The results of these trials have uncovered the hyperglycemic and hypoglycemic effects of chromene **31** and caleins A (**46**) and C (**47**). The other compounds isolated from the aqueous extract might contribute to the activity against yeast α -glucosidase *in vitro* and *in vivo*. Altogether, the results support the popular use of the species as an antidiabetic agent. This work represents the first description of the hypoglycemic and antihyperglycemic properties of the extracts and compounds from *B. cavanillesii*.

INDICE

1. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES.....	1
1.1 GENERALIDADES DE LA DIABETES	1
1.2 PREVALENCIA DE DIABETES EN EL MUNDO	2
1.3 TERAPIAS PARA EL CONTROL DE LOS NIVELES DE GLUCOSA EN PACIENTES CON DIABETES TIPO II	4
1.4 INHIBIDORES DE ALFA-GLUCOSIDASAS	6
1.4.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LAS GLUCOSIDASAS.....	6
1.4.2 INHIBIDORES DE LAS ALFA-GLUCOSIDASAS DE MAYOR USO EN LA TERAPÉUTICA DE LA DIABETES	8
1.4.3 INHIBIDORES DE ALFA-GLUCOSIDASAS DE ORIGEN NATURAL.....	10
1.5 LAS PLANTAS MEDICINALES MEXICANAS COMO FUENTES POTENCIALES DE INHIBIDORES DE ALFA- GLUCOSIDASAS.....	16
1.6 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE <i>BRICKELLIA CAVANILLESII</i>	18
1.6.1 ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y ETNOBOTÁNICOS.....	18
1.6.2 ESTUDIOS CLÍNICOS Y FARMACOLÓGICOS.....	20
1.6.3 ESTUDIOS QUÍMICOS	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GENERAL	28
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	28
4. HIPÓTESIS.....	29
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	30
5.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS, ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS.....	30
5.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES.....	30
5.3 MATERIAL VEGETAL.....	31
5.4 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICO Y ACUOSO DE <i>BRICKELLIA CAVANILLESII</i>	32
5.5 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS.....	32
5.5.1 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA SANGUÍNEA	33
5.5.2 EFECTO AGUDO HIPOGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS Y COMPUESTOS.....	33
5.5.3 EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y SACAROSA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS	34
5.5.4 INDUCCIÓN DE DIABETES TIPO II	34
5.5.5 EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO Y COMPUESTOS PUROS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ALFA- GLUCOSIDASA DE LEVADURA.....	35
5.5.6 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	36
5.5.7 ACOPLAMIENTO Y RECONOCIMIENTO MOLECULAR.....	36
5.6 ESTUDIO QUÍMICO.....	37
5.6.1 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO	37

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....39

6.1	EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS HIPOGLUCEMIANTE Y ANTIHIPERGLUCÉMICO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS.....	39
6.1.1	EFFECTO AGUDO HIPOGLUCEMIANTE SOBRE LOS NIVELES DE GLUCEMIA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS	39
6.1.2	EFFECTO SOBRE LOS NIVELES DE GLUCEMIA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS EN EXPERIMENTOS DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA	42
6.1.3	EFFECTO SOBRE LOS NIVELES DE GLUCEMIA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS EN EXPERIMENTOS DE TOLERANCIA A LA SACAROSA.....	44
6.2	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE ALFA-GLUCOSIDASAS.....	46
6.2.1	CROMENOS 31, 44 Y 45.....	49
6.2.2	LACTONAS SESQUITERPÉNICAS 46-48.....	53
6.2.3	FLAVONOIDES 43, 51-54	57
6.2.4	CUMARINA 49.....	59
6.3	EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS SOBRE LAS ENZIMAS ALFA-GLUCOSIDASAS	60
6.4	CINÉTICA DE INHIBICIÓN DE LOS COMPUESTOS 44, 47 Y 54	63
6.5	ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO Y RECONOCIMIENTO MOLECULAR.....	65
6.6	EFFECTO AGUDO HIPOGLUCEMIANTE DE LOS COMPUESTOS AISLADOS SOBRE LOS NIVELES DE GLUCEMIA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS	72
6.7	EFFECTO DE LOS COMPUESTOS AISLADOS SOBRE LOS NIVELES DE GLUCEMIA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS EN EXPERIMENTOS DE TOLERANCIA A LA SACAROSA	74

7. CONCLUSIONES78

8. BIBLIOGRAFÍA.....80

ANEXO 1.	DATOS ESPECTROSCÓPICOS Y ESPECTROMÉTRICOS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.....	88
ANEXO 2.	EFFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS.....	92
ANEXO 3.	EFFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS EN RATONES DIABÉTICOS	92
ANEXO 4.	EFFECTO DE LOS EXTRACTOS EN LA PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS	93
ANEXO 5.	EFFECTO DE LOS EXTRACTOS EN LA PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA EN RATONES DIABÉTICOS	93
ANEXO 6.	EFFECTO DE LOS EXTRACTOS EN LA PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SACAROSA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS	94
ANEXO 7.	EFFECTO DE LOS EXTRACTOS EN LA PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SACAROSA EN RATONES DIABÉTICOS	94
ANEXO 8.	DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS DE RMN ¹ H (500 MHz)* Y RMN ¹³ C (125 MHz) DE LA CALEÍNA A (46).....	95
ANEXO 9.	DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS DE RMN ¹ H (500 MHz)* Y RMN ¹³ C (125 MHz) DE LA CALEÍNA C (47)	96
ANEXO 10.	ESPECTROS DE RMN DE LA CALEÍNA C	97
ANEXO 11.	DATOS CRISTALOGRAFÍCOS DE LA CALEÍNA C	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
Á	Amstrongs
ANADEVA	Análisis de Varianza
ADA	Asociación Americana de Diabetes
cm	Centímetro
CDCl ₃	Cloroformo Deuterado
IDF	Federación Internacional de la Diabetes
CG	Cromatografía de Gases
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
DM1	Diabetes Mellitus Tipo I
DM2	Diabetes Mellitus Tipo II
E.E.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 ⁺	Ión Molecular
Kg	Kilogramo

MeOH	Metanol
CD ₃ 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 ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
TMS	Tetrametilsilano
<i>t_R</i>	Tiempo de Retención
UV	Ultra Violeta
G _i	Valor de Glucemia Inicial
G _t	Valor de Glucemia Total

1. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

1.1 GENERALIDADES DE LA DIABETES.

La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por la producción insuficiente de insulina, o por la disminución de la sensibilidad del organismo a esta hormona. La insulina regula la entrada de glucosa en las células para su transformación en energía. Cuando falta la insulina, la glucosa se acumula en la sangre, con lo que aumenta la glucemia o concentración sanguínea de glucosa. Entonces, la diabetes no controlada se traduce en un estado de hiperglucemia que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas especialmente el nervioso y cardiovascular (OMS, 2012).

Existen varias clases de diabetes, pero las más importantes son las de tipo I y II. La diabetes de tipo I, también llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia, se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de la hormona. Se desconoce aún la causa de la diabetes de tipo I, y no se puede prevenir con el conocimiento actual. Sus síntomas principales son: poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio, entre otros. Estos síntomas pueden aparecer de forma súbita (OMS, 2012).

La diabetes tipo II, llamada también no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta surge de una utilización ineficiente de la insulina. Este tipo de diabetes representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a una serie de factores genéticos y epigenéticos. Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes tipo I, pero a menudo menos intensos. En consecuencia, la enfermedad puede diagnosticarse sólo cuando ya tiene varios años de evolución y han aparecido complicaciones (OMS, 2012). Hasta hace poco, este tipo de diabetes sólo se observaba en adultos, pero en la actualidad también se está manifestando en niños.

La diabetes tipo II provoca un aumento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares como infartos, angina de pecho, claudicación de pierna, gangrena,

accidentes cerebrovasculares y demencia, entre otras. Los pacientes afectados con diabetes tipo II tienen el mismo riesgo de un evento cardiovascular que pacientes no diabéticos que han experimentado su primer ataque al corazón. Así mismo, los diabéticos con eventos cardiovasculares previos tienen un riesgo aún mayor, 10 veces más que la población de referencia, de sufrir nuevamente estos accidentes. Por consiguiente el manejo de los factores de riesgo cardiovascular desempeña un papel importante en la atención de los pacientes con diabetes tipo II (Mant, 2008).

1.2 PREVALENCIA DE DIABETES EN EL MUNDO.

Según los estudios de la federación Internacional de Diabetes (Atlas, 2012), en el mundo hay más de 371 millones de personas con diabetes. Se calcula que 4.8 millones de personas han muerto por esta enfermedad, y que más del 80% de estas muertes se registran en países de ingresos bajos y medios. Además, casi la mitad de esas muertes corresponden a personas de menos de 70 años y un 55% a mujeres. La OMS prevé que las muertes por diabetes se multipliquen por dos entre 2005 y 2030 (OMS, 2012). En Norteamérica, más de 38.4 millones de personas están afectadas por la enfermedad, y se espera que para el año 2030 haya un aumento de 51.2 millones. En el año 2012, la diabetes causó 287.020 muertes en esta región.

México como parte de Norteamérica, ocupa el segundo lugar en casos de diabetes y el quinto a nivel mundial con 10.6 millones de diabéticos (**Figura 1**). De tal forma que en las últimas décadas el número de personas afectadas por la enfermedad ha incrementado notablemente, además la enfermedad constituye una de las primeras causas de muerte en el país (Gutiérrez, 2012). De acuerdo a la última encuesta nacional de salud, del total de enfermos que se identificaron como diabéticos, el 16% no cuentan con protección en materia de salud, en tanto que 42% son derechohabientes del IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social), 12% de otras instituciones de seguridad social, y 30% refieren estar afiliados al SPSS (Sistema de Protección Social en Salud). Del total de diabéticos diagnosticados, 14.2%, dijeron no haber acudido al

médico para el control de la diabetes en los 12 meses previos a la encuesta, por lo tanto no se encuentran en tratamiento.

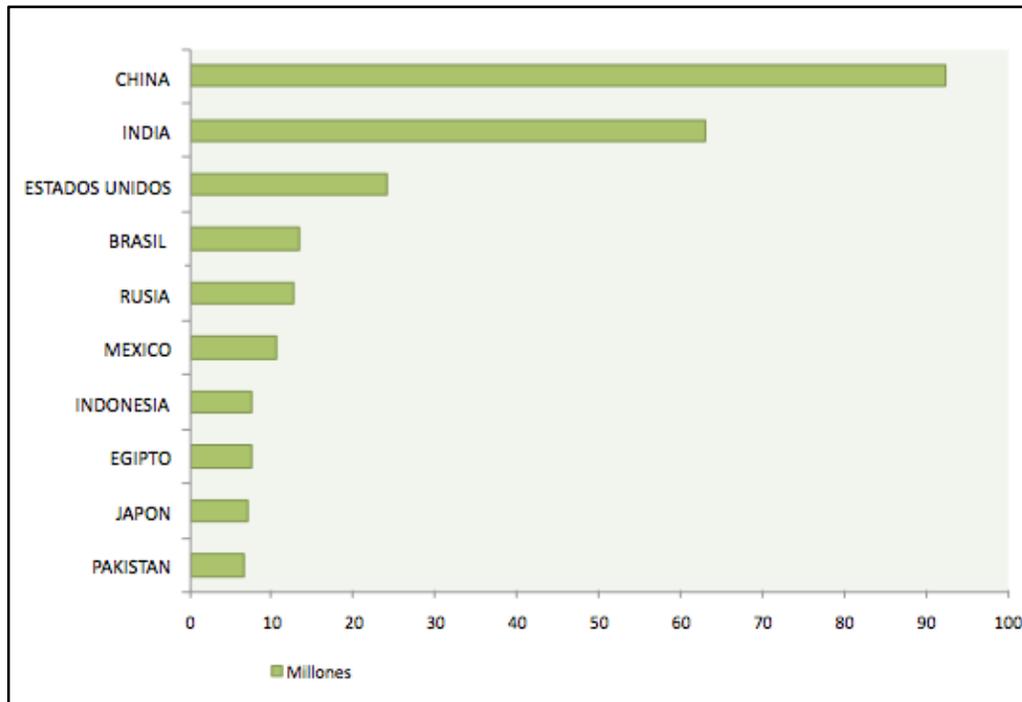


Figura 1. Incidencia de diabetes en diferentes países. Se consideran pacientes con edades entre 20 y 79 años (modificado IDF DIABETES ATLAS, 5ª Edición, 2012).

Si bien todas las enfermedades son importantes, los principales factores de riesgo de la diabetes son una verdadera emergencia de salud pública que deben ser atendidos. Los factores de riesgo más importantes son: peso corporal excesivo (especialmente alrededor de la cintura), antecedentes familiares de diabetes, niveles sanguíneos altos de triglicéridos, hipertensión arterial, trastorno en la tolerancia a la glucosa, y bajo nivel de actividad física, entre otros. La diabetes de tipo II conlleva a una serie de complicaciones que pueden dar lugar a una incapacidad permanente o incluso la muerte. Las más importantes son enfermedades cardiovasculares, lesiones renales, enfermedades oculares como la ceguera, enfermedades digestivas y el síndrome del pie diabético, que puede obligar a una amputación (**Figura 2**).

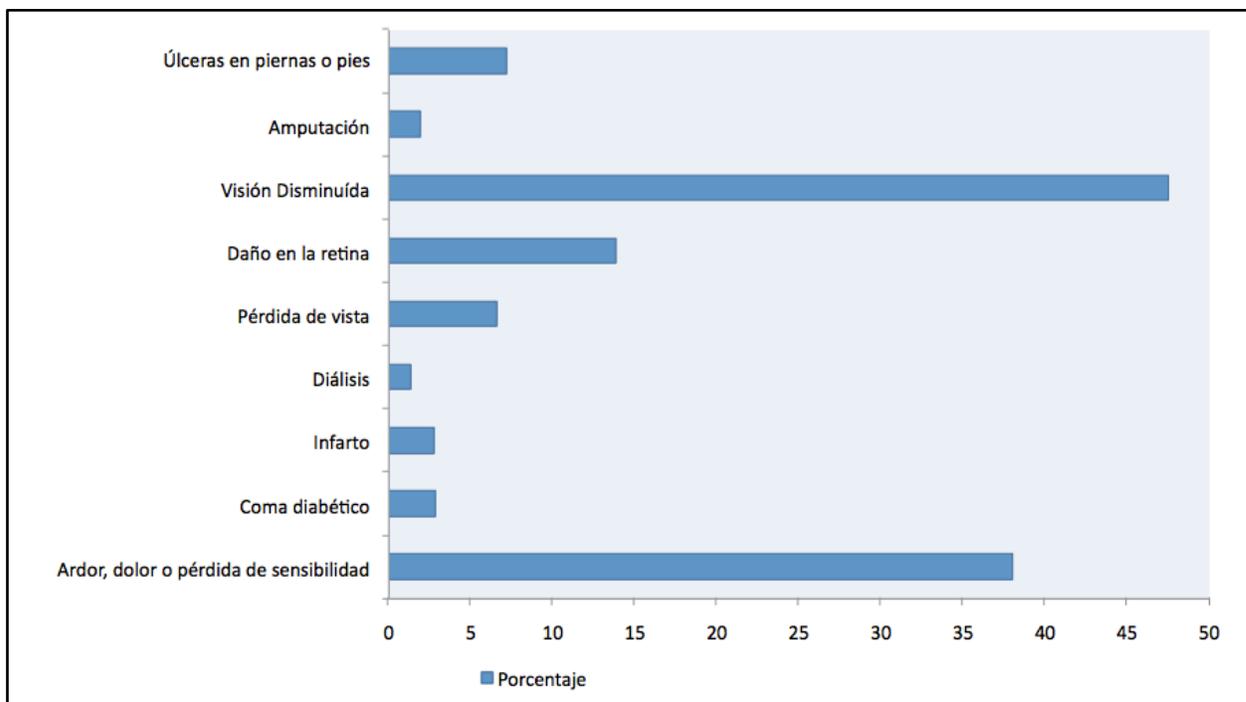


Figura 2. Complicaciones de la diabetes (Gutiérrez, 2012), México.

1.3 TERAPIAS PARA EL CONTROL DE LOS NIVELES DE GLUCOSA EN PACIENTES CON DIABETES TIPO II.

Para el tratamiento de la diabetes tipo II se emplean numerosos agentes farmacológicos, tanto hipoglucemiantes como antihiper glucémicos, incluyendo la insulina; los más relevantes se indican en el **Cuadro 1**. Estos agentes se administran generalmente en forma combinada, incluso con la insulina. La terapia con esta hormona se debe utilizar en pacientes que presenten pérdida de peso, síntomas graves de hiperglucemia, o niveles de glucosa en ayunas mayor de 250 mg/dL (Linn *et al.*, 2009).

Entre los hipoglucemiantes y antihiper glucémicos orales más utilizados se encuentran las sulfonilureas, meglitinidas, biguanidas, tiazolidinedionas, las incretinas, gliptinas y los inhibidores de α -glucosidasas. Este último grupo es de gran relevancia para el presente trabajo y se discutirá en el **inciso 1.4**.

Cuadro 1. Fármacos antidiabéticos orales más comunes (Linn *et al.*, 2009; Holt *et al.*, 2010; Israili, 2011).

TIPO DE FARMACO	MECANISMO DE ACCION	EFFECTOS ADVERSOS
BIGUANIDAS Metformina	Inhiben la gluconeogénesis; aumentan la captación de glucosa en el músculo a través del aumento y activación de una proteína kinasa activada por AMP (AMPK) que induce la traslocación del Glut4; aumentan también la oxidación de ácidos grasos.	Contraindicados en pacientes con insuficiencia cardiaca o respiratoria, alteración de la función renal, o hepática, y una historia de la acidosis metabólica. Pueden provocar diarrea, flatulencia y dolor abdominal
SULFONILUREAS Glimepirida, Gliburida, Glibenclamida	Bloquean los canales de potasio dependientes de ATP, despolarización de la membrana, permitiendo la entrada de calcio y liberación de insulina.	Aumento de peso promedio (1 a 4 Kg) que se estabiliza en más de seis meses; hipoglucemia
MEGLITINIDAS Repaglinida, Nateglinida	Inhibición de los canales de potasio dependientes de ATP de las células beta pancreáticas.	Su uso conlleva un riesgo menor de hipoglucemia, pero provocan un aumento de peso.
GLIPTINAS (inhibidores de DPP-4) Sitagliptina	Inhiben la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) permitiendo un incremento en los niveles de GLP-1 (peptido-1-similar al glucagon) que estimula la liberación de insulina e inhibe la secreción de glucagón. También provoca la preservación de células beta a través de la estimulación de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis.	No hay un patrón característico de los eventos adversos. Disminuyen el apetito.
TAZOLIDINEDIONAS Pioglitazona, Rosiglitazona	Disminuyen la resistencia de las células a la acción de la insulina, y la producción de glucosa por el hígado.	Aumento de peso (promedio de 1 a 4 Kg que se estabiliza en más de 6 a 12 meses), edema, hipoglucemia y elevación de las enzimas hepáticas.
INCRETINAS MIMÉTICAS Exenatida, Pramlintida.	Estimulan la liberación de insulina y suprimen la secreción de glucagón; inhiben el vaciado gástrico, y reducen el apetito.	Náuseas, vómito, diarrea ó anorexia.
INHIBIDORES DE α -GLUCOSIDASAS Acarbosa, Miglitol, Voglibosa	Inhiben competitivamente la actividad de las enzimas α -glucosidasas intestinales retardando la degradación de carbohidratos complejos y con ello la absorción de glucosa y otros monosacáridos.	Flatulencia, cólicos y diarrea.
MEDICINA TRADICIONAL Preparados de plantas	Diversos como: Efecto insulínico, disminución de resistencia a la insulina, inhibición de α -glucosidasas, actividad inhibitoria de aldolasa reductasa, reducción de gluconeogénesis, entre otros.	Varios

Dado el gran número de medicamentos orales para el tratamiento de la diabetes tipo II, clínicas y pacientes requieren información acerca de su eficacia y seguridad para tomar las decisiones correctas. Existen en la actualidad, documentos que resumen los beneficios y problemas que puedan causar el uso de dichos medicamentos, bien sea bajo la forma de monoterapia o en terapias combinadas. Estas monografías facilitan además las opciones de tratamiento personalizado para el paciente.

A pesar de que los beneficios a largo plazo, así como los riesgos de todos los medicamentos, no están muy claros, los diferentes estudios clínicos sustentan el uso de la metformina como agente de primera línea para el tratamiento de la diabetes tipo II (Israili, 2011).

Los niveles altos de morbilidad y mortalidad ocasionados por esta enfermedad han estimulado a los distintos sectores, tanto industriales como académicos, a realizar investigaciones que conlleven al descubrimiento de nuevos fármacos, con mecanismos novedosos o conocidos, y con menos efectos adversos.

1.4 INHIBIDORES DE ALFA-GLUCOSIDASAS.

1.4.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LAS GLUCOSIDASAS.

Las glucosidasas son un grupo de enzimas específicas que catalizan la ruptura del enlace glicosídico en oligosacáridos y glicoconjugados. Su actividad es fundamental para varios procesos bioquímicos tales como: (i) Degradación de polisacáridos para convertirlos en unidades de monosacáridos, los cuales son absorbidos y usados por el organismo. (ii) Catabolismo glicoconjugado lisosomal y desarrollo de glicoproteínas. (iii) Biosíntesis de glicoproteínas o glicolípidos. Las glucosidasas se clasifican en α - y β - dependiendo del tipo de enlace glicosídico (α - o β -) que escindan en el carbono anomérico del azúcar. Las funciones de las α -glucosidasas en el organismo hacen de estas enzimas un blanco terapéutico importante para el tratamiento de la diabetes (Borges de Melo, 2006). Por lo tanto se profundiza en esta clase de agentes.

Las α -glucosidasas son un grupo de enzimas que hidrolizan enlaces α -glucosídicos de disacáridos y oligosacáridos, liberando glucosa como producto final (Chiba, 1997). En la **Figura 3** se ilustra el mecanismo de hidrólisis propuesto para estas enzimas. Las α -glucosidasas se designan según el sustrato sobre el que actúan; de tal forma que reciben los nombres de maltasas, sacararas, dextrinasas, y glucoamilasas, entre otros. Las α -glucosidasas se encuentran ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y tejidos animales. Con base en su estructura primaria, estas enzimas se clasifican en dos grupos: I y II. Estos dos tipos de enzima han evolucionado de manera independiente y convergente a partir de diferentes proteínas ancestrales. En el grupo de tipo I se encuentran las α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sp* (SAM 1606), entre otras. Las α -glucosidasas de *Aspergillus niger* (P2), *Aspergillus oryzae*, *Mucos javanicus*, *Candida tsukubaensis*, intestino humano (isomaltasas, sacararas, maltasas, lactasas), intestino de conejo (isomaltasas y sacararas), intestino de rata (sacararas e isomaltasas) y espinacas pertenecen a la familia de tipo II (Chiba, 1997).

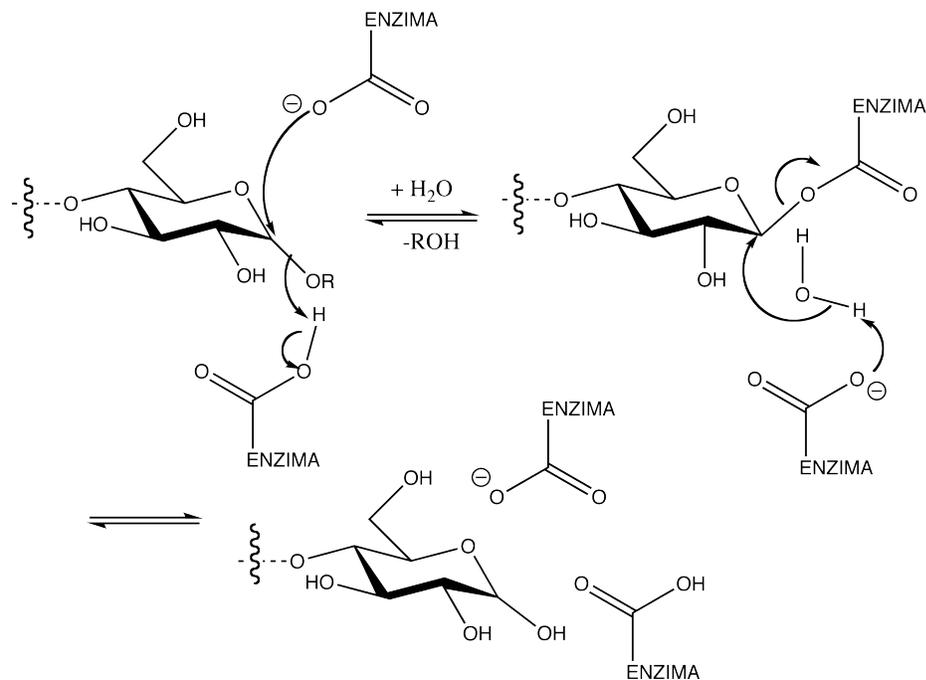


Figura 3. Mecanismo de acción de las α -glucosidasas (Chiba, 1997).

1.4.2 INHIBIDORES DE LAS ALFA-GLUCOSIDASAS DE MAYOR USO EN LA TERAPÉUTICA DE LA DIABETES.

Estudios realizados a finales de 1970 demostraron que los inhibidores de las enzimas α -glucosidasas intestinales podrían retardar el paso final de la digestión de carbohidratos con el consecuente retraso en la absorción de azúcares. A principios de los años ochenta, se demostró que el uso de estos agentes podría reducir la hiperglucemia posprandial en pacientes diabéticos (Holt *et al.*, 2010). La acarbosa (**1**) fue el primer inhibidor de las α -glucosidasas introducido en el mercado a principios de los años noventa. Es un producto natural aislado de la fermentación de cultivos de *Actinoplanes sp.* SE 50 por investigadores de Bayer (Asano, 2003). Después de numerosos estudios clínicos, la acarbosa **1** se introdujo al mercado en Alemania en 1990 para el tratamiento de la diabetes, y desde entonces se ha comercializado en Europa y América Latina. Posteriormente, en 1996 la acarbosa **1** fue introducida al mercado de Estados Unidos bajo el nombre de "Precose[®]". Subsecuentemente, el miglitol (Glyset[®]) (**2**) fue seleccionado como el inhibidor más favorable después de evaluar *in vitro* varios productos derivados de la desoxinojirimicina. Así, en 1996 se autorizó su comercialización por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) y se introdujo en el mercado en 1999 como un inhibidor de α -glucosidasas más potente y con menos efectos secundarios gastrointestinales.

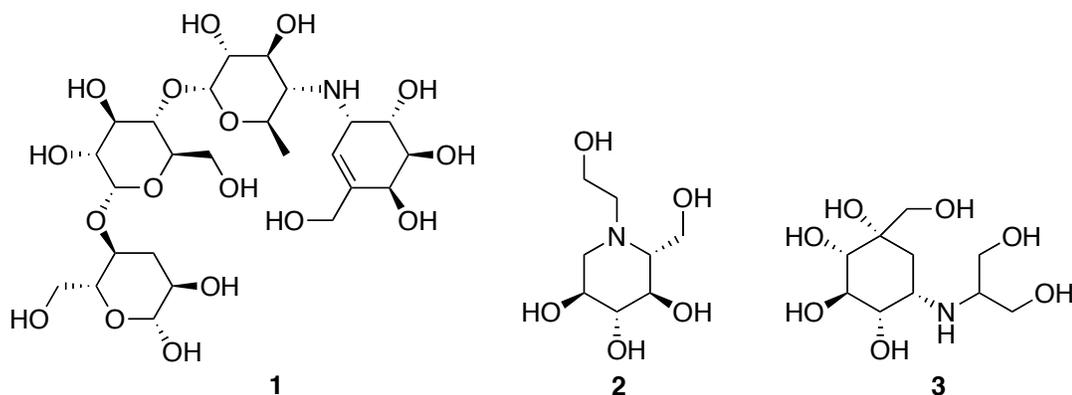


Figura 4. Estructuras de fármacos inhibidores de α -glucosidasas.

Acarbosa (**1**), miglitol (**2**) y voglibosa (**3**).

La voglibosa (**3**) se desarrolló en Japón por la empresa Takeda. Es un derivado de la valiolumina *N*-sustituida y se emplea para el tratamiento de la diabetes en Japón desde 1994 (Asano, 2003). La **Figura 4** muestra los inhibidores de α -glucosidasas de mayor uso en la terapéutica moderna.

Los productos **1-3** inhiben competitivamente la actividad de las enzimas α -glucosidasas en el borde del cepillo de los enterocitos que recubren las vellosidades intestinales (**Figura 5**), evitando así la degradación de carbohidratos complejos y con ello la absorción de glucosa y otros monosacáridos. Estos agentes pueden utilizarse como terapia única para pacientes que padecen de hiperglucemia posprandial; sin embargo, comúnmente se emplean en combinación con otros agentes orales (Holt *et al.*, 2010). Estos fármacos además ocasionan indirectamente una disminución de la hiperinsulinemia posprandial y los niveles de triglicéridos; así mismo, los pacientes no experimentan un aumento de peso y no corren el riesgo de experimentar cuadros de hipoglucemia. Sus efectos adversos incluyen perturbaciones gastrointestinales como flatulencia, malestar estomacal y diarrea. Estos efectos pueden ser minimizados gradualmente tratando a los pacientes con dosis bajas y previniéndolos de comer alimentos con carbohidratos muy complejos (Linn *et al.*, 2009).

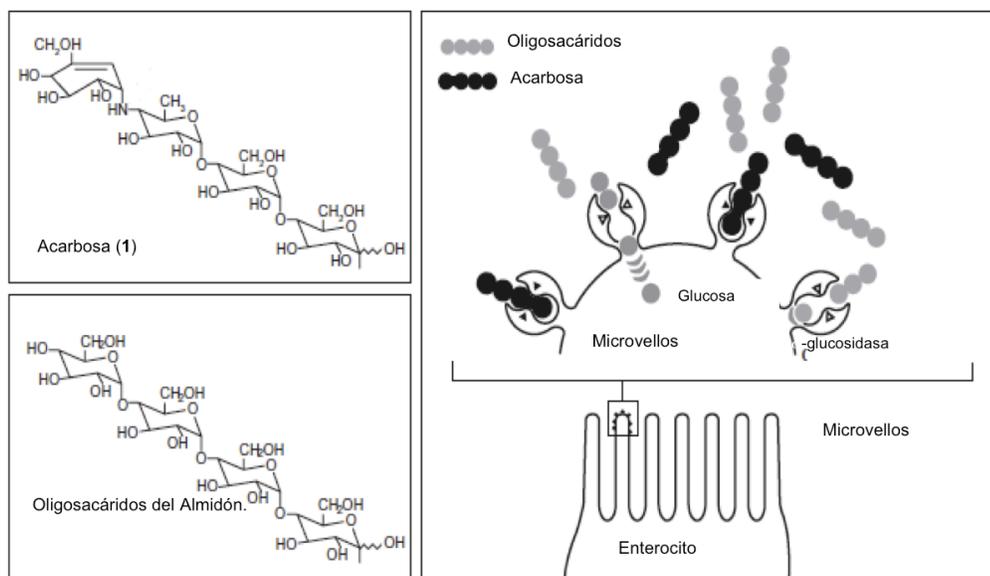


Figura 5. Modo de acción de inhibidores de α -glucosidasas. (Rosak *et al.*, 2012).

La acarbosa (**1**) se degrada por la acción de amilasas en el intestino delgado y por bacterias intestinales; menos del 2% del fármaco inalterado se absorbe junto con algunos de los productos de degradación intestinal. La mayoría del material absorbido se elimina por la orina en 24 horas. El miglitol (**2**) se absorbe casi completamente y se elimina inalteradamente en la orina (Holt *et al.*, 2010).

Los diferentes inhibidores de las α -glucosidasas presentan distintas afinidades a estas enzimas. Esto les confiere perfiles de actividad diferentes; por ejemplo, la acarbosa inhibe a este tipo de enzimas en el orden siguiente: glucoamilasas > sacarosas > maltasas > dextrinasas, mientras que el miglitol es un potente inhibidor de las sacarosas. Los inhibidores de las α -glucosidasas pueden alterar indirectamente la liberación de hormonas intestinales dependientes de glucosa pertenecientes al grupo de las incretinas, tales como el polipéptido inhibidor gástrico (GIP, por sus siglas en inglés) y el péptido similar al glucagón de tipo I (GLP-1, por sus siglas en inglés). Éstas se liberan en respuesta a la ingestión de alimentos y su efecto más importante es potenciar la secreción de insulina inducida por glucosa (Holt *et al.*, 2010).

1.4.3 INHIBIDORES DE ALFA-GLUCOSIDASAS DE ORIGEN NATURAL.

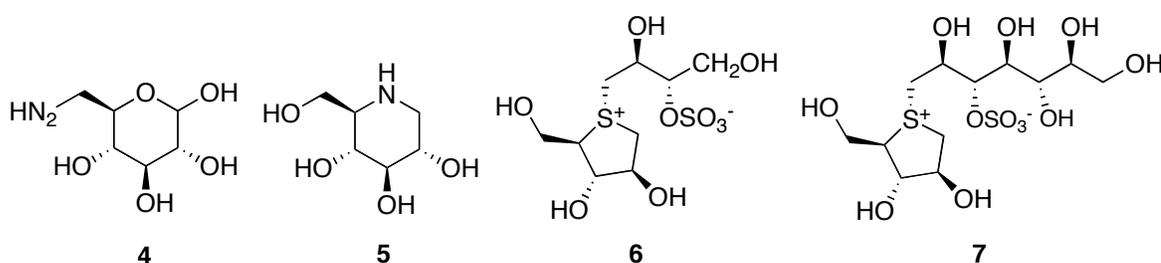
A pesar del gran avance en el campo de las α -glucosidasas a partir de los años setenta, la búsqueda de nuevos inhibidores de origen natural más potentes y selectivos así como el desarrollo de rutas sintéticas eficientes para estos es cada vez más intensa (Wardrop *et al.*, 2010). Así los distintos programas de investigación en torno a este tópico han permitido descubrir varios grupos de inhibidores de las α -glucosidasas de origen natural, principalmente a partir de productos herbolarios para el tratamiento de la diabetes. De acuerdo a revisiones recientes, los productos naturales más importantes como inhibidores de α -glucosidasas incluyen disacáridos, iminoazúcares, tioazúcares, alcaloides polihidroxilados incluyendo piperidinas, pirrolidinas, indolizidinas y nor-tropanos, aminociclitoles, ciclitoles insaturados, tioazúcares, polifenoles (flavonoides,

taninos y fenilpropanoides), terpenoides, entre otros (Borges de Melo *et al.*, 2006; Matsui *et al.*, 2006; Wardrop *et al.*, 2010). La mayoría de estos productos se han aislado de especies utilizadas en la medicina popular alrededor del mundo (Matsui *et al.*, 2006).

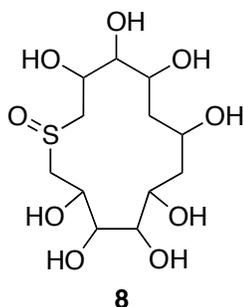
Uno de los productos naturales más relevante como inhibidor de las α -glucosidasas es la nojirimicina (**4**), un iminoazúcar que representa el primer análogo nitrogenado de la glucosa, es decir el oxígeno del grupo hidroximetileno (C_6 -OH) de la piranosa de la glucosa está sustituido por un átomo de nitrógeno. La nojirimicina (**4**) se describió inicialmente como un antibiótico producido por *Streptomyces roseochromogenes* R-468 y *S. lavendulae* SF-425; después demostró ser un potente inhibidor tanto de α como β glucosidasas que podía obtenerse de varias fuentes naturales (Asano, 2003). Sin embargo, debido a su poca estabilidad, se desarrollaron varios derivados que finalmente condujeron a la 1-desoxinojirimicina (DNJ) (**5**), que posteriormente se aisló de las raíces de los árboles de la morera (*Morus alba var*). La DNJ también se biosintetiza en numerosas cepas de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*. A la fecha, se han desarrollado también muchos derivados de la DNJ para incrementar su actividad *in vivo* y, hasta el momento, el miglitol (**2**) es el mejor (Marles y Farnsworth, 1995; Borges de Melo, 2006; Asano, 2003).

Otros productos naturales importantes por su efecto sobre las α -glucosidasas son el salacinal (**6**) y el kotalanol (**7**), tioazúcares que consisten de un tiociclopentano con un átomo de sulfuro trivalente (ión sulfonio) y una cadena lateral de un polialcohol con un grupo O-sulfato. Los productos se obtuvieron de la planta *Salacia reticulata* (Hippocrateaceae) conocida como “Kothala-himbutu” y distribuida en los bosques de la India y Sri Lanka. La especie se emplea como un suplemento alimenticio para prevenir la obesidad y la diabetes. En la medicina ayurvédica se recomienda para el tratamiento de la diabetes un preparado de “Kothala-himbutu” que resulta de macerar la madera de la planta con agua durante una noche.

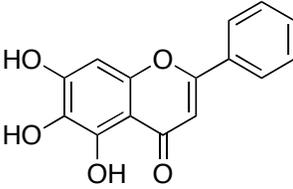
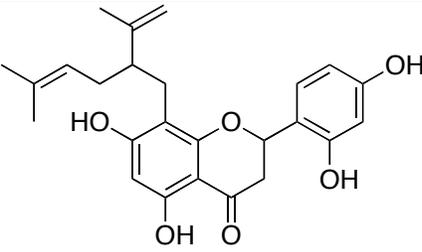
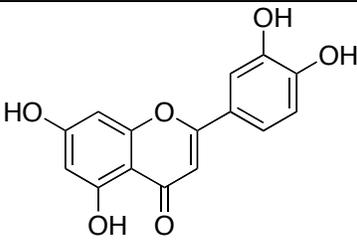
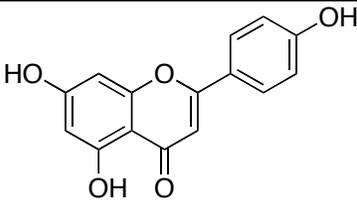
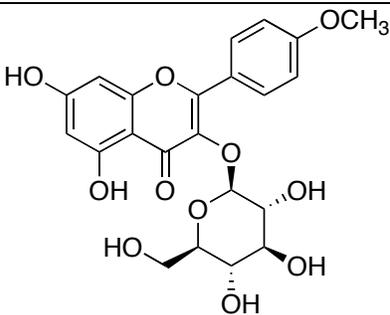
Estos dos compuestos presentaron actividades inhibitorias de maltasas y sacarosas casi iguales a las de la acarbosa (**1**); para isomaltasas son mucho más potentes que la acarbosa (**1**) (Tundis, 2010). La actividad biológica de los productos **6** y **7**, su estructura única y la rapidez con la que los análogos de estos productos se preparan, han impulsado algunos estudios de relación estructura química-actividad (Wardrop, 2010; Borges de Melo, 2006). De acuerdo a los resultados para una mejor actividad se requiere una configuración 2'S, 4'R de los centros quirales de la cadena polihidroxilada, en tanto que la configuración de los otros centros y la presencia del grupo sulfato no son relevantes para una mejor actividad.



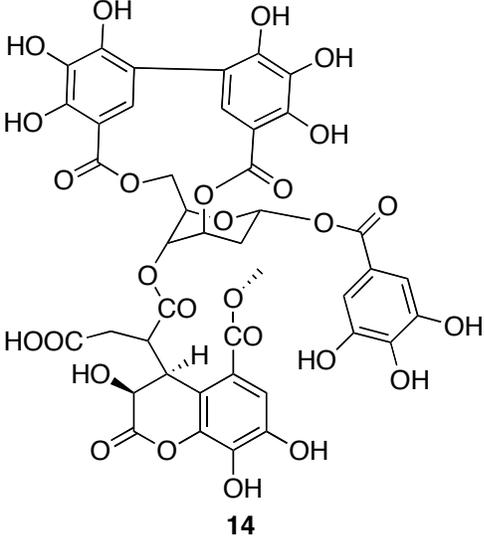
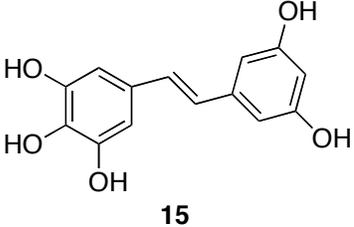
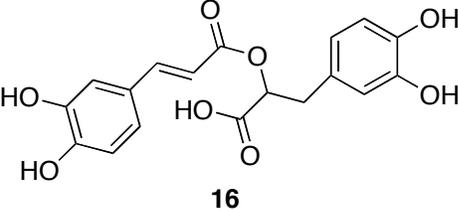
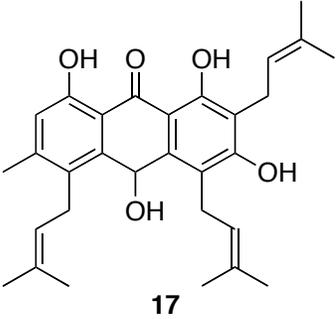
Recientemente se obtuvo de un extracto acuoso de *S. reticulata* un sulfóxido cíclico de 13 miembros (**8**). La estructura se estableció mediante RMN y EM. Este producto presentó mucho mejor actividad inhibitoria sobre las α -glucosidasas que **6** y **7**. Así las concentraciones medias inhibitorias (CI₅₀) como inhibidores de maltasa, sacarasa e isomaltasa fueron de 0.227 μ M; 0.186 μ M y 0.099 μ M, respectivamente.



Cuadro 2. Flavonoides selectos con propiedades inhibitorias de las α -glucosidasas.

NOMBRE	ESTRUCTURA	Cl ₅₀ (Enzima)
Baicaleina ¹	 <p style="text-align: center;">9</p>	45 μ M (Sacarasas intestinales de mamífero)
Soforaflavanona ²	 <p style="text-align: center;">10</p>	37 μ M (α -glucosidasas de levadura)
Luteolina ³	 <p style="text-align: center;">11</p>	45.4 μ M (α -glucosidasas de levadura)
Apigenina ³	 <p style="text-align: center;">12</p>	21.85 μ M (α -glucosidasas de levadura)
3-O-Glucósido de Isoramnetina ^{4,5}	 <p style="text-align: center;">13</p>	619 μ M (α -amilasa pancreática de porcino)

¹Borges de Melo, 2006; ²Kim *et al*, 2006; ³Ha *et al*, 2012. ⁴Tundis *et al.*, 2010; ⁵Tundis *et al.*, 2007.

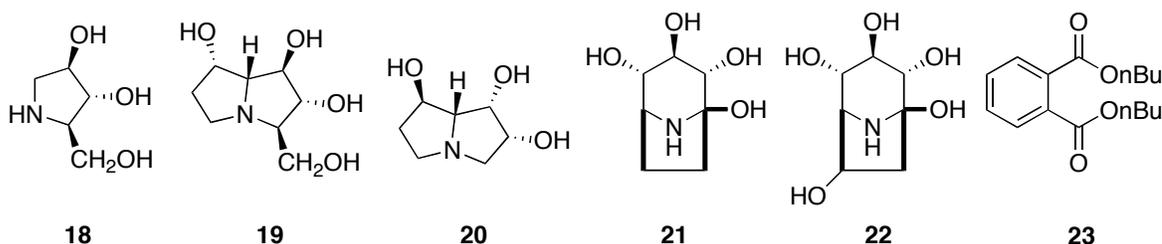
NOMBRE	ESTRUCTURA	CI ₅₀ (Enzima)
Ácido chebulágico ¹	 <p style="text-align: center;">14</p>	<p>97 μM (Maltasas intestinales de mamífero)</p>
Pentahidroxi estilbeno ²	 <p style="text-align: center;">15</p>	<p>19.2 mM (α-glucosidasas tipo IV de <i>B. stearothermophilus</i>)</p>
Ácido rosmarínico ²	 <p style="text-align: center;">16</p>	<p>1.4 mM (α-amilasa pancreática de porcino)</p>
Kemgantranol ³	 <p style="text-align: center;">17</p>	<p>6.3 μM (α-glucosidasa de <i>Saccharomyces</i> sp.)</p>

¹Gao *et al.*, 2007; ²Kumar *et al.*, 2011; ³Tundis *et al.*, 2010.

Los polifenoles constituyen otro grupo importante de inhibidores de las α-glucosidasas *in vitro*. Los más importantes incluyen fenilpropanoides esterificados con ácido quínico o no, flavonoides y taninos (Tundis *et al.*, 2010). De tal forma que

muchas especies medicinales con actividad antihíperglucémica deben su efecto a sus flavonoides de diversa naturaleza; muchos de estos compuestos inhiben las α -glucosidasas con concentraciones medias inhibitorias que oscilan entre 30 y 600 μ M. En el **Cuadro 2** se incluyen ejemplos selectos de flavonoides y otros polifenoles con propiedades inhibitorias α -glucosidasas. Cabe destacar que la mayoría de esos compuestos presenta una amplia distribución en la naturaleza.

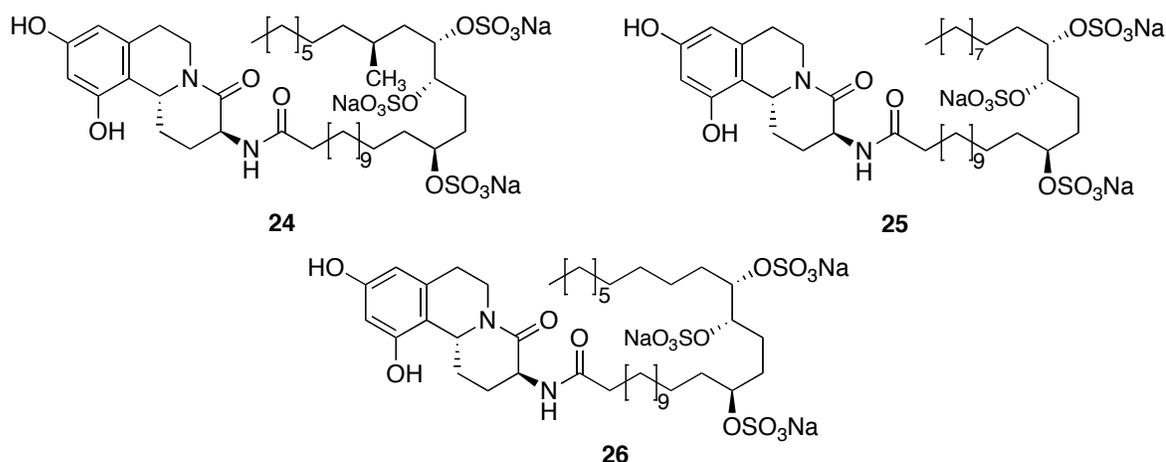
Dentro del grupo de los alcaloides se ha encontrado que algunas pirrolizidinas, pirrolinas, indolizidinas, y nortropanos inhiben α -glucosidasas de diferente naturaleza. Dentro de las pirrolinas destaca el producto **18** aislado de *Angylocalyx boutiquenus* que inhibió varias α -glucosidasas de mamíferos con valores de CI_{50} de 0.18 μ M. Este compuesto además presentó la particularidad de inhibir la enzima glicógeno fosforilasa hepática ($CI_{50} = 1\mu$ M) por lo que representa un candidato idóneo para el desarrollo de un fármaco antidiabético. Las pirrolizidinas polihidroxiladas como la australina (**19**) aislada de *Castanospermum australe* también presentó actividad contra α -glucoamilasa intestinal de mamífero con una CI_{50} de 5.8 μ M. En el grupo de las indolizidinas vale la pena mencionar a la (-)-swainsonina (**20**) aislada de *Swainsona canescens* y especies de *Ipomoea*. Este alcaloide demostró potente inhibición de enzimas de tipo α -manosidasa ($CI_{50} = 0.001\ \mu$ M) de frijoles. Por último, dentro de los nortropanos destacan las calisteginas A3, B1, B2 y C1 aisladas de especies de *Physalis*, *Calystegia* e *Ipomoea*. La calistegina B2 (**21**) inhibió la actividad de α -glucosidasas de arroz ($CI_{50} = 75\ \mu$ M), en tanto que la C1 (**22**) inhibe solo a las β -glucosidasas ($CI_{50} = 0.82\ \mu$ M).



Otros inhibidores incluyen a la dibutilftalida (**23**) aislada de *Streptomyces melanosporofaciens* que inhibe las α -glucosidasas de levadura de forma no competitiva

con un valor de K_i de $3.9 \mu\text{M}$ (Borges de Melo, 2006). También éste guarda similitud con varios análogos de las talidomidias que recientemente demostraron una potente actividad contra estas enzimas.

Finalmente, cabe mencionar que de fuentes marinas se han obtenido inhibidores de α -glucosidasas. Así, Takada y colaboradores, lograron aislar de un extracto acuoso de la esponja *Penares schulzei*, tres alcaloides tetrahidroisoquinolínicos que pertenecen a una nueva clase de compuestos llamados schulzeinas A-C (**24-26**). Los valores de CI_{50} de estos compuestos contra α -glucosidasas varían entre 40 a 170 nM (Borges de Melo, 2006).



1.5 LAS PLANTAS MEDICINALES MEXICANAS COMO FUENTES POTENCIALES DE INHIBIDORES DE ALFA-GLUCOSIDASAS.

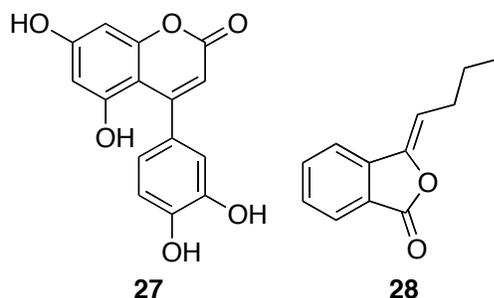
En México, al igual que en otras regiones del mundo, las plantas medicinales tradicionalmente han jugado un papel importante para aliviar los principales padecimientos que afectan a los distintos sectores de la población. Asimismo, el renovado interés global por el uso de medicamentos herbolarios bajo la creencia de su nula o baja toxicidad y el menor costo de éstos ha conllevado al empleo de productos fitoterápicos para el tratamiento de la diabetes. De tal manera que muchos pacientes

abandonan el tratamiento alopático y consumen plantas para tratar los síntomas asociados con la enfermedad (Soumyanath, 2006; Aguilar-Contreras y Xolalpa-Molina, 2005; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Sin embargo, de las más de trecientos especies empleadas en las prácticas médicas no convencionales, muy pocas han sido estudiadas con la finalidad de comprobar sus propiedades hipoglucemiantes o antihiper glucémicas, su toxicidad y su abundancia para garantizar una fuente segura del recurso en caso de verificarse su eficacia (Soumyanath, 2006).

Tomando en cuenta la importancia de los inhibidores de α -glucosidasas en el tratamiento de la diabetes, se han realizado numerosos esfuerzos para identificar nuevos inhibidores de estas enzimas a partir de fuentes naturales, y así desarrollar nuevos fármacos o preparados herbolarios efectivos (Borges de Melo *et al*, 2006).

Entre las plantas utilizadas para el tratamiento de la diabetes en México (al menos 383 especies), únicamente 38 han sido estudiadas como fuentes potenciales de inhibidores de α -glucosidasas (Mata *et al*, 2013). La mayoría de estos estudios han sido enfocados en la evaluación de diferentes tipos de extractos (orgánico o acuoso) como inhibidores de α -glucosidasas de diferentes fuentes (de levadura, *Bacillus stearothermophilus*, preparación enzimática del crudo del intestino de cerdo, etc). De los 38 estudios, ha sido posible aislar los principios activos de las especies *Hintonia latiflora* (Sessé & Moc. ex DC.) *Bullock* (Rubiaceae), *Hintonia standleyana* *Bullock* (Rubiaceae) y *Ligusticum porteri* *Coult. & Rose* (Apiaceae) (Mata *et al.*, 2013). Así, para *Hintonia latiflora*, se obtuvo 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**27**) como el compuesto más activo con una CI_{50} de 62 μ M, en comparación con la acarbosa de 569 μ M; este compuesto demostró además, por medio de experimentos *in vivo* de tolerancia a la sacarosa, poseer una actividad antihiper glucémica en ratones diabéticos (Mata *et al.*, 2013). En cuanto a los compuestos de *Ligusticum porteri*, se obtuvo la (Z)-3-butilidennftálida (**28**) como el compuesto inhibidor más importante de α -glucosidasas con una CI_{50} de 2350 μ M, en comparación con 420 μ M para acarbosa. A este compuesto se realizaron ensayos de cinética enzimática, obteniendo una K_i de 4.86 μ M, comparada

con 0.46 μ M para acarbosa. De acuerdo con los análisis de las gráficas de Dixon y los cálculos de acoplamiento molecular (Docking) se concluyó que el compuesto (Z)-3-butilidenftalida (**28**) posee un tipo de inhibición no competitiva. También se realizaron ensayos *in vivo* con este compuesto que permitieron corroborar su actividad sobre las α -glucosidasas (Mata *et al.*, 2013; Brindis *et al.*, 2011).



1.6 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE *BRICKELLIA CAVANILLESII*

1.6.1 ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y ETNOBOTÁNICOS.

Brickellia cavanillesii (Cass.) A. Gray (Asteraceae) (**Figura 5**) es una planta que mide de 1 a 3 metros de altura. Sus hojas en forma ovada, de color verde, (alternas las superiores), opuestas, pecioladas, ovado-lanceoladas, almenado-dentadas, trinervadas, casi lanosas inferiormente y de color cenizo, con algunas glándulas apenas visibles a simple vista. Sus flores son de color amarillo y están en agrupaciones en cabezuelas colgantes. Tiene tallos ásperos, velludos y rojizos (Martínez, 1989). Se conoce popularmente con los nombres de atanasia amarga, gobernadora de Puebla; hamula de Monterrey, hierba del becerro; hierba amargosa; prodigiosa; zacatechichi y zacatexixi, entre otros. Varias sinonimias se han descrito para esta planta, las más destacadas por su frecuencia de uso son: *Bulbactyles cavanillesii*, DC; *B. nepetaefolia*, H.B.K.; *Eupatorium squarrosus* Cav.; y *Coleosanthus cavanillesii*, Cass.

Brickellia cavanillesii se utiliza para afecciones del estómago y diarrea, además para combatir la atonía secretora y motriz del aparato gastrointestinal, la gastritis y se le atribuyen propiedades vermífugas y antidiabéticas (Anales del IMN., 1894; Martínez, 1980; INI; Poss *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2006).

El uso de la planta para el tratamiento de la diabetes es reciente, y el primer reporte escrito aparece entre finales del siglo pasado (Nicholson *et al.*, 1993). Sin embargo, las especies relacionadas *B. grandiflora* y *B. californica*, conocidas también como “prodigiosa” y “hamula” se han utilizado por mayor tiempo como reguladores de los niveles de glucosa en la sangre (Moore, 1990). Por lo tanto, es altamente probable que el uso de *B. cavanillesii* para el tratamiento de la diabetes surgió de su empleo como sustituto *B. grandiflora* y *B. californica*.



Figura 5. *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray.

1.6.2 ESTUDIOS CLÍNICOS Y FARMACOLÓGICOS.

Los registros acerca de los usos médicos de *B. cavanillesii* datan desde el año 1894 en los Anales del Instituto Médico Nacional, donde se incluyó en la lista de las plantas que formaron parte de la Materia Médica Nacional. Posteriormente, se registran los datos colectados por el profesor Juan Manuel Noriega en la publicación “Curso de Historia de Drogas”, donde relata que la planta fue estudiada en el Instituto Médico por el Sr. D. Francisco Carmona. En esa obra se documentan las aplicaciones de la planta para tratar las fiebres palúdicas, como tónico, y tenífugo; con estos fines se elaboraba un cocimiento, la infusión o el extracto a la dosis de 5 g de hojas por 0.20 de extracto. Según el Sr. Carmona, los principios activos eran la resina de la planta y la brickellina. Finalmente se estableció que la planta no era tóxica y carecía de propiedades antipalúdicas (Noriega, 1902).

Nuevamente, se recopila esta misma información en el tomo VII del mes de abril de 1905 de los propios Anales, reportando además que en las zonas de Puebla y el estado de San Luis Potosí, la planta se reconoce con los nombres comunes de “Prodigiosa” y “Yerba del Becerro”.

En 1907, se reportaron varias investigaciones clínicas y farmacológicas realizadas en el Instituto Médico Nacional por el Dr. Loaeza. Así, la evaluación de *B. cavanillesii* en dos pacientes a los cuales se les administraba dosis de 20 gotas de tintura de la planta por tres veces durante el día como aperitivo y eupéptico, se logró conseguir el primer efecto sin presentarse el segundo, ya que no mejoraron de manera sensible las digestiones. También se trató otro paciente con dosis de 20 gotas durante 27 días para mejorar trastornos dispépticos, obteniéndose un alivio moderado (Loaeza, 1907). Otra recopilación acerca de la información existente de esta especie se realizó en este mismo año, informándose tres sinónimos científicos (*Bulbostylis cavanillesii*, *Eupatorium squarrosum* y *Coleosanthus cavanillesii*) para la planta. También describen su amplia

abundancia en el Valle de México y que la temporada de floración ocurre entre los meses de septiembre a diciembre (Anales del INM, 1907).

Continuando con los estudios clínicos del Dr. Loaeza, quien da cuenta con varias observaciones recopiladas en el Pabellón N° 5 del Hospital General, en enero de 1908, reporta el tratamiento con *B. cavanillesii* a un paciente con anorexia, tomando por espacio de seis días extracto fluido de la planta y su apetito mejoró. También trató con el mismo extracto, a un convaleciente de pleuresía con dosis de 10 gotas antes de cada comida durante diez días, y a los 24 días sólo se obtuvieron medianos resultados (Anales del INM, 1908). Por último, en 1912 el extracto de la planta en dosis de 24 horas administrado en forma pilular, dos o tres horas antes de las principales comidas se mostró como tónico para combatir la atonía gástrica, consecutiva a dispepsia hipoclorhídrica y gastroéctasis. La gastralgia fue uno de los síntomas que mejoró notablemente (Anales INM, 1912).

En 2005, Aguirre-Crespo y colaboradores (2005) demostraron el efecto vaso-relajante de un extracto metanólico de la planta utilizando un modelo de anillo de aorta aislado de rata. Posteriormente, se demostró que el extracto acuoso de la planta era citotóxico sobre una línea celular de carcinoma hepático (HepG2), (Jiniqui *et al.*, 2008). El efecto fue dependiente del tiempo de exposición de las células. Este efecto fue mayor al combinar los extractos de *B. cavanillesii* con el de la tronadora (*Tecoma stans*).

En 2009, Palacios-Espinosa describió un estudio más detallado acerca de la farmacología de *B. cavanillesii*. En ese trabajo se demostró mediante el método de Lorke que el extracto orgánico íntegro de la planta no es tóxico para ratones, ya que hasta la dosis de 5 g/Kg los animales no manifestaron signos de toxicidad. Las pruebas farmacológicas realizadas sobre los extractos de la planta y el producto mayoritario de *B. cavanillesii* permitieron comprobar su potencial antinociceptivo en los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal (100-794 mg/Kg). Se establecieron además las

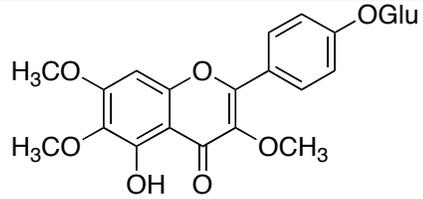
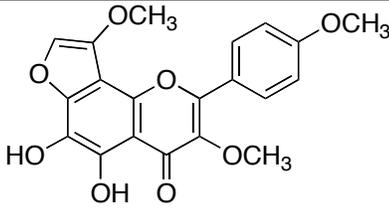
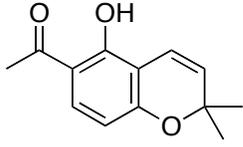
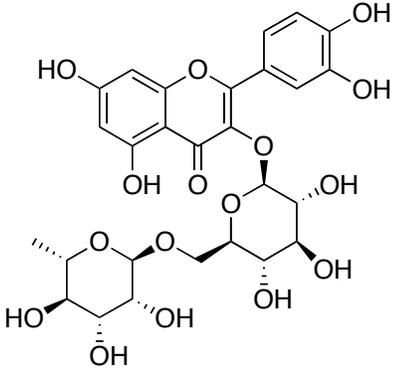
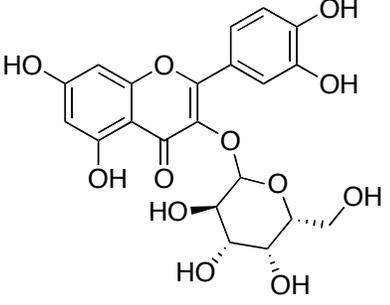
propiedades gastroprotectoras del extracto de la planta (10-300 mg/Kg), la DE₅₀ calculada fue de 30 mg/Kg. Los estudios preliminares del mecanismo de acción demostraron que el efecto gastroprotector podría estar mediado en parte por las prostaglandinas endógenas, las cuales son muy importantes para la protección de la mucosa gástrica. Estos resultados, aunados a la inhibición significativa del crecimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* ocasionada por el extracto orgánico, el aceite esencial y el cromeno mayoritario de la planta dan sustento científico al uso de la planta para el tratamiento de padecimientos asociados con la gastritis. Por último, se comprobó que tanto la esencia como el extracto orgánico de *B. cavanillesii*, provocan una disminución del tránsito intestinal del carbón administrado a los animales de prueba (Palacios, 2009).

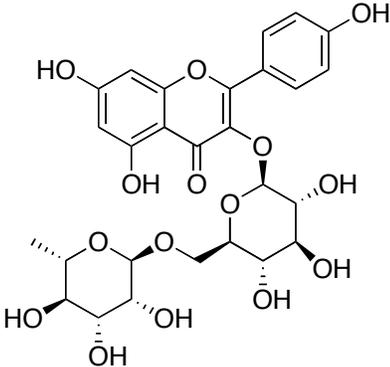
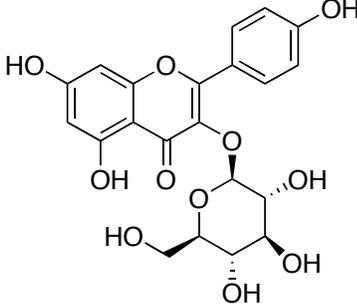
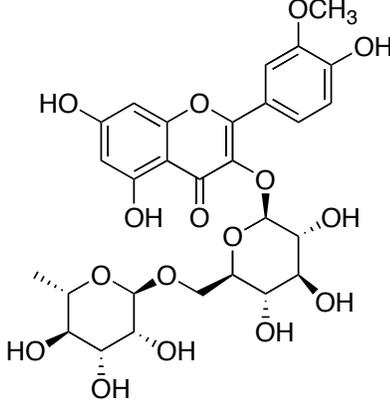
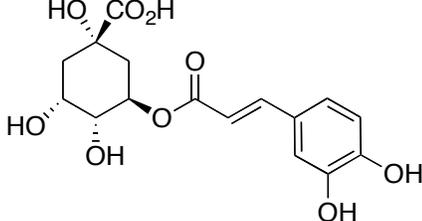
1.6.3 ESTUDIOS QUÍMICOS

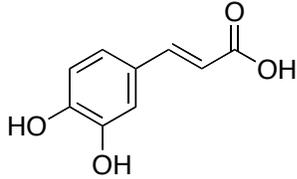
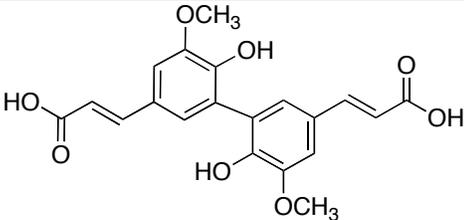
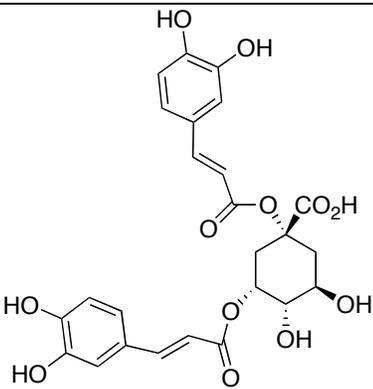
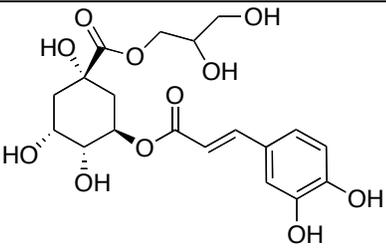
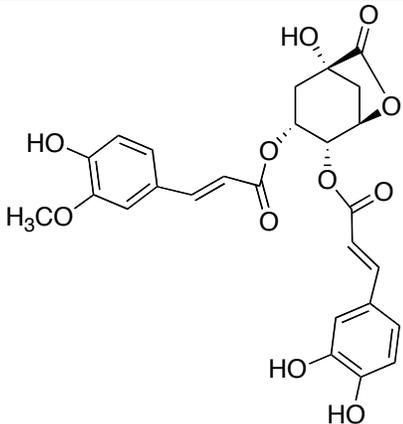
Flores y Herrán (1958) realizaron la extracción exhaustiva de la planta entera seca con alcohol y obtuvieron una sustancia cristalina amarilla la cual fue llamada pendulina (**29**) y se le asignó la fórmula molecular C₂₄H₂₆O₁₂. Con base en diferentes pruebas con reactivos específicos, se llegó a la conclusión que este compuesto presentaba una estructura de un flavonoide unido a una molécula de glucosa y se caracterizó como el 4'-glucósido de 4',5-dihidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona. Posteriormente, en 1960 los mismos autores aislaron de esta planta otro flavonoide al cual denominaron atanasina (**30**) (Flores y Herrán, 1960). Rodríguez y colaboradores (2006) describen la presencia de la desmetilisoencecalina (6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno) (**31**) en la planta; en esa ocasión la estructura se estableció mediante un análisis de difracción de rayos-X. Recientemente, Palacios-Espinosa en 2010 estableció los perfiles cromatográficos de un extracto orgánico de la planta. El análisis de este último mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia (CLAE) acoplada a espectrometría de masas (EM) permitió la identificación de varios compuestos fenólicos incluyendo flavonoides como la rutina (**32**), hiperósido (**33**), 3-O-rutinósido del camperol (**34**), 3-O-glucósido del camperol (**35**), y 3-O-rutinósido de la isoramnetina (**36**); de manera adicional, se identificó la presencia de los ácidos clorogénico (**37**), caféico (**38**),

diferúlico (**39**), y 1,3-dicafeoilquínico (**40**), clorogenato de glicerilo (**41**), y la lactona del ácido 3-O-feruol-4-O-cafeoilquínico (**42**). Cabe destacar que ninguno de estos productos se aisló y su identificación se basó únicamente en el análisis del extracto crudo por CLAE. El **Cuadro 3** ilustra los compuestos identificados y/o aislados de *B. cavanillesii*.

Cuadro 3. Compuestos fenólicos identificados en el extracto íntegro de *B. cavanillesii* mediante HPLC-DAD-APCI/MS.

NUMERO	NOMBRE	ESTRUCTURA
29	Pendulina	
30	Atanasina	
31	6-acetil-5-hidroxy-2,2-dimetil-2H-cromeno	
32	Rutina	
33	Hiperósido	

NUMERO	NOMBRE	ESTRUCTURA
34	3-O-rutinósido del camperol	
35	3-O-glucósido del camperol	
36	3-O-rutinósido de la isoramnetina	
37	Ácido clorogénico	

NUMERO	NOMBRE	ESTRUCTURA
38	Ácido caféico	
39	Ácido diferúlico	
40	Ácido 1,3-dicafeoilquínico	
41	Clorogenato de glicerilo	
42	Lactona del ácido 3-O-feruloil-4-O-cafeoilquínico	

2. JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales tradicionalmente han jugado un papel importante para aliviar los principales padecimientos que afectan a los distintos sectores de la población mexicana, incluso aquellos sectores socio-económicos más privilegiados. Por otro lado, el renovado interés global por el uso de medicamentos herbolarios ha provocado que el público en general prefiera consumir este tipo de productos. Entonces esta propuesta obedece a que en México un gran segmento de la población recurre a las plantas medicinales para tratar los síntomas asociados con la diabetes (Soumyanath, 2006; Aguilar-Contreras y Xolalpa-Molina, 2005; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

De acuerdo con la literatura científica especializada, la población Mexicana actual emplea más de 380 especies vegetales para tratar la diabetes (Mata *et al.*, 2013). 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. De tal forma que el desarrollo de este proyecto permitirá también generar la información científica necesaria para sustentar farmacológicamente el potencial antidiabético de *Brickellia cavanillesii*.

Este proyecto pretende también descubrir nuevos prototipos de fármacos orales de utilidad potencial 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 antihiperoglucémicos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente proyecto consiste en establecer la eficacia antihiper glucémica e hiperglucemiante preclínica de *Brickellia cavanillesii* mediante estudios farmacológicos con la finalidad de completar los estudios de eficacia de la especie para la integración de su monografía tipo OMS, y proporcionar agentes efectivos y de amplia aceptación popular para el tratamiento de la diabetes en México.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el potencial hipoglucemiante de la especie mediante la evaluación de los efectos de sus extractos íntegros elaborados a partir de la droga cruda en los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos utilizando experimentos agudos.
- Determinar el potencial antihiper glucémico de la especie mediante la evaluación de los efectos de sus extractos elaborados a partir de la droga cruda en los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos utilizando una prueba de tolerancia a la glucosa.
- Determinar el potencial antihiper glucémico mediante la evaluación de los efectos de sus extractos íntegros elaborados a partir de la droga cruda en los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos utilizando una prueba de tolerancia a la sacarosa con la finalidad de establecer *in vivo* un posible efecto sobre las enzimas α -glucosidasas.

- Aislar y caracterizar los principios activos de *B. cavanillesii* a través de la aplicación de los procedimientos químicos convencionales.
- Establecer el efecto de los extractos y principios activos sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura *in vitro*.
- En caso de obtener compuestos activos, predecir el posible sitio de unión mediante un estudio de acoplamiento molecular.
- Estudiar la cinética de unión de los inhibidores más activos mediante los cálculos de Dixon.
- Evaluar *in vivo* al menos uno de los constituyentes activos aislados.

4. HIPÓTESIS

- El uso popular de la especie *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray (Asteraceae) para el tratamiento de la diabetes sugiere la presencia en la planta 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 α -glucosidasas.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS, ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS.

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fisher-Johns. 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-¹H) y de Carbono 13 (RMN-¹³C) se generaron en un aparato Unity-Inova, marca Varian, el cual se operó a una radiofrecuencia de 500 y 125 MHz, respectivamente. Los espectros se realizaron en cloroformo deuterado ó metanol deuterado, y los desplazamientos químicos se designaron en unidades δ (ppm), referidas al tetrametilsilano (TMS). Los análisis se ejecutaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

5.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES

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). Para la cromatografía en columna de exclusión se utilizó Sephadex LH-20, con modalidad isocrática con MeOH.

Los análisis de Cromatografía en Capa Fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución. La CCF se realizó sobre

placas de aluminio con diferentes dimensiones y recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ 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 se revelaron con sulfato amoniacal en ácido sulfúrico, 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 Phurospher RP-18 (tamaño de partícula 5 mm, 100 Å), de 4.6 x 250 mm. Los analitos se prepararon disolviendo 1 mg de muestra en 500 µL de acetonitrilo, se inyectaron en un volumen de 10 µL. Los cromatogramas se registraron utilizando las longitudes de onda 254 y 365 nm, y se procesaron mediante el programa de software Empower version 2 (Waters). Todos los análisis fueron realizados a temperatura ambiente.

5.3 MATERIAL VEGETAL

Brickellia cavanillesii (Cass.) A. Gray se recolectó en el municipio de Yecapixtla, Morelos en el Km 2.2 norte, en el mes de septiembre de 2009. La identificación de la planta fue efectuada por el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). Un ejemplar de referencia (Bye & Linares 36171) se depositó en el Herbario Nacional (MEXU) Instituto de Biología, UNAM.

5.4 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICO Y ACUOSO DE *BRICKELLIA CAVANILLESII*.

La planta seca y molida (4.35 Kg) se sometió a una extracción por maceración con una mezcla de diclorometano:metanol (1:1) durante siete días; el proceso se repitió tres veces. Una vez eliminado el disolvente se obtuvieron 415 g de extracto orgánico. El extracto acuoso se elaboró mediante la técnica de infusión; para ello se pesaron 450 g de planta seca, los cuales fueron tratados con agua a punto de ebullición (13.5 L) durante 30 minutos, luego se filtró al vacío y finalmente, se concentró en una bomba de alto vacío para obtener el extracto seco (40 g).

5.5 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS.

Todos los experimentos se manejaron conforme a la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manipulación de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999) y en armonía con las reglas internacionales sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio con libre acceso al alimento y agua. Para los ensayos de tipo agudo, los animales de prueba se colocaron en jaulas individuales y privados de alimento varias horas antes de la evaluación; durante los periodos de ayuno y desarrollo del experimento, todos los animales tuvieron acceso libre al agua.

Para la determinación de la actividad hipoglucemiante y antihiper glucémica de los extractos orgánicos, acuosos y compuestos puros, se diseñaron diferentes experimentos de tipo agudo *in vivo* con base en los protocolos experimentales ampliamente descritos en la literatura (Bailey y Flatt, 1990; Williamson, *et al.*, 1996; Verspohl, 2002; Soumyanath, 2006).

5.5.1 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA SANGUÍNEA.

Las muestras sanguíneas se recolectaron de la vena caudal de los animales a través de una pequeña incisión al final de la cola. Los niveles de glucosa sanguínea se midieron por el método enzimático de la glucosa oxidasa utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra, Jonhson-Jonhson, Milpitas, CA, EE.UU.).

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:

$$\% \text{ de Variación de Glucemia: } \frac{G_f - G_i}{G_i} \times 100$$

Donde, G_i es el valor de la glucemia inicial y G_f es el valor de la glucemia al tiempo de determinación (horas o días) posterior a la administración de los tratamientos (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, cuando fue necesaria) se realizaron con el programa computacional GraphPad Prism Versión 5.0.

5.5.2 EFECTO AGUDO HIPOGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS Y COMPUESTOS.

Al término de las ocho horas de ayuno, los animales normoglucémicos se dividieron en grupos iguales de ocho ratones. A continuación, los niveles de glucosa sanguínea se midieron a las 0, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 horas posteriores a la administración oral de las diferentes muestras. Una vez obtenidos los valores de las lecturas de glucosa sanguínea (mg/dL), se calcularon los porcentajes de variación de glucemia.

5.5.3 EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y SACAROSA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS.

Posterior a las doce horas de ayuno los animales de prueba (40 ratones normoglucémicos o diabéticos) se dividieron en varios grupos. El grupo 1 recibió el vehículo (solución salina); al grupo 2 (control positivo) se le administró una dosis (10 mg/Kg) de glibenclamida (en el caso de tolerancia a la glucosa); ó acarbosa (5 mg/kg) (en el caso de tolerancia a la sacarosa). Los grupos restantes recibieron diferentes dosis del extracto de prueba (51.6, 100 y 316 mg/Kg) ó compuestos puros si es el caso. Treinta minutos después, a todos los animales se les administró por vía oral una solución que contenía una dosis de glucosa anhidra (1.5 g/Kg) o sacarosa (3 g/Kg). Posteriormente, se midieron los niveles de glucosa sanguínea a los 0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos siguientes a la administración de la carga del carbohidrato.

5.5.4. INDUCCIÓN DE DIABETES TIPO II.

La diabetes mellitus se indujo en los ratones mediante la administración de una dosis única de estreptozotocina [STZ, 100 mg/Kg *i.p.*], previo tratamiento con Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD) (30 mg/Kg). Los niveles de glucosa se determinaron de 3 a 5 días después de la administración de la STZ y aquellos que presentaron niveles de glucosa sanguínea mayores a 160 mg/dL se consideraron diabéticos e incluidos en los estudios de actividad antihiper glucémica e hipogluce miante.

5.5.5 EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO Y COMPUESTOS PUROS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ALFA-GLUCOSIDASA DE LEVADURA.

El efecto de extractos, fracciones o compuestos puros sobre la actividad enzimática de α -glucosidasa de levadura (EC 3.2.1.20) adquirida de Sigma-Aldrich se realizó de acuerdo al método descrito por Sou y colaboradores (2000) con modificaciones de nuestro grupo de trabajo. La inhibición de la enzima se determinó por un método espectrofotométrico. El ensayo se realizó de la siguiente forma: el sustrato, *p*-nitrofenil- α -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 0.75 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 0.2 a 2.0 mg/ml. El ensayo se realizó en microplacas. El incremento en la absorción a 405 nm debido a la hidrólisis de PNGP por la α -glucosidasa se midió espectrofotométricamente en un lector de microplacas (Bio Instruments Incorporated, EE.UU.).

Las soluciones de acarbosa o de los compuestos a diferentes concentraciones se incubaron durante 5 min con 20 μ L de enzima y 10 μ L de sustrato (5 mM). La concentración media requerida para inhibir la actividad de la enzima al 50% (CI_{50}) se calculó mediante un análisis de regresión no lineal, utilizando la siguiente ecuación.

$$V = \frac{A_{100}}{1 + (I/CI_{50})^S}$$

Donde *v* es el porcentaje de inhibición, A_{100} es la inhibición máxima, *I* es la concentración de inhibidor, CI_{50} es la concentración requerida de compuesto para inhibir la actividad de la enzima en un 50%, y *S* el grado de cooperatividad.

5.5.6 CINÉTICA ENZIMÁTICA.

Los parámetros cinéticos se determinaron utilizando el método gráfico de Dixon y Lineweaver-Burk 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 estándar de la media (E.E.M.). Los parámetros cinéticos como V_{max} , K_m , y K_i se evaluaron utilizando el método de regresión no lineal basado en la siguiente ecuación:

$$V = \frac{V_{max} S}{K_m (1 + I/k_i) + S(1 + I/k`i)}$$

Donde V es la velocidad inicial en ausencia y en presencia del inhibidor, I y S son la concentración del inhibidor y sustrato, respectivamente, V_{max} es la velocidad máxima, K_m es la constante de Michaelis-Menten, K_i es la constante de inhibición competitiva, y $K`i$ es la constante de inhibición no competitiva.

5.5.7 ACOPLAMIENTO Y RECONOCIMIENTO MOLECULAR.

Los estudios de acoplamiento y reconocimiento molecular se realizaron con 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 α -glucosidasa de levadura para realizar los estudios de acoplamiento y reconocimiento molecular se construyó por homología. La conformación inicial de cada ligando fue construida y minimizada energéticamente con la aplicación “geometric optimization” del

programa HyperChem 8. Las estructuras de las moléculas objeto de estudio se prepararon para el acoplamiento y reconocimiento molecular utilizando AutoDockTools 1.5.4 (<http://mgltools.scripps.edu/>); este proceso consistió en adicionar átomos de hidrógeno y cargas parciales de Kollman a la enzima (α -glucosidasa) y cargas de Gasteiger a los ligandos. La macromolécula es considerada como un cuerpo rígido durante el proceso de acoplamiento, mientras que en los ligandos se consideró su flexibilidad. El tamaño de la caja fue de 126 Å x 126 Å x 126 Å en las dimensiones x, y, z, con el centro de la cuadrícula correspondiente a la proteína.

5.6 ESTUDIO QUÍMICO.

El fraccionamiento de los extractos y la separación de los constituyentes biodinámicos se realizó mediante las técnicas convencionales, las cuales incluyen procesos de partición y métodos cromatográficos (Sukhdev S *et al.*, 2008).

5.6.1 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO.

El extracto acuoso (40 g) fue sujeto a un proceso de reparto con diclorometano para obtener una fracción orgánica (4.5 g) de la infusión (FSD). Este último procedimiento se repitió tantas veces como fue necesario.

5.6.1.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA FSD.

Para el aislamiento y la caracterización de los compuestos inhibidores de α -glucosidasas presentes en el extracto acuoso se utilizó como prueba de monitoreo el ensayo *in vitro* descrito en el inciso 4.5.5.

Al realizar el reparto de la infusión entre diclorometano y agua, precipitaron espontáneamente 223 mg de quercetina (**43**), uno de los compuestos mayoritarios

presentes en la planta. La fracción soluble en diclorometano (FSD) (4.5 g) se sometió a un fraccionamiento secundario vía una columna cromatográfica sobre Sephadex utilizando metanol como eluyente. Este proceso condujo a nueve fracciones secundarias (FSD1-FSD9). Los resultados de inhibición de la actividad de las α -glucosidasas de levadura indicaron que las fracciones activas fueron FSD3, FSD6, FSD7 y FSD9. Posteriormente FSD3 (3 g) se recromatografió en una columna cromatográfica abierta con gel de sílice (120 g), eluyendo con hexano e incrementando gradualmente la polaridad con cantidades crecientes de acetato de etilo (7:3 \rightarrow 9:1). De esta separación se logró aislar tres cromenos [60 mg de 6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (**31**), 62 mg de 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (**44**) y 12 mg de 6-acetil-5-hidroxi-2-hidroximetil-2-metil-2H-cromeno (**45**)] y una mezcla de las lactonas sesquiterpénicas que se resolvió mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (Columna Waters Purospher RP-18e, tamaño de partícula 5 μ m, de 10 x 250 mm; gradiente de elución: acetonitrilo:agua 48:52 y un flujo de 3.8 mL/min para generar 184 mg de caleína A (**46**, t_R = 10.55 min), 335 mg de caleína C (**47**, t_R = 11.90 min) y 8 mg de calealactona C (**48**, t_R = 13.58 min). De la fracción secundaria FSD6 (128 mg) se obtuvieron 22 mg del ácido 3,5-di-O-caffeoilquínico (**50**) mediante una cromatografía preparativa en capa delgada (CCD). La fracción FSD7 (62 mg) presentó un precipitado amarillo (22 mg) del cual se obtuvieron mediante CLAE (Columna Waters Purospher RP-18e, tamaño de partícula 5 μ m, de 10 x 250 mm; gradiente de elución: acetonitrilo:agua 45:55 \rightarrow 60:40 y un flujo de 3.0 mL/min; tiempo de retención: 14.56 y 15.09 min) 9.6 mg de acacetina (**51**) y 6.4 mg de genkwanina (**52**). Además se aislaron 8 mg de camperol (**53**), mediante CLAE (Columna Spherisorb waters S5 ODS2, 4.6 x 150 mm; gradiente de elución: metanol:agua 45:55 \rightarrow 65:35, t_R = 24.9 min) utilizando un estándar obtenido de Sigma-Aldrich. A partir de la fracción FSD9 (90 mg) se obtuvo el flavonoide isoramnetina (**54**) empleando CLAE (Columna Waters Purospher RP-18e, tamaño de partícula 5 μ m, de 10 x 250 mm; gradiente de elución: acetonitrilo:agua 48:52 y un flujo de 3.8 mL/min; t_R : 7.42 min).

Los datos espectroscópicos y espectrométricos de los diferentes compuestos aislados conocidos se presentan en el **Anexo 1**.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de *B. cavanillesii* para tratar la diabetes en la medicina popular de México es reciente, y a pesar de su gran demanda no se contaba con la información científica que sustentase esta aplicación medicinal, muy importante para un gran sector de la población. De ahí la fundamentación para realizar el presente trabajo amplio que describe las propiedades hipoglucemiantes y antihiper glucémicas de la planta. Para la conducción del trabajo se aplicó la siguiente estrategia metodológica: En primer lugar, se estableció el efecto hipoglucemiante de la infusión y el extracto orgánico en ratones normoglucémicos y diabéticos mediante un experimento de tipo agudo. A continuación, se determinó su posible efecto antihiper glucémico mediante ensayos de tolerancia a la glucosa y sacarosa en ratones. También se efectuó un ensayo *in vitro* para medir el efecto de los preparados sobre las enzimas α -glucosidasas de levadura de acuerdo con el método de Oki y colaboradores (Oki *et al.*, 1999). De esta forma, se contaría con un ensayo apropiado para monitorear el aislamiento de los principios activos antihiper glucémicos inhibidores de estas enzimas. Por último, algunos de los compuestos activos en el ensayo enzimático se evaluaron *in vivo* para comprobar su potencial antihiper glucémico en ratones normoglucémicos y diabéticos.

6.1 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS HIPOGLUCEMIANTE Y ANTIHIPERGLUCÉMICO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS.

6.1.1 EFECTO AGUDO HIPOGLUCEMIANTE SOBRE LOS NIVELES DE GLUCEMIA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS.

El efecto hipoglucemiante de los extractos orgánico y acuoso de *B. cavanillesii* se determinó tanto en ratones normoglucémicos como diabéticos, utilizando glibenclamida como control positivo. El modelo de diabetización utilizado en los experimentos

realizados a lo largo del estudio se basa en la administración *i.p.* de una dosis de estreptozotocina (STZ, 100 mg/Kg), previo tratamiento con NAD.

La STZ es una glucosamina derivada de la nitrosourea que daña selectivamente las células β -pancreáticas a través de la alquilación del ADN celular. Cuando la STZ entra a la célula vía un transportador de glucosa (GLUT2), el ADN dañado induce la activación de la poliribosilación del ADP. Este proceso conlleva a la disminución de NAD^+ y ATP. Al aumentar la desfosforilación del ATP después del tratamiento con STZ, hay suministro de un sustrato de la xantina oxidasa que provoca la formación de radicales superóxido. Consecuentemente, se genera peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Además, la STZ es un donador de óxido nítrico que inhibe la actividad de la aconitasa y participa en el daño del ADN. Entonces, como resultado, las células beta sufren destrucción por necrosis (Szkudelski, 2001). El tratamiento preliminar con NAD, provoca una protección parcial contra la acción citotóxica de la STZ al eliminar radicales libres y causar daños menores a las células beta pancreáticas, de tal forma que se genera un síndrome diabético tipo II (Srinivasan y Ramarao, 2007). Este modelo es ampliamente utilizado para la detección de compuestos que incluyen productos naturales con actividad insulínica, hipoglucemiante y antihiper glucémica (Srinivasan y Ramarao, 2007). La glibenclamida es una sulfonilúrea que bloquea los canales de potasio dependientes de ATP de la célula beta pancreática, despolariza la membrana y permite la entrada de calcio con la consecuente liberación de insulina (Linn *et al.*, 2009).

El extracto orgánico elaborado con CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) presenta un efecto hipoglucemiante en ratones normoglucémicos a partir de las tres hasta las cinco horas posteriores a su administración a la menor dosis ensayada (56.1 mg/Kg) (**Figura 6**). Para el caso de las dosis de 100 y 316 mg/Kg se observa su mayor efecto hipoglucemiante a las tres horas posteriores; sin embargo, al realizar los cálculos de área bajo la curva (**Anexo 2a**) de los efectos obtenidos con estas dos dosis (100 y 316 mg/Kg), se encontró que los mismos no fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) con respecto al vehículo. Por otro lado, la infusión induce una acción similar a la de la glibenclamida a las dosis de 100 y 316 mg/kg, es decir, este preparado provoca un

efecto hipoglucemiante en ratones normoglucémicos. Además se observa un efecto dependiente de la dosis en las gráficas de área bajo la curva (ABC) (**Anexo 2b**).

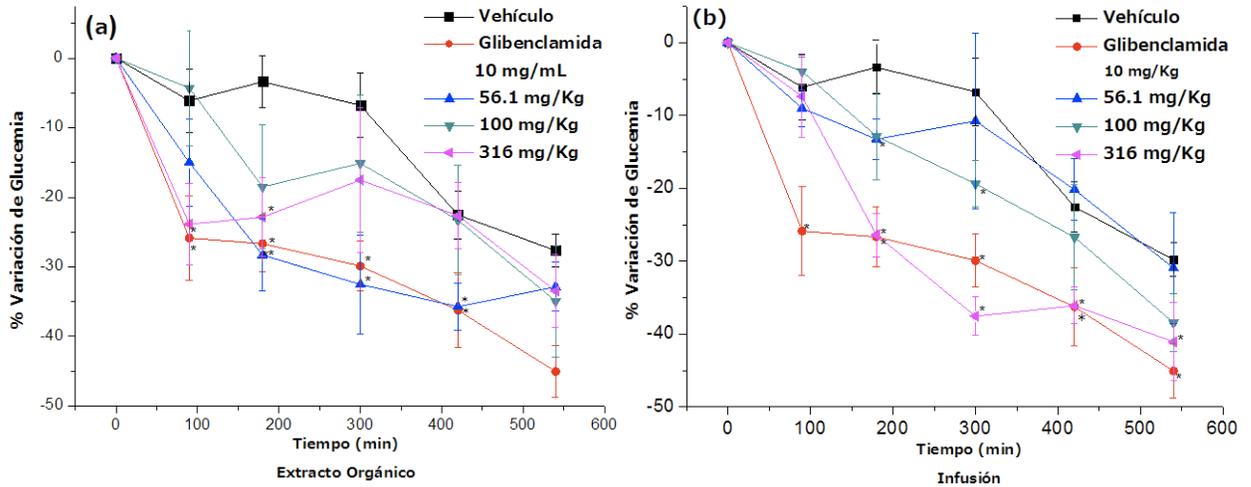


Figura 6. Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre en ratones normoglucémicos. Cada punto representa la media de seis determinaciones ($n = 6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett $P < 0.05$.

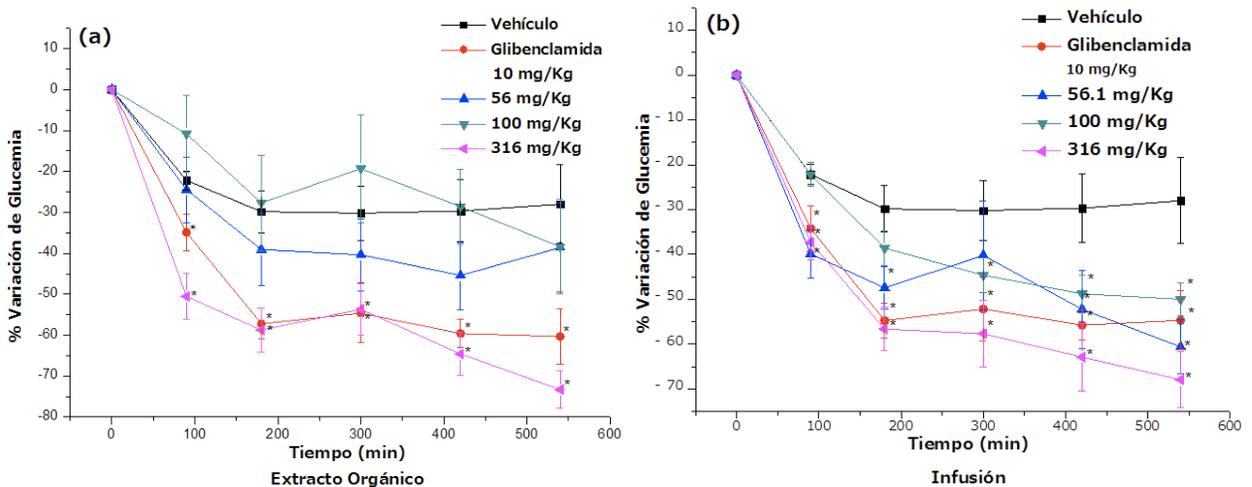


Figura 7. Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre en ratones diabéticos. Cada punto representa la media de seis determinaciones ($n = 6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett $P < 0.05$.

Los datos estadísticos del experimento en ratones diabéticos revelan, que ambos extractos inducen una disminución significativa de los porcentajes de glucosa en

sangre; en el caso del extracto orgánico el efecto se apreció a la dosis de 316 mg/Kg, en tanto que la infusión ejerció su acción a las dosis de 56.1 y 316 mg/Kg (**Figura 7**). Además se puede notar en las gráficas de área bajo la curva (**ANEXO 3a y 3b**), que las mayores dosis administradas de ambos tratamientos provocan un efecto similar al de la glibenclamida. Con los resultados de los experimentos realizados se puede concluir que los extractos orgánico y acuoso de *B. cavanillesii* regulan los niveles de glucosa en la sangre en los roedores de prueba.

6.1.2 EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE GLUCEMIA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS EN EXPERIMENTOS DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.

La prueba de tolerancia a la glucosa se utiliza para determinar el efecto antihiper glucémico e hipoglucemiante durante las tres horas posteriores a la administración de una carga de glucosa, previo tratamiento con diferentes dosis de los extractos en estudio. De nueva cuenta la glibenclamida se empleó como control positivo.

El experimento de tolerancia a la glucosa en ratones normoglucémicos demuestra que tanto el extracto orgánico como la infusión ejercen un efecto antihiper glucémico al inhibir el pico posprandial (**Figura 8**); sin embargo, después de los 60 minutos de administrar la carga de glucosa la acción de los dos extractos es diferente, ya que el extracto orgánico ejerce un efecto antihiper glucémico más no hipoglucemiante tanto en ratones normoglucémicos (**Figura 8a**) como en ratones diabéticos (**Figura 9a**). Este tipo de comportamiento podría sugerir un mecanismo de acción similar al de las biguanidas (Linn *et al.*, 2009), las cuales no incrementan la secreción de insulina como la glibenclamida, sino que promueven la captación de glucosa en los tejidos y reducen la salida de glucosa hepática, provocando de esta forma un efecto antihiper glucémico pero no hipoglucemiante. Casos similares se han reportado en el análisis de un extracto alcohólico de hojas de *Alangium lamarckii*, en ratas diabéticas (STZ). En ese trabajo se

ensayaron dosis de 250 y 500 mg/Kg de un extracto de *A. lamarckii* observándose que en el experimento de tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos, el efecto de los extractos no fue similar al de la glibenclamida, pero se notó una disminución significativa del pico posprandial (Kumar *et al.*, 2011). Caso contrario a la infusión de *B. cavanillesii*, donde se percibe un descenso en los niveles de glucemia a las dosis administradas de 100 y 316 mg/Kg, durante las tres horas del registro de datos, los niveles de glucemia disminuyeron significativamente ($P < 0.05$). El comportamiento de la infusión fue similar al observado para la glibenclamida en la dosis de 100 y 316 mg/Kg (**Anexo 5**).

Estos resultados sugieren que la infusión de *B. cavanillesii* ejerce efectos antihiper glucémicos e hipoglucemiantes, es decir, existe la presencia de compuestos en la misma que actúan por más de un mecanismo de acción para así regular los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos.

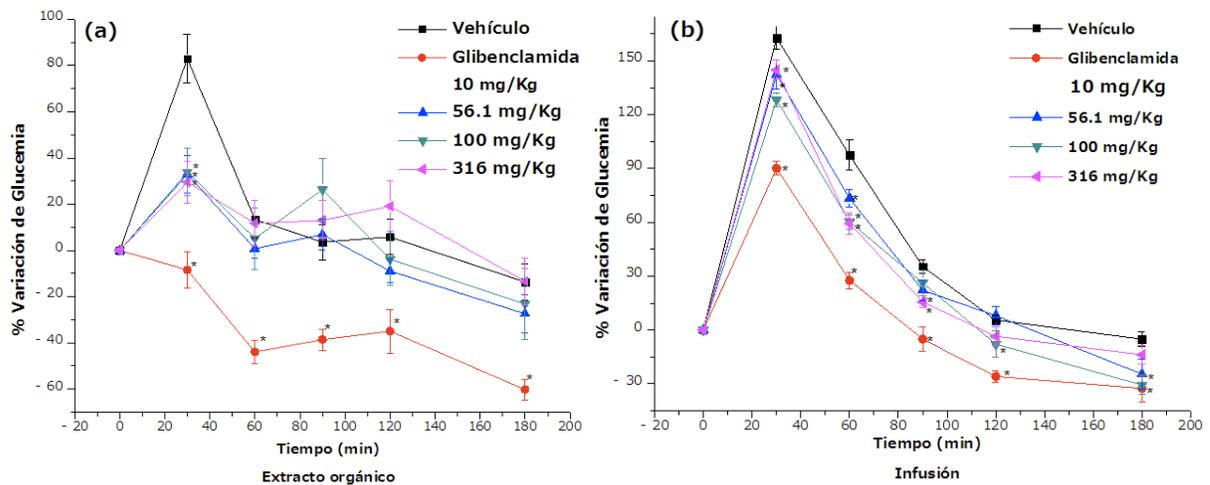


Figura 8. Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre en una prueba de tolerancia a la glucosa en ratones normoglucémicos. Cada punto representa la media de seis determinaciones ($n = 6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunnett $P < 0.05$.

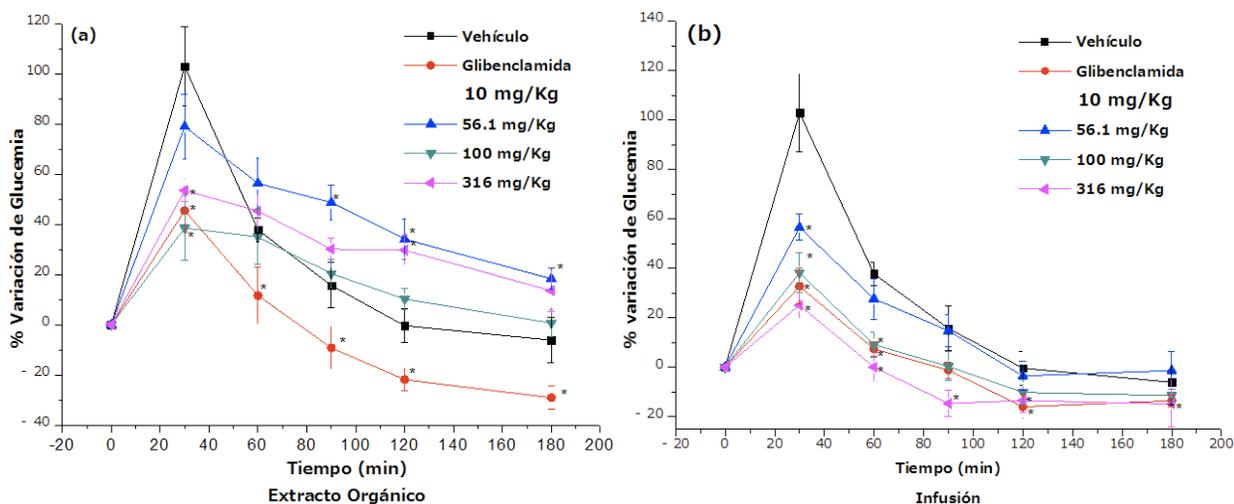


Figura 9. Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre durante una prueba de tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos. Cada punto representa la media de seis determinaciones (n = 6) ± EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett P<0.05.

6.1.3 EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE GLUCEMIA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS EN EXPERIMENTOS DE TOLERANCIA A LA SACAROSA.

La inhibición de α -glucosidasas *in vivo* puede ser demostrada mediante la administración oral de una carga de sacarosa o maltosa previo tratamiento con los extractos o compuestos en estudio, utilizando acarbosa (1) como control positivo. Este fármaco inhibe las α -glucosidasas intestinales que degradan, en este caso, al disacárido y evita la hiperglucemia posprandial (Vershpol, 2002). Esto se vería reflejado en una curva dosis-respuesta de la variación de glucosa en la sangre *versus* el tiempo. La inhibición de la hiperglucemia posprandial se observa a los 30 minutos posteriores a la administración de la carga de sacarosa.

La **Figura 10** representa los ensayos de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos de los extractos orgánico (a) y acuoso (b). El extracto orgánico presentó, al minuto 30, una diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto al vehículo a la mayor dosis administrada (316 mg/Kg). Sin embargo, la dosis no fue suficiente para inducir un efecto similar al de la acarbosa. El extracto acuoso provocó una mejor

inhibición de la hiperglucemia posprandial a las dosis de 100 y 316 mg/Kg. Únicamente a la dosis de 316 mg/Kg se observa un efecto antihyperglucémico similar al del control positivo (5 mg/Kg) (**Anexo 6b**). Los resultados de los ensayos en ratones diabéticos demuestran un efecto antihyperglucémico a todas las dosis administradas de los dos preparados.

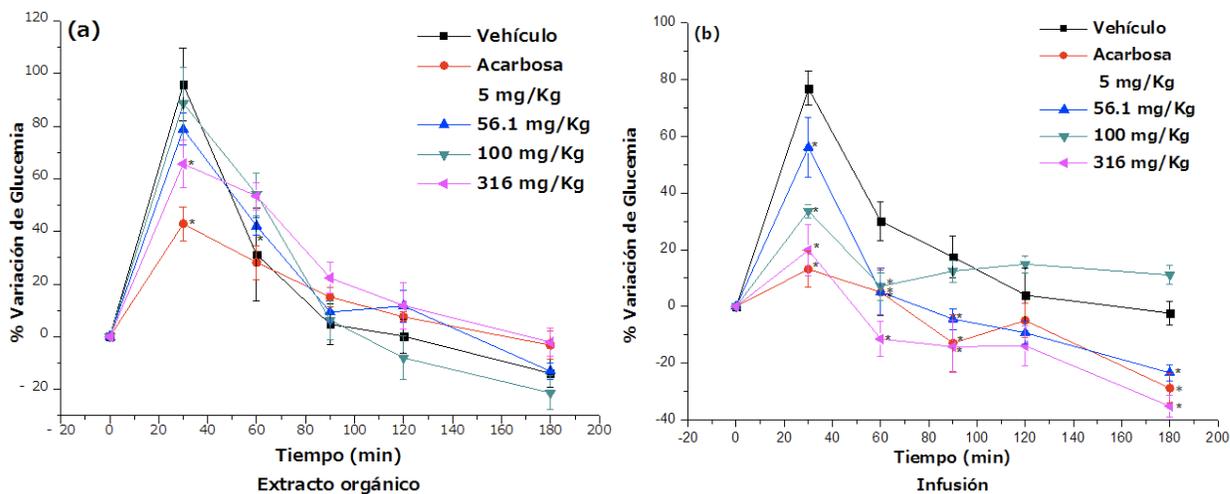


Figura 10. Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre, durante una prueba de tolerancia a la sacarosa (3 g/Kg) en ratones normoglucémicos. Cada punto representa la media de seis determinaciones ($n = 6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett $P < 0.05$.

El menor efecto del extracto orgánico en ratones sanos y diabéticos, en comparación con el de la infusión resulta inexplicable. Un efecto similar al encontrado en el presente trabajo 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 y concluyen que el extracto presenta componentes que además de inhibir a las α -glucosidasas interfieren con el transporte de glucosa, de por sí debilitado en ratones diabéticos.

El efecto de inhibición de hiperglucemia posprandial que provocó la infusión tanto en ratones normoglucémicos como diabéticos (**Figura 11**) y que fue de manera similar al desarrollado por la acarbosa, supone la presencia de compuestos inhibidores de las α -glucosidasas en este extracto. Por esta razón y tomando en cuenta el uso tradicional

de *B. cavanillesii* para el tratamiento de la diabetes, se seleccionó la infusión para llevar a cabo un análisis químico biodirigido que implique el aislamiento de los metabolitos activos como inhibidores de las α -glucosidasas.

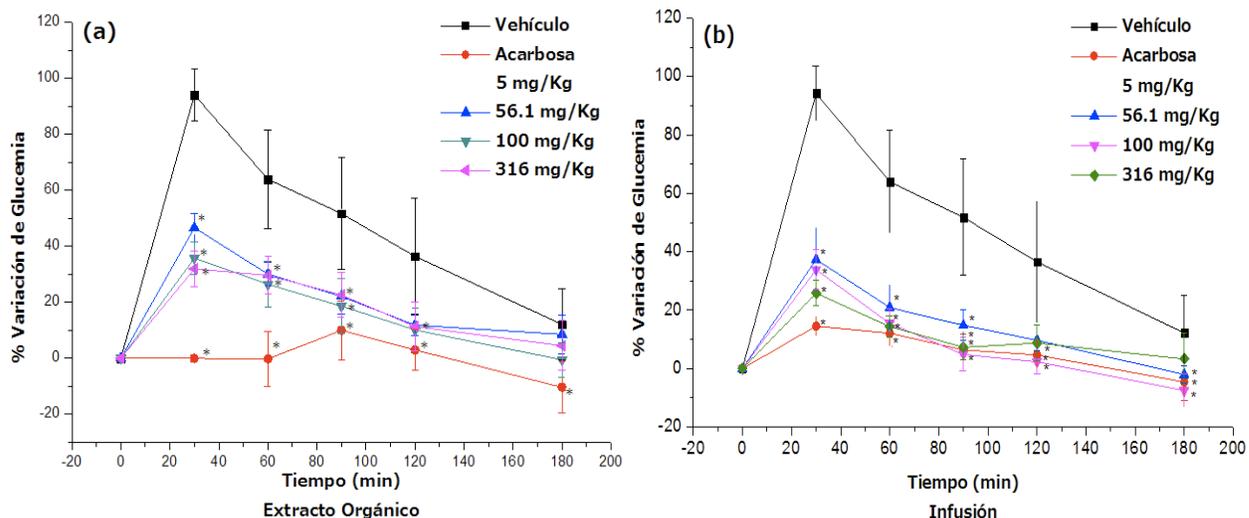
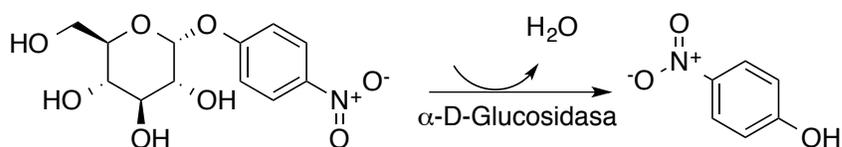


Figura 11. Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre durante una prueba de tolerancia a la sacarosa (3 g/Kg) en ratones diabéticos. Cada punto representa la media de seis determinaciones ($n = 6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunnett $P < 0.05$.

6.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE ALFA-GLUCOSIDASAS.

Los resultados obtenidos en las pruebas *in vivo* de tolerancia a la sacarosa motivaron a realizar la determinación del efecto del extracto acuoso sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas de *Sacharomyces cerevisiae in vitro*. Para ello se utilizó un ensayo espectrofotométrico descrito por Oki y colaboradores (1999); el método se basa en la determinación de la cantidad de sustrato (glucopiranosido de *p*-nitrofenilo) hidrolizado por las enzimas α -glucosidasas provenientes de una fuente natural, en presencia de un inhibidor de la actividad enzimática. La cantidad de *p*-nitrofenol liberada es directamente proporcional a la actividad de la enzima.



El extracto acuoso presentó una CI_{50} de 0.436 ± 0.04 mg/mL en tanto que para la acarbosa fue de 1.12 ± 0.30 mg/mL. Estos datos corroboran que uno de los mecanismos de acción involucrados en la actividad antihiper glucémica del extracto acuoso de *B. cavanillesii* se basa en la inhibición de las enzimas α -glucosidasas.

El extracto acuoso se fraccionó de manera preliminar vía un proceso de reparto con diclorometano. Este procedimiento generó dos fracciones, una acuosa y otra orgánica. Esta última presentó actividad inhibitoria contra las α -glucosidasas; el valor calculado de CI_{50} fue de $0.116 \pm$ mg/mL.

Para identificar los compuestos inhibidores de α -glucosidasas de la fracción activa de la infusión se aplicaron varios procedimientos cromatográficos que condujeron al aislamiento y caracterización de varios compuestos incluyendo varios flavonoides [isoramnetina (**54**), quercetina (**43**), camperol (**53**), flavonas (**51** y **52**)], tres cromenos (**31**, **44** y **45**), tres lactonas sesquiterpénicas (**46**, **47** y **48**), una cumarina (**49**, la herniarina) y el ácido 3,5-dicafeoilquínico (**50**)]. Las estructuras de los compuestos se ilustran en el **Cuadro 4**.

El cromeno **44**, se identificó como un producto natural inédito en la literatura química y los restantes (**45-52**) son novedosos para la especie. Los compuestos (**45-54**) al igual que el cromeno **31** fueron identificados por comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos con aquellos descritos previamente.

Cuadro 4. Compuestos aislados de *B. Cavanillesii*.

N	ESTRUCTURA	N	ESTRUCTURA
31		43	
44		49	
45		51	
46		52	
47		53	
48		54	
50		R =	

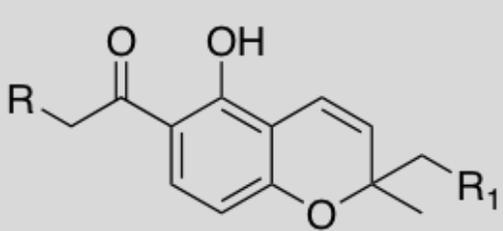
6.2.1 CROMENOS 31, 44 Y 45.

El cromeno **31** se aisló como un sólido amarillo cristalino, en tanto que **44** y **45** se aislaron como aceites amarillos. Las fórmulas moleculares se determinaron por espectrometría de masas como $C_{13}H_{14}O_3$, $C_{13}H_{14}O_4$ y $C_{13}H_{14}O_4$, respectivamente. Entonces los compuestos **44** y **45** resultaron isómeros. La comparación de los datos de RMN (**Cuadro 5**), EM, UV e IR (**Anexo 1**) de **44** y **45** con los del cromeno **31** sugiere una estrecha relación estructural entre los tres compuestos. Así, en los tres casos en el IR se aprecian bandas de absorción características para grupos hidroxilo ($\sim 3451\text{ cm}^{-1}$), carbonilo de cetona conjugada ($\sim 1640\text{ cm}^{-1}$) y aromaticidad (~ 1618 y $\sim 1487\text{ cm}^{-1}$). El espectro de masas en su modalidad de impacto electrónico de **31** presenta una pérdida de 15 unidades de masa a partir del ion molecular $[M^+ - 15]$ para generar el pico base (m/z 203). En el caso de **44** se observaron pérdidas consecutivas de $[M^+ - 15]$ (m/z 219), $[M^+ - 15 - 18]$ (m/z 201, pico base) y $[M^+ - 31]$ (m/z 203). Esta última pérdida es consistente con la presencia de un grupo hidroximetileno en la molécula. Finalmente, en el caso del producto **45** se observa un ion pseudomolecular en una m/z de 335 $[M+H]^+$ en el espectro registrado en la modalidad de ionización por “electrospray”.

Las señales presentes en los espectros de RMN ^{13}C y de 1H (**Cuadro 5**) de los productos **31**, **44** y **45** fueron casi idénticas. La principal diferencia entre los espectros fue la presencia de una señal para una unidad de hidroximetileno $[\delta_H/\delta_C$ 4.82 (s, H-14)/65 (C-14) y δ_H 4.81 (OH-14) en **44**; y δ_H/δ_C 4.82 (s, H-14)/65 (C-14) y δ_H 4.81 (OH-14) en **45**] en lugar del metilo de la función cetona en C-6 de **31** y de uno de los metilos geminales en C-2 en el caso de **45**. Por otro lado, al igual que **31**, los espectros de RMN (**Cuadro 5**, **Figura 12**) de **44** y **45** mostraron absorciones para: un grupo cetona en δ_C 203.6, un hidroxilo fenólico quelatado en $\delta_H \sim 12.55$, un doble enlace *cis* $[\delta_H/\delta_C$ ~ 6.67 (*dd*, $J = 10, 0.5$ Hz, H-4) y ~ 5.68 (*d*, $J = 10$ Hz, H-3)/(116.3, C-4) y 129.7 (C-3)] y dos hidrógenos aromáticos orientados en posición *orto*, $[\delta_H/\delta_C$ 7.55 (*d*, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.34 (*dd*, $J = 9.0, 1.0$ Hz, H-8)/131.1 (C-7) y 109.8 (C-8)]. La presencia de un grupo hidroxilo quelatado en los espectros de RMN 1H de **44** y **45** indica que el grupo ceto y el fenol se encuentran también en disposición *orto*. Por último, el producto **44** presentó

señales para dos grupos metilos geminales [δ_H/δ_C 1.42, s, (H-11 y H-12)/28.6 (C-11 y C-12)] en C-2 y **45** [δ_H/δ_C 1.41, s, (H-11)] para solo un grupo metilo geminal al grupo hidroximetileno.

Cuadro 5. Desplazamientos químicos de RMN ^1H (500 MHz)* y RMN ^{13}C (125 MHz) en CDCl_3 de los cromenos aislados en *B. cavanillesii*.

						
31 : R, R ₁ = H 44 : R = OH, R ₁ = H 45 : R = H, R ₁ = OH						
	^1H (500 MHz) d (ppm) (J en Hz)	^{13}C	^1H (500 MHz) d (ppm) (J en Hz)	^{13}C	^1H (500 MHz) d (ppm) (J en Hz)	^{13}C
	31		44		45	
2	-	77.7		78.9		80.7
3	5.58, <i>d</i> (10)	128.2	5.67, <i>d</i> , (10)	129.8	5.55, <i>d</i> (10)	130.6
4	6.71, <i>d</i> (10)	115.8	6.67, <i>dd</i> (10 y 0.5)	116.3	6.89, <i>d</i> (10.5)	116.6
5	-	159.7	-	161.1	-	159.9
6	-	113.9	-	112.3	-	114.0
7	7.52, <i>d</i> (8.8)	131.6	7.55, <i>d</i> (8.5)	131.1	7.54, <i>d</i> (9.0)	131.1
8	6.33, <i>d</i> (8.8)	108.3	6.34, <i>dd</i> (9.0 y 1.0)	109.7	6.36, <i>dd</i> (8.5 y 0.5)	109.6
9	-	159.6	-	160.0	-	159.8
10	-	108.3	-	110.3	-	110.5
11	1.45, <i>s</i>	28.3	1.42, <i>s</i>	28.6	1.41, <i>s</i>	27.8
12	1.45, <i>s</i>	28.3	1.42, <i>s</i>	28.6	3.66, <i>dd</i> (18 y 12)	68.8
13	-	202.8	-	203.6	-	202.8
14	2.54, <i>s</i>	26.1	4.82, <i>s</i>	65.12	2.54, <i>s</i>	26.1
OH5	12.97, <i>s</i>	-	12.55, <i>s</i>	-	12.96 <i>s</i>	-

Las señales se asignaron con base en las correlaciones observadas en los espectros HMBC, HSQC y COSY.

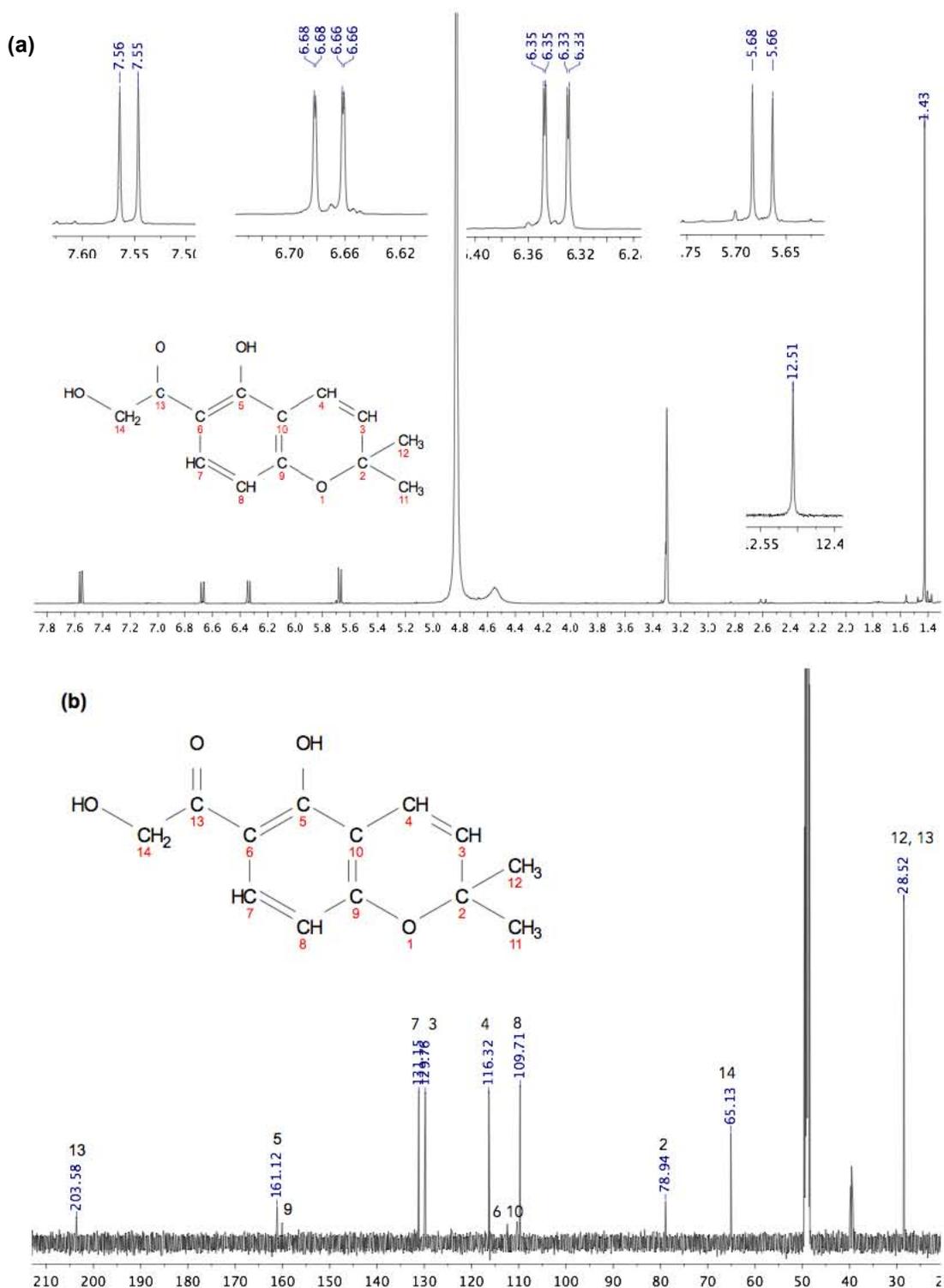


Figura 12. Espectro de RMN ^1H (a) y ^{13}C (b) de **44**.

La ubicación del grupo hidroximetileno en **44** en una posición alfa al grupo ceto (C-13) se estableció con base en los cuadros de conectividad observados en el espectro

HMBC entre C-13/H-14, C-5/H-7 y C-6/H-8 (Figura 13). Por otro lado, las fuertes correlaciones observadas en el espectro de NOESY (Figura 14), entre H-7 y H-14, apoyan esta propuesta.

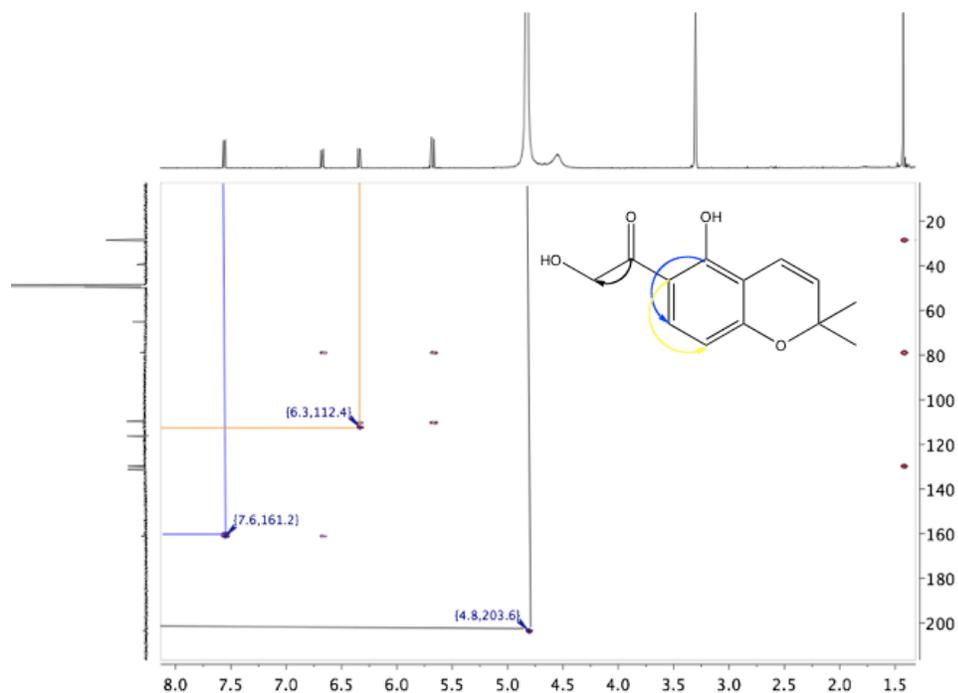


Figura 13. Interacciones HMBC (\rightarrow) observadas en los espectros bidimensionales de RMN del cromeno **44**.

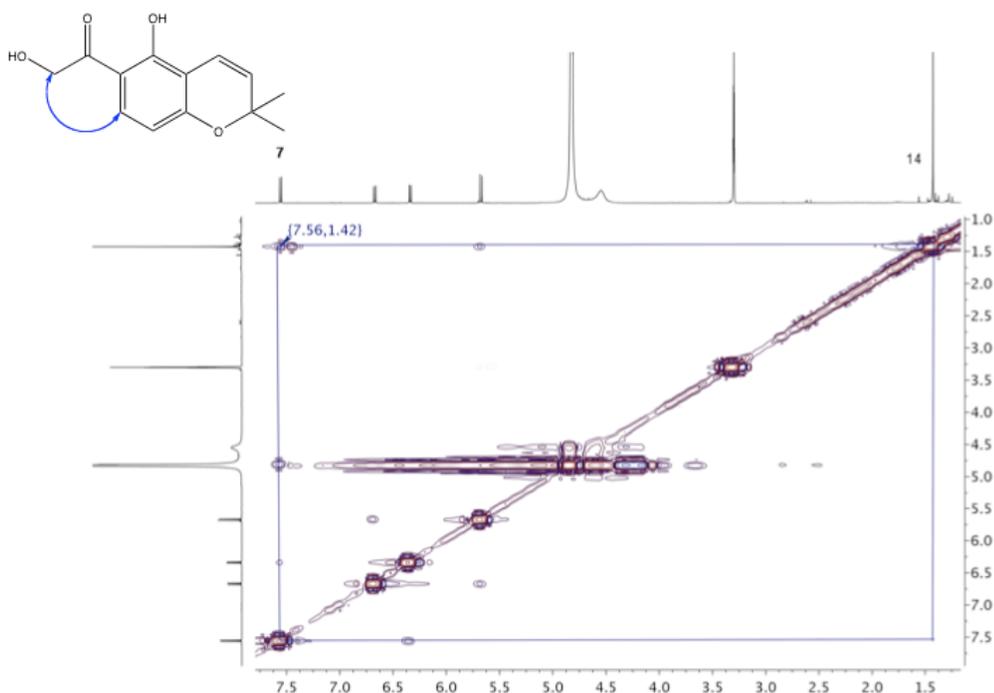


Figura 14. Interacciones NOESY (\leftrightarrow) observadas en los espectros bidimensionales de RMN del cromeno **44**.

La acetilación del cromeno **44** con un equivalente de anhídrido acético y piridina generó el compuesto **44a**, que presenta la señal correspondiente al metileno del alcohol primario paramagnéticamente desplazada a δ_H 5.34. Así el compuesto **44** se caracterizó como 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno.

En el caso de **45** los espectros de RMN resultaron idénticos a los descritos para el 6-acetil-5-hidroxi-2-hidroximetil-2-metil-2*H*-cromeno previamente aislado de los rizomas de *Blepharispermun subsessile* (Kulkarni *et al.*, 1987 y Agarwal *et al.*, 2000).

6.2.2 LACTONAS SESQUITERPÉNICAS 46-48.

Los datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos **46-48**, demostraron una estrecha relación estructural entre sí. Estos compuestos son sustancias sólidas incoloras que presentan puntos de fusión de 167-168 °C, 177-178 °C y 170-172 °C, respectivamente. Las fórmulas moleculares se establecieron mediante la técnica de espectrometría de masas como $C_{22}H_{28}O_8$, $C_{21}H_{26}O_8$ y $C_{21}H_{26}O_8$, respectivamente. En los espectros en el IR se observaron bandas características para hidroxilo en $\sim 3439\text{ cm}^{-1}$, γ -lactona conjugada alrededor de 1770 y 1630 cm^{-1} , y carbonilo de éster conjugado o no conjugado en ~ 1736 y 1694 cm^{-1} , respectivamente; y finalmente, para carbonilo de una cetona α,β -insaturada (1630 cm^{-1}), en el caso de **46** y **47**, y no conjugada en el caso de **48** (1769 cm^{-1}).

El análisis detallado de los espectros de RMN uni- y bidimensionales (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) de los productos **46** y **47** (**Anexos 8** y **9**) permitió definir que son heliangólidas con la función de la lactona *trans* entre C-6/C-7, funciones oxigenadas en C-8, C-9 y C-10, y que poseen un grupo ceto conjugado (**46** y **47**) o no conjugado (**48**) (Quijano *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1982; Herz y Kumar, 1979; Ober *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 2010). Dada la similitud entre **46** y **47** su elucidación estructural se discutirá simultáneamente.

Los espectros de RMN de ^{13}C de **46** y **47** presentaron señales para 22 y 21 carbonos, respectivamente. A campo más bajo se observa la señal para la cetona α,β -insaturada en δ_{C} 204; a continuación se aprecian dos carbonilos de éster en el rango de δ_{C} 165-170, de estos las señales a campo más alto confirman la presencia de ésteres insaturados en las moléculas, en tanto que la señal de δ_{C} 170 es congruente con la presencia de un acetato [δ_{C} 165.3 (C-1') y 170.2 (C-1'') en **46**; δ_{C} 165.3 (C-1') y 170.3 (C-1') en **47**]. En la zona donde absorben las dobles ligaduras se aprecian seis señales que de acuerdo con las correlaciones directas en el espectro HSQC, dos corresponden al metileno exocíclico de la γ -lactona [$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 126.3/ 5.83 (*d*, $J = 1.5$ Hz, H-13) y 6.33 (*da*, $J = 1.5$ Hz, H-13a) para **46**; $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 126.4/ 5.83 (*d*, $J = 1.5$ Hz, H-13) y 6.32 (*da*, $J = 1.5$ Hz, H-13a) en **47**]; otras dos son asignables a una doble ligadura con una configuración *Z* y conjugada a la cetona en el ciclo de diez [$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 125.4/ 6.60 (*d*, $J = 12$ Hz, H-2) y 148.2/ 6.02 (*t*, $J = 12$ Hz, H-3) en **46**; $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ en 125.3/ 6.61 (1H, *d*, $J = 12$ Hz, H-2) y 148.2/ 6.02 (*t*, $J = 11.5$ Hz, H-3) en **47**], el valor de la constante de acoplamiento de 12 Hz entre los hidrógenos correspondientes indica que su configuración es *Z*; las últimas dos señales vinílicas corresponden a las dobles ligaduras conjugadas presentes en los residuos de éster que en el caso de **46** presentó las señales típicas de un angelato [$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 140.9/ 6.09 (*cc*, $J = 7.5$ y 1.5 Hz, H-3')], en tanto que en **47** la de un metacrilato [$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 127.0/6.02 (*c*, $J = 1.5$ HZ, H-3') y 5.55 (*c*, $J = 1.5$ HZ, H-3') en **47**]. La presencia de estos ésteres en las moléculas se evidenciaron en los espectros de masas, así para **46**, se observaron la pérdida de 83 uma a partir del ión molecular en m/z 337 [$\text{M}^+ - 83$] y picos en m/z 83 ($\text{C}_5\text{H}_7\text{O}^+$) y 55 (C_4H_7^+), que son diagnósticos de un residuo de angelato. Por otro lado, en el caso de **47** se observan una serie de fragmentos típicos para un residuo metacrilato que incluyen la pérdida de 85 unidades de masa a partir del ion molecular en m/z 321 y los fragmentos en m/z 85 ($\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_2^+$) y 69 [$\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^+$]. En los dos espectros, se aprecian también los fragmentos característicos para un residuo de ácido acético dados por la pérdida de 42 y 60 unidades de masa a partir del ion molecular.

Continuando con la descripción de los espectros de RMN ^{13}C , en la zona de carbonos unidos a oxígeno, se aprecian cuatro señales, una cuaternaria correspondiente al alcohol terciario en C-10 [δ_{C} 79.0 en **46**; 79.3 en **47**], geminal al

metilo en esa posición y de las tres restantes una es asignable al carbono base de la lactona [δ_C/δ_H 76.3/ 4.58 (*dd*, $J = 12$ y 5 Hz, H-6) en **46**; δ_C/δ_H 76.3/ 4.60 (*dd*, $J = 12$ y 4.5 Hz, H-6) en **47**] y las dos restantes a los carbonos bases de las funciones éster [δ_C/δ_H 74.0/ 5.67 (*dd*, $J = 10$ y 2 Hz, H-8) 73.4/ 5.59 (*d*, $J = 10$, H-8) Hz, H-9) en **46**; 74.4/ 5.62 (*dd*, $J = 9.5$ y 1.5 Hz, H-8) y 73.4/ 5.60 (*d*, $J = 9.5$, H-9) en **47**]. Finalmente, a campo alto se observan señales para dos metinos [δ_C 168.8 (C-12) para **46** y 165.0 (C-12) para **47**], dos metilenos [δ_C/δ_H 126.3/ 5.83 (*d*, $J = 1.5$ Hz, H-13a), 6.33 (*da*, $J = 1.5$ Hz, H-13b), 140.9/ 6.09 (*cc*, $J = 7.5$ y 1.5 Hz, H-3') en **46**; 126.4/ 5.83 (*d*, $J = 1.5$ Hz, H-13) y 6.32 (*da*, $J = 1.5$ Hz, H-13a), 127/ 6.02 (*c*, $J = 1.5$ HZ, H-3'a) y 5.55 (*c*, $J = 1.5$ HZ, H-3'b) en **47**] y varios metilos. En **47** las señales de los metilos fácilmente se asignaron a C-15 [δ_C/δ_H 19.7/ 1.35 (*s*, H-15),] y C-14 [δ_C/δ_H 18.1/ 1.14 (*d*, $J = 6.5$ Hz, H-14)], al metilo del residuo de ácido acético [δ_C/δ_H 20.3/ 2.02 (*s*, H-2'')], y el último a un metilo sobre la doble ligadura del residuo metacrilato [δ_C/δ_H 1.83 (*dc*, $J = 1.5$ Hz, H-4')]. En **46**, además de las señales para los metilos en C-15 [δ_C/δ_H 20.1/ 1.35 (*s*, H-15)], C-14 [δ_C/δ_H 19.7/ 1.14 (*d*, $J = 6.5$ Hz, H-14)], y para el acetato [δ_C/δ_H 20.3/ 2.02 (*s*, H-2'')], se aprecian las señales para los dos metilos del residuo angelato [δ_C/δ_H 15.7/ 1.93 (*dc*, $J = 7.5$ y 1.5 Hz, H-4') y 23.7/ 1.75 (*q*, $J = 1.5$ Hz, H-5')]. Cabe mencionar que la serie de correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC (**Anexos 8 y 9**) permitieron corroborar la ubicación de los sustituyentes en el germacrano.

La disposición *trans* de la lactona en **46** y **47** se estableció con base en las magnitudes de $J_{6,7}$ y $J_{7,11}$ que fueron menor de 3 Hz e igual a 1.5 Hz, respectivamente (Fischer *et al.*, 1979; Yamada *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1982; Wu *et al.*, 2010). Estos valores concuerdan con los encontrados para otras heliangólidas que poseen una γ -lactona *trans*-fusionada entre C-6/C-7. Estos compuestos adoptan conformaciones en las que los ángulos dihedros entre H-6 y H-7 se acercan a los 90°, por lo tanto la constante de acoplamiento entre estos hidrógenos es menor a 3 Hz. Cabe mencionar que estos productos no siguen la regla de Samek y que la asignación de la configuración de la lactona debe hacerse con base en la consideración antes mencionada. (Fischer *et al.*, 1979). Finalmente, las interacciones NOESY H-15/H-14, H-

5, H-9, H-2; y H-7/H-5, H-4, H-8, H-13 [Anexo 10 (1-5)] corroboran la disposición de los hidrógenos en la misma cara de la molécula.

En la presente investigación fue posible corroborar la estructura por rayos X de la caleína C. En la **Figura 15** se ilustra el diagrama correspondiente. De acuerdo a los resultados se confirma la configuración relativa de los distintos centros estereogénicos y más importante aún el cierre *trans* de la lactona en C-6/C-7. En el **Anexo 11** se indican los datos cristalográficos, las coordenadas atómicas ($\times 10^4$), los parámetros de desplazamiento isotrópicos ($\text{Å}^2 \times 10^3$), distancias de enlace [Å], ángulos de torsión, parámetros de desplazamiento isotrópico y los enlaces por puente de hidrógeno.

Con base en la discusión anterior los compuestos **46** y **47** se identificaron como las caleínas A y C, respectivamente aisladas anteriormente de diferentes especies del género *Calea* (Quijano *et al.*, 1979; Herz y Kumar, 1979; Ober *et al.*, 1986; Ferreira *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1982; Wu *et al.*, 2010). Cabe mencionar que Wu y colaboradores (2010) describieron otro producto con la misma disposición de sustituyentes que la caleína A descrita por Quijano y colaboradores (1979); sin embargo, los autores lo designaron como caleína B, error que debe corregirse.

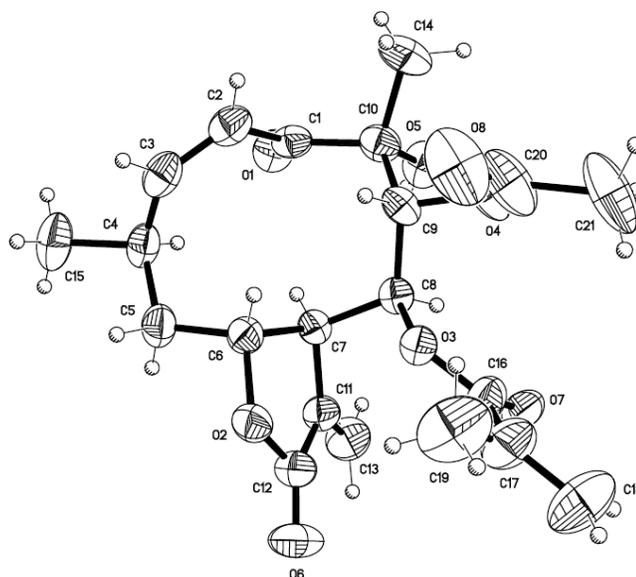


Figura 15. Estructura cristalina de la caleína C (**47**).

El compuesto **48** resultó ser un isómero estructural de la caleína C (**47**), la diferencia estructural entre los dos compuestos es la posición de la doble ligadura del ciclo de diez miembros. En el caso de **48** esta insaturación se encuentra en las posiciones C-3/C-4, y las señales correspondientes en los espectros de RMN se aprecian en δ_C/δ_H 121.5/ 5.91 (*m*, H-3) y δ_C 136.6 (C-4)]; por lo tanto, C-2 es un metileno, cuyos hidrógenos no equivalentes se aprecian en los espectros en δ_C/δ_H 36.1/ 3.08 (*dd*, $J = 16.0$ y 8.5 Hz, H-2a) y 3.59 (*dd*, $J = 16.0$ y 10 Hz, H-2b); las señales para los hidrógenos del metileno en C-5 están desplazados paramagnéticamente, en relación a **47**, en δ_C/δ_H 35.9/ 2.77 (*dd*, $J = 15$ y 4.0 Hz, H-5a) y 2.86 (*dd*, $J = 15$ y 3.5 Hz, H-5b); finalmente, el grupo metilo en C-4 se observa como un singulete ancho en el espectro de RMN ^1H en δ_H 1.86 en lugar del doblete en δ_H 1.14 ($J = 6.5$ Hz) observado en el espectro de **47**. Estos datos espectroscópicos indican que **48** es la calealactona C (**48**), previamente aislada de *Calea urticifolia* (Yamada *et al.*, 2004) y *C. zacatechichi* (Wu *et al.*, 2005).

6.2.3 FLAVONOIDES **43**, **51-54**.

Los espectros de los compuestos **51** y **52** en el UV presentan dos bandas de absorción máxima (λ_{max}) a 266 (banda II) y 330 (banda I) nm. Los espectros en el infrarrojo presentaron como características relevantes bandas de absorción para hidroxilos (banda ancha centrada en ~ 3270 cm^{-1}), carbonilo de γ -pirona (~ 1650 y 1692 cm^{-1}), y aromaticidad (~ 1575 , 1488 y 1440 cm^{-1}) para ambos casos. Las fórmulas moleculares de **51** y **52** se establecieron con base en los espectros de masas obtenidos por la técnica de impacto electrónico. En este caso los iones moleculares $[\text{M}]^+$ se observaron en una relación m/z 284 para ambos compuestos.

Los compuestos presentaron en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C señales típicas de flavonoides con funciones *meta* hidroxiladas en el anillo A [**51**: δ_C/δ_H 93.3/ 6.51 (*d*, $J = 2.0$ Hz, H-8) y 97.2/ 6.31 (*d*, $J = 1.5$ Hz, H-6); **52**: δ_C/δ_H 93.3/ 6.44 (*d*, $J = 2.0$ Hz, H-8) y 98.5 6.26 ppm (*d*, $J = 1.5$ Hz, H-6)]; y el anillo B *p*-sustituido [sistema A_2B_2 ; **51**: δ_C/δ_H

127.1/ 7.78 (*d*, *J* = 9.0 Hz, H-2' y 6'), 113.3/ 6.96 (*d*, *J* = 8.5 Hz, H-3' y 5'); **52**: δ_C/δ_H 127.6/ 7.85 (*d*, *J* = 9.0 Hz, H-2' y 6') y 115.7/ 7.03 (*d*, *J* = 8.5 Hz, H-3' y 5'). La presencia de una señal asignable a H-3 en los espectros (δ_H 6.55) y el número de hidroxilos requeridos por la fórmula molecular indicaron que ambos productos son flavonas. De acuerdo con los datos espectroscópicos obtenidos y comparados con los descritos anteriormente, se llegó a la conclusión que se trata de dos flavonas conocidas, la acacetina (**51**) y la genkwanina (**52**) (Narain, 1976; Bosabalidis *et al.*, 1997).

Los compuestos **43**, **53** y **54** fueron obtenidos como sólidos amorfos amarillos, cuyas fórmulas moleculares $C_{15}O_{10}O_7$, $C_{15}H_{10}O_6$ y $C_{16}H_{12}O_7$ respectivamente, se determinaron mediante los espectros de masas generados por las técnicas de FAB en su modalidad positiva para **43** y **53**, y de impacto electrónico para **54**. Esto permitió determinar los iones pseudo-moleculares $[M+H]^+$ para **43** y **53**; y molecular $[M]^+$ para **54** en una *m/z* de 303, 287 y 316, respectivamente. Los espectros en el UV presentan dos bandas de absorción máxima (λ_{max}) a 264 (banda II) y 364 (banda I) nm, características para estructuras de flavonoides. Los espectros de RMN de 1H , presentaron señales de anillos aromáticos para un sistema AB en **43** [δ_C/δ_H 98.0/ 6.17 (*d*, *J* = 2.1 Hz, H-6) y 93.2/ 6.38 (*d*, *J* = 2.1 Hz, H-8)], **53** [δ_C/δ_H 98.3/ 6.16 (*d*, *J* = 2.1 Hz, H-6) y 93.4/ 6.38 (*d*, *J* = 2.1 Hz, H-8)] y **54** [δ_C/δ_H 93.5/ 6.46 (*d*, *J* = 2.5 Hz, H-8) y 98.2/ 6.18 (*d*, *J* = 2.5 Hz, H-6)], que al igual que los compuestos **51** y **52** corresponden a dos hidrógenos meta relacionados de un anillo A con sustituyentes oxigenados en las posiciones C5 y C7 de un flavonoide. En el caso de **53** y **54** las señales de los hidrógenos del anillo B, trisustituido en las posiciones C-1', C-3' y C-4' conformaron el típico sistema ABX [**53**: δ_C/δ_H 115/ 7.70 (*d*, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 119.8/ 7.60 (*dd*, *J* = 2.1 y 8.5 Hz, H-6') y 115.4/ 6.90 (*d*, *J* = 8.5 Hz, H-5'); **54**: δ_C/δ_H 111.6/ 7.74 (*d*, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 121.7/ 7.67 (*dd*, *J* = 8.5 y 2.0 Hz, H-6') y 115.5/ 6.93 (*d*, *J* = 8.5 Hz, H-5')]. En el caso de **53** las señales el anillo B se aprecian como un sistema A_2B_2 [δ_C/δ_H 129.4/ 8.05 (*d*, *J* = 9.0 Hz, H-2' y 6') y 115.3/ 6.89 (*d*, *J* = 8.5 Hz, H-3' y 5')]. La ausencia de la señal para H-3 y el número de hidroxilos requeridos por la fórmula molecular indicaron, *a priori* que los tres compuestos (**43**, **53** y **54**) eran flavonoles. Los compuestos **43** y **53** que presentan únicamente sustituyentes de tipo hidroxilos se caracterizaron fácilmente como la

quercetina y el camperol, respectivamente, los cuales presentan una alta distribución en la naturaleza (Linn *et al.*, 2000; Kerhoas *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Ha *et al.*, 2012).

El compuesto **54** presentó una señal de metoxilo (δ_C 55.74), por lo cual fue necesario analizar los espectros HMBC y NOESY para asignar su posición en la molécula. Así en el espectro bidimensional NOESY, la señal del metoxilo (δ_H 3.83) correlaciona con el doblete ($J = 2.0$ Hz) en δ_H 7.74 asignable al H-2', por lo tanto el metoxilo debe ubicarse en C-3' (δ_C 115.5). Con base en estas evidencias, este compuesto se caracterizó como la isoramnetina (Yang y Teng, 2007; Lee *et al.*, 2008).

6.2.4 CUMARINA 49.

La cumarina **49** se aisló como un sólido amorfo amarillo. Su fórmula estructural se determinó por espectrometría de masas como $C_{10}H_8O_3$ por el modo de impacto electrónico. En el IR el producto presenta bandas de absorción características para grupos carbonilo de cumarina (1715 cm^{-1}), y aromaticidad (1610 y 1505 cm^{-1}). El espectro de masas de **49** presenta una pérdida de 28 unidades de masa a partir del ión molecular $[M^+ - 28]$ con una m/z 148 y, posteriormente, una pérdida de 15 unidades de masa $[M^+ - 28 - 15]$ para generar el pico base (m/z 133). En las señales de los espectros de RMN de 1H y de ^{13}C del producto **49** se observan: una señal para un grupo metoxilo [δ_H/δ_C 55.78/ 3.879 (s, H-11)]; un doble enlace *cis* [δ_H/δ_C 112.6/ 6.25 (*d*, $J = 9.5$ Hz, H-3) y 143.6/ 7.63 (*d*, $J = 9.5$ Hz, H-4)] y tres hidrógenos aromáticos pertenecientes a un sistema ABX [δ_H/δ_C 128.7/ 7.37 (*d*, $J = 8.5$ Hz, H-5), 113.1/ 6.83 (*dd*, $J = 7.0, 2.5$ Hz, H-6) y 162.8/ 6.85 (*d*, $J = 2.5$, H-8)]. La posición del metoxilo en C-7 fue comprobada por el análisis del espectro NOESY. Fue posible entonces observar la correlación de la señal del metoxilo con los hidrógenos asignables a H-6 y H-8. De acuerdo con los resultados obtenidos para el compuesto **49**, este se identificó como la herniarina, producto natural aislado anteriormente de varias plantas, principalmente de *Matricaria chamomilla* (Elgamal *et al.*, 1979; Petrulova-Poracká *et al.*, 2013).

6.3 EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS SOBRE LAS ENZIMAS ALFA-GLUCOSIDASAS.

Los compuestos **31**, **43-49**, **51-52** y **54**, fueron evaluados para determinar su efecto sobre las enzimas α -glucosidasas *in vitro*. Los compuestos **50** y **53** no se ensayaron debido a sus antecedentes como inhibidores de α -glucosidasas. De tal forma, que el camperol (**53**) es reconocido como potente inhibidor de α -glucosidasas (Tadera, K *et al.*, 2006) y α -amilasas (Lo Piparo. *et al.*, 2008); mientras que el ácido 3,5-dicafeoilquínico (**50**) es inhibidor selectivo de maltasas (Hong Gao *et al.*, 2008). La quercetina (**43**) también ha sido muy estudiada como inhibidor de α -glucoasidasas (Tadera, K *et al.*, 2006). Por lo tanto se tomó como un segundo control positivo en el análisis *in vitro*. El **Cuadro 6** indica los valores de CI_{50} obtenidos para cada uno de los compuestos evaluados.

Cuadro 6. Resultados de la evaluación de la actividad de los compuestos aislados de *B. cavanillesii* sobre la enzima α -glucosidasa *in vitro*.

Compuesto	% Inhibición [2 mM]	CI_{50} (mM)
Acarbosa (1)	80	0.45
6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (31)	60	1.5
6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (44)	86	0.42
6-acetil-5-hidroxi-2-hidroximetil-2-metil-2H-cromeno (45)	75	0.62
Caleína A (46)*	20	-
Caleína C (47)	73	0.48
Caleaclatona C (48)*	33	-
Herniarina (49)	-	-
Acacetina (51)	-	-
Genkwanina (52)	-	-
Isoramnetina (54)	89	0.16
Quercetina (43)	80	0.53

*No presentaron porcentaje de inhibición mayor al 50%.

Entre los compuestos evaluados, los más activos fueron los flavonoles (**54** y **43**), dos cromenos (**44** y **65**) y una lactona sesquiterpénica (**47**). Los flavonoides han sido ampliamente estudiados como inhibidores de α -glucosidasas por varios investigadores. Por ejemplo, Tadera y colaboradores (2006) establecieron la relación estructura

actividad de seis grupos de flavonoides contra α -glucosidasas de levadura, intestinales de rata y α -amilasa pancreática de porcino. Los grupos de flavonoides que presentaron mayor inhibición de α -glucosidasas de levadura fueron las antocianidinas, isoflavonas y flavonoles con CI_{50} menores a 15 μ M; las estructuras que presentaron mayor actividad inhibitoria fueron las correspondientes a los flavonoles e isoflavonas con sustituyentes de tipo hidroxilo en el anillo B como la quercetina y luteolina, respectivamente. Las α -glucosidasas de intestino de rata fueron poco sensibles a flavonoides, antocianidinas e isoflavonas, en general, y sólo flavonoles como la quercetina fueron activos (Tadera *et al.*, 2006). Recientemente, Phan y colaboradores (2013), con base en la evaluación de varios glicósidos de flavonoles, proponen que el hidroxilo libre en C-7 es más importante para la actividad inhibitoria contra α -glucosidasas. Este conjunto de antecedentes se encuentra en armonía con la inactividad de las dos flavonas aisladas. Cabe destacar que las α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae* tienen mayor actividad de tipo sacarasa y son poco eficientes para la hidrólisis de maltooligosacáridos (Nakai *et al.*, 2005; Nishio *et al.*, 2002). Por lo tanto, se podría decir que los compuestos **49**, **51** y **52** son inactivos para inhibir sacarasas; sin embargo, sería necesario realizar ensayos en enzimas de otras fuentes para completar un análisis de selectividad, como demostraron Oki y colaboradores (1999) al observar diferentes actividades inhibitorias de fármacos conocidos como acarbosa y voglibosa contra α -glucosidasas de diferentes fuentes.

Entre las lactonas sesquiterpénicas evaluadas (**46**, **47** y **48**): el compuesto **47** presentó un efecto similar a la acarbosa; sin embargo, **46** y **48** no inhibieron la enzima más de un 50%. Las diferencias estructurales entre los tres compuestos son muy pocas para realizar un análisis de estructura química actividad biológica. Hasta el momento, no se han reportado lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de germacrano como compuestos inhibidores de α -glucosidasas. Existen estudios de otros sesquiterpenos como derivados del cedrol y el acetato de cedrilo (sesquiterpenos tricíclicos); los autores concluyen que el acetato de cedrilo tiene mayor actividad inhibitoria en α -glucosidasas de levadura debido al grupo acetato en la posición C-8; el éster fue más potente que el cedrol y la acarbosa con una CI_{50} de 94, 130 y 780 mM respectivamente.

Además los sustituyentes –OH en estos compuestos disminuyen la actividad, siendo casi nula la de los sesquiterpenos polihidroxilados (Sultan *et al.*, 2013). También se describió el estudio de una lactona sesquiterpénica nueva con esqueleto de guayano (endoperoxisesquiterpen lactona) aislada de flores de *Chrysanthemum morifolium*. Este compuesto demostró un potente efecto inhibitorio sobre α -glucosidasas con una CI_{50} de 229.3 μ M y sobre lipasa pancreática con una CI_{50} de 161.0 mM; pero no fue activa sobre α -amilasas (Thi *et al.*, 2013).

Entre los cromenos evaluados, la escala de inhibición de mayor a menor fue **44** (CI_{50} = 0.42 mM) > **45** (CI_{50} = 0.62 mM) > **31** (CI_{50} = 1.5 mM). Aparentemente, la hidroxilación alfa a la cetona en **44** incrementa la actividad inhibitoria contra la enzima. Al igual que estos compuestos, se han estudiado una serie de cromenonas 3,4 y 3,6-disustituidas, incluyendo nuevos derivados de cromenonas las cuales fueron sintetizadas para evaluar su actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas de intestino de rata. La mayoría de los compuestos presentaron diferentes niveles de inhibición, siendo el compuesto más potente una cromenona que presentaba un grupo 3-acetyl-6-(6-metoxi-3-piridil); la inhibición del producto fue de tipo no-competitivo. Este producto demostró también una actividad antihiper glucémica importante *in vivo* en un ensayo de tolerancia al almidón en ratas Wistar (Raju *et al.*, 2010).

La herniarina (**49**) no presentó actividad inhibitoria de α -glucosidasas en este trabajo. En un estudio anterior se evaluó el efecto de varias cumarinas con estructuras muy similares, incluyendo a la umbeliferona y la esculetina, sobre la actividad de α -glucosidasas (maltasas y sacarasas) y α -amilasas. Los resultados permitieron concluir que el hidroxilo en C-7 desempeña un papel importante para conferir actividad inhibitoria de α -glucosidasas (sacarasas y maltasas). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo para la herniarina (Kato *et al.*, 2008).

6.4 CINÉTICA DE INHIBICIÓN DE LOS COMPUESTOS 44, 47 Y 54.

Los compuestos **44**, **47** y **54** junto con la acarbosa (**1**), fueron seleccionados para realizar ensayos de cinética enzimática con el fin de determinar sus propiedades de inhibición sobre la enzima α -glucosidasa de levadura. Cabe notar que estos tres compuestos presentaron los mayores porcentajes de rendimiento. El proceso de cinética enzimática se realizó mediante el método de Oki y colaboradores (1999) variando las concentraciones tanto del sustrato como del inhibidor. Estos datos permitieron realizar las curvas de Lineweaver-Burk y Dixon para explicar en una forma ilustrativa el tipo de inhibición (Bowden, 1974) y calcular la constante inhibitoria (K_i) para cada compuesto mediante las ecuaciones de Dixon. Con la curva de la doble recíproca (Lineweaver-Burk) se puede determinar de manera sencilla si la inhibición de un producto es competitiva, no competitiva o mixta (Kim *et al.*, 1999). Este método consiste en graficar la recíproca de la respuesta obtenida vs la recíproca de la concentración del sustrato para obtener como resultado, una serie de rectas que pueden intersectar o no en un mismo punto; ya sea el punto en el eje de las abcisas, en el eje de las ordenadas, o entre éstas.

Cuando el abanico de rectas tiene su punto de intersección en el eje de las ordenadas, se trata de una "inhibición competitiva"; es decir, el inhibidor ocupa el sitio catalítico de la enzima de tal forma que el sustrato no puede unirse a éste; pero, una concentración mayor de sustrato podría desplazar al inhibidor del sitio activo de la enzima (Copeland, 2000). Este tipo de comportamiento se observó experimentalmente con la acarbosa (**1**) que al igual que en otros reportes (Kim *et al.*, 1999) presentó una inhibición de tipo competitiva sobre α -glucosidasas de *S. cerevisiae*. En la Figura 16 se ilustra la gráfica de Lineweaver-Burk donde se refleja el comportamiento de la acarbosa (**1**) con una K_i de 0.26 mM.

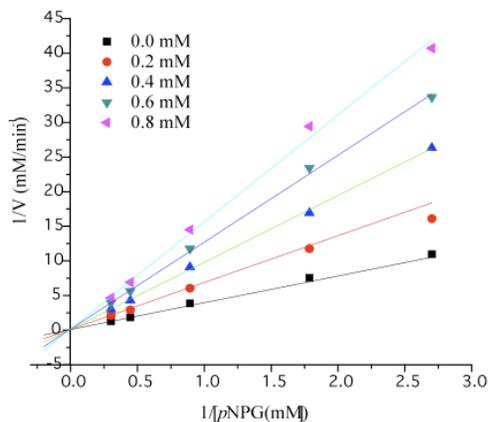


Figura 16. Cinética enzimática de la Acarbosa (1).

En el caso de una inhibición no-competitiva, el inhibidor puede unirse tanto a la enzima como al complejo enzima-sustrato para formar dos tipos de complejos: enzima-inhibidor y enzima-sustrato-inhibidor. Cuando la afinidad del inhibidor por la enzima libre y por el complejo enzima-sustrato es la misma, la representación de Lineweaver-Burk muestra una familia de rectas que tienen en común el punto de intersección con el eje de las abscisas (Cortés *et al.*, 2001). Este tipo de comportamiento se observó experimentalmente en el estudio del cromeno **44** (Figura 17) con una K_i de 0.13 mM. Por lo tanto, el cromeno inhibe de forma no competitiva a las enzimas α -glucosidasas.

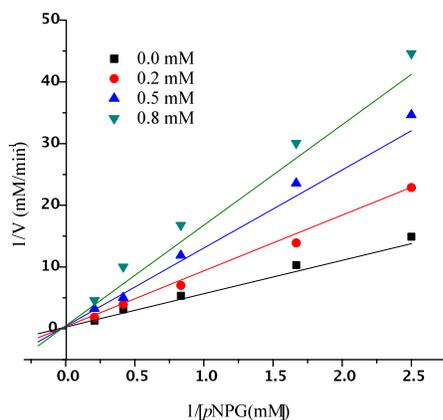


Figura 17. Cinética enzimática del cromeno **44**.

Cuando la inhibición es mixta, las rectas de la gráfica de Lineweaver-Burk se cortan bien por encima o por debajo del eje de las abscisas. Esto indica que puede haber una unión tanto en el sitio activo como alostérica en la enzima (Copeland, 2000). Entre los compuestos analizados, dos de ellos presentaron una inhibición de este tipo, la isoramnetina (**54**) y la caleína C (**47**) con K_i de 0.41 mM y 1.91 mM, respectivamente (**Figura 18**).

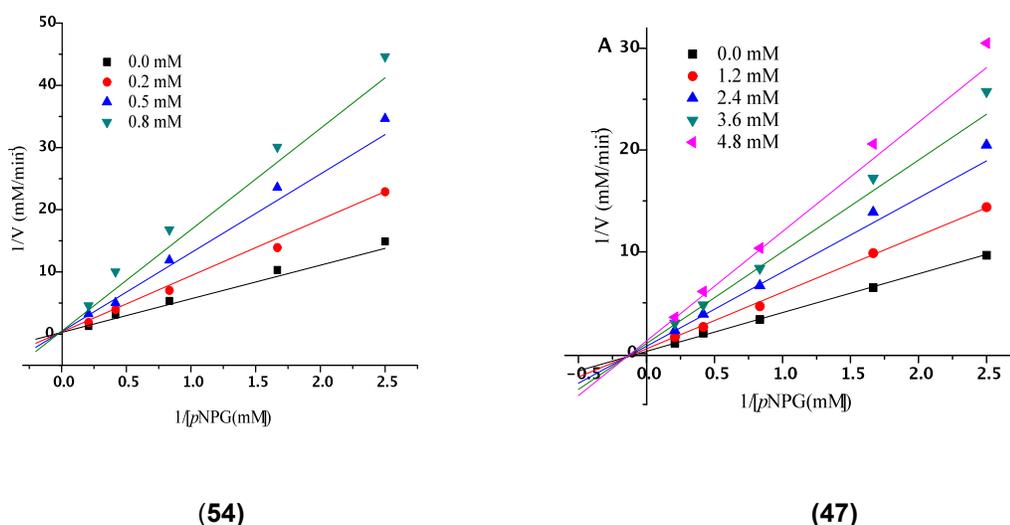


Figura 18. Cinética enzimática de la isoramnetina (**54**) y la caleína c (**47**).

Estos resultados indican la presencia en la infusión de compuestos inhibidores de α -glucosidasas capaces de unirse a diferentes sitios de la enzima para inhibirla.

6.5 ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO Y RECONOCIMIENTO MOLECULAR.

Los resultados anteriores conducen a proseguir con estudios de acoplamiento y reconocimiento molecular (“docking”) para proponer un sitio de interacción de estos compuestos con la enzima y reconocer los grupos funcionales de la molécula que puedan llegar a ser indispensables para la acción inhibitoria. Después de obtener la optimización geométrica de los compuestos, éstos se acoplaron a la proteína completa para observar las mejores conformaciones adquiridas. Posteriormente, se acoplaron en una área más pequeña para refinar los resultados.

La enzima MAL12, perteneciente a la familia GH13, se utilizó para llevar a cabo los análisis de acoplamiento molecular (“docking”); la enzima está formada por una cadena polipeptídica de 576 residuos, similar a glucosidasas de *Bacillus cereus* y *Geobacillus sp.* La enzima está compuesta de tres dominios: los residuos N-terminales (residuos 1-104 y 176-500), el subdominio (residuos 105-175) y el dominio C-terminal (residuos 500-576). Los residuos catalíticos (Asp214, Glu276 y Asp349) se encuentran en el dominio N-terminal, como en todas las glucosidasas de la familia GH13 (Ferreira *et al.*, 2010; Borges de Melo *et al.*, 2006).

Con el fin de mejorar el entendimiento del tipo de inhibición comprobada *in vitro*, se realizó el “docking” de los tres compuestos analizados mediante la cinética enzimática (**44**, **47** y **54**) y de la acarbosa (**1**). Los resultados se ilustran en las **Figuras 19-22**. En el caso de la acarbosa (**1**) (**Figura 19**) se observan cuatro interacciones por puentes de hidrógeno entre los hidroxilos de la glucopiranososa con Asp349, Thr215, Thr307 y Asp408. Además, estos mismos hidroxilos pueden interactuar con más de un residuo del sitio catalítico como Glu276, Asp214 y Phe311. Se ha propuesto que la interacción con los residuos Asp214, Glu276 y Asp349 evita de manera eficaz las rupturas de los enlaces glucosídicos ya que el primero actúa como un nucleófilo y los otros dos como catalizadores de la reacción ácido/base durante el proceso de hidrólisis de azúcares (McCarter y Withers, 1996). Por último, la unidad amino de la acarbosa (**1**) puede interactuar con Glu304. Estos datos son similares a los obtenidos por estudios realizados con difracción de rayos X de un cristal del complejo α -amilasa pancreática de porcino (perteneciente a la familia GH13) con acarbosa; en este caso el seudotetrasacárido fue localizado en el sitio activo de la enzima donde las interacciones más importantes se observaron con los residuos Asp300 y Glu233 (que corresponden a Asp214 y Glu276 para glucosidasas), que forman enlaces por puentes de hidrógeno con los grupos amino e hidroxilos del fármaco (Qian *et al.*, 1994; Legler, 1996; Krasicov *et al.*, 2001). La K_i calculada para la acarbosa fue de 0.024 mM.

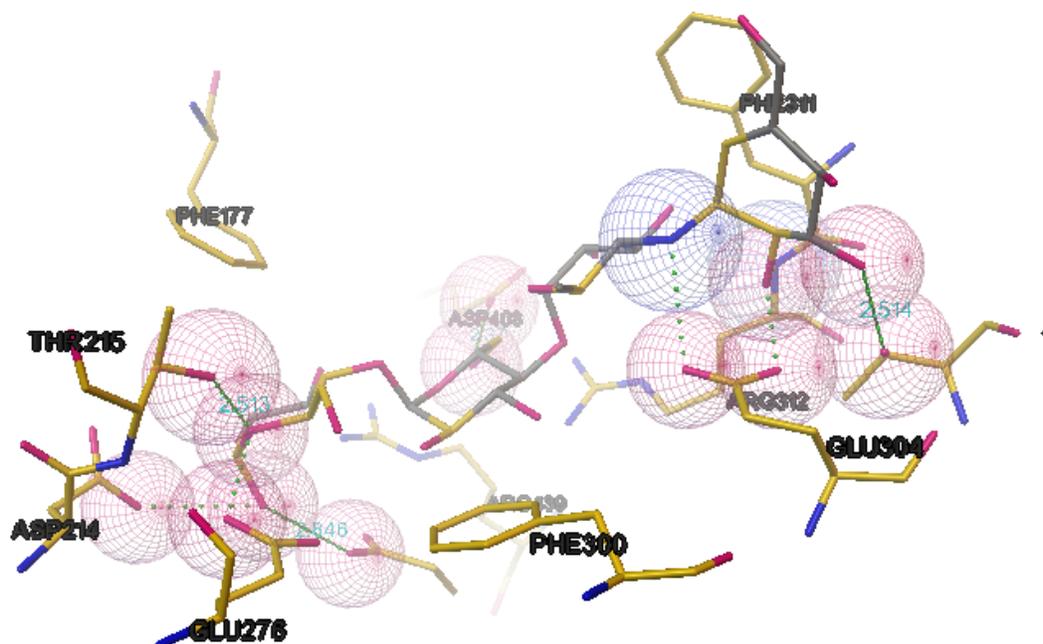


Figura 19. Docking de la acarbosa (1).

El análisis de “docking” de la isoramnetina (7) (**Figura 19**) pronosticó que este flavonoide se puede unir al sitio catalítico de la α -glucosidasa y que forma enlaces por puente hidrógeno con Asp214, Glu304, Arg312, Asp349 y Arg439 a través de los grupos hidroxilos o metoxilo de las posiciones C-4', C-5, C-7 (O:Iso-H:Arg), C-7 (H:Iso-O:Asp) y C-3'. Dos de estos aminoácidos, Asp214 y Asp349, forman parte de los residuos catalíticos de la enzima. La K_i calculada de la isoramnetina fue de 7.9 μ M. Estos resultados apoyan parcialmente las observaciones de otros autores en el sentido de que los grupos hidroxilo del anillo B y en C-7 en flavonoles desempeñan un papel importante en la inhibición de las enzimas (Kato *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Xu, 2010, Lee *et al.*, 2008; Tadera *et al.*, 2006, Phang *et al.*, 2013).

De acuerdo a los análisis de docking y cinética enzimática de la quercetina, miricetina y luteolina, de Xu (2010), el mejor efecto de estos productos se puede atribuir: i) a que los grupos hidroxilo del anillo B pueden formar enlaces de puente de hidrógeno con Asp214, Glu276, y Arg439 ubicados en el sitio catalítico; ii) a que la apertura de la cavidad hidrofóbica de las α -glucosidasas es relativamente estrecha, y la

libre rotación del anillo B de los flavonoides es menor que la de los anillos A y C, lo cual ocasiona que el anillo B entre más fácilmente a la cavidad y forme puentes de hidrógeno con el sitio catalítico; la inhibición mejora aún más con un grupo hidroxilo en C-3' (Xu, 2010). Sin embargo, los resultados experimentales en este trabajo demostraron que la CI_{50} de la isoramnetina (**54**) que posee un grupo metoxilo en C-3', fue menor que la de la quercetina (**43**) la cual posee sus hidroxilos libres en C-3' y C-4'. Además, el análisis por acoplamiento señala que el metoxilo en C-3' también puede formar puente de hidrógeno, aunque con un aminoácido diferente; así **54** interactúa con Arg439 (**Figura 20**) en lugar de Glu276 como lo hace la quercetina (**43**). Otra diferencia con la quercetina es que el hidroxilo en C-7 forma un enlace por puente de hidrógeno con Asp349, otro residuo importante para la actividad catalítica de la enzima (McCarter y Withers, 1994).

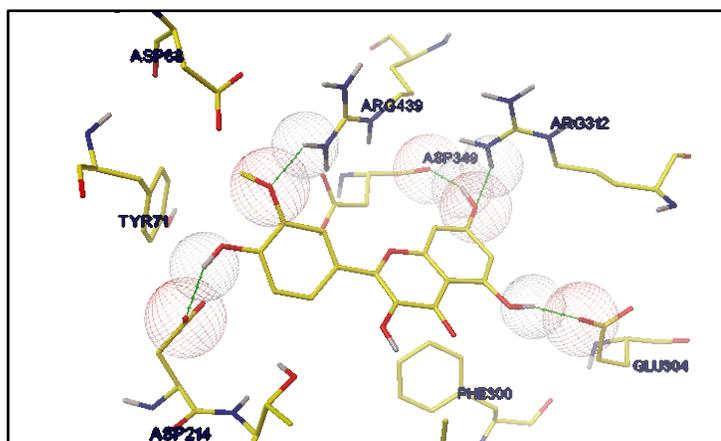


Figura 20. Docking de la isoramnetina (**54**).

El análisis de docking de la caleína C (**47**) también predice que la lactona puede interactuar en el sitio catalítico de la enzima; el valor de K_i calculado fue de $0.30 \mu\text{M}$. En la **Figura 21a**, se ilustra que las principales interacciones de la caleína C (**47**) con la enzima son a través del hidroxilo en C-10 y el carbonilo de la γ -lactona, que forman puentes de hidrógeno con los residuos Glu304 y Arg439, respectivamente. Estos residuos de aminoácido también están involucrados en la interacción con la isoramnetina (**54**) (Glu304 y Arg439) y la acarbosa (**1**) (Glu304). Al parecer, los residuos de éster en C-8 y C-9 no afectarían la actividad inhibitoria en este caso. Estos resultados junto con los porcentajes de inhibición obtenidos para **46-48** fueron motivo

para encontrar en el estudio por “docking” una posible explicación a nivel estructural de las diferencias en la actividad inhibitoria sobre α -glucosidasas de las tres lactonas.

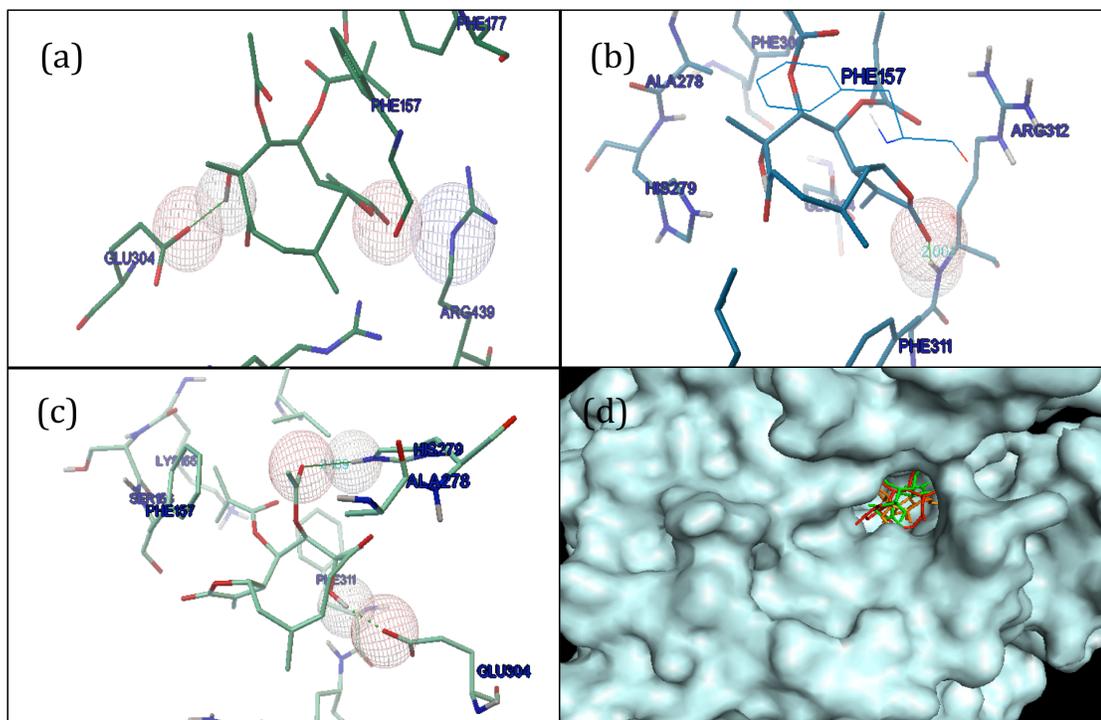


Figura 21. Docking de la caleína C (a), caleína A (b) y calealactona C (c).

En la **Figura 21** se ilustran los diferentes acoplamientos moleculares “docking” de los compuestos **46-48**. Estos resultados revelan que **46 y 48** también podrían entrar al sitio catalítico de la enzima. Sin embargo, las interacciones serían diferentes. Así por ejemplo, la caleína A (**Figura 21b**), al igual que la caleína C puede formar enlace por puente de hidrógeno a través del carbonilo de la lactona con el residuo Arg312 de la enzima pero no participa el hidroxilo en la posición C-10. En tanto que la calealactona C (**48**) forma enlaces de hidrógeno por medio del hidroxilo en C-10 con la Glu304, pero no participa el carbonilo de la γ -lactona. En este caso se puede dar una interacción entre el grupo acetato en C-9 con el aminoácido His279. Sin embargo, el valor de la K_i calculada para este compuesto es mayor ($1.63 \mu\text{M}$) que la de la caleína C ($0.3 \mu\text{M}$). De lo anterior se propone que es necesaria la participación de los dos grupos tanto del carbonilo de la γ -lactona como del hidroxilo de la posición C-10 para obtener una inhibición efectiva.

Finalmente, el cromeno **44** se une con mayor probabilidad a una región diferente del sitio catalítico con un valor de K_i de 13 μM . Éste interactúa con tres residuos del subdominio de la enzima (Ser156, Phe157, Gly159) los cuales pertenecen al área hidrofóbica de MAL12, y con un residuo del dominio N-terminal (Asp408). Esto es consistente con los resultados de inhibición no competitiva en la cinética enzimática.

De igual modo que las calealactonas (**46**, **47** y **48**), los tres cromenos fueron analizados mediante el acoplamiento molecular “docking” para entender mediante una comparación estructural los resultados experimentales. Así se observa en la **Figura 22**, que todos los cromenos (**31**, **44** y **45**) pueden incorporarse en el mismo sitio hidrofóbico de la enzima y que tienen en común la interacción por puente de hidrógeno con el residuo Ser156 y el hidroxilo de la posición C-5. Al parecer, el hidroxilo alfa al carbonilo (cromeno **44**) es más importante para mejorar la actividad inhibitoria ya que este grupo facilita la interacción con un mayor número de residuos (Phe157 y Asp408), como se observó con el cromeno **44** ($K_i = 13 \mu\text{M}$); mientras que el cromeno **45** que posee el hidroxilo en C-11, sólo interactúa por medio de enlace por puente de hidrógeno con Arg312 ($K_i = 32 \mu\text{M}$). Finalmente, el cromeno **31** contó con el menor número de interacciones por enlaces de hidrógeno ($K_i = 69 \mu\text{M}$), además presentó una mayor energía de enlace (**Cuadro 7**). Estos datos teóricos coinciden con los resultados experimentales, y se concluye que la actividad inhibitoria depende de la presencia del hidroxilo alfa al carbonilo. Así la escala de mayor a menor actividad para los cromenos analizados fue de **44 > 45 > 31**.

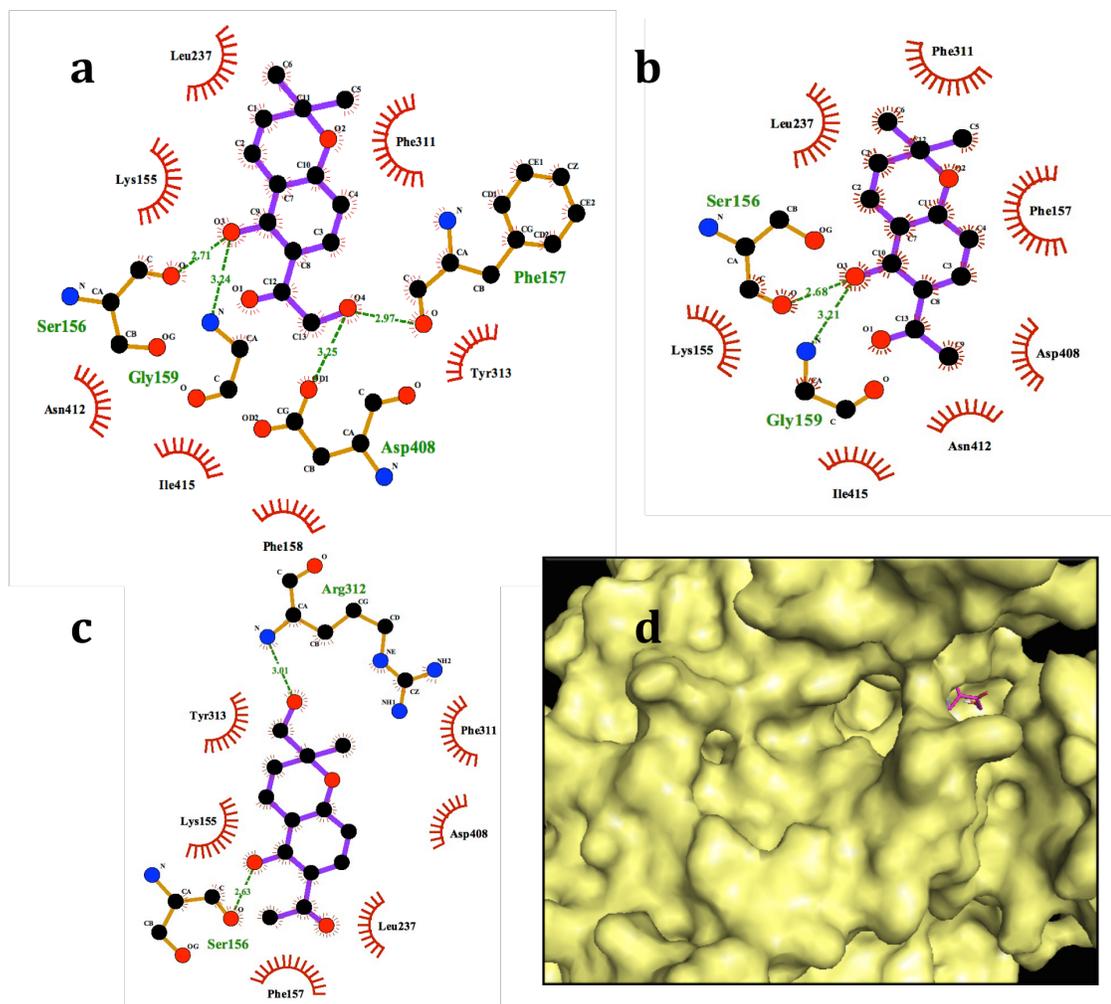


Figura 22. Docking de los cromenos 31 (a), 44 (b), 45 (c) y sitio de interacción con la enzima α -glucosidasa.

Cuadro 7. Datos de CI_{50} experimentales y K_i teóricos de los compuestos 1, 31, 44 y 45, 46, 47 y 48.

Compuesto	CI_{50} (mM)	K_i (docking) (μ M)	Energía de enlace Kcal/mol
1	0.4	0.024	-10.39
31	1.5	69	-5.68
44	0.4	13	-6.47
45	0.6	32	-6.12
46	-	0.74	-8.37
47	0.48	0.3	-8.88
48	-	1.63	-7.9

6.6 EFECTO AGUDO HIPOGLUCEMIANTE DE LOS COMPUESTOS AISLADOS SOBRE LOS NIVELES DE GLUCEMIA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS.

Los compuestos ensayados *in vitro* sobre la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa que presentaron actividad y suficiente rendimiento, fueron seleccionados para realizar ensayos *in vivo* y comprobar su efectividad antihiper glucémica en ratones normoglucémicos y diabéticos. En este caso se evaluaron las dos caleínas (**46 y 47**) y el cromeno **31**. Las dosis de administración se realizaron con base en sus resultados de CI_{50} *in vitro*.

Se inició con el análisis del efecto agudo hipoglucemiante de las caleínas A y C (**46 y 47**). Los resultados indican (**Figura 23 y 24**) que ambos compuestos producen un efecto hipoglucemiante a la mayor dosis administrada en ratones tanto normoglucémicos como diabéticos.

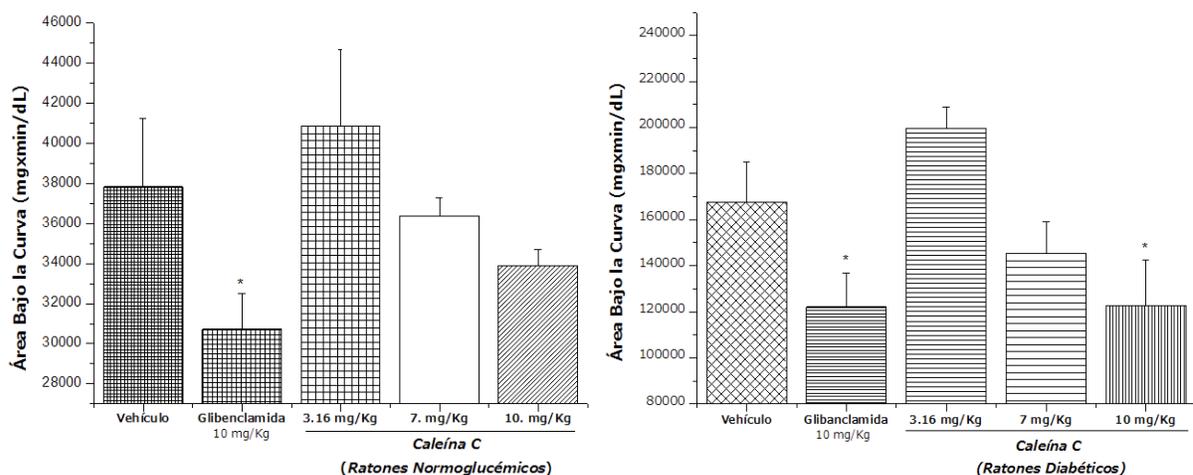


Figura 23. Efecto de la caleína C en los niveles de glucosa en la sangre en ratones normoglucémicos y diabéticos. Cada barra representa la media de seis determinaciones ($n = 6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunnett $P < 0.05$.

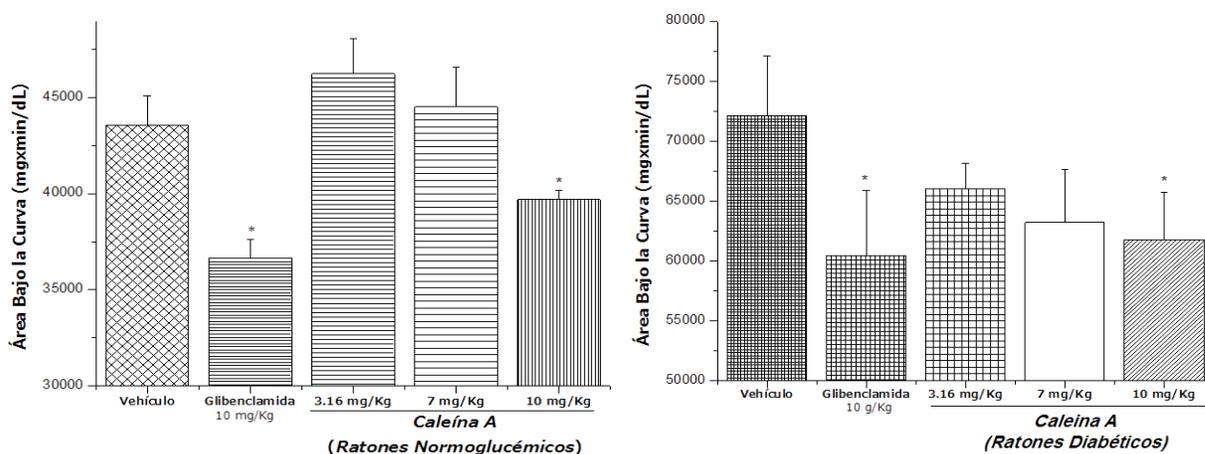


Figura 24. Efecto de la caleína A en los niveles de glucosa en la sangre en ratones normoglicémicos y diabéticos. Cada barra representa la media de seis determinaciones ($n = 6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunnett $P < 0.05$.

El cromeno **31** (**Figura 25**) demostró un efecto hipoglucemiante en ratones normoglicémicos a las dosis de 10 y 31.6 mg/Kg, y en ratones diabéticos a la dosis administrada de 10 mg/Kg. Los resultados anteriores demuestran que los compuestos **31**, **46** y **47** pueden participar en la disminución de los niveles de glucosa en la sangre.

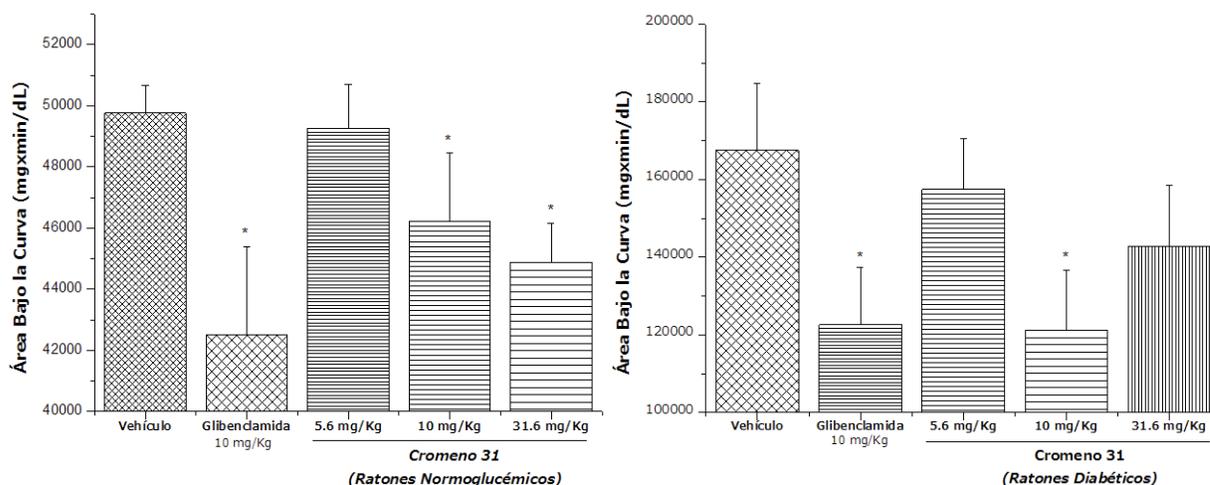


Figura 25. Efecto del cromeno **31** en los niveles de glucosa en la sangre en ratones normoglicémicos y diabéticos. Cada barra representa la media de seis determinaciones ($n = 6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunnett $P < 0.05$.

6.7 EFECTO DE LOS COMPUESTOS AISLADOS SOBRE LOS NIVELES DE GLUCEMIA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS Y DIABÉTICOS EN EXPERIMENTOS DE TOLERANCIA A LA SACAROSA.

Las pruebas de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos y diabéticos de los compuestos **31**, **46** y **47** se realizaron para comprobar su actividad antihiper glucémica mediante el mecanismo de inhibición de α -glucosidasas *in vivo*. Los resultados obtenidos indicaron que las dos caleínas (**46** y **47**) (**Figuras 26 y 27**) presentaron un efecto antihiper glucémico en todas las dosis administradas a ratones normoglucémicos (3.16, 7.0 y 10 mg/Kg). De igual modo, para ambos casos se apreció un efecto de inhibición del pico posprandial similar al de la acarbosa (**1**) a la dosis de 7.0 mg/Kg en ratones diabéticos.

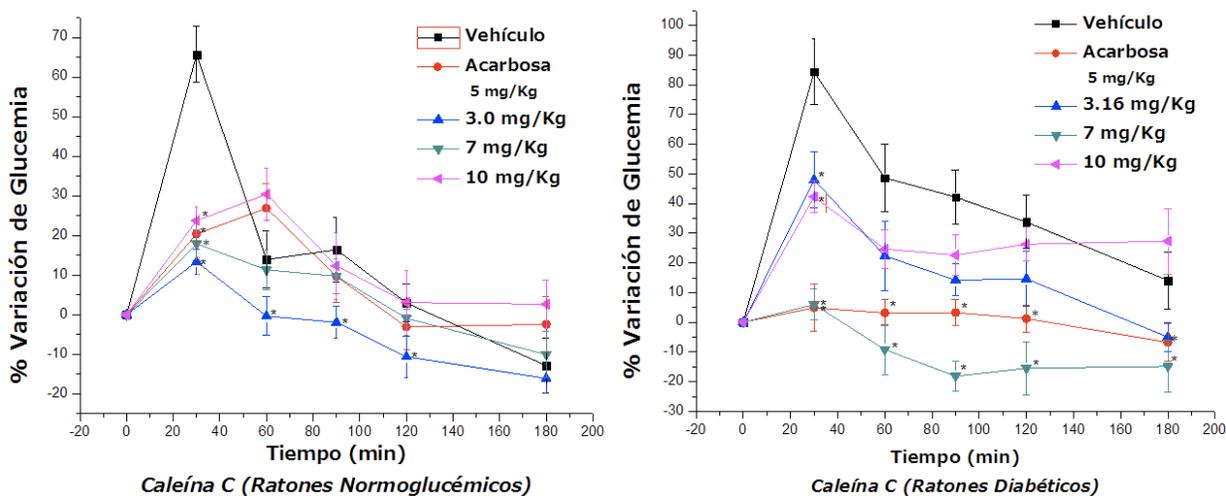


Figura 26. Efecto de la caleína C en los niveles de glucosa en la sangre, usando el método de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos y diabéticos. Cada punto representa la media de seis determinaciones ($n = 6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett $P < 0.05$.

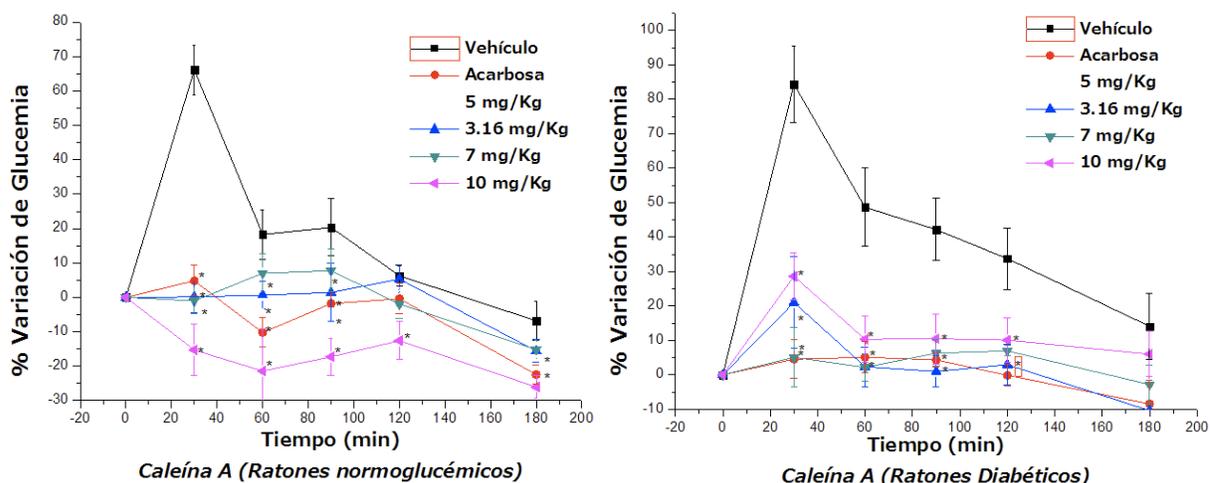


Figura 27. Efecto de la caleína A en los niveles de glucosa en la sangre, usando el método de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos y diabéticos. Cada punto representa la media de seis determinaciones ($n = 6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett $P < 0.05$.

El cromeno **31** también fue estudiado en pruebas *in vivo* para justificar la importancia de la presencia de los cromenos en la infusión como inhibidores de α -glucosidasas. La **Figura 28** ilustra que tanto en ratones normoglucémicos como diabéticos, el cromeno **31** ejerce un efecto antihiperoglucémico en todas las dosis administradas; el mejor comportamiento se observó a la dosis de 10 mg/Kg en ratones diabéticos.

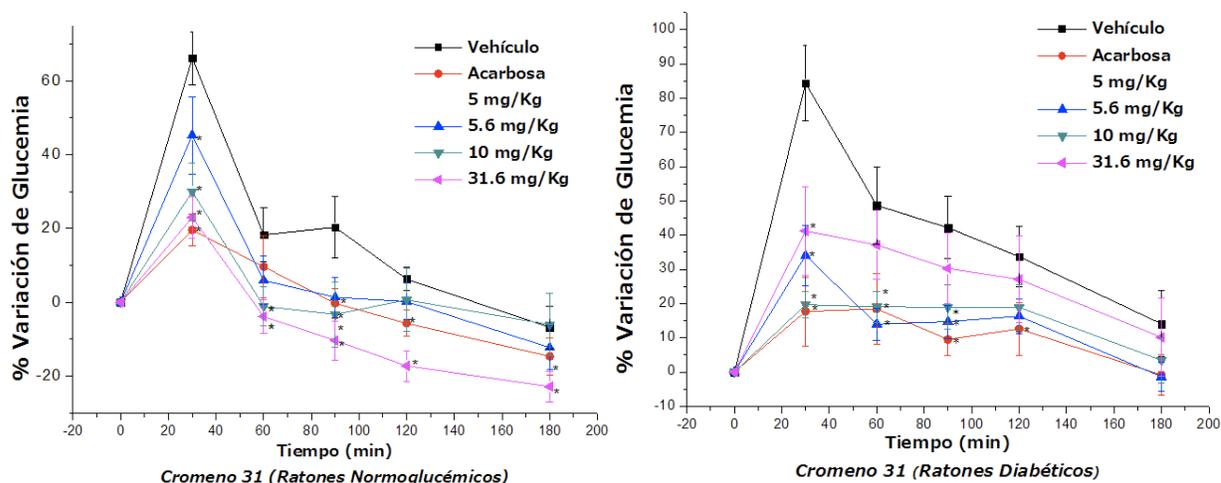


Figura 28. Efecto del cromeno **31** en los niveles de glucosa en la sangre, usando el método de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos y diabéticos. Cada punto representa la media de seis determinaciones ($n = 6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett $P < 0.05$.

Los resultados de los experimentos *in vivo* del efecto agudo hipoglucemiante y tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos y diabéticos, sugieren lo siguiente: i) las caleínas (**46** y **47**) presentan el mismo comportamiento en todos los experimentos, por lo tanto, la diferencia estructural no es relevante en los ensayos *in vivo*. Ambas lactonas presentaron un efecto antihiperoglucémico más evidente en los ratones normoglucémicos. Esto puede ser consecuencia de que la diabetes con frecuencia da lugar a desequilibrios metabólicos graves y cambios patológicos en varios tejidos incluyendo la mucosa intestinal. De tal forma, que en un estado hiperoglucémico (Dudeja *et al.*, 1990) y de deficiencia de insulina (Liu *et al.*, 2011) se observó una sobre expresión y aumento de la actividad de los transportadores de glucosa y disacaridasas en la mucosa intestinal (sacaridasas-isomaltasas) (Den *et al.*, 2011); ii) La desmetilisoencecalina (**31**) demostró actividad tanto hipoglucemiante como antihiperoglucémica a la dosis administrada de 10 mg/Kg.

Con los resultados de los análisis *in vitro* e *in vivo* obtenidos se corrobora la hipótesis del poder antihiperoglucémico de la planta mediante el mecanismo de inhibición de α -glucosidasas. Además se demostró que los preparados contienen compuestos que actúan sobre diferentes blancos de acción, como fue el caso de la desmetilisoencecalina (**31**), las caleínas (**46**, **47** y **48**), la quercetina (**43**), el ácido 3,5-dicafeoilquínico (**50**) y el camperol (**53**) que poseen propiedades hipoglucemiantes y antihiperoglucémicas. Los efectos hipoglucemiantes se pueden atribuir a una estimulación de células beta del páncreas para liberar insulina, la inhibición de procesos degradativos de la insulina, reducción de resistencia a la insulina, un incremento de la glucogénesis o una disminución de la gluconeogénesis, entre otros (Mukherjee, 2006). La quercetina (**43**), es uno de los componentes principales en la infusión activa de *B. cavanillesii*. Este flavonoide provoca un incremento en los islotes pancreáticos, aumentando así la liberación de insulina en ratas diabéticas e incrementa los niveles de la enzima glucocinasa hepática (Vessal *et al.*, 2003). Además el tratamiento con quercetina ejerce un efecto protector en ratas diabéticas por medio de la disminución de estrés oxidativo y preservación de las células β -pancreáticas (Coskum *et al.*, 2005). Este flavonoide mejora el control glucémico por medio de la reducción de absorción de

glucosa intestinal en el nivel de transportadores de glucosa (GLUT) e inhibe el transporte de glucosa y fructosa por GLUT2 en células intestinales. Sin embargo, los dos transportadores de azúcares intestinales más importantes, GLUT5 y SGLT1, no son afectados por este flavonoide (Kwon *et al.*, 2007). Se ha descrito también el resultado benéfico de la quercetina debido a su efecto en el páncreas mediante el uso de la línea celular INS-1 β . Para esto, se estudió el efecto de la quercetina en la secreción de insulina inducida por glibenclamida o glucosa y disfunción de células β inducida por peróxido de hidrógeno. Se observó entonces que la quercetina potencia la secreción de insulina inducida tanto por glucosa como por glibenclamida. Este efecto fue observado al ensayar en islotes de langherhans aislados de rata y además de observar dicho efecto, se notó protección contra el daño inducido por peróxido de hidrógeno en las células β (Youl *et al.*, 2010). La quercetina (**43**) también disminuye el efecto de sacarosas y maltasas *in vivo e in vitro* (Pereira *et al.*, 2011). El ácido 3,5-dicafeoilquínico Es inhibidor selectivo de maltasas (Gao *et al.*, 2008) y tiene actividad antihiper glucémica mediante el efecto de la reducción significativa de la glucosa y lípidos en sangre de ratones con diabetes tipo II. En conjunto con sus isómeros pueden ejercer un posible efecto sinérgico (Song *et al.*, 2011). Finalmente, el camperol (**53**) es reconocido como un potente inhibidor de α -glucosidasas (Tadera, K *et al.*, 2006) y α -amilasas (Lo Piparo. *et al.*, 2008). También este compuesto reduce el daño de las células β pancreáticas bajo condiciones hiper glucémicas al interferir en el metabolismo de las especies de oxígeno reactivas y es protector contra la peroxidación lipídica (Lee *et al.*, 2010). Se demostró que también incrementa el consumo de oxígeno del miocito esquelético, su mecanismo de acción se basa en el incremento de la generación de AMP cíclico y activación de la proteína cinasa A (Da-Silva *et al.*, 2010; Zhang y Liu, 2011). Este flavonoide también modula la expresión pancreática y duodenal de los homeobox-1, y subsecuentemente restaura variables asociadas con el crecimiento, la conservación y el funcionamiento de las células β pancreáticas, incluyendo la señalización mejorada de AMP cíclico y la expresión de la proteína antiapoptótica (Zhang *et al.*, 2012). Finalmente, se ha descubierto que los efectos del camperol en conjunto con las sales biliares pueden inhibir la digestión del almidón (Takahama y Hirota, 2013).

7. CONCLUSIONES

- Se demostró mediante estudios *in vivo* e *in vitro* que la infusión de *B. cavanillesii* posee propiedades hipoglucemiantes y antihiper glucémicas, corroborándose así el uso tradicional de la planta para el tratamiento de la diabetes tipo II. La información generada indica que la infusión de *B. cavanillesii* es eficaz *in vivo* para controlar los niveles de glucosa en ayunas y posprandial en ratones diabéticos. Además el preparado inhibió de manera significativa la actividad de las α -glucosidasas *in vitro*, corroborándose el efecto antihiper glucémico encontrado mediante una prueba de tolerancia a la sacarosa *in vivo*.
- El estudio biodirigido del extracto acuoso de *B. cavanillesii* mediante el ensayo *in vitro* de inhibición de las α -glucosidasas permitió el aislamiento y la caracterización de 13 compuestos incluyendo tres cromenos [6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (**31**) 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (**44**) y 6-acetil-5-hidroxi-2-hidroximetil-2-metil-2*H*-cromeno (**45**)], tres lactonas sesquiterpénicas [caleína A (**46**), caleína C (**47**) y calealactona C (**48**)] cinco flavonoides [quercetina (**43**), acetina (**51**), genkwanina (**52**), camperol (**53**) e isoramnetina (**54**)], el ácido 3,5-dicafeoilquínico (**50**) y una cumarina [herniarina (**49**)]. El cromeno **44** es un producto natural novedoso.
- Con la excepción de las flavonas (**51** y **52**) y la herniarina (**49**), los demás constituyentes aislados parecen contribuir a la eficacia de la especie vegetal para el tratamiento de la diabetes. Los metabolitos activos provocan una disminución de los niveles de glucosa en animales diabéticos a través de varios mecanismos de acción (polivalencia). De tal forma que la planta contiene al menos seis compuestos inhibidores de las α -glucosidasas; de estos, tres se descubrieron en la presente investigación a través de estudios *in vivo* e *in vitro*. Así, las caleínas A y C (**46** y **47**) inhiben las enzimas α -glucosidasas a dosis bajas de forma mixta; además a dosis

mayores son hipoglucemiantes. La caleína A (**46**) no presentó actividad inhibitoria *in vitro* a bajas concentraciones, sin embargo las dosis administradas *in vivo* inhibieron de manera significativa el pico posprandial. El cromeno 6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (**31**) demostró un efecto antihiperoglucémico importante *in vivo* durante la prueba de tolerancia a la sacarosa. Otros, la isoramnetina (**54**), la caleína C (**47**) y los cromenos **31**, **44** y **45** demostraron propiedades inhibitorias de las α -glucosidasas *in vitro*, los más activos fueron el cromeno **44**, la caleína C (**47**), y la isoramnetina (**54**) que actuaron como inhibidores, no competitivo y mixto, respectivamente. Las propiedades inhibitorias de estos tres compuestos también resultaron inéditas. Los cromenos constituyen nuevos prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos inhibidores de las α -glucosidasas.

- La inocuidad de la especie, en conjunto con los estudios de eficacia preclínica desarrollados en el presente estudio, hacen de *B. cavanillesii* un candidato ideal para el desarrollo de un preparado herbolario estandarizado.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abeywickrama KRW, Ratnasooriya WD, Amarakoon AMT (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.
- Agarwal SK, Verma S, Singh S, Tripathi AK, Khan ZK, Kumar S (2000). Antifeedant and antifungal activity of chromene compounds isolated from *Blepharispermum subsessil*. *J Ethnopharmacol* 71, 231-234.
- Aguilar-Contreras A, Xolalpa-Molina S (2005). La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. *Ciencias*, 58, 24-35.
- Aguirre-Crespo F, Castillo-España P, Villalobos-Molina R, López-Guerrero J, Estrada-Soto S (2005). Vasorelaxant effect of Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Pharmaceutical Biology* 43, 6, 540-546.
- Anales del Instituto Médico Nacional, Continuación de "El Estudio". Oficina tipográfica de la secretaría de fomento (1894).
- Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo VII; Oficina tipográfica de la secretaría de fomento. Abril (1905).
- Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo VII; Oficina tipográfica de la secretaría de fomento. (1907)
- Andrade-Cetto A, Heinrich M (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*, 99, 325-348.
- Asano N (2003). Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology* 13, 10, 93R-104R.
- Bailey CJ, Flatt PR (1990). Models for testing new hypoglycemic drugs. En: Bailey CJ, Flatt PR (Eds). *New antidiabetic drugs*. Smith-Gordon. London, 65-82.
- Borges de Melo E, da Silveira Gomez A, Carvalho I (2006). α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* 62, 1027-1032.
- Bosabalidis A, Gabrieli C, Niopas I (1998). Flavones aglycones in glandular hairs of *origanum x intercedens*. *Phytochemistry* 49, 6, 1549-1553.

- Brindis F, Rodríguez R, Bye R, González-Andrade M, Mata RJ (2011). (Z)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -glucosidase inhibitor. *J Nat Prod* 74, 314–320.
- Chiba S (1997). Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 8, 1233-1239.
- Copeland RA (2000). Enzymes, A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis; second edition; Wiley-VCH, 129-135.
- Cortés A, Cascante M, Cardenas ML, Cornish-Bowden A (2001). Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition : new ways of analysing data. *Biochem J* 357, 263-268.
- Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin induced oxidative stress and cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research* 51, 117–123.
- da-Silva WS, Harney JW, Kim BW, Li J, Bianco SDC, Crescenzi A, Christoffolete MA, Huang SA, Bianco AC (2007). The small polyphenolic molecule camperol increases cellular energy expenditure and thyroid hormone activation. *Diabetes* 56, 3, 767-776.
- Deng YX, Chen YS, Zhang WR, Chen B, Qiu XM, He LH, Mu LL, Yang CH, Chen R (2011). Polysaccharide from *Gynura divaricata* modulates the activities of intestinal disaccharidases in streptozotocin-induced diabetic rats. *British Journal of Nutrition* 106, 1323-1329.
- Elgamal MHA, Elewa NH, Elkhisy AM, Duddeck Helmut (1979). ^{13}C NMR Chemical shifts and carbon-proton coupling constants of some furocoumarins and furochromones. *Phytochemistry* 18, 139-143.
- Fischer NH, Olivier EJ, Fischer HD (1979). The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. progress in the chemistry of organic natural products 38, 58-87.
- Ferreira SB, Soderro ACR, Cardoso MFC, Lima ES, Kaiser CR, Silva FP, Jr., Ferreira VF (2010). Synthesis, Biological activity, and molecular modeling studies of 1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates as α -glucosidases Inhibitors. *J Med Chem* 53, 2364-2375.

- Flores S, Herrán J (1960). Atanasina: A new flavone isolated from *Brickellia squarrosa* (Cav) Robinson. *Chemistry and Industry* 12, 291.
- Flores S, Herrán J (1958). The structure of pendulin and penduletin: a new flavonol glucoside isolated from *Brickellia pendula*. *Tetrahedron* 2, 308-315.
- Ha TJ, Lee JH, Lee MH, Lee BW, Kwon HS, Park CH, Shim KB, Kim HT, Baek IY, Jang DS (2012). Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against α -glucosidase and aldose reductase. *Food Chemistry* 135, 1397-1403.
- Holt RIG, Cockram C, Flyvbjerg A, Goldstein BJ (2010). Textbook of diabetes. 4^o edición, Wiley-Blackwell. 471-474.
- Hong G, Yi-Na H, Pei-Yu X, Jun K (2007). Inhibitory effect on α -glucosidase by the fruits of *Terminalia chebula* Retz. *Food Chemistry* 105, 628-634.
- Hong G, Yi-Na H, Bo G, Pei-Yu X, Chika I, Jun K (2008). α -Glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food Chemistry* 106, 1195-1201.
- Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).
- Hertz W, Kumar N (1980). Sesquiterpene lactones of *Calea zacatechichi* and *C. urticifolia*". *Phytochemistry* 19, 593-597.
- Israili ZH (2011). Advances in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Ther* 18, 117-152.
- IDF, diabetes ATLAS, 5^a edición, 2012. Nuevos estimados para 2012 de estimados de prevalencia de diabetes, mortalidad y gastos.
- Jinqiu Z, Viñas R, Smith E (2008). *In vitro* evaluation of human liver cancer cells and the potencial cytotoxicity of *Tecoma stans* (Bignoniaceae) and *Brickellia cavanillesii* (Asteraceae) both single and in combination. *Toxicological & Environmental Chemistry* 90, 4, 801-808.
- Joung T, Hwan J, Lee MH, Won B, Sook H, Park CH, Shim KB, Kim HT, Baek IY, Jang DS (2012). Isolation and identification of phenolic compounds from the

- seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against α -glucosidase and aldose reductase. *Food Chemistry* 135, 1397-1403.
- Kato A, Minoshima Y, Yamamoto J, Adachi I, Watson AA, Nash RJ (2008). Protective Effects of Dietary Chamomile Tea on Diabetic Complications; *J Agric Food Chem* 56, 8206–8211.
 - Kerhoas L, Aouak D, Cingoz A, Routaboul J-M, Lepiniec L, Einhorn J y Birlirakis N (2006). Structural characterization of the major flavonoid glycosides from *Arabidopsis thaliana* seeds. *J Agric Food Chem* 54, 6603-6612.
 - Kim JH, Ryu YB, Kang NS, Lee BW, Heo JS, Jeong IY, Park KH (2006). Glycosidase inhibitory flavonoids from *Sophora flavescens*. *Biol Pharm Bull* 29, 2, 302-305.
 - Kim MJ, Lee SB, Lee HS, Lee SY, Baek JS, Kim D, Moon TW, Robyt JF, Park KH (1999). Comparative study of the inhibition of alpha-glucosidase, alpha-amylase, and cyclomaltodextrin glucanosyltransferase by acarbose, isoacarbose, and acarviosine-glucose. *Arch Biochem Biophys* 371, 277–283.
 - Krasikov VV, DKarelov DV, Firsov LM (2001). α -Glucosidases. *Biochemistry (Moscow)* 66, 3, 267-281.
 - Kulkarni MM, Nagasampagi BA, Desphande SG, Sharma RN (1987). Five chromenes from *Blepharispermum subseeile*. *Phytochemistry* 26, 11, 2969-2971.
 - Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, Levine M (2007). Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids; *FASEB J* 21, 366-377.
 - Lee E, Moon BH, Park Y, Hong S, Lee S, Lee Y, Lim Y (2008). Effects of hydroxy and methoxy substituents on NMR data in flavonols. *Bull Korean Chem Soc* 29, No. 2
 - Lee IY, Errol JO, Lowell EU, Nikolaus HF (1982). Two sesquiterpene lactones of *Calea ternifolia* var. *Calyculata*. *Phytochemistry* 21, 9, 2313-2316.
 - Lee YJ, Suh KS, Choi MC, Chon S, Oh S, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS (2010). Kaempferol protects HIT-T15 Pancreatic beta cells from 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative damage. *Phytother Res* 24, 419-423.

- Linn W, Wofford M, Elizabeth M, Posey M (2009). Pharmacotherapy in Primary Care; Mc Graw Hill, USA, 279-288.
- Liu L, Yu YL, Liu C, Wang XT, Liu XD, Xie L (2011). Insulin deficiency induces abnormal increase in intestinal disaccharidase activities and expression under diabetic states, evidences from *in vivo* and *in vitro* study. *Biochem Pharmacol* 82, 1963-1970.
- Lo Piparo E, Scheib H, Frei N, Williamson G, Grigorov M, Chou CJ (2008). *J Med Chem* 51, 3555-3561.
- Loaeza A (1907). *An Inst Med Nac* 9, 303-304.
- Mant J, Bakhshi L, Cullen K, Davies M, Diaz J. Elster B (2008). Type 2 Diabetes; Royal College of Physicians; Londres Inglaterra.
- Marles RJ, Farnsworth NR (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2, 2, 137-189.
- Martínez M (1989). Las plantas medicinales de México. Editorial Botas, México, DF.
- Mata R, Cristians S, Escandón-Rivera S, Juárez-Reyes K, Rivero-Cruz I (2013). Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *J Nat Prod* 76, 3, 468-483.
- Matsui T, Ogunwande IA, Abesundara KJM, Matsumoto K (2006). Anti-hyperglycemic potential of natural products. *Mini-Rev Med Chem* 6, 109-120.
- McCarter JD, Withers SG (1996). Glycosyl Fluorides cerevisiae α -glucosidase using 5-fluoro the catalytic nucleophile of *Saccharomyces*. *J Biol Chem* 271, 6889-6894.
- Moore M (1990). Los Remedios: Traditional Herbal Remedies of the Southwest. Red Crane Books: Santa Fe, NM, pp 48.
- Nakai H, Okuyama M, Kim Y, Saburi W, Mori H, Chiba S, Kimura A (2005). Molecular analysis of α -glucosidase belonging to GH family 31.; *Biologia (Bratislava)* 60, Suppl 16, 131-135.
- Narain NK (1976). Spectroscopic Studies of a Less Abundant Flavone, Genkwanin. *Spectroscopy Letters* 9, 12, 865-875.

- Nicholson MS, Arzeni CB (1993). The market medicinal plants of Monterrey, Nuevo León, México. *Econ Bot* 47, 184-192.
- Nishio T, Hakamata W, Kimura A, Chiba S, Takatsuki A, Kawachi R, Oku T (2002). Glycon specificity profiling of α -glucosidases using monodeoxy and mono-*O*-methyl derivatives of *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside. *Carbohydrate Research* 337, 629-634.
- Noriega J (1902). Curso de Historia de drogas.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
- Ober AG, Urbatsch LE, Fischer NH (1985). Guaianolides and chromenes from *Calea species*. *Phytochemistry* 24, 4, 795-199.
- Oki T, Matsui T, Osajima Y, (1999). Inhibitory effect of α -glucosidase, inhibitors varies according to its origin. *J Agric Food Chem*, 47, 550-553
- Organización Mundial de la Salud (2004). Marketing and Dissemination, World Health Organization, Geneva Switzerland.
- Palacios Espinosa, (2009). Pruebas selectas de identidad, eficacia y composición de *Brickellia cavanillesii* (Cass) A. Gray y *B. Veronicifolia* (Kunth) A. Gray (Asteraceae). Tesis de doctorado UNAM.
- Phan M, Wang J, Tang J, Lee YZ, Ng K (2013). Evaluation of α -glucosidase inhibition potencial of some flavonoids from *Epimedium brevicornum*. *Food Science and technology* 53, 492-488.
- Petrułova-Poracká V, Repečak M, Vilková M, Imrich J (2013). Coumarins of *Matricaria Chamomilla* L: Aglycones and Glycosides. *Food Chemistry* 141, 54-59.
- Poss JE, Jezewski MA, Stuart AG (2003). Home Remedies for Type 2 Diabetes Used by Mexican Americans in El Paso, Texas. *Clin Nurs Res* 12, 4, 304-323.
- Prabhakar PK, Doble M (2011). Mechanism of action of natural products used in the treatment of *Diabetes Mellitus*. *Chin J Integr Med* 17, 8, 563-574.
- Qian M, Haser R, Buisson G, Duée E, Payan F (1994). The active center of a mammalian alpha-amylase. Structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 33, 6284-6294.

- Quijano L, Romo de Vivar A, Rios T (1979). *Phytochemistry* 18, 1745-1747.
- Raju BC, Tiwari AK, Kumar JA, Ali AZ, Agawane SB, Saidachary G, Madhusudana K (2010). α -Glucosidase inhibitory antihyperglycemic activity of substituted chromenone derivatives; *Bioorg Med Chem* 18, 358-365.
- Rodríguez-López J, Moreno-Escobar A, Avila-Torres O, Tlahuext H (2006). 6-Acetyl-5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene. *Acta Cryst*, Section E. Structure Reports. E62, o3616–o3617.
- Ross S, Gulve E, y Wang M (2004). Chemistry and Biochemistry of Type 2 diabetes. *Chem Rev*, 104, 1255-1282.
- Song C, Xie C, Zhou Z, Yu S, Fang N (2012). Antidiabetic effect of an active components group from *Ilex kudingcha* and its chemical composition. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012, ID 423690.
- Szkudelski T (2001). The Mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50, 536-546.
- Soumyanath A (2006). Traditional Medicines for Modern Times. Vol. 6. Antidiabetic Plants. Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, p 314.
- Srinivasan K, Ramarao P (2007). Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res* 125, 451-472.
- Handa S S, Khanuja S P S, Longo G, Rakesh D D (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. Trieste, Italy.
- Sultan S, Choudhary M, Khar SN, Fatima U, Atif M, Ali A, Fatmi Q (2013). Fungal transformation of cedryl acetate and α -glucosidase inhibition assay, quantum mechanical calculations and molecular docking studies of its metabolites. *Eur J Med Chem* 62, 764-770.
- Tadera K, Minami Y, Takamatzu K, Matsuoka T (2006). Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 52, 149-153.
- Takahama U, Hirota S (2013). Effects of starch on nitrous acid-induced oxidation of kaempferol and inhibition of α -amylase-catalysed digestion of starch by

- kaempferol under conditions simulating the stomach and the intestine. *Food Chemistry* 141, 313-319.
- Thi L, Tram LH, Hanh HH, Binh PT, Dang NH, Minh CV, Dat T (2013). Inhibitors of α -glucosidase, α -amylase and lipase from *Chrysanthemum morifolium*. *Phytochemistry Letters* 6, 322-325.
 - Tundis, R, Loizzo MR, Statti GA, Menichini F (2007). Inhibitory effects on the digestive enzyme α -amylase of three *Salsola* species (Chenopodiaceae) *in vitro*. *Pharmazie* 62, 473-475.
 - Tundis R, Loizzo MR, Menichini F (2010). Natural Products as α -Amylase and α -glucosidase inhibitors and their hipoglycaemic potential in the treatment of diabetes: An update. *Mini-Rev Med Chem* 10, 315-331.
 - Vessala M, Hemmatia M, Vasei M (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 135C, 3, 357-364.
 - Verspohl EJ (2002). Recommended testing in diabetes research. *Planta Med* 68, 581-90.
 - Yamada M, Matsuura N, Suzuki H, Kurosaka C, Hasegawa N, Ubukata M, Tanaka T, Linuma M (2004). Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry* 65 3107–3111.
 - Yang X y Teng J (2007). Chemical constituents of the unripe fruits of *Evodia rutaecarpa*. *J Chin Pharma Sci* 16, 20-23.
 - Wang H, Dub YJ, Song HC (2010). α -Glucosidase and a-amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry* 123, 6-13.
 - Wardrop DJ, Waidyarachchi SL (2010). Synthesis and biological activity of naturally occurring α -glucosidase inhibitors. *Nat Prod Rep* 27, 1431-1468.
 - Williamson EM, Opako DT, Evans FJ (1996). *Pharmacological methods in phytotherapy research*. Vol 1. Ed. Jonh Wiley & Sons, NewYork, pp 1-228
 - Wu H, Fronczek FR, Burandt CL Jr, Zjawiony JK (2011). Antileishmanial germacranolides from *Calea zacatechichi*. *Planta Med* 77, 749-753.
 - Xu H (2010). Inhibition kinetics of flavonoids on yeast α -glucosidase merged with docking simulations. *Protein Pept Lett* 17, 1270-1279.

• 9. ANEXOS

ANEXO 1. DATOS ESPECTROSCÓPICOS Y ESPECTROMÉTRICOS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.

6-Acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (31). Cristales amarillos; UV (MeOH) ($\log \epsilon$) λ_{\max} nm: 265 (4.48) y 310 (3.82); IR ν_{\max} cm^{-1} : 2974, 2931, 1638 (C=O), 1614, 1578, 1485, 1425, 1375, 1368, 1272, 1124, 1109, 1071, 1021; ^1H -RMN (CD_3OD , 500 MHz): δ 12.61 (OH-5), 7.60 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-7), 6.66 (1H, *dd*, $J = 10$ Hz, $J = 0.5$ Hz, H-4), 6.36 (1H, *dd*, $J = 9.0$ Hz, $J = 1.0$ Hz, H-8), 5.67 (1H, *d*, $J = 10$ Hz, H-3), 5.34 (2H, *s*, H-14), 2.17 (3H, *s*, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 1.42 (6H, *s*, H-11 and H-12); 202.8 (C-11), 159.7 (C-5), 159.6 (C-9), 131.6 (C-7), 128.2 (C-3), 115.8 (C-4), 113.9 (C-6), 108.3 (C-8 y C-10), 77.7 (C-2), 28.3 (C-13 y C-14), 26.1 (C-12). EI-MS m/z 218 $[\text{M}]^+$, 203 (100).

6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (44). Aceite amarillo; UV (MeOH) ($\log \epsilon$) λ_{\max} nm: 265 y 310; IR ν_{\max} cm^{-1} : 3451 (-OH), 2974, 2931, 1640 (C=O), 1618, 1576, 1487, 1428, 1362, 1280, 1164, 1109, 1076, 1022; RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz): δ 12.61 (OH-5), 7.52 (1H, *d*, $J = 8.8$ Hz, H-7), 6.71 (1H, *d*, $J = 10$ Hz, H-4), 6.33 (1H, *d*, $J = 8.8$ Hz, H-8), 5.58 (1H, *d*, $J = 10$ Hz, H-3), 5.34 (2H, *s*, H-14), 2.17 (3H, *s*, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 1.45 (6H, *s*, H-11 and H-12); ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): 203.6 (C-11), 161.1 (C-5), 160 (C-9), 131.1 (C-7), 129.8 (C-3), 116.3 (C-4), 112.3 (C-6), 110.3 (C-8 y C-10), 78.9 (C-2), 65.12 (C-14) 28.6 (C-11 y C-12). EI-MS m/z 234 $[\text{M}]^+$ (44), 219 $[\text{M}-15]^+$ (90), 201 (100), 173 (43), 161 (31), 77 (59), 51 (43); HREIMS m/z 234.0887 (calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$ 234.0892).

Acetilación de 6-Hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (44a). El compuesto **19** (5 mg) fue tratado con anhídrido acético (1 mL) y piridina (1 mL). La mezcla se dejó reaccionando durante 24 horas; luego, se adicionaron 2 mL de agua a la mezcla de reacción y se extrajo la fase orgánica con diclorometano (5 mL \times 3).

6-Acetoxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (44a). Aceite amarillo; IR (ν_{\max}) cm^{-1} : 3450 (-OH), 2973, 2929, 1720, 1640, 1620, 1570, 1280; RMN ^1H (CD_3OD , 500

MHz): δ 12.61 (OH-5), 7.60 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-7), 6.66 (1H, *dd*, *J* = 10 Hz, *J* = 0.5 Hz, H-4), 6.36 (1H, *dd*, *J* = 9.0 Hz, *J* = 1.0 Hz, H-8), 5.67 (1H, *d*, *J* = 10 Hz, H-3), 5.34 (2H, *s*, H-14), 2.17 (3H, *s*, CH₃-CO), 1.42 (6H, *s*, H-11 and H-12); EI-MS *m/z* 276 [M]⁺ (5), 234 (58), 217 (25), 43 (100); HREIMS *m/z* 276.0995 (calculado para C₁₅H₁₆O₅ 276.0998).

6-acetil-5-hidroxi-2-hidroximetil-2-metil-2H-cromeno (45). Aceite amarillo; UV (MeOH) (log ϵ) λ_{\max} nm: 265 y 311; IR ν_{\max} cm⁻¹: 3453 (-OH), 2971, 2931, 1640 (C=O), 1616, 1572, 1487, 1428, 1359, 1280, 1164, 1109, 1076, 1022; RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 12.61 (OH-5), 7.60 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-7), 6.66 (1H, *dd*, *J* = 10 Hz, *J* = 0.5 Hz, H-4), 6.36 (1H, *dd*, *J* = 9.0 Hz, *J* = 1.0 Hz, H-8), 5.67 (1H, *d*, *J* = 10 Hz, H-3), 5.34 (2H, *s*, H-14), 2.17 (3H, *s*, CH₃-CO), 1.42 (6H, *s*, H-11 y H-12); ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): 202.8 (C-11), 159.9 (C-5), 159.8 (C-9), 131.1 (C-7), 130.6 (C-3), 116.6 (C-4), 114 (C-6), 110.5 (C-8 y C-10), 80.7 (C-2), 68.8 (C-12) 27.8 (C-11) 26.1 (C-14). ESI-MS *m/z* 335 [M+H]⁺ (100).

Caleína A (46): Sólido amorfo, punto de fusión: 177-178 °C; IR (KBr): ν_{\max} : 3439 (-OH), 2977, 1770, 1736, 1694, 1630, 1383, 1219, 1157, 1029; RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ_{H} 6.60 (1H, *d*, *J* = 12 Hz, H-2), 6.09 (1H, *cc*, *J* = 1.5 y 7.5 Hz, H-3'), 6.02 (1H, *t*, *J* = 12 Hz, H-3), 5.67 (1H, *dd*, *J* = 10 y 2 Hz, H-8), 5.59 (1H, *d*, *J* = 10 Hz, H-9), 4.58 (1H, *dd*, *J* = 12 y 15 Hz H-6), 3.12 (1H, *m*, H-4), 2.63 (1H, *sa*, H-7), 2.02 (3H, *s*, H-2''), 1.93 (1H, *dc*, *J* = 7.5 y 1.5 Hz, H-4'a), 1.75 (1H, *q*, *J* = 1.5, H-H-4'b), 1.84 (1H, *m*, H-5a), 1.44 (1h, *m*, H-4b), 1.35 (3H, *s*, H-15), 1.14 (3H, *d*, *J* = 6.5 Hz); ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): 204 (C-1), 170 (C-2''), 168.7 (C-12), 165.3 (C-1'), 148.2 (C-3), 134.9 (C-2'), 134.6 (C-11), 127 (C-3') 126.4 (C-13), 125.3 (C-2), 79.3 (C-10), 76.3 (C-6), 74.4 (C-8), 73.4 (C-9), 41.2 (C-7), 40.2 (C-5), 28.3 (C-4), 20.3 (C-2''), 19.7 (C-14), 18.1 (C-4'). ESI-MS *m/zs* 420 [M]⁺, 364 (2), 337 (2), 278 (5), 232 (40), 189 (40), 83 (10), 69 (100), 55 (4).

Caleína C (47): Sólido amorfo, punto de fusión: 167-168 °C; IR (KBr): ν_{\max} : 3439 (-OH), 2977, 1770, 1736, 1694, 1630, 1383, 1219, 1157, 1029; RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ_{H} 6.62 (1H, *d*, *J* = 12 Hz, H-2), 6.32 (1H, *da*, *J* = 1.0 Hz, H-13a), 6.02 (1H, *t*, *J* = 11.5 Hz, H-3), 6.02 (1H, *q*, *J* = 1.0 Hz H-3'a), 5.83 (1H, *d*, *J* = 1.5 Hz, H-13b), 5.62 (1H,

dd, $J = 9.5$ y 1.5 Hz, H-8), 5.60 (1H, *d*, $J = 9.5$ Hz, H-9), 5.54 (1 H, *q*, $J = 1.5$ Hz, H-3'b), 4.61 (1H, *dd*, $J = 12$ y 4.5 Hz H-6), 3.12 (1H, *m*, H-4), 2.64 (1H, *sa*, H-7), 2.02 (3H, *s*, H-2''), 1.83 (1H, *c*, H-4'), 1.44 (1h, *m*, H-4b), 1.35 (3H, *s*, H-15), 1.14 (3H, *d*, $J = 6$ Hz, H-14); ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): 204 (C-1), 170 (C-2''), 168.7 (C-12), 165.3 (C-1'), 148.2 (C-3), 134.9 (C-2'), 134.6 (C-11), 127 (C-3') 126.4 (C-13), 125.3 (C-2), 79.3 (C-10), 76.3 (C-6), 74.4 (C-8), 73.4 (C-9), 41.2 (C-7), 40.2 (C-5), 28.3 (C-4), 20.3 (C-2''), 19.7 (C-14), 18.1 (C-4'). ESI-MS m/z 406 $[\text{M}]^+$, 364 (4), 321 (4), 260 (5), 192 (4), 85 (6), 69 (100).

Calealactona C (48): Sólido amorfo, punto de fusión: 167-168 °C; IR (KBr): ν_{max} : 3439 (-OH), 2977, 1770, 1736, 1694, 1630, 1383, 1219, 1157, 1029; RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz): δ_{H} 6.30 (1H, *d*, $J = 3.5$ Hz, H-13a), 5.99 (1H, *m*, H-3'a), 5.91 (1H, *ta*, $J = 9.5$ Hz, H-3), 5.89 (1H, *dd*, $J = 10.5$ y 1.5 Hz H-8), 5.72 (1H, *s*, H-13b), 5.70 (1H, *d*, $J = 9.0$ Hz, H-9), 5.61 (1H, *m*, H-3'b), 4.94 (1H, *m*, H-6), 3.59 (1H, *dd*, $J = 16.0$ y 10 Hz, H-2a), 3.08 (1H, *dd*, $J = 16.0$ y 8.5 Hz, H-2b), 2.86 (1H, *dd*, $J = 15$ y 3.5 Hz, H-5b), 2.77 (1H, *dd*, $J = 15$ y 4.0 Hz, H-5a), 2.68 (1H, *m*, H-7), 2.05 (3H, *s*, H-2''), 1.87 (1H, *s*, H-4'), 1.86 (1H, *s*, H-14), 1.35 (3H, *s*, H-15); ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): 210.6 (C-1), 170.5 (C-2''), 168.1 (C-12), 165.2 (C-1'), 136.6 (C-5), 134.9 (C-2'), 134.5 (C-11), 126.9 (C-3') 124.4 (C-13), 121.5 (C-3), 80.3 (C-10), 76.6 (C-6), 72.5 (C-9), 67.1 (C-8), 42.1 (C-7), 35.9 (C-5), 25.4 (C-14) 22.3 (C-15), 20.4 (C-2''), 18.1 (C-4'). EI-MS m/z : 406 $[\text{M}]^+$ (5), 378 (45), 364 (54), 336 (70), 292 (98), 69 (100); HREIMS m/z 406.1621 (calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_8$, 406.1627).

Acido 3,5-dicafeoilquínico (50): Cristales amarillos; punto de fusión: 185-187 °C; IR (KBr): ν_{max} : 3455, 3200, 1715, 1687, 1621, 1593, 1526, 1374, 1285, 1184, 1118, 978 cm^{-1} ; RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz): δ 7.63 (2H, *da*, $J = 16$ Hz, H-7'), 7.60 (2H, *da*, $J = 16$ Hz, H-7''), 7.10 (1H, *da*, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.07 (1H, *da*, $J = 2.1$ Hz, H-2''), 6.99 (2H, *dd*, $J = 7.5$ y 2.1 Hz, H-6' y 6''), 6.80 (2H, *da*, $J = 8$ Hz) 6.44 (1H, *d*, $J = 16$ Hz, H-8'), 6.33 (1H, *d*, $J = 16$ Hz, H-8''), 5.53 (1H, *ddd*, $J = 10$ y 5 Hz, H-6), 5.42 (1H, *dd*, $J = 6.6$ y 3.3 , H-5), 3.93 (1H, *dd*, $J = 9.9$ y 3.5 Hz, H-4), 2.26 (2H, *m*, H-2a y 2b), 2.25 (1H, *da*, H-6a), 2.20 (1H, *da*, H-6b). FAB-MS: $m/z = 515$ (50), 353 (100), 179 (20).

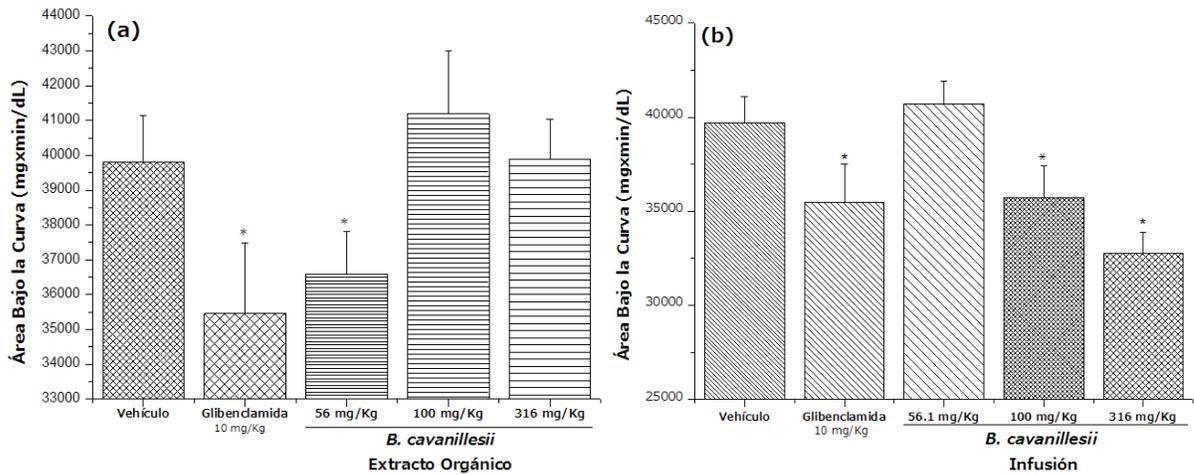
Isoramnetina (54): Polvo amarillo, punto de fusión: 302-303; RMN ^1H (DMSO, 500 MHz): δ_{H} 7.74 (1H, *d*, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.67 (1H, *dd*, $J = 8.5$ Y 2.0 Hz, H-6'), 6.93 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.46 (1H, *d*, $J = 2.5$ Hz, H-6), 6.18 (1H, *d*, $J = 2.5$ Hz, H-8); ^{13}C (DMSO, 125 MHz): δ_{C} 175.8 (C-4), 163.9 (C-7), 160.6 (C-5), 156.1 (C-9), 148.7 (C-5'), 147.3 (C-4'), 146.6 (C-2), 135.8 (C-3), 121.9 (C-1'), 121.7 (C-2'), 115.5 (C-3') 111.6 (C-6'), 102.9 (C-10), 98.2 (C-6), 93.5 (C-8). EI-MS m/z 316 $[\text{M}]^+$, 279 (10), 167 (25), 149 (100).

Acacetina (51): Polvo amarillo, punto de fusión: 284-286; $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$; IR (KBr): ν_{max} : 3270 (-OH), 1650, 1692 1655, 1575, 1488, 1440, 1379, 1330, 1280, 1270, 1210 y 825 cm^{-1} . RMN ^1H (DMSO, 500 MHz): δ_{H} 7.78 (2H, *d*, $J = 9.0$ Hz, H-2' y 6'), 6.96 (2H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-2' y 4'), 6.51 (1H, *d*, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.31 (1H, *d*, $J = 1.5$ Hz, H-6), 6.54 (1H, *s*, H-3); ^{13}C (DMSO, 125 MHz): δ_{C} 181.5 (C-4), 163.8 (C-7), 163.7 (C-2), 162.8 (C-5), 160.5 (C-9), 163.5 (C-4'), 127.1 (C-2' y 6'), 122.6 (C-1'), 113.3 (C-3' y 5'), 103.6 (C-10), 102.5 (C-3), 97.2 (C-6), 93.3 (C-8), 54.6 (C-MeO). EI-MS m/z 284 (100) $[\text{M}]^+$, 256 (35), 152 (20), 138(40), 132 (40).

Genkwanina (52): Polvo amarillo, punto de fusión: 283-285; $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$; RMN ^1H (DMSO, 500 MHz): δ 7.85 (2H, *d*, $J = 9.0$ Hz, H-2' y 6'), 7.03 (2H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-2' y 4'), 6.44 (1H, *d*, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.26 (1H, *d*, $J = 1.5$ Hz, H-6), 6.54 (1H, *s*, H-3); ^{13}C (DMSO, 125 MHz): δ 181.3 (C-4), 164.5 (C-7), 164.4 (C-2), 161.2 (C-5), 156.9 (C-8), 161.6 (C-4'), 127.3 (C-2' y 6'), 120.9 (C-1'), 115.7 (C-3' y 5'), 104.4 (C-10), 103.0 (C-3), 98.5 (C-6), 93.3 (C-8), 54.6 (C-MeO). EI-MS m/z 284 (100) $[\text{M}]^+$, 256 (10), 166, 138, 118, 121.

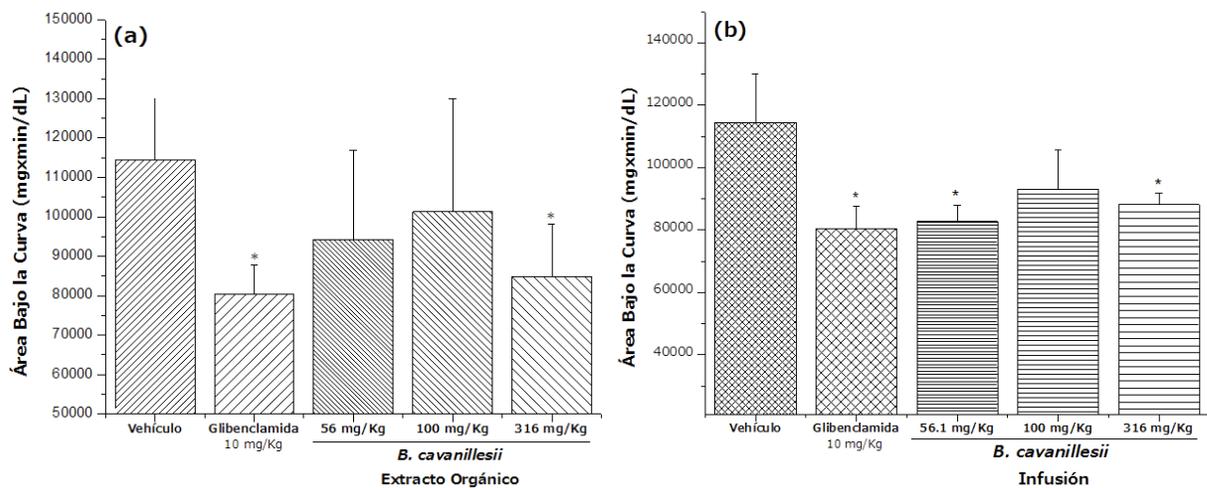
Camperol (53): Polvo amarillo, punto de fusión: 276-278; $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$; RMN ^1H (DMSO, 500 MHz): δ_{H} 8.05 (1H, *d*, $J = 9.0$ Hz, H-2' y 6'), 7.70 (1H, *d*, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.60 (1 H, *dd*, $J = 2.1$ y 8.5 Hz, H-6'), 6.90 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.89 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-3' y 5'), 6.38 (*d*, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.16 (*d*, $J = 2.1$ Hz, H-6); ^{13}C (DMSO, 125 MHz): δ_{C} 129.4 (C-2' y 6'), 119.8 (C-6'), 115.4 (C-5'), 115.3 (C-3' y 5'), 115 (C-2'), 98.3 (C-6) 93.4 (C-8).

ANEXO 2. EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS.



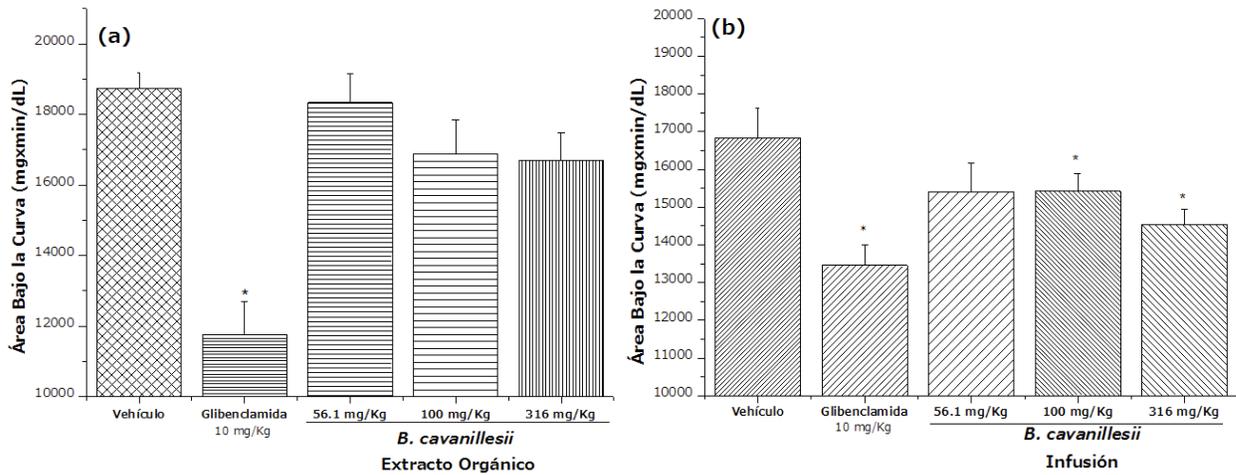
Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre, usando el método agudo hipoglucemiante en ratones normoglicémicos. Cada barra representa la media de seis determinaciones (n=6) ± EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett P<0.05.

ANEXO 3. EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS EN RATONES DIABÉTICOS.



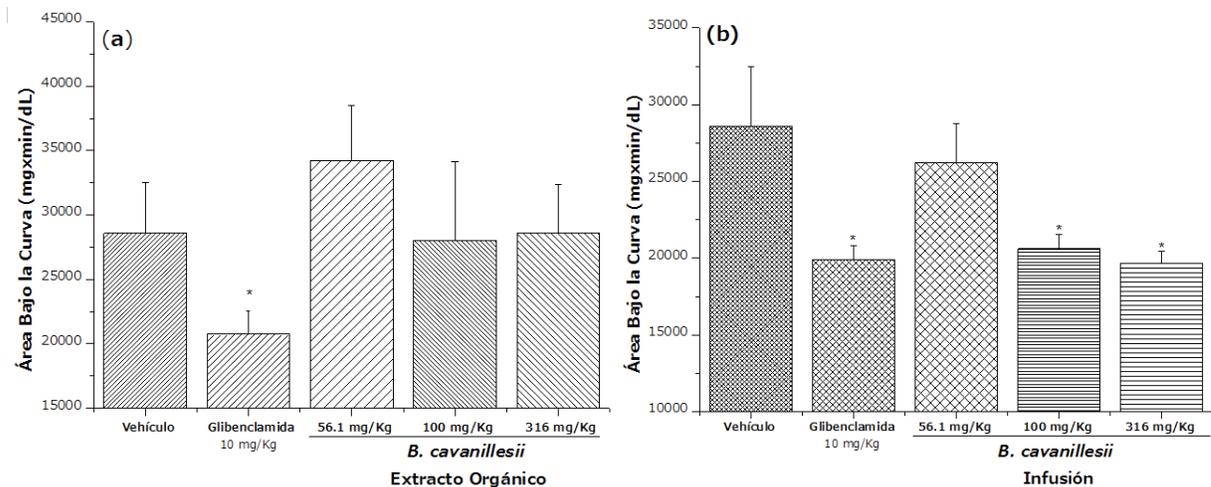
Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre, usando el método agudo hipoglucemiante en ratones diabéticos. Cada barra representa la media de seis determinaciones (n=6) ± EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett P<0.05.

ANEXO 4. EFECTO DE LOS EXTRACTOS EN LA PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS.



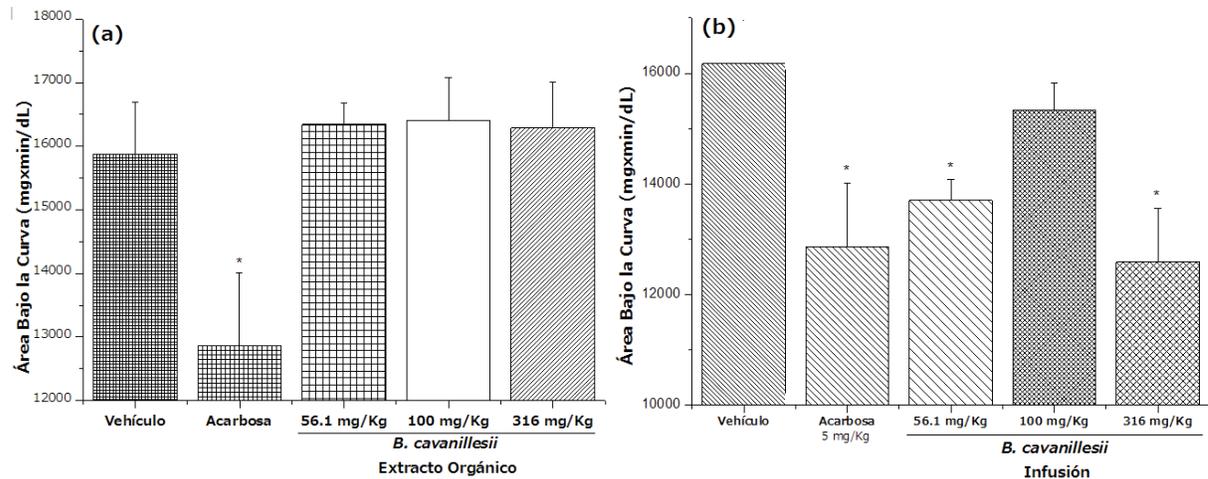
Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* (Área bajo la curva de porcentaje de variación de glucemia) en los niveles de glucosa en la sangre, usando el método de tolerancia a la glucosa en ratones normoglicémicos. Cada barra representa la media de seis determinaciones ($n=6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett $P<0.05$.

ANEXO 5. EFECTO DE LOS EXTRACTOS EN LA PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA EN RATONES DIABÉTICOS.



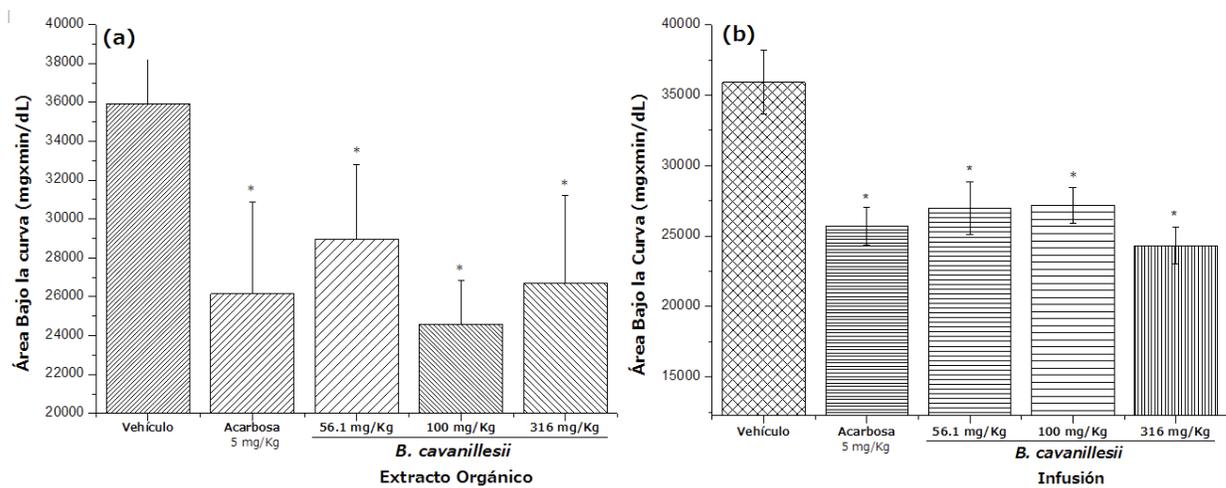
Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* (Área bajo la curva de porcentaje de variación de glucemia) en los niveles de glucosa en la sangre, usando el método de tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos. Cada barra representa la media de seis determinaciones ($n=6$) \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett $P<0.05$.

ANEXO 6. EFECTO DE LOS EXTRACTOS EN LA PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SACAROSA EN RATONES NORMOGLUCÉMICOS.



Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre, usando el método de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglicémicos. Cada barra representa la media de seis determinaciones (n=6) ± EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett P<0.05.

ANEXO 7. EFECTO DE LOS EXTRACTOS EN LA PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SACAROSA EN RATONES DIABÉTICOS.



Efecto de los extractos orgánico (a) y acuoso (b) de *B. cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre, usando el método de tolerancia a la sacarosa en ratones diabéticos. Cada barra representa la media de seis determinaciones (n=6) ± EEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba de Dunett P<0.05.

ANEXO 8. DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS DE RMN¹H (500 MHz)* Y RMN¹³C (125 MHz) DE LA CALEÍNA A (46).

	¹ H (500 MHz) δ (ppm), (J en Hz)	¹³ C	COSY	HMBC	NOESY
1	-	204.7	-	2,3,15	-
2	6.60, <i>d</i> (12)	125.4	3	1, 3, 4	3,9,15
3	6.02, <i>t</i> (12)	148.2	2, 4	1, 4,14, 5, 5,	2
4	3.12, <i>m</i>	28.3	3, 5, 14	14, 5α, 5β, 3, 2	7, 5β, 15
5	α 1.84, <i>m</i>	40.3	5β, 4, 6	3, 4, 6, 7,14	α =5,14,6
	β 1.44, <i>m</i>		5α, 6		β=14,5,4
6	4.58, <i>dd</i> (12 y 5)	76.3	5α, 5β	14, 5, 5, 8, 9	5α,7,9
7	2.63, <i>sa</i>	41.2	8, 13	5, 11, 12, 13	4,6,8,13
8	5.67, <i>dd</i> , (10 y 2)	73.4	7, 9	6, 9, 13	7,13
9	5.59, <i>d</i> (10)	73.9	8	6,8,15	6,7,2
10	-	79.2	-	15	-
11	-	134.7	-	6, 7,13	-
12	-	168.8	-	7, 6, 13	-
13	5.83 <i>d</i> (1.5)	126.5	7	7	8,7,13
	6.32 <i>da</i> (1.0)		7		13
14	1.14, <i>d</i> , (6.5)	19.7	4	3, 4, 5	6,15,3
15	1.35, <i>s</i>	20.1	-	-	9,2,14
1'	-	165.3	-	4',3',8	-
2'	-	126.4	-	3', 4'	-
3'	6.09, <i>cc</i> (7.5 y 1.5)	140.9	3', 4' 3', 4'	4`	5',4'
4'	1.93, <i>dc</i> , (7.5 y 1.5)	15.7	3'	3',2"	5',3'
5'	1.75 <i>q</i> (1.5)	23.7	4'	-	2",4',3'
1"	-	165.3	-	5'	-
2"	-	170.3	-	2", 9	-
	2.02, <i>s</i>	20.3	-	-	4',5'

*Las señales se asignaron con base en las correlaciones observadas en los espectros HMBC, HSQC y COSY.

ANEXO 9. DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS DE RMN¹H (500 MHz)* Y RMN¹³C (125 MHz) DE LA CALEÍNA C (47).

N	¹ H (500 MHz) d (ppm) (J en Hz)	¹³ C	COSY	HMBC	NOESY
1	-	204.7	-	2,3,15	-
2	6.62 <i>d</i> (12)	125.3	3	1, 3, 4	3,9,15
3	6.02 <i>t</i> (11.5)	148.2	2, 4	1, 4,14, 5, 5,	2,9,6,14
4	3.121 <i>m</i> (6)	28.3	3, 5 α , 14	14, 5 α , 5 β , 3, 2	7, 5 β , 15
5	α 1.84 <i>m</i> β 1.439 <i>m</i>	40.2	5 β , 4, 6 5 α , 6	3, 4, 6, 7,14	β = 14,5,7,4 α =5,14,6
6	4.606 <i>dd</i> (12,4.5)	76.3	5 α , 5 β	14, 5, 5, 8, 9	5 α ,7,9,3
7	2.64 <i>sa</i>	41.2	8, 13 a y 13b	5, 11, 12, 13	5 β ,4,6,8,13
8	5.62 <i>dd</i> (9.5,1.5)	74.4	7, 9	6, 9, 13	2,15,6,
9	5.60 <i>d</i> (9.5)	73.4	8	6,8,2",15	13,3',2",15
10	-	79.3	-	15	-
11	-	134.6	-	6, 7,13	-
12	-	168.7	-	7, 6, 13	-
13	5.83 <i>d</i> (1.5) 6.32 <i>da</i> (1.0)	126.4	7 7	7	8,7,13 2,13,3'
14	1.14 <i>d</i> (6)	19.7	4	3, 4, 5	5,4,3
15	1.35 <i>s</i>	23.6	-	-	5, 2",9,2,14
1'	-	165.3	-	4',3',8	-
2'	-	134.9	-	3', 4'	-
3'	a = 6.02 <i>q</i> (1.0) b = 5.54 <i>q</i> (1.5)	127	3'b, 4' 3'a, 4'	4'	13,9,3' 8-9,3',4'
4'	1.83 <i>c</i> (1.5)	18.1	3'a, 3'b	3',2"	2',3'
1"	-	170.3	-	2", 9	-
2"	2.02 <i>s</i>	20.3	-	-	15, 4'

*Las señales se asignaron con base en las correlaciones observadas en los espectros HMBC, HSQC y COSY. En CDCl₃.

ANEXO 10. ESPECTROS DE RMN DE LA CALEÍNA C.

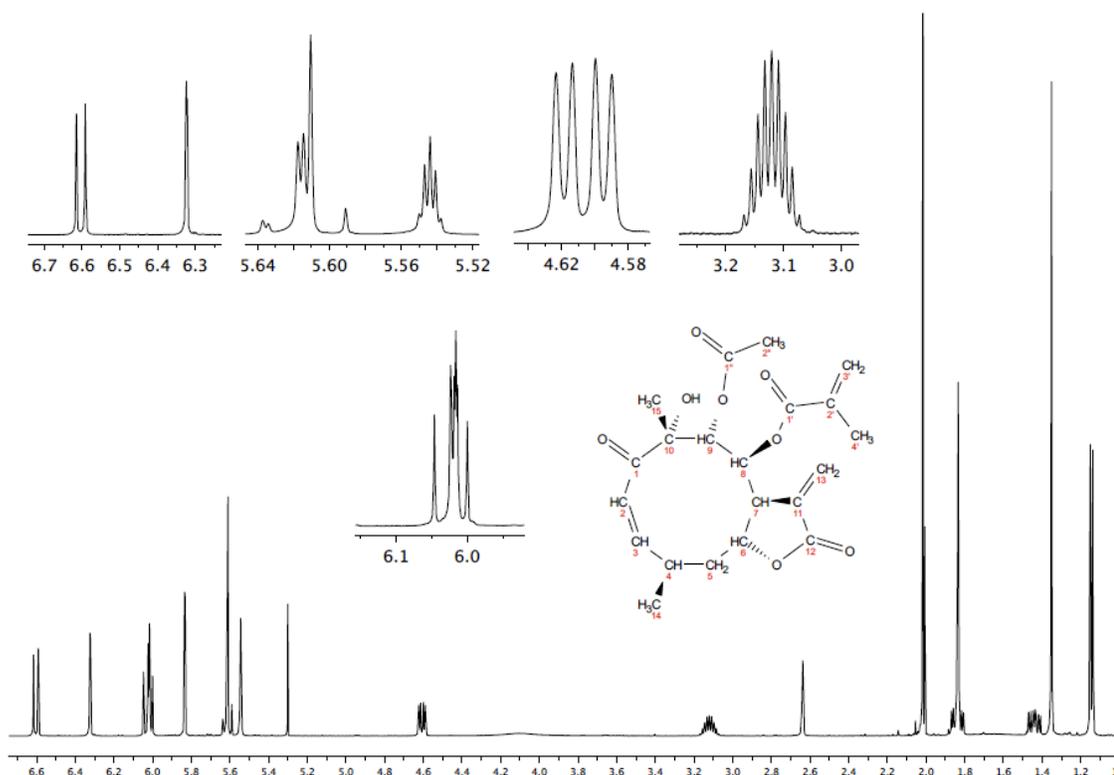


Figura 1. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de la caleína C (44).

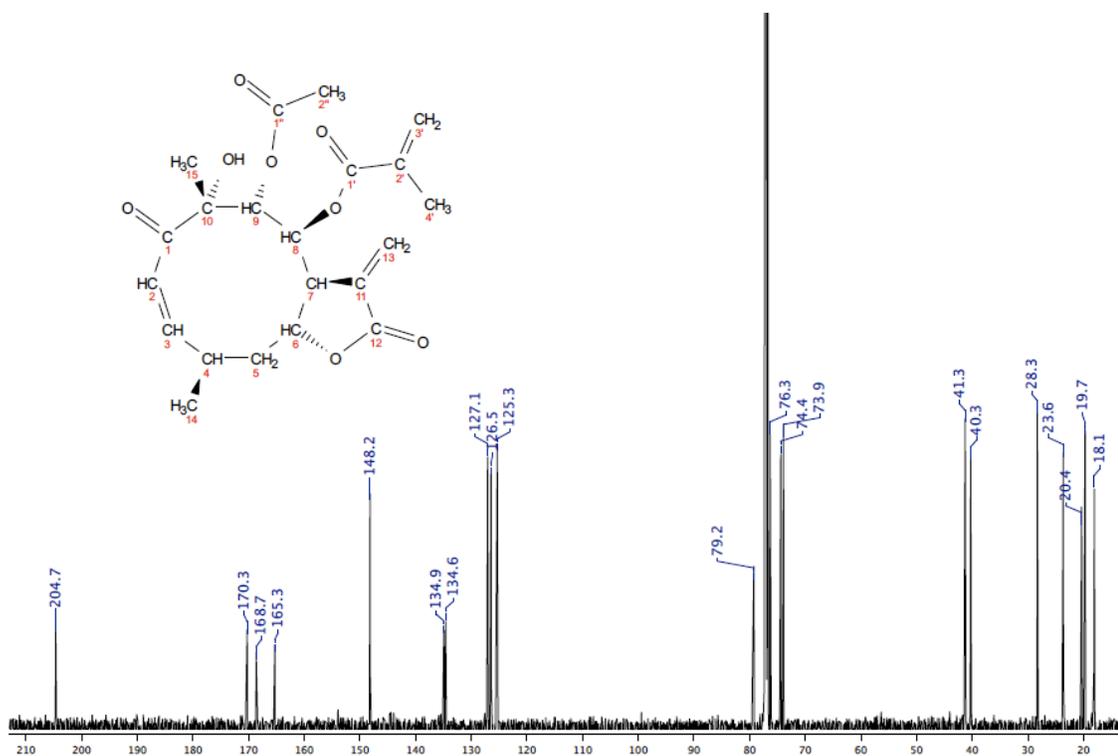


Figura 2. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de la caleína C (44).

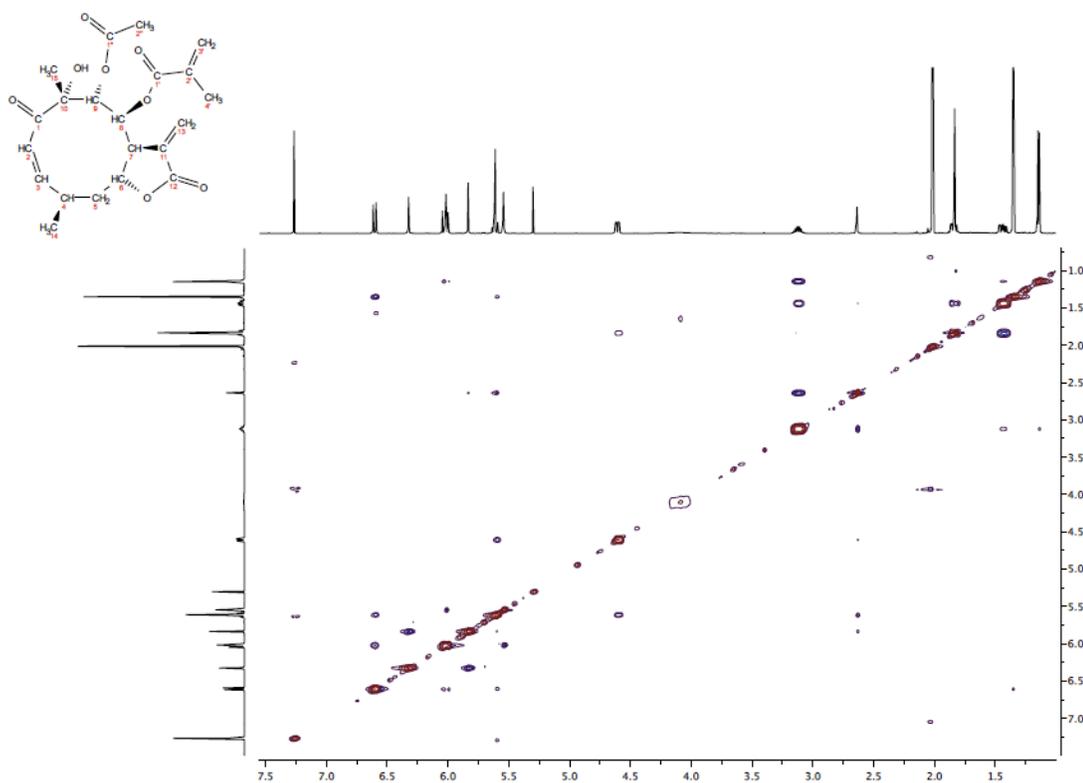


Figura 3. Espectro bidimensional NOESY (500 MHz, CDCl₃) de la caleína C (44).

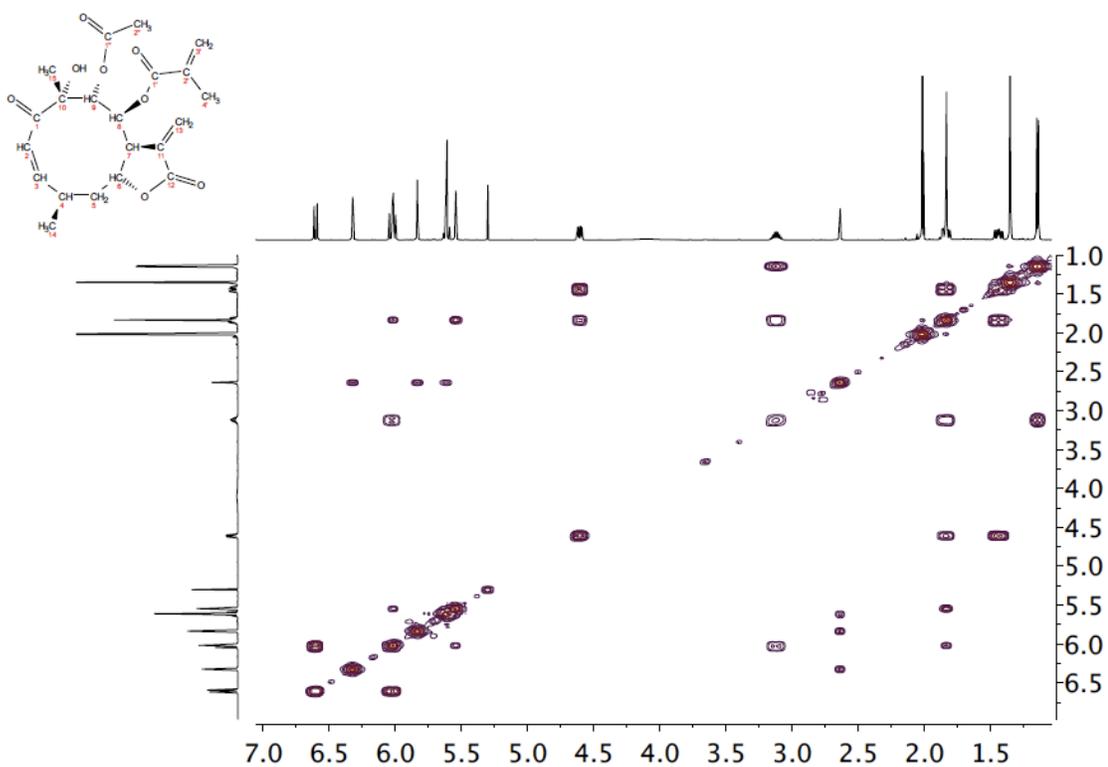


Figura 4. Espectro bidimensional COSY (500 MHz, CDCl₃) de la caleína C (44).

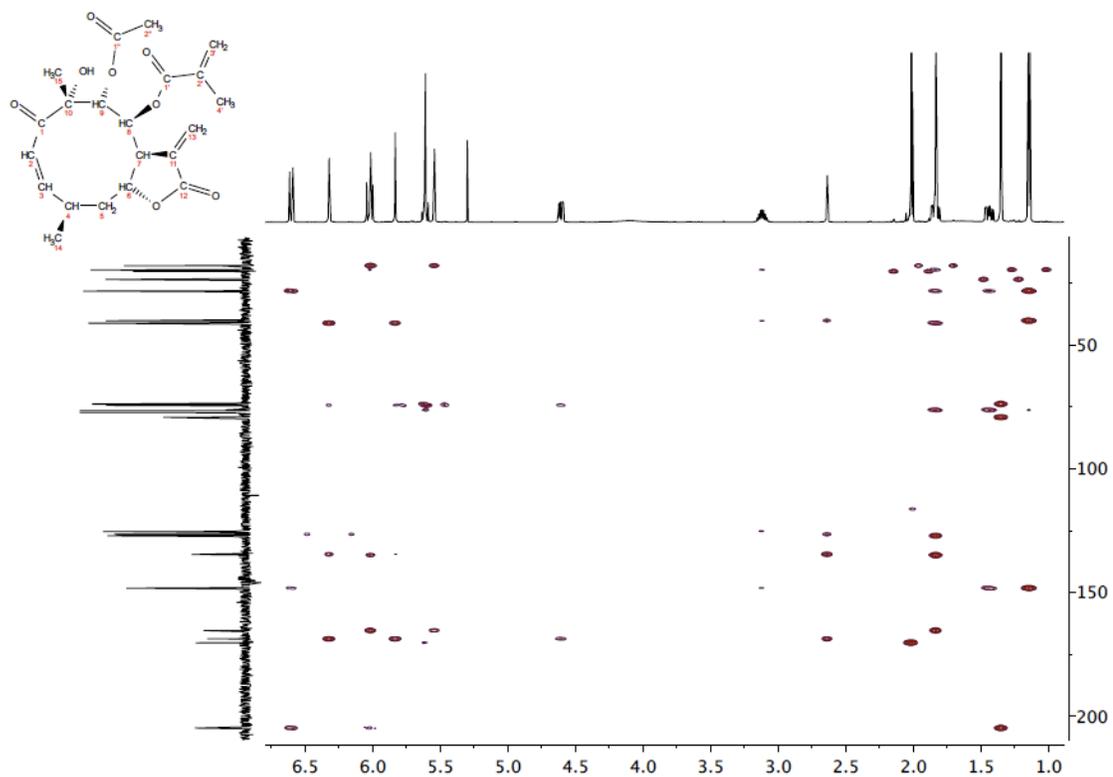


Figura 5. Espectro bidimensional HMBC (500 MHz, CDCl₃) de la caleína C (**44**).

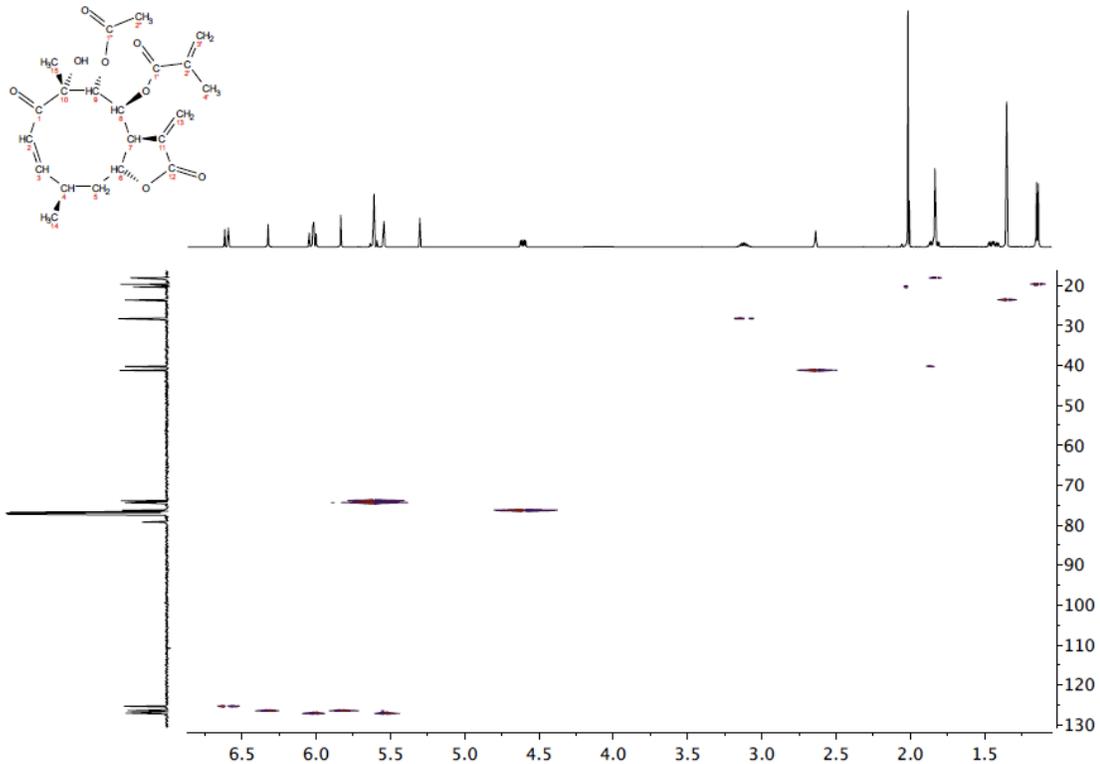


Figura 6. Espectro bidimensional HSQC (500 MHz, CDCl₃) de la caleína C (**44**).

ANEXO 11. DATOS CRISTALOGRAFICOS DE LA CALEÍNA C.**Tabla 1.** Datos cristalográficos y de refinamiento para la caleína C (44)

Código de identificación	172XYZ13
Título de proyecto	caleína C
Fórmula empírica	C ₂₁ H ₂₆ O ₈
Peso fórmula	406.42
Temperatura	298(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å
Sistema cristalino	Orthorhombic
Grupo de espacio	<i>P</i> 21 21 21
Dimensiones de unidad de celda	<i>a</i> = 10.1880(3) Å <i>a</i> = 90° <i>b</i> = 12.3924(4) Å <i>b</i> = 90° <i>c</i> = 17.8199(6) Å <i>g</i> = 90°
Volumen	2249.83(12) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1.200 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0.092 mm ⁻¹
<i>F</i> (000)	864
Tamaño del cristal / color / forma	0.316x0.216x0.212 mm/incoloro/bloque
Rango theta para colección de datos	2.00 to 28.28°
Rabgos de índice	-13 <i>h</i> 12, -16 <i>k</i> 16, -22 <i>l</i> / 23
Reflexiones colectadas	22646
Reflexiones independientes	5585 [<i>R</i> (int) = 0.0524]
Integridad para theta =	28.28° 100.0 %
Dispositivo de medición	Difractómetro Bruker Smart Apex CCD 01-670-01
Coerción de absorción	Semi-empírico de equivalentes
Max. y min. transmisión	0.7457 and 0.6676
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados <i>F</i> ²
Datos / restricciones / parámetros	5585 / 1045 / 535
Bondad de ajuste	1.035
Índice <i>R</i> final	[<i>I</i> > 2 <i>s</i> (<i>I</i>)] <i>R</i> ₁ = 0.0670, <i>wR</i> ₂ = 0.1847
Índice <i>R</i> (todos los datos)	<i>R</i> ₁ = 0.1336, <i>wR</i> ₂ = 0.2349
Parámetros de estructura absoluta	?
Mayor diferencia	0.236 y -0.284 e.Å ⁻³

Tabla 2. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para cafeína C (44). $U(\text{eq})$ es definido como un tercio de la traza del tensor U_{ij} ortogonalizado.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
O(1)	5732(5)	5938(4)	5448(3)	83(1)
O(2)	3793(5)	2461(4)	7094(3)	75(1)
O(3)	1842(5)	4142(5)	6939(3)	61(1)
O(4)	1218(5)	5735(4)	6000(4)	92(2)
O(5)	3640(8)	6914(6)	5986(4)	90(2)
O(6)	3814(6)	2444(5)	8308(3)	107(2)
O(7)	1310(8)	5132(6)	7968(3)	83(2)
O(8)	164(9)	4379(7)	5346(6)	154(4)
C(1)	4694(7)	5518(5)	5268(3)	67(1)
C(2)	4627(9)	4513(5)	4802(4)	79(1)
C(3)	5340(8)	3622(6)	4982(4)	80(2)
C(4)	6233(6)	3477(5)	5630(4)	74(1)
C(5)	5587(6)	2801(5)	6235(4)	75(1)
C(6)	4221(6)	3178(5)	6477(3)	63(1)
C(7)	4167(5)	4328(4)	6813(3)	56(1)
C(8)	2854(5)	4901(5)	6703(3)	56(1)
C(9)	2475(5)	5229(5)	5912(3)	65(1)
C(10)	3408(7)	6037(5)	5502(3)	71(1)
C(11)	4395(6)	4068(5)	7632(3)	69(1)
C(12)	3917(6)	2949(5)	7769(3)	80(2)
C(13)	4831(9)	4684(7)	8164(4)	97(3)
C(14)	2735(9)	6464(6)	4778(4)	105(2)
C(15)	7531(7)	2927(7)	5375(6)	110(2)
C(16)	1125(6)	4381(6)	7564(3)	82(2)
C(17)	59(9)	3563(8)	7670(6)	109(2)
C(18)	-802(11)	3687(13)	8268(8)	159(5)
C(19)	-40(15)	2681(10)	7176(8)	157(4)
C(20)	123(7)	5156(7)	5742(4)	128(2)
C(21)	-1144(8)	5669(10)	6049(8)	170(4)

Tabla 3. Distancias de enlace [Å] y ángulos de torsión [°] para la caleína C (44)

	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
O(1)	80(3)	70(3)	97(4)	-2(2)	9(3)	-17(2)
O(2)	81(3)	59(2)	83(3)	13(2)	8(2)	2(2)
O(3)	60(2)	56(2)	68(2)	-3(2)	4(2)	-4(2)
O(4)	63(2)	51(2)	161(4)	21(2)	-24(2)	-2(2)
O(5)	100(4)	57(3)	112(4)	-15(3)	10(3)	-15(3)
O(6)	125(4)	116(4)	79(3)	42(3)	0(3)	-8(3)
O(7)	97(4)	86(4)	67(3)	-1(3)	21(3)	-3(3)
O(8)	111(6)	116(5)	236(9)	-30(6)	-65(6)	-19(4)
C(1)	80(3)	63(3)	57(3)	8(2)	2(2)	-10(2)
C(2)	94(4)	77(3)	67(3)	-8(2)	9(3)	-13(3)
C(3)	85(4)	76(3)	78(3)	-24(3)	15(3)	-12(3)
C(4)	73(3)	63(3)	86(3)	-15(3)	19(2)	2(2)
C(5)	77(3)	65(3)	83(3)	-10(2)	12(3)	9(2)
C(6)	68(2)	56(2)	65(3)	1(2)	5(2)	1(2)
C(7)	55(2)	53(2)	60(2)	1(2)	-1(2)	1(2)
C(8)	56(2)	50(2)	63(2)	-3(2)	-1(2)	-4(2)
C(9)	63(2)	51(2)	81(3)	7(2)	-12(2)	0(2)
C(10)	82(3)	56(3)	76(3)	6(2)	-7(3)	-6(2)
C(11)	71(3)	77(3)	58(3)	1(2)	-1(2)	6(2)
C(12)	84(4)	86(3)	70(3)	16(2)	3(3)	7(3)
C(13)	111(7)	106(5)	75(4)	-16(4)	-12(4)	-1(5)
C(14)	116(5)	86(4)	112(4)	42(4)	-23(4)	-1(4)
C(15)	79(4)	104(5)	147(6)	-32(5)	35(4)	5(3)
C(16)	77(3)	78(3)	92(3)	-2(3)	22(3)	-3(3)
C(17)	104(4)	113(4)	110(4)	5(3)	27(3)	-30(3)
C(18)	131(8)	205(11)	141(8)	-3(7)	48(6)	-62(7)
C(19)	177(8)	136(6)	157(9)	-16(5)	16(7)	-71(6)
C(20)	84(3)	92(4)	208(6)	1(4)	-62(4)	2(3)
C(21)	83(4)	140(8)	286(12)	-12(8)	-80(6)	32(5)

Tabla 4. Hidrógenos coordinados ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para caleína C (**44**).

	x	y	z	(eq)
H(5)	4320(70)	7040(50)	6240(30)	135
H(2)	4088	4499	4381	95
H(3)	5258	3035	4660	96
H(4)	6442	4188	5839	89
H(5A)	6154	2796	6672	90
H(5B)	5521	2064	6056	90
H(6)	3609	3122	6054	76
H(7)	4887	4770	6616	67
H(8)	2823	5538	7028	68
H(9)	2375	4579	5603	78
H(13A)	4855	4432	8655	117
H(13B)	5120	5378	8055	117
H(14A)	3373	6822	4470	157
H(14B)	2053	6963	4911	157
H(14C)	2363	5869	4505	157
H(15A)	8088	2816	5802	165
H(15B)	7971	3380	5018	165
H(15C)	7335	2244	5147	165
H(18A)	-1461	3181	8348	191
H(18B)	-720	4277	8587	191
H(19A)	-754	2226	7329	235
H(19B)	764	2276	7186	235
H(19C)	-196	2939	6676	235
H(21A)	-1776	5731	5652	254
H(21B)	-951	6373	6245	254
H(21C)	-1495	5224	6441	254
H(2B)	3181	4948	4323	98
H(3B)	4439	3488	4369	102
H(4B)	6078	4523	5398	105
H(5C)	5401	2339	5594	104
H(5D)	6211	3048	6154	104
H(6B)	3488	3327	5890	83
H(7B)	4908	4875	6491	72
H(8B)	2962	5530	7095	70
H(9B)	2331	4654	5684	82
H(13C)	5503	4110	8428	101
H(13D)	5481	5202	7938	101
H(14D)	2371	7424	4882	159
H(14E)	1247	7111	5441	159
H(14F)	1611	6334	4779	159
H(15D)	7428	3975	4470	186
H(15E)	6677	2884	4352	186
H(15F)	7588	3037	5053	186
H(18C)	-1747	3545	8219	145
H(18D)	-1109	4729	8288	145
H(19D)	-672	2230	7541	192
H(19E)	863	2292	7591	192
H(19F)	143	2655	6855	192
H(21D)	-1673	5591	5874	189
H(21E)	-1451	5888	5028	189
H(21F)	-863	6622	5661	189

Tabla 5. Enlaces de hidrógeno para la caleína C (**44**) [Å y °].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(5)-H(5)...O(6)#1	0.84(6)	2.12(7)	2.956(9)	170(6)

Transformaciones simétricas utilizadas para generar átomos equivalentes: #1 - $x+1, y+1/2, -z+3/2$

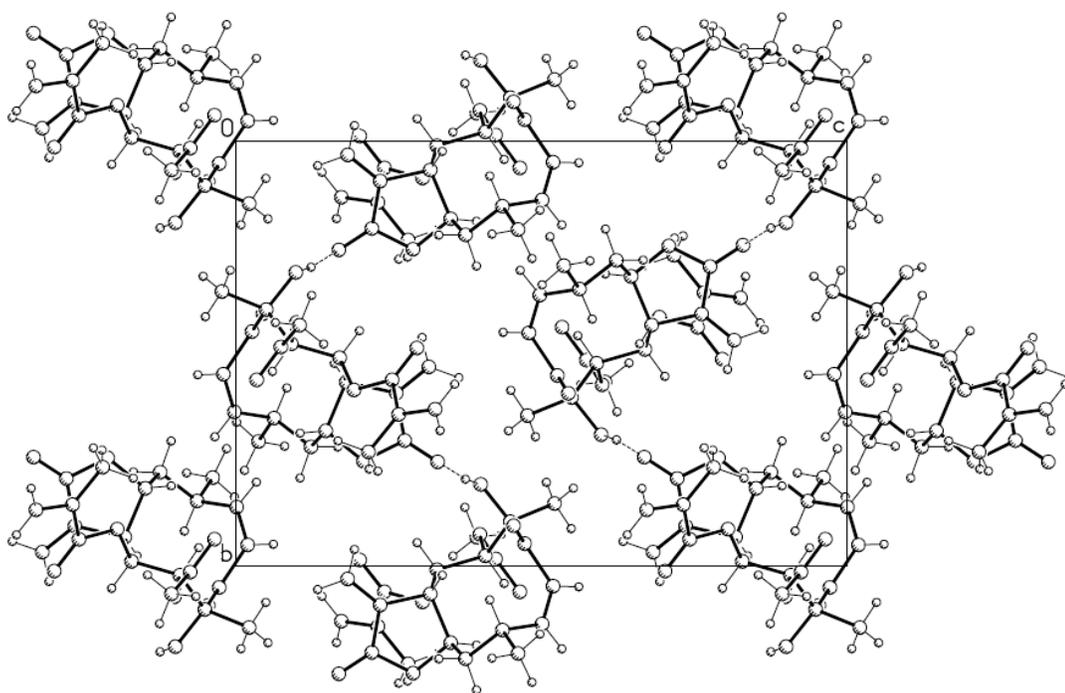


Figura 1. Celda cristalográfica de la caleína C (**44**).