



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Parámetros de calidad, seguridad y eficacia de las infusiones de
hojas y corteza de *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.)
Bullock y *H. standleyana* Bullock (Rubiaceae): un enfoque al
desarrollo de preparados fitoterapéuticos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

M. en C. SOL CRISTIANS NIIZAWA

TUTORA PRINCIPAL: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

FACULTAD DE QUÍMICA, U.N.A.M.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTOR: DR. ROBERT BYE BOETTLER

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, U.N.A.M.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTOR: DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA

FACULTAD DE QUÍMICA, U.N.A.M.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Parámetros de calidad, seguridad y eficacia de las infusiones de
hojas y corteza de *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.)
Bullock y *H. standleyana* Bullock (Rubiaceae): un enfoque al
desarrollo de preparados fitoterapéuticos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

M. en C. SOL CRISTIANS NIIZAWA

TUTORA PRINCIPAL: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

FACULTAD DE QUÍMICA, U.N.A.M.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTOR: DR. ROBERT BYE BOETTLER

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, U.N.A.M.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTOR: DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA

FACULTAD DE QUÍMICA, U.N.A.M.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/569/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **9 de septiembre de 2013**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **CRISTIANS NIIZAWA SOL** con número de cuenta **402059604** con la tesis titulada: "**Parámetros de calidad, seguridad y eficacia de las infusiones de hojas y corteza de *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock y *H. standleyana* Bullock (Rubiaceae): un enfoque al desarrollo de preparados fitoterapéuticos**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**:

Presidente:	DR. ROBERT BYE BOETTLER
Vocal:	DR. RICARDO REYES CHILPA
Secretario:	DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO
Suplente:	DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA
Suplente	DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 18 de octubre de 2013.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la U.N.A.M., que a través de su programa de Doctorado me permitió profundizar mi formación académica y conocer nuevas aristas del quehacer científico.

A todos los apoyos recibidos durante el desarrollo de este proyecto de investigación, al la beca CONACyT (becario no. 207145) a través de la cual pude dedicarme de tiempo completo al programa de Doctorado. A los proyectos DGAPA-UNAM (IN218110 e IN212913) y CONACyT (150966 y 99395) cuyos apoyos permitieron financiar este trabajo de investigación.

A la Dra. Rachel Mata, a quien agradezco todo el compromiso, tiempo y paciencia invertidos en el desarrollo de este proyecto de investigación, así como su confianza, permitiéndome formar parte de su grupo de trabajo y verter en mí sus consejos en diversos aspectos académicos y personales.

Al Dr. Robert Bye por sus sugerencias a lo largo de este estudio que permitieron ampliar mi conocimiento en el campo de la etnobotánica, relacionando en todo momento el quehacer científico con el panorama social.

Al Dr. Rogelio Pereda por guiarme durante el desarrollo de este trabajo experimental, fortaleciendo el mismo con sus observaciones puntuales, teniendo en todo momento, un punto de vista certero.

Agradecimientos personales

A la Dra. Martha Martínez Gordillo por formar parte del jurado y enriquecer con sus comentarios esta tesis, siempre brindándome el conocimiento y el tiempo para discutir los aspectos taxonómicos de la familia Rubiaceae.

Al Dr. Andrés Navarrete por ser miembro del jurado y aportar sus observaciones a este trabajo, además de asesorarme en los aspectos farmacológicos y permitirme trabajar con su grupo el modelo de gastroprotección.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por ser parte del jurado de esta tesis tomándose el tiempo de leerla y comentarla.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega por la asesoría, la cual permitió desarrollar los estudios de farmacocinética de las 4-fenilcumarinas.

A la M. en C. Socorro Alpízar Ramos, responsable del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, por su supervisión en el llenado de las cápsulas de extracto acuoso de corteza de *H. standleyana*.

A las Dras. Araceli Pérez Vásquez e Isabel Rivero Cruz por toda la asesoría técnica brindada en múltiples etapas de este trabajo desarrollado en el laboratorio 124, así como su tiempo invertido para discutir aspectos metodológicos y resultados inherentes a este proyecto de investigación.

A los MVZ Lucía Macías y Héctor Rico, así como Lilia Mejorada por toda la asesoría y el apoyo brindado en la Unidad de Experimentación Animal en diversas etapas que involucraron el uso de modelos animales.

A todos los compañeros del laboratorio 124 de la Facultad de Química, que a través de sus conocimientos, cooperación y sugerencias enriquecieron este trabajo de investigación.

A todos mis amigos que han estado siempre pendientes de mí y formaron parte de los distintos momentos de este transcurrir.

A mi familia de allá y de acá que siempre apoyan y motivan cada una de los ciclos que decido encarar.

A Cristina, Jorge, Azul y Xul, principio de certidumbre y congruencia, siempre presentes en cada paso que doy y partícipes de todo lo que soy.



A mis padres, que con sus huellas coloridas y sonoras

armaron el camino que me hace volver a casa,

donde siempre sé quien soy

I. Índice

	Página
1. Resumen	1
1.1. Abstract	4
2. Introducción	6
3. Antecedentes	8
3.1. Aspectos taxonómicos y etnobotánicos del complejo copalchi	8
3.1.1. <i>Hintonia latiflora</i> (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock	9
3.1.2. <i>Hintonia standleyana</i> Bullock	13
3.1.3. <i>Exostema caribaeum</i> (Jacq.) Schult.	14
3.2. Antecedentes fitoquímicos	16
3.2.1. 4-Fenilcumarinas	16
3.2.2. Triterpenoides de tipo cucurbitano y ursano	18
3.2.3. Alcaloides	20
3.2.4. Ácido clorogénico	20
3.2.5. Otros compuestos	21
3.3. Antecedentes toxicológicos y farmacológicos	22
3.3.1. Toxicidad aguda y mutagenicidad	22
3.3.2. Actividad antiprotozoaria	22
3.3.3. Actividad antimicrobiana	23
3.3.4. Actividad antinociceptiva	23
3.3.5. Actividad antidiabética	24
3.3.6. Actividad vasodilatadora	27
3.3.7. Ensayos clínicos	27
3.3.8. Efectos adversos	28
3.4. Generalidades de la diabetes	28
3.4.1. Fármacos utilizados para el control de la diabetes tipo 2	30
3.5. Generalidades sobre trastornos acidopépticos y gastritis	37
3.5.1. Fármacos utilizados para el control de trastornos acidopépticos y gastritis	34
3.6. Estudios de absorción, permeabilidad, distribución y eliminación de los principios activos de los fármacos	40
4. Objetivos	43
4.1. Objetivos generales	43
4.2. Objetivos particulares	43
5. Hipótesis	44
6. Metodología	45
6.1. Material vegetal	45

6.2. Preparación y extracción del material vegetal	46
6.3. Preparación de las cápsulas de extracto acuoso de corteza de <i>H. standleyana</i>	46
6.4. Análisis cromatográfico	47
6.5. Análisis de las hojas de <i>H. latiflora</i>	47
6.5.1. Variación estacional	47
6.5.2. Variación geográfica	48
6.5.4. Validación del método analítico	48
6.5.4.1. Preparación de la matriz de trabajo	48
6.5.4.2. Preparación los analitos de referencia	49
6.5.4.3. Linealidad del sistema	49
6.5.4.4. Selectividad del método	49
6.5.4.5. Linealidad y exactitud del método	49
6.5.4.6. Precisión	50
6.5.4.7. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	50
6.5.4.8. Estabilidad	50
6.6. Determinación de la dosis letal media (DL ₅₀)	51
6.7. Evaluación de la actividad antidiabética	51
6.7.1. Ensayo hipoglucemiante agudo	51
6.7.2. Curva de tolerancia a la sacarosa oral	52
6.7.3. Curva de tolerancia a la glucosa oral	53
6.7.4. Evaluación de la actividad antihiperoglucemiante de los compuestos 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4) y su aglicona 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (34)	54
6.8. Obtención de las agliconas 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (34) y 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina (35)	54
6.9. Ensayo de inhibición de α-glucosidasas <i>in vitro</i>	55
6.10. Estudio de acoplamiento molecular	56
6.11. Evaluación de la actividad gastroprotectora	57
6.11.1 Determinación del mecanismo de acción gastroprotector	58
6.12. Estudio farmacocinético del compuesto 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4) y su aglicona (34)	59
6.11.1. Cuantificación simultánea de los compuestos 4 y 34 en plasma de rata	59
6.11.1.1. Preparación los analitos de referencia	59
6.11.1.2. Preparación de la matriz de trabajo	59
6.11.1.3. Método de extracción	60
6.11.1.4. Linealidad del sistema	60
6.11.1.5. Selectividad del método	60
6.11.1.6. Linealidad y exactitud del método	60

6.11.1.7. Precisión	60
6.11.1.8. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	60
6.11.1.9. Estabilidad	60
6.11.1.10. Análisis preliminar de la absorción de los compuestos 4 y 34	62
6.11.2. Cuantificación simultánea de los compuestos 4 y 34 en heces de rata	62
6.11.2.1. Preparación los analitos de referencia	62
6.11.2.2. Preparación de matriz de trabajo	62
6.11.2.3. Método de extracción	63
6.11.2.4. Linealidad del sistema	63
6.11.2.5. Selectividad del método	63
6.11.2.6. Linealidad y exactitud del método	63
6.11.2.7. Precisión	64
6.11.2.8. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	64
6.11.2.9. Estabilidad	64
6.11.2.10. Análisis de la eliminación de los compuestos 4 y 34 en rata	64
7. Resultados y discusión	65
7.1. Determinación de la influencia fenológica y geográfica en la concentración de metabolitos biodinámicos de <i>H. latiflora</i>	65
7.1.1. Validación del método analítico	69
7.1.2. Influencia fenológica	73
7.1.3. Influencia geográfica	74
7.2. Comparación de los perfiles cromatográficos	75
7.3. Preparación y extracción del material vegetal	83
7.4. Determinación de la toxicidad preclínica aguda	83
7.5. Evaluación de la actividad antidiabética	86
7.5.1. Ensayo hipoglucemiante agudo	86
7.5.2. Curva de tolerancia a la sacarosa oral	95
7.5.3. Curva de tolerancia a la glucosa oral	105
7.5.4. Inhibición de α -glucosidasas <i>in vitro</i>	107
7.5.5. Actividad antihiperoglucemiante de la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4) y su aglicona (34)	109
7.6. Estudio de acoplamiento molecular	112
7.7. Evaluación de la actividad gastroprotectora	114
7.7.1. Mecanismo de acción gastroprotector	119
7.8. Estudio farmacocinético del compuesto 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4) y su aglicona (34)	121
7.8.1. Cuantificación simultánea de los compuestos 4 y 34 en plasma de rata	121
7.8.2. Cuantificación simultánea de los compuestos 4 y 34 en heces de rata	123

7.9. Propuesta de formulación de los preparados fitoterapéuticos	126
7.9.1. Preparado fitoterapéutico antidiabético	126
7.9.2. Preparado fitoterapéutico gastroprotector	128
7.9.2.1. Preparación de las cápsulas	129
8. Conclusiones	131
9. Perspectivas	133
10. Bibliografía	135
11. Anexos	147
11.1. Gastroprotective effect of <i>Hintonia latiflora</i> and <i>Hintonia standleyana</i> aqueous extracts and compounds	175
11.2. Mexican Antidiabetic Herbs: Valuable Sources of Inhibitors of α - Gucosidases	181

II. Índice de cuadros y figuras

	Página
Figura 1. <i>Hintonia latiflora</i>	11
Figura 2. <i>Hintonia latiflora</i> (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock	12
Figura 3. <i>Hintonia standleyana</i> Bullock	14
Figura 4. <i>Exostema caribaeum</i> (Jacq.) Schult.	16
Figura 5. 4-Fenilcumarinas	18
Figura 6. Triterpenoides de tipo cucurbitano	19
Figura 7. Triterpenoide de tipo ursano	19
Figura 8. Ácidos desoxicordifolínico y clorogénico	20
Figura 9. 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-flavona, manitol, 6-O- β -D-glucopiranosil-4-metoxi-2,3',4'-trihidroxi- β -fenilestireno y 3-O- β -D-glucopiranosido del β -sitosterol	21
Figura 10. Reproducción de la gráfica original contenida en el tomo XII de los AIMN, reportando la actividad antidiabética de <i>H. latiflora</i>	25
Cuadro 1. Principales hipoglucemiantes orales	34
Cuadro 2. Principales fármacos utilizados para el control de los trastornos acidopépticos	39
Figura 11. Diagrama ombrotérmico de Huetamo, Mich.	66
Cuadro 3. Colectas realizadas en la localidad de “La Cocina”	66
Cuadro 4. Colecta realizada en la localidad de “La Arena”	67
Figura 12. Diagrama ombrotérmico de Urique, Chih.	68
Cuadro 5. Colecta realizada en la localidad “Rancho Entre Amigos”	68
Figura 13. Diagrama ombrotérmico de Atenango del Río, Gro.	69
Cuadro 6. Colecta realizada en la localidad de “Tuzantlán”	69
Figura 14. Espectros UV de los compuestos 13 y 24 en distintas muestras	71
Figura 15. Concentración promedio de los compuestos biodinámicos <i>Hintonia latiflora</i> en diferentes etapas fenológicas	74
Figura 16. Concentración de los compuestos biodinámicos de <i>Hintonia latiflora</i> en las poblaciones de Michoacán y Chihuahua	75
Figura 17. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de corteza de <i>H. latiflora</i>	76
Figura 18. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de hojas de <i>H. latiflora</i>	76
Figura 19. Perfil cromatográfico comparativo por CLUE de las infusiones de corteza y hojas de <i>H. latiflora</i>	77
Figura 20. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de corteza de <i>H.</i>	78

<i>standleyana</i>	
Figura 21. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de hojas de <i>H. standleyana</i>	78
<i>standleyana</i>	
Figura 22. Perfil cromatográfico comparativo por CLUE de las infusiones de corteza y hojas de <i>H. standleyana</i>	79
Figura 23. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de corteza de <i>E. caribaeum</i>	80
<i>caribaeum</i>	
Figura 24. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de hojas de <i>E. caribaeum</i>	80
<i>caribaeum</i>	
Figura 25. Perfil cromatográfico comparativo por CLUE de las infusiones de corteza y hojas de <i>E. caribaeum</i>	81
Figura 26. Perfil cromatográfico por CLUE del preparado comercializado bajo el nombre de copalchi	83
Cuadro 7. Relación dosis–muerte en ratones ICR y DL ₅₀ de los extractos acuosos de las rubiáceas pertenecientes al complejo copalchi	85
Figura 27. Efecto agudo de CHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	86
Figura 28. Efecto agudo de CHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	87
Figura 29. Efecto agudo de HHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	88
Figura 30. Efecto agudo de HHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	88
Figura 31. Efecto agudo de CHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos.	89
Figura 32. Efecto agudo de CHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	90
Figura 33. Efecto agudo de HHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	91
Figura 34. Efecto agudo de HHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	91
Figura 35. Efecto agudo de CEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	92
Figura 36. Efecto agudo de CEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	93
Figura 37. Efecto agudo de HEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	94
Figura 38. Efecto agudo de HEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones	94

diabéticos	
Figura 39. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; CHL	96
Figura 40. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; CHL	96
Figura 41. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; HHL	97
Figura 42. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; HHL	98
Figura 43. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; CHS	99
Figura 44. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; CHS	99
Figura 45. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; HHS	100
Figura 46. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; HHS	101
Figura 47. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; CEC	102
Figura 48. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; CEC	102
Figura 49. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; HEC	103
Figura 50. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; HEC	104
Figura 51. Curva de tolerancia a la glucosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; HHL	106
Figura 52. Curva de tolerancia a la glucosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; HHL	106
Cuadro 8. Valores de IC ₅₀ calculados para distintos compuestos del complejo copalchi	109
Figura 54. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; compuestos 4 y 34	110
Figura 55. Curva de tolerancia al almidón oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; compuestos 4 y 34	111
Figura 56. Curva de tolerancia al almidón oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; compuestos 4 y 34	111
Figura 57. Acoplamiento molecular utilizando el modelo estructural de la α -	114

glucosidasa	
Figura 58. Actividad gastroprotectora de CHL y HHL	115
Figura 59. Actividad gastroprotectora de CHS y HHS	116
Figura 60. Actividad gastroprotectora de 13	117
Figura 61. Actividad gastroprotectora de 29	117
Figura 62. Actividad gastroprotectora de la DE ₅₀ de los compuestos 13 y 29 y su comparación con la suma de la DE ₂₅ de ambos compuestos	118
Figura 63. Efecto de la DE ₅₀ de los compuestos 13 y 29 en úlceras inducidas por etanol en ratas pretratadas con NEM, L-NAME e indometacina	120
Figura 64. Cromatograma del extracto acuoso de corteza de <i>H. standleyana</i>	129
Cuadro A1. Resultados experimentales de las curvas de calibración de los compuestos 13 y 29	147
Cuadro A2. Resultados experimentales de los compuestos 13 y 29 referentes a la exactitud del método	149
Cuadro A3. Resultados experimentales de los compuestos 13 y 29 referentes a la precisión del método	150
Cuadro A4. Efecto de las etapas fenológicas en la concentración de metabolitos biodinámicos en la infusión de hojas de <i>H. latiflora</i>	150
Cuadro A5. Diferencias ente las poblaciones de Chihuahua y Michoacán en relación a la concentración de compuestos biodinámicos de la infusión de hojas de <i>H. latiflora</i>	151
Cuadro A6. Efecto agudo de CHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	152
Figura S1. Efecto agudo de CHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	152
Cuadro A7. Efecto agudo de CHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	153
Figura S2. Efecto agudo de CHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	153
Cuadro A8. Efecto agudo de HHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	154
Figura S3. Efecto agudo de HHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	155
Cuadro A9. Efecto agudo de HHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	152
Figura S4. Efecto agudo de HHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	155
Cuadro A10. Efecto agudo CHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones	156

normoglucémicos	
Figura S5. Efecto agudo de CHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	156
Cuadro A11. Efecto agudo CHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	157
Figura S6. Efecto agudo de CHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	157
Cuadro A12. Efecto agudo de HHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	158
Figura S7. Efecto agudo de HHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	158
Cuadro A13. Efecto agudo de HHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	159
Figura S8. Efecto agudo de HHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	159
Cuadro A14. Efecto agudo de CEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	160
Figura S9. Efecto agudo de CEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	160
Cuadro A15. Efecto agudo de CEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	161
Figura S10. Efecto agudo de CEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	161
Cuadro A16. Efecto agudo de HEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	162
Figura S11. Efecto agudo de HEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	162
Cuadro A17. Efecto agudo de HEC (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos.	163
Figura S12. Efecto agudo de HEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	163
Cuadro A18. Efecto de CHL en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos	164
Cuadro A19. Efecto de CHL en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones diabéticos	164
Cuadro A20. Efecto de HHL en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos	165
Cuadro A21. Efecto de HHL en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en	165

ratones diabéticos	166
Cuadro A22. Efecto de CHS en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos	166
Cuadro A23. Efecto de CHS en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones diabéticos	166
Cuadro A24. Efecto de HHS en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos	167
Cuadro A25. Efecto de HHS en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones diabéticos	167
Cuadro A26. Efecto de CEC en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos	168
Cuadro A27. Efecto de CEC en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones diabéticos	168
Cuadro A28. Efecto de HEC en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos	169
Cuadro A29. Efecto de HEC en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones diabéticos	169
Cuadro A30. Efecto de HHL en una curva de tolerancia a la glucosa oral en ratones normoglucémicos	170
Cuadro A31. Efecto de HHL en una curva de tolerancia a la glucosa oral en ratones diabéticos	170
Cuadro A32. Efecto de la tolerancia a la sacarosa oral de los compuestos 4 y 34 en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	171
Cuadro A33. Efecto de la tolerancia a al almidón oral de los compuestos 4 y 34 en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos.	171
Cuadro A34. Efecto de la tolerancia a al almidón oral de los compuestos 4 y 34 en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	172
Cuadro A35. Actividad gastroprotectora de HHL, CHL, HHS y CHS	173
Cuadro A36. Actividad gastroprotectora del compuesto 13	173
Cuadro A37. Actividad gastroprotectora del ácido clorogénico 29	174
Cuadro A38. Actividad gastroprotectora de la DE ₅₀ de los compuestos 13 y 29 , y su comparación con la suma de la DE ₂₅ de ambos compuestos	174

III. Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
%GP	Porcentaje de gastroprotección
°C	Grado Celsius
4-FC	4-fenilcumarina
Å	Armstrong
ABC	Área bajo la curva
ACG	Ácido clorogénico
ACN	Acetonitrilo
ADA	American Diabetes Association
AINM	Anales del Instituto Médico Nacional
AMPK	Proteína cinasa activada por adenosin monofosfato
ANADEVA	Análisis de varianza
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
ca.	Casi
CEC	Extracto acuoso de la corteza de <i>Exostema caribaeum</i>
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHL	Extracto acuoso de la corteza de <i>Hintonia latiflora</i>
CHS	Extracto acuoso de la corteza de <i>Hintonia standleyana</i>
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CLUE	Cromatografía líquida de ultra eficiencia
cm	Centímetro
CV	Coefficiente de variación
CYP	Citocromo P-450
DE ₅₀	Dosis efectiva media
DEA	Desviación estándar absoluta
dL	Decilitro
DL ₅₀	Dosis letal media
DPP-4	Dipeptidil peptidasa IV
EC	<i>Exostema caribaeum</i>
FCME	Herbario de la Facultad de Ciencias
g	Gramo
GIP	Polipéptido inulinotrópico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido 1 análogo de glucagón
Glu	Ácido glutámico
GLUT-2	Transportador de glucosa 2
HEC	Extracto acuoso de las hojas de <i>Exostema caribaeum</i>
HHL	Extracto acuoso de las hojas de <i>Hintonia latiflora</i>
HHS	Extracto acuoso de las hojasde <i>Hintonia standleyana</i>
His	Histidina

HL	<i>Hintonia latiflora</i>
HS	<i>Hintonia standleyana</i>
i.p.	Intraperitoneal
kg	Kilogramo
K_i	Constante de unión
km	Kilómetro
L-NAME	N^G -nitro-L-arginina
Leu	Leucina
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m	Metro
m snm	Metros sobre el nivel del mar
MeOH	Metanol
MEXU	Herbario Nacional
mg	Miligramo
mg/g DC	Miligramo por gramo de droga cruda
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Normalidad
NA	Nicotinamida
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
NOM	Norma Oficial Mexicana
NP-SH	Compuestos endógenos sulfhídricos no-proteicos
NSAID	Antiinflamatorios no esteroideos
OCH ₃	Metoxilo
OH	Hidroxilo
p.o.	Intragástrico
PDA	Arreglo de fotodiodos
PG	Prostaglandinas
Phe	Fenilalanina
PPAR γ	Receptor gama activado por proliferador de peroxisomas
Pro	Prolina
r^2	Coefficiente de correlación
s.c.	Subcutáneo
seg	Segundo
Ser	Serina
STZ	Estreptozotocina
TAO	Tolerancia al almidón oral
TFA	Ácido trifluoroacético
TGO	Tolerancia a la glucosa oral

Thr	Treonina
t _R	Tiempo de retención
TSO	Tolerancia a la sacarosa oral
Tyr	Tirosina
U	Unidades
UV	Ultravioleta
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro

1. Resumen

El presente trabajo describe una serie de estudios toxicológicos y farmacológicos conducentes a establecer la eficacia de *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock, y *H. standleyana* Bullock como agentes gastroprotectores. De manera adicional, se completaron los estudios de eficacia como agente antihiper glucémico e hipoglucemiantes de las infusiones elaboradas de las cortezas y hojas de las dos especies anteriores y de *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. et Schult (Rubiaceae). Las tres especies constituyen el grupo de rubiáceas del complejo copalchi, el cual se caracteriza por tener cortezas amargas y emplearse como sustitutos de las quinas, usadas en el tratamiento de las fiebres palúdicas.

La evaluación de la toxicidad preclínica aguda en ratón utilizando el método de Lorke mostró que las infusiones preparadas a partir de las cortezas y hojas de las tres especies analizadas son seguras para roedores ya que en todos los casos la dosis letal media fue superior a los 5000 mg/kg.

La eficacia antidiabética de los extractos acuosos de las hojas y corteza de *H. latiflora*, *H. standleyana* y *E. caribaeum* se caracterizó a partir del estudio de los efectos hipoglucemiantes agudo y antihiper glucémico en ratones normoglucémicos y diabetizados mediante un tratamiento con nicotinamida-estreptozotocina (NA-STZ); éste último empleando experimentos de tolerancia a la sacarosa y al almidón administrados en forma oral. A pesar de las similitudes en la composición química de las tres plantas, se demostró que el mejor agente hipoglucemiante es el preparado de las hojas de *H. latiflora*, mientras que el mejor efecto antihiper glucémico lo presentan el extracto acuoso de la corteza de *E. caribaeum* seguido por el extracto acuoso de las hojas de *H. standleyana*; asimismo, el extracto acuoso de las hojas de *H. latiflora* presenta una actividad antihiper glucemiante significativa en el ensayo de tolerancia a la glucosa oral. Con la finalidad de caracterizar el mecanismo de acción por el cual los extractos evaluados disminuyen el pico postprandial durante los estudios de tolerancia a la sacarosa oral, se determinó la actividad antihiper glucemiante *in vivo* e *in vitro* de compuestos selectos, aislados de las distintas drogas crudas en estudio, siendo la 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina el mejor inhibidor de la actividad enzimática de las α -glucosidasas.

Se demostró la actividad gastro protectora de los extractos acuosos de hojas y corteza de *H. latiflora* y *H. standleyana* utilizando un modelo de lesión gástrica inducida por etanol en

ratas. Los resultados indicaron que las cortezas de *H. latiflora* ($DE_{50} = 184.7$ mg/kg) y *H. standleyana* tuvieron actividad gastroprotectora significativa a las dosis de 300 mg/kg ($80.5 \pm 3.35\%$ y $80.26 \pm 3.96\%$ de gastroprotección, respectivamente). Los extractos de hojas también fueron activos a partir de las dosis de 177 mg/kg y 300 mg/kg.

Los resultados de este segundo grupo de experimentos sugieren que las hojas pueden ser usadas de manera alternativa, lo cual, en términos de la conservación del recurso natural es relevante, pues como se indicó, las poblaciones de ambas especies de *Hintonia* son escasas y se encuentran en peligro de extinción. Los compuestos 5-*O*-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y el ácido clorogénico son algunos de los responsables de dicha actividad farmacológica; su efecto está relacionado con la producción de grupos sulfhidrilo endógenos, que a su vez favorece la generación del moco alcalino en la mucosa gástrica.

El análisis de la influencia fenológica y geográfica sobre la concentración de compuestos farmacológicamente activos en la infusión de las hojas de *H. latiflora* permitió asegurar el mejor régimen de recolección de las mismas con la finalidad de asegurar la concentración adecuada de los metabolitos activos y, de esta forma, garantizar la eficacia terapéutica.

El estudio farmacocinético de glicósidos de 4-fenilcumarinas selectas demostró que estos compuestos se hidrolizan para formar la aglicona correspondiente que no se absorbe, al igual que su glicósido de origen, en el tracto gastrointestinal, ya que se eliminan en una alta proporción por vía fecal. Todos los análisis conducentes a determinar la presencia de dichos productos en plasma y en orina demostraron su ausencia. Estos resultados sugieren que las diversas actividades farmacológicas de estos productos se dan *in situ*, con la posibilidad de desencadenar cascadas de señalización que explican algunos de los efectos farmacológicos observados a nivel sistémico.

Con las observaciones y los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de investigación, fue posible proponer la formulación de dos preparados fitoterapéuticos:

- Cápsula de extracto acuoso desecado de corteza de *H. standleyana*, estandarizada con respecto a la 5-*O*-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, auxiliar en el tratamiento de úlceras gástricas.

- Tisana a partir de las hojas secas y fragmentadas de *H. latiflora*, estandarizada con respecto a la 5-*O*-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y al ácido clorogénico, coadyuvante en el control de los niveles de glicemia en pacientes diabéticos.

1.1. Abstract

This dissertation describes the pharmacological and toxicological studies conducted to determine the gastroprotective action of *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock, *H. standleyana* Bullock. In addition, the antihyperglycemic and hypoglycemic actions of the infusion prepared from the leaves and stem bark of *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. et Schult (Rubiaceae) and both *Hintonia* species. The three plants belong to the Mexican medicinal plant complex known as copalchi, featured by their extremely bitter stem bark and their long-term use as a substitute of cinchona bark for healing fevers associated with malaria. In contemporary Mexico, they are popularly used as antidiabetic and gastroprotective agents.

The preclinical acute toxicity evaluation in mice using the method of Lorke revealed the innocuousness of the infusions to these animals since in all cases the lethal dose was higher than 5000 mg/kg.

The hypoglycemic and antihyperglycemic effects of the aqueous extracts of the leaves and stem bark of the three plants was assessed using acute and sucrose tolerance tests in normal and diabetic (NA-STZ) mice, respectively. Despite of the chemical composition similarities between the three plants, the results demonstrated that the best hypoglycemic agent was the *H. latiflora* leaves extract; while the best antihyperglycemic effect was shown by the stem bark extract of *E. caribaeum*, followed by the *H. standleyana* leaves extract; in addition, the extract of *H. latiflora* from the leaves show a significant antihyperglycemic activity in the oral glucose tolerance test. In order to characterize the antihyperglycemic mechanism of action of the extracts evaluated, the *in vitro* and *in vivo* α -glucosidases inhibitory activity was assessed, being the 7-methoxy-5,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin the best enzymatic activity inhibitor.

The gastroprotective activity of the *H. latiflora* and *H. standleyana* leaves and stem bark aqueous extracts was demonstrated; in all cases the gastric injuries formation was significantly inhibited. The compounds 5-O-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin and chlorogenic acid were some of the active compounds; their effect was related with the endogenous sulfhydryl groups production, maintaining the gastric mucosal integrity by the alkaline mucus production.

The chemical study leads to the determination of the identity parameters for the unambiguous identification of the three main Rubiaceae species. Additionally, the

chromatographic profiles allow the recognition of the different crude drugs: leaves or stem bark, thus, letting the characterization of the pharmacologically active principles and their standardization.

The analysis of the phenological and geographical influence in the concentration of pharmacologically active compounds in *H. latiflora* leaves infusion revealed the best harvest season ensuring the appropriate content of the active metabolites, and accordingly the pharmacological efficacy of the crude drug.

The pharmacokinetic study of selected 4-phenylcoumarins glycosides showed the *in vivo* hydrolysis into their corresponding aglycones; in none of the cases the compounds were absorbed in the gastrointestinal tract, nevertheless they were eliminated in a high rate in the feces. All the analyses targeted to their identification in plasma or urine show their absence. These results suggest the *in situ* activity of pharmacological effects of these products, triggering molecular pathways that explain some of the biological effects observed at a systemic level.

Altogether, with the observations and results of this work, it was possible to put forward two phytoterapeutic formulations:

- A dried standardized *extract of H. standleyana* stem bark lyophilized formulated as capsules and intended to the gastric ulcers treatment.
- A tisane of the *H. latiflora* dry and fragmented leaves, standardized in relation of the 5-*O*-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenilcoumarin and chlorogenic acid, for the glycemic level control in diabetics.

2. Introducción

Hintonia latiflora (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock, *H. standleyana* Bullock y *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. et Schult (Rubiaceae) conforman un complejo de plantas medicinales conocido como complejo copalchi, el cual se define como un grupo de plantas que reciben el mismo nombre común, comparten características morfológicas y/o aromáticas y les son atribuidas propiedades curativas similares. Generalmente sobresale una planta que le da el nombre al complejo y sale de su área de distribución geográfica por el mercadeo; en este caso sobresale la rubiácea *H. latiflora*. El complejo copalchi, se caracteriza por tener cortezas amargas y emplearse como sustitutos de las quinas, usadas en el tratamiento de la fiebres palúdicas. En la actualidad su uso como agentes antidiabéticos y gastroprotectores se ha popularizado en el país (Linares y Bye, 1987; Anaya 1991). Además, las plantas del complejo reciben varios nombres vulgares para una misma especie, tal es el caso del vocablo “copalchi”, pero también destaca el nombre de “quinas”.

La especie pilar del complejo, *H. latiflora*, es una planta no sólo de amplio uso en la medicina tradicional sino también con una amplia historia que data de más de 400 años de antigüedad. Su corteza es altamente valorada por sus propiedades antidiabéticas (Sahagún, 1540; Mociño, 1802; Terres, 1913; Gentry, 1942; Díaz, 1976, Bye, 1986; Martínez, 1989).

Recientemente, se comprobó el potencial antidiabético de las hojas de *H. latiflora*, presentando tanto propiedad antihiper glucémica como hipoglucemiantes significativa. Por otro lado, se establecieron los parámetros que permitieron conocer el perfil químico de la infusión de las hojas. Con toda esta información, se consideró factible proponer la sustitución del uso de la corteza por el de las hojas de *H. latiflora* (Cristians *et al.*, 2009).

Si bien existen numerosos estudios referentes a la química y farmacología de *H. latiflora*, *H. standleyana* y *E. caribaeum*, estos aún son insuficientes para proponer el desarrollo de un preparado fitoterapéutico a partir de alguna de estas especies. Por este motivo, el presente trabajo busca aportar información referente a los aspectos de seguridad, eficacia y calidad de los extractos acuosos de hojas y cortezas de las tres rubiáceas del complejo copalchi.

La evaluación de la toxicidad preclínica aguda permitirá establecer los parámetros de seguridad de los extractos acuosos para avalar su uso en ensayos farmacológicos en animales, o

bien establecer un punto de partida para futuros análisis clínicos, estimando el riesgo de una intoxicación aguda.

La eficacia antidiabética de los extractos acuosos se caracterizará a partir del estudio de los efectos hipoglucemiante agudo y antihiper glucémico en ratones normoglu cémicos y diabéticos; además, se llevarán a cabo estudios *in vitro* de inhibición de α -glucosidasas con la finalidad de entender el posible mecanismo de acción antihiper glucémico. Asimismo, la eficacia gastro protectora de extractos y compuestos, se evaluará utilizando un modelo de lesión gástrica inducida por etanol en ratas.

El análisis de la influencia fenológica y geográfica sobre la concentración de compuestos farmacológicamente activos en la infusión de las hojas de *H. latiflora* dará pie al aseguramiento del mejor régimen de recolección de las mismas con la finalidad de asegurar la concentración adecuada de los metabolitos activos y, de esta forma, garantizar la eficacia terapéutica.

Además la comparación de los perfiles cromatográficos de las infusiones de las hojas y cortezas de las tres especies permitirá establecer si las muestras comerciales se sustituyen por otras especies no pertenecientes al complejo, se adulteran o bien determinar si el producto comercial es una mezcla de dos o más especies de copalchi.

Por último, el estudio farmacocinético de compuestos biodinámicos selectos generará una visión preliminar del metabolismo de dichos productos naturales permitiendo así entender la manera en la cual ejercen diversas actividades farmacológicas.

Finalmente, los estudios realizados permitirán proponer la formulación de preparados fitoterapéuticos de amplia aceptación para la población mexicana para el tratamiento de la diabetes y las úlceras gástricas.

3. Antecedentes

3.1. Aspectos taxonómicos y etnobotánicos del complejo copalchi

Hintonia latiflora (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock, *Hintonia standleyana* Bullock y *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. et Schult son las especies principales que conforman el grupo de rubiáceas de un complejo de plantas medicinales conocido como complejo copalchi. Un complejo de plantas medicinales se define como un grupo de plantas que reciben el mismo nombre común, comparten características morfológicas y/o aromáticas y les son atribuidas propiedades curativas similares (Linares y Bye, 1987). Generalmente sobresale una planta que le da el nombre al complejo y sale de su área de distribución geográfica debido a su amplia comercialización; siendo la rubiácea *H. latiflora* la que sobresale en este complejo. En el caso particular del complejo copalchi, si bien el vocablo “copalchi” es el que se utiliza con mayor frecuencia, el nombre de quina también destaca entre los nombres vulgares (Linares y Bye, 1987; Anaya 1991).

Dentro del complejo copalchi se encuentran otras especies de la familia Rubiaceae, tal es el caso de *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum., *Exostema mexicanum* A. Gray y *Simira mexicana* (Bullock) Steyerem. Entre las características compartidas para estas especies botánicas resalta la presencia de cortezas amargas y su uso tradicional como febrífugos; sin embargo, no pueden sustituir a las especies del género *Cinchona* y deben considerarse como falsas quinas. De manera adicional, bajo el nombre de copalchi quedan suscritas diversas especies de euforbiáceas, entre las que destacan *Croton guatemalensis* Lotsy, *C. glabellus* L., *C. niveus* Jacq. y *C. reflexifolius* Kunth, lo cual complica la definición y estudio del complejo copalchi (Anaya, 1991).

La familia Rubiaceae cuenta con una gran diversidad de especies, especialmente en los trópicos, con alrededor de 10 000 exponentes. Esta familia es biológica y morfológicamente diversa, con distintas formas de vida y rasgos reproductivos. Las formas de vida varían desde las hierbas pequeñas, epífitas, lianas, arbustos y árboles grandes; cuenta con una variedad de flores con diferentes sistemas de polinización. Los frutos y semillas son también variados y se dispersan mediante varios agentes; inclusive, los rasgos de los frutos se han usado como caracteres de clasificación. Las rubiáceas son una familia conocida por su difícil clasificación a nivel intrafamiliar. Un problema persistente en cuanto al esquema de clasificación, es el uso de

uno o pocos caracteres como marcadores absolutos de un grupo taxonómico, orillando a clasificaciones poco naturales (Bremer *et al.*, 1995).

La familia Rubiaceae se divide en cuatro subfamilias: Cinchonoideae, Ixoroideae, Rubioideae y Antirheoideae. El género *Hintonia* ha sido difícil de ubicar dentro de una subfamilia, inclusive después de estudios filogenéticos utilizando la secuencia del gen del cloroplasto *rbcL*; de esta forma, se encuentra en una dicotomía entre las subfamilias Ixoroideae *sensu lato* y Cinchonoideae *sensu stricto* (Bremer *et al.*, 1995; Stranzinger *et al.*, 2006).

El género *Hintonia* fue descrito por primera vez por Bullock en 1935, quien lo separó del género *Portlandia*. Las especies del género *Hintonia* son endémicas de México y el norte de Centroamérica. Se conocen cuatro especies: *H. latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock, *H. lumaeana* (Baill.) Bullock, *H. octomera* (Hemsl.) Bullock y *H. standleyana* Bullock (Borhidi, 2006; Stranzinger *et al.*, 2006).

Además de la evidencia molecular, Borhidi (2006) señala una serie de caracteres anatómicos que diferencian a *H. latiflora* de *H. standleyana*, por mucho tiempo consideradas como una sola especie. *H. latiflora* posee los lóbulos del cáliz y la corola glabros, la superficie de las hojas es glabra y posee domacios en el envés. En contraste *H. standleyana* posee los lóbulos del cáliz y corola pubescentes y blanquecinos; la superficie de las hojas es pubescente-pilosa y el envés es piloso, al menos a lo largo de la venación.

3.1.1. *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock

Hintonia latiflora es un arbusto o árbol de hasta 8 m de alto con ramas cinéreas, cortopelosas o glabras, entrenudos cortos o alargados. Estípulas triangulares, de 2 a 4 mm de largo, agudas o acuminadas, con glándula apical; pecíolos delgados, de 0.4 a 2 cm de largo. Hojas con lámina ovada, oblonga, oval o ovado-oval, de 3.5 a 12 por 1.5 a 6 cm, redondeada hasta aguda en la base, por lo común abruptamente corto-decurrente, obtusa, aguda o abruptamente corto-acuminada en el ápice, verde vivo, concolor, glabra o esparcidamente corto-pelosa en el haz, la venación plana, corto-pelosa o glabra en el envés, a menudo con grupos de tricomas blancos en las axilas de los nervios laterales, domacios, prominentes y arcuados, el margen plano. Flores perfectas; axilares, solitarias, pedicelos de 1 a 2.5 cm de largo, bracteolados en la mitad o más abajo, bractéolas menudas, sublobuladas; hipanto glabro o peloso, de 5 a 7 mm de largo; actinomórficas; lóbulos del cáliz 6, anchamente lineares o

tubulados, de 1 a 2 cm de largo; corola blanca o verdosa en seco, de 6 a 8 cm de largo, tubo estrechamente obcónico, anguloso, ca. 3 cm de ancho en la garganta, lóbulos 6, plegado-imbrincados, redondeado-ovados o semiorbiculares, ca. $\frac{1}{4}$ de largo que el tubo, estambres 6, iguales de largo o más cortos que la corola, anteras de 2 a 2.5 cm de largo. Fruto en cápsula obovada, aguda en la base, de 2 a 3 por 1.5 a 2 cm, ligeramente comprimida, 6-costada, lenticelada y finamente tuberculada, parda. Semillas ovales u orbiculares, de 4 a 7 mm de largo, pardas. La planta florece en los meses de febrero y marzo, llegando a presentar una floración extemporánea en el mes de junio, las hojas están presentes entre los meses de febrero y octubre. Se distribuye a todo lo largo del territorio nacional, llegando al norte de Centroamérica; principalmente se distribuye en el bosque tropical caducifolio (Borhidi, 2006; Cristians, observaciones personales) (Figuras 1 y 2).

Nombre científico: *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Rubiaceae) (Icones Plantarum 33: t. 3295: 4. 1935).

Sinonimias: *Coutarea latiflora* Sessé et Mociño ex DC. (Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis 4: 350. 1830); *Coutarea pterosperma* (S. Watson) Standley (North American Flora 32: 127. 1921); *Portlandia pterosperma* S. Watson (Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences 24: 52. 1889) *Portlandia hexandra* Jacq. (Enumeratio Systematica Plantarum 16. 1760).

Nombres comunes: Campanilla (Jalisco), campanillo (Chiapas), cáscara sagrada, chib'u'she (Sonora, Pima), chichicpatli (Náhuatl), copalchi, copalchile, copalquín, corteza de Jojutla, huetiyo (Sonora-Chihuahua, Warihío), iwíchuri (Chihuahua, Tarahumara), palo amargo, palo amargoso (Sinaloa), palo copalche (Durango), palo de bolsa (Michoacán), quina de Michoacán, quina, San Antonio, tacusisha (Nayarit, Cora), tapichogua (Sinaloa, Mayo) y tyaacujsixa'a (Nayarit, Cora) (Sahagún, 1540; Mociño, 1802; Arévalo, 1897; Gentry, 1942; Díaz, 1976, Bye, 1986, 2007; Martínez, 1989; Argueta *et al.*, 1994).

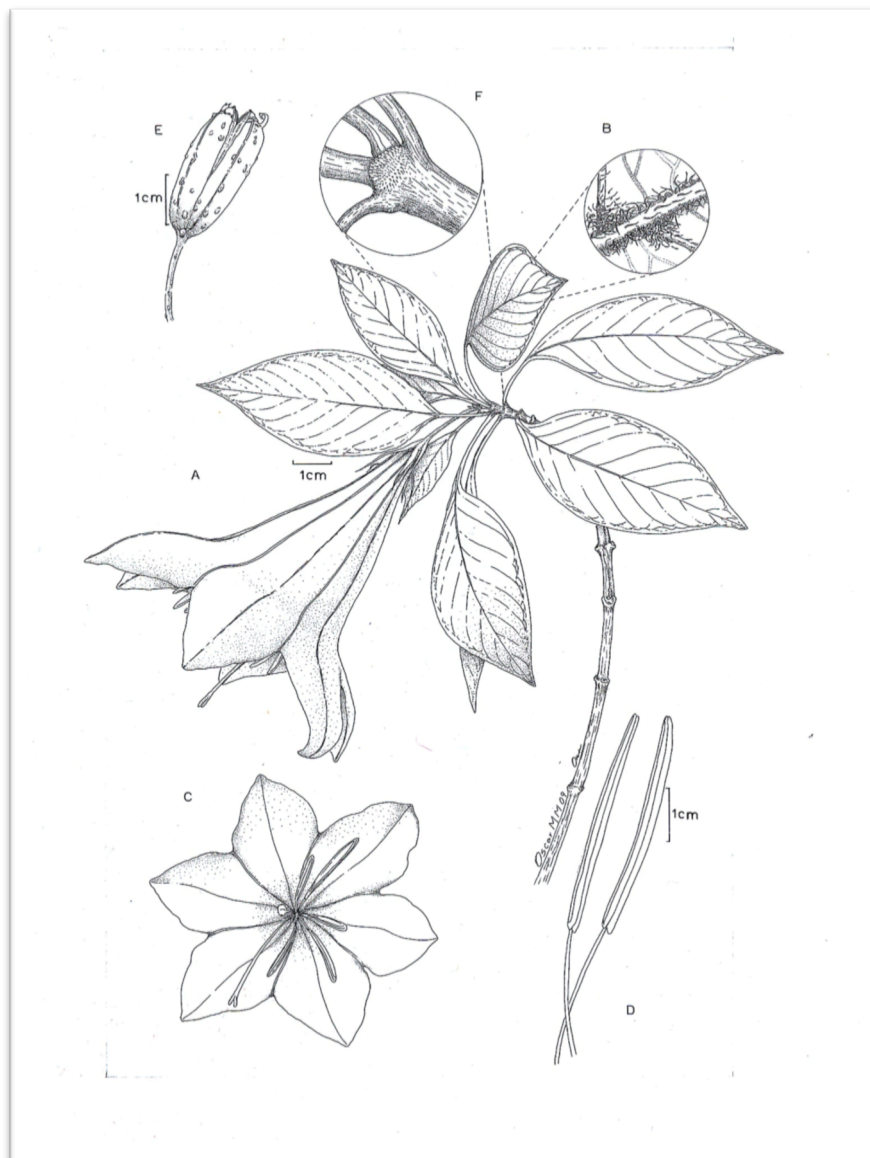


Figura 1. *Hintonia latiflora*. A. *H. latiflora* B. Domacios C. Flor D. Estambres E. Fruto F. Filotaxia (Oscar Montiel, 2009)



Figura 2. *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock. Huetamo, Michoacán. Julio de 2010. (S. Cristians, 2010)

Hay una amplia información acerca de los usos de *H. latiflora* recabada a través de diversos estudios históricos y etnobotánicos (Sahagún, 1540; Mociño, 1802; AIMN, 1894, Loaeza, 1906, 1907, 1908; Landa, 1913; Terres, 1913; Gentry, 1942; Díaz, 1976, Bye, 1986, 2007; Martínez, 1989; Argueta *et al.*, 1994). Toda esta información ha sido condensada de la siguiente manera:

Padecimientos del sistema circulatorio. La corteza se utiliza para purificar la sangre. También se describe el uso tópico de la corteza hervida para tratar dolores de pecho cercanos al corazón.

Padecimientos del sistema digestivo. El cocimiento y/o infusión de la corteza se usa contra problemas digestivos como purgante, contra el dolor de estómago, empacho, gastritis, úlcera gástrica, gastroenteritis, o bien como digestivo. Por otro lado, se utiliza en enfermedades de la vesícula biliar, “tratar la bilis” y los cálculos biliares. Además, se incluye su uso en el tratamiento de los cálculos vesicales.

Padecimientos del sistema endocrino. El uso de la infusión de la corteza de *H. latiflora* como antidiabético es quizás el uso más difundido hoy en día.

Padecimientos del sistema genito-urinario. La corteza en infusión se utiliza como diurético y contra diversas enfermedades del riñón. Además, los lavados y la unción de la corteza hervida se recomiendan para en el tratamiento de la comezón en los genitales.

Infecciones e infestaciones. La infusión de la corteza se utiliza como antiparasitario y en infecciones causadas por protozoarios, específicamente como antipalúdico. También, se utiliza para controlar fiebres relacionadas con el paludismo.

Heridas. Se utiliza para tratar heridas y granos, a través de lavados con el cocimiento de la corteza y la aplicación de corteza seca y pulverizada. Por otro lado, su infusión se usa para tratar heridas internas.

Padecimientos mentales. Se utiliza la infusión de la corteza como tranquilizante.

Padecimientos del embarazo. El cocimiento de la corteza se utiliza para “quitar el aire de las mujeres que se alivian de niño”, tomando la infusión durante el periodo que la madre permanece acostada (cuarentena).

Padecimientos de la piel. Lavados con la infusión de la corteza se utilizan para tratar las manchas en la piel y el mal de pinto. También, su uso se recomienda contra la caída del cabello.

3.1.2. *Hintonia standleyana* Bullock

Hintonia standleyana es un árbol o arbusto de hasta 6 m de alto, tronco cubierto por una corteza suberosa, ramas densamente corto-pelosas cuando jóvenes, más tarde glabras. Estípulas deltadas, 2 a 4 mm de largo, agudas o acuminadas. Hojas con pecíolo flexuoso, 0.5 a 2 cm de largo; lámina ovada o anchamente oval, de 4 a 12 por 1.5 a 6 cm, obtusa o cortamente acuminada en el ápice, redondeada, hasta aguda o subcordada en la base, usualmente cortamente pelosa en el haz, blanco-tomentosa o pelosa a glabrescente en el envés, salvo los nervios hirsutos; pedicelos ebracteolados, 5 a 15 mm de largo. Hipanto densamente peloso, unos 5 mm de largo, lóbulos del cáliz lineares o subulados, 6 a 10 mm de largo. Flores de olor dulce. Corola blanca, tomentosa hasta esparcidamente pelosa por fuera, tubo 3 a 4.5 cm de ancho en la garganta, lóbulos triangulares, mitad del largo que el tubo o más cortos. Estambres ligeramente más cortos que la corola. Fruto en cápsula obovada, ca. 2 cm de largo, parda, 6-costada, oscura u obviamente lenticelada. Semillas 5 a 7 de largo, pardas. Esta especie se

distribuye en Guerrero, Oaxaca y Veracruz, así como en Guatemala en el bosque tropical caducifolio (Borhidi, 2006) (Figura 3).

Nombre científico: *Hintonia standleyana* Bullock (Rubiaceae) (Icones Plantarum 33(4): 6, sub t. 3295. 1935).

Sinonimias: *Coutarea latiflora* Sessé et Mociño ex DC. (Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis 4: 350. 1830).

Nombres comunes: Copalchi, copalchi de Jojutla (Morelos), falsa quina, quina amarilla (Díaz 1976; González-Chevez, 2000; Monroy y Castillo-España, 2007).

Usos: antidiabético, febrífugo, antipalúdico, antiparasítico, gastritis, trastornos gastrointestinales, úlceras gástricas (Díaz 1976; González-Chevez, 2000; Monroy y Castillo-España, 2007).

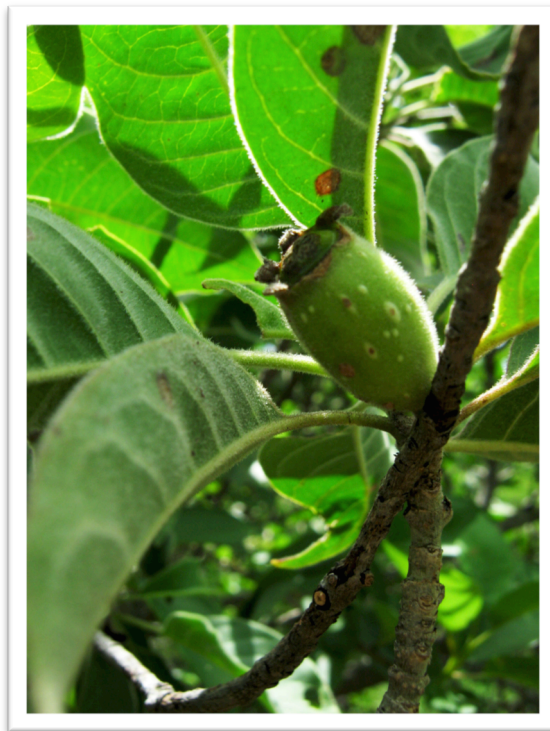


Figura 3. *Hintonia standleyana* Bullock. Tuzantlan, Guerrero. Julio de 2010. (S. Cristians, 2010)

3.1.3. *Exostema caribaeum* (Jacq.) Schult.

Exostema caribaeum es un árbol o arbusto de hasta 8 m de altura, corteza escamosa café con manchas blanquecinas, fisuras longitudinales profundas y anchas. Estípulas interpeciolares de 2.5 a 5 mm cilioladas; peciolo de 3 a 12 mm. Hojas ovadas a elíptico-oblongas, 5 a 11 cm

de largo y 1.3 a 5 cm de ancho, ápice acuminado, base aguda, papiráceas, nervios secundarios de 4 a 5 pares, pecíolos 6-12 mm de largo, con grupos de tricomas en las axilas de los nervios del envés, o a veces densamente pelosas, el margen plano. Flores axilares, solitarias, los pedicelos 4 a 10 mm de largo; tubo del cáliz glabro, 3 a 5 cm de largo, lóbulos 1 mm de largo, anchos, obtusos o agudos. Corola blanca tornándose violáceo-rosada con la edad, con el tubo fusionado terminando con 5 pétalos largos. Estambre exserto, anteras de 2 cm. Los frutos son cápsulas ovaladas elípticas de 7 a 15 mm de largo y 6 a 14 mm de ancho, que no se abren, de color café oscuro; semillas 3-6 mm de largo. El género *Exostema* es originario de la República Dominicana y Cuba; su distribución abarca desde el sur de Florida, incluyendo los Cayos, y distribuyéndose hacia el Caribe y Centroamérica. En nuestro país se encuentra en los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tamaulipas y Yucatán (Anaya, 1991; Argueta, *et al.*, 1994; Borhidi, 2006) (Figura 4).

Nombre científico: *Exostema caribaeum* (Jacq.) Schult. (Rubiaceae) (Systema Vegetabilium 5: 18. 1819).

Sinonimias: *Cinchona caribaea* Jacq. (Enumeratio Systematica Plantarum, quas in insulis Caribaeis 16. 1760). *Exostema longicuspe* Oerst. (Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening i Kjøbenhavn 1852(2-4): 48. 1853).

Nombres comunes: carey de costa (Cuba), “caribbean princewood”, “caribbee barktree”, cáscara sagrada roja, cerillo, chakiis, sabakche’ (Quintana Roo), “chandelle anglaise”, copalche, copalchi de Jojutla, copalchi (Guerrero), copalchi de Michoacán (Michoacán), copalti (Estado de México), cuerpo de zapo, hestio (Nicaragua), “jesuitbark” (Jamaica), falsa quina, lirio santana, palo de jazmín, palo de quina (Puerto Rico), piñí-piñí, “princewood” (Bahamas) quina, quina criolla (República Dominicana), “quinquina piton” (Martinica), “quinquina pays” (Hatí), teílla, “yellow-torch” (Islas Vírgenes) (Anaya, 1991; Argueta, *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 2005; Little *et al.*, 2001; Monroy y Castillo-España, 2007).

Usos: antidiabético, fiebres palúdicas, reumatismo, padecimientos gastrointestinales como amibiasis, otras parasitosis, disentería, gastritis, úlceras, clarificar la sangre, fomentos en granos, llagas, granos y manchas (Díaz, 1976; Anaya, 1991; Argueta, *et al.*, 1994; Martínez, 1989).



Figura 4. *Exostema caribaeum* (Jacq.) Schult. Tuzantlán, Guerrero. Julio de 2010. (A. Madariaga, 2010)

3.2. Antecedentes fitoquímicos

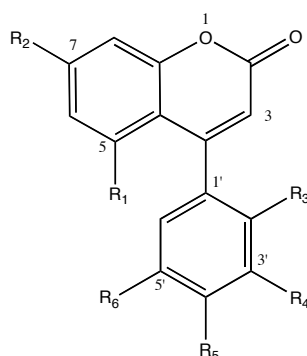
3.2.1. 4-Fenilcumarinas

De la corteza y hojas de *H. latiflora* se han aislado algunos derivados de 4-fenilcumarinas (1-18) y 4-fenil-5,2'-óxido-cumarinas (19-21) (Figura 5). Estos compuestos son de interés, ya que han sido identificados como los principios responsables de la actividad antidiabética de los extractos de la planta (Reher y Kraus, 1984; Mata *et al.*, 1990; 1992 y 2008; Argotte-Ramos *et al.*, 2006; Guerrero-Analco *et al.*, 2007; Cristians *et al.*, 2009). Estos metabolitos fueron caracterizados como: 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcumarina (1), 5,7,4'-trimetoxi-3'-hidroxi-4-fenilcumarina (2), 5,2',5'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (3), 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4), 5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5), 5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (6), 6''-O-acetil-5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (7), 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-4'-hidroxi-4-fenilcumarina (8), 5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-2',4',5'-trihidroxi-4-fenilcumarina (9), 5-O-β-D-glucopiranosil-7,4'-dimetoxi-3'-hidroxi-4-fenilcumarina (10), 6''-O-acetil-5-O-β-D-galactopiranosil-7,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (11), 6''-O-acetil-5-O-β-D-galactopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (12), 5-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (13), 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-

3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (14), 5-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (15), 7-metoxi-4',5'-dihidroxi-4-fenil-5,2'-óxido-cumarina (19) y 7,4'-dimetoxi-5'-hidroxi-4-fenil-5,2'-óxido-cumarina (20).

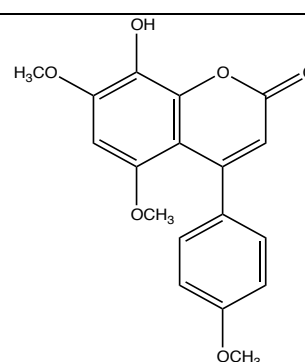
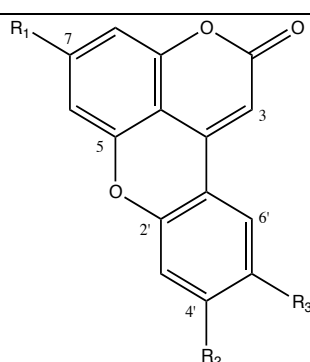
La composición química de las hojas y la corteza de *H. standleyana* comparte varias de las 4-fenilcumarinas antes mencionadas, de esta forma se han identificado a los metabolitos 4-7, 11-14 y el compuesto 6''-O-acetil-5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (16) (Mata *et al.*, 2008; Guerrero-Analco *et al.*, 2007; Cristians *et al.*, 2009).

En el caso de la corteza de *E. caribaeum*, en 1969 Sánchez-Viesca aisló, a partir de un extracto bencénico, un compuesto denominado exostemina (22). Posteriormente, se aislaron las 4-fenilcumarinas 2-7, 14 y 16-21 (Mata *et al.*, 1987; 1988; Castillejos-Ramírez, 2013).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H
2	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	H
3	OH	OCH ₃	OH	H	H	OH
4	<i>O</i> - β -D-galactopiranosil	OCH ₃	H	OH	OH	H
5	<i>O</i> - β -D-glucopiranosil	OCH ₃	H	OH	OH	H
6	<i>O</i> - β -D-glucopiranosil	OH	H	OH	OH	H
7	6''- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil	OH	H	OH	OH	H
8	<i>O</i> - β -D-galactopiranosil	OCH ₃	H	H	OH	H
9	<i>O</i> - β -D-glucopiranosil	OCH ₃	OH	H	OH	OH
10	<i>O</i> - β -D-glucopiranosil	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	H
11	6''- <i>O</i> -acetil-5- <i>O</i> - β -D-galactopiranosil	OH	H	H	OH	H
12	6''- <i>O</i> -acetil-5- <i>O</i> - β -D-galactopiranosil	OH	H	OH	OH	H
13	<i>O</i> -[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-	OCH ₃	H	OH	OH	H

	glucopiranosil]					
14	<i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]	OCH ₃	H	OH	OH	H
15	<i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H
16	6''- <i>O</i> -acetil-5- <i>O</i> - β -D-galactopiranosil	OCH ₃	H	OH	OH	H
17	<i>O</i> - β -D-galactopiranosil	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H
18	<i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]	OH	H	OH	OH	H



Exostemina (22)

	R ₁	R ₂	R ₃
19	OCH ₃	OH	OH
20	OCH ₃	OCH ₃	OH
21	OH	OH	OH

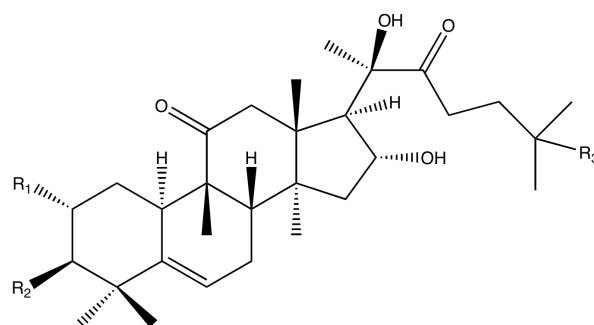
Figura 5. 4-Fenilcumarinas

3.2.2. Triterpenoides de tipo cucurbitano y ursano

De la corteza de *H. latiflora* se han aislado cuatro derivados de la dihidrocucurbitacina F (23-26), los cuales también se han relacionado con la actividad antidiabética de la especie (Reguero *et al.*, 1987; Mata *et al.*, 1990; Déciga-Campos *et al.*, 2006; Guerrero-Analco *et al.*, 2007) (Figura 6). Estos compuestos son la 23,24-dihidrocucurbitacina F (23), 25-acetil-23,24-dihidrocucurbitacina F (24), 3-*O*- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (25) y 25-acetil-3-*O*- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (26). Estos compuestos no han sido detectados en las hojas de la planta.

De igual manera, de la corteza de *H. standleyana* se aislaron las dihidrocucurbitacinas F 25 y 26 (Déciga-Campos *et al.*, 2006; Guerrero-Analco *et al.*, 2007). Cabe mencionar que

estos compuestos no han sido detectados en las hojas de las dos especies del género *Hintonia*, o en la corteza u hojas de *E. caribaeum*.



	R ₁	R ₂	R ₃
23	OH	OH	OH
24	OH	OH	OAc
25	OH	<i>O</i> -β-D-glucopiranosil	OH
26	OH	<i>O</i> -β-D-glucopiranosil	OAc

Figura 6. Triterpenoides de tipo cucurbitano

El extracto orgánico de las hojas de *H. latiflora* contiene ácido ursólico (27) (Cristians *et al.*, 2009). El ácido ursólico presenta propiedades antidiabéticas (Gao *et al.*, 2008), ya que actúa como un regulador de la apoptosis en ambientes ricos en glucosa (Oh *et al.*, 2007), como estimulador de la toma de glucosa por el incremento de la fosforilación del receptor de insulina (Zhang *et al.*, 2006) y como un supresor de la angiogénesis en pacientes diabéticos con retinopatía no proliferativa (Skopinski *et al.*, 2004) (Figura 7).

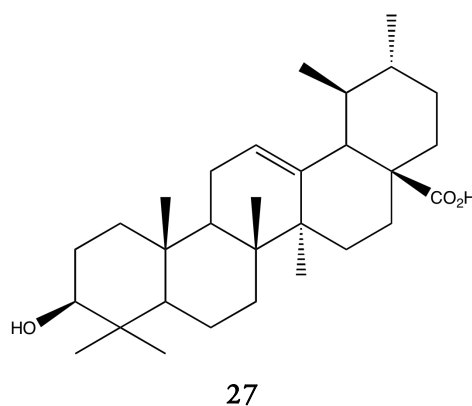


Figura 7. Triterpenoide de tipo ursano

3.2.3. Alcaloides

Tanto la corteza como las hojas de *H. latiflora* y la corteza de *H. standleyana*, contienen ácido desoxicordifolínico (**28**). Este alcaloide se considera un compuesto marcador de las especies del género *Hintonia*, ya que presenta una distribución restringida (Guerrero-Analco *et al.*, 2007; Cristians *et al.*, 2009) (Figura 8).

3.2.4. Ácido clorogénico

La infusión de las hojas de *H. latiflora* tiene como compuesto mayoritario al ácido clorogénico (**29**); también ha sido detectado en la corteza (Cristians *et al.*, 2009). Las propiedades antidiabéticas y antioxidantes de este compuesto han sido ampliamente investigadas (Matsui *et al.*, 2006; Basoli *et al.*, 2008; Scherer y Godoy, 2008). Así, se ha descrito que **29** reduce la absorción de carbohidratos, mimetizando el efecto de fármacos como la acarbosa, inhibe la presencia de picos posprandiales, fenómenos tan dañinos para el diabético, y en pacientes normoglucémicos actúa como un agente preventivo contra el desarrollo de la diabetes (McCarty, 2005) (Figura 8).

El compuesto **29** también se ha reportado en las hojas y corteza de *H. standleyana*, así como en la corteza de *E. caribaeum*

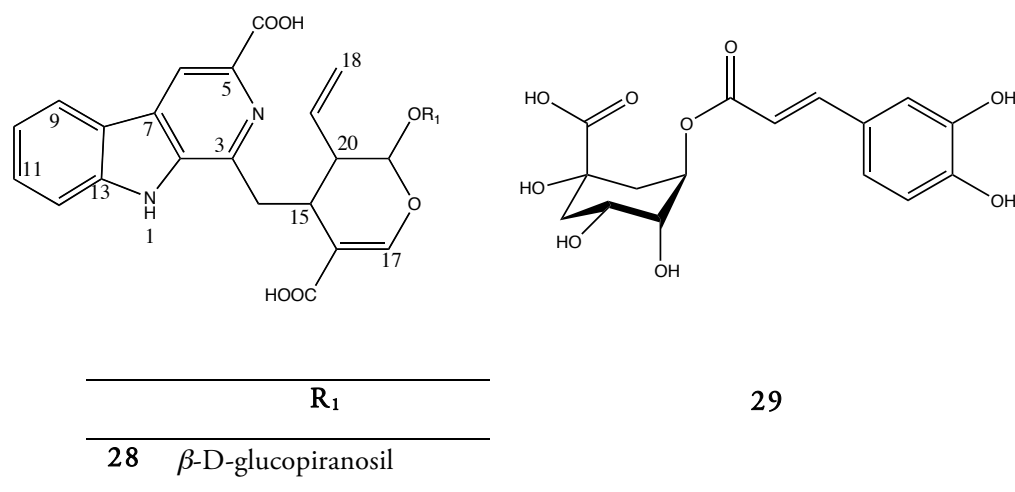


Figura 8. Ácidos desoxicordifolínico (**28**) y clorogénico (**29**)

3.2.5. Otros compuestos

De manera adicional, a partir de la corteza de *H. latiflora* se han aislado la flavona 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-flavona (**30**), el manitol (**31**) (Camacho, 1990) y el 6-O- β -D-glucopiranosil-4-metoxi-2,3',4'-trihidroxi- β -fenilestireno (**32**) (Mata *et al.*, 1992) (Figura 9).

De la corteza de *H. standleyana* se aisló el compuesto **31** así como 3-O- β -D-glucopiranosido del β -sitosterol (**33**) (Guerrero-Analco, 2007).

Para la corteza de *E. caribaeum* también se ha reportado la presencia del compuesto **31** (Krebs y Griesinger, 1960).

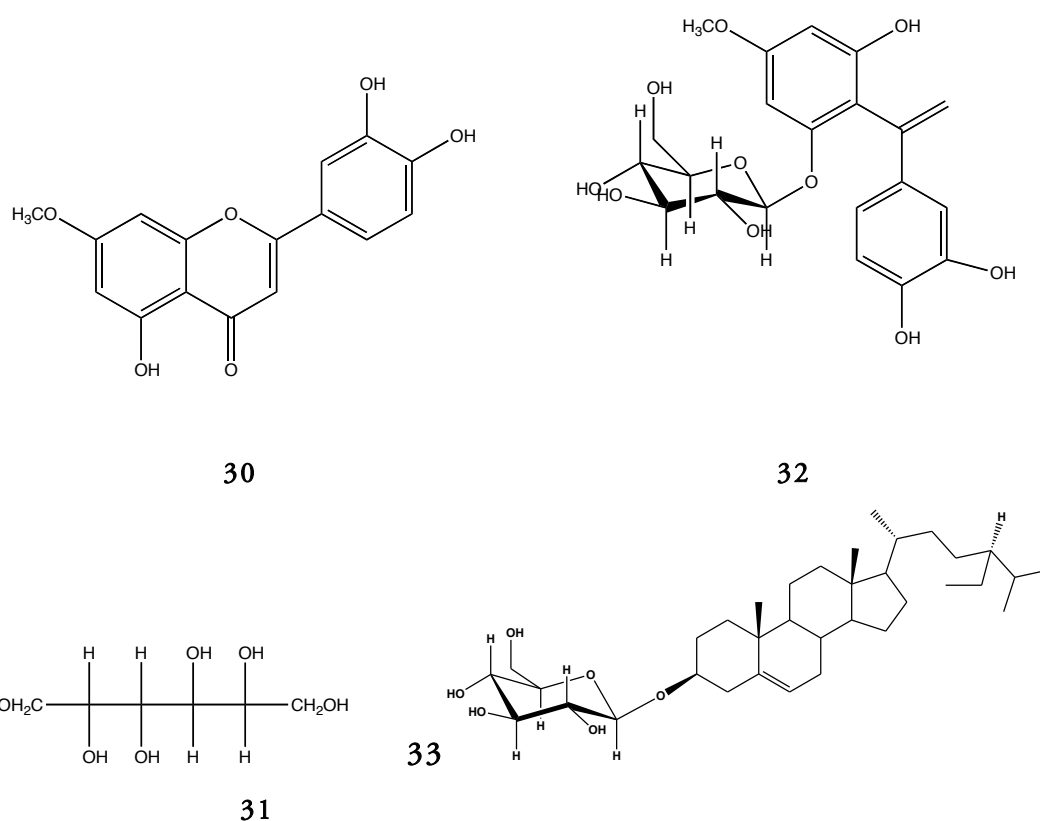


Figura 9. 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-flavona (**30**), manitol (**31**), 6-O- β -D-glucopiranosil-4-metoxi-2,3',4'-trihidroxi- β -fenilestireno (**32**) y 3-O- β -D-glucopiranosido del β -sitosterol

3.3. Antecedentes toxicológicos y farmacológicos

3.3.1. Toxicidad aguda y mutagenicidad

En el ensayo de toxicidad aguda, basado en el método de Lorke en ratones de la cepa ICR, un extracto orgánico, CH₂Cl₂-MeOH (1:1), preparado a partir de la corteza de *H. latiflora* presentó una dosis letal media (DL₅₀) de 2852 mg/kg, sin presentar mutagenicidad, de acuerdo a la prueba de Ames. Tampoco, el extracto fue tóxico para el crustáceo *Artemia salina* (DL₅₀ >1000 µg/ml). El extracto orgánico de las hojas de *H. latiflora* presentó una DL₅₀ de 1668 mg/kg utilizando el método de Lorke en ratones de la cepa ICR. Para el caso de *H. standleyana*, los extractos orgánicos preparados a partir de la corteza y hojas presentaron una DL₅₀ >5000 mg/kg; las evaluaciones en *Artemia salina* y la prueba de Ames para el extracto orgánico de la corteza tampoco presentaron toxicidad ni mutagenicidad (Déciga-Campos *et al.*, 2007; Cristians *et al.*, 2009). El extracto orgánico de la corteza de *E. caribaeum* presentó una toxicidad moderada (700 mg/kg) en el ensayo de toxicidad aguda utilizando el método de Lorke; sin embargo, careció de efecto en el ensayo de *Artemia salina*, y no presentó mutagenicidad en la prueba de Ames (Déciga-Campos *et al.*, 2007).

3.3.2. Actividad antiprotozoaria

Estudios en el IMN demostraron que *H. latiflora* no surtía efecto en pacientes con paludismo, ya que al administrar un extracto fluido de la corteza, en una dosis de 45 g por día, no se observaba mejoría en los pacientes (Loeza, 1908).

Rivero y Ramírez (1940), como parte del estudio del efecto antipalúdico de la corteza de *H. latiflora* y de sus extractos, analizaron su efecto antiprotozoario contra *Haemoproteus columbae*, causante de un cuadro similar al paludismo en aves, sin encontrar ningún efecto.

Noster y Kraus (1990) encontraron que los productos de hidrólisis ácida de algunos extractos orgánicos, preparados con acetato de etilo, de las cortezas de *H. latiflora* y *E. caribaeum* presentaban una moderada actividad anti-*Plasmodium falciparum in vitro*. Sin embargo, la actividad fue menor que la observada para los controles positivos (cloroquina y quinina). Resultados similares se obtuvieron en un trabajo posterior (Mata, 1993). Recientemente, se determinó que los extractos metanólico y de acetato de etilo de la corteza de *H. latiflora* y la 5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5), a la dosis 40 mg/kg/día, durante cuatro días, inhibió significativamente la parasitemia inducida

con *Plasmodium berghei* en ratones en un 70.8%. También se demostró que los productos **5** y **10** inhiben el desarrollo de los esporozoitos del parásito, cultivados *in vitro*; las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) fueron de 24.7 y 25.9 μ M, respectivamente (Argotte-Ramos *et al.*, 2006).

Camacho y colaboradores (2003) comprobaron la actividad antiprotozoaria moderada de un extracto metanólico elaborado con la corteza de *H. latiflora*. En este caso los organismos de prueba fueron *Leishmania donovani* (CI₅₀ 85.1 mg/mL) y *Trypanosoma brucei* (CI₅₀ 31.25 mg/mL).

3.3.3. Actividad antimicrobiana

En un estudio sobre el potencial antimicrobiano de las cortezas de *H. latiflora* y *E. caribaeum* se demostró que los extractos metanólicos fueron inactivos contra levaduras y bacterias tanto gram-positivo como gram-negativo. Sin embargo, los compuestos **4** y **21** presentaron una actividad moderada contra *Candida albicans*; su concentración mínima inhibitoria fue de 12 μ g/mL, comparable a la del control positivo nistatina (6 μ g/mL). En este mismo trabajo se comprobó que los glicósidos de 4-fenilcumarina **8** y **7**, así como los compuestos **25** y **32**, otros metabolitos secundarios aislados a partir de la corteza de *H. latiflora* carecen de actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos de prueba (Rojas *et al.*, 1992).

3.3.4. Actividad antinociceptiva

El extracto orgánico de la corteza de *H. latiflora* presentó actividad antinociceptiva significativa en la prueba de estiramiento abdominal a las dosis de 75 a 600 mg/kg, mientras que en la prueba de placa caliente tuvo efecto importante en el intervalo de dosis de 50 a 150 mg/kg (Ángeles-López, 2006). En el caso del extracto orgánico de la corteza de *H. standleyana*, se registró una respuesta significativa dosis-dependiente en el ensayo de estiramiento abdominal, con un comportamiento similar al del control positivo metamizol. Adicionalmente, aumentó significativamente la latencia al estímulo térmico en el ensayo de la placa caliente. El compuesto **25** redujo significativamente el número de estiramientos en el modelo de dolor inflamatorio e incrementó la latencia en el modelo térmico de nocicepción. Ambos efectos fueron también dependientes de la dosis. Cabe destacar, que el efecto del

compuesto **25** (100 mg/Kg) también fue similar al efecto del metamizol (100 mg/kg) en el ensayo de estiramiento abdominal, pero fue menor a la acción antinociceptiva de la morfina (5 mg/kg), en el modelo de la placa caliente (Déciga-Campos, *et al.*, 2007). Los compuestos **28** y **13** no presentaron actividad analgésica significativa cuando fueron comparados con los grupos control (vehículo, metamizol y morfina) en los dos modelos experimentales de nocicepción.

El efecto del producto **25** podría involucrar la vía de NO-GMPc, la apertura de canales de K⁺ sensibles a ATP y la estimulación de los receptores opioides ya que el pretratamiento de los animales de experimentación con un antagonista no específico de los receptores opioides, como la naloxona o con un inhibidor de la sintasa del NO como el L-NAME o con un bloqueador de los canales de K⁺ sensibles a ATP como la glibenclamida, antagoniza el efecto antinociceptivo del compuesto de prueba.

3.3.5. Actividad antidiabética

Los primeros estudios sobre los efectos antidiabéticos de *H. latiflora* se remontan a principios del siglo XX, con el trabajo desarrollado por científicos del Instituto Médico Nacional. En ese marco, José Terrés (1913), aisló de la corteza de *H. latiflora* hasta 5.3% de una sustancia que denominaron “glucósido”, que cuando fue suministrado por vía oral, en dosis altas, a perros sometidos a una dieta constante, provocó un incremento de la secreción urinaria, vómitos y evacuaciones diarreicas. En perros con diabetes floridzínica no se pudo demostrar la acción antiglucosúrica. Ese mismo año, Everardo Landa (1913) administra por vía oral el extracto fluido de la corteza de *H. latiflora*, en dosis de 50 a 100 gotas diarias, a tres grupos de enfermos, uno de individuos con riñones sanos, otro de enfermos renales y otro con perturbaciones urinarias de importancia. En los tres grupos, se confirmaron los efectos diuréticos del extracto y en los diabéticos disminuyó la glucosuria, pero no de manera definitiva o total (Figura 10). Además, se encontró mejoría en enfermos con cirrosis atrófica del hígado (Landa, 1913).



Figura 10. Reproducción de la gráfica original contenida en el tomo XII de los AIMN, reportando la actividad antidiabética de *H. latiflora* (Tomado de Terres, 1913).

Años después, siguiendo los lineamientos de la Farmacopea Nacional de 1930 y de la Farmacología Nacional de 1913, textos oficiales donde se reconocía la actividad antiglicosúrica y antidiabética de *H. latiflora*, Francisco Guerra (1947), utilizando el extracto fluido de la planta, no encontró una modificación significativa de la glucemia normal, ni alteración en la hiperglucemia provocada en conejos. La administración mediante sonda nasogástrica de tres dosis de 15 mL de extracto fluido de *H. latiflora*, incrementó la glucemia en ayunas, la glucemia media diurna, la diuresis y la glucosuria, generando además en los animales náuseas, vómitos y polidipsia.

Posteriormente estos trabajos fueron confirmados por investigadores en Alemania, Francia e Italia mediante el empleo de varios modelos experimentales en animales. Así, Kaiser y Geyer (1955) en Alemania, y Paris y Bastien (1961) en Francia comprobaron que los extractos de *H. latiflora* administrados por vía oral después de una carga de glucosa (prueba de tolerancia a la glucosa) provocaron una disminución del pico postprandial en los animales tratados. A finales de la década de los noventa, en otro estudio realizado en Italia, Pinto y colaboradores (Pinto *et al.*, 1997) demostraron el efecto hipoglucemiante del Sucontral®, un

preparado herbolario alemán a base de la corteza de *H. latiflora*, en ratas normoglucémicas durante un experimento de tipo crónico.

En el año 2000 Korec y colaboradores, en Alemania, comprobaron el efecto antihiperoglucémico agudo en ratas diabéticas del producto de síntesis 3',4',5-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina y de un extracto nativo de "copalchi", fabricado por la empresa Harras Pharma Curarina, misma compañía que produce el Suconral®. Tanto el producto de síntesis como el extracto, administrados por vía oral, disminuyeron significativamente los niveles de glucosa sanguínea en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. Los autores propusieron en esa ocasión que el compuesto de síntesis era uno de los principios activos responsables del efecto farmacológico del extracto.

En estudios recientes, el extracto orgánico de corteza de *H. standleyana* (100 mg/kg) presentó, en ratas Wistar normoglucémicas y diabéticas inducidas con STZ, una reducción significativa en los niveles de glicemia. Los compuestos **13** y **25** son los principios activos de la corteza de *H. standleyana*, ya que en su dosificación subcrónica (10 mg/kg y 30 mg/kg) provocaron la disminución de los niveles de glucosa en sangre, llegando a restarurarlos por completo mediante la acción del compuesto **13** (Guerrero-Analco, 2005).

El extracto orgánico de *H. latiflora* presentó un efecto hipoglucemiante cercano al -24% de variación de glucemia, el cual se mantuvo a lo largo de todo el experimento. En animales con diabetes inducida con STZ, el mayor efecto se observó a las dosis de 100 y 300 mg/kg a las 9 horas (-21 y -33.4%, respectivamente) (Guerrero-Analco *et al.*, 2007). Cabe mencionar que estas evaluaciones mostraron resultados positivos en estudios agudos y crónicos. Los autores relacionaron la actividad a los compuestos ya conocidos para estas plantas, como son las 4-fenilcumarinas y-cucurbitacinas. El mecanismo de acción involucra el efecto estimulante en la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas, y una estimulación del metabolismo de glucógeno hepático (Guerrero-Analco *et al.*, 2007).

También, se evaluaron los extractos orgánicos de hojas de *H. latiflora* y *H. standleyana* en animales normoglucémicos, presentando un efecto hipoglucemiante de -36.7% y -44.6%, de variación de glucemia, respectivamente, a la dosis de 300 mg/kg a las 9 horas del experimento. En el caso de ratas con diabetes inducida con STZ, el efecto hipoglucemiante se presentó, en ambos casos, a partir de las 3 horas y se mantuvo a lo largo del experimento teniendo un efecto máximo para las dosis de 100 y 300 mg/kg a las 9 horas (-62.6 y -68.8%

para *H. latiflora* y -30.9 y -39.6% para *H. standleyana*) (Cristians *et al.*, 2009). En una prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratones diabéticos cepa ICR, el extracto orgánico de *H. latiflora*, a las dosis de 100 y 500 mg/kg, evita la presencia del pico postprandial, ya que presentaron un aumento de la concentración de la glucosa sanguínea menor al 10%, mostrando una importante actividad antihiper glucémica (Cristians, 2009).

El efecto antihiper glucémico de las hojas de *H. latiflora* está relacionado con su contenido de metabolitos secundarios con propiedades antidiabéticas, principalmente las 4-fenilcumarinas (Guerrero-Analco *et al.*, 2005 y 2007), el ácido ursólico (Skopinski *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008) y el ácido clorogénico (McCarty, 2005; Matsui *et al.*, 2006; Basoli *et al.*, 2008; Scherer y Godoy, 2008).

3.3.6. Actividad vasodilatadora

En el año 2005, Vierling demostró el efecto vasodilatador *in vitro*, en el modelo de aorta de rata pre-contraída con noradrenalina, del extracto íntegro de *H. latiflora* (IC₅₀ 51,98 µg/mL) y de la 3',4',5-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, aglicona de los principales glicósidos presentes en la planta, esta última a la concentración de 60 µg/mL provoca una inhibición de la contracción inducida de un 72%.

3.3.7. Ensayos clínicos

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

3.3.8. Efectos adversos

Armendáris (1904) concluyó, tras su experiencia clínica a inicios del siglo pasado con *H. latiflora*, que para evitar actividad irritante sobre los órganos digestivos era conveniente una dosis no mayor de 2 g del “glucósido” obtenido de la corteza. Roca (2003) describió que un paciente de sexo masculino, 58 años de edad y afectado con diabetes tipo I, experimentó una serie de efectos adversos al ser tratado con un fitofármaco elaborado con extracto del copalchi *Hintonia latiflora* por la compañía española Soria Natural. El enfermo presentó vómito, ictericia y orina muy oscura, sugiriendo un cuadro clínico de rabdomiólisis y hemólisis. Los síntomas se observaron a los dos días posteriores a la ingesta del producto y desaparecieron a los cuatro días siguientes de la interrupción del medicamento. Cabe destacar que esta información representa el único caso documentado de efectos tóxicos del copalchi (Roca, 2003).

3.4. Generalidades de la diabetes

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas, de alta prevalencia a nivel mundial, caracterizadas por niveles de glucosa elevados en la sangre o hiperglucemia. Es una enfermedad poligénica caracterizada por múltiples defectos en la acción de la insulina en tejido muscular, adiposo e hígado y en la secreción pancreática. Adicionalmente, se asocia con la deficiencia de las incretinas en el intestino, aumento en la reabsorción de glucosa en el riñón, aumento de la secreción de glucagón de las células α -pancreáticas, y una acelerada lipólisis en los adipocitos. Las complicaciones a largo plazo de la diabetes incluyen retinopatía con pérdida potencial de la visión; nefropatía generando deficiencia renal; neuropatía periférica con el riesgo de úlceras en los pies, amputaciones y pie de Charcot; y neuropatías autonómicas, causando alteraciones gastrointestinales, genitourinarias y cardiovasculares. En pacientes con diabetes se ha incrementado la incidencia de arteriosclerosis cardiovascular, arterial periférica y enfermedad cerebrovascular, así como, hipertensión y anormalidades en el metabolismo lipoprotéico. La incidencia de esta enfermedad se ha incrementado a nivel mundial, con la posibilidad de alcanzar proporciones epidémicas en ciertas partes del mundo, ocasionando discapacidad y reducción en la esperanza de vida de los pacientes y, además, generando costos elevados, relacionados a su tratamiento y complicaciones, haciendo de la diabetes un foco de atención a nivel global. Entre los síntomas de una marcada hiperglucemia se encuentran la

poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces con polifagia y la visión nublada (American Diabetes Association, ADA, 2007; El-Kaissi y Sherbeeni, 2011; Israili, 2011).

Durante el período pre-diabético, se identifican problemas con la ingesta de glucosa y/o problemas con la tolerancia a la glucosa, que son los que provocan la hiperglucemia. Existen tres grandes tipos de diabetes: *diabetes mellitus* tipo 1 (insulinodependiente), *diabetes mellitus* tipo 2 (no insulinodependiente) y diabetes gestacional; aunque también existen otros tipos específicos de diabetes. Asignar un tipo u otro a un individuo depende mucho de las circunstancias al momento de la diagnosis, pues pueden padecer más de un tipo, o bien puede un tipo desencadenar en otro distinto (Permut *et al.*, 2005; ADA, 2007).

Entre los pacientes que padecen diabetes mellitus tipo 2, también conocida como diabetes de la edad adulta, un 80-85% presentan resistencia a la insulina y un 50% de pérdida de función de las células β . Al menos en un principio y, frecuentemente, a lo largo de su vida, los individuos que padecen diabetes mellitus tipo 2 no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir; sin embargo, la glucotoxicidad, lipotoxicidad, citosinas proinflamatorias y amiloidosis contribuyen a la posterior pérdida de función de las células β (Davis y Granner, 2001; Permut *et al.*, 2005; ADA, 2007; Israili, 2011).

La diabetes mellitus tipo 2 supone el 90–95% de los casos de diabetes. La frecuencia de la diabetes mellitus aumenta en todo el mundo en forma acelerada. En el año 2007, se estimaba que para el año 2025 esta cifra llegará a 300 millones; sin embargo, en el año 2012 la cifra sobrepasó las expectativas, llegando a 346 millones de personas con diabetes. En México, la prevalencia de la diabetes se presenta en personas en edad productiva (menores a 50 años), con un número aproximado de 10.3 millones de diabéticos, el 17% de la población. Esta enfermedad representa el principal reto en materia de procuración de salud, siendo la segunda causa más frecuente de consultas y el primer motivo de hospitalización por procedimientos no-quirúrgicos; sin mencionar que año con año se encuentra entre las tres principales causas de muerte en el país (ADA, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2012; Scully, 2012).

La alteración subyacente en esta enfermedad es la pérdida de sensibilidad de los tejidos a la insulina, denominada insulinorresistencia, así como una secreción inadecuada de insulina por las células encargadas de su producción en el páncreas. Además de aumentar la concentración de glucosa, la acción deficiente de la insulina se traduce frecuentemente en elevación de los niveles de colesterol y/o triglicéridos (ADA, 2007). La mayor parte de los

casos de diabetes mellitus tipo 2 se producen en el contexto de lo que se denomina síndrome metabólico. En éste se asocian diabetes, hipertensión arterial, aumento de los niveles de colesterol, triglicéridos y/o ácido úrico así como sobrepeso, muy probablemente relacionados a la insulinoresistencia. El síndrome metabólico eleva notablemente el riesgo cardiovascular y es una causa fundamental de muerte en los países desarrollados (ADA, 2007).

La diabetes mellitus tipo 2 se da en una mayor tasa en personas con antecedentes familiares de diabetes. En los últimos años se han descubierto muchos genes relacionados con la posterior aparición de diabetes, aunque este componente genético es complejo y, posiblemente, debe acompañarse de factores ambientales relacionados, en este caso, fundamentalmente con los hábitos de vida: sedentarismo y alimentación inadecuada. Sin embargo, la genética de esta forma de diabetes es compleja y no está claramente definida (Permut *et al.*, 2005; ADA, 2007; Israili, 2011). El 80% de las personas con diabetes tipo 2 son obesas, y la obesidad por sí misma causa cierto grado de resistencia a insulina. Pacientes que no son obesos, muchas veces tienen mayor cantidad de grasa corporal distribuida predominantemente en la región abdominal. El tratamiento de la diabetes tipo 2 se basa en tres pilares fundamentales: seguimiento de un plan de alimentación equilibrado, práctica de ejercicio físico regular y tratamiento farmacológico personalizado (Gómez Peralta, 2005; ADA, 2007; Israili, 2011).

3.4.1. Fármacos utilizados para el control de la diabetes tipo 2

En individuos normoglucémicos, la homeostasis de glucosa se mantiene dentro de un estrecho rango gracias a la acción de las hormonas pancreáticas, insulina y glucagón; por hormonas reguladoras, amilina; así como las denominadas incretinas (secreción intestinal de insulina): el péptido 1 análogo de glucagón (GLP-1) y el polipéptido inulinotrópico dependiente de glucosa (GIP) (Israili, 2011).

Los fármacos utilizados para el control de la diabetes mellitus tipo 2 se conocen bajo el nombre genérico de hipoglucemiantes orales. En contraste con los estudios sistemáticos que condujeron al aislamiento de la insulina, los hipoglucemiantes orales se descubrieron de manera accidental. Así en 1942, Janbon y colaboradores notaron que algunas sulfonamidas causaban hipoglucemia en animales de experimentación. A partir de dichas observaciones se

fueron descubriendo un número mayor de hipoglucemiantes que actúan a distinto nivel (Davis y Granner, 2001).

Entre los hipoglucemiantes orales se encuentran a los inhibidores de α -glucosidasas, las incretinas, las biguanidas, los secretagogos de insulina, los sensibilizadores a la insulina y los inhibidores de las lipasas intestinales (Davis y Granner, 2001; Cheng y Fantus, 2005; El-Kaissi y Sherbeeni, 2011; Israili, 2011) (Cuadro 1).

Los inhibidores de las α -glucosidasas reducen la absorción intestinal de almidón, dextrina, oligosacáridos y disacáridos, al inhibir la acción de las α -glucosidasas presentes en las microvellosidades intestinales. La inhibición de esta enzima aplaza la absorción de carbohidratos por lo que el aumento postprandial de la glucosa plasmática disminuye en sujetos tanto normales como diabéticos. Entre los inhibidores de las α -glucosidasas más comunes se hallan la acarbosa (Cuadro 1), un oligosacárido de origen microbiano, el miglitol, un derivado de la desoxinojirimicina y la voglibosa. También inhiben de manera competitiva a la glucoamilasa y a la sacarasa, pero tienen efectos débiles sobre la α -amilasa pancreática. Estos productos reducen las concentraciones plasmáticas postprandiales de glucosa en sujetos con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2. Los inhibidores de las α -glucosidasas pueden tener profundos efectos sobre las concentraciones de hemoglobina A_{1c} en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que presentan hiperglucemia grave (Davis y Granner, 2001; Cheng y Fantus, 2005; Borges de Melo *et al.*, 2006; El-Kaissi y Sherbeeni, 2011; Israili, 2011).

Las incretinas endógenas, en especial GLP-1 y GIP, controlan la liberación de insulina y glucagón pancreáticos en respuesta a los alimentos. GLP-1 es un péptido de 30 aminoácidos secretado por las células L neuroendocrinas a nivel del íleon y el colon, mientras que GIP es un péptido de 42 aminoácidos secretado por las células K del duodeno y el yeyuno. Ambas incretinas tienen receptores específicos. GLP-1 desencadena la biosíntesis de insulina, la expresión de transportador de glucosa (GLUT-2), aumenta la sensibilidad a insulina, retarda el vaciamiento gástrico, suprime el apetito, aumenta el control glicémico y disminuye la secreción de glucagón. GIP también incrementa la secreción de insulina, pero no tiene efecto en la salida de glucosa hepática, motilidad intestinal, saciedad ni peso corporal; sin embargo, induce la lipogénesis y suprime la secreción de ácido gástrico. Ambas incretinas tienen un tiempo de vida corto, dos minutos para GLP-1 y cinco minutos para GIP, debido a la acción de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-4). De esta manera, el aumento de los efectos de las

incretinas es una de las metas de la nueva terapia antidiabética, de esta manera se han desarrollado simuladores de las incretinas y potenciadores de las incretinas. La exenatida es un simulador de GLP-1, extraído de las glándulas salivales de *Heloderma suspectum* (monstruo de Gila), que presenta los mismos efectos y ha dado resultado en terapia combinada con otros hipoglucemiantes orales (Cuadro 1). Otros simuladores de GLP-1 son la liraglutida, la albiglutida y la taspoglutida; para evitar la rápida degradación de cualquiera de los simuladores de GLP-1, la vía de administración debe ser distinta a la oral. Los potenciadores de incretinas son inhibidores de DPP-4, la sitagliptina es uno de ellos, la cual se administra vía oral y en combinación con otros hipoglucemiantes orales, como las biguanidas, tiazolidinedionas o inclusive insulina. La ventaja de este fármaco está relacionada al control adicional de perfil lipídico del paciente. Otros potenciadores de las incretinas son la alogliptina, la denagliptina, la saxagliptina y la vidagliptina (El-Kaissi y Sherbeeni, 2011; Israili, 2011).

Las biguanidas causan hipoglucemia al disminuir el aporte de glucosa hepática inhibiendo la gluconeogénesis. Por otro lado, incrementan la toma de glucosa por parte del músculo esquelético y la sensibilidad a la insulina en el hígado. Existen varias biguanidas como la fenformina, la buformina y la metformina (Cuadro 1); sin embargo, esta última es la única que se sigue utilizando, ya que otras biguanidas están relacionadas con la producción de acidosis láctica (Davis y Granner, 2001; Cheng y Fantus, 2005; El-Kaissi y Sherbeeni, 2011; Israili, 2011). La metformina activa la proteína cinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK) hepática y muscular. La activación de AMPK produce la fosforilación e inhibición de la acetil-coenzima A carboxilasa, bloqueando así la síntesis de ácidos grasos, promoviendo su oxidación. La activación de AMPK hepático disminuye la expresión de la proteína 1 de unión al elemento regulador de colesterol (SREBP-1), un factor de transcripción implicado en la patogénesis de la resistencia a la insulina, dislipidemia y diabetes. La disminución en la expresión de SREBP-1 resulta en la baja de la expresión genética de enzimas lipogénicas, posteriormente contribuyendo a una disminución de la síntesis de triglicéridos y esteatosis hepática. De esta forma, la metformina reduce la producción de glucosa hepática e incrementa la toma de glucosa por parte del músculo esquelético. AMPK es el principal regulador de metabolismo lipídico y de la glucosa, siendo la clave de los efectos benéficos de la metformina (Cheng y Fantus, 2005).

Dentro de los secretagogos se encuentran las sulfonilureas, las cuales causan hipoglucemia al estimular la liberación de insulina a partir de las células β pancreáticas. La administración aguda de sulfonilureas a pacientes con diabetes mellitus tipo 2 aumenta la liberación de insulina desde el páncreas. También, pueden incrementar las cifras de insulina al reducir la depuración de la hormona en el hígado. Entre las sulfonilureas más comunes están la glibenclamida (Cuadro 1), la gliclazida, la glimepirida y la gliburida (Davis y Granner, 2001; Cheng y Fantus, 2005; El-Kaissi y Sherbeeni, 2011; Israili, 2011). Las sulfonilureas se unen a su receptor en la superficie de las células β pancreáticas. El receptor a sulfonilurea está asociado a las subunidades del canal de potasio sensible a trifosfatos (kir6.2). El complejo de unión receptor a sulfonilurea-kir6.2 produce el cierre de los canales de potasio y la inhibición del flujo de iones de potasio en las demás células β , lo cual resulta en la despolarización de la membrana celular y la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. El flujo de calcio causa la contracción de los microtúbulos y la exocitosis de insulina desde las vesículas. Las sulfonilureas no afectan directamente la sensibilidad a insulina (Cheng y Fantus, 2005).

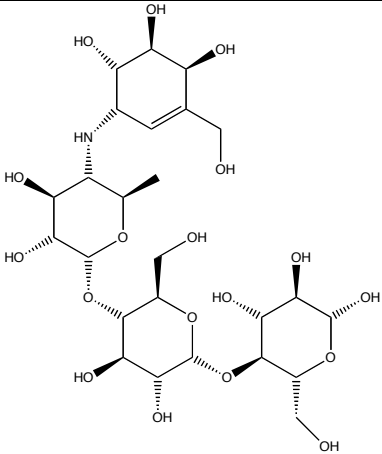
Existe otro grupo de secretagogos que no se encuentran relacionados con las sulfonilureas; esta nueva clase de fármacos está representada por la nateglinida y la repaglinida (Cuadro 1). La repaglinida es un derivado del ácido benzóico, mientras que la nateglinida es un derivado de la fenilalanina. Su mecanismo de acción es similar al de las sulfonilureas, cierre del canal potasio-adenosin trifosfato y secreción de insulina dependiente de calcio; sin embargo, se unen al receptor de sulfonilureas en un sitio distinto; son de acción más rápida, pero la duración del efecto es menor, generando una baja liberación de insulina (Cheng y Fantus, 2005).

Las tiazolidinedionas activan genes que tienen capacidad de dar respuesta a la insulina y regulan el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Son sensibilizadores a la insulina, dando un aumento en la captación de glucosa en los músculos y decremento de la producción endógena de glucosa. Entre las tiazolidinedionas más comunes se encuentran la troglitazona, retirada del mercado por estar vinculada a la toxicidad hepática, la rosiglitazona (Cuadro 1) y la pioglitazona (Davis y Granner, 2001; Cheng y Fantus, 2005; El-Kaissi y Sherbeeni, 2011; Israili, 2011). Las tiazolidinedionas funcionan como ligandos del receptor gama activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ), el cual se expresa principalmente en adipositos. Estos receptores nucleares son fundamentales en la regulación de la expresión de una variedad de

genes involucrados en los metabolismos de lípidos y carbohidratos. Las tiazolidinedionas incrementan la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos, aparentemente debido al efecto sobre los adipocitos, ya que hay pocos receptores PPAR γ en el tejido muscular. En el adipocito, se incrementa la diferenciación, se reduce la lipólisis y los niveles de adipocitocinas circulantes se alteran, se reducen el factor α de necrosis tumoral y la leptina, así como se incrementa la adiponectina. El reclutamiento de un gran número de adipocitos pequeños, asociado a un incremento de la lipogénesis, produce una reducción en los ácidos grasos libre circulantes. Todos estos efectos incrementan la sensibilidad a la insulina. En animales se ha observado que las tiazolidinedionas incrementan y preservan la función de las células β pancreáticas (Cheng y Fantus, 2005).

Los inhibidores de las lipasas intestinales no son hipoglucemiantes orales; sin embargo, se recetan en el tratamiento de la diabetes. El fármaco orlistat inhibe selectivamente las lipasas gástricas y pancreáticas y, en consecuencia, la hidrólisis de las grasas a ácidos grasos libres absorbibles y la absorción de carbohidratos simples. La reducción en la absorción de grasas y monosacáridos produce un decremento en la ingesta energética y pérdida de peso, factores importantes en el control de la diabetes. El orlistat también se emplea para tratar la obesidad (Cheng y Fantus, 2005).

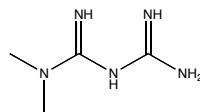
Cuadro 1. Principales hipoglucemiantes orales

Compuesto	Estructura
Inhibidores de α -glucosidasas: Acarbosa	
Simuladores de las incretinas: Exenatida	H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp- Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu- Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Gly-

Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂

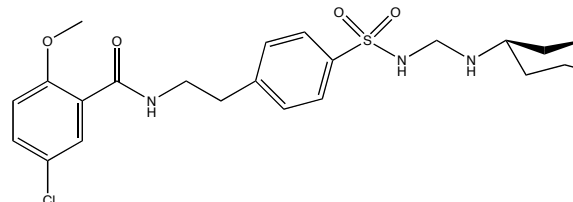
Biguanidas:

Metformina



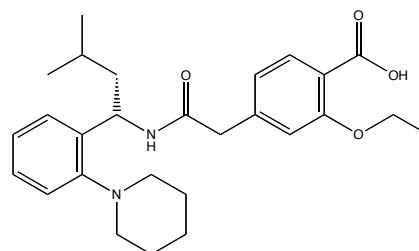
Sulfonilureas:

Glibenclamida



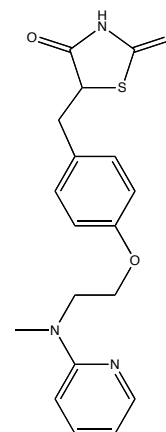
Secretagogos no relacionados con las sulfonilureas:

Repaglinida



Tiazolidinedionas:

Rosiglitazona

Referencias: Borges de Melo *et al.*, 2006; Cheng y Fantus, 2005; Davis y Granner, 2001

3.5. Generalidades sobre trastornos acidopépticos y gastritis

El término trastorno acidopéptico abarca diversos padecimientos médicos relativamente específicos, en los cuales se cree que tiene importancia la lesión por ácido gástrico, una pepsina activada. Dichos trastornos comprenden la enfermedad por reflujo gastroesofágico, úlceras pépticas benignas del estómago y el duodeno, úlceras consecutivas al uso de antiinflamatorios no esteroideos convencionales (NSAID) y úlceras debidas al síndrome de Zollinger-Ellison. En la mayor parte de estas enfermedades la exposición del tejido afectado al ácido es esencial para la aparición de los síntomas clínicos (Hoogerwerf y Pasricha, 2003).

La gastritis aguda sobreviene a los procesos inflamatorios en la mucosa y submucosa gástricas, causada principalmente por la infección por *Helicobacter pylori*, el consumo de NSAID's, alcohol, tabaquismo y estrés. Cuando se adquiere la infección por *H. pylori*, la bacteria penetra a través de la capa de moco del estómago y se multiplica en las proximidades de la células epiteliales superficiales (Dixon, 2001).

En el caso de la gastritis crónica, se da una inflamación gradual del revestimiento estomacal que persiste durante un tiempo prolongado. A diferencia de la gastritis aguda, que se caracteriza por la presencia de linfocitos y células plasmáticas en la mucosa en respuesta a la producción de citosinas durante un periodo prolongado. La gastritis crónica está asociada a la atrofia de la mucosa y metaplasia intestinal, pero sin provocar erosiones. La infección crónica por *H. pylori* genera una gastritis crónica atrófica que provoca el adelgazamiento de la mucosa con disminución y disfuncionalidad de las glándulas productoras de moco, infiltración linfocitaria y plasmocitaria y presencia de neutrófilos. La alteración de la estructura y la pérdida del tejido glandular, provocan la inhibición de la producción de moco y de sustancias elementales como enzimas y la hormona gastrina, componentes indispensables para mantener al funcionalidad de la mucosa (Dixon, 2001).

El estómago se protege a sí mismo contra daño por secreciones endógenas (ácido gástrico, pepsina y bilis) e irritantes exógenos (alcohol, NSAID's, etc.) mediante mecanismos variados que en su conjunto actúan como la defensa de la mucosa. El ácido en sí mismo puede fungir como la primera línea de defensa, ya que reduce la posibilidad de colonización bacteriana en el estómago, evitando la entrada de las bacterias a la circulación sistémica si es que existe un daño en el epitelio gástrico; sin embargo, la línea de defensa clásica consiste en la presencia de uniones intercelulares estrechas entre las célula epiteliales gástricas, una capa de mucina que cubre dichas células, prostaglandinas en la mucosa gástrica, así como la secreción de iones de bicarbonato hacia la capa de mucina. El moco secretado previene la colonización y translocación bacteriana; también genera un microambiente sobre los sitios de daño superficial, favoreciendo la rápida restitución celular (Wallace, 2001; Hoogerwerf y Pasricha, 2003).

Las prostaglandinas E₂ e I₂ (PG) inhiben la secreción de ácido gástrico mediante un efecto directo sobre las células parietales, mediado por el receptor EP₃. Además, las PG incrementan el flujo sanguíneo de la mucosa y estimulan la secreción de moco y bicarbonato;

los NSAID's reducen la secreción de dichos factores al inhibir la síntesis de prostaglandinas. El óxido nítrico (NO) es otro importante mediador del flujo sanguíneo de la mucosa, estimula la liberación del péptido relacionado a calcitonina y modula la dilatación del flujo de las arteriolas de la submucosa; el aumento de flujo sanguíneo permite que se amortigüe el efecto del ácido gástrico, removiendo las sustancias tóxicas que puedan haber alcanzado el compartimento subepitelial. Dentro del proceso de defensa mucosa, el atrapamiento de radicales libres formados por la acción de agentes irritantes es una función clave, los compuestos endógenos sulfhídricos no-proteicos (NP-SH) juegan un papel fundamental al estabilizar la capa de moco, formando puentes disulfuro y reduciendo a los radicales libres, en otras palabras, los NP-SH son fundamentales para el atrapamiento de radicales libres y el control de la producción y naturaleza del moco (Wallace, 2001; Hoogerwerf y Pasricha, 2003; Andreo *et al.*, 2006).

3.5.1. Fármacos utilizados para el control de trastornos acidopépticos y gastritis

El control de la acidez estomacal es la línea para el tratamiento de los trastornos acidopépticos; bajo esta premisa se pueden clasificar los fármacos en inhibidores de la bomba de protones, antagonistas de los receptores de histamina, análogos de prostaglandina, sucralfato, antiácidos y fármacos citoprotectores (Wallace, 2001; Hoogerwerf y Pasricha, 2003; Andreo *et al.*, 2006) (Cuadro 2).

Los inhibidores de la bomba de protones (H^+ , K^+ -ATPasa) gástrica son los supresores más eficaces de la secreción de ácido gástrico. Los inhibidores de la bomba de protones son profármacos que requieren activación en un ambiente ácido, formando sulfenamida tiofílica o ácido sulfénico, que es capaz de unirse covalentemente a las cisteínas de la ATPasa; dicha unión irreversible genera una disminución en la producción de hasta el 95%. Los benzimidazoles son los fármacos por excelencia, *e.g.* pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol y omeprazol (Cuadro 2); éste último además inhibe selectivamente la anhidrasa carbónica de la mucosa gástrica, suprimiendo la producción de ácido (Hoogerwerf y Pasricha, 2003).

Los antagonistas de los receptores de histamina H_2 inhiben la producción de ácido al competir de manera reversible con la histamina por la unión a receptores H_2 sobre la membrana basolateral de las células parietales. Suprimen mejor la secreción basal de ácido, por

lo que se usan para controlar la acidez nocturna, sobre todo en casos donde los inhibidores de la bomba de protones no actúan correctamente. Entre estos fármacos se puede mencionar a la cimetidina, famotidina, nizatidina, siendo el más usado la ranitidina (Cuadro 2) (Hoogerwerf y Pasricha, 2003).

En el caso de los análogos de prostaglandina se busca reproducir los efectos deseados de inhibición en la producción de ácido sobre las células parietales, la producción de moco y bicarbonato y el aumento del flujo sanguíneo. El misoprostol (Cuadro 2) es un análogo sintético de la prostaglandina E₁, con un grupo éster adicional en el C1, aumentando la potencia y duración del efecto antisecretor. Su administración alcanza hasta un 95% de la inhibición de la secreción basal (Wallace, 2001; Hoogerwerf y Pasricha, 2003).

Los antiácidos son una serie de sales, *e.g.* CaCO₃, Mg(OH)₂ y Al(OH)₃, que tienen baja absorción y, así, proporcionan efecto antiácido sostenido con efectos equilibrados sobre la motilidad intestinal. Estos tratamientos son cada vez menos usados en la terapéutica, ya que los otros grupos de fármacos antes mencionados son más eficaces (Hoogerwerf y Pasricha, 2003).

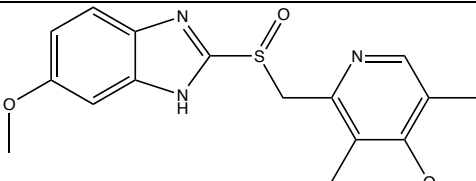
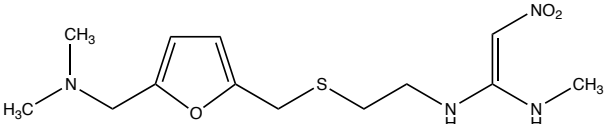
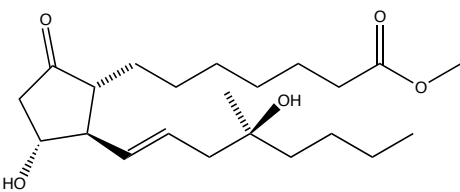
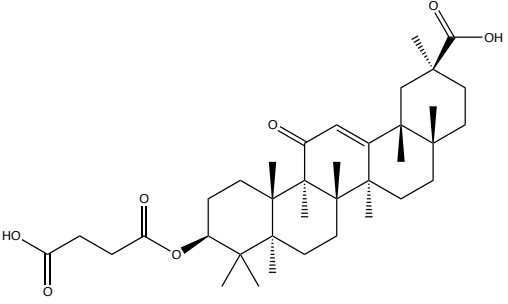
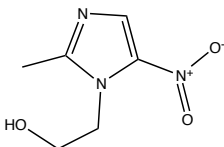
En presencia de daño inducido por ácido, la hidrólisis de proteínas de la mucosa mediada por pepsina contribuye a la erosión de la mucosa y a ulceración de la misma. Este proceso puede inhibirse por medio de polisacáridos sulfatados, como el sucralfato, octasulfato de sacarosa con hidróxido de aluminio. En pH ácido sufre entrecruzamiento y polimerización formando un gel viscoso que se adhiere a las células epiteliales y cubre las úlceras. Es fundamentalmente un efecto citoprotector que incluye la producción local de prostaglandina y de factor de crecimiento epidérmico (Hoogerwerf y Pasricha, 2003).

Los fármacos citoprotectores son todos aquellos que generan un efecto directo sobre las células epiteliales superficiales, ya sea generando una barrera mecánica, o bien por el incremento en la producción de prostaglandinas, modulando la secreción de mucosa gástrica. Un ejemplo de este grupo de fármacos es la carbenoxolona (Cuadro 2), un derivado del ácido glicirrízico que altera la composición y la cantidad de la mucina, ejerciendo así su efecto citoprotector tópico. Otros citoprotectores importantes son los compuestos de bismuto, la rebamipida y el ecabet (Hoogerwerf y Pasricha, 2003; Andreo *et al.*, 2006).

El tratamiento contra de *H. pylori* es conocido como la triple terapia, que consiste en la prescripción de dos antibióticos como la amoxicilina, claritromicina, tetraciclina o metronidazol (Cuadro 2) y un inhibidor de la bomba de protones durante una o dos semanas.

Este tratamiento tiene un 80% de efectividad; en los casos que no se logra erradicar la bacteria, se prescribe la terapia cuádruple, en la cual se agregan sales de bismuto por una o dos semanas, elevando las posibilidades de éxito hasta el 95%. Existen otros agentes antimicrobianos novedosos como la levofloxacin, rifabutina y furazolidona. También es común la combinación con otros fármacos utilizados para el control de trastornos acidopépticos (Vakil y Megraud, 2007)

Cuadro 2. Principales fármacos utilizados para el control de los trastornos acidopépticos

Compuesto	Estructura
Inhibidores de la bomba de protones: Omeprazol	
Antagonista de los receptores de histidina: Ranitidina	
Análogos de prostaglandinas Misoprostol	
Fármacos citoprotectores: Carbenoxolona	
Antimicrobianos: Metronidazol	

Referencias: Wallace, 2001; Hoogerwerf y Pasricha, 2003; Andreo *et al.*, 2006; Vakil y Megraud, 2007

3.6. Estudios de absorción, permeabilidad, distribución y eliminación de los principios activos de los fármacos

De manera general, el desarrollo de un medicamento, independientemente de su naturaleza, consta de dos etapas: la preclínica y la clínica. El desarrollo preclínico de un producto desde su descubrimiento hasta que se convierta en Nueva Aplicación del Fármaco (NDA), involucra a su vez varias fases. Las más relevantes son: el tamizaje biológico que permitió su descubrimiento, estudios farmacológicos y toxicológicos tanto *in vitro* como *in vivo*; el análisis de sus propiedades fisicoquímicas; la optimización del proceso de extracción y desarrollo de la forma de dosificación apropiada (Gadamasetti *et al.*, 1999; Avendaño, 2001).

El desarrollo de fármacos requiere la realización de estudios predictivos de su absorción, distribución y eliminación, con el fin de evidenciar su biodisponibilidad cuando son administrados por vía oral. Además, es importante desde un inicio, clasificarlos desde el punto de vista biofarmacéutico. Esta clasificación considera los factores que controlan la velocidad y la magnitud de la absorción para categorizar los fármacos de acuerdo a su solubilidad y permeabilidad. Este sistema es una herramienta de gran utilidad en el desarrollo de nuevos fármacos para poder anticipar las características de absorción de los mismos (Gibaldi, 1991; Avendaño, 2001; Armijo, 2003).

Con la finalidad de describir la disponibilidad en el organismo del principio activo más relevante de un fitofármaco, se determinan una serie de parámetros farmacocinéticos que incluyen la constante de absorción, el volumen de distribución, la constante de eliminación y la vida media de eliminación. Estos cuatro parámetros tienen una influencia directa sobre el nivel del fármaco y su farmacocinética al ser expuesto a los tejidos y, por tal razón, afectan el rendimiento y actividad farmacológica del fitofármaco.

Para que un fármaco actúe es necesario que llegue a su sitio de acción. Para ello, la sustancia tiene que absorberse, esto es, alcanzar el compartimiento acuoso del organismo. Con la excepción de la piel y algunas mucosas, la distribución de los fármacos se realiza por vía sanguínea. Así, la distribución del fármaco dentro del cuerpo puede variar de acuerdo con el flujo sanguíneo o la vascularización regional de cada tejido u órgano, y la cantidad de fármaco que cada tejido reciba depende de la concentración del fármaco en la sangre. A su vez, la magnitud del efecto varía por la velocidad con la que el fármaco penetra al tejido hasta alcanzar niveles suficientes.

Un fármaco puede administrarse por vía enteral o por vía parenteral, inyectarse directamente al espacio intravascular o ser depositado en sitios fuera de este espacio, para su absorción gradual. El sistema gastrointestinal es el sitio habitual para ello, aunque las vías pulmonar (por inhalación), subcutánea e intramuscular son otras opciones (Gibaldi, 1991; Avendaño, 2001; Armijo, 2003).

Para que una sustancia atraviese las membranas celulares es condición esencial que se encuentre en forma libre, es decir, que no esté unida a otras moléculas. En la sangre, la albúmina representa una proteína con múltiples sitios de unión para fármacos. Mientras éstos se mantengan unidos a la albúmina no podrán abandonar el torrente sanguíneo y, por lo tanto, no llegarán a sus sitios de acción. Por otra parte, los fármacos, a su vez, competirán con otras moléculas endógenas contenidas en la sangre (por ejemplo, hormonas, bilirrubina, vitaminas, iones, etc.) por los sitios de transporte, con consecuencias potencialmente peligrosas de acumulación.

El paso de fármacos a través de las barreras biológicas está condicionado por las características fisicoquímicas de la sustancia activa. En particular, el tamaño o peso molecular; grado de ionización y liposolubilidad. Así, una sustancia pequeña, poco ionizada y muy liposoluble atraviesa rápidamente las membranas celulares (Gibaldi, 1991; Irvine *et al.*, 1999; Avendaño, 2001; Armijo, 2003). La transferencia de fármacos a través de barreras membranales puede realizarse mediante diversos mecanismos que dependen del tamaño y gradiente de concentración del fármaco que se transporte, su solubilidad y la necesidad de acarreadores membranales.

Finalmente, es necesario considerar la biodisponibilidad, entendida como la facilidad con la que un fármaco se incorpora a sus sitios de acción; aquí se incluye la presentación farmacéutica en la que se ofrece el medicamento. En relación con la distribución del fármaco, una vez que alcanza el espacio intravascular, es necesario tomar en cuenta su volumen aparente de distribución (Vd), como un índice de la distribución de la sustancia. Así, la distribución de un fármaco determinará en parte la latencia, intensidad y duración de la actividad biológica del fármaco. Existen varios factores que pueden afectar el Vd: la afinidad del fármaco por las moléculas transportadas por la sangre, el flujo sanguíneo regional, la afinidad por los componentes de los tejidos, las barreras especiales y diversos factores fisiológicos, patológicos y farmacológicos.

La eliminación de un fármaco se efectúa por medio del metabolismo, el almacenamiento y la excreción. Todos estos procesos tienden a disminuir los niveles extracelulares del fármaco. El proceso más frecuente es el de la excreción a través de los riñones, sistema biliar, intestino y, en ocasiones, los pulmones (Gibaldi, 1991; Avendaño, 2001; Armijo, 2003).

El coeficiente de permeabilidad de un fármaco relaciona el proceso de permeabilidad con el paso a través de la superficie intestinal con base en un modelo matemático. El coeficiente de permeabilidad se puede calcular *in vitro*, utilizando modelos celulares, entre los que se encuentra el uso de cultivos celulares para simular la membrana del tracto gastrointestinal, por lo que se realizan estudios de difusión del fitofármaco por lo menos en tres diferentes concentraciones, en células MDCK cultivadas en soportes permeables, ya sea para elucidar los mecanismos de transporte de fármacos o bien para obtener coeficientes de permeabilidad aparente y poder tener un modelo de predicción en la absorción de este compuesto por vía oral en humanos (Irvine *et al.*, 1999).

Por último, cabe mencionar que todas las investigaciones desde el descubrimiento hasta la salida al mercado del medicamento y su farmacovigilancia deben estar regulados por normas y protocolos de Buenas Prácticas de Fabricación, Clínicas y de Laboratorio, además de las guías propuestas por organizaciones mundiales y nacionales como la OMS, la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), la Asociación Médica Mundial, la Agencia Europea de Medicinas (EMA), la Agencia de Dispositivos Farmacéuticos y Médicos de Japón (PMDA), Farmacopea de los Estados Unidos (USP), entre otros. En el caso de México la regulación está a cargo de la Secretaría de Salud a través de las Norma Oficial Mexicana (NOM) NOM-073 (estabilidad, 2005), NOM-059 (buenas prácticas de fabricación en la industria farmacéutica, 1993), NOM-164 (buenas prácticas de fabricación para fármacos, 1998), NOM-177 (estudios de bioequivalencia, 1998), 072 (etiquetado de medicamentos, 1993), NOM-220 (farmacovigilancia, 2002), por mencionar algunas.

4. Objetivos

4.1. Objetivos generales

- Realizar estudios farmacológicos conducentes a establecer la eficacia preclínica de las infusiones de las hojas y corteza de *H. latiflora*, *H. standleyana* y *E. caribaeum* como agentes antidiabéticos y/o gastroprotectores.
- Contribuir al desarrollo de preparados fitoterapéuticos a partir de las hojas y corteza de *H. latiflora* y *H. standleyana* con la finalidad de proporcionar nuevas alternativas terapéuticas de amplia aceptación para la población mexicana en el tratamiento de la diabetes y las úlceras gástricas.

4.2. Objetivos particulares

- Determinar la eficacia antidiabética y la seguridad preclínicas de las infusiones de las hojas y corteza de *H. latiflora*, *H. standleyana* y *E. caribaeum* con la finalidad de proponer estudios de tipo clínico.
- Determinar la eficacia gastroprotectora de las infusiones de corteza y hojas de *H. latiflora* y *H. standleyana*, con la finalidad de relacionar dicha actividad farmacológica con el uso popular local de la planta contra la irritación estomacal y gastritis.
- Establecer los principios gastroprotectores de las dos especies objeto de estudio, así como su mecanismo de acción.
- Establecer los perfiles cromatográficos de las drogas crudas derivadas de las hojas y cortezas de *Hintonia latiflora*, *H. standleyana* y *Exostema caribaeum*, mediante cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (CLUE) con la finalidad de identificar las distintas especies que conforman el complejo copalchi.
- Precisar mediante CLUE las variaciones intraespecíficas en función del ciclo fenológico y de la distribución geográfica de al menos una especie del complejo copalchi, con la finalidad de identificar las mejores condiciones de recolección de la droga cruda, enfocadas a la producción de metabolitos secundarios activos.
- Establecer los parámetros farmacocinéticos, a nivel preclínico, de los principios activos mayoritarios de las infusiones de las hojas y corteza de las especies de *Hintonia*, mediante la experimentación biofarmacéutica apropiada.

5. Hipótesis

Si infusiones de las drogas crudas del complejo copalchi tienen los mismos principios activos que los extractos orgánicos, la actividad antidiabética será similar.

El uso popular de las cortezas de especies del género *Hintonia* para el tratamiento de gastritis indicaría la presencia de compuestos con propiedades gastroprotectoras.

Si la fenología o la distribución geográfica modulan la composición química de las drogas crudas, su eficacia terapéutica también se verá afectada.

6. Metodología

6.1. Material vegetal

Se eligieron diversas localidades para la recolecta de material vegetal, con base en la revisión de ejemplares del Herbario Nacional (MEXU) y el Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME), se consideraron localidades previamente estudiadas por nuestro grupo de investigación (Guerrero-Analco, *et al.* 2007; Cristians *et al.*, 2009).

La localidad de David J. Tellitud, localmente conocida como Santa Rita, municipio de Huetamo de Núñez, estado de Michoacán se utilizó como sitio de estudio para recolectar material botánico y dar seguimiento a la fenología de *H. latiflora*, cubriendo un periodo de un año. Se muestrearon las localidades de La Cocina (18° 31.709' N; 101° 04.692' W; 221 m snm) y La Arena (18°31' 0.76" N; 101° 5' 19.8" W; 225 m snm). En cada recolecta, se tomaron muestras de hojas de distintos individuos, así como ejemplares de herbario. De igual manera, se registró la fenología del árbol, prestando especial atención a la calidad y cantidad de las hojas presentes en cada individuo estudiado.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la distribución geográfica sobre la concentración de los metabolitos secundarios de interés farmacológico en las hojas de *H. latiflora*, se recolectaron, además, muestras de distintos individuos en la localidad de Rancho Entre Amigos, municipio de Urique, estado de Chihuahua (29° 13.143' N 107° 54.832' W; 579 m snm). Se registró el estado de las hojas de cada individuo recolectado.

Para las especies *H. standleyana* y *E. caribaeum* se eligió la localidad de Tuzantlán, municipio de Atenango del Río, estado de Guerrero, basado en la abundancia de las poblaciones vegetales y su distribución simpátrica (18° 12' 22.35" N; 99° 11' 1" W; 989 m snm). Se recolectaron muestras de hojas y corteza de los distintos individuos identificados para cada especie, así como ejemplares de herbario. De igual manera, se registraron las características generales de cada individuo, enfocados en las mismas características registradas para las hojas de *H. latiflora*.

Con el objetivo de conocer la identidad botánica de la droga cruda que se vende bajo el nombre de copalchi y/o quina amarilla, se adquirieron muestras de cortezas en los mercados Sonora y Merced de la Ciudad de México, así como un preparado comercial que se dispensa en Europa.

6.2. Preparación y extracción del material vegetal

El material vegetal se secó a temperatura ambiente, protegiéndolo de la exposición directa a la luz y, posteriormente, se fragmentó utilizando un molino de laboratorio Wiley, usando una rejilla de 2 mm.

En el caso del análisis cromatográfico, las infusiones se prepararon a partir 750 mg de material vegetal molido (tamaño de partícula < 2000 μm), extraído en 50 mL de agua hirviendo durante 30 minutos. Las infusiones se filtraron utilizando filtros Whatman No. 1 y se aforaron a 100 mL en matraces volumétricos con agua destilada. Previo a su análisis por CLUE, las infusiones se filtraron utilizando acrodiscos de nylon de 0.45 μm (Pall®).

En cuanto a los ensayos biológicos, los extractos acuosos se prepararon a partir de 10 g de droga cruda molida, extraídos en 250 mL de agua hirviendo durante 30 minutos, dichas infusiones se concentraron *in vacuo* a 50 °C a 10 mbar de presión, hasta sequedad.

6.3. Preparación de las cápsulas de extracto acuoso de corteza de *H. standleyana*

El material vegetal (20 kg), corteza seca de *H. standleyana*, proveniente del estado de Guerrero, se procesó con la colaboración de los Laboratorios MIXIM, donde se preparó un extracto acuoso, el cual se desecó hasta generar un sólido fino, color café, utilizando la técnica de secado por aspersión, “spray drying”, utilizando como aditivo inerte maltodextrina. La metodología empleada para dicho proceso no se detalla por motivos de confidencialidad, ya que se trata de un proceso industrial sujeto a patente.

Cada cápsula se llenó con aproximadamente 230 mg de extracto de corteza de *H. standleyana* (mínimo de 211 mg; máximo de 248 mg; media de 230 mg) en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Química, UNAM, bajo la supervisión de la M. en C. Socorro Alpízar Ramos.

6.4. Análisis cromatográfico

Para el establecimiento de perfiles cromatográficos a través de CLUE se analizaron las infusiones de hojas y cortezas de *H. latiflora*, *H. standleyana* y *E. caribaeum* con la finalidad de detectar diferencias en la composición química. Adicionalmente, la identificación de los compuestos en los cromatogramas se llevó a cabo con base en el tiempo de retención y el enriquecimiento de las infusiones con estándares (10 µL de solución estándar a una concentración de 1 mg/mL), bajo las mismas condiciones cromatográficas.

Para realizar los perfiles en CLUE de los extractos acuosos, se utilizó un cromatógrafo ACQUITY UPLC – H class, acoplado a un sistema de arreglo de fotodiodos (PDA) con una columna Acquity UPLC BEH shield-RP18 (tamaño de partícula de 1.7 µm; 100 mm × 2.1 mm) a 35 °C. El sistema de elución utilizado fue un gradiente de acetonitrilo (A)-agua (0.1 % de ácido trifluoroacético; B): 16% A por 0–5 min, 16–30 % A por 5–7 min, 30% A por 7–10 min y 30–16% A por 10–12 min a un flujo de 0.4 mL/min; el volumen de inyección en todos los casos fue de 10 µL. Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 327 nm.

6.5. Análisis de las hojas de *H. latiflora*

Se realizó un análisis cromatográfico en CLUE, en las mismas condiciones cromatográficas descritas para los perfiles cromatográficos, a infusiones preparadas a partir de distintas muestras de hojas *H. latiflora*, comparando a nivel cuantitativo la concentración de ácido clorogénico (**29**) y una serie de 4-fenilcumarinas (**5**, **6**, **13** y **14**).

6.5.1. Variación estacional

Se realizaron seis recolectas de material vegetal en la localidad de La Cocina, Santa Rita, municipio de Huetamo de Núñez, estado de Michoacán, correspondientes a los meses de agosto, octubre y diciembre del año 2009 y abril y julio del año 2010. En todos los casos que se encontró material vegetal, se muestrearon tres individuos distintos, identificados como HL19, HL21 y HL22. Estas recolectas abarcaron un periodo de un año, las dos épocas del año características de

dicha localidad (época de lluvias y época de secas) y las etapas fenológicas más importantes: desarrollo de hojas nuevas, floración, pre-senescencia y senescencia foliar.

Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las distintas muestras ($n = 12$) se calcularon a partir de un análisis de varianza (ANADEVA) de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey (Maldonado-López *et al.*, 2008). La concentración se reporta en mg por gramo de droga cruda (mg/g DC) para cada muestra recolectada.

6.5.2. Variación geográfica

Se compararon dos poblaciones de individuos de *H. latiflora* separadas geográficamente por más de 1000 kilómetros (1190 km), las cuales se identificaron como población Urique, siete individuos; Rancho Entre Amigos, municipio de Urique en el estado de Chihuahua; fecha de colecta septiembre de 2009, y población Huetamo, siete individuos; La Cocina y La Arena, Santa Rita, municipio de Huetamo de Núñez, estado de Michoacán; fecha de colecta julio de 2010. Dichos muestreos permiten establecer una comparación entre dos poblaciones aisladas geográficamente.

Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las distintas muestras ($n = 14$) se calcularon a partir de una prueba de t (Maldonado-López *et al.*, 2008). Los resultados se reportan en mg por gramo de droga cruda (mg/g DC) para cada muestra recolectada.

6.5.4. Validación del método analítico

La validación del método analítico se realizó con base en los lineamientos establecidos por las normas de Armonización Tripartita referentes a la Validación de Métodos Analíticos (ICH Q2 R1, 2005) y a la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

6.5.4.1. Preparación de la matriz de trabajo

Las distintas muestras a analizar se prepararon a partir de 750 mg de material vegetal molido (tamaño de partícula $< 2000 \mu\text{m}$), extraído en 50 mL de agua hirviendo durante 30 minutos, las infusiones se filtraron utilizando filtros Whatman No. 1 y se aforaron a 100 mL en

matraces volumétricos con agua destilada; previo a su análisis por CLUE, las infusiones se filtraron utilizando acrodiscos de nylon de 0.45 μm (Pall®).

6.5.4.2. Preparación de los analitos de referencia

Las soluciones patrón de los analitos de referencia **13** y **29** se prepararon a una concentración de 1 mg/mL en agua desionizada, utilizando no más de un 10% de ACN para solubilizar la muestra. Ambas soluciones se filtraron utilizando acrodiscos de nylon de 0.45 μm .

6.5.4.3. Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó a partir de una curva de calibración con cinco niveles de concentración para los analitos **13** (1–50 $\mu\text{g/mL}$) y **29** (3–150 $\mu\text{g/mL}$), construida a partir de la solución patrón de los mismos. El área bajo la curva ($\mu\text{V} \cdot \text{seg}$) correspondiente a las señales de los estándares se graficó con respecto su concentración. El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios: $b_0 = 0$; $b_1 \neq 0$; $r \geq 0.99$; $r^2 \geq 0.98$ y $\text{IC}(\beta_1)$ no incluye el cero. Se analizaron cinco réplicas por cada nivel de concentración.

6.5.4.4. Selectividad del método

La selectividad del método se realizó mediante el registro de los espectros UV de los analitos de referencia a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ y su comparación con la matriz de trabajo y una solución enriquecida de la misma con los estándares de referencia a una concentración de 15 $\mu\text{g/mL}$ para el compuesto **13** y de 45 $\mu\text{g/mL}$ para el compuesto **29**.

6.5.4.5. Linealidad y exactitud del método

La linealidad y exactitud del método se determinaron mediante el enriquecimiento con tres diferentes concentraciones de los estándares (punto bajo, punto medio y punto alto) a la matriz de trabajo; para el compuesto **13** fueron 3, 15 y 45 $\mu\text{g/mL}$ y 9, 45 y 135 $\mu\text{g/mL}$ para el compuesto **29**. Se evaluaron cinco réplicas por concentración. Los valores de área bajo la curva resultantes se interpolaron en las ecuaciones de la recta obtenidas a partir de curvas de calibración para evaluar la linealidad del sistema. Los resultados obtenidos (concentración adicionada vs.

concentración recuperada) fueron analizados para determinar sus parámetros estadísticos: $b_0 = 0$; $b_1 \neq 0$; $r \geq 0.99$; $r^2 \geq 0.98$ y $CV_{y/x} \leq 2\%$, mediante un análisis de regresión lineal simple. La exactitud del método se evaluó mediante los siguientes parámetros estadísticos: \bar{y} , s , CV y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro.

6.5.4.6. Precisión

La repetibilidad y la precisión intermedia se establecieron mediante el análisis de seis réplicas de los estándares **13** y **29** a una concentración definida (15 y 45 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). El análisis se efectuó en dos días diferentes por dos analistas distintos. Los resultados obtenidos se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

6.5.4.7. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

La evaluación de LOD y LOQ se realizó construyendo curvas de calibración a partir de la dilución del nivel de concentración más bajo de los estándares. Así, las disoluciones empleadas contenían entre 0.1–0.5 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto **13** y 0.3–1.5 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto **29**. Se evaluaron tres réplicas por concentración y se realizó un análisis de regresión lineal simple a partir del área bajo la curva de las diluciones analizadas con respecto a su nivel de concentración. El LOD y LOQ fueron determinados de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{LOD} = (3.3 \times S_{y/x}) / b_1 \qquad \text{LOQ} = (10 \times S_{y/x}) / b_1$$

6.5.4.8. Estabilidad

La estabilidad de los estándares se evaluó mediante el análisis de su concentración (100 $\mu\text{g/mL}$) después de someterlos a condiciones de refrigeración (-4°C), temperatura ambiente (25°C), hidrólisis ácida e hidrólisis básica. Las muestras se analizaron por triplicado y las determinaciones se obtuvieron a las 12 y 24 horas para el caso de las variaciones en las condiciones de temperatura.

6.6. Determinación de la dosis letal media (DL₅₀)

Para evaluar la toxicidad aguda de los extractos acuosos de las hojas y corteza de *H. latiflora*, *H. standleyana* y *E. caribaeum* (HHL, CHL, HHS, CHS, HEC y CEC, respectivamente) se utilizó el protocolo experimental descrito por Lorke (1983).

Se utilizaron grupos de tres ratones macho, cepa ICR, con un peso promedio entre 20–25 gramos. Se ensayaron en una primera etapa, tres dosis del extracto: 10, 100 y 1000 mg/kg; y, si todos los animales sobreviven, en una segunda etapa, otras tres dosis del extracto: 1600, 2900 y 5000 mg/kg. En todos los casos, los tratamientos fueron suspendidos en solución salina (0.1% de Tween 80). Posterior a la administración de los extractos, los animales se observaron durante las primeras dos horas, y se continuaron monitoreando durante quince días, registrando su peso, comportamiento y cambios fisiológicos visibles diariamente. Al finalizar el periodo de observación, se realiza un examen morfológico general de los órganos de los animales, comparándolos contra un individuo del grupo control.

Con las dos fases del método de Lorke concluidas, se puede estimar el valor de la dosis mínima necesaria para producir la muerte del animal por toxicidad (DL₅₀). Dicho valor se calcula mediante una media geométrica entre la dosis donde se presenta el deceso del primer animal y la última dosis donde no hay muertos.

6.7. Evaluación de la actividad antidiabética

6.7.1. Ensayo hipoglucemiante agudo

Para la evaluación de la actividad hipoglucemiante de HHL, CHL, HHS, CHS, HEC y CEC, se llevó a cabo un experimento de tipo agudo, utilizando animales normoglucémicos y diabéticos (Guerrero-Analco *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 1996). Se utilizaron ratones macho, cepa ICR, de 25 gramos de peso promedio, con un ayuno de 6 horas, formando lotes de ocho animales, los cuales se agruparon en los distintos tratamientos: vehículo (blanco), glibenclamida 10 mg/kg (control positivo) (Sigma) y los extractos a evaluar a las dosis de 100 mg/kg, 300 mg/kg y 500 mg/kg.

Para su administración, cada dosis de extracto íntegro se suspendió en una solución salina con 0.05% de Tween 80; los dos controles siguieron el mismo procedimiento de disolución; todos los tratamientos fueron administrados vía oral, utilizando una sonda orogástrica.

Los animales se diabetizaron con una dosis intraperitoneal de estreptozotocina (STZ 100 mg/kg, Fluka) posterior a la administración de nicotinamida (NA 30 mg/kg i.p., Sigma). Dicho protocolo con la finalidad de proteger del daño que produce la STZ a las células β pancreáticas, asegurando así la generación de animales con diabetes tipo 2 (Masiello *et al.*, 1998).

Se tomaron muestras de sangre a las 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas después de la administración de los tratamientos. Las muestras sanguíneas se tomaron de la vena caudal de los animales a través de una pequeña incisión en el final de la cola. Los niveles de glucosa sanguínea se midieron por el método enzimático de la glucosa oxidasa, utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra, Jonhson-Jonhson, Milpitas, CA, EE.UU.).

Una vez obtenidos los valores de las lecturas de glucosa sanguínea (mg/dL), se calcularon los porcentajes de variación de glucemia de acuerdo a la ecuación:

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

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

6.7.2. Curva de tolerancia a la sacarosa oral

Para la evaluación de la actividad antihiper glucémica de HHL, CHL, HHS, CHS, HEC y CEC, se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la sacarosa oral (TSO) utilizando animales normoglucémicos y diabéticos, la cual nos permite establecer *a priori* si la actividad antihiper glucémica está asociada a una inhibición de las alfa-glucosidasas intestinales (Williamson *et al.*, 1996).

Se utilizaron ratones ICR macho, de 25 gramos de peso promedio, con un ayuno de 6 horas, formando lotes de ocho animales, los cuales se agruparon en los distintos tratamientos: vehículo (control negativo), acarbosa 5 mg/kg (control positivo) (Sigma), extractos acuosos a las dosis de 100 mg/kg, 300 mg/kg y 500 mg/kg. 30 minutos después de administrar el tratamiento a cada grupo se le administró una carga de 3 g/kg de sacarosa (Sigma)

Para su administración, cada dosis de extracto íntegro se suspendió en solución salina con 0.05% de Twen 80, los dos controles siguieron el mismo procedimiento de disolución; todos los tratamientos fueron administrados vía oral, utilizando una sonda orogástrica.

Los animales se diabetizaron bajo el mismo protocolo descrito en el ensayo hipoglucemiante agudo.

Se tomaron muestras de sangre a las 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas después de la administración de la carga de sacarosa bajo el mismo protocolo descrito anteriormente.

Los valores obtenidos en las mediciones de glucosa sanguínea (mg/dL) se reportan en porcentaje de variación de glucemia de acuerdo a la ecuación:

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

Donde G_i corresponde al valor de glucemia inicial y G_r el valor de glucemia a 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas posteriores a la carga de sacarosa.

Se verificó si los animales presentaron, o no, una disminución del pico posprandial relacionada con la administración de los extractos.

6.7.3. Curva de tolerancia a la glucosa oral

Para la evaluación de la actividad antihiper glucémica del extracto acuoso íntegro de la hojas de *H. latiflora*, se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa oral (TGO), utilizando animales normoglicémicos y diabéticos (Williamson *et al.*, 1996).

Se utilizaron ratones ICR macho, de 25 gramos de peso promedio, con un ayuno de 12 horas, formando lotes de ocho animales, los cuales se agruparon en los distintos tratamientos: vehículo (control negativo), glibenclamida 10 mg/kg (control positivo) (Sigma), extracto de *H. latiflora* 100 mg/kg, extracto de *H. latiflora* 300 mg/kg y extracto de *H. latiflora* 500 mg/kg. Se administró a cada lote una carga de 1 g/kg de glucosa anhidra (Sigma). Para su administración, cada dosis de extracto íntegro se suspendió en solución salina con 0.05% de Twen 80, los dos controles siguieron el mismo procedimiento de disolución; todos los tratamientos fueron administrados vía oral utilizando una sonda orogástrica. Los animales se diabetizaron bajo el mismo protocolo descrito en el ensayo hipoglucemiante agudo.

Se tomaron muestras de sangre a las 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas después de la administración. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas bajo el mismo protocolo descrito anteriormente. Los valores obtenidos en las lecturas de glucosa sanguínea se reportan en mg/dL de glucosa sanguínea. Se verificó si los animales presentaron una disminución del pico posprandial relacionada con la administración de los extractos.

6.7.4. Evaluación de la actividad antihiper glucemiante de los compuestos 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4) y su aglicona 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (34)

Para la evaluación de la actividad antihiper glucémica de los compuestos 4 y 34, se llevaron a cabo pruebas de tolerancia a la sacarosa oral (TSO) y al almidón (TAO), utilizando animales normoglucémicos y diabéticos (Williamson *et al.*, 1996).

Se utilizaron ratones ICR macho, de 25 gramos de peso promedio, con un ayuno de 6 horas, formando lotes de ocho animales, los cuales se agruparon en los distintos tratamientos: vehículo (control negativo), acarbosa 5 mg/kg (control positivo) (Sigma), compuesto 4 a las dosis de 5 mg/kg y 50 mg/kg y compuesto 34 a las dosis de 5 mg/kg y 50 mg/kg. Según fue el caso, TSO o TAO, a cada grupo se le administró una carga de 3 g/kg de sacarosa (Sigma-47289) o 2 g/kg de almidón (Sigma-4126).

Para su administración, cada dosis de extracto íntegro se suspendió en solución salina con 0.05% de Twen 80, los dos controles siguieron el mismo procedimiento de disolución; todos los tratamientos fueron administrados vía oral utilizando una sonda orogástrica.

Los animales se diabetizaron bajo el mismo protocolo descrito en el ensayo hipoglucemiante agudo.

Se tomaron muestras de sangre a las 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas después de la administración. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas bajo el mismo protocolo descrito en el ensayo de tolerancia a la sacarosa oral. Los valores obtenidos en las lecturas de glucosa sanguínea se reportan en mg/dL de glucosa sanguínea. Se verificó si los animales presentaron una disminución del pico posprandial relacionada con la administración de los extractos.

6.8. Obtención de las agliconas 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (34) y 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina (35)

Para la obtención del compuesto 34, se disolvió un gramo del compuesto 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4) en 100 mL de ácido clorhídrico (1N). La mezcla se sometió a proceso de reflujo a una temperatura de 50 °C, durante 90 minutos.

Se dejó enfriar la solución hasta temperatura ambiente, el precipitado resultante se filtró en un embudo Buchner, hasta llegar a sequedad, para su posterior identificación.

En el caso del compuesto **35**, se disolvieron 100 mg del compuesto 6''-acetil-5-*O*- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**7**) en 10 mL de ácido clorhídrico (1 N) y se puso en reflujo a una temperatura de 50 °C durante 180 minutos. Se dejó enfriar la solución hasta temperatura ambiente, el precipitado resultante se filtró en un embudo Buchner, hasta llegar a sequedad, para su posterior identificación.

6.9. Ensayo de inhibición de α -glucosidasas *in vitro*

Se determinó la CI_{50} de distintos compuestos presentes en la especies que conforman el complejo copalchi: *H. latiflora* (HL), *H. standleyana* (HS) y *E. caribaeum* (EC):

- 5-*O*- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**4**; HL, HS, EC)
- 5-*O*- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**5**; HL, HS, EC)
- 5-*O*- β -D-glucopiranosil-7, 3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**6**; HL, EC)
- 6''-acetil-5-*O*- β -D-glucopiranosil-7, 3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**7**; HS, EC)
- 5-*O*-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**13**; HL, HS)
- 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**34**)
- 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina (**35**)
- 3-*O*- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina (**25**; HL, HS)
- 25-*O*-acetil-3-*O*- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina (**26**; HL, HS)
- Ácido desoxicordifolínico (**28**; HL, HS)
- Ácido clorogénico (**29**; HL, HS, EC)

El ensayo de inhibición de α -glucosidasas *in vitro* se llevó a cabo utilizando la metodología descrita por Brindis y colaboradores (2010). Se utilizó α -glucosidasa proveniente de levadura (G5003, Sigma Aldrich) a una concentración de 0.75 U/mL en un volumen final de 100 mM de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.0); y como sustrato se utiliza *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (N1377, Sigma Aldrich) a una concentración de 5 mM. Como control positivo

se utiliza acarbosa (A8980, Sigma Aldrich). Los compuestos se evaluaron a una concentración patrón de 10 mM generando un rango que va de 0 a 1 mM.

La inhibición se determinó espectrofotométricamente en una placa de 96 pozos, utilizando el lector de placas iMark (BioRad). En cada pozo, se dispensa para su incubación, durante 10 minutos a temperatura ambiente, 20 μ L de enzima con una determinada concentración de inhibidor o compuesto a ensayar; se toma una lectura espectrofotométrica inicial a una longitud de onda de 415 nm. Después de la incubación, se adicionan 10 μ L de sustrato y se incuba una vez más durante 35 minutos a una temperatura de 36 °C. Posterior a la incubación, se toma una segunda lectura a 415 nm. Las absorbancias se adquirieron a través del programa Microplate Manager 6 (BioRad) y la CI_{50} se calculó a partir de la curva de inhibición obtenida para cada rango de concentraciones utilizando el programa Origin 8.

6.10. Estudio de acoplamiento molecular

Para el estudio de acoplamiento molecular, se construyeron las estructuras con el programa Hyperchem 7.5 (HyperCube Inc., FL). Para la visualización de las estructuras se utilizaron los siguientes programas: Hyperchem 7.5, Pymol (DeLano Scientific LLC, CA) y AutoDock Tools (ADT; www.autodock.scripps.edu). La optimización geométrica de las estructuras se llevó a cabo con el programa Hyperchem 7.5, utilizando el campo de fuerza AMBER, siguiendo un algoritmo de gradiente conjugado (Polak-Ribiere), y teniendo como condición de término un gradiente 0.01 kcal/[Å mol], o un máximo de 750 ciclos. Esta minimización de energía se llevó a cabo al vacío.

Los cálculos de acoplamiento molecular se llevaron a cabo con el programa AutoDock 4.0 (www.autodock.scripps.edu). La adición de los átomos de hidrógenos polares a la proteína, las cargas de Kollman, los parámetros de solvatación y volúmenes fraccionarios, se realizaron utilizando el programa ADT (AutoDock Tools). A cada ligante se le asignaron las cargas parciales de Gasteiger-Marsili, se removieron los hidrógenos no polares y se permitió la rotación de todos los ángulos de torsión permisibles.

El acoplamiento molecular consistió en la generación de mapas electrostáticos para cada tipo de átomo que participa en el mismo, en una caja de 120x120x120 Å, con un espacio de

enrejamiento de 0.375 Å, localizada en el centro de la macromolécula, la cual fue construida con AutoGrid 4 (parte de la paquetería de programas de AutoDock 4). La búsqueda de las posiciones de menor energía de interacción ligando-proteína se realizó utilizando el algoritmo genético Lamarkiano, utilizando los parámetros recomendados inicialmente, los cuales consisten en: una población de 150 individuos, 2,500,000 evaluaciones energéticas y cambiando únicamente el número de corridas, que fue de 1000 evaluaciones independientes.

Los programas utilizados para el acoplamiento molecular y su análisis fueron los siguientes: AutoDock 4.00 revisión 1.69 (1991-2007), AutoDockTools versión 1.5.0 revisión 7 (1999-2007 Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Reseach Institute) y PyMOL, sobre el sistema operativo UNIX usando una supercomputadora (KANBALAM HP CP 4000), la cual contiene 1368 procesadores AMD Opteron, 3 terabyte de memoria y 160 terabyte de almacenamiento (<http://www.super.unam.mx/>).

6.11. Evaluación de la actividad gastroprotectora

Para la evaluación de la actividad gastroprotectora de HHL, CHL, HHS, CHS y los compuestos **13** y **29**, se realizó una prueba de inhibición a la formación de lesiones gástricas agudas inducidas por etanol absoluto en estómago de rata macho Wistar siguiendo el protocolo de Roberts (1979) modificado por Navarrete y colaboradores (2002).

Los extractos acuosos se evaluaron a las dosis de 30, 100, 177 y 300 mg/kg; mientras que el compuesto **13** se evaluó a las dosis 0.1, 1, 10, 17, 30, 57 y 100 mg/kg; el compuesto **29** a las dosis de 3, 10, 17, 30, 57 y 100 mg/kg; y se compararon contra los controles negativo (vehículo) y positivo (carbenoxolona 10 mg/kg). Todos los tratamientos se administran v.o. 30 minutos antes de la administración *per os* de 1 mL de etanol absoluto.

Dos horas después de la administración de etanol, los animales se sacrificaron por inhalación de dióxido de carbono, se extrajo el estómago, el cual se fijó con 10 mL de formaldehído 30% v/v durante 15 minutos y se contabilizaron las úlceras gástricas. El estómago se abrió por la curvatura mayor y se midió el área de las lesiones (mm²) utilizando un microscopio de disección con el ocular graduado (10×). La suma del área total de lesiones de cada estómago se calcula como el índice de úlcera (IU).

La actividad gastroprotectora (%GP) se evalúa con la fórmula:

$$\%GP = (IU_{veh} - IU_{trat} / IU_{veh}) \times 100$$

Se reportan las diferencias significativas ($p < 0.05$) de los tratamientos con respecto al control negativo a través de un ANDEVA de una vía seguido de una prueba de Newman-Keuls (Navarrete *et al.*, 2002).

6.11.1 Determinación del mecanismo de acción gastroprotector

Con la finalidad de determinar el mecanismo de acción gastroprotector de los compuestos **13** y **29** se realizaron una serie de experimentos pretratando a los animales con fármacos selectos que bloquean las principales vías de gastroprotección.

Para investigar el papel de la producción endógena del óxido nítrico en el efecto protector de los compuestos **13** y **29** (DE_{50} =15 y 26 mg/kg p.o., respectivamente), se administró el éster metílico de la N^G -nitro-L-arginina (L-NAME; 70 mg/kg disuelto en solución salina isotónica, i.p.) 30 minutos antes del tratamiento con los compuestos mencionados. Después de media hora se indujo la formación de lesiones gástricas, las cuales se cuantificaron utilizando la misma metodología descrita para evaluar el efecto gastroprotector. De igual manera se incluyeron los controles negativo (vehículo) y positivo (pretratamiento con L-NAME) (Chávez-Piña *et al.*, 2009).

Para determinar el rol de los grupos sulfhidrilo endógenos en el efecto protector de los compuestos **13** y **29**, se administró *N*-etilmaleimida (NEM; 20 mg/kg disuelto en solución salina isotónica, s.c.) 30 minutos antes del tratamiento con los compuestos mencionados. Después de media hora, se indujo la formación de lesiones gástricas, las cuales se cuantificaron utilizando la misma metodología descrita para evaluar el efecto gastroprotector. De igual manera, se incluyeron los controles negativo (vehículo) y positivo (pretratamiento con NEM) (Chávez-Piña *et al.*, 2009).

Con la finalidad de conocer el papel de las prostaglandinas endógenas en el efecto protector de los compuestos **13** y **29**, se administró indometacina (10 mg/kg disuelto en $NaHCO_3$ 5 mM, s.c.) 30 minutos antes del tratamiento con los compuestos mencionados. Después de media hora, se indujo la formación de lesiones gástricas, las cuales se cuantificaron

utilizando la misma metodología descrita para evaluar el efecto gastroprotector. De igual manera, se incluyeron los controles negativo (vehículo) y positivo (pretratamiento con indometacina) (Chávez-Piña *et al.*, 2009).

6.12. Estudio farmacocinético del compuesto 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**4**) y su aglicona (**34**)

La importancia farmacológica de las 4-fenilcumarinas obliga a la determinación de una serie de parámetros farmacocinéticos; los analitos **4** y **34** se cuantificaron simultáneamente en dos matrices biológicas distintas: plasma y heces de rata, con la finalidad de determinar la absorción y eliminación de los mismos.

6.12.1. Cuantificación simultánea de los compuestos **4** y **34** en plasma de rata

El método analítico desarrollado para cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) consiste en una fase móvil isocrática conformada por acetonitrilo (ACN) y agua acidificada (ácido trifluoroacético, TFA, 0.1%) en una proporción 24:76 a un flujo de 1 mL/min. Se utilizó una columna fase reversa Symmetry C-8, tamaño de partícula de 5 μ m; 3.9 \times 150 mm (Waters), con un guarda-columna SecurityGuard, cartuchos Widedpore C-18 4.0 \times 3.0 mm (Phenomenex). Los compuestos se registraron a una longitud de onda de 327 nm. El tiempo de corrida fue de 12 minutos, con un tiempo de retención (t_R) para el compuesto **4** de 2.7 minutos y para el compuesto **34** de 9.5 minutos; el volumen de inyección en todos los casos fue de 20 μ L.

6.12.1.1. Preparación los analitos de referencia

Las soluciones patrón de los analitos de referencia **4** y **34** se prepararon a una concentración de 1 mg/mL (agua desionizada) y se filtraron utilizando acrodiscos de nylon de 0.45 μ m (Pall®).

6.12.1.2. Preparación de la matriz de trabajo

La sangre total (5 mL) de rata macho cepa Wistar (250–300 g de peso) decapitada se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos. El plasma resultante se filtró utilizando acrodiscos de membrana Supor® de 0.45 µm (Pall®); el plasma obtenido congeló (–20 °C) hasta su utilización. Para la validación del método se trabajó con un volumen de 500 µL de plasma; para el enriquecimiento de la matriz de trabajo con los analitos se agitó cada muestra en vórtex durante 15 segundos.

6.12.1.3. Método de extracción

Se llevó a cabo una extracción líquido-líquido adicionando a la matriz enriquecida 200 µL de una mezcla ACN:MeOH (2:1), posteriormente se centrifugó a 15000 rpm durante 20 minutos, para separar cualquier proteína plasmática existente. Se tomaron 300 µL del sobrenadante y éste es el que se analiza en CLAE.

6.12.1.4. Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó a partir de una curva de calibración con cinco niveles de concentración para la mezcla de los analitos **4** y **34** (1–50 µg/mL) disueltos en agua. El parámetro estadístico que se calcula es el coeficiente de correlación (r^2), y su criterio de aceptación es $r^2 \geq 0.98$. Se realizaron tres réplicas por cada nivel de concentración.

6.12.1.5. Selectividad del método

La selectividad del método se realizó mediante la comparación de una muestra con la mezcla de los analitos **4** y **34** (15 µg/mL) disueltos en agua, contra una muestra en iguales condiciones proveniente de la matriz biológica enriquecida. Se observa si en las respuestas obtenidas por su análisis en CLAE existe alguna interferencia en el tiempo de retención del fármaco analizado.

6.12.1.6. Linealidad y exactitud del método

Se prepararon tres curvas de calibración en el rango de concentraciones mencionadas enriqueciendo la matriz biológica. Se calculó a través de una regresión lineal simple las ecuaciones de la recta para cada uno de los analitos y se calcula la desviación estándar absoluta (DEA, concentración adicionada vs. concentración recuperada). Los criterios de aceptación son una $r^2 \geq 0.98$ para las curvas y una $DEA \leq 15\%$ para cada nivel de concentración evaluado y una $DEA \leq 20\%$ para el nivel más bajo de concentración.

6.12.1.7. Precisión

La repetibilidad y reproducibilidad se establecieron mediante el análisis de una curva de calibración, cinco repeticiones de los puntos control para la repetibilidad y tres repeticiones de los mismos para la reproducibilidad. Se calculó la concentración recuperada en cada nivel de concentración, interpolando los datos obtenidos de los puntos control de la curva de calibración. Se evaluaron los parámetros estadísticos: \bar{y} , s , CV en cada una de las concentraciones analizadas. El criterio de aceptación para el parámetro de precisión $CV \leq 15\%$.

6.12.1.8. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

La evaluación de LOD y LOQ se realizó construyendo curvas de calibración a partir de la dilución del nivel de concentración más bajo de los estándares. Así, las disoluciones empleadas contenían entre 0.1–0.5 $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos **4** y **34**. Se evaluaron tres réplicas por concentración y se realizó un análisis de regresión lineal simple a partir del área bajo la curva de las diluciones analizadas con respecto a su nivel de concentración. El LOD y LOQ fueron determinados de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{LOD} = (3.3 \times S_{y/x}) / b_1$$

$$\text{LOQ} = (10 \times S_{y/x}) / b_1$$

6.12.1.9. Estabilidad

La estabilidad de los estándares se evaluó mediante el análisis de su concentración (100 $\mu\text{g/mL}$), después de someterlos a condiciones de refrigeración ($-4\text{ }^\circ\text{C}$), temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C}$), hidrólisis ácida e hidrólisis básica. Las muestras se analizaron por triplicado y las

determinaciones se obtuvieron a las 12 y 24 horas para el caso de las variaciones en las condiciones de temperatura.

6.12.1.10. Análisis preliminar de la absorción de los compuestos 4 y 34

Se administró una dosis de 100 mg/kg del compuesto 4. Se utilizaron cinco animales, obteniendo dos tiempos de muestreo de cada uno de ellos, 1.5 mL de sangre vía seno orbito ocular. Los tiempos de muestreo fueron: 0, 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360, 720 y 1440 minutos. Cada muestra se mezcló por inversión con 100 µL de heparina, para evitar la coagulación, y se sometió al método de extracción establecido anteriormente; 300 µL de cada muestra se congelaron a -20 °C para su posterior análisis por CLAE utilizando el método analítico validado.

6.12.2. Cuantificación simultánea de los compuestos 4 y 34 en heces de rata

El método analítico desarrollado para CLAE consiste en una fase móvil isocrática conformada por acetonitrilo (ACN) y agua acidificada (ácido trifluoroacético, TFA, 0.1%) en una proporción 25:75 a un flujo de 1 mL/min. Se utilizó una columna fase reversa Symmetry C-8, tamaño de partícula de 5 µm; 3.9 × 150 mm (Waters), con un guarda-columna SecurityGuard, cartuchos Wipore C-18 4.0 × 3.0 mm (Phenomenex). Los compuestos se registraron a una longitud de onda de 327 nm. El tiempo de corrida fue de 12 minutos con un tiempo de retención (t_R) para el compuesto 4 de 2.5 minutos y para el compuesto 34 de 8.5 minutos; el volumen de inyección en todos los casos fue de 20 µL.

6.12.2.1. Preparación los analitos de referencia

Las soluciones patrón de los estándares de referencia 4 y 34 se prepararon a una concentración de 1 mg/mL (agua desionizada) y se filtraron utilizando acrodiscos de nylon de 0.45 µm (Pall®).

6.12.2.2. Preparación de matriz de trabajo

Las heces de rata se recolectaron utilizando una jaula metabólica en la cual se aislaron a ratas macho cepa Wistar (250–300 g de peso), de cada animal se obtuvieron aproximadamente 8 g de heces en un periodo de 24 horas. Las muestras fecales se liofilizaron hasta alcanzar peso constante. Las heces se almacenaron en un desecador hasta su utilización. Para la validación del método se trabajó con un peso de 50 mg de heces; para el enriquecimiento de la matriz de trabajo, se adicionaron los analitos en un volumen de 200 μ L de agua desionizada. Las muestras se dejaron rehidratar y se agitaron en vórtex durante 10 minutos.

6.12.2.3. Método de extracción

Se llevó a cabo una extracción adicionando a la matriz biológica 1300 μ L de una mezcla ACN y agua acidificada (1:3), ésta se dejó durante hidratar 15 minutos y se agitó en vórtex por 2 minutos más, posteriormente se centrifuga a 3000 rcf, durante 10 minutos. Se toman 500 μ L de sobrenadante los cuales se someten a una segunda centrifugación a 10000 rcf, por 10 minutos. Se toman 400 μ L del sobrenadante para su análisis por CLAE.

6.12.2.4. Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó a partir de una curva de calibración con cinco niveles de concentración para la mezcla de los analitos **4** y **34** (3–150 μ g/mL) disueltos en agua. El parámetro estadístico que se calcula es el coeficiente de correlación (r^2); el criterio de aceptación es $r^2 \geq 0.98$. Se realizaron tres réplicas por cada nivel de concentración.

6.12.2.5. Selectividad del método

La selectividad del método se estableció mediante la comparación de una muestra conteniendo la mezcla de los analitos **4** y **34** (45 μ g/mL) disueltos en agua, contra una muestra de iguales condiciones proveniente de la matriz biológica enriquecida. Se observa si en las respuestas obtenidas por su análisis en CLAE existe alguna interferencia en el tiempo de retención del fármaco analizado.

6.12.2.6. Linealidad y exactitud del método

Se prepararon tres curvas de calibración en el rango de concentraciones mencionadas enriqueciendo la matriz biológica. Este parámetro se calculó de la misma manera descrita en el punto 6.1.12.6.

6.12.2.7. Precisión

Este parámetro se estableció siguiendo el mismo protocolo descrito en el punto 6.12.1.7.

6.12.2.8. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

La evaluación de LOD y LOQ se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el punto 6.12.1.8.

6.12.2.9. Estabilidad

La estabilidad de los estándares se evaluó mediante el análisis descrito en el punto 6.12.1.9.

6.12.2.10. Análisis de la eliminación de los compuestos 4 y 34 en rata

Previo un ayuno de 8 h, se formaron tres grupos de seis ratas macho cepa Wistar (250-300 g) a cada grupo se les administraron las dosis de 15, 30 y 90 mg/kg compuesto 4, respectivamente. También se consideró un grupo control de tres animales sólo administrado con solución salina isotónica. Se recolectaron muestras de las heces fecales a las 0, 12, 18, 24, 36, 48, 60 y 72 horas, las cuales se liofilizaron para su posterior análisis por CLAE utilizando el método analítico validado.

7. Resultados y discusión

En la presente sección se abordarán los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de investigación. En primer lugar, se expone y discute la influencia fenológica y geográfica en la concentración de metabolitos biodinámicos selectos en las hojas de *H. latiflora*; posteriormente, se compara la composición química de las infusiones de hojas y cortezas de las tres rubiáceas en estudio. En segundo término, se presentan los resultados referentes a la farmacología del complejo copalchi; desde la evaluación de la toxicidad preclínica aguda de todos los extractos acuosos evaluados, seguido por el estudio de la eficacia antidiabética y gastroprotectora, hasta los estudios farmacocinéticos preliminares de 4-fenilcumarinas biodinámicas selectas. Finalmente, se propone la formulación de dos preparados fitoterapéuticos.

7.1. Determinación de la influencia fenológica y geográfica en la concentración de metabolitos biodinámicos de *H. latiflora*

Con la finalidad de detectar la influencia de distintos factores de variación como la fenología y la distribución geográfica en la concentración de los metabolitos de interés farmacológico, se analizaron muestras diferentes de hojas de *H. latiflora* recolectadas en los sitios de estudio mencionados en la metodología.

Se eligió la localidad de David J. Tellitud, popularmente conocida como Santa Rita, municipio de Huetamo de Núñez, estado de Michoacán, ubicada en la depresión del río Balsas a una altitud de 221 m snm; dentro de esta localidad se eligieron dos sitios de estudio: La Cocina y La Arena. El diagrama ombrotérmico de la localidad para el periodo 1971-2000, única información disponible a la fecha, se representa en la Figura 11. Dicho diagrama nos permite comparar las condiciones climáticas en las distintas localidades estudiadas, y así descartar otro factor de variabilidad en el estudio.

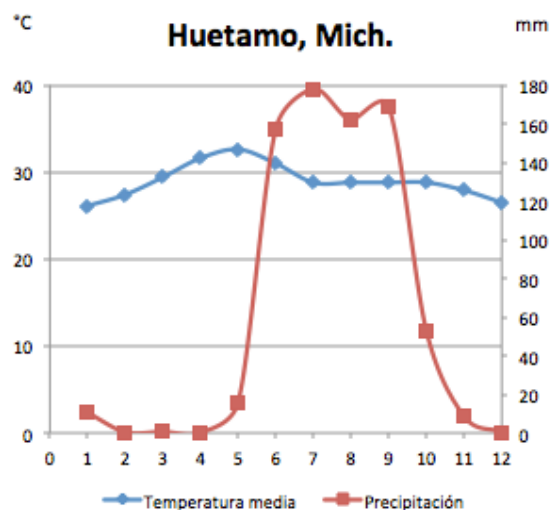


Figura 11. Diagrama ombrotérmico de Huetamo, Mich. Datos tomados del Servicio Meteorológico Nacional.

El sitio de estudio, conocido como “La Cocina” (18° 31.709’ N; 101° 04.692’ W), presenta regiones semi-conservadas a conservadas de bosque tropical caducifolio. No obstante, presenta grandes extensiones destinadas a prácticas agrícolas y ganaderas. Para el estudio de *H. latiflora*, se seleccionaron tres individuos marcados como 19, 21 y 22 de los cuales se obtuvieron sólo las hojas durante un muestreo de un año (Cuadro 3).

Cuadro 3. Colectas realizadas en la localidad de “La Cocina” entre los meses de agosto de 2009 a julio de 2010.

Fecha de colecta	Individuo	Peso seco (g)	Estado de las hojas / Características árbol	Ejemplar de herbario (FCME)
29-VIII-2009	19	43.8	Hojas ligeramente manchadas / Posfloración, pocos frutos	–
29-VIII-2009	21	34.1	Hojas en buen estado general / Posfloración, sin frutos	–
29-VIII-2009	22	37.2	Hojas en buen estado / Posfloración, sin frutos	–
10-X-2009	19	23.2	Hojas ligeramente manchadas / Senescencia foliar	–
10-X-2009	21	53.1	Hojas en buen estado general / Senescencia foliar	–
10-X-2009	22	22.1	Hojas en buen estado general / Senescencia foliar	–
20-XII-2009	21	28.5	Pocas hojas con manchas oscuras / Senescencia foliar	–
12-I-2010	21	20.1	Prácticamente sin hojas, manchadas / Senescencia foliar	–
9-IV-2010	19	48.3	Hojas nuevas y maduras en perfecto estado / Posfloración, muchos brotes, yemas foliares saliendo de la latencia, algunos frutos	–

9-IV-2010	21	30.5	Hojas nuevas y maduras en perfecto estado / Posfloración, muchos brotes, yemas foliares saliendo de la latencia, sin frutos	-
9-IV-2010	22	32	Hojas nuevas y maduras en perfecto estado / Posfloración, muchos brotes, yemas foliares saliendo de la latencia, algunos frutos	131316
4-VII-2010	19	35	Hojas en perfecto estado / Árbol sin flor	131315
4-VII-2010	21	11	Hojas en perfecto estado / Árbol en floración	131336
4-VII-2010	22	175	Hojas en perfecto estado / Árbol sin flor	131337

La segunda localidad, “La Arena” (18°31' 0.76" N; 101° 5' 19.8" W), con mayor número de árboles de *H. latiflora*, se ubica aproximadamente a 2.5 km al oeste de “La Cocina”; se recolectaron muestras de cuatro individuos adicionales (S. Cristians [84](#), [85](#), [86](#) y [87](#)) para realizar la comparación con los individuos de la localidad de Urique, Chih. Cabe destacar que se recolectó en la temporada de lluvias (julio de 2010) por lo que todos los árboles tenían hojas en perfecto estado y algunos presentaban flores y frutos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Colecta realizada en la localidad de “La Arena” en el mes de julio de 2010 en Santa Rita, Huetamo, Mich.

Fecha de colecta	Individuo	Peso seco (g)	Estado de las hojas / Características árbol	Ejemplar de herbario (FCME)
4-VII-2010	84	50	Hojas en perfecto estado / Árbol sin flor	131344
4-VII-2010	85	30	Hojas en perfecto estado / Árbol sin flor	131345
4-VII-2010	86	43	Hojas en perfecto estado / Árbol en floración	131355, 131334, 131333, 131338
4-VII-2010	87	43	Hojas en perfecto estado / Árbol en floración	131346

Para llevar a cabo la comparación entre poblaciones de la especie *H latiflora* se hizo una colecta en el municipio de Urique en el estado de Chihuahua (29° 13.143' N 107° 54.832' W), en un terreno privado con remanentes de bosque tropical caducifolio, a una altitud de 579 m snm; el diagrama ombrotérmico de la localidad para el periodo 1971-2000 se representa en la Figura 12. La recolecta se llevó a cabo en el mes de septiembre de 2009. Además de los individuos antes estudiados ([34439](#), [35139](#), [35140](#) y [35141](#); Cristians, 2009) se encontraron cuatro nuevos individuos ([63](#), [67](#), [68](#) y [69](#)). En todos los casos, los árboles estaban en un estado avanzado de senescencia foliar, presentando hojas manchadas. El individuo [63](#) era el que presentó un número menor de manchas, mientras que los individuos [35139](#) y [35141](#) presentaron una cantidad abundante de manchas (Cuadro 5).

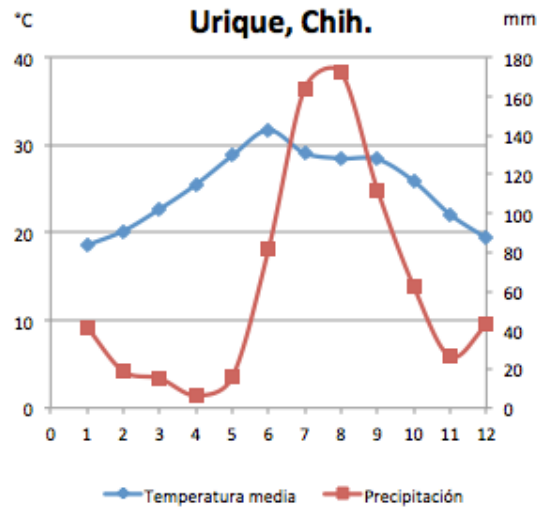


Figura 12. Diagrama ombrotérmico de Urique, Chih. Datos tomados del Servicio Meteorológico Nacional.

Cuadro 5. Colecta realizada en la localidad “Rancho Entre Amigos” en el mes de septiembre de 2009 en Urique, Chih.

Fecha de colecta	Individuo	Peso seco (g)	Estado de las hojas / Características árbol
22-IX-2009	35139	15	Hojas muy manchadas, estado de senescencia.
22-IX-2009	63	17	Hojas poco manchadas, estado senescente.
22-IX-2009	64 (34439)	60	Hojas manchadas, estado de senescencia.
22-IX-2009	65 (35140)	57	Hojas manchadas, estado de senescencia.
22-IX-2009	66 (35141)	67	Hojas manchadas, estado de senescencia.
22-IX-2009	67	69	Hojas manchadas, estado de senescencia.
22-IX-2009	68	90	Hojas manchadas, estado de senescencia.
22-IX-2009	69	123	Hojas manchadas, estado de senescencia.

A partir de la revisión de herbarios acerca de la distribución de otras rubiáceas pertenecientes al complejo copalchi, se eligió la localidad de Tuzantlán, municipio de Atenango del Río en el estado de Guerrero ($18^{\circ} 12' 22.35''$ N; $99^{\circ} 11' 1''$ W), sobre las laderas de un cerro a 989 m snm; el diagrama ombrotérmico de la localidad para el periodo 1971-2000 se representa en la Figura 13. Se recolectaron hojas y corteza de diferentes individuos de las especies *H. standleyana* (S. Cristians 89, 91, 94 y 96) y *E. caribaeum* (S. Cristians 88, 90, 92, 93, 95 y 97) y se prepararon muestras para su depósito en el herbario de la Facultad de Ciencias (FCME) (Cuadro 6).

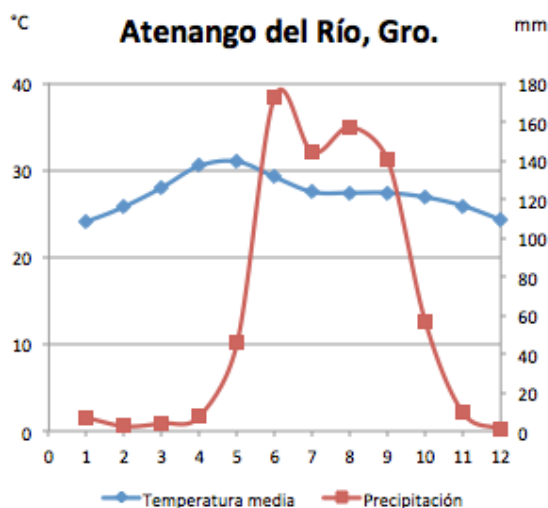


Figura 13. Diagrama ombrotérmico de Atenango del Río, Gro. Datos tomados del Servicio Meteorológico Nacional.

Cuadro 6. Colecta realizada en la localidad de “Tuzantlán” en el mes de julio de 2010 en Atenango del Río, Gro.

Fecha de colecta	Individuo	Peso seco (g)	Estado de las hojas / Características árbol	Ejemplar de herbario (FCME)
29-VII-2010	89 HS	110	Hojas en perfecto estado / Árbol con frutos	131342
29-VII-2010	91 HS	30	Hojas en perfecto estado / Árbol sin frutos	–
29-VII-2010	94 HS	83	Hojas en perfecto estado / Árbol con frutos	131350
29-VII-2010	96 HS	70	Hojas en perfecto estado / Árbol con frutos	131351
29-VII-2010	88 EC	97	Hojas en perfecto estado / Árbol en floración	131341
29-VII-2010	90 EC	82	Hojas en perfecto estado / Árbol en floración	131340
29-VII-2010	92 EC	40	Hojas en perfecto estado / Árbol en floración	131339
29-VII-2010	93 EC	91	Hojas en perfecto estado / Árbol en floración	131347, 131348
29-VII-2010	95 EC	75	Hojas en perfecto estado / Árbol en floración	131349
29-VII-2010	97 EC	83	Hojas en perfecto estado / Árbol en floración	131355

7.1.1. Validación del método analítico

Una vez concluida la recolecta del material vegetal considerando las variables fenológicas y geográficas, se validó un método cromatográfico analítico que permitiera la cuantificación de metabolitos biodinámicos selectos en las infusiones de hojas de *H. latiflora*.

La identificación de los compuestos en los cromatogramas se realizó basándose en el tiempo de retención y en los experimentos de enriquecimiento con compuestos aislados de *H. latiflora* (5, 6, 13 y 14) y un estándar comercial del compuesto 29, los cuales se inyectaron a una concentración de 1 mg/mL. La cuantificación de la serie de 4-fenilcumarinas se realizó a través de interpolar los valores de área bajo la curva ($\mu\text{V} \cdot \text{seg}$) para cada uno de los compuestos a la ecuación de la recta, construida a partir de la curva de calibración diseñada para el compuesto 13.

Por lo tanto, la concentración de los compuestos antes mencionados se describen en μg de equivalentes de 4-fenilcumarina. En el caso del compuesto **29**, se calculó interpolando los valores del área bajo la curva a una ecuación de la recta calculada a partir de la curva de calibración diseñada para dicho compuesto

Para el desarrollo del método, se evaluaron distintas condiciones cromatográficas: fase estacionaria, temperatura, composición de la fase móvil, gradiente de elución y longitud de onda, con la finalidad de registrar un perfil cromatográfico definido, en el cual se pudieran cuantificar los compuestos **13** (equivalentes de 4-fenilcumarina; $t_{\text{R}} = 3.12$) y **29** ($t_{\text{R}} = 1.43$), y así poder establecer la influencia de los factores fenológicos y geográficos sobre la concentración de los compuestos de interés farmacológico (Figura 18).

El método fue selectivo ya que, a través de su aplicación, las respuestas analíticas de los compuestos **13** y **29** no presentaron interferencia con el resto de los componentes presentes en la matriz de trabajo. La selectividad se evaluó mediante el registro de los espectros de UV de los compuestos **13** y **29** en la matriz de trabajo, los estándares a una concentración definida ($100 \mu\text{g/mL}$) y los mismos en la matriz de trabajo enriquecida ($45 \mu\text{g/mL}$ para **29** y $15 \mu\text{g/mL}$ para **13**). Ya que los espectros UV son los mismos en todos los casos y no se observan modificaciones en los máximos de absorción, se puede asegurar que la respuesta analítica observada se debe únicamente a la presencia de los compuestos **13** y **29** (Figura 14).

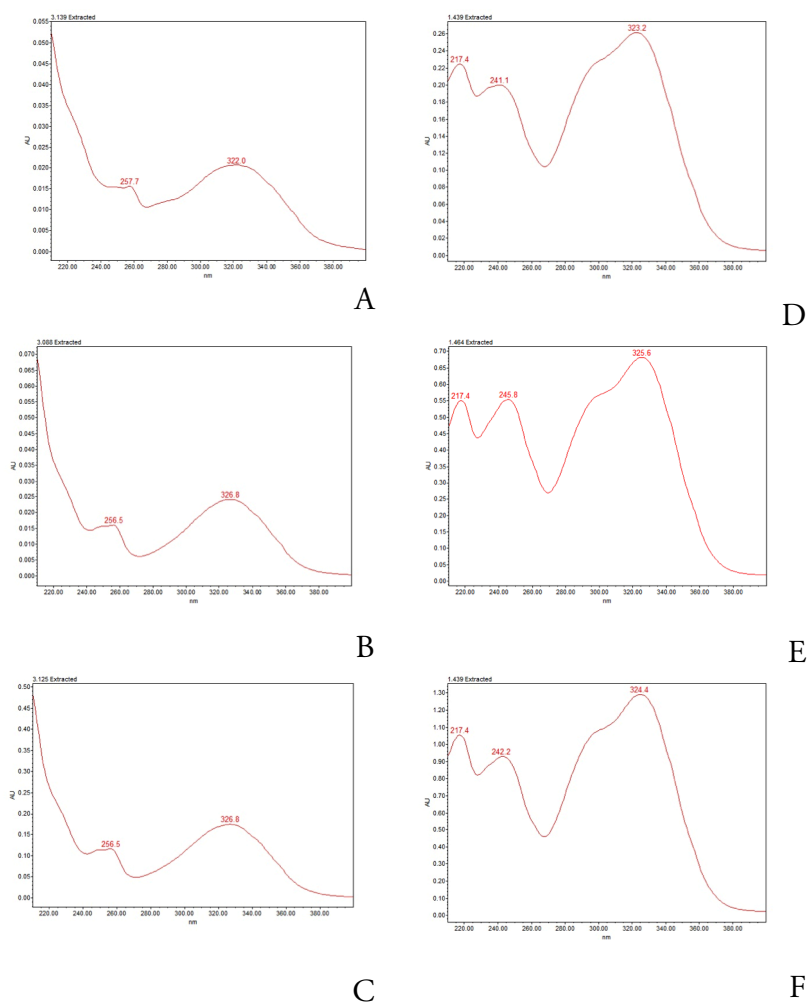


Figura 14. Espectros UV de los compuestos **13** y **24** en distintas muestras. **A.** Compuesto **13** en matriz de trabajo; **B.** Compuesto **13** a 100 µg/mL; **C.** Matriz enriquecida con el compuesto **13** (15 µg/mL); **D.** Compuesto **29** en matriz de trabajo; **E.** Compuesto **29** a 100 µg/mL; **F.** Matriz enriquecida con el compuesto **29** (45 µg/mL).

El método fue lineal, ya que las respuestas analíticas en las concentraciones analizadas son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. El intervalo de concentraciones ensayadas para el compuesto **13** fue 1–50 µg/mL con una $r^2 = 0.997$, mientras que para el compuesto **29** el rango evaluado fue 3–150 µg/mL con una $r^2 = 0.994$ (Cuadro A1, ver Anexos). Las ecuaciones de las rectas calculadas a partir de la regresión lineal fueron $y = 23788x + 1323$ para el compuesto **13**, mientras que para el compuesto **29** fue $y = 54065x - 50993$.

La exactitud se interpreta como la concordancia entre el valor de la concentración del analito en la matriz enriquecida y el valor de referencia. Los porcentajes de recobro se calcularon a partir de tres niveles de concentración, puntos control bajo, medio y alto. En todas las concentraciones evaluadas los porcentajes de recobro se encontraron entre el 98-102%, por lo que el método fue exacto para el intervalo de concentraciones ensayadas (Cuadro A2).

La precisión de un sistema o método analítico se refiere a la concordancia entre las respuestas analíticas individuales bajo las mismas condiciones de análisis en relación a varias estimaciones de una concentración conocida. La precisión se determina bajo la premisa de que la dispersión de las concentraciones calculadas no debe exceder el 2% del coeficiente de variación (CV). Los resultados obtenidos demostraron que el método fue preciso (Cuadro A3).

El LOD se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra que se puede detectar, más no cuantificar; en el caso del LOQ es la concentración mínima de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud. Para el compuesto **13** el LOD y el LOQ fueron de 0.04 µg/mL y 0.1 µg/mL, respectivamente; en el caso del compuesto **29** se calcularon los valores de 0.28 µg/mL y 0.85 µg/mL para el LOD y el LOQ. En ambos casos estos valores se encontraron por debajo del punto más bajo de los rangos evaluados.

Se evaluó la estabilidad de los compuestos **13** y **29** con respecto a los factores de tiempo y temperatura. El compuesto **13** fue estable en las condiciones evaluadas, mientras que el compuesto **29** no presentó estabilidad a temperatura ambiente (CV >2%). Este resultado indica que en todos los casos que se requiera la solución estándar de dicho compuesto, se deberá preparar en el día mismo de análisis, o bien mantener en refrigeración.

7.1.2. Influencia fenológica

Las concentraciones de ácido clorogénico (**29**) y 4-fenilcumarinas (**4**, **6**, **13** y **14**) presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) a lo largo del ciclo fenológico de *H. latiflora*. La concentración incrementó durante las etapas de pre-senescencia y senescencia. En la etapa de renovación foliar se cuantificó la mayor concentración de metabolitos de interés farmacológico, mientras que en la etapa de floración los árboles disminuyeron la concentración de los compuestos a la mitad (Cuadro A4, Figura 15).

No existe información al respecto de la influencia del ciclo fenológico y la modulación en la concentración de las 4-fenilcumarinas; sin embargo, en el caso del compuesto **29** se han realizado varios estudios al respecto que son coincidentes con los resultados descritos para las hojas de *H. latiflora* (Stamp *et al.*, 2004; Cirak *et al.*, 2007a; 2007b). El ácido clorogénico actúa como compuesto aleloquímico, protegiendo a las plantas contra insectos al interferir con su alimentación, crecimiento y supervivencia (Wen *et al.*, 2003; Stamp *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2009); con relación a dicho rol ecológico, se ha observado una mayor acumulación durante el desarrollo de la etapa vegetativa, sobre todo en hojas jóvenes, con una disminución notable en las últimas etapas de fructificación (Stamp *et al.*, 2004; Cirak *et al.*, 2007a; 2007b).

El comportamiento descrito para el ácido clorogénico también se ha descrito para otros compuestos de defensa, presentándose una mayor concentración en órganos en desarrollo que en órganos maduros (Figuereido *et al.*, 2008). Por otro lado, la disminución sustancial del compuesto **29** durante la etapa de floración es coincidente con la redistribución de fotosintatos hacia órganos reproductivos, así como la disminución en la concentración de metabolitos de defensa en ciertos tejidos vegetales durante dichas etapas reproductivas (Taiz y Zeiger, 2006; Konchar *et al.*, 2011).

Estos resultados muestran que el periodo óptimo para la cosecha de hojas de *H. latiflora* debe estar restringido a la etapa de senescencia, coincidiendo con el final de la temporada de lluvias, así como durante la etapa de renovación foliar, al inicio de la temporada de lluvias del año siguiente. Es importante puntualizar que la cosecha de hojas durante la etapa de floración debe evitarse si se quiere asegurar un contenido apropiado de compuestos activos y, por lo tanto, la eficacia farmacológica de la droga cruda.

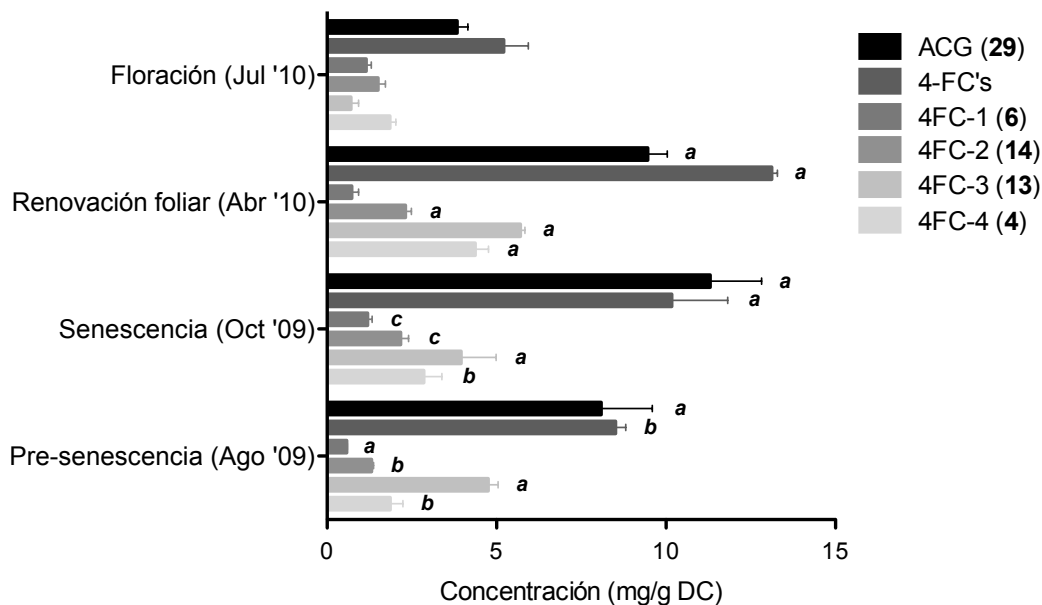


Figura 15. Concentración promedio \pm EE (mg/g CD) de los compuestos biodinámicos *Hintonia latiflora* en diferentes etapas fenológicas (^a $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una comparación múltiple de Tukey en relación a la etapa de Floración; ^b mismo tratamiento estadístico con respecto a la etapa de Renovación foliar; ^c mismo tratamiento estadístico con respecto a la etapa de Pre-senescencia).

7.1.3. Influencia geográfica

Las diferencias en la concentración de 4-fenilcumarinas entre las poblaciones de Michoacán y Chihuahua fueron significativas ($p < 0.05$). Estas dos localidades se seleccionaron con base a una serie de consideraciones sociopolíticas, por un lado el fácil acceso a las mismas sin riesgos para la integridad física. En segundo lugar, la abundancia relativa de la especie objeto de estudio. Los resultados muestran el doble de concentración de 4-fenilcumarinas en la población de Michoacán con respecto a la de Chihuahua, siendo el compuesto **6** el que mayor aporta a dicha diferencia; sin embargo, la concentración de ácido clorogénico (**29**) no se ve afectada por la diferencia geográfica (Cuadro A5, Figura 16).

En términos generales, la concentración de los compuestos biodinámicos con respecto a la variación interpoblacional parece ser un factor menos importante que la variación fenológica. Dicho resultado implica que el material vegetal puede ser recolectado indistintamente, al menos,

en estas dos poblaciones; sin embargo, el establecimiento de cultivos controlados aseguraría la calidad y abasto de drogas crudas estandarizadas. Adicionalmente, se contribuiría a la conservación de *H. latiflora*, cuyas poblaciones silvestres se encuentran amenazadas y en peligro de extinción (Martínez-Pérez *et al.*, 2012).

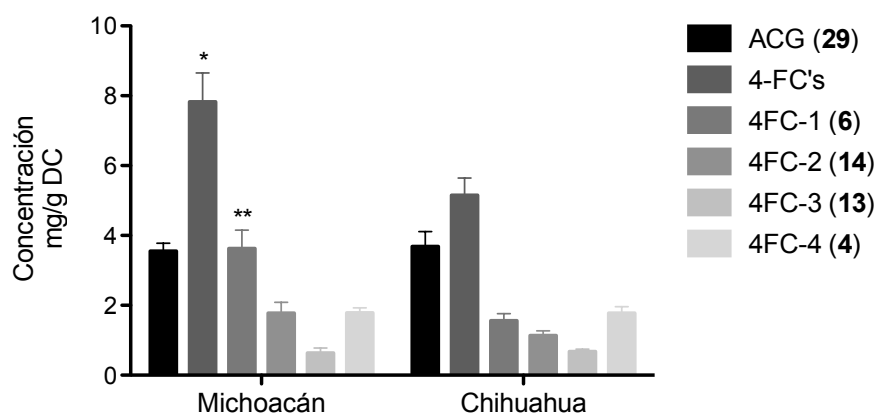


Figura 16. Concentración promedio \pm EE (mg/g DC) de los compuestos biodinámicos de *Hintonia latiflora* en las poblaciones de Michoacán y Chihuahua (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ diferencia significativa prueba de t de la comparación entre localidades).

7.2. Comparación de los perfiles cromatográficos

Los perfiles cromatográficos de las drogas crudas derivadas de las hojas y cortezas de las rubiáceas del complejo copalchi se obtuvieron basándose en el tiempo de retención y enriquecimiento con compuestos aislados de las tres especies *H. latiflora*, *H. standleyana*, y *E. caribaeum*. Al comparar las infusiones de corteza y hojas de *H. latiflora* se pudo observar una mayor complejidad en la composición química de la infusión de hojas (Figuras 17-19). El compuesto mayoritario en la infusión de corteza fue el compuesto **14**, mientras que en las hojas correspondió al compuesto **29** (Figuras 17 y 18), dicha diferencia permite identificar la naturaleza de la droga cruda utilizada para elaborar las dos infusiones.

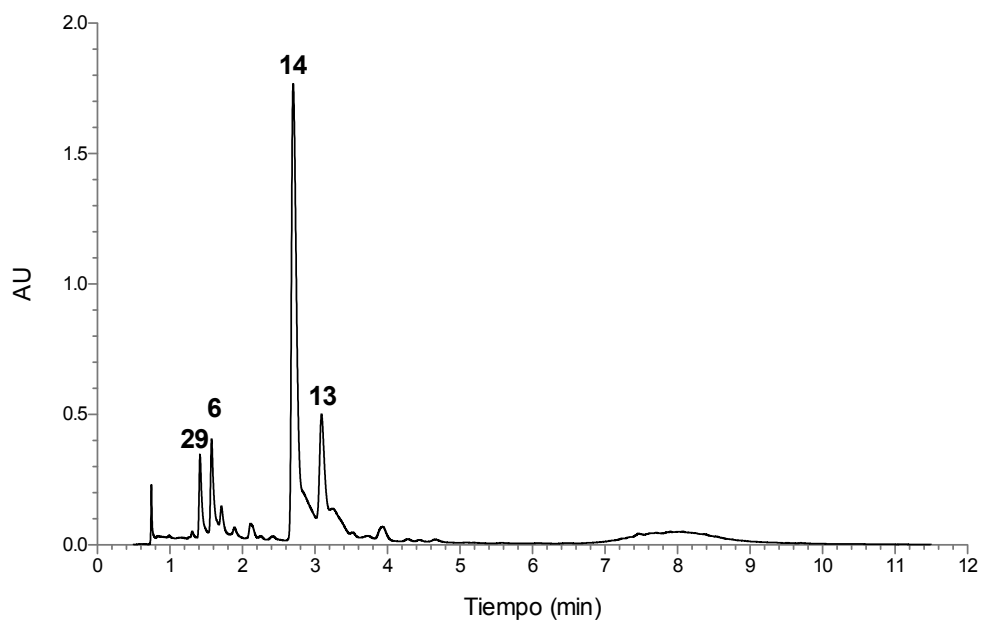


Figura 17. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de corteza de *H. latiflora*. Compuesto (R_t ; min): 29 (1.42), 6 (1.58), 14 (2.70) y 13 (3.10).

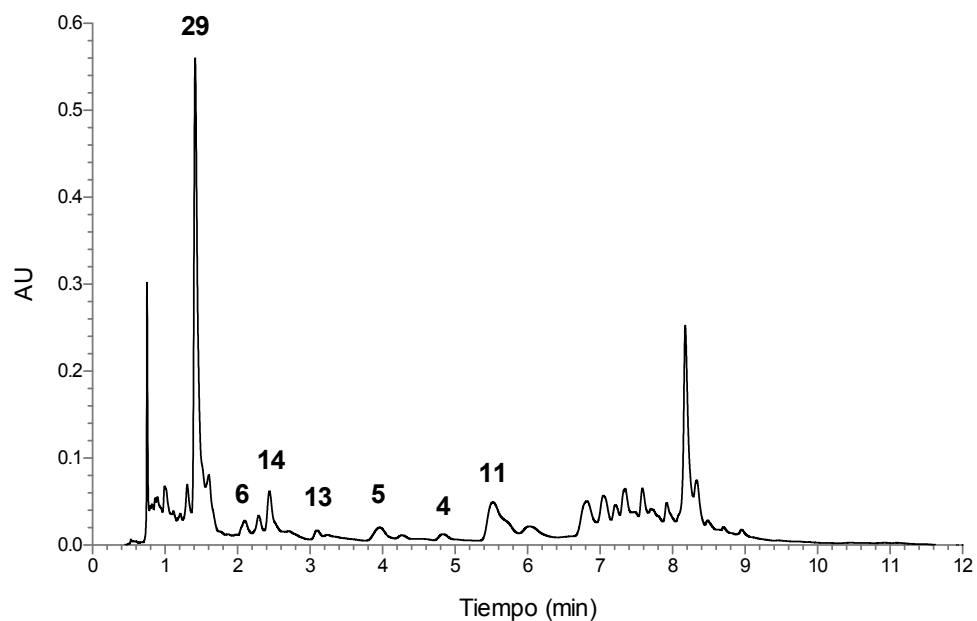


Figura 18. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de hojas de *H. latiflora*. Compuesto (R_t ; min): 29 (1.42), 6 (2.13), 14 (2.46), 13 (3.20), 5 (4.04), 4 (4.93) y 11 (5.58).

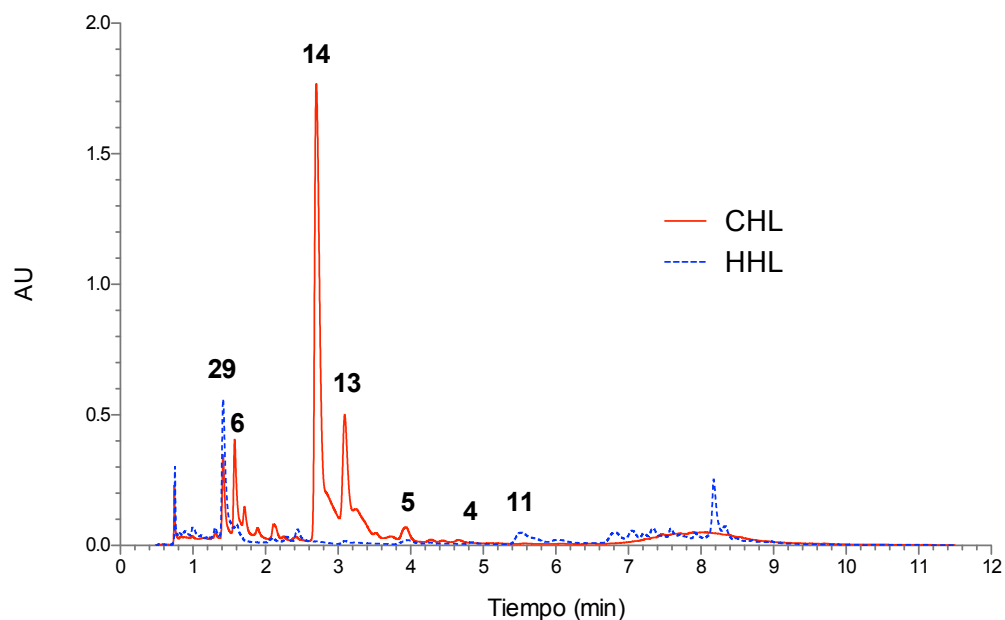


Figura 19. Perfil cromatográfico comparativo por CLUE de las infusiones de corteza y hojas de *H. latiflora*.

En el caso de las infusiones de corteza y hojas de *H. standleyana* la diferencia en la complejidad química no fue tan evidente como en *H. latiflora* (Figura 22); el compuesto mayoritario de la infusión de corteza correspondió al compuesto **13** (Figura 20); mientras que en las hojas el mayoritario es el compuesto **5** (Figura 21). En esta especie del género *Hintonia* la concentración de 4-fenilcumarinas es similar y en el caso del compuesto **29** es mucho mayor la concentración en la infusión de hojas.

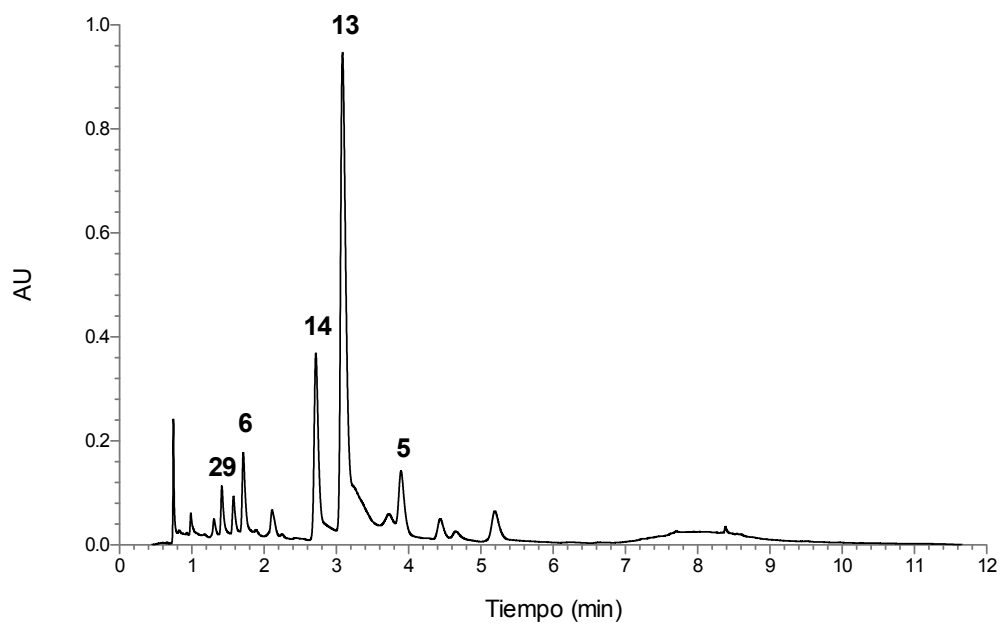


Figura 20. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de corteza de *H. standleyana*. Compuesto (R_t; min): 29 (1.42), 6 (1.72), 14 (2.72), 13 (3.09) y 5 (3.92).

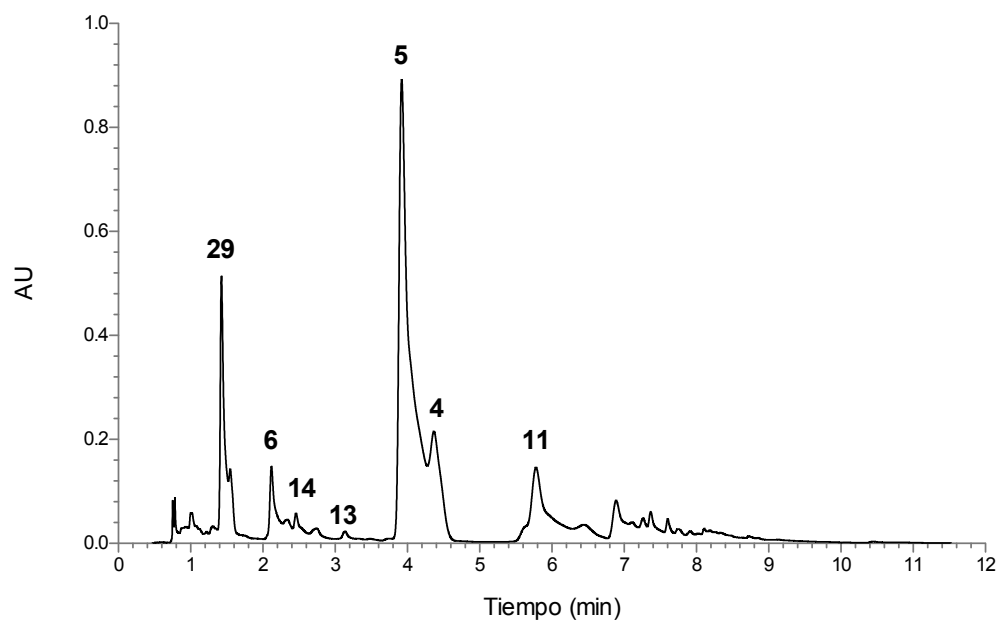


Figura 21. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de hojas de *H. standleyana*. Compuesto (R_t; min): 29 (1.43), 6 (2.13), 14 (2.48), 13 (3.26), 5 (3.93), 4 (4.39) y 11 (5.81).

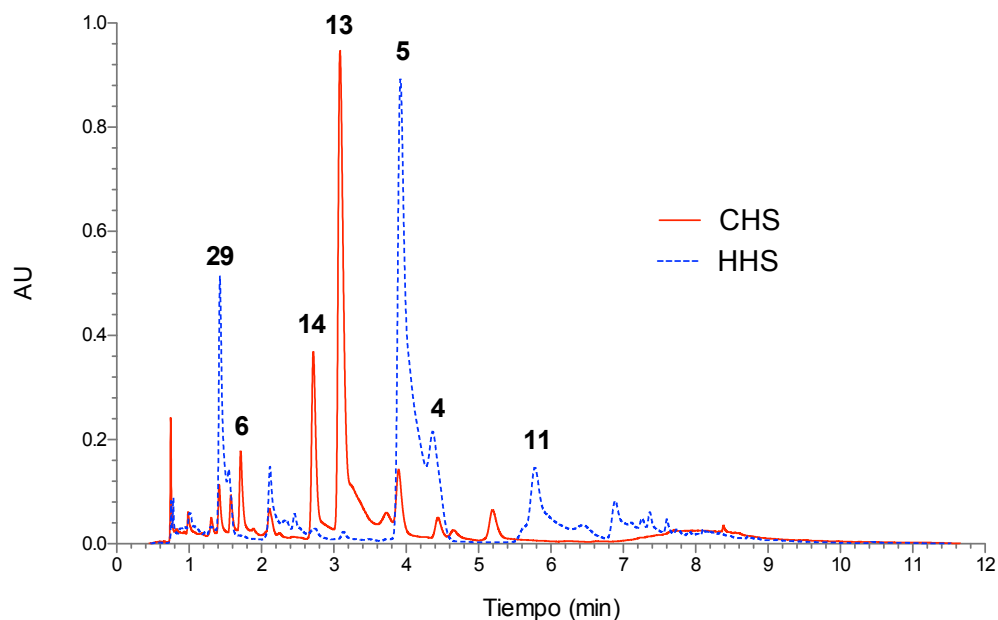


Figura 22. Perfil cromatográfico comparativo por CLUE de las infusiones de corteza y hojas de *H. standleyana*.

Al comparar los cromatogramas de las infusiones de corteza y hojas de *E. caribaeum* encontramos diferencias en la composición química que las permitió distinguir inequívocamente (Figura 25); en el caso de la infusión de la corteza el compuesto mayoritario es 5, el compuesto 18 también se encuentra en una concentración considerable (Figura 23), para el caso de las hojas, el compuesto 29 es el mayoritario (Figura 24). Cabe mencionar que la concentración de compuestos en ambas drogas crudas de *E. caribaeum*, y especialmente del compuesto 29 en la infusión de hojas fue mayor que la observada en las especies del género *Hintonia*.

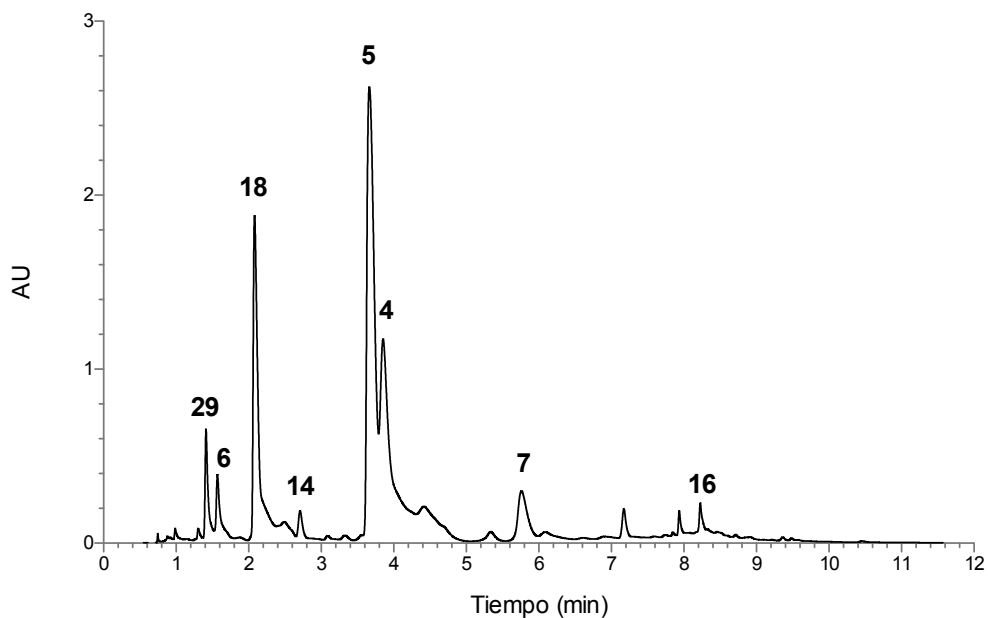


Figura 23. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de corteza de *E. caribaeum*. Compuesto (R_t ; min): 29 (1.42), 6 (1.58), 18 (2.08), 14 (2.73), 5 (3.67), 4 (3.87), 7 (5.79) y 16 (8.24).

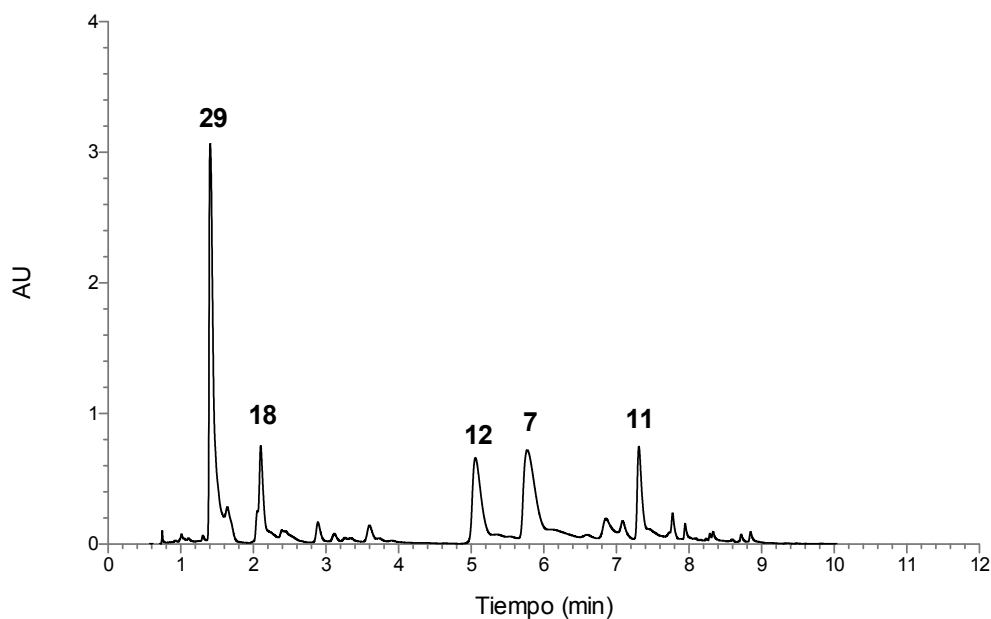


Figura 24. Perfil cromatográfico por CLUE de la infusión de hojas de *E. caribaeum*. Compuesto (R_t ; min): 29 (1.42), 18 (2.11), 12 (5.09), 7 (5.82) y 11 (7.32).

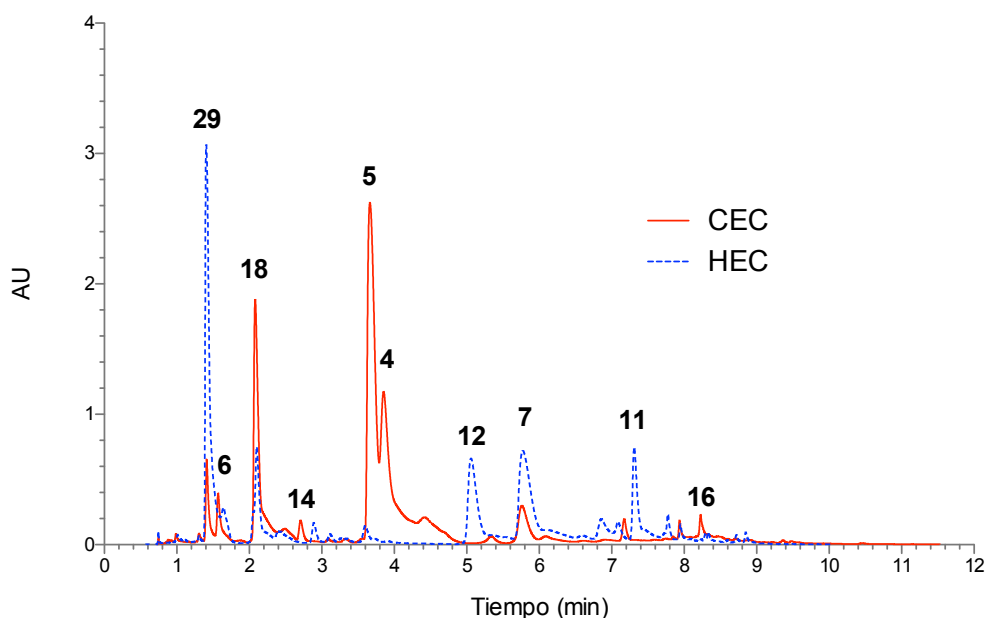


Figura 25. Perfil cromatográfico comparativo por CLUE de las infusiones de corteza y hojas de *E. caribaeum*.

En el caso de las infusiones de las cortezas, los compuestos mayoritarios de cada especie resultaron distintos; así, en *H. latiflora* se identificó al compuesto **14**, en *H. standleyana* resultó el compuesto **13** y finalmente para *E. caribaeum* fue el compuesto **5**. Asimismo, esta diferencia encontrada en la composición química puede ser usada como una evidencia adicional que apoya la separación taxonómica de *H. latiflora* y *H. standleyana* como dos especies distintas (Borhidi, 2006; Stranczinger *et al.*, 2006).

Las infusiones de las hojas de las tres rubiáceas en estudio también presentaron diferencias importantes que permiten su distinción inequívoca, en el caso de *H. standleyana*, el compuesto mayoritario fue **5**, mientras que *H. latiflora* y *E. caribaeum* presentaron como compuesto mayoritario a **29**. Sin embargo, en el caso de *E. caribaeum* no fueron detectadas 4-fenilcumarinas metoxiladas. De manera adicional, la presencia de los compuestos **7**, **12** y **18** se encontraron solamente en esta última especie.

De esta manera, la obtención de los perfiles cromatográficos permitió establecer las diferencias entre las cortezas y hojas de cada una de las rubiáceas del complejo copalchi, y por lo

tanto generar una herramienta de identidad importante para el control de calidad de estas plantas. En todos los casos, los cromatogramas analizados provienen de un preparado elaborado con una mezcla de distintos individuos, con la finalidad de presentar resultados que se asemejen a manera en la que se comercializan las plantas.

Estos resultados permitieron establecer si las muestras comerciales se sustituyen por otras especies no pertenecientes al complejo, se adulteran o bien determinar si el producto comercial es una mezcla de dos o más especies de copalchi. En este marco, se eligieron los mercados Sonora y Merced para adquirir las muestras comerciales de Copalchi; el mercado Sonora es el principal centro de acopio y mercadeo de plantas medicinales de México, mientras que el mercado Merced es uno de los centros de comercialización más importantes de la Ciudad de México. En el mercado Sonora se adquirieron dos muestras de corteza bajo el nombre de quina amarilla en los locales 199 “El Niño de la Salud”, y el local “La Señora Félix, la Tía”; en el mercado Merced se compró el material vegetal en el local 60, pasillo 19; las tres muestras se adquirieron en noviembre de 2012. El preparado comercial que se comercia en Europa bajo el nombre de Copalchi, indica en el marbete del producto: “extracto seco de corteza de **Coutarea latiflora* D.C. en glicerina vegetal. Es una de las mejores plantas para reducir el nivel de azúcar en sangre de personas con diabetes” [sic], cuya posología indica que deben tomarse de 15-20 gotas diluidas en medio vaso de agua, tres veces por día.

El análisis permitió establecer que bajo el nombre de copalchi y/o quina amarilla se comercializa, tanto en México como en el extranjero, una mezcla de las cortezas de *H. standleyana* y *E. caribaeum* (Figura 26); en ninguno de los casos, se identificaron las señales características y atribuibles a la composición química de la corteza de *H. latiflora*.

La distribución simpátrida de *H. standleyana* y *E. caribaeum* en la localidad de Tuzantlán, Gro., así como la ausencia de estas mismas especies en las localidades donde se recolectó *H. latiflora*, hace pensar que el abasto de material vegetal proviene de una misma zona, la más cercana al Distrito Federal, en la cual los acopiadores recolectan indistintamente las rubiáceas que comparten una misma área geográfica.

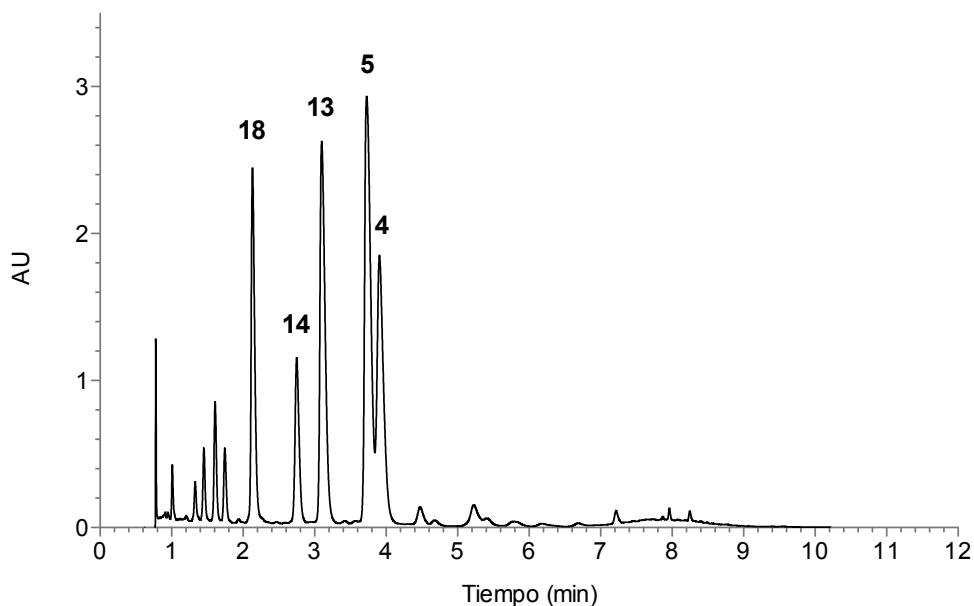


Figura 26. Perfil cromatográfico por CLUE del preparado comercializado bajo el nombre de copalchi; composición química correspondiente a una mezcla de las cortezas de *H. standleyana* (compuestos **13** y **14**) y de *E. caribaeum* (compuestos **4**, **5** y **18**).

7.3. Preparación y extracción del material vegetal

Para los ensayos biológicos se prepararon distintos extractos acuosos a partir de las infusiones de hojas y corteza molidas de *H. latiflora*, *H. standleyana* y *E. caribaeum*; se obtuvieron 2.9 g del extracto acuoso de corteza de *H. latiflora* (CHL), mientras que de sus hojas (HHL) se obtuvieron 2.7 g, en el caso de *H. standleyana* se obtuvieron para los extractos de corteza (CHS) y hojas (HHS) 2.5 y 2.1 g, respectivamente. En cuanto a los extractos acuosos de corteza (CEC) y hojas (HEC) de *E. caribaeum* se obtuvieron 2.7 y 3.2 g.

7.4. Determinación de la toxicidad preclínica aguda

La investigación de la toxicidad aguda es el primer paso en la investigación toxicológica de una sustancia desconocida. A partir del cálculo de la DL_{50} se establece, a nivel preclínico, los parámetros de seguridad de un extracto vegetal o un compuesto aislado para avalar su uso en

ensayos farmacológicos en animales, o bien establecer un punto de partida para futuros análisis clínicos, estimando el riesgo de una intoxicación aguda.

En todas las evaluaciones de los extractos acuosos de las distintas drogas crudas de las rubiáceas del complejo copalchi se calculó una $DL_{50} > 5000$ mg/kg. Los ratones sobrevivieron la primera fase del ensayo de Lorke y fueron sometidos a la segunda fase, sobreviviendo todos, inclusive a la dosis máxima de 5000 mg/kg de peso (Cuadro 7).

En cuanto a los pesos registrados, en todos los casos se mantuvo el peso inicial promedio, presentando un ligero aumento al final de los 15 días. Referente a la inspección anatómica general de los órganos vitales, no se encontró diferencia entre los tratamientos y el control, todos tenían el mismo color y tamaño, tampoco se identificaron evidencias de daño tisular.

Los resultados obtenidos demuestran que las infusiones de hojas y cortezas de las rubiáceas del complejo copalchi son inocuas ($DL_{50} > 5000$ mg/kg), siendo un aporte importante en relación a los parámetros de seguridad para las drogas crudas. Este resultado cobra un valor agregado si se lo compara con la DL_{50} de los extractos orgánicos de estas plantas, ya que en estudios previos se registraron valores menores, lo que se traduce en una mayor toxicidad y un menor margen de seguridad. En el caso de *H. latiflora* se observaron DL_{50} de 2852 y 1668 mg/kg para el extracto orgánico de corteza y hojas, respectivamente (Déciga-Campos *et al.*, 2007; Cristians *et al.*, 2009). Para *H. standleyana* y *E. caribaeum* sólo existe el resultado para los extractos orgánicos de las cortezas, teniendo una $DL_{50} > 5000$ y 700 mg/kg, respectivamente (Déciga-Campos *et al.*, 2007); en éste último caso ya se considera a la planta como tóxica.

El valor para la DL_{50} que presentan las infusiones puede estar asociado a una diferencia en la concentración de algunos compuestos que incrementan la toxicidad de los extractos orgánicos; por otro lado, en la medicina tradicional se utilizan las cortezas del complejo copalchi en forma de infusiones y/o decocciones, con lo que se explica el uso ancestral de estas plantas sin la presencia de eventos adversos. El reporte de Roca (2003) está ligado al uso de un fitofármaco del cual no se puede asegurar el origen del material vegetal, ni el proceso por el cual se elaboró el mismo; un preparado fitoterapéutico a partir de cualquiera de las drogas crudas del complejo copalchi debe formularse considerando tanto la seguridad y calidad del material vegetal, ya que éstos son los pilares sobre los que se consolida su eficacia.

Cuadro 7. Relación dosis–muerte en ratones ICR y DL₅₀ de los extractos acuosos de las rubiáceas pertenecientes al complejo copalchi

	Extracto acuoso de corteza de <i>H. latiflora</i> (CHL)		
Dosis de la segunda fase	1600 mg/kg	2900 mg/kg	5000 mg/kg
No. de muertes	0/3	0/3	0/3
DL ₅₀	> 5000 mg/kg		
	Extracto acuoso de hojas de <i>H. latiflora</i> (HHL)		
Dosis de la segunda fase	1600 mg/kg	2900 mg/kg	5000 mg/kg
No. de muertes	0/3	0/3	0/3
DL ₅₀	> 5000 mg/kg		
	Extracto acuosos de corteza de <i>H. standleyana</i> (CHS)		
Dosis de la segunda fase	1600 mg/kg	2900 mg/kg	5000 mg/kg
No. de muertes	0/3	0/3	0/3
DL ₅₀	> 5000 mg/kg		
	Extracto acuoso de hojas de <i>H. standleyana</i> (HHS)		
Dosis de la segunda fase	1600 mg/kg	2900 mg/kg	5000 mg/kg
No. de muertes	0/3	0/3	0/3
DL ₅₀	> 5000 mg/kg		
	Extracto acuoso de corteza de <i>E. caribaeum</i> (CEC)		
Dosis de la segunda fase	1600 mg/kg	2900 mg/kg	5000 mg/kg
No. de muertes	0/3	0/3	0/3
DL ₅₀	> 5000 mg/kg		
	Extracto acuoso de hojas de <i>E. caribaeum</i> (HEC)		
Dosis de la segunda fase	1600 mg/kg	2900 mg/kg	5000 mg/kg
No. de muertes	0/3	0/3	0/3
DL ₅₀	> 5000 mg/kg		

7.5. Evaluación de la actividad antidiabética

7.5.1. Ensayo hipoglucemiante agudo

El extracto acuoso de corteza de *H. latiflora* (CHL) mostró efecto hipoglucemiante agudo en los ratones normoglucémicos a todas las dosis evaluadas; para el caso de las dosis de 300 y 500 mg/kg, el efecto se presentó a partir de las 3 horas y se mantuvo a lo largo del experimento, mostrando la mayor actividad en la dosis de 500 mg/kg, a las 7 horas posteriores a la administración del tratamiento (-62.09 %) (Cuadro A6, Figuras 27 y S1, ver Anexos). En el caso de los animales diabéticos la actividad sólo se observó en las dosis de 300 y 500 mg/kg, presentando la mayor actividad a la dosis de 300 mg/kg, a las 9 horas posteriores a la administración del tratamiento (-36.2 %) (Cuadro A7, Figuras 28 y S2).

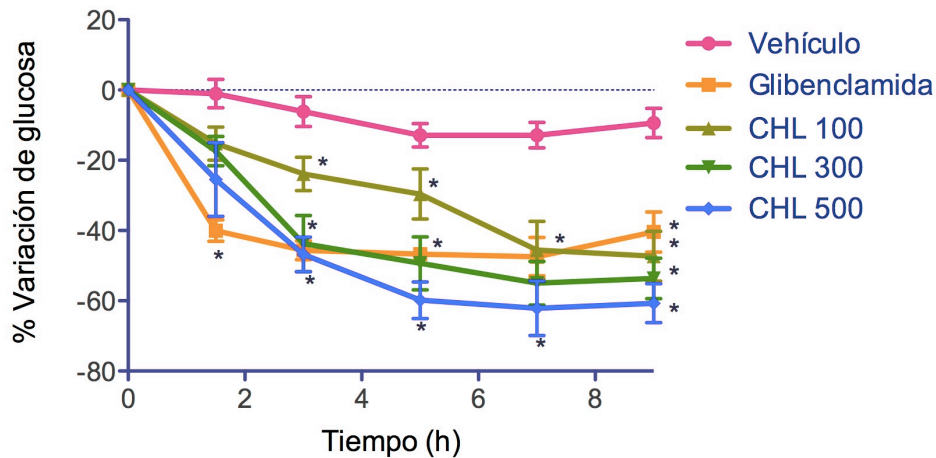


Figura 27. Efecto agudo de CHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

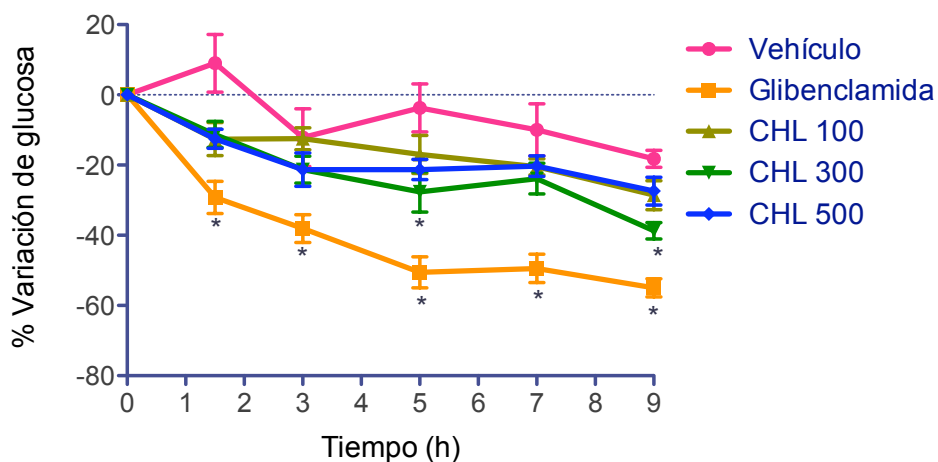


Figura 28. Efecto agudo de CHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

El extracto acuoso de hojas de *H. latiflora* (HHL) no mostró actividad hipoglucemiante aguda en los ratones normoglucémicos (Cuadro A8, Figuras 29 y S3). En el caso de los animales diabéticos, se observó un efecto significativo en todas las dosis ensayadas; el efecto se presentó a partir de las 3 horas y se mantuvo a lo largo del experimento en todos los casos. No hubo diferencia significativa entre las dosis evaluadas, presentando en todo momento un efecto similar al control positivo, glibenclamida (Cuadro A9, Figuras 30 y S4).

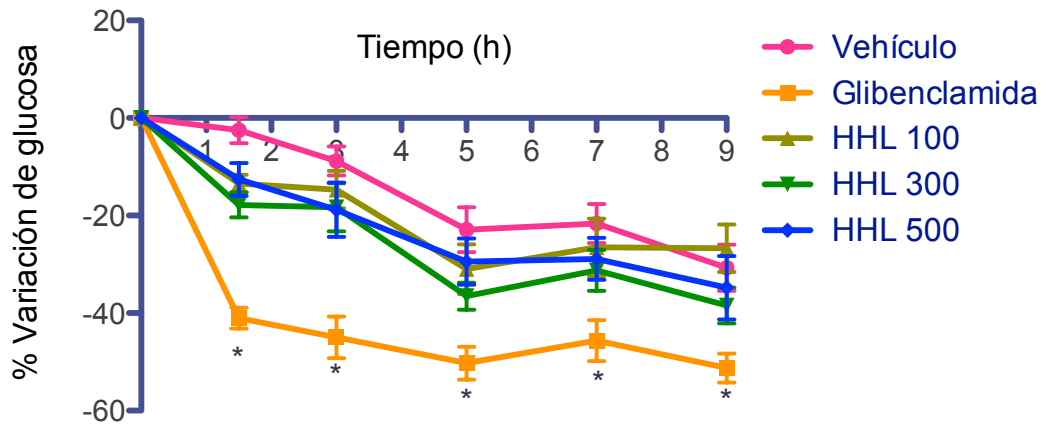


Figura 29. Efecto agudo de HHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

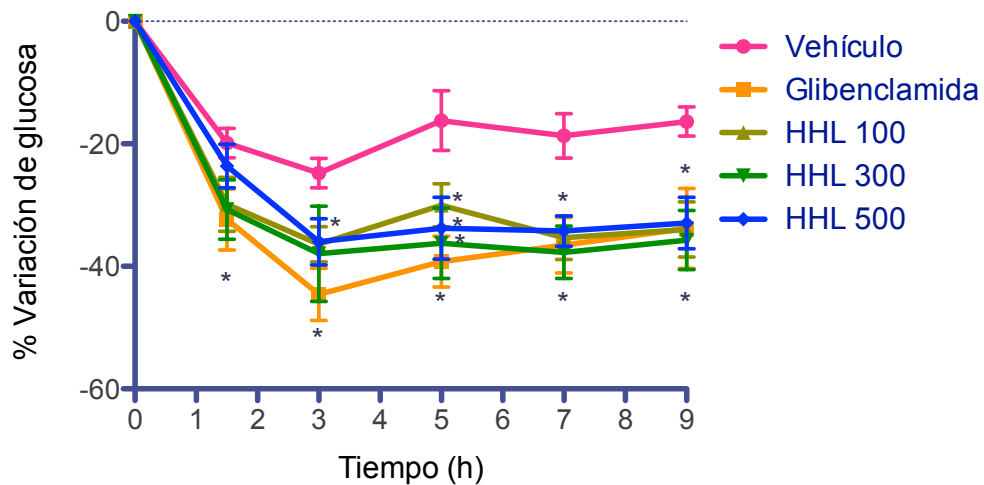


Figura 30. Efecto agudo de HHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

El extracto acuoso de corteza de *H. standleyana* (CHS) presentó un efecto hipoglucemiante agudo significativo en ratones normoglucémicos a la dosis de 500 mg/kg. El efecto se presentó a partir de las 5 horas y se mantuvo a lo largo del experimento; la mayor actividad se presentó a las 9 horas posteriores a la administración del tratamiento (-39.65 %) (Cuadro A10, Figuras 31 y S5). En el caso de los ratones diabéticos, se registró actividad hipoglucemiante a las dosis de 100 y 500 mg/kg; sin embargo, dichos efectos no fueron sostenidos ya que a la dosis de 100 mg/kg sólo fue significativo a las 1.5 horas, mientras que a la dosis de 500 mg/kg, sólo mostro efecto a las 3 horas posteriores a la administración del tratamiento (Cuadro A11, Figuras 32 y S6).

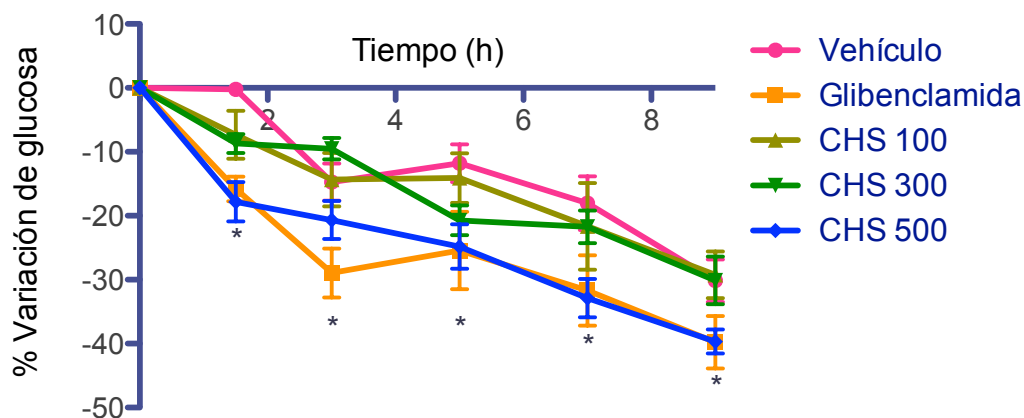


Figura 31. Efecto agudo de CHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

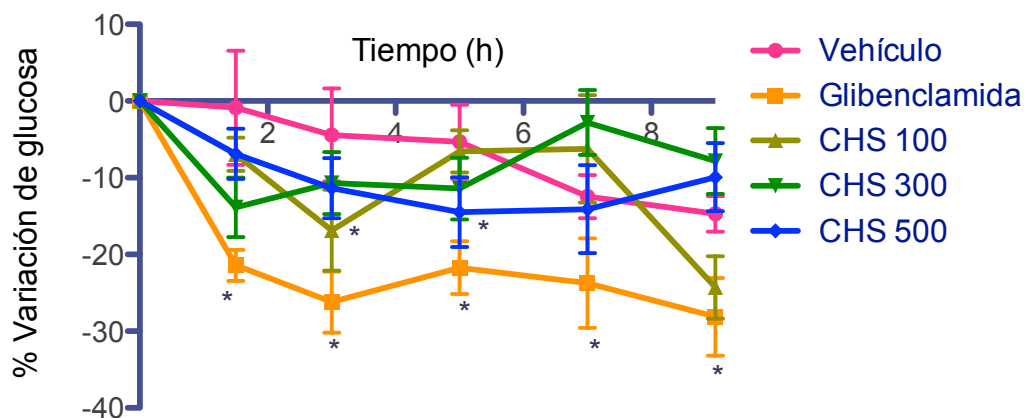


Figura 32. Efecto agudo de CHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

El extracto acuoso de las hojas de *H. standleyana* (HHS) mostró actividad hipoglucemiante significativa a la dosis de 500 mg/kg en ratones normoglucémicos; sin embargo, dicha actividad sólo se registró a las 1.5 y 9 horas posteriores a la administración, por lo que a nivel global no se puede considerar una actividad hipoglucemiante sostenida (Cuadro A12, Figuras 33 y S7). En el caso de los animales diabéticos, tampoco se presentó actividad hipoglucemiante sostenida, ya que el único registro significativo se presentó a la dosis de 500 mg/kg a las 3 horas posteriores a la administración del tratamiento (Cuadro A13, Figuras 34 y S8).

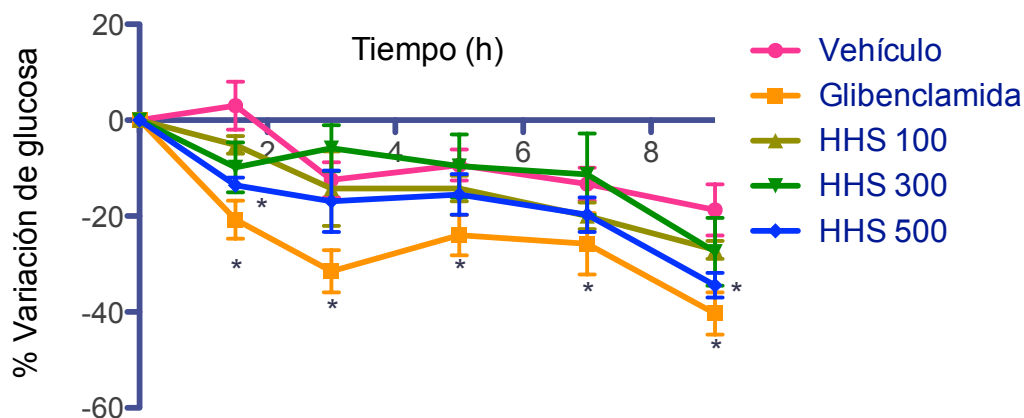


Figura 33. Efecto agudo de HHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

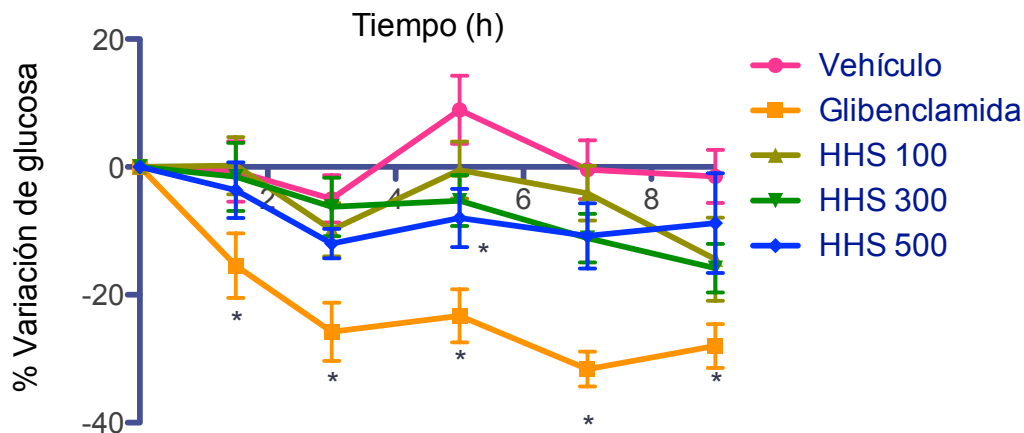


Figura 34. Efecto agudo de HHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

El extracto acuoso de la corteza de *E. caribaeum* (CEC) no mostró efecto en ratones normoglucémicos (Cuadro A14, Figuras 35 y S9). En el caso de los animales diabéticos, se observó actividad hipoglucemiante significativa a la dosis de 500 mg/kg, dicho efecto se presentó a partir de la hora 1.5 y se mantuvo a lo largo de todo el experimento, presentando la mayor acción a las 9 horas posteriores a la administración del tratamiento (-41.4 %), siendo inclusive mejor que el efecto mostrado por la glibenclamida (Cuadro A15, Figuras 36 y S10).

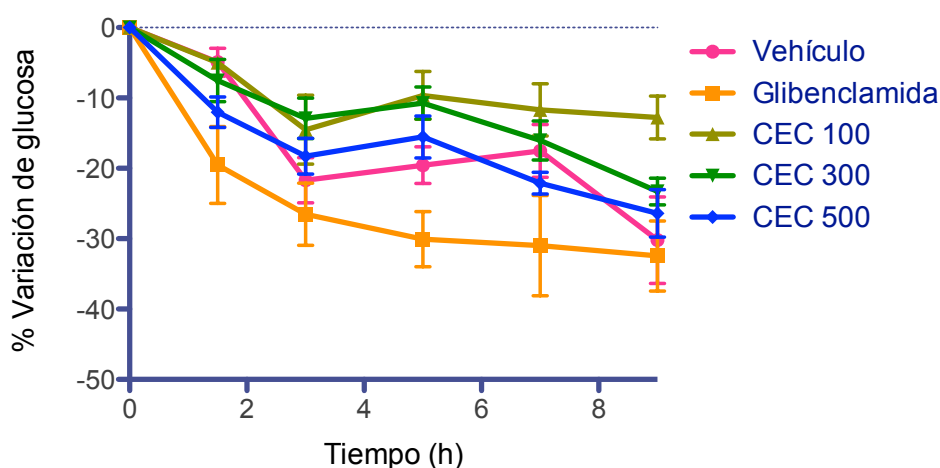


Figura 35. Efecto agudo de CEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

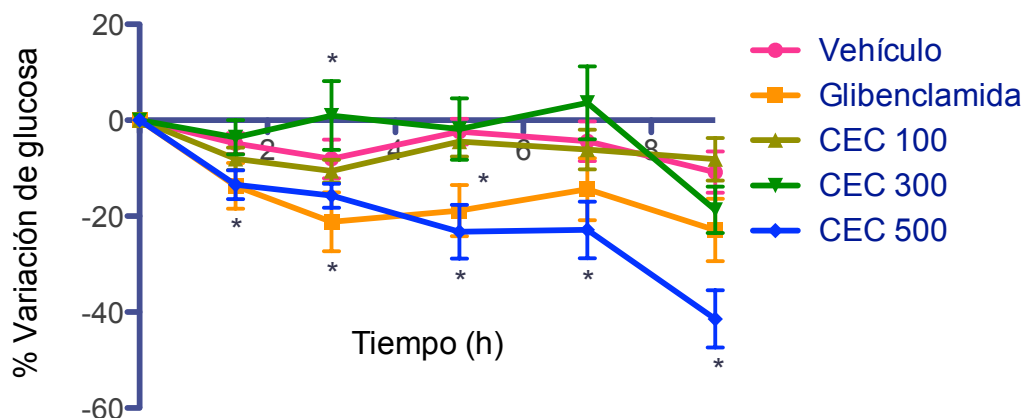


Figura 36. Efecto agudo de CEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

El extracto acuoso de las hojas de *E. caribaeum* (HEC) no mostró efecto en ratones normoglucémicos en ninguna de las dosis evaluadas (Cuadro A16; Figuras 37 y S11). En el caso de los animales diabéticos, se observó actividad hipoglucemiante significativa a la dosis de 500 mg/kg, dicho efecto se presentó a partir del tiempo 1.5 horas y se mantuvo a lo largo de todo el experimento, presentando la mayor acción a las 9 horas posteriores a la administración del tratamiento (-52.41 %), en este caso el efecto observado fue mejor que el mostrado por la glibenclamida (Cuadro A17, Figuras 38 y S12).

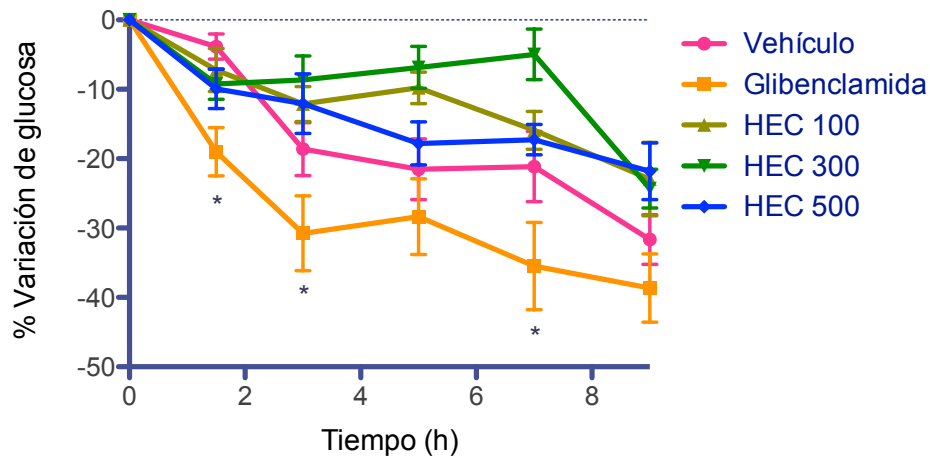


Figura 37. Efecto agudo de HEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

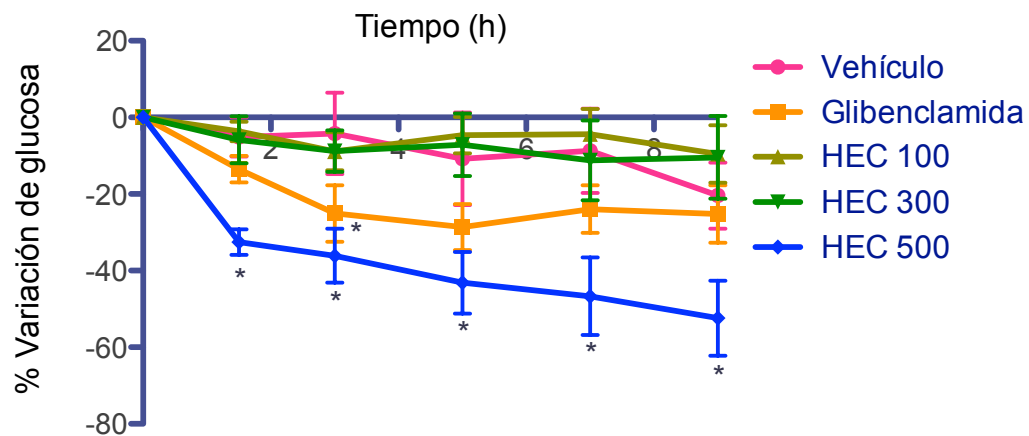


Figura 38. Efecto agudo de HEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

El ensayo hipoglucemiante agudo permite analizar si los tratamientos administrados presentan actividad antidiabética a nivel sistémico; principalmente, ejerciendo una actividad secretagoga, favoreciendo la liberación de insulina de las células β pancreáticas remanentes. De los diferentes extractos acuosos evaluados HHL presentó el mejor efecto tanto en animales normoglucémicos (Cuadro A8, Figuras 29 y S3) como en diabéticos, en estos últimos la actividad hipoglucemiante fue significativa en todas las dosis evaluadas y mostró una actividad similar a la de la glibenclamida (Cuadro A9, Figura 30 y S4s). Los otros tratamientos que presentaron una actividad comparable con el control positivo en animales diabéticos fueron CEC y HEC (Cuadro A15 y A17, Figuras 36 y 38, S10 y S12, respectivamente); en el caso de HEC la actividad descrita fue mejor que la de la glibenclamida.

La comparación de la composición química de HHL y HEC muestra que en ambas infusiones el compuesto mayoritario es **29**; sin embargo, de la diversidad de 4-fenilcumarinas solamente comparten el compuesto **11** (Figuras 18 y 24). Este resultado podría sugerir que el ácido clorogénico (**29**), como compuesto mayoritario, juega un papel determinante en la actividad biológica de estas drogas crudas; sin embargo, no se descarta que la interacción con las 4-fenilcumarinas u otros compuestos que no se detectaron pudieran estar modulando el efecto hipoglucemiante agudo.

7.5.2. Curva de tolerancia a la sacarosa oral

El extracto acuoso de la corteza de *H. latiflora* (CHL) no presentó efecto en ratones normoglucémicos en ninguna de las dosis evaluadas (Cuadro A18, Figura 39). En el caso de los animales diabéticos, se observó actividad antihiperoglucemiante significativa en todos los tratamientos. Se inhibió el pico postprandial en una relación dosis dependiente; a la dosis de 500 mg/kg se obtuvo un efecto similar al de la acarbosa (16.18%) (Cuadro A19, Figura 40).

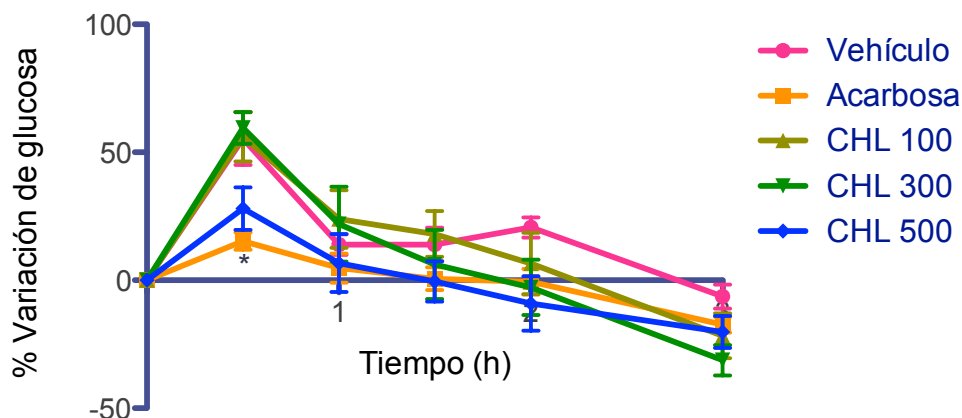


Figura 39. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; CHL (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVVA, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

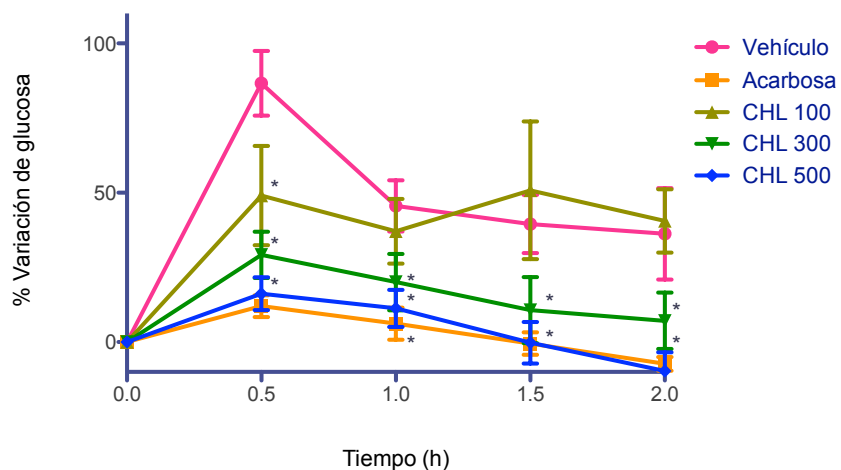


Figura 40. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; CHL (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVVA, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

El extracto acuoso de las hojas de *H. latiflora* (HHL) no presentó efecto en ratones normoglucémicos en ninguna de las dosis evaluadas (Cuadro A20, Figura 41). En el caso de los animales diabéticos, sólo se observó actividad antihiper glucemiante significativa a la dosis de 500 mg/kg; sin embargo, el pico postprandial fue similar al del control positivo (23.83 %) (Cuadro A21, Figura 42).

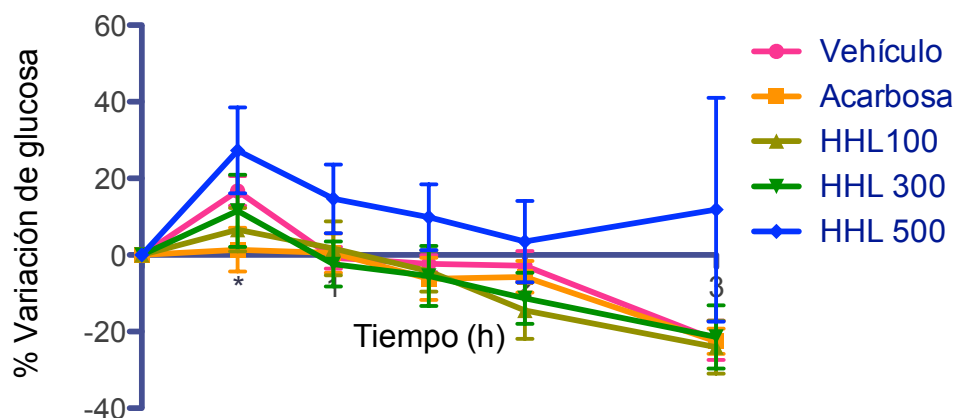


Figura 41. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; HHL (100, 300 y 500 mg/kg) Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

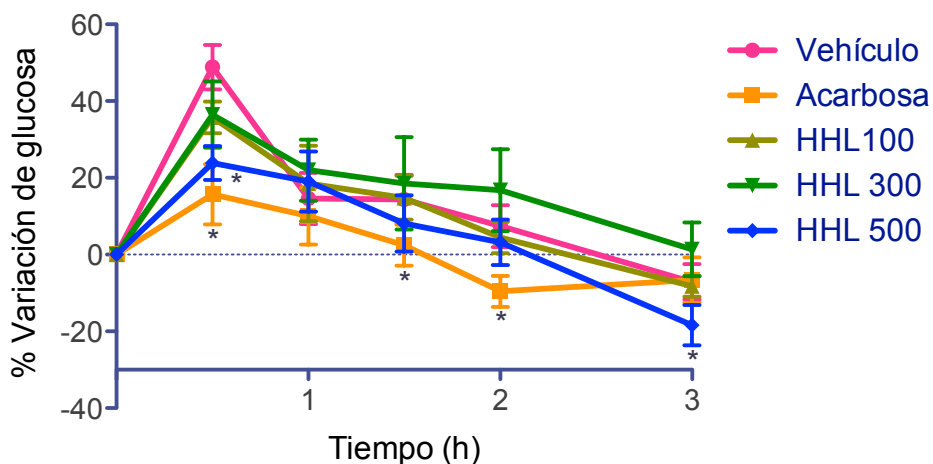


Figura 42. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; HHL (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

El extracto acuoso de la corteza de *H. standleyana* (CHS) presentó efecto antihiperoglucemiante significativo en todas las dosis evaluadas en ratones normoglucémicos, siendo la dosis de 500 mg/kg la que presentó el menor pico postprandial (6.07 %) (Cuadro A22, Figura 43). En el caso de los animales diabéticos sólo se observó actividad farmacológica significativa a la dosis de 500 mg/kg; de igual manera que para HHL, la inhibición del pico postprandial fue idéntica a la observada para el control positivo (28.25 %) (Cuadro A23, Figura 44).

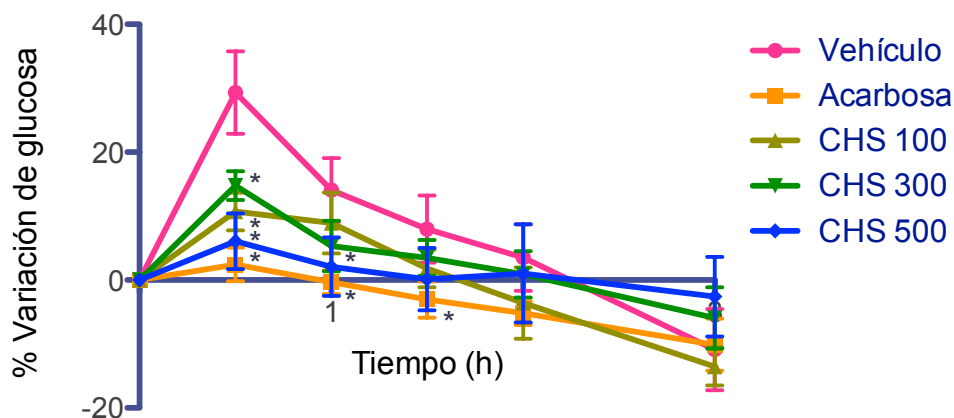


Figura 43. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; CHS (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

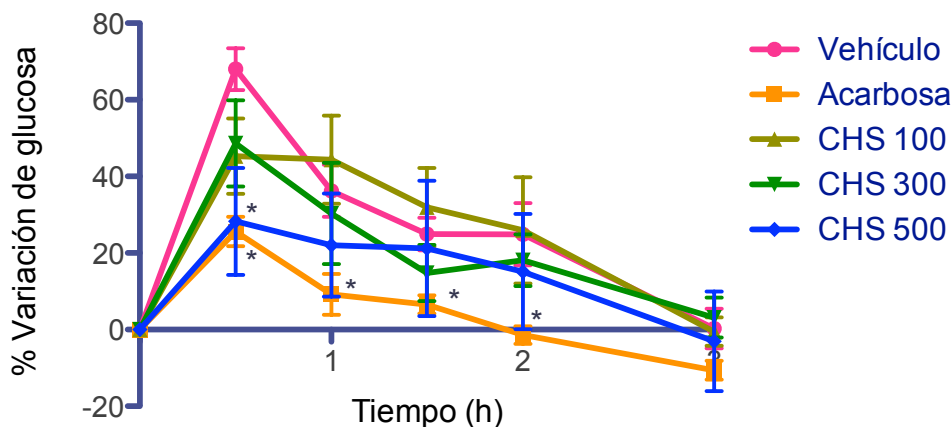


Figura 44. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; CHS (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

El extracto acuoso de las hojas de *H. standleyana* (HHS) no presentó efecto en los animales normoglucémicos a ninguna de las dosis evaluadas (Cuadro A24, Figura 45). En el caso de los animales diabéticos la actividad antihiper glucémica fue significativa en todos los tratamientos, pero sólo la dosis de 300 mg/kg presentó actividad similar a la acarbosa (54.55%), la cual se mantuvo a todo lo largo del experimento (Cuadro A25, Figura 46).

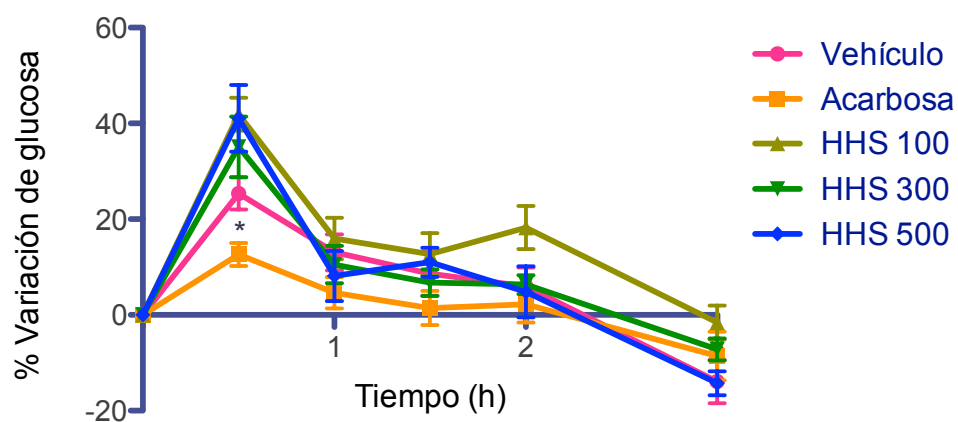


Figura 45. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; HHS (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

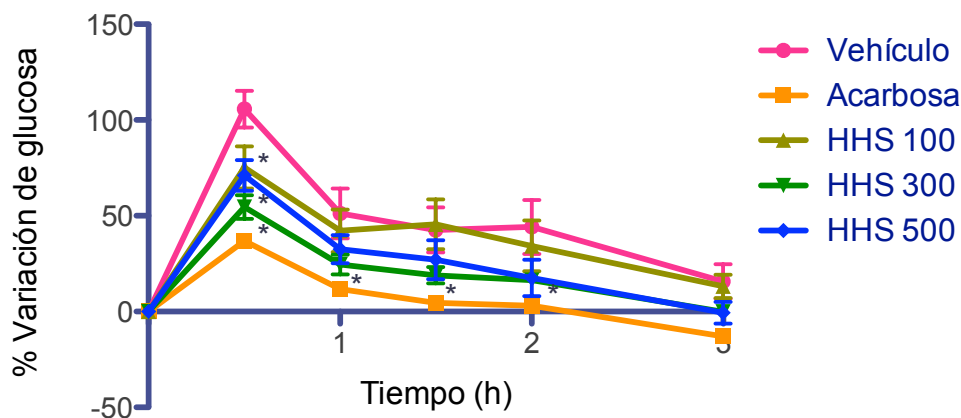


Figura 46. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; HHS (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

El extracto acuoso de corteza de *E. caribaeum* (CEC) presentó actividad antihiper glucémica significativa en animales normoglu cémicos a todas las dosis evaluadas, en todos los casos fue similar a al pico postprandial producto de la administración de acarbosa, e inclusive, a la dosis de 500 mg/kg la actividad fue mejor que la del control positivo (2.6 %) (Cuadro A26, Figura 47). En animales diabéticos el efecto se reprodujo, pero en menor intensidad, presentando actividad antihiper glucemiante significativa a todas las dosis evaluadas, similar a la acarbosa, el mejor efecto se registró a la dosis de 100 mg/kg (19.08%) (Cuadro A27, Figura 47).

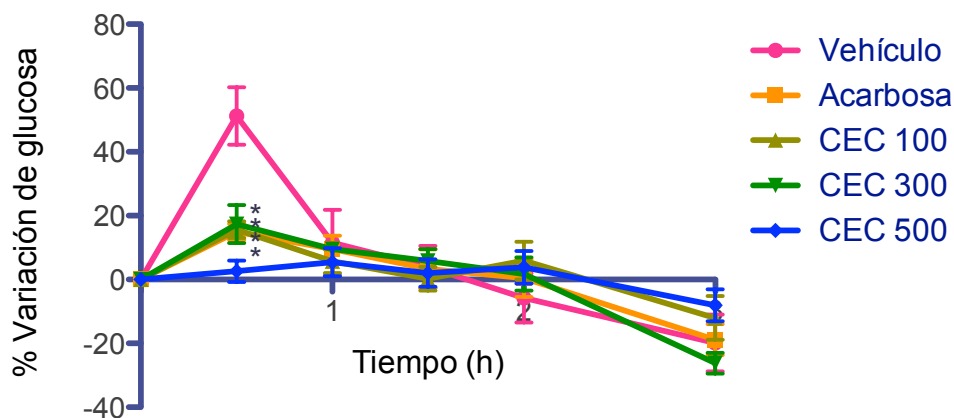


Figura 47. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; CEC (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

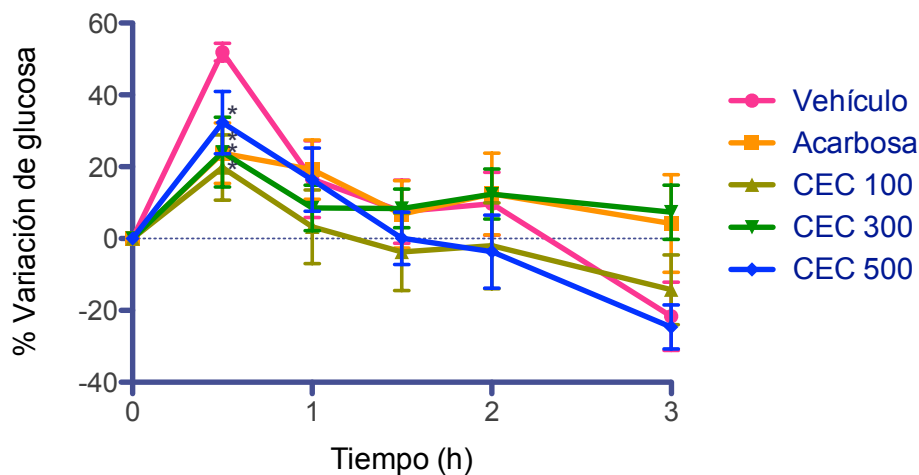


Figura 48. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; CEC (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

En el caso del extracto acuoso de hojas de *E. caribaeum* (HEC) no se presentó actividad antihiperoglucemiante a ninguna de las dosis evaluadas en animales normoglucémicos, ni en animales diabéticos; sin embargo en ambos casos el control positivo, acarbosa, tuvo el efecto esperado al inhibir los picos postprandiales (Cuadros A28 y A29, Figuras 49 y 50).

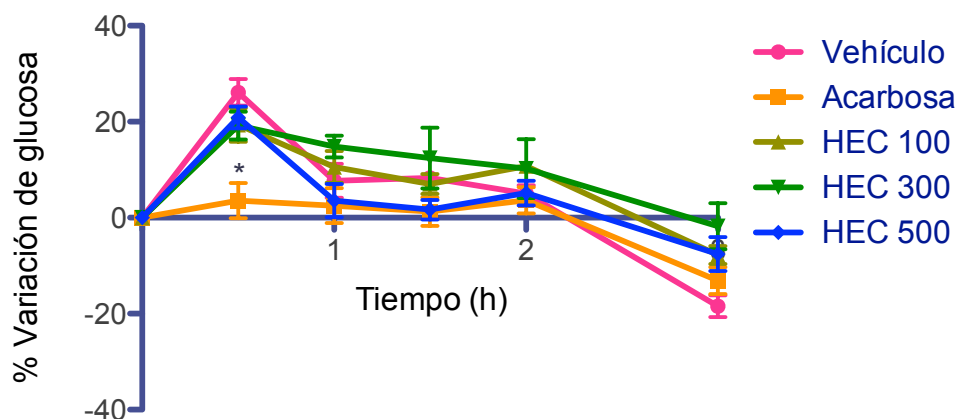


Figura 49. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; HEC (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

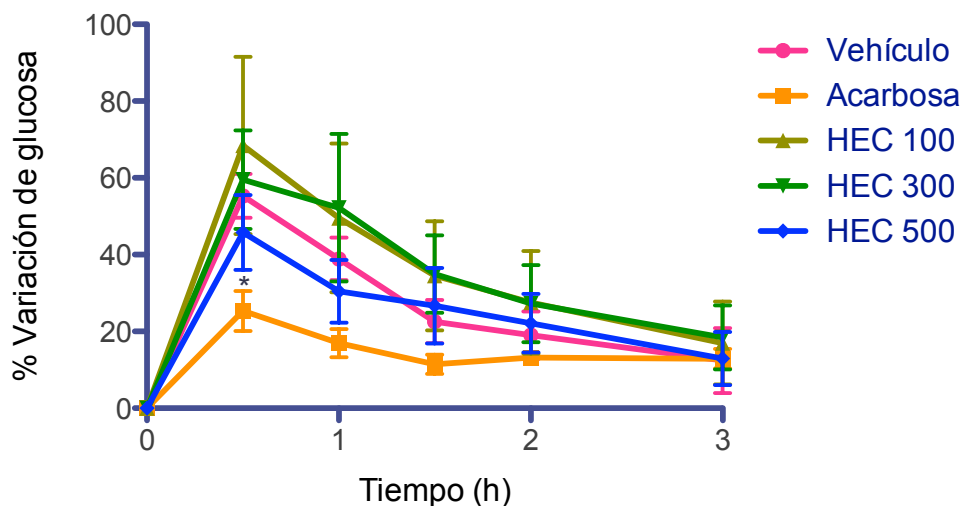


Figura 50. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; HEC (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

La curva de tolerancia a la sacarosa oral permite analizar si los tratamientos administrados presentan eficacia antidiabética relacionada con la inhibición de la absorción intestinal de carbohidratos, en específico se enfoca en la actividad enzimática de las α -glucosidasas; así, la disminución del pico postprandial se traduce como una inhibición de la actividad de dichas enzimas. De los diferentes extractos acuosos evaluados CEC tuvo el mejor efecto, al presentar actividad significativa a todas las dosis evaluadas, tanto en animales normoglucémicos como diabéticos, la inhibición del pico postprandial fue inclusive mejor que la acarbosa (Cuadros A26 y A27, Figuras 47 y 48). En el caso de HHS, también presentó inhibición del pico postprandial a las dosis evaluadas en animales diabéticos, la actividad antihiperglucemiante fue similar a la de la acarbosa en todos los casos (Cuadro A25, Figura 46). Finalmente, los tratamientos con CHL, HHL y CHS también presentaron actividad significativa en animales diabéticos a la dosis de 500 mg/kg, siendo en todos los casos similar a la de la acarbosa (Cuadros A19, A21 y A23, Figuras 42, 44 y 46).

La comparación de la composición química de los extractos que presentaron actividad (CHL, HHL, CHS, HHS y CEC) muestra que los compuestos mayoritarios son 4-fenilcumarinas, excepto en HHL, cuyo compuesto mayoritario es el ácido clorogénico (**29**; Figura 18). En el caso de CHL, la 4-fenilcumarina mayoritaria es **14** (Figura 17), mientras que en CHS es el compuesto **13** (Figura 20). Finalmente en HHS y CEC la fenilcumarina **5** es la más abundante (Figuras 21 y 23, respectivamente). Los compuestos **5**, **13** y **14** tienen en común la misma aglicona (**34**) (Figura 5). Cabe mencionar que HHL también presenta compuestos con dicha aglicona; presentando actividad en animales diabéticos a la dosis más alta evaluada. Por último, en el caso de HEC, la falta de actividad antihiper glucemiante coincide con la ausencia de 4-fenilcumarinas con grupos metoxilo en su aglicona, lo que podría estar indicando la importancia de dicho patrón de sustitución en la disminución del pico postprandial, como consecuencia de la inhibición selectiva de las α -glucosidasas.

7.5.3. Curva de tolerancia a la glucosa oral

El extracto acuoso de las hojas de *H. latiflora* (HHL) presentó una inhibición del pico postprandial a todas las dosis evaluadas en ratones normoglucémicos, siendo la dosis de 100 mg/kg la más activa a los 30 minutos posteriores a su administración, presentando un porcentaje de variación de glucosa menor que el control positivo (1.87%). Los tratamientos restantes presentaron un efecto similar a la de la glibenclamida; sin embargo, se puede observar que sólo el control positivo mantuvo un efecto durante todo el transcurso del experimento (Cuadro A30, Figura 51). En el caso de los animales diabéticos, se observó el mismo comportamiento descrito para los animales normoglucémicos. Todas las dosis evaluadas tuvieron un efecto antihiper glucemiante significativo, similar al de la glibenclamida; la dosis de 100 mg/kg fue la más activa a los 30 minutos (Cuadro A31, Figura 52).

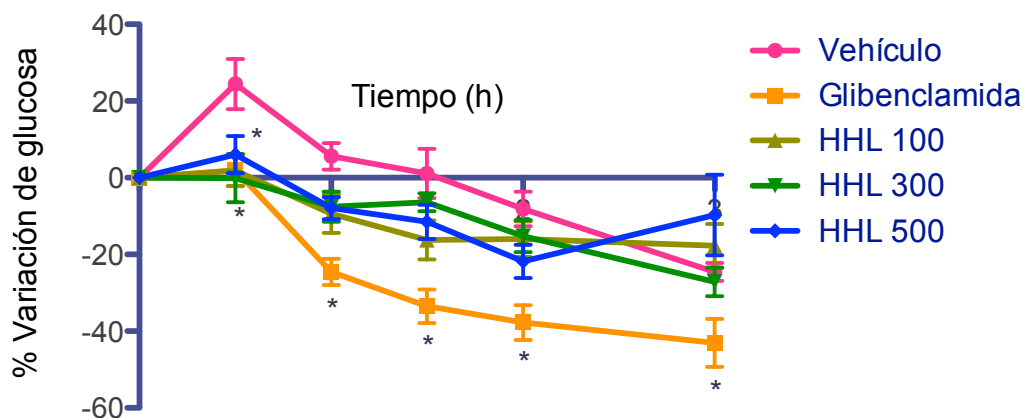


Figura 51. Curva de tolerancia a la glucosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; HHL (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

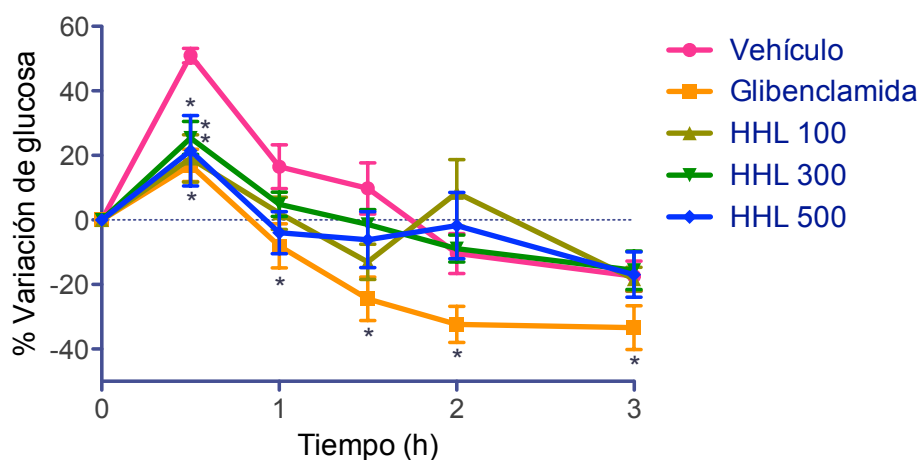


Figura 52. Curva de tolerancia a la glucosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; HHL (100, 300 y 500 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Sólo se evaluó HHL debido a que presentó la mejor actividad en el ensayo hipoglucemiante agudo, siendo la curva de tolerancia a la glucosa oral una prueba complementaria que permite analizar si el mecanismo de acción antidiabético, además de involucrar un mecanismo

secretagogo, está relacionado con un aumento del transporte de glucosa o una sensibilización de los tejidos a la acción de la insulina. Cabe resaltar que el mejor efecto se obtuvo a la menor dosis evaluada (100 mg/kg); sin embargo, esta fue similar a las otras concentraciones y a la glibenclamida; en ningún caso el efecto se mantuvo a lo largo del experimento, como en el caso del control positivo (Cuadros A30 y A31, Figuras 51 y 52).

7.5.4. Inhibición de α -glucosidasas *in vitro*

Se evaluó una diversidad de compuestos presentes en las rubiáceas del complejo copalchi, con la finalidad de determinar su efecto contra las enzimas α -glucosidasa, ya que todos los extractos evaluados, a excepción de HEC, presentaron inhibición del pico postprandial al menos en una de las dosis evaluadas en animales diabéticos y que dicha actividad farmacológica está directamente relacionada a la inhibición de α -glucosidasas. Para determinar este efecto se aplicó el método espectrofotométrico desarrollado por Oki y colaboradores (1999). Mediante este método se pudo calcular la concentración media que inhibe la actividad enzimática de una α -glucosidasa de levadura.

Los compuestos **34** y **35** son las agliconas más comunes de las 4-fenilcumarinas glicosiladas aisladas de las distintas rubiáceas del complejo copalchi (Figura 5), y productos de la hidrólisis gastrointestinal de las 4-fenilcumarinas, por lo que es de interés su evaluación en ensayos antidiabéticos *in vivo* e *in vitro*.

Como las agliconas no se aíslan como productos naturales libres, para la obtención de la 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**34**) y 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina (**35**) se realizó una hidrólisis ácida a partir de los productos **4** y **7**, respectivamente. El producto **34** (502 mg) se obtuvo como un sólido amarillo claro con una polaridad menor que la presentada por el compuesto **4**; esto se verificó en una cromatografía en capa fina, donde se calculó un factor de retención menor para el compuesto **4** ($R_f = 0.43$), en comparación con el producto de la hidrólisis ($R_f = 0.72$). La menor polaridad es un indicio de la pérdida de la unidad glicosilante y la formación de la aglicona 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**34**). La misma cromatografía sirvió para corroborar la pureza del compuesto **34** y, a su vez, mostrar que la hidrólisis del producto **4** fue total con un rendimiento del 50% con respecto a la diferencia de

pesos entre el compuesto inicial (**4**) y el producto final (**34**) de la hidrólisis. La 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina (9.2 mg; **35**) se obtuvo bajo la forma de un sólido naranja en un rendimiento del 9.2%.

El cálculo de la IC_{50} permitió demostrar que las agliconas **34** y **35** inhiben a concentraciones menores que el fármaco de elección terapéutica, acarbosa. El compuesto **34** presentó una IC_{50} de 62.62 μ M, siendo más activo que el compuesto **35** (208.63 μ M). De la diversidad de 4-fenilcumarinas glicosiladas que se evaluaron, sólo los compuestos **6** y **7** presentaron actividad inhibitoria, pero sin llegar al 50% de inhibición. Este estudio reveló que para que las 4-fenilcumarinas presentaran actividad inhibitoria deben tener libre la posición 5 (Figura 5; Cuadro 8); en otras palabras, deben ser hidrolizadas para ejercer su actividad biológica. De manera adicional, el sustituyente metoxilo en la posición 7, favorece el potencial inhibitorio; esta observación concuerda con los resultados de la prueba de tolerancia a la sacarosa oral, en la cual, el tratamiento con HEC, carente de 4-fenilcumarinas metoxiladas, no presentó actividad significativa a ninguna de las dosis ensayadas. Estos resultados permiten evidenciar la importancia que tiene la hidrólisis de las 4-fenilcumarinas en el estómago de los animales para observar la actividad inhibitoria de α -glucosidasas que provoca un efecto antihiper glucémico.

En el caso de los compuestos restantes, ni las cucurbitacinas (**25** y **26**), ni el ácido clorogénico (**29**) presentaron actividad; este resultado contrasta con las descripciones previas que adjudican un efecto inhibitor de estas enzimas para el compuesto **29** (McCarty, 2005; Matsui *et al.*, 2006); sin embargo, otros reportes señalan que su actividad antidiabética está relacionada a las siguientes acciones: antioxidante al proteger las células β pancreáticas de los efectos tóxicos de diversas especies reactivas de oxígeno (Van Dam, 2006; Sato *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012, *inter alia*); reductora de la síntesis de la glucosa hepática a través de la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa (Van Dam, 2006, *inter alia*); reductora de la absorción de glucosa intestinal debido a la inhibición de la glucosa-6-fosfato translocasa 1 y otros mecanismos asociados al incremento de los niveles de GLP-1 (Van Dam, 2006, *inter alia*). Estos mecanismos sustentan la eficacia de los extractos acuosos con concentraciones altas del compuesto **29**, en los ensayos hipoglucemiantes agudo y de tolerancia a la glucosa oral.

Cuadro 8. Valores de CI_{50} calculados para distintos compuestos del complejo copalchi. Cada valor es la concentración inhibitoria media (μM) \pm DE; salvo los casos donde sólo se alcanzó el porcentaje de inhibición señalado a la máxima concentración evaluada (1000 μM). La acarbosa es el control positivo del ensayo. NA se refiere al la ausencia de actividad inhibitoria. ND se refiere al compuesto insoluble.

Compuesto	CI_{50} (μM)
Acarbosa	569.68 \pm 0.02
7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (34)	62.62 \pm 4.96
5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina (35)	208.63 \pm 8.19
5-O- β -D-glucopiranosil-7, 3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (6)	38.19% a 1000 μM
6''-acetil-5-O- β -D-glucopiranosil-7, 3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (7)	11.76% a 1000 μM
5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4)	NA
5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5)	NA
5-O-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (13)	NA
3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina (25)	NA
25-O-acetil-3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina (26)	NA
Ácido clorogénico (29)	NA
Ácido desoxicordifolínico (28)	ND

7.5.5. Actividad antihyperglucemiante de la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4) y su aglicona (34)

Los compuestos 4 y 34 presentaron actividad significativa en animales diabéticos, ambos compuestos presentaron actividad antihyperglucemiante significativa en la dosis más alta evaluada (50 mg/kg) en la curva de tolerancia a la sacarosa oral (Cuadro A32, Figura 54) .

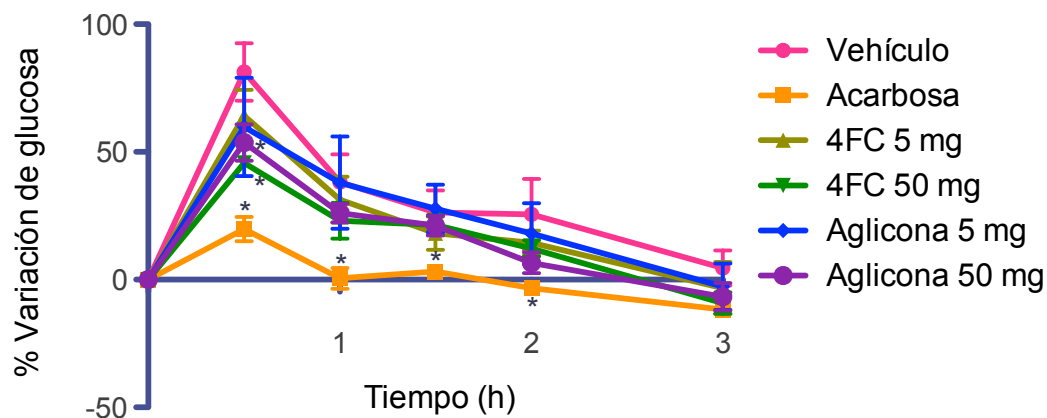


Figura 54. Curva de tolerancia a la sacarosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; compuestos **4** y **34** (4FC y Aglicona; 5 y 50 mg/kg, cada uno). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

El compuesto **34** presentó actividad antihiper glucemiante significativa a la dosis de 50 mg/kg en animales normoglucémicos (Cuadro A33, Figura 55), en pruebas de tolerancia al almidón. En animales diabéticos, ambos compuestos (**4** y **34**) presentaron un efecto inhibitorio del pico postprandial; el compuesto **34** presentó actividad a las dos dosis evaluadas (5 y 50 mg/kg) y su acción se mantuvo a lo largo de todo el experimento, de manera similar a la acarbosa (Cuadro A34, Figura 56).

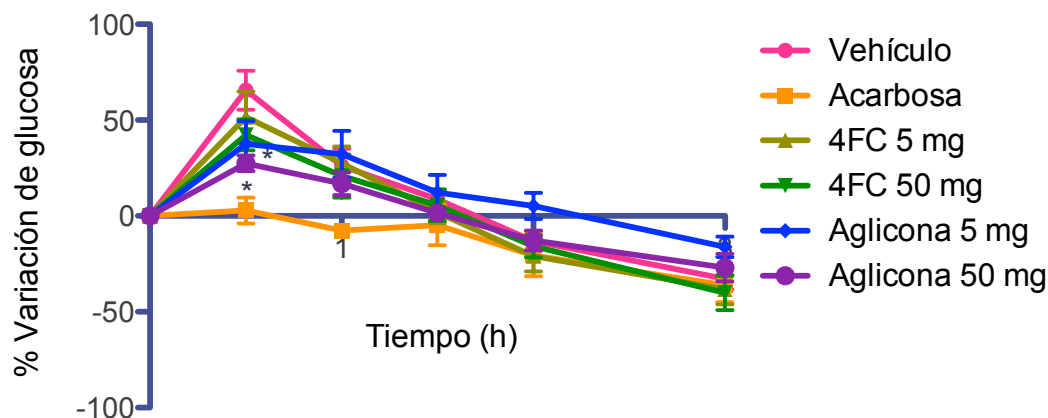


Figura 55. Curva de tolerancia al almidón oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; compuestos **4** y **34** (4FC y Aglicona; 5 y 50 mg/kg, cada uno). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

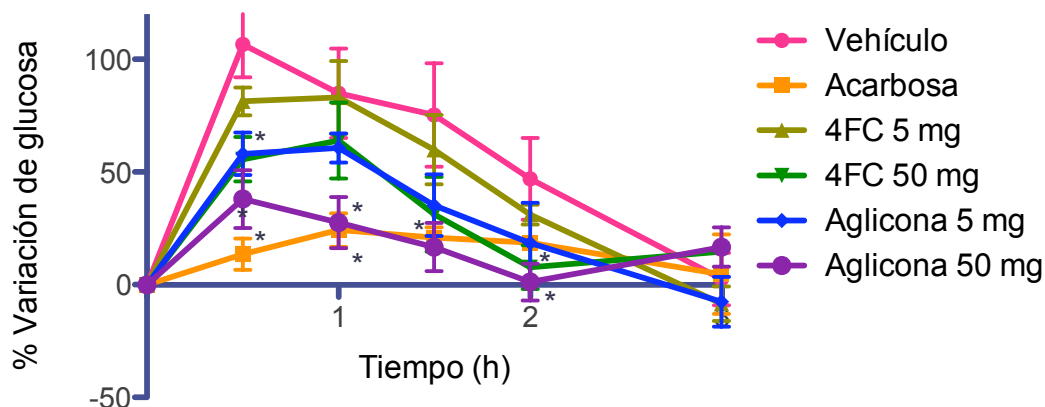


Figura 56. Curva de tolerancia al almidón oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos; compuestos **4** y **34** (4FC y Aglicona; 5 y 50 mg/kg, cada uno). Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

En concordancia con el ensayo *in vitro* de inhibición de α -glucosidasas, se evaluaron los compuestos **4** y **34**. El compuesto **4** se eligió debido a su disponibilidad y con la finalidad de contrastar si la administración de una 4-fenilcumarina glicosilada modificaba el tiempo y la

eficacia en la respuesta con respecto a la actividad observada para la aglicona (**34**), bajo la premisa de que requiere ser hidrolizada para ejercer su actividad biológica. También se evaluó la respuesta metabólica a la carga oral con dos fuentes de carbohidratos distintas, un disacárido (sacarosa) y un polisacárido (almidón).

En la curva de tolerancia al almidón, el compuesto **34** fue activo a partir de la dosis de 5 mg/kg en animales diabéticos, mientras que el compuesto **4** sólo fue activo en la dosis más alta evaluada (50 mg/kg). Además, la aglicona (**34**; 50 mg/kg) presentó una inhibición del pico postprandial similar a la observada para la acarbosa y su actividad mantuvo una diferencia significativa con el vehículo durante todo el experimento (Cuadro A34, Figura 56). Este efecto, puede relacionarse con la administración de almidón como fuente de carbohidrato, ya que la metabolización de este polisacárido fue más lenta, como se puede observar en el pico de glicemia ensanchado, permitiendo que la actividad antihiper glucemiantes se desarrollara por un periodo mayor de tiempo. En cualquier caso los resultados indican que los compuestos inhiben tanto a las α -glucosidasas con actividad amilasa como aquellas con actividad sacarasa.

7.6. Estudio de acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es un método computacional que permite el análisis teórico de la unión entre ligantes potenciales (generalmente moléculas pequeñas) y blancos macromoleculares (proteínas) de estructura conocida. La técnica permite estimar teóricamente la asociación ligante-proteína utilizando una parametrización energética con la cual se obtienen constantes de unión o afinidad (K_i). Este método también permite predecir el sitio idóneo de unión molecular entre el ligante y la macromolécula. El acoplamiento molecular es frecuentemente utilizado para predecir la orientación y la afinidad de unión de fármacos potenciales a blancos moleculares, generalmente receptores o enzimas, de interés terapéutico. En este estudio, se realizó el acoplamiento molecular de la aglicona **34**, ampliamente representada en las 4-fenilcumarinas glicosiladas aisladas de las distintas rubiáceas del complejo copalchi.

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron empleando la estructura de la enzima MAL12, perteneciente a la familia GH13. Esta enzima está formada por una cadena polipeptídica de 576 residuos, similar a glucosidasas de *Bacillus cereus* y *Geobacillus sp.*, y está compuesta de tres

dominios: los dominios N-terminal (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 (Borges de Melo *et al.*, 2006). La estructura de compuesto **34** se optimizó geométricamente mediante el software HyperChem 7.0 y posteriormente se encontraron los sitios de interacción más favorables con la enzima de acuerdo a diferentes factores energéticos empleando el programa AutoDock 4.0.

El análisis de acoplamiento molecular del compuesto **34** (Figura 57A) pronosticó que este compuesto se puede unir al sitio catalítico de la α -glucosidasa y que podría estar formando enlaces de hidrógeno con los residuos Asp408, Arg312, Phe157 e His279 a través de los grupos hidroxilos de las posiciones C-3' (O:10a-H:Asp), C-4' (O:10a-H:Asp; O:10a-H:Phe), C-5 (H:10a-N:Arg), así como con los átomos de oxígeno en O-1 (O:10a-H:His) y C-2 (O:10a-H:His). El modelo teórico también predice algunas interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Tyr313, Glu304, Thr307, Leu237, Ser308 y Phe311. La K_i calculada de 10a fue de 4.56 μM . Las interacciones hidrofóbicas, así como los enlaces de hidrógeno ayudan a estabilizar al compuesto dentro del sitio catalítico, permitiendo así una mejor interacción y pudiendo propiciar una posible inhibición de la enzima.

El mismo análisis se llevó para la acarbosa (Figura 57B), el cual predijo un sitio de interacción de la acarbosa con la enzima similar al descrito en trabajos previos (Escandón-Rivera *et al.*, 2012), con una K_i calculada de 0.024 μM . En este caso, se observaron tres enlaces de hidrógeno, formados por las interacciones con los residuos Arg312, Thr307 y Phe311 con grupos hidroxilo de la glucopiranososa, además de interacciones hidrofóbicas con los residuos Phe157, Asp214, Leu237, Arg349, Ala278, His279, Phe300, Glu304, Ser308, Pro309, Asp349 y Asp408. Se ha propuesto que la interacción con los residuos Asp214, Glu276 y Asp349 podría evitar las rupturas de los enlaces glucosídicos, ya que el primero actúa como un nucleófilo y los otros dos reacciones como catalizadores de la reacción ácido/base durante el proceso de hidrólisis de azúcares (McCarter y Withers, 1994).

Cabe resaltar que el compuesto **34** mostro una importante actividad inhibitoria del pico postprandial en la curva de tolerancia al almidón (Figura 56), lo que indicaría que posee actividad inhibitoria de α -amilasa.

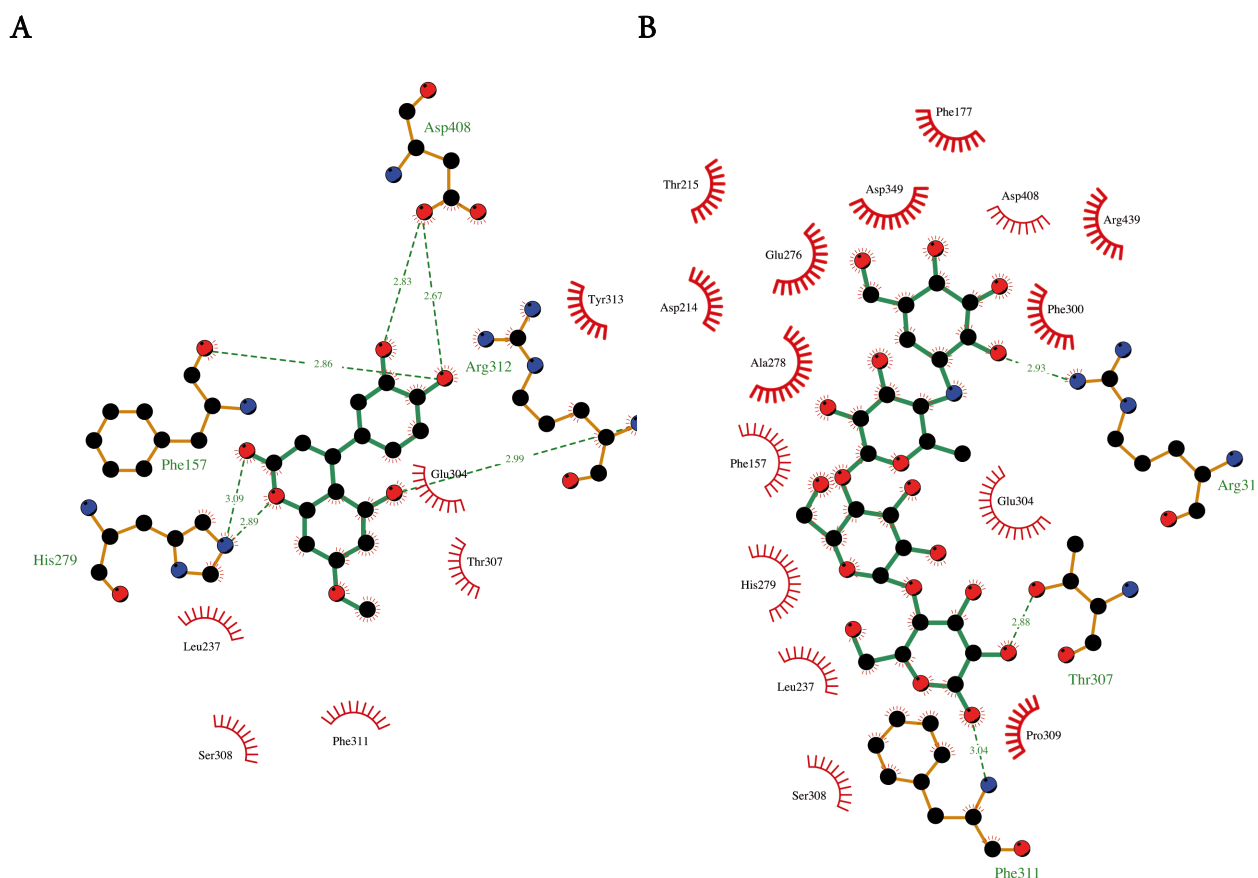


Figura 57. Acoplamiento molecular utilizando el modelo estructural de la α -glucosidasa. **A.** Sitio de unión del compuesto **34**. **B.** Sitio de unión de la acarbose, considerando el sitio catalítico de la enzima.

7.7. Evaluación de la actividad gastroprotectora

Los resultados (Cuadro A35, Figuras 58 y 59) indicaron que CHL ($DE_{50} = 184.7$ mg/kg) y CHS tuvieron actividad gastroprotectora significativa a las dosis de 300 mg/kg ($80.5 \pm 3.35\%$ y $80.26 \pm 3.96\%$ de gastroprotección, respectivamente). Los extractos de hojas (HHL y HHS) también fueron activos (Cuadro A35 y las Figuras 58 y 59); en este caso los efectos fueron significativos a partir de las dosis de 177 mg/kg y 300 mg/kg (75.1 ± 7.26 y $74.5 \pm 11.32\%$ de

gastroprotección; $DE_{50} = 109.1$ mg/kg para HLL; 65.97 ± 5.18 y $76.85 \pm 3.17\%$ de gastroprotección; $DE_{50} = 149.7$ mg/kg para HHS).

Los resultados de este segundo grupo de experimentos sugieren que las hojas pueden ser usadas de manera alternativa, lo cual, en términos de la conservación del recurso natural es relevante pues, como se dijo en los antecedentes, las poblaciones de ambas especies de *Hintonia* son escasas y se encuentran en peligro de extinción. En todos los caso, la carbenoxolona, un agente citoprotector de la porción superior del tracto gastrointestinal, se utilizó como control positivo. La carbenoxolona incrementa la síntesis de moco alcalino en la mucosa gástrica debido al incremento del ácido *N*-acetilneuramínico presente en las mucoproteínas. Además, este compuesto prolonga la vida media de la células de la mucosa gástrica al reducir la tasa de recambio celular (Navarrete *et al*, 2002).

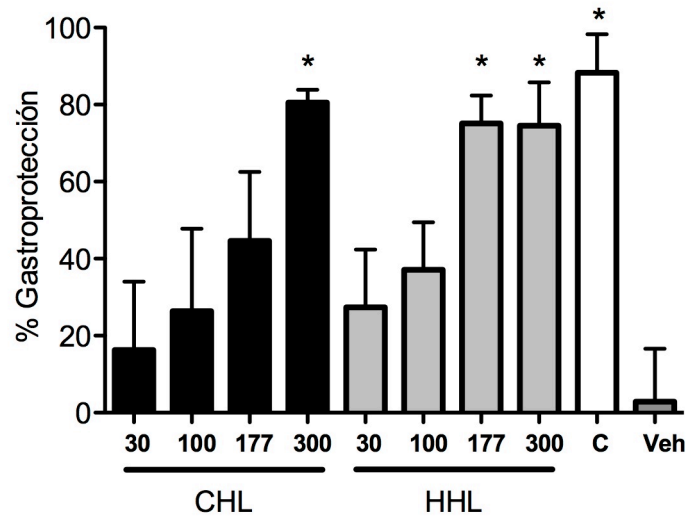


Figura 58. Actividad gastroprotectora de CHL y HHL (30, 100, 177 y 300 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de gastroprotección (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratas en cada grupo.* $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls comparando cada valor con el vehículo.

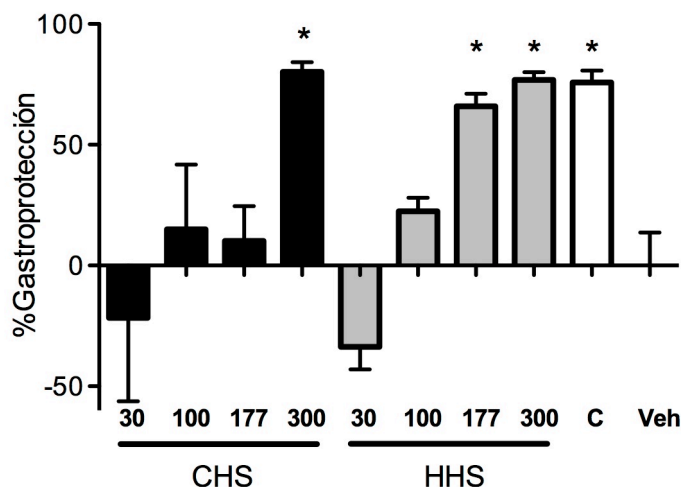


Figura 59. Actividad gastroprotectora de CHS y HHS (30, 100, 177 y 300 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de gastroprotección (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratas en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls comparando cada valor con el vehículo.

Se eligió evaluar la actividad gastroprotectora del compuesto **13** ya que es un compuesto mayoritario común en todas las infusiones del género *Hintonia*; mientras que el compuesto **29** se encuentra en cantidades significativas en las infusiones de hojas de ambas especies (Figuras 18 y 21). El compuesto **29** tuvo un efecto significativo en el rango de 17 a 100 mg/kg (Cuadro A37, Figura 61); el efecto fue dependiente de la dosis, mostrando un efecto máximo de inhibición de las lesiones gástricas a la dosis de 100 mg/kg ($74.04 \pm 4.4\%$), con una DE_{50} calculada de 26 mg/kg. En el caso del compuesto **13**, la actividad gastroprotectora significativa se presentó en un rango de 10 a 100 mg/kg (Cuadro A36, Figura 60); sin embargo, el efecto farmacológico alcanzado con la dosis de 17 mg/kg ($64.21 \pm 3.7\%$) fue similar al de la dosis de 100 mg/kg ($68.85 \pm 8.4\%$), la DE_{50} calculada para el compuesto **13** fue de 15 mg/kg.

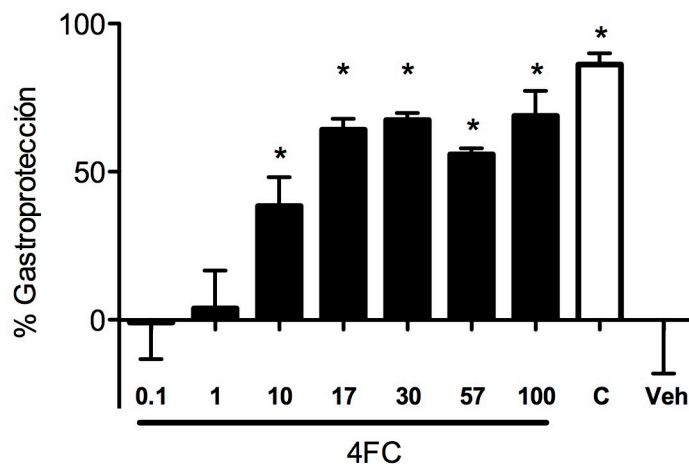


Figura 60. Actividad gastroprotectora de 13 (4FC; 0.1, 1, 10, 17, 30 y 100 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de gastroprotección (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratas en cada grupo.* $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls comparando cada valor con el vehículo.

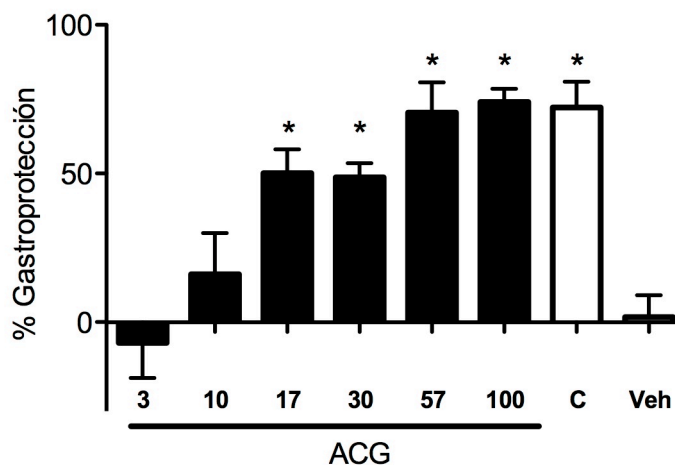


Figura 61. Actividad gastroprotectora de 29 (ACG; 3, 10, 17, 30 y 100 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de gastroprotección (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratas en cada grupo.* $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls comparando cada valor con el vehículo.

Los compuestos **13** y **29** mostraron valores de DE_{50} menores en comparación a los cuatro extractos evaluados, revelando que estos compuestos son los principios activos responsables de la actividad gastroprotectora de las especies de *Hintonia*, aunque es posible que las otras 4-fenilcumarinas o cucurbitacinas presentes en las plantas contribuyan al efecto farmacológico.

Una mezcla de los compuestos **13** y **29** a las DE_{25} de cada uno, 7.5 mg/kg y 13 mg/kg respectivamente, fue evaluada para investigar de manera preliminar la posible interacción entre estos dos compuestos. La combinación mostró un efecto gastroprotector significativo ($42.9 \pm 9.6\%$) similar a la DE_{50} de cada compuesto evaluado por separado (Cuadro A38, Figura 62), lo que respalda que los compuestos **13** y **29** actúan independientemente, pero de manera aditiva. Este resultado preliminar apunta a que los compuestos **13** y **29** comparten un mismo mecanismo de acción gastroprotector (Berebaum, 1989; Miranda *et al.*, 2001).

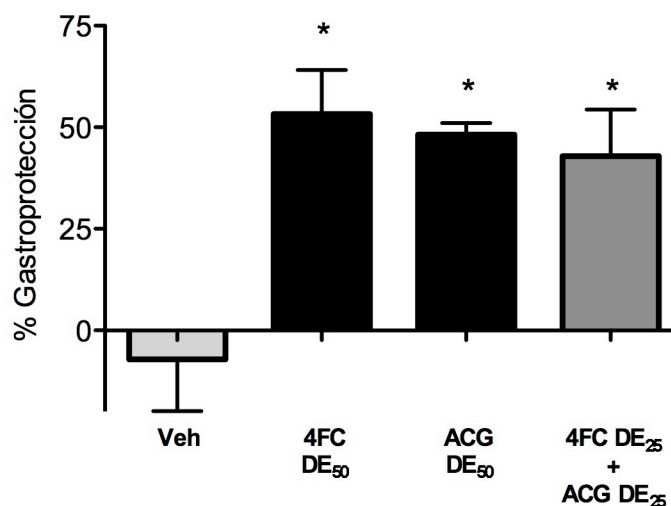


Figura 62. Actividad gastroprotectora de la DE_{50} de los compuestos **13** (4FC; 15 mg/kg) y **29** (ACG; 26 mg/kg) y su comparación con la suma de la DE_{25} de ambos compuestos (**13**: 7.5 mg/kg y **29**: 13 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de gastroprotección (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratas en cada grupo.* $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls comparando cada valor con el vehículo.

7.7.1. Mecanismo de acción gastroprotector

Los compuestos sulfhidrilo no proteicos endógenos (NP-SH) son importantes para mantener la integridad de la mucosa gástrica (Hiraishi *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 1999). Dichos NP-SH tienen la capacidad de unirse a los radicales libres generados por agentes nocivos y así controlar la producción y naturaleza del moco (Andreo *et al.*, 2006). La administración de un bloqueador de la producción de los NP-SH como la *N*-etilmaleimida (NEM; 10mg/kg) incrementa significativamente el efecto del etanol en las lesiones gástricas, revirtiendo el efecto gastroprotector de los compuestos **13** (DE₅₀= 15 mg/kg) y **29** (DE₅₀= 26 mg/kg) (Figura 63A). Estos resultados sugieren que el efecto gastroprotector de ambos compuestos implican una fuerte participación de los NP-SH en el mecanismo protector de la mucosa gástrica contra agentes exógenos dañinos.

El óxido nítrico (NO) y las prostaglandinas también desempeñan un papel en la protección y la reparación de la mucosa gástrica. Estos factores gastroprotectores endógenos modulan el flujo sanguíneo estimulando la secreción de moco, inhiben la adherencia y la activación de neutrófilos, regulan la respuesta alcalina al ácido y protegen al estómago contra agentes ulcerogénicos (Allen and Flemström, 2005; Wallace, 2001). Por lo tanto, para determinar si el NO y las prostaglandinas están de alguna manera relacionadas al mecanismo de acción de los compuestos **13** y **29**, los animales fueron pretratados con L-NAME (70 mg/kg) o indometacina (10 mg/kg). Ninguno de los dos pretratamientos inhibieron el efecto gastroprotector de los compuestos **13** y **29** al compararlos con los grupos control (Figuras 63B y 63C). Así, los resultados revelan que la vía por la cual dichos compuestos ejercen su actividad gastroprotectora no está mediada por NO ni por prostaglandinas, pero sí por NP-SH, compartiendo el mismo mecanismo de acción. Este último hallazgo es consistente con el posible efecto aditivo observado en la evaluación de la mezcla de ambos compuestos.

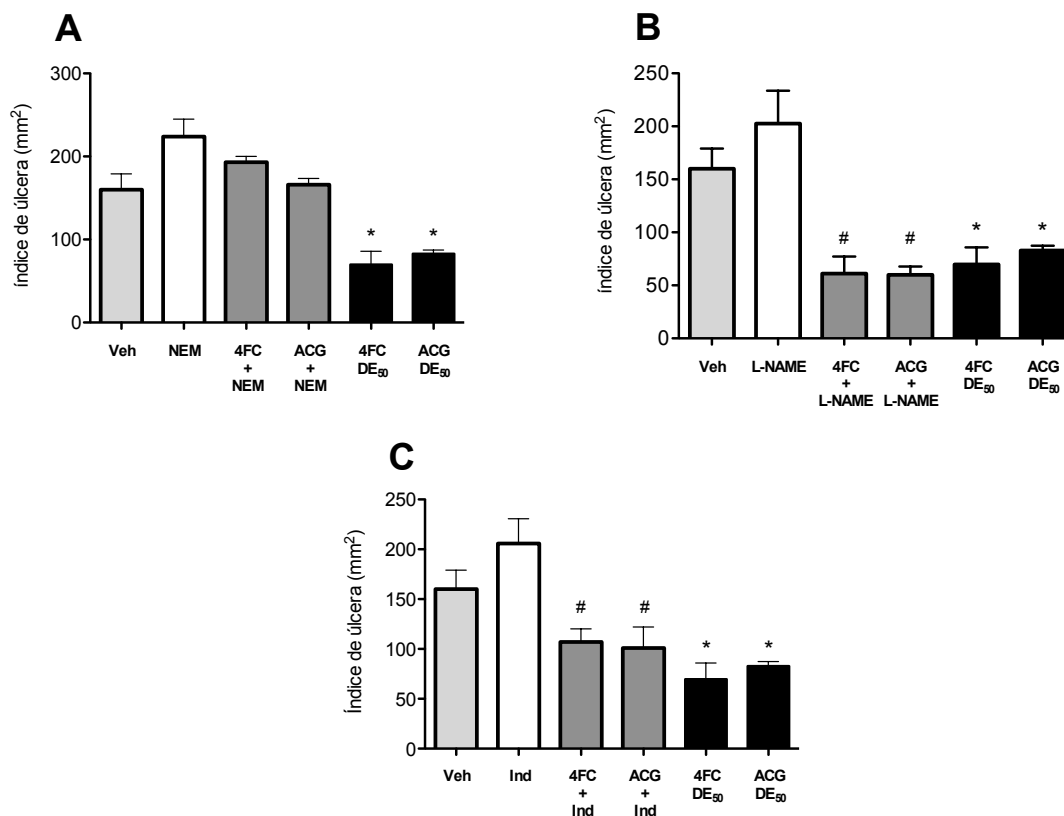


Figura 63. Efecto de la DE₅₀ de los compuestos **13** (4FC; 15 mg/kg) y **29** (ACG; 26 mg/kg) en úlceras inducidas por etanol en ratas pretratadas con (A) NEM (10 mg/kg s.c.), (B) L-NAME (70 mg/kg i.p.) e (C) indometacina (10 mg/kg s.c.). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratas en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls comparando cada valor con el vehículo.

Si bien el ácido clorogénico (**29**) y las 4-fenilcumarinas demostraron tener propiedades farmacológicas diversas, incluyendo antidiabéticas (Cristians *et al.*, 2009; Matsui *et al.*, 2006) y antioxidantes (Sato *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012, *inter alia*), la actividad gastroprotectora no había sido reportada anteriormente. De esta forma, esta actividad novedosa para ambos compuestos, permite entender la acción gastroprotectora de muchas plantas que contienen ácido clorogénico (Chung *et al.*, 2011; Monforte *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2004, *inter alia*). De manera general, la naturaleza polifenólica de los compuestos **13** y **29**, así como su propiedad antiinflamatoria (Shen *et al.*, 2002) y atrapadora de radicales libres (Sato *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012, *inter alia*) demostrada para el ácido clorogénico podrían contribuir con la estabilidad de la mucosa gástrica,

la cual sufre un daño posterior a la reducción en la concentración de los NP-SH (Andreo *et al.*, 2006; Salim, 1990).

7.8. Estudio farmacocinético del compuesto 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4) y su aglicona (34)

El conocimiento de los parámetros farmacocinéticos, *e.g.* la absorción y la eliminación, son fundamentales para el establecimiento de un preparado fitoterapéutico, ya que proporcionan un panorama amplio de la manera en la cual estos compuestos ejercen sus actividades biológicas y como son metabolizados por el organismo. Se eligieron como candidatos para este estudio a los compuestos 4 y 34, en el caso del compuesto glicosilado (4) los criterios de inclusión en el estudio fueron su disponibilidad en cantidades suficientes para realizar los estudios y su presencia en las tres rubiáceas estudiadas. Por otro lado, la aglicona (34) tiene el patrón de sustitución más común entre las 4-fenilcumarinas identificadas en las rubiáceas del complejo copalchi.

7.8.1. Cuantificación simultánea de los compuestos 4 y 34 en plasma de rata

La selectividad se evaluó mediante la comparación de los cromatogramas correspondientes a la matriz biológica y al enriquecimiento de la misma con una concentración definida de los compuestos 4 y 34 (15 $\mu\text{g/mL}$), con lo que se verificó que no hay interferencia en el tiempo de retención de los compuestos analizados.

El método demostró ser lineal para rango de concentraciones analizadas. El intervalo de concentraciones del compuesto 4 fue 1–50 $\mu\text{g/mL}$, con una $r^2 = 0.999$, mientras que para el compuesto 34 se evaluó el mismo rango de concentraciones, obteniendo una $r^2 = 0.988$. Las ecuaciones de las rectas calculadas a partir de la regresión lineal fueron $y = 19.733x - 9.297$ para el compuesto 4, mientras que para el compuesto 34 fue $y = 22.754x + 34.648$.

Los porcentajes de recobro se calcularon a partir de tres niveles de concentración, puntos control bajo, medio y alto. El porcentaje de recobro absoluto para ambos analitos no resultó aceptable para las concentraciones más bajas del rango (1 $\mu\text{g/mL}$), ya que no fue posible determinar la concentración recuperada; por otro lado, para el compuesto 4 se obtuvo un

porcentaje de recobro constante para demás concentraciones (3–50 µg/mL; 90 – 98% de recobro absoluto), mientras que para el compuesto **34** los porcentajes fueron muy variables.

La precisión se determinó bajo la premisa de que la dispersión de las concentraciones calculadas no debe exceder el 15% del coeficiente de variación (CV). Los resultados obtenidos demostraron que el método fue preciso.

El LOD se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, más no cuantificada; en el caso del LOQ es la concentración mínima de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud. Para el compuesto **4** el LOD y el LOQ fueron de 0.55 µg/mL y 1.16 µg/mL, respectivamente; en el caso del compuesto **34** se calcularon los valores de 0.36 µg/mL y 1.10 µg/mL para el LOD y el LOQ. En ambos casos estos valores de LOQ se encontraron por encima del punto más bajo de los rangos evaluados.

Para el análisis preliminar de la absorción de los compuestos **4** y **34** se administró a los animales el compuesto **4** y se analizó una muestra de plasma obtenido, como se indica en la metodología. El análisis mostró que ninguno de los dos compuestos están presentes en el plasma, ya que no se pudo identificar, ni cuantificar, en ningún tiempo de muestreo la presencia del compuesto **4** o su metabolito **34**, lo que indicaría que no se están absorbiendo, o bien se están uniendo a otra molécula o se biotransforma a un metabolito de naturaleza desconocida.

La absorción de fármacos es fundamental para que estos lleguen a su sitio de acción y ejerzan una función biológica a nivel sistémico. Para que una sustancia atraviese las membranas celulares es fundamental que no esté unida a otras moléculas. Por otro lado, el paso a través de barreras biológicas está modulado por las características fisicoquímicas del compuesto, *e.g.* peso molecular, ionización, liposolubilidad, etc. (Gibaldi, 1991; Irvine *et al.*, 1999; Avendaño, 2001; Armijo, 2003). Si el compuesto **4** o su metabolito no cumplen con dichas características es posible que no se absorba y no llegue a modular acciones a nivel sistémico.

7.8.2. Cuantificación simultánea de los compuestos 4 y 34 en heces de rata

Debido a que en el estudio preliminar de absorción de los compuestos 4 y 34 se obtuvieron resultados que sugieren que dichos compuestos no se absorben, el análisis del parámetro de eliminación se vuelve necesario.

La selectividad se evaluó mediante la comparación de los cromatogramas correspondientes a la matriz biológica y al enriquecimiento de la misma con una concentración definida de los compuestos 4 y 34 (45 µg/mL) con lo que se verificó que no hay interferencia en el tiempo de retención de los fármacos analizados.

El método demostró ser lineal para rango de concentraciones analizadas. El intervalo de concentraciones del compuesto 4 fue 50–150 µg/mL con una $r^2 = 0.999$, mientras que para el compuesto 34 se evaluó el mismo rango de concentraciones obteniendo la misma $r^2 = 0.999$. Las ecuaciones de las rectas calculadas a partir de la regresión lineal fueron $y = 15.887x + 4.722$ para el compuesto 4, mientras que para el compuesto 34 fue $y = 18.451x + 0.5590$.

Los porcentajes de recobro se calcularon a partir de tres niveles de concentración, puntos control bajo, medio y alto. El porcentaje de recobro absoluto para ambos analitos resultó ser exacto, ya que la DEA para todos los niveles de concentración evaluados estuvieron entre el 85-109%.

Los resultados obtenidos demostraron que el método fue preciso, ya que ninguno de los datos rebasó el 15% del coeficiente de variación (CV).

El LOD se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, más no cuantificada; en el caso del LOQ es la concentración mínima de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud. Para el compuesto 4 el LOD y el LOQ fueron de 7.79 µg/mL y 16.37 µg/mL, respectivamente; en el caso del compuesto 34 se calcularon los valores de 4.59 µg/mL y 9.65 µg/mL para el LOD y el LOQ. En ambos casos estos valores se encontraron por debajo del punto más bajo de los rangos evaluados.

Para el análisis de la eliminación de los compuestos 4 y 34 se formaron cuatro grupos de animales a los cuales se les administró el compuesto 4, disuelto en solución salina a las dosis de 15, 30 y 90 mg/kg, adicionalmente se administró un grupo con solución salina como control. Se

tomaron las heces a los tiempos: 0, 12, 18, 24, 36, 48, 60 y 72 horas. Para el análisis por CLAE se utilizaron muestras obtenidas de acuerdo al procedimiento experimental descrito en la metodología..

El ensayo realizado, permitió detectar y cuantificar la presencia de los compuestos **4** y **34** en heces de rata, corroborando que el producto natural (**4**) no sólo se elimina de manera inalterada, sino también se metaboliza y elimina en forma de su aglicona (**34**).

No se pudieron obtener muestras en todos los tiempos analizados; sin embargo, en todas las dosis evaluadas, el primer registro de eliminación se presentó a las 12 horas y el último a las 48 horas, en ningún hubo eliminación en los tiempos posteriores. A las 12 horas se elimina la 4-fenilcumarina glicosilada (**4**), en una concentración diez veces mayor que la aglicona (**34**); sin embargo, dicha proporción cambia a las 24 horas, siendo la concentración del compuesto **34** mayor al doble de la registrada para el compuesto **4**. Cabe destacar que a las 48 horas se observó la máxima concentración de aglicona (**34**) y la concentración del compuesto **4** también se incrementa, triplicando a la del compuesto **34**. El balance final de la eliminación mostró que el compuesto inalterado (**4**) se elimina en una concentración tres veces superior a su metabolito (**34**).

La sumatoria de las concentraciones de los compuesto **4** y **34** al cabo de 48 horas indica un porcentaje de eliminación del $42.3 \pm 13.2\%$, $44.23 \pm 8.2\%$ y $73.43 \pm 5.3\%$, para las dosis de 15, 30 y 90 mg/kg, respectivamente; sin embargo, algunos animales presentan porcentajes superiores de eliminación mayores, llegando inclusive al 93.6%. Lo anterior indica la falta de reproducibilidad en el estudio, debido a un error metodológico en el planteamiento de este análisis, ya que las cifras son variables con respecto a la dosis y los distintos individuos. Entonces durante la extracción se debería procesar la totalidad de las heces recolectada en cada tiempo; ya que no hay forma de asegurar que se esté tomando una muestra proporcional a partir de los 50 mg, en otras palabras, no existe homogeneidad en el reparto del compuesto **4**, o su metabolito (**34**) en una matriz sólida como son las heces. En este marco, el porcentaje de eliminación de 73.4% no refleja el valor real, el cual debe ser cercano a la totalidad de la muestra administrada.

Con lo anterior se comprobó que la 4-fenilcumarina **4** no se absorbe, sino que se elimina por vía fecal, en forma inalterada o como su metabolito hidrolizado, la aglicona **34**; no obstante,

queda abierta la posibilidad de que un porcentaje se esté metabolizando en otros compuestos que no fueron detectados.

Para que se diera una metabolización de las 4-fenilcumarinas, tendría que quedar libre el núcleo cumarínico lo cual aún no se comprueba; de ser el caso, existen reportes acerca de la farmacocinética de las cumarinas, que indican que son completamente absorbidas en el tracto gastrointestinal y metabolizadas extensamente vía el metabolismo del primer paso en el hígado; el citocromo P-450 (CYP) puede provocar la hidroxilación y la epoxidación de una cumarina simple; la acción de la enzima glutatión transferasa puede convertir el epóxido en un hidroxifenilacetaldehído, el cual puede ser reducido a hidroxifeniletanol, a través de la aldehído deshidrogenasa o bien oxidado a ácido hidroxifenilacético; posteriormente el ácido o aldehído se excretarían vía urinaria (Chen *et al.*, 2011).

El elevado porcentaje de eliminación no contraviene los resultados farmacológicos descritos para las 4-fenilcumarinas, ya que en ambos casos se pueden explicar sus actividades a través de una acción *in situ*, que no requiere de una absorción y distribución sistémica para llegar a diversos órganos diana.

En el caso del potencial antidiabético, el efecto antihiper glucémico relacionado con la inhibición de las α -glucosidasas, se da en forma directa en las vellosidades del intestino delgado. En el caso del efecto hipoglucemiante y la tolerancia a la glucosa, que involucran una respuesta sistémica, ya sea secretagoga, moduladora del transporte de glucosa o sensibilizadora de los tejidos periféricos, se puede explicar por medio de la acción de las incretinas (GIP y GLP-1) las cuales se modulan a nivel intestinal; GLP-1 desencadena la biosíntesis de insulina, la expresión de transportador de glucosa (GLUT-2), aumenta la sensibilidad a insulina, retarda el vaciamiento gástrico, suprime el apetito, aumenta el control glicémico y disminuye la secreción de glucagón. GIP también incrementa la secreción de insulina, induce la lipogénesis y suprime la secreción de ácido gástrico (El-Kaissi y Sherbeeni, 2011; Israili, 2011). Ambos compuestos están modulados por la actividad de DPP-4, siendo éste el probable blanco de acción de las 4-fenilcumarinas, inhibiendo su función o síntesis, lo que favorecería la duración e intensidad de la acción de las incretinas.

En el caso de la actividad gastroprotectora, se demostró que su posible mecanismo de acción estaría ligado a la producción de NP-SH, acción desencadenada *in situ*, sin la necesidad de absorber y distribuir el compuesto para ejercer su actividad biológica.

Otros compuestos desempeñan un papel importante en la actividad farmacológica de las rubiáceas del complejo copalchi; en el caso del ácido clorogénico (**29**), existen numerosos estudios sobre su farmacocinética (Crozier *et al.*, 2010; Williamson *et al.*, 2011). El compuesto **29** se absorbe y metaboliza en el tracto gastrointestinal; así, en el estómago se hidroliza a su aglicona, el ácido cafeico, generando una diversidad de hidroxycinamatos, *e.g.* ácidos ferúlico, isoferúlico, dihidrocafeico, dihidroferúlico, etc. Existe una baja presencia del fármaco inalterado en plasma; la mayor concentración de los metabolitos en plasma se observa a las seis horas posteriores a su administración vía oral. El papel de la microbiota intestinal es fundamental para la metabolización del compuesto **29**, sus metabolitos se excretan, finalmente, vía urinaria (Crozier *et al.*, 2010; Williamson *et al.*, 2011).

7.9. Propuesta de formulación de los preparados fitoterapéuticos

7.9.1. Preparado fitoterapéutico antidiabético

La formulación de un preparado fitoterapéutico coadyuvante en el control de los niveles de glicemia en pacientes diabéticos, o inclusive con actividad profiláctica en individuos normoglucémicos, consistiría en una tisana a partir de 1.5 g de hojas secas y fragmentadas de *H. latiflora*. Esta propuesta se basa en que el extracto acuoso de las hojas de *H. latiflora* (HHL) puede considerarse inocuo, según el ensayo de toxicidad aguda de Lorke (Cuadro 7), lo que se traduce como un importante parámetro de seguridad enfocado a la propuesta de un preparado fitoterapéutico.

En cuanto a la actividad antidiabética de HHL, su infusión presentó el mejor efecto hipoglucemiante, con una actividad similar a la del control positivo, glibenclamida en todas las dosis evaluadas (Cuadro A9, Figuras 30 y S4); de manera adicional, indujo un efecto antihiperoglucemiante en el ensayo a la tolerancia a la sacarosa oral, en animales diabéticos con una actividad similar a la de la acarbosa a la dosis de 500 mg/kg (Cuadro A21, Figura 42); finalmente, en el ensayo a la tolerancia a la glucosa oral presentó un efecto similar a la de la glibenclamida en

todas las dosis evaluadas (Cuadro A30, Figura 51). Estos tres resultados muestran que HHL tiene un efecto antidiabético amplio, involucrando una serie de mecanismos de acción, *e.g.* secretagogo, incrementando el transporte de glucosa, sensibilizador al efecto de la insulina y/o inhibidor de α -glucosidasas, lo que se traduce en una actividad con múltiples blancos farmacológicos.

El efecto antidiabético observado se relaciona directamente con la composición química que presenta HHL; el compuesto **29** es el mayoritario, el cual presenta importantes actividades biológicas: protege las a las células β pancreáticas de los efectos tóxicos de diversas especies reactivas de oxígeno a través de su actividad antioxidante (Van Dam, 2006; Sato *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012, *inter alia*), reductor de la síntesis de la glucosa hepática a través de la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa (Van Dam, 2006, *inter alia*), reductor de la absorción de glucosa intestinal debido a la inhibición de la glucosa-6-fosfato translocasa 1 y otros mecanismos asociados al incremento de los niveles de GLP-1 (Van Dam, 2006, *inter alia*). Asimismo, HHL presenta una diversidad de 4-fenilcumarinas: como el compuesto **6**, que presenta un hidroxilo libre en C-7, el cual restaura los niveles de glucosa en estudios crónicos en ratas diabéticas (Guerrero-Analco *et al.*, 2007); metoxiladas con un sustituyente monosacárido como el compuesto **4**, el cual presentó actividad antihiper glucemiante significativa en los ensayos a las tolerancias a la sacarosa y almidón orales (Cuadros A32 y A34, Figuras 54 y 56) y **5**, el cual presenta la misma actividad descrita para el compuesto **6**; o metoxiladas con sustituyente disacárido, como en el caso de **13** y **14**, que presentan la aglicona **34** la cual fue la más activa tanto en las pruebas de inhibición de α -glucosidasas *in vitro* (Cuadro 8) e *in vivo* (Cuadros A32 y A34, Figuras 54 y 56); demostrando, a través del estudio de acoplamiento molecular, una interacción en el mismo sitio catalítico en el cual actúa la acarbosa (Figura 57A). Finalmente, estarían jugando un papel importante en la actividad antidiabética la presencia de otras 4-fenilcumarinas u otros compuestos, como es el caso del ácido ursólico (**27**), que actúa como un regulador de la apoptosis en ambientes ricos en glucosa (Oh *et al.*, 2007), como estimulador de la toma de glucosa por el incremento de la fosforilación del receptor de insulina (Zhang *et al.*, 2006) y como un supresor de la angiogénesis en pacientes diabéticos con retinopatía no proliferativa (Skopinski *et al.*, 2004).

Los estudios farmacocinéticos preliminares aportan datos fundamentales para la formulación del preparado fitoterapéutico, ya que se sabe que las 4-fenilcumarinas no se absorben,

o al menos no lo hacen de forma extensa, y por otro lado, se eliminan prácticamente en su totalidad vía fecal, en su forma inalterada o bien como sus agliconas.

La validación del método analítico para la cuantificación de metabolitos de interés farmacológico en HHL, permite estandarizar la droga cruda respecto su concentración de 4-fenilcumarinas, en equivalentes del compuesto **13** y la presencia de ácido clorogénico (**29**), lo que constituye un parámetro de calidad para la formulación de un preparado fitoterapéutico; adicionalmente, se puede proponer la etapa de renovación foliar, como el régimen de cosecha de las hojas óptimo, en relación a la elevada concentración de los compuestos antidiabéticos; no obstante, se propondrían estudios encaminados al establecimiento de cultivos controlados, que aseguren la calidad y abasto de drogas crudas estandarizadas.

7.9.2. Preparado fitoterapéutico gastroprotector

La formulación de un preparado fitoterapéutico auxiliar en el tratamiento de úlceras gástricas consistiría en una cápsula de gelatina dura con 230 mg de un extracto acuoso liofilizado de la corteza de *H. standleyana*.

La propuesta se basa en que el extracto acuoso de la corteza de *H. standleyana* (CHS) puede considerarse inocuo, según los resultados del ensayo de toxicidad aguda de Lorke (Cuadro 7), siendo un preparado fitoterapéutico seguro.

En cuanto a la eficacia farmacológica de CHS, éste presentó actividad significativa a la dosis de 300 mg/kg ($80.26 \pm 3.96\%$ de gastroprotección; Cuadro A35, Figura 59), reduciendo la ulceración gástrica causada por la administración aguda de etanol. Dicho efecto se relaciona con su composición química, y es el compuesto **13** el mayoritario, el cual presentó una $DE_{50} = 15$ mg/kg, inclusive mejor que la del control positivo, carbenoxolona (Cuadro A36, Figura 60). Por otro lado, CHS presenta en su composición al compuesto **29**, con comprobada actividad gastroportectora ($DE_{50} = 26$ mg/kg; Cuadro A37, Figura 61), además de las actividades antioxidante y antiinflamatoria (Shen *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012, *inter alia*) que contribuyen a la estabilidad de la mucosa gástrica. Ambos compuestos actúan de forma aditiva y comparten el mismo mecanismo de acción gastroprotector, el cual está relacionado a la producción de NP-SH, los cuales tienen la capacidad de unirse a los radicales libres generados por

agentes nocivos y así controlar la producción y naturaleza del moco (Andreo *et al.*, 2006). La presencia de otras 4-fenilcumarinas, así como de las cucurbitacinas, podrían estar aportando en la disminución de la ulceración, así como en la reparación y protección de la mucosa gástrica.

7.9.2.1. Preparación de las cápsulas

El secado por aspersión es un método que preserva los componentes naturales presentes en los extractos, a partir del material vegetal. La presencia de compuestos como azúcares en los extractos acuosos impide que las infusiones puedan secarse por aspersión, sin que se adhiera a las superficies internas de los equipos, lo que produce un bajo rendimiento de recuperación. Es por esto que se usan aditivos inertes, como la maltodextrina favoreciendo la recuperación del producto al actuar como coadyuvante del secado (López-Hernández *et al.*, 2008).

Se eligieron las cápsulas de gelatina dura como forma farmacéutica idónea para el producto, debido a la versatilidad de dicha forma farmacéutica para el empaquetamiento del extracto y el enmascaramiento del sabor del mismo; ya que al ser extremadamente amargo, requería de una forma farmacéutica que aislara esta característica organoléptica.

Se analizó por CLAE el extracto acuoso de corteza de *H. standleyana*, para evaluar su estabilidad dentro de la cápsula e identificar los principales compuestos que lo conforman. El cromatograma generado (Figura 64) coincide con el reportado en el estudio realizado por Mata y colaboradores (2008), acerca de las cortezas de las dos especies del género *Hintonia*. Además del compuesto **13**, se identificaron los compuestos 5-*O*- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**4**) y 5-*O*-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**14**).

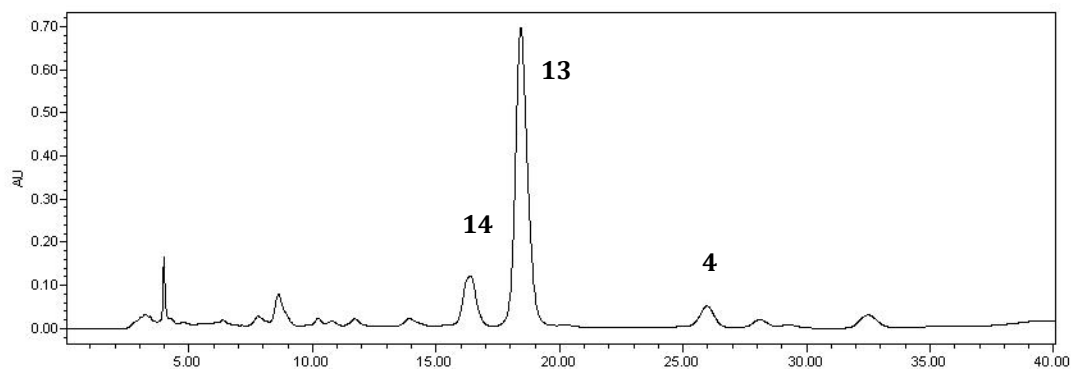


Figura 64. Cromatograma del extracto acuoso de corteza de *H. standleyana*; columna Symmetry C8 (3.9 × 50 mm). Fase móvil isocrática ACN: agua (0.1% ácido trifluoroacético; 19:81), flujo 0.4 mL/min, compuesto (tiempo de retención en minutos R_t): **14** (16.13), **13** (18.5) y **4** (26.01).

El extracto acuoso de la corteza de *H. standleyana* encapsulado, resultó una forma farmacéutica idónea para enmascarar las características organolépticas no deseadas; su principal ventaja radica en la estabilidad que le confiere al preparado, ya que la composición y concentración química se ha mantenido constante a lo largo del tiempo. Se cuenta con un método que permite la cuantificación del producto **13**, el cual se puede utilizar para el control de calidad del preparado.

En el caso de CHS, la investigación relacionada con la propagación de *H. standleyana*, así como la implementación de estrategias de cosecha de la corteza racionales, son fundamentales para la comercialización del preparado gastroprotector.

8. Conclusiones

- Se establecieron los parámetros de identidad que permiten separar de forma inequívoca a las tres principales rubiáceas del complejo copalchi: *Hintonia latiflora*, *H. standleyana* y *Exostema caribaeum*. De manera adicional, a través del establecimiento de los perfiles cromatográficos se puede distinguir la naturaleza de la droga cruda: hojas ó cortezas, permitiendo así la identificación de los principios farmacológicamente activos y, con ello, su estandarización.
- Se establecieron los parámetros de seguridad de los extractos acuosos de las seis drogas crudas provenientes del complejo copalchi. La evaluación de la toxicidad preclínica aguda mostró que los extractos analizados son seguros, ya que en todos los casos la $DL_{50} > 5000$ mg/kg.
- El análisis de la influencia fenológica y geográfica sobre la concentración de compuestos farmacológicamente activos en la infusión de las hojas de *H. latiflora* permitió asegurar el mejor régimen de recolección de la droga cruda con la finalidad de asegurar la concentración adecuada de los metabolitos activos y, de esta forma, garantizar su eficacia terapéutica.
- Las diversas pruebas antidiabéticas permitieron caracterizar los efectos hipoglucemiantes e antihiper glucémicos de los seis extractos acuosos de los tres miembros de la sección rubiácea del complejo copalchi. Dicho estudio mostró que a pesar de las similitudes en la composición química de las tres plantas, el mejor agente hipoglucemiante es el preparado de las hojas de *H. latiflora*, mientras que el mejor efecto antihiper glucémico lo presentan el extracto acuoso de la corteza de *E. caribaeum*, seguido por el extracto acuoso de las hojas de *H. standleyana*. Asimismo, el extracto acuoso de las hojas de *H. latiflora* presenta actividad antihiper glucemiante significativa en el ensayo de tolerancia a la glucosa oral.

- Se caracterizó la actividad antihiperglucemiante *in vivo* e *in vitro* de compuestos selectos presentes en las distintas drogas crudas del complejo copalchi, siendo el compuesto **34** el mejor inhibidor de la acción de las α -glucosidasas. Estas evaluaciones permitieron caracterizar el mecanismo de acción por el cual disminuyen el pico postprandial los extractos evaluados.
- Se evaluó la actividad gastroprotectora de los extractos acuosos de hojas y corteza de *H. latiflora* y *H. standleyana*, mostrando en todos los casos una significativa actividad inhibitoria de la formación de lesiones gástricas. Los compuestos **13** y **29** son algunos de los responsables de dicha actividad farmacológica y su efecto está relacionado a la producción de grupos sulfhidrilo endógenos, que a su vez favorece la generación del moco alcalino en la mucosa gástrica.
- El estudio farmacocinético de glicósidos de 4-fenilcumarinas selectas demostró que estos compuestos se hidrolizan para formar la aglicona correspondiente; ni esta última, ni el glicósido de 4-fenilcumarina se absorben en el tracto gastrointestinal, ya que se eliminan en una alta proporción vía fecal. Todos los análisis conducentes a determinar la presencia de dichos productos en plasma y en orina demostraron su ausencia. Todo ello sugiere que las diversas actividades farmacológicas de estos productos se da *in situ*, con la posibilidad de desencadenar cascadas de señalización que explican algunos de los efectos farmacológicos a nivel sistémico observados.

9. Perspectivas

- En base a las conclusiones de este trabajo de investigación, se propone la formulación de dos preparados fitoterapéuticos:
 - Tisana a partir de las hojas secas y fragmentadas de *H. latiflora*, estandarizada con respecto a los compuestos **13** y **29**, coadyuvante en el control de los niveles de glicemia en pacientes diabéticos. En este caso, los procedimientos analíticos necesarios para la estandarización se desarrollaron exitosamente.
 - Extracto acuoso liofilizado de la corteza de *H. standleyana* encapsulado, estandarizado con respecto al compuesto **13**, auxiliar en el tratamiento de úlceras gástricas.
- Realizar estudios de absorción utilizando la metodología CLAE acoplado a un espectrómetro de masas, para así disminuir el LOQ; así como un estudio de paso a través de membrana, con la finalidad de simular la permeabilidad en el tracto gastrointestinal y concluir definitivamente si existe absorción de las 4-fenilcumarinas o algún metabolito de las mismas.
- Realizar nuevamente el estudio de eliminación del compuesto **13**, teniendo en cuenta la extracción de la totalidad de las heces obtenidas en cada tiempo de muestreo.
- Realizar los perfiles de disolución de las cápsulas del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *H. standleyana*.
- Determinar el grado de ionización y coeficiente de reparto de los compuestos **13** y **29**, ya que estos son los productos de elección para la estandarización de los dos preparados fitoterapéuticos propuestos.

- Realizar estudios de toxicidad crónica y mutagenicidad con los dos preparados fitoterapéuticos, para así completar los parámetros de seguridad de los mismos.
- Realizar los estudios conducentes a establecer el mecanismo de acción antidiabético de las 4-fenilcumarinas, con el propósito de determinar si existe otro blanco de acción distinto a la inhibición de α -glucosidasas.
- Establecer protocolos de propagación de las especies *H. latiflora* y *H. standeyana*, para conformar cultivos controlados y evitar la depredación de las poblaciones silvestres.

10. Bibliografía

- Allen, A., Flemström, G. 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*. **288**: C1-C19.
- *Anales del Instituto Médico Nacional (AIMN)*. 1984. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. 218.
- Anaya Dávila Garibi, M. I. 1991. Estudio etnobotánico del complejo quina en México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Anderson, E. N., Canul, C. J., Dzib, A., Guido, S. F. 2005. *Las Plantas de los Mayas: etnobotánica en Quintana Roo*, México. ECOSUR, CONABIO.
- Andreo, M. A., Rodríguez Ballesteros, K. V., Hiruma-Lima, C. A., Machado da Rocha, L. R., Monteiro Souza Brito, A. R., Vilegas, W. 2006. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. *Journal of Ethnopharmacology*. **107**: 431-441.
- Aquino, R., D'Agostino, M., De Simone, F. y Pizza, C. 1988. 4-arylcoumarin glycosides from *Coutarea Hexandra*. *Phytochemistry*. **27**: 1827-1830.
- Arévalo, R. 1897. Estudio sobre la corteza de Copalchi. *Anales del Instituto Médico Nacional: Nueva recopilación de Monografías Mexicanas y Tesis Inaugurales de Materia Médica*. **2**: 66-70.
- Argotte-Ramos R., Ramírez-Ávila, G., Rodríguez-Gutiérrez, M.C., Ovilla-Muñoz, M., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M., González-Cortázar, M. y Álvarez, L. 2006. Antimalarial 4-phenylcoumarins from the stem bark of *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*. **69**: 1442-1444.
- Argueta, A. V., Cano, L. M. y Rodarte, M. E. (editores). 1994. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista. México, D.F. 1786 pp.
- Armijo JA. 2003. Farmacocinética: Absorción, Distribución y Eliminación de los Fármacos. *Farmacología Humana*, 4º ed. Masson. España.

- Avendaño, C. 2001. *Introducción a la Química Farmacéutica*. 2º ed. Ed. Mc Graw Hill. España.
- Bassoli, B. K., Cassolla, P., Borba-Murad, G. R., Constantin, J., Salgueiro-Pagadigorria, C. L., Bazotte, R. B., Ferreira da Silva, R. S., Medri de Souza, H. 2008. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochemistry and Function*. **26**: 320–328.
- Bastien, M. 1961. *Recherches sur les Copalchis, drogues hypoglycémiantes et en particulier sur le Coutarea latiflora DC (Rubiaceae)*. Dissertation, Faculté de Pharmacie de l'Université. Francia.
- Berebaum, M.C. 1989. What is synergy? *Pharmacological Reviews*. **1989**: 93-129.
- Borges de Melo, E., A. Silveira-Gomes, and I. Carvalho. 2006. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*. **62**:10277–10302.
- Borhidi, A. 2006. *Rubiaceas de México*. Akadémiai Kiadó. Budapest. 512 pp.
- Bremer, B., Andreasen, K., Olsson, D. 1995. Subfamilial and tribal relationship in the Rubiaceae based on rbcL sequence data. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **82**, 383–397.
- Brindis, F., Rodríguez, R., Bye, R., González-Andrade, M., Mata, R. 2010. (Z)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum porter*, an α -Glucosidase Inhibitor. *Journal of Natural Products*. **74**: 314-320.
- Bye, R. 2007. Investigación acerca del texto: Un estudio de la flora y sus usos en la Sierra Tarahumara. Chihuahua, México. 1885 por Dr. Edward Palmer.
- Bye, R.A. 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany*. **40**: 103-124.
- Camacho, M. R. 1990. Nuevos metabolitos secundarios de la *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex D.C.) y aislamiento de compuestos bioactivos del *Teloxys graveolens* (Wild) W. A. Weber. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México.
- Castillejos-Ramírez, E. V. 2013. Pruebas de composición e identidad de la droga cruda *Exostema caribaeum* (Rubiaceae). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México.

- Chávez-Piña, A., Sandoval, A., Arrieta, J., Reyes, B., Flores, A.M., Navarrete, A. 2009. Gastroprotective effect of β -lupeol: role of prostaglandins, sulfhydryls and nitric oxide. *Revista Latinoamericana de Química*. **37**: 133-143.
- Chen, X. W., Serag, E. S., Sneed, K. B., Zhou, S. F. 2011. Herbal bioactivation molecular targets and the toxicity relevance. *Chemico-Biological Interactions*. **192**: 161-176.
- Chung, C.P., Hsia, S.M., Lee, M.Y., Chen, H.J., Cheng, F., Chan, L.C., Kuo, Y.H., Lin, Y.L., Chiang, W. 2011. Gastroprotective activities of Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) on the growth of the stomach cancer AGS cell line and indomethacin-induced gastric ulcers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59**: 6025-6033.
- Cirak, C., Radusiene, J., Janulis, V., Ivanauskas, L. 2007a. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. *Botanica Helvetica*. **117**: 29-36.
- Cirak, C., Radusiene, J., Ivanuskas, L., Janulis, V. 2007b. Variation of bioactive secondary metabolites in *Hypericum origanifolium* during its phenological cycle. *Acta Physiologiae Plantarum*. **29**: 197-203.
- Cristians, S. 2009. Investigación Farmacológica y Química de las hojas de *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Rubiaceae): una contribución para la elaboración de su monografía tipo OMS. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. México.
- Cristians, S., Gurerrero-Analco, J.A., Pérez-Vásquez, A., Palacios-Espinosa, F., Ciangherotti, C., Bye, R. y Mata, R. 2009. Hypoglycemic Activity of Extracts and Compounds from the Leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: Potential Alternatives to the Use of the Stem Bark of These Species. *Journal of Natural Products*. **72**: 408-413.
- Croizet, A., Del Rio, D., Clifford, M. N. 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*. **31**: 446-467.

- D'Agostino, M., De Feo, V., De Simone, F., Vincieri, F.F., C. Pizza. 1988. Isolation of 8-hydroxy-5,7,3',4'-tetramethoxy-4-phenylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Planta Medica*. **55**: 578.
- Déciga-Campos, M., Guerrero-Analco, J. A., Quijano, L., Mata, R. Antinociceptive activity of 3-O- β -D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae). 2006. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. **83**: 342-348.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Ángeles-López, G.E., Navarrete, A. y Mata, R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **110**: 334-342.
- Díaz, J. L. (editor). 1976. *Usos de las plantas medicinales de México: monografías científicas I y II*. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. México, D.F. 358 y 329 p.
- Dixon, M. 2001. Pathology of gastritis and peptic ulceration. En: Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L. (eds.) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press. Washington. 459-469.
- El-Kaissi, S., Sherbeeni, S. 2011. Pharmacological Management of Type 2 Diabetes Mellitus: An Update. *Current Diabetes Reviews*. **7**: 392-405.
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., Mata, R. 2012. α -Glucosidase Inhibitor of *Brickellia cavanillesii*. *Journal of Natural Products*. **75**: 968-974.
- Figueredo, C. A., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Scheffer, J. J. C. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. **23**: 213-226.
- Gadamasetti, K. 1999. *Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry*. Ed. Marcel Dekker. E.U.A.
- Gao, D., Li, N., Li, Q., Li, J., Han, Z., Fan, Y. y Liu, Z. 2008. Study of the extraction, purification and antidiabetic potential of ursolic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *Therapy*. **5**: 697-705.

- Gentry, H.S. 1962. The Warihío Indians of Sonora-Chihuahua: an ethnographic survey. *Bureau of American Ethnology Bulletin*. **186**: 61-144.
- Gentry, H.S. *Río Mayo Plants: a study of the flora and vegetation of the Valley of the Río Mayo, Sonora*. Carnegie Institution of Washington. Washington, D.C. 1942. 328 p.
- Gibaldi M. 1991. *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. 4º ed. Lea & Febilger.
- González-Chevez I., Hersch-Martínez, P. Juárez Miranda, A. Pérez Cardona, A. 2000. Plantas medicinales de Copalillo y Temalac, Guerrero. *Serie Patrimonio Vivo 5, México: Actores Sociales de la Flora Medicinal en México*. **5**: 27–28.
- Guerrero-Analco, J. A., Hersch-Martínez, P., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R. 2005. Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Medica*. **71**: 1099-1105.
- Guerrero-Analco, A., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A. y Mata, R. 2007. Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry*. **68**: 2087-2095.
- Gutiérrez, J. P., 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 2012: Resultados Nacionales*. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca. 196 pp.
- Hernández, F. *Historia de las plantas de Nueva España*. Tomo II, Libros 3 y 4 (1615). Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Imprenta Universitaria. México, D.F. 1943. 413 pp.
- Hiraishi, H., Shimada, T., Ivey, K.J., Terano, A. 1999. Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **289**: 103-109.
- Hoogerwerf, W. A., Pasricha, P. J. 2003. Fármacos utilizados para el control de la acidez gástrica y el tratamiento de úlceras pépticas y enfermedad por reflujo gastroesofágico. En: Hardman, J. G., Limbird, L. E. (eds.). *Goodman & Gilman: las bases farmacológicas de la terapéutica*. 10 ed. McGraw Hill. México. 2049 pp.

- Irvine D.J., Takahashi L., Lockhart K., Cheong J., Tolan J.W., Selick H.E., Grove J.R. 1999. MDCK (Madin–Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **88**: 28-33.
- Israili, Z. H. 2011. Advances in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *American Journal of Therapeutics*. **18**: 117-152.
- Kaiser H., H. Geyer. 1955. Beitrage zur pharmacognosie, chemie, und pharmakologie der rinde von *Coutarea latiflora* DC und zur kenntnis der copalchi rinden. *Planta Medica*. **3**:186-187.
- Krebs, K. G., Griesinger, E. 1960. Ingredients of the bark of *Exostema caribaeum*. *Arzneimittel-Forschung*. **10**: 32-33.
- Konchar, K., Li, X. L., Yang, Y. P., Emshwiller, E. 2011. Phytochemical Variation in *Fritillaria cirrhosa* D. Don (*Chuan Bei Mu*) in Relation to Plant Reproductive Stage and Timing of Harvest. *Economic Botany*. **65**: 283-294.
- Korec, R., Heinz-Sensch, K. y Zoukas, T. 2000. Effects of the neoflavonoid coutareagenin, one of the antidiabetic active substances of *Hintonia latiflora*, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Drug Research*. **50**: 122-128.
- Korecova, M., Hladicova, M. y Korec, R. 2006. *Hintonia latiflora* in patients with type 2 diabetes: a long-term study. *Zeitschrift für Phytotherapie*. **27**: 272-278.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedures of the National Academy of Sciences*. **102**: 8369-8374.
- Lachman L., Lieberman A.H., Kanig L.J. 1986. *The theory and practice of industrial pharmacy*. 3° ed. Lea & Febiger. E.U.A.
- Landa, E. 1913. Estudio del Copalchi de Jojutla (*Coutarea latiflora*). *Anales del Instituto Médico Nacional*. **XII**: 146-158.
- Linares, E., y Bye, R. 1987. A study of four medicinal plants complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*. **19**, 153-83.
- Little, L. E., Wadsworth, H. F., Marrero, J. 2001. Árboles Comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes. 2a ed. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. San Juan. 347 pp.

- Loaeza, A. 1906. Informes de trabajos realizados en el mes de enero al mes de noviembre de 1906. *Anales del Instituto Médico Nacional*. **VIII**: 408, 510.
- Loaeza, A. 1907. Informes de trabajos realizados del mes de enero al mes de noviembre de 1907. *Anales del Instituto Médico Nacional*. **IX**: 178, 246.
- Loaeza, A. 1908. Informes de los trabajos realizados del mes de enero al mes de junio de 1908. *Anales del Instituto Médico Nacional*. **X**: 154-155.
- López-Hernández, O.D., Torres-Amaro, L., González-Sanabia, M.L. Rodríguez-Ferradá, C.A. 2008. Estudio de secado por aspersion hasta escala de banco del extracto acuosos de *Boerhaavia erecta* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **13**:1-5.
- Lorke, D. 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*. **54**: 275–287.
- Maldonado-López, Y., Linares-Mazari, E., Bye, R., Delgado, G., Espinosa-García, F.J. 2008. Mexican Arnica Anti-Inflammatory Action: Plant Age is Correlated with the Concentration of Anti-Inflammatory Sesquiterpenes in the Medicinal Plant *Heteroteca inuloides* Cass. (Asteraceae). *Economic Botany*. **62**:161-170.
- Martínez, M. *Las plantas medicinales de México*. Ed. Botas. México D.F. 1989. 656 pp.
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., Ribes, G. 1998. Experimental NIDDM: Development of a New Model in Adult Rats Administered Streptozotocin and Nicotinamide. *Diabetes*. **47**: 224-229.
- Mata R. *Estudios químicos y aspectos biológicos de algunas plantas usadas en la medicina tradicional de México*. La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Secretaría de Salud. México. D. F. 1993. p 143-156.
- Mata, R. Calzada, F., García, R. M., Reguero, M. T. 1987. Chemical studies on plants used in traditional medicine, III: New 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *Journal of Natural Products*. **51**: 851-856.
- Mata, R. Calzada, F., García, R. M. 1988. Chemical studies on plants used in traditional medicine, III: New 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *Journal of Natural Products*. **55**: 866-871.

- Mata, R., Camacho, M.R., Mendoza, S. y Cruz, M.C. 1992. A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **31**: 3199-3201.
- Mata R., Camacho, M.R., Cervera, E., Bye, R. y Linares E. 1990. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **29**: 2037-2040.
- Mata, R., Acevedo, L., Méndez-Bautista, D. I., Guerrero-Analco, J. A., Rivero, B. y Rodríguez, J. M. 2008. Development and validation of Liquid Chromatography Method for quantification of the active markers of *Hintonia standleyana* and *Hintonia latiflora* crude drugs. *Pharmaceutical Biology*. **46**: 105-110.
- Mata, R., Camacho, M.R., Cervera, E., Bye, R. y Linares, E. 1990. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **29**: 2037-2040.
- Matsuda, H., Li, Y., Yoshikawa, M. 1999. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sciences*. **65**: 27-32.
- Matsui, T., Ogunwande, I. A., Abesundara, K. J. M. y Matsumoto, K. 2006. Antihyperglycemic Potential of Natural Products. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. **6**: 349-356.
- McCarter, J.D., Withers, S.G. 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*. **4**: 885-892.
- McCarty, M.F. 2005. Nutraceutical resources for diabetes prevention: an update. *Medical Hypotheses*. **64**: 151-158.
- Miranda, H., Sierralta, F., Pinaridi, G. 2001. An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception. *Anesthesia & Analgesia*. **93**: 430-435.
- Monforte, M.T., Lanuzza, F., Pergolizzi, S., Mondello, F., Tzakou, O., Galati. 2012. Protective effect of *Calamintha officinalis* Moench leaves against alcohol-induced gastric mucosa injury in rats. Macroscopic, histologic and phytochemical analysis. *Phytotherapy Research*. **26**: 839-844.
- Mociño, J.M. 1802. *Discurso de apertura de las lecciones de botánica en México*. Anales de Historia Nacional 1799–1804. III: 288-296.

- Monroy, O. C., Castillo-España, P. 2007. *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos*. 2a ed. Editorial UAEM. Cuernavaca. 405 pp.
- Navarrete, A., Trejo-Miranda, J.L., Reyes-Trejo, L. 2002. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrateaceae) with gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **79**: 383-388.
- Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Diario Oficial de la Federación, Primera Sección, viernes 9 de mayo de 1999
- Noster, S. y Kraus, L. 1990. In vitro Antimalarial activity of *Coutarea latiflora* and *Exostema caribaeum* extracts on *Plasmodium falciparum*. *Planta Medica*. **56**: 63-65.
- Oh, C. J., Park, C. I., Yang, C. H. y Park, J. W. 2007. Ursolic acid regulates high glucose-induced apoptosis. *Free Radical Research*. **41**: 638-644.
- Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y. 1999. Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **47**:550-553.
- Olmedo, D., Rodríguez, N., Vásquez, Y., Solís, P.N., López-Pérez, J.L., Feliciano, A.S., Gupta, M.P. 2007. A new coumarin from the fruits of *Coutarea hexandra*. *Natural Product Research*. **21**:625-631.
- Pacifici G.M., Viani A. 1992. Methods for Determining Plasma and Tissue Binding of Drugs: Pharmacokinetics Consequences. *Clinical Pharmacokinetics*. **23** (6): 449-468.
- Paris, R.R. y Bastien M. 1960. À propos de l'action hypoglycémique de 2 drogues nommée "copalchi": *Coutarea latiflora* (Rubiaceae) and *Croton niveus* (Euphorbiaceae). *Annales Pharmaceutiques Francaises*. **18**: 205-219.
- Pinto, A., Capasso, A. y Sorrentino, L. 1997. Experimental animal studies on the hypoglycemic effects of a copalchi extract. *Drug Research*. **47**: 829-833.
- Reguero, M.T., Mata, R., Bye, R., Linares, E. y Delgado, G. 1987. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine: cucurbitacines from *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*. **50**: 315-316.
- Reher, G. y Kraus, L. 1984. New neoflavonoids from *Coutarea latiflora*. *Journal of Natural Products*. **47**: 172-174.

- Rivero, M.D. y Ramírez, E. 1940. La infección por el *Haemoproteus columbae* en la investigación de la actividad antimalárica de *Coutarea latiflora*. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*. **1**:245-264.
- Robert, A. 1979. Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology*. **77**: 761-767.
- Roca, B. 2003. Rhabdomyolysis and hemolysis after use of *Coutarea latiflora*. *American Journal of Medicine*. **115**: 677.
- Rojas, A., Hernández, L., Pereda-Miranda R. y Mata, R. 1992. Screening for antimicrobial activity of crude extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **35**: 275-283.
- Rzedowsky, J. 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa. México, D.F. 432 pp.
- Salim, S. 1999. Role of oxygen-derived free radicals in mechanism of acute and chronic duodenal ulceration in the rat. *Digestive Diseases and Sciences*. **35**: 73-79.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K. 2011. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. **403**: 136-138.
- Sánchez-Viesca, F. 1969. Structure of exostemin, a new 4-phenylcoumarin isolated from *Exostema caribaeum*. *Phytochemistry*. **8**: 1821-1823.
- Sahagún, B. (1540–1585). *Historia general de las cosas de Nueva España. Primera versión íntegra del texto castellano del manuscrito conocido como Códice Florentino*. Introducción, paleografía, glosario y notas de Alfredo López Austin y Josefina García Quintana. 2 vols. Alianza Editorial Quinto Centenario. Madrid, 1988.
- Shen, W., Qui, R., Zhang, J., Wang, Z., Wang, H., Hu, C., Zhao, Y., Bie, M., Wang, Y., Fu, Y., Chen, M., Lu, D. 2012. Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. *Brain Research Bulletin*. **88**: 487-494.
- Scherer, R., Godoy, H. T. 2008. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*. **112**: 654-658.
- Scully, T. 2012. Diabetes in numbers. *Nature*. **45**: S2-S3.

- Skopinski, P., Szafilik, J., Duda-Krol, B., Nartowska, J., Sommer, E., Chorostowska-Wynimko, J., Demkow, U. y Skopinska-Rozewdka, E. 2004. Suppression of angiogenic activity of sera from diabetic patients with non-proliferative retinopathy by compounds of herbal origin and sulindac sulfone. *International Journal of Molecular Medicine*. **14**: 707-711.
- Stamp, N., Bradfield, M., Li, S., Alexander, B. 2004. Effect of Competition on Plant Allometry and Defense. *The American Midland Naturalist*. **151**: 50-64.
- Stranczinger, S., Szentpéteri, J. L., y Borhidi, A. (2006). Sequence differentiation between some DNA regions of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana*. *Acta Botanica Hungarica*. **48**: 435-440.
- Sworbrick J. y Boylan C.J. 2002. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. 2º ed. Marcel Dekker. E.U.A.
- Tapia, A., Rodríguez, J., Theoduloz, C., López, S., Feresin, E.G., Schmeda-Hirschmann, G. 2004. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology*. **95**: 155-161.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*. 4a ed. Sinauer Associates Publishers. Sunderland. 764 pp.
- Terres, J. 1913. Informe rendido por el Director del Instituto a la Secretaría de Instrucción Pública y Bellas Artes de los trabajos realizados por el establecimiento del 1 de julio de 1911 al 31 de diciembre de 1912. *Anales del Instituto Médico Nacional*. **XII**: 104, 109, 118, 129.
- Van Dam, R. M. 2006. Coffee and type 2 diabetes: From beans to beta-cells. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. **16**: 69-77.
- Vakil, N., Megraud, F. 2007. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. **133**: 985-1001.
- Vierling, C.. *Zum vasodilatierenden Effekt des antidiabetisch wirkenden Hintonia-latiflora-Extraktes: In-vitro- und In-vivo-Messungen*. Tesis de Doctorado. Universidad de Munich. Munich, 2005. pp 154.

- Wallace, J. L. 2001. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. *The American Journal of Medicine*. **110**: 19-23.
- Wan B.Y.C., Gottfried S. 1985. Cytoprotective action of carbenoxolone sodium on ethanol-induced gastric lesions in rats and its inhibition by indomethacin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **37**: 739-741.
- Watson, S. 1886. List of plants collected by Dr. Edward Palmer in Southwestern Chihuahua, Mexico, en 1885. Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences. **21**:414-445.
- Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K. Toiovonen, P. 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*. **20**: 305-311.
- Williamson, G., Dionisi, F., Renouf, M. 2011. Flavanols from green tea and phenolic acids from coffee: Critical quantitative evaluation of the pharmacokinetic data in humans after consumption of single doses of beverages. *Molecular Nutrition Food Research*. **55**: 864-873.
- Wu, X., Lin, S., Zhang, X. 2012. Antioxidant and antiapoptotic properties of chlorogenic acid on human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Medicinal Plants Research*. **6**: 708-715.
- Zhang, W., Hong, D., Zhou, Y., Zhang, Y., Shen, Q., Li, J., Hu, L., Li, J. 2006. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*. **10**: 1505-1512.
- Zhou, D. S., Wang, C. Z., van Loon, J. J. A. 2009. Chemosensory basis of behavioural plasticity in response to deterrent plant chemicals in the larva of the Small Cabbage White butterfly *Pieris rapae*. *Journal of Insect Physiology*. **55**: 788-792.

11. Anexos

Cuadro A1. Resultados experimentales de las curvas de calibración de los compuestos 13 y 29

Réplica	13		29	
	µg/mL	ABC	µg/mL	ABC
1	50	1131449	150	7845282
2	50	1147891	150	8526022
3	50	1220855	150	8142477
4	50	1219507	150	8665099
5	50	1200158	150	7533505
Promedio	1183972 ± 18635.4		8142477 ± 209691.7	
1	25	593007	75	3814216
2	25	593249	75	3698824
3	25	614797	75	3731230
4	25	610873	75	3757685
5	25	623941	75	4069126
Promedio	607173 ± 6113.7		3814216 ± 66474.4	
1	10	238934	30	1685515
2	10	237154	30	1605136
3	10	247876	30	1602576
4	10	247151	30	1580443
5	10	271088	30	1552010
Promedio	248441 ± 6052.5		1605136 ± 22248.0	
1	5	114216	15	819945
2	5	113994	15	777316
3	5	115418	15	796577
4	5	111748	15	797603
5	5	122799	15	791442
Promedio	115635 ± 1886.6		796577 ± 6871.9	

1	1	15156	3	161193
2	1	15312	3	132725
3	1	15676	3	156835
4	1	16028	3	146499
5	1	18550	3	135242
Promedio		16144 ± 620.1		146499 ± 5653.3

Cuadro A2. Resultados experimentales de los compuestos **13** y **29** referentes a la exactitud del método

Réplica	13				29			
	Cantidad adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	ABC ($\mu\text{V}\times\text{seg}$)	Cantidad recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	% recobro	Cantidad adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	ABC ($\mu\text{V}\times\text{seg}$)	Cantidad recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	% recobro
1	3	71256	2.94	98.04	9	443890	9.15	101.71
2	3	71424	2.95	98.27	9	443043	9.14	101.53
3	3	72775	3.00	100.17	9	442813	9.13	101.48
4	3	71667	2.96	98.61	9	444591	9.17	101.85
5	3	72681	3.00	100.03	9	433732	8.97	99.62
6	3	72463	2.99	99.73	9	434280	8.98	99.73
1	15	355321	14.89	99.25	45	2385087	45.06	100.13
2	15	351902	14.74	98.29	45	2392675	45.20	100.44
3	15	351737	14.74	98.25	45	2372189	44.82	99.60
4	15	366302	15.35	102.33	45	2345417	44.32	98.50
5	15	355156	14.88	99.20	45	2340578	44.24	98.30
6	15	355922	14.91	99.42	45	2346741	45.06	98.55
1	45	1053990	44.27	98.38	135	7193484	134.00	99.26
2	45	1074542	45.13	100.30	135	7184125	133.82	99.13
3	45	1093608	45.94	102.08	135	7253266	135.10	100.08
4	45	1077966	45.28	100.62	135	7185302	133.84	99.14
5	45	1104190	46.38	103.07	135	7213850	134.37	99.54
6	45	1098252	46.13	102.52	135	7260416	135.23	100.17

Cuadro A3. Resultados experimentales de los compuestos **13** y **29** referentes a la precisión del método

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Repetitividad (% CV)
13	15	0.54
29	45	1.19

Cuadro A4. Efecto de las etapas fenológicas en la concentración de metabolitos biodinámicos en la infusión de hojas de *H. latiflora*

	Fenología (concentración mg/g DC)									
	Pre-senescencia (Agosto '09)	df	q	Senescencia (Octubre '09)	df	q	Renovación foliar (Abril '10)	df	q	Floración (Julio '10)
Compuesto 29 (CGA)	8.08 \pm 1.51 ^a	35	4.78 [*]	11.30 \pm 1.52 ^a	35	6.66 ^{***}	9.46 \pm 0.57 ^a	35	5.02 ^{**}	3.84 \pm 0.31
4- Fenilcumarinas (4FC's)	8.51 \pm 0.31 ^b	35	5.02 ^{**}	10.17 \pm 1.65 ^a	35	5.40 ^{**}	13.12 \pm 0.16 ^a	35	8.61 ^{***}	5.21 \pm 0.72
Compuesto 6 (4FC-1)	0.58 \pm 0.01 ^a	35	3.99 [*]	1.20 \pm 0.13 ^c	35	4.30 [*]	0.73 \pm 0.20	35	ns	1.15 \pm 0.15
Compuesto 14 (4FC-2)	1.31 \pm 0.06 ^b	35	4.62 [*]	2.17 \pm 0.24 ^c	35	5.42 ^{**}	2.31 \pm 0.18 ^a	35	4.37 [*]	1.51 \pm 0.21
Compuesto 13 (4FC-3)	4.75 \pm 0.30 ^a	35	7.30 ^{***}	3.95 \pm 1.04 ^a	35	5.85 ^{**}	5.71 \pm 0.13 ^a	35	9.03 ^{***}	0.71 \pm 0.22
Compuesto 4 (4FC-4)	1.86 \pm 0.38 ^b	35	6.43 ^{***}	2.86 \pm 0.53 ^b	35	3.88 [*]	4.37 \pm 0.39 ^a	35	6.45 ^{***}	1.85 \pm 0.18

Concentración promedio \pm EE (mg/g DC) ^a $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una comparación múltiple de Tukey en relación a la etapa de Floración; ^b mismo tratamiento estadístico con respecto a la etapa de Renovación foliar; ^c mismo tratamiento estadístico con respecto a la etapa de Pre-senescencia. ^{*} $p < 0.05$; ^{**} $p < 0.01$; ^{***} $p < 0.005$. df: grados de libertad, q: diferencia entre medias.

Cuadro A5. Diferencias ente las poblaciones de Chihuahua y Michoacán en relación a la concentración de compuestos biodinámicos de la infusión de hojas de *H. latiflora*

	Localización geográfica (concentración mg/g DC)		
	Michoacán	Chihuahua	Valor P
Compuesto 29 (CGA)	3.55 ± 0.22	3.68 ± 0.42	ns
4-Fenilcumarinas (4FC's)	7.82 ± 0.82 *	5.15 ± 0.48	0.0181
Compuesto 6 (4FC-1)	3.62 ± 0.52 **	1.55 ± 0.20	0.0023
Compuesto 14 (4FC-2)	1.77 ± 0.30	1.13 ± 0.13	ns
Compuesto 13 (4FC-3)	0.63 ± 0.14	0.68 ± 0.06	ns
Compuesto 4 (4FC-4)	1.79 ± 0.14	1.78 ± 0.18	ns

Cada valor es la media \pm EE para siete individuos de cada localidad analizada. $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. ns: sin diferencia significativa.

Cuadro A6. Efecto agudo de CHL (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)						
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h	
Control (vehículo)	-	157.88	0	-1.02 \pm 4.03	-6.12 \pm 4.26	-12.87 \pm 3.32	-12.83 \pm 3.59	-9.37 \pm 4.15	
Glibenclamida	10	152.75	0	-40.01 \pm 3.03*	-45.61 \pm 2.68*	-46.7 \pm 1.75*	-47.42 \pm 5.44*	-40.39 \pm 5.68*	
CHL	100	154.38	0	-15.25 \pm 4.68	-23.9 \pm 4.74	-29.6 \pm 7.13	-45.51 \pm 8.17*	-47.26 \pm 7.07*	
CHL	300	149.13	0	-17.36 \pm 4.14	-43.7 \pm 7.99*	-49.31 \pm 7.53*	-54.97 \pm 6.19*	-53.61 \pm 5.73*	
CHL	500	154.71	0	-25.45 \pm 10.48	-46.81 \pm 4.92*	-59.82 \pm 5.18*	-62.09 \pm 7.74*	-60.67 \pm 5.51*	

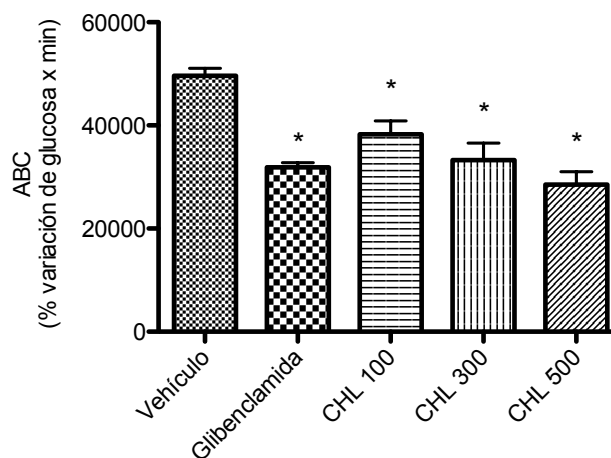


Figura S1. Efecto agudo de CHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A7. Efecto agudo de CHL (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)						
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h	
Control (vehículo)	–	238.00	0	9.01 \pm 5.81	-12.16 \pm 3.63	-3.68 \pm 5.18	-9.97 \pm 3.48	-18.19 \pm 4.53	
Glibenclamida	10	225.17	0	-29.19 \pm 4.57*	-38.07 \pm 3.95*	-50.54 \pm 4.39*	-49.42 \pm 4.01*	-54.95 \pm 2.55*	
CHL	100	229.33	0	-12.59 \pm 4.68	-12.49 \pm 3.09	-16.96 \pm 5.37	-20.47 \pm 2.28	-28.57 \pm 4.1	
CHL	300	198.43	0	-10.17 \pm 3.73	-19.63 \pm 3.82*	-21.9 \pm 5.72*	-20.85 \pm 4.39	-36.02 \pm 2.33*	
CHL	500	199.00	0	-12.38 \pm 2.71	-17.63 \pm 4.77	-21.79 \pm 2.87*	-21.98 \pm 2.89*	-24.44 \pm 3.96	

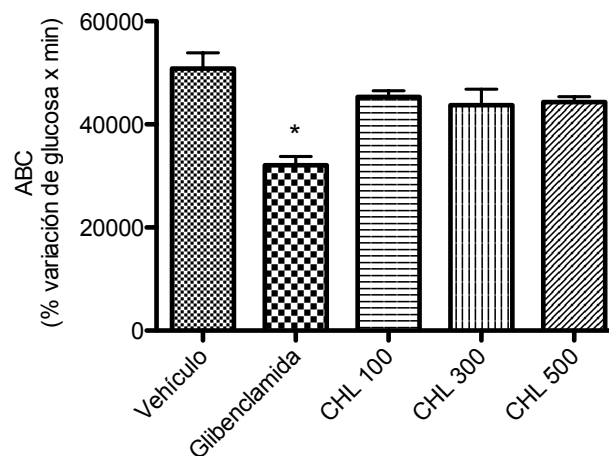


Figura S2. Efecto agudo de CHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A8. Efecto agudo de HHL (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	-	159.63	0	-2.50 \pm 2.65	-8.81 \pm 2.98	-22.87 \pm 4.59	-21.66 \pm 4.0	-30.71 \pm 4.73
Glibenclamida	10	163.88	0	-41.04 \pm 2.12*	-44.96 \pm 4.24*	-50.25 \pm 3.35*	-45.61 \pm 4.19*	-51.26 \pm 2.96*
HHL	100	167.63	0	-13.41 \pm 1.79	-14.66 \pm 3.84	-30.98 \pm 5.11	-26.52 \pm 5.91	-26.69 \pm 4.89
HHL	300	179.00	0	-17.80 \pm 2.56	-18.30 \pm 4.92	-36.52 \pm 2.76	-31.24 \pm 4.19	-38.42 \pm 3.69
HHL	500	165.75	0	-12.57 \pm 3.36	-18.81 \pm 5.55	-29.43 \pm 4.71	-28.86 \pm 4.30	-34.79 \pm 6.47

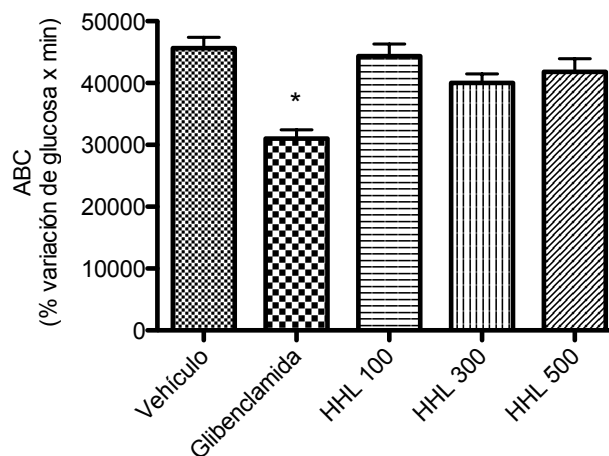


Figura S3. Efecto agudo de HHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A9. Efecto agudo de HHL (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	-	252.17	0	-19.88 \pm 2.41	-24.77 \pm 2.39	-16.20 \pm 4.88	-18.68 \pm 3.63	-16.36 \pm 2.38
Glibenclamida	10	210.83	0	-32.34 \pm 4.95	-44.57 \pm 4.25*	-39.21 \pm 4.13*	-36.53 \pm 4.51*	-33.80 \pm 6.54*
HHL	100	215.83	0	-29.86 \pm 4.39	-36.39 \pm 2.89*	-30.03 \pm 3.49*	-35.32 \pm 3.54*	-33.96 \pm 4.48*
HHL	300	288.50	0	-30.72 \pm 4.85	-37.94 \pm 7.79*	-36.23 \pm 5.75*	-37.70 \pm 4.25*	-35.70 \pm 4.82*
HHL	500	222.00	0	-23.62 \pm 3.56	-35.99 \pm 3.79*	-33.77 \pm 5.06*	-34.23 \pm 2.47*	-32.91 \pm 4.19*

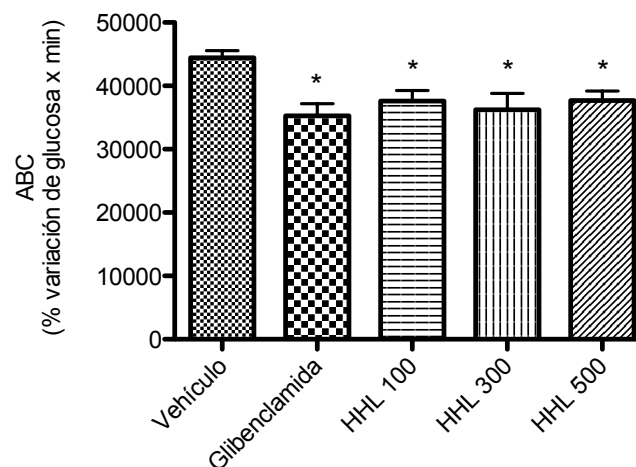


Figura S4. Efecto agudo de HHL en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A10. Efecto agudo CHS (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)						
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h	
Control (vehículo)	-	154.63	0	-0.23 \pm 0.9	-14.72 \pm 2.91	-11.78 \pm 2.94	-18.02 \pm 4.22	-30.13 \pm 3.33	
Glibenclamida	10	160.50	0	-15.79 \pm 1.92*	-28.94 \pm 3.84*	-25.42 \pm 6.04*	-31.67 \pm 5.5*	-39.78 \pm 4.08*	
CHS	100	148.13	0	-11.78 \pm 2.94*	-14.34 \pm 4.16	-14.09 \pm 3.87	-21.63 \pm 6.77	-29.22 \pm 3.66	
CHS	300	153.50	0	-8.68 \pm 1.47*	-9.5 \pm 1.68	-20.71 \pm 2.32	-21.71 \pm 2.54	-30.1 \pm 3.73	
CHS	500	164.25	0	-17.80 \pm 3.08*	-20.67 \pm 2.97	-24.81 \pm 3.47*	-32.87 \pm 2.98*	-39.65 \pm 1.85*	

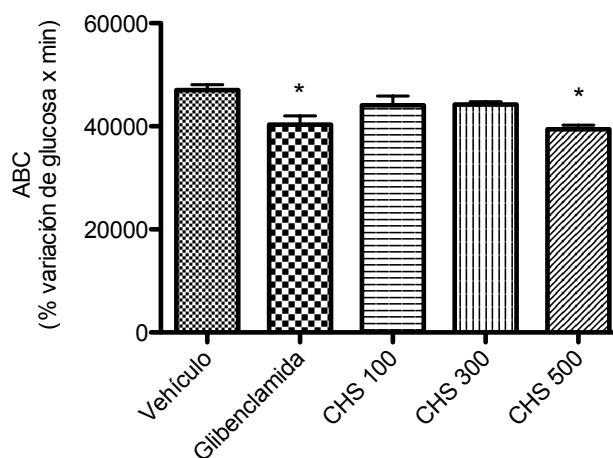


Figura S5. Efecto agudo de CHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEV, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A11. Efecto agudo CHS (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVIA, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	-	418.63	0	-0.87 \pm 7.44	-4.42 \pm 6.05	-5.31 \pm 4.83	-12.45 \pm 2.79	-14.7 \pm 2.32
Glibenclamida	10	355.14	0	-21.4 \pm 2.02*	-26.2 \pm 3.96*	-21.71 \pm 3.43*	-23.74 \pm 5.82*	-28.12 \pm 5.06*
CHS	100	309.75	0	-13.84 \pm 3.86*	-11.35 \pm 3.92	-6.55 \pm 2.75	-6.22 \pm 7.0	-24.28 \pm 4.06
CHS	300	363.63	0	-6.94 \pm 2.17	-10.67 \pm 4.04	-11.41 \pm 4.02	-2.8 \pm 4.23	-7.81 \pm 4.28
CHS	500	275.14	0	-6.88 \pm 3.26	-16.84 \pm 5.27*	-14.48 \pm 4.55	-14.09 \pm 5.72	-9.93 \pm 4.43

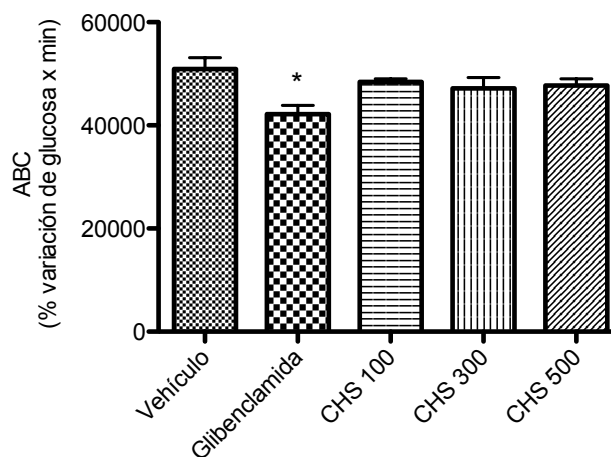


Figura S6. Efecto agudo de CHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVIA, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A12. Efecto agudo de HHS (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnett comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	-	130.62	0	3.03 \pm 5.03	-12.43 \pm 3.64	-9.33 \pm 3.21	-13.31 \pm 3.43	-18.71 \pm 5.33
Glibenclamida	10	142.12	0	-20.73 \pm 3.94*	-31.49 \pm 4.38*	-23.97 \pm 4.22*	-25.78 \pm 6.42*	-40.28 \pm 4.40*
HHS	100	136.00	0	-5.13 \pm 1.83	-14.25 \pm 7.76	-14.25 \pm 2.67	-19.95 \pm 2.77	-27.04 \pm 1.87
HHS	300	128.16	0	-9.83 \pm 5.20	-5.82 \pm 4.81	-9.56 \pm 6.56	-11.29 \pm 8.49	-27.45 \pm 7.09*
HHS	500	136.00	0	-13.53 \pm 1.58*	-16.88 \pm 6.40	-15.48 \pm 4.22	-19.69 \pm 3.58	-34.42 \pm 2.55

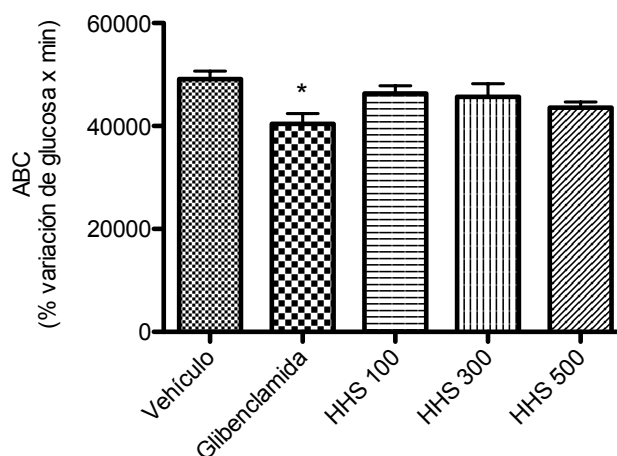


Figura S7. Efecto agudo de HHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa, seguido por una prueba de t de Dunnett comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A13. Efecto agudo de HHS (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	-	216.77	0	-0.69 \pm 4.71	-4.97 \pm 3.70	8.94 \pm 5.33	-0.43 \pm 4.58	-1.47 \pm 4.14
Glibenclamida	10	264.12	0	-15.42 \pm 5.06*	-25.77 \pm 4.52*	-23.26 \pm 4.14*	-31.60 \pm 2.71*	-27.99 \pm 3.41*
HHS	100	240.50	0	0.20 \pm 4.47	-9.81 \pm 4.18	-0.47 \pm 4.45	-4.12 \pm 4.27	-14.41 \pm 6.49
HHS	300	230.66	0	-1.55 \pm 5.31	-6.23 \pm 4.57	-5.27 \pm 3.97	-11.13 \pm 3.80	-15.84 \pm 3.78
HHS	500	218.33	0	-3.62 \pm 4.33	-11.97 \pm 2.28*	-7.97 \pm 4.54	-10.78 \pm 5.08	-8.77 \pm 7.78

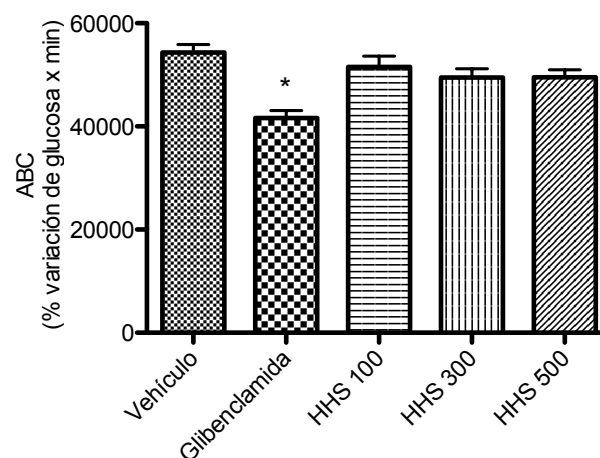


Figura S8. Efecto agudo de HHS en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A14. Efecto agudo de CEC (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	-	150.87	0	-4.90 \pm 1.97	-21.70 \pm 3.21	-19.55 \pm 2.61	-17.51 \pm 3.73	-30.20 \pm 6.14
Glibenclamida	10	156.50	0	-19.52 \pm 5.44	-26.51 \pm 4.43	-30.06 \pm 3.91*	-30.96 \pm 7.13	-32.45 \pm 4.96
CEC	100	158.83	0	-4.98 \pm 0.87	-14.51 \pm 4.89	-9.63 \pm 3.38	-11.69 \pm 3.71	-12.77 \pm 3.04
CEC	300	139.83	0	-7.53 \pm 3.00	-12.88 \pm 2.88	-10.71 \pm 2.26	-16.03 \pm 2.77	-23.28 \pm 1.90
CEC	500	161.66	0	-12.01 \pm 2.16	-18.26 \pm 2.54	-15.54 \pm 2.97	-22.10 \pm 1.53	-26.40 \pm 3.36

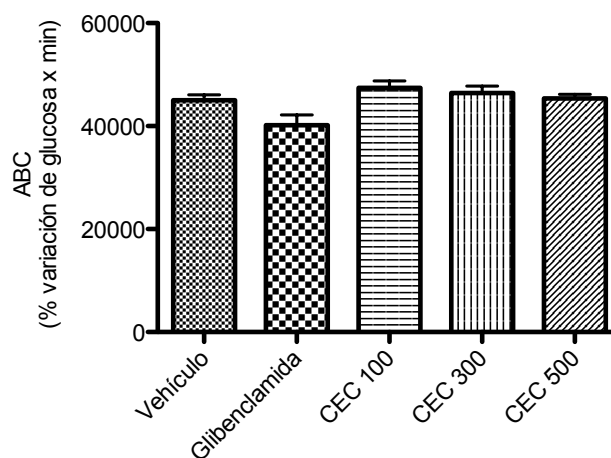


Figura S9. Efecto agudo de CEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A15. Efecto agudo de CEC (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	-	321.5	0	-4.8 \pm 2.2	-8.1 \pm 4.0	-2.4 \pm 2.7	-4.4 \pm 4.1	-10.8 \pm 4.3
Glibenclamida	10	323.4	0	-13.7 \pm 4.8*	-21.2 \pm 6.1*	-18.9 \pm 5.3*	-14.4 \pm 6.5	-22.9 \pm 6.5*
CEC	100	343.9	0	-8.0 \pm 2.3	-10.6 \pm 2.4	-4.4 \pm 3.1	-6.1 \pm 4.2	-8.1 \pm 4.4
CEC	300	249.3	0	-3.6 \pm 3.6	1.0 \pm 7.2	-1.8 \pm 6.4	3.6 \pm 7.6	-18.7 \pm 4.8
CEC	500	246.8	0	-13.4 \pm 3.0*	-15.7 \pm 2.5*	-23.2 \pm 5.6*	-22.9 \pm 5.9*	-41.4 \pm 6.0*

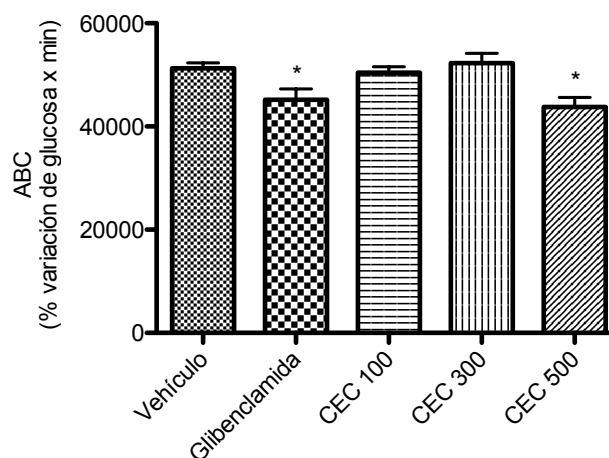


Figura S10. Efecto agudo de CEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A16. Efecto agudo de HEC (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnett comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	-	153.88	0	-3.84 \pm 1.82	-18.62 \pm 3.80	-21.52 \pm 4.37	-21.14 \pm 5.06	-31.65 \pm 3.57
Glibenclamida	10	158.25	0	-19.00 \pm 3.47*	-30.75 \pm 5.40*	-28.37 \pm 5.45	-35.49 \pm 6.28*	-38.64 \pm 4.92
HEC	100	152.17	0	-7.22 \pm 3.10	-12.11 \pm 2.51	-9.79 \pm 2.26	-15.91 \pm 2.73	-22.93 \pm 5.29
HEC	300	156.38	0	-9.25 \pm 2.18	-8.65 \pm 3.46	-6.84 \pm 3.01	-4.97 \pm 3.64	-24.31 \pm 2.77
HEC	500	148.63	0	-9.93 \pm 2.83	-12.05 \pm 4.27	-17.80 \pm 3.10	-17.26 \pm 2.19	-21.80 \pm 4.09

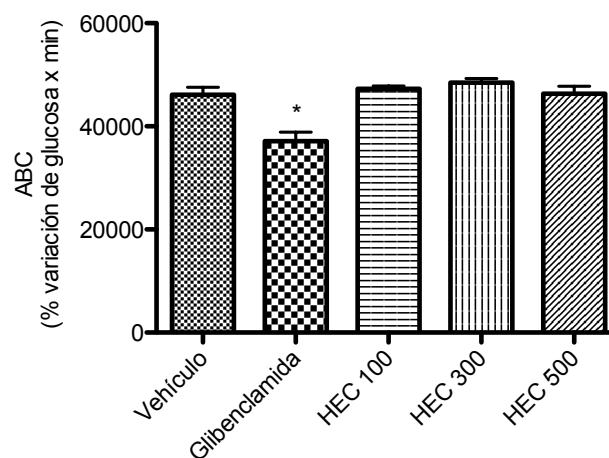


Figura S11. Efecto agudo de HEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa, seguido por una prueba de t de Dunnett comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A17. Efecto agudo de HEC (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	–	199.20	0	-5.10 \pm 5.10	-4.20 \pm 10.62	-10.82 \pm 12.08	-8.72 \pm 11.01	-20.40 \pm 8.61
Glibenclamida	10	356.67	0	-13.5 \pm 3.44	-25.06 \pm 7.37*	-28.64 \pm 6.02	-23.93 \pm 6.23	-25.21 \pm 7.48
HEC	100	320.63	0	-3.65 \pm 2.56	-8.84 \pm 4.93	-4.59 \pm 4.75	-4.38 \pm 6.57	-9.53 \pm 7.53
HEC	300	420.57	0	-5.85 \pm 6.13	-8.76 \pm 5.42	-7.12 \pm 8.15	-11.21 \pm 10.43	-10.42 \pm 10.79
HEC	500	451.57	0	-32.57 \pm 3.34*	-36.11 \pm 7.03*	-43.14 \pm 8.02*	-46.67 \pm 10.12*	-52.42 \pm 9.75*

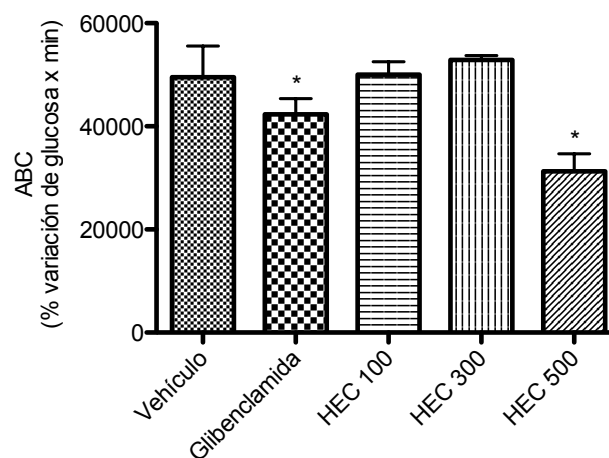


Figura S12. Efecto agudo de HEC en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en área bajo la curva (ABC; % variación de glucosa \times min). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa, seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada tratamiento con el vehículo.

Cuadro A18. Efecto de CHL (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnett comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	-	142.33	0	55.35 \pm 10.35	13.96 \pm 3.99	13.96 \pm 6.58	20.64 \pm 3.95	-6.35 \pm 4.65
Acarbosa	3	169.50	0	15.29 \pm 3.36*	4.76 \pm 5.68	0.61 \pm 4.4	-0.52 \pm 4.98*	-17.34 \pm 3.04
CHL	100	144.38	0	56.11 \pm 9.64	23.94 \pm 11.2	18.08 \pm 8.93	6.6 \pm 11.98	-21.66 \pm 8.77*
CHL	300	142.17	0	59.5 \pm 6.18	21.9 \pm 14.65	6.22 \pm 13.51	-2.75 \pm 10.8	-31.24 \pm 5.95*
CHL	500	144.17	0	28.01 \pm 8.27	6.71 \pm 11.32	-0.43 \pm 7.86	-9.06 \pm 10.66	-20.21 \pm 6.22*

Cuadro A19. Efecto de CHL (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnett comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)				
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
Control (vehículo)	-	209.67	0	86.62 \pm 10.81	45.59 \pm 8.59	39.53 \pm 9.72	36.24 \pm 15.32
Acarbosa	3	195.17	0	12.04 \pm 3.65*	4.76 \pm 5.68*	0.61 \pm 4.4*	-0.52 \pm 4.98*
CHL	100	203.80	0	49.05 \pm 16.58	37.09 \pm 10.82	50.81 \pm 23.02	40.55 \pm 10.58
CHL	300	194.40	0	29.19 \pm 7.74*	20.08 \pm 9.41	10.68 \pm 11.05	7.12 \pm 9.43*
CHL	500	186.60	0	16.18 \pm 5.49*	11.28 \pm 6.22*	-0.21 \pm 6.93*	-9.65 \pm 6.22*

Cuadro A20. Efecto de HHL (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnett comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	167.00	0	16.73 \pm 3.84	-0.70 \pm 2.80	-2.25 \pm 2.21	-2.80 \pm 3.87	-22.22 \pm 5.11
Acarbosa	3	179.67	0	1.41 \pm 5.74*	0.50 \pm 5.13	-6.21 \pm 5.50	-5.68 \pm 4.14	-22.50 \pm 3.28
HHL	100	166.75	0	6.60 \pm 5.66	1.74 \pm 7.02	-4.17 \pm 5.38	-14.48 \pm 7.36	-24.05 \pm 6.91
HHL	300	157.50	0	11.54 \pm 9.42	-2.34 \pm 5.87	-5.44 \pm 7.81	-11.29 \pm 6.63	-21.40 \pm 8.25
HHL	500	158.13	0	27.32 \pm 11.19	14.67 \pm 8.98*	9.88 \pm 8.60	-3.50 \pm 10.64	11.85 \pm 31.99

Cuadro A21. Efecto de HHL (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnett comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	231.00	0	48.83 \pm 5.82	14.64 \pm 6.68	14.41 \pm 6.38	7.42 \pm 5.47	-7.09 \pm 4.63
Acarbosa	3	182.33	0	15.71 \pm 7.82*	10.00 \pm 7.42	2.46 \pm 5.35*	-9.55 \pm 4.04*	-6.63 \pm 5.89
HHL	100	181.00	0	35.76 \pm 4.14	18.55 \pm 9.81	14.83 \pm 5.67	4.46 \pm 4.05	-8.22 \pm 2.70
HHL	300	192.17	0	36.49 \pm 8.65	22.00 \pm 7.95	18.57 \pm 12.03	16.81 \pm 10.67	1.35 \pm 7.01
HHL	500	214.25	0	23.83 \pm 4.41*	19.04 \pm 7.82	8.09 \pm 7.33	3.17 \pm 5.91	-18.39 \pm 5.23*

Cuadro A22. Efecto de CHS (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	139.75	0	29.34 \pm 6.44	14.08 \pm 4.99	7.98 \pm 5.23	3.54 \pm 5.20	-10.88 \pm 6.36
Acarbosa	3	155.50	0	2.43 \pm 2.62*	-0.32 \pm 1.84*	-3.04 \pm 2.82*	-5.17 \pm 1.83	-10.10 \pm 4.08
CHS	100	136.83	0	10.71 \pm 2.95*	8.94 \pm 4.74	1.81 \pm 2.95	-3.58 \pm 5.57	-13.52 \pm 2.97
CHS	300	141.83	0	14.79 \pm 2.24*	5.32 \pm 3.95*	3.47 \pm 2.79	0.92 \pm 3.62	-5.93 \pm 4.79
CHS	500	142.50	0	6.08 \pm 4.33*	2.09 \pm 4.58*	0.14 \pm 4.86	1.03 \pm 7.67	-2.60 \pm 6.22

Cuadro A23. Efecto de CHS (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	247.22	0	68.01 \pm 5.44	36.24 \pm 6.76	24.94 \pm 4.24	24.90 \pm 8.12	0.30 \pm 5.17
Acarbosa	3	245.25	0	25.63 \pm 3.81*	9.21 \pm 3.81*	6.58 \pm 2.35*	-1.40 \pm 2.29*	-10.59 \pm 2.43
CHS	100	234.04	0	45.30 \pm 9.80	44.39 \pm 9.80	31.95 \pm 10.21	25.94 \pm 13.88	-0.50 \pm 3.70
CHS	300	191.49	0	48.63 \pm 11.21	30.32 \pm 11.21	14.77 \pm 7.34	18.13 \pm 6.74	3.15 \pm 5.20
CHS	500	212.86	0	28.25 \pm 13.99*	22.07 \pm 13.99	21.22 \pm 17.67	15.15 \pm 15.02	-3.05 \pm 12.96

Cuadro A24. Efecto de HHS (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	138.50	0	25.40 \pm 3.36	13.08 \pm 3.78	8.61 \pm 4.61	5.94 \pm 3.96	-13.88 \pm 4.55
Acarbosa	3	145.38	0	12.63 \pm 2.43	4.61 \pm 3.27	1.46 \pm 3.56	2.24 \pm 3.79	-8.56 \pm 5.07
HHS	100	141.67	0	41.93 \pm 3.44	15.96 \pm 4.33	12.72 \pm 4.38	18.26 \pm 4.51	-1.57 \pm 3.56
HHS	300	142.17	0	35.10 \pm 6.35	10.53 \pm 3.88	6.74 \pm 2.78	6.34 \pm 1.97	-7.19 \pm 2.28
HHS	500	136.17	0	41.06 \pm 6.96	8.14 \pm 5.24	11.02 \pm 3.02	4.83 \pm 5.34	-14.26 \pm 2.50

Cuadro A25. Efecto de HHS (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	239.25	0	105.68 \pm 9.54	51.23 \pm 13.03	42.60 \pm 11.74	44.22 \pm 14.10	15.83 \pm 9.00
Acarbosa	3	239.00	0	36.97 \pm 2.88	11.82 \pm 3.70	4.62 \pm 2.08	3.02 \pm 1.74	-12.90 \pm 3.12
HHS	100	230.50	0	75.30 \pm 11.01	42.22 \pm 11.05	45.53 \pm 12.98	34.30 \pm 13.29	13.21 \pm 6.09
HHS	300	218.00	0	54.55 \pm 6.21	24.54 \pm 5.20	18.99 \pm 4.24	16.42 \pm 3.17	-0.15 \pm 2.56
HHS	500	218.33	0	71.08 \pm 8.01	32.58 \pm 7.37	27.03 \pm 10.17	17.59 \pm 9.54	-0.60 \pm 5.71

Cuadro A26. Efecto de CEC (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	107.1	0	51.2 \pm 9.0	11.6 \pm 10.3	3.9 \pm 6.6	-5.7 \pm 7.7	-19.8 \pm 8.9
Acarbosa	3	146.5	0	14.9 \pm 2.5*	9.5 \pm 4.2	3.4 \pm 6.0	0.5 \pm 5.9	-18.8 \pm 8.9
CEC	100	152.5	0	15.7 \pm 2.6*	5.8 \pm 3.7	0.3 \pm 3.7	6.0 \pm 5.9	-12.0 \pm 6.8
CEC	300	134.4	0	17.4 \pm 5.9*	9.6 \pm 1.9	5.9 \pm 3.7	1.7 \pm 5.2	-26.2 \pm 3.3
CEC	500	146.5	0	2.6 \pm 3.4*	5.4 \pm 4.4	2.0 \pm 4.3	3.9 \pm 5.1	-8.0 \pm 5.0

Cuadro A27. Efecto de CEC (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	255.4	0	51.9 \pm 2.5	16.5 \pm 10.7	7.5 \pm 8.8	9.7 \pm 8.7	-21.6 \pm 9.5
Acarbosa	3	228.9	0	23.8 \pm 8.4*	19.2 \pm 8.3	6.8 \pm 9.4	12.4 \pm 11.4	4.2 \pm 13.6
CEC	100	261.1	0	19.8 \pm 9.1*	3.3 \pm 10.2	-3.7 \pm 10.7	-2.0 \pm 12.0	-14.2 \pm 9.7
CEC	300	278.4	0	24.1 \pm 9.7*	8.6 \pm 6.3	8.4 \pm 5.4	12.4 \pm 7.0	7.3 \pm 7.5
CEC	500	243.1	0	32.3 \pm 8.7*	16.4 \pm 8.8	0.1 \pm 7.3	-3.6 \pm 10.2	-24.6 \pm 6.1

Cuadro A28. Efecto de HEC (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnett comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	144.13	0	26.13 \pm 2.74	7.71 \pm 3.53	8.28 \pm 1.51	5.07 \pm 1.69	-18.45 \pm 2.28
Acarbosa	3	155.00	0	3.56 \pm 3.66	2.52 \pm 3.61	1.28 \pm 2.97	3.66 \pm 2.73	-13.10 \pm 2.80
HEC	100	136.33	0	19.35 \pm 3.49	10.59 \pm 3.29	7.03 \pm 2.06	10.79 \pm 1.25	-7.75 \pm 1.87
HEC	300	145.17	0	19.20 \pm 2.90	14.85 \pm 2.26	12.44 \pm 6.30	10.25 \pm 6.15	-1.76 \pm 4.77
HEC	500	144.33	0	20.90 \pm 2.25	3.56 \pm 3.45	1.67 \pm 2.04	5.15 \pm 2.56	-7.55 \pm 3.53

Cuadro A29. Efecto de HEC (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la sacarosa oral en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnett comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	273.14	0	55.33 \pm 5.72	38.88 \pm 5.55	22.58 \pm 5.63	19.00 \pm 6.18	12.42 \pm 8.48
Acarbosa	3	339.00	0	25.35 \pm 5.19	16.96 \pm 3.64	11.47 \pm 2.47	13.24 \pm 1.71	12.91 \pm 2.54
HEC	100	313.75	0	68.47 \pm 23.09	49.56 \pm 19.38	34.50 \pm 14.22	27.56 \pm 13.38	16.99 \pm 10.82
HEC	300	233.83	0	59.53 \pm 12.85	52.25 \pm 19.18	34.96 \pm 10.11	27.25 \pm 10.06	18.45 \pm 8.35
HEC	500	265.17	0	45.78 \pm 9.75	30.46 \pm 8.13	26.72 \pm 9.86	22.17 \pm 7.61	12.96 \pm 6.94

Cuadro A30. Efecto de HHL (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la glucosa oral en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	-	169.50	0	24.41 \pm 6.53	5.59 \pm 3.43	1.10 \pm 6.39	-8.13 \pm 4.48	-24.54 \pm 2.31
Glibenclamida	10	192.33	0	1.97 \pm 4.16*	-24.55 \pm 3.39*	-33.47 \pm 4.37*	-37.72 \pm 4.55*	-43.06 \pm 6.25*
HHL	100	163.86	0	1.87 \pm 4.02*	-9.38 \pm 5.00	-16.20 \pm 5.06	-15.99 \pm 4.63	-17.68 \pm 5.66
HHL	300	161.25	0	-0.08 \pm 6.29*	-7.51 \pm 3.92	-6.34 \pm 2.33	-15.21 \pm 4.19	-27.15 \pm 3.71
HHL	500	165.13	0	6.04 \pm 4.86*	-7.90 \pm 2.85	-11.49 \pm 4.47	-21.77 \pm 4.34	-9.72 \pm 10.50

Cuadro A31. Efecto de HHL (100, 300 y 500 mg/kg) en una curva de tolerancia a la glucosa oral en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	-	187.50	0	50.93 \pm 2.26	16.51 \pm 6.81	9.77 \pm 7.94	-10.36 \pm 6.19	-17.43 \pm 4.66
Glibenclamida	10	208.17	0	16.92 \pm 4.96*	-8.01 \pm 6.84*	-24.42 \pm 6.75	-32.35 \pm 5.60*	-33.38 \pm 6.77*
HHL	100	211.38	0	19.07 \pm 7.32*	2.08 \pm 5.01	-12.98 \pm 5.45	8.4 \pm 10.30	-18.33 \pm 3.69
HHL	300	206.33	0	25.42 \pm 5.06*	4.89 \pm 3.76	-1.40 \pm 4.60	-8.84 \pm 4.17	-15.58 \pm 5.95
HHL	500	204.50	0	21.46 \pm 10.90*	-3.92 \pm 6.48*	-6.10 \pm 8.66	-1.73 \pm 10.27	-16.93 \pm 6.99

Cuadro A32. Efecto de la tolerancia a la sacarosa oral de los compuestos **4** y **34** (5 y 50 mg/kg cada uno) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	199.25	0	81.35 \pm 11.26	38.0 \pm 10.15	24.6 \pm 7.27	21.52 \pm 15.07	2.66 \pm 8.58
Acarbosa	3	192.88	0	19.79 \pm 4.71*	2.98 \pm 4.86*	3.06 \pm 3.21*	-3.8 \pm 3.56*	-10.99 \pm 2.44
Compuesto 4	5	282.83	0	64.2 \pm 10.14	31.34 \pm 8.98	18.19 \pm 6.52	14.39 \pm 4.78	-3.25 \pm 10.15
Compuesto 4	50	278.43	0	45.72 \pm 1.83*	23.02 \pm 6.98	21.39 \pm 3.9	12.21 \pm 3.19	-9.12 \pm 4.14
Compuesto 34	5	228.67	0	59.8 \pm 19.22	37.99 \pm 18.09	27.87 \pm 9.35	18.0 \pm 11.97	-2.74 \pm 9.09
Compuesto 34	50	199.43	0	53.7 \pm 7.1*	26.09 \pm 3.64	-21.17 \pm 3.81	6.62 \pm 4.01	-6.71 \pm 5.40

Cuadro A33. Efecto de la tolerancia a al almidón oral de los compuestos **4** y **34** (5 y 50 mg/kg cada uno) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	136.00	0	65.56 \pm 10.16	26.11 \pm 9.04	8.79 \pm 4.29	-13.11 \pm 5.16	-32.76 \pm 5.46
Acarbosa	3	147.75	0	2.85 \pm 6.69*	-7.57 \pm 2.7*	-4.69 \pm 10.54	-20.54 \pm 10.9	-36.1 \pm 8.76
Compuesto 4	5	155.88	0	51.57 \pm 13.39	27.64 \pm 8.52	1.94 \pm 5.7	-20.93 \pm 8.03	-38.29 \pm 7.73
Compuesto 4	50	144.67	0	42.30 \pm 8.1	20.85 \pm 11.29	5.65 \pm 8.22	-15.78 \pm 5.76	-40.13 \pm 8.95
Compuesto 34	5	126.38	0	37.58 \pm 11.81	32.17 \pm 12.2	12.21 \pm 9.18	5.19 \pm 6.84	-16.05 \pm 5.28
Compuesto 34	50	142.50	0	27.48 \pm 4.11*	16.83 \pm 5.86	1.57 \pm 2.59	-12.7 \pm 5.18	-26.9 \pm 7.21

Cuadro A34. Efecto de la tolerancia a almidón oral de los compuestos **4** y **34** (5 y 50 mg/kg cada uno) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en porcentaje de variación de glucosa (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glicemia inicial (mgdL ⁻¹)	Porcentaje de variación de glucosa (%)					
			0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	-	209.50	0	106.65 \pm 14.63	84.97 \pm 19.81	75.31 \pm 23.0	46.99 \pm 18.13	2.49 \pm 11.65
Acarbosa	3	247.25	0	13.53 \pm 6.96*	24.23 \pm 7.48*	20.93 \pm 4.46*	18.62 \pm 1.73*	4.61 \pm 17.63
Compuesto 4	5	243.00	0	55.79 \pm 18.23	61.3 \pm 19.35	40.64 \pm 17.15	18.82 \pm 9.1	-8.26 \pm 5.67
Compuesto 4	50	220.50	0	61.62 \pm 9.67*	72.37 \pm 15.52	32.28 \pm 12.86	9.79 \pm 7.81*	-13.79 \pm 1.86
Compuesto 34	5	253.40	0	58.08 \pm 9.45*	60.64 \pm 6.43	35.27 \pm 13.68	18.56 \pm 17.79*	-7.59 \pm 11.0
Compuesto 34	50	304.80	0	44.34 \pm 13.11*	48.77 \pm 15.11*	26.25 \pm 13.55*	8.02 \pm 10.01*	-14.26 \pm 8.2

Cuadro A35. Actividad gastroprotectora de la infusión de hojas y corteza de *H. latiflora* (HHL y CHL) y de *H. stanleyana* (HHS y CHS). Datos expresados en porcentaje de gastroprotección (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratas en cada grupo.* $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls comparando cada valor con el vehículo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	% Gastroprotección
Vehículo HL	-	0
Carbenoxolona	10	88.3 \pm 9.98
CHL	30	16.3 \pm 17.78
CHL	100	26.4 \pm 21.40
CHL	177	44.6 \pm 17.92
CHL	300	80.5 \pm 3.35 *
HHL	30	26.0 \pm 12.29
HHL	100	37.1 \pm 12.3
HHL	177	75.1 \pm 7.26*
HHL	300	74.5 \pm 11.32*
Vehículo HS	-	0 \pm 15.32
Carbenoxolona	30	75.84 \pm 5.47
CHS 30	30	-21.72 \pm 34.46
CHS 100	100	14.98 \pm 26.83
CHS 177	177	10.21 \pm 14.4
CHS 300	300	80.26 \pm 3.96*
HHS 30	30	-33.66 \pm 9.31
HHS 100	100	22.51 \pm 5.51
HHS 177	177	65.97 \pm 5.18*
HHS 300	300	76.85 \pm 3.17*

Cuadro A36. Actividad gastroprotectora del compuesto 5-*O*-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**13**). Datos expresados en porcentaje de gastroprotección (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratas en cada grupo.* $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls comparando cada valor con el vehículo.

Tratamiento	Dosis (g/kg)	% Gastroprotección
Vehículo	-	0 \pm 14.02
Carbenoxolona	30	86.17 \pm 3.85
Compuesto 13	0.1	-0.86 \pm 12.35
Compuesto 13	1	3.88 \pm 12.8
Compuesto 13	10	38.37 \pm 9.8*
Compuesto 13	17	64.21 \pm 3.7*
Compuesto 13	30	67.41 \pm 2.4*
Compuesto 13	57	55.86 \pm 2.08*
Compuesto 13	100	68.85 \pm 8.4*

Cuadro A37. Actividad gastroprotectora del ácido clorogénico (**29**). Datos expresados en porcentaje de gastroprotección (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratas en cada grupo.* $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVVA seguido por una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls comparando cada valor con el vehículo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	% Gastroprotección
Vehículo	-	1.64 \pm 7.3
Carbenoxolona	30	72.26 \pm 8.6*
Compuesto 29	3	-6.99 \pm 11.8
Compuesto 29	10	16.10 \pm 13.83
Compuesto 29	17	50.09 \pm 8*
Compuesto 29	30	48.75 \pm 4.7*
Compuesto 29	57	70.48 \pm 10.5*
Compuesto 29	100	74.04 \pm 4.4*

Cuadro A38. Actividad gastroprotectora de la DE₅₀ de los compuestos **13** (4FC; 15 mg/kg) y **29** (ACG; 26 mg/kg), y su comparación con la suma de la DE₂₅ de ambos compuestos (**13**: 7.5 mg/kg y **29**: 13 mg/kg). Datos expresados en porcentaje de gastroprotección (%). Cada valor es la media \pm EE para 6 ratas en cada grupo

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Índice de úlcera (mm ²)
Vehículo	-	142.47 \pm 14.18
Compuesto 13 (ED ₅₀)	15	66.53 \pm 14.6 (53.3%)*
Compuesto 29 (ED ₅₀)	26	73.79 \pm 9.49 (48.2%)*
Compuestos 13 + 29 (ED ₂₅)	7.5 + 13	81.32 \pm 9.69 (42.92%)*



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jepGastroprotective effect of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* aqueous extracts and compoundsS. Cristians^a, R. Bye^b, A. Navarrete^{a,*}, R. Mata^{a,**}^a Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico^b Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2012

Received in revised form

12 November 2012

Accepted 18 November 2012

Available online 23 November 2012

Keywords:

*Hintonia latiflora**Hintonia standleyana*

Gastroprotective effect

Chlorogenic acid

4-phenylcoumarins

Endogenous sulfhydryl compounds

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The stem-barks of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana*, locally known as “copalchi”, are used for treating several maladies such as diabetes and gastrointestinal complaints, including gastric ulcers. Although the antidiabetic properties have been demonstrated, the gastroprotective action remains unexplored.

Aim of the study: The main goals of this study were to establish the potential acute toxicity and the gastroprotective activity of aqueous extracts and compounds from *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* in order to demonstrate their preclinical efficacy for the treatment of gastric ulcers in Mexican folk medicine.

Materials and methods: The aqueous extracts from the stem-barks (HLSB and HSSB) and leaves (HLL and HSL) from *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* were prepared by infusion. Investigation of the acute toxicity was accomplished by the Lorke method. The gastroprotective effect was assessed by means of a conventional ethanol-induced gastric injury model in rats using carbenoxolone as positive control. 5-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**1**) and chlorogenic acid (**2**) were also assayed. Preliminary mechanism of action of the tested compounds was analyzed using the same pharmacological models but pretreating the animals with N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N-ethylmaleimide (NEM) and indomethacin.

Results: Investigation of the acute toxicity revealed that infusions of the leaves and stem-barks of both *Hintonia* species were not toxic to mice (LD₅₀ > 5000 mg/kg in all cases). HLSB, HSSB, HLL and HSL provoked a significant gastroprotective effect [80.5 ± 3.35% (ED₅₀ = 184.7 mg/kg), 80.26 ± 3.96%, 75.1 ± 7.26% (ED₅₀ = 109.1 mg/kg), 76.85 ± 3.17% (ED₅₀ = 149.7 mg/kg) of gastroprotection respectively]. Compounds **1** and **2**, present in all the extracts, were also active [68.85 ± 8.4% (ED₅₀ = 15 mg/kg), 74.04 ± 4.4% (ED₅₀ = 26 mg/kg) of gastroprotection respectively] and their mode of action involved non-protein sulfhydryl endogenous (NP-SH) compounds, since only pretreatment with NEM inhibited their gastroprotective action.

Conclusions: The present investigation tends to support the ethnomedical use of HLSB, HSSB for treating gastric ulceration. Since HLL and HSL were also active, the leaves could be used alternatively, which in terms of natural resources conservation is an outstanding finding, considering that the plant populations of both *Hintonia* are scarce and in danger of extinction. Mainly two compounds (**1** and **2**) are important active principles of the plants.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: 4PC, 5-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**1**); C, carbenoxolone; CGA, chlorogenic acid (**2**); HLL, *Hintonia latiflora* leaves aqueous extract; HLSB, *Hintonia latiflora* stem-bark aqueous extract; HSL, *Hintonia standleyana* leaves aqueous extract; HSSB, *Hintonia standleyana* stem-bark aqueous extract; Ind, indomethacin; L-NAME, N^G-nitro-L-arginine methyl ester; NEM, N-ethylmaleimide.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5291.

** Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5289; fax: +52 55 5622 5327.

E-mail addresses: anavarrt@unam.mx (A. Navarrete), rachel@unam.mx (R. Mata).

1. Introduction

Stem-bark infusions of *copalchi* [*Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex. DC.) Bullock or *Hintonia standleyana* Bullock, Rubiaceae] are highly priced in contemporary Mexico to treat diabetes and gastrointestinal ailments including dyspepsia, gastric ulcers and stomach aches (Mata et al., 2009; Monroy-Ortiz and Castillo-España, 2007; Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), 2001; Argueta et al., 1994; Bye, 1986, inter alia). The first description of the use of *Hintonia latiflora* for gastrointestinal illnesses appeared in the “Florentine Codex” in the 16th century. In

this document the plant, under the names of *chichicuahuitl* (bitter tree, in Nahuatl language) and *chichicpatli* (bitter medicine), was described as a valuable euppeptic agent (de Sahagún, 1988).

The chemical composition (Cristians et al., 2009; Guerrero-Analco et al., 2007; Mata et al., 1990, 1992, 2008; Reguero et al., 1987; Reher and Kraus, 1984) as well as the antidiabetic (Cristians et al., 2009; Guerrero-Analco et al., 2007; Korec et al., 2000; Korecova et al., 2006; Landa, 1913; Paris and Bastien, 1960; Pinto et al., 1997; Terres, 1913), antimalarial (Argotte-Ramos et al., 2006; Noster and Kraus, 1990) and antimicrobial (Rojas et al., 1992) properties of the stem bark of *Hintonia latiflora* have been the subject of several investigations. These studies have revealed that the major antidiabetic principles of the stem-bark are 4-phenylcoumarins and cucurbitacins (Guerrero-Analco et al., 2005). In addition, it has been demonstrated that the leaves of both species exhibited discernible hypoglycemic effects representing an excellent alternative to the use of their stem bark (Cristians et al., 2009). This finding is relevant since the use of the leaves, rather than the stem-bark, might contribute to the conservation of these very Mexican plants, which have been overexploited for almost 100 years (Martínez-Pérez et al., 2012).

Thus, this work was undertaken to establish the preclinical efficacy of the infusions of both *Hintonia* species stem-barks and leaves as gastroprotective agents considering the alleged uses of the plant for treating the gastrointestinal complaints (Mata et al., 2009; Monroy-Ortiz and Castillo-España, 2007; Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), 2001; Argueta et al., 1994; Bye, 1986, inter alia). Although, the leaves are not used in traditional medicine they were included in the study in a new attempt to promote their conservation.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Leaves of *Hintonia latiflora* were collected in “La Cocina” and “La Arena” localities (18°31′11.81″N, 101°4′11.53″W and 18°31′0.76″N, 101°5′19.8″W), Huetamo Municipality, in the Michoacán State (voucher specimens: 131316, 131333, 131344, 131345, 131346; FCME) on July 2010. The stem-bark of *Hintonia latiflora* was collected in “Barranca del Cobre” locality (27°32′8.25″N, 107°49′22.55″W), Bocoyna Municipality, in Chihuahua State (voucher specimen Bye 36987; MEXU) on February 2012. The stem-bark and leaves of *Hintonia standleyana* were collected in “Tuzantlan” locality (18°12′22.35″N, 99°11′1″W), Atenango del Río Municipality, in Guerrero State (voucher specimens 131342, 131150, 131151; FCME) on July 2010. In the present study, the leaves and stem-bark of *Hintonia latiflora* were collected in different locations due to the low availability of wild populations which in turn preclude stem-bark collection. On the other hand, in those region where the populations were higher, the availability of leaves were lower due to seasonal senescence. However, cross chemical comparison of the plant materials collected for this study with those previously gathered (Cristians et al., 2009; Guerrero-Analco et al., 2007) revealed no significant differences.

2.2. Aqueous extracts preparation

In all cases, the plant material was air-dried at room temperature and grounded using a Thomas Willey laboratory mill (particle size < 2000 µm, mesh size 2 mm). The infusions were prepared by treating the crude drugs (10 g of leaves or stem-barks of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana*) with hot water (100 mL) for 30 min and then filtered through Whatman No. 1 filter paper; the

resulting solutions were dried in vacuo to yield 2.9 g (stem-bark of *Hintonia latiflora*, HLSB), 2.7 g (leaves of *Hintonia latiflora*, HLL), 2.5 g (leaves of *Hintonia standleyana*, HSSB) and 2.1 g (stem-bark of *Hintonia standleyana*, HSL) of dried extracts.

2.3. Natural products and drugs

Compound **1** was isolated from the stem-bark of *Hintonia standleyana* as previously described (Guerrero-Analco et al., 2005). Compound **2** was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Carbenoxolone, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N-ethylmaleimide (NEM) and indomethacin were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The drugs were prepared freshly each time and administered suspended.

2.4. Animals

Acute toxicity studies were performed on male ICR mice, weighing 25–30 g; whereas, all the gastroprotection experiments were performed with male Wistar rats, weighing 200–250 g. All the animals were obtained from Centro UNAM-Harlan. Mice were housed in a climate and light controlled room with a 12 h light/dark cycle. Twelve hours before experiments, food was withheld, but animals had free access to drinking water. The rats were placed in single cages with wire-net floors and deprived of food 18 h before the experiments but allowed free access to tap water throughout. Acute toxicity experiments were carried out using three animals per dose, whereas gastroprotective activity experiments were carried out using six animals per group. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with international rules on care and use of laboratory animals. The Institutional Committee for Care and Use of Laboratory Animals (FQ/CICUAL/021/11) of Facultad de Química, UNAM, approved the experimental protocols.

2.5. Acute toxicity study in mice

The aqueous extracts of *Hintonia* species, HLSB, HLL, HSSB, HSL, were suspended in the vehicle (Tween 80, NaCl 0.9% p.o.). Mice were treated in two phases. In the first, intragastric doses of 10, 100, and 1000 mg/kg were administered ($n=3$). On the second, the doses were administered according to the method of Lorke (1983). In both phases, mice were observed daily in a period of 14 days for mortality, toxic effects and/or changes in behavioral pattern. At the end of the experiments the animals were sacrificed in a CO₂ chamber and the main organs were compared versus the control group.

2.6. Acute gastric ulcers induced by absolute ethanol

Ulceration was induced according to the method described by Robert (1979). In all cases the animals were divided into different groups ($n=6$). Rats were pretreated with vehicle (NaCl 0.9% p.o.), positive control (carbenoxolone 30 mg/kg p.o.; Wan and Gottfried, 1985), HLSB, HLL, HSSB, HSL (30, 100, 177 and 300 mg/kg p.o.), compounds **1** (0.1, 1, 10, 17, 30, 57 and 100 mg/kg p.o.) or **2** (3, 10, 17, 30, 57, 100 mg/kg p.o.). After each treatment, intragastric instillation of 1 mL of absolute ethanol was administered; two hours later the rats were killed in a CO₂ chamber. The stomach and duodenum were removed, inflated with 10 mL of formaldehyde (4%), and placed in formaldehyde for at least 15 min to fix both the inner and outer layers. The duodenum was opened along its anti-mesenteric side and the stomach along the greater curvature. The damage area (mm²) was measured under a dissection microscope (10×) with an ocular micrometer. The sum of the area of all lesions for each rat corpus

was calculated and served as the ulcer index (UI); UI values for all material tested are provided in the supplementary material. Gastroprotection (%) was calculated according to the formula:

$$\% \text{Gastroprotection} = [(UIC - UIT) \times 100] \times UIC^{-1}$$

where UIC is ulcer index in control and UIT is ulcer index in test (Navarrete et al., 2002).

2.7. Evaluation of a mixture of compounds 1 and 2

Each animal group received one of the following treatments: the vehicle (NaCl 0.9% p.o.), compound 1 (15 mg/kg p.o.), compound 2 (26 mg/kg p.o.), and a mixture of compounds 1 and 2 (7.5 and 13 mg/kg p.o., representing the ED₂₅ of each one). The single doses were equivalent to the ED₅₀. The gastroprotection was assessed as described above.

2.8. Effect of N^G-nitro-L-arginine methyl ester pretreatment in compounds 1 and 2 gastroprotection

To investigate the involvement of endogenous NO in the protective effect of compounds 1 and 2, L-NAME was administered (70 mg/kg, NaCl 0.9% i.p.) 30 min before the administration of compounds 1 or 2 (ED₅₀ = 15 and 26 mg/kg p.o., respectively). Thirty minutes later, the gastric lesions were induced and measured as described above. Vehicle and L-NAME-treated groups were included (Chávez-Piña et al., 2009).

2.9. Effect of N-ethylmaleimide pretreatment in compounds 1 and 2 gastroprotection

To investigate the involvement of endogenous sulfhydryl groups in the protective effect of compounds 1 and 2, NEM was injected (10 mg/kg, NaCl 0.9% s.c.) 30 min before the administration of compound 1 or 2 (ED₅₀ = 15 and 26 mg/kg p.o., respectively). Thirty minutes later, the gastric lesions were induced and measured as described. Vehicle and NEM-treated groups were incorporated (Chávez-Piña et al., 2009).

2.10. Effect of indomethacin pretreatment in compounds 1 and 2 gastroprotection

To investigate the involvement of endogenous prostaglandins in the gastroprotective effect of compounds 1 and 2, indomethacin was injected (10 mg/kg dissolved in NaHCO₃ 5 mM, s.c.) 75 min before the administration of compound 1 or 2 (ED₅₀ = 15 and 26 mg/kg p.o., respectively). Thirty minutes later, the gastric lesions were induced and measured as described. Vehicle and indomethacin-treated groups were involved (Chávez-Piña et al., 2009).

2.11. Statistical analysis

All data are expressed as mean ± SEM. Groups were compared using a one-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls multiple comparison test. Values of *p* < 0.05 were considered to show significant differences between means.

3. Results and discussion

The present study was undertaken to establish the acute toxicity and preclinical efficacy for treating gastrointestinal disorders of the infusions of two Mexican copalchis (*Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana*). The infusions were testing considering that people commonly uses this type of preparation as therapeutic

means (Mata et al., 2009; Monroy-Ortiz and Castillo-España, 2007; Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), 2001; Argueta et al., 1994; Bye, 1986, inter alia). In spite of the long recognized use of these species for alleviating upset-stomach, most of the pharmacological research on these plants has been focused in demonstrating their antidiabetic properties. Thus, the potential of these species as gastroprotective agents remained unexplored. In this study were tested not only the stem-barks which have been traditionally used as crude drugs, but also the leaves which in accordance with previous investigations share a few common metabolites with the stem-bark, mainly 4-phenylcoumarins (Cristians et al., 2009; Mata et al., 2008).

3.1. Acute toxicity study in mice

Determination of the acute toxicity is the first step in the toxicological investigations of herbal drugs. Lorke's method is perhaps the most widely used approach since the experiments are carried out with a minimum number of experimental animals (*n* = 18 for each tested extract; Déciga-Campos et al., 2007; Lorke, 1983). Thus, to assess any potential toxic effects of the plant, mice were treated orally with the infusions of the leaves and stem-barks of both *Hintonia* species using doses in the range of 10–1000 mg/kg in a first phase, and 1600, 2900 and 5000 mg/kg at the second phase. After 14 days, treated mice did not present any visible toxic effect, important changes on behavior or body weight. Furthermore, no lesions or bleedings were observed in macroscopic morphology on internal organs such as lungs, kidneys, liver, heart and stomach. Since no death or damage was observed throughout the experiment, the LD₅₀ was higher than 5000 mg/kg for the four aqueous extracts assayed, thus indicating their innocuousness for mice.

3.2. Gastroprotective effect of HLSB, HSSB, HLL and HSL

The preparations were evaluated using a conventional ethanol-induced gastric injury model in rats (Chávez-Piña et al., 2009; Robert, 1979). The results (Fig. 1(A and B); Tables S1 and S2) indicated that HLSB (ED₅₀ = 184.7 mg/kg) and HSSB provoked a significant gastroprotective when tested at 300 mg/kg (80.5 ± 3.35% and 80.26 ± 3.96% of gastroprotection, respectively). According to the data summarized in Fig. 1 and Tables S1 and S2, the extracts of the leaves (HLL and HSL) were also very active; in this case the effects were significant at the doses of 177 mg/kg and 300 mg/kg (75.1 ± 7.26 and 74.5 ± 11.32% of gastroprotection; ED₅₀ = 109.1 mg/kg for HLL; 65.97 ± 5.18 and 76.85 ± 3.17% of gastroprotection; ED₅₀ = 149.7 mg/kg for HSL). The results of this second set of experiments suggested that the leaves could be use alternatively, which in terms of natural resources conservation is valuable since the plant population of both *Hintonia* are scarce and in danger of extinction. In all cases, carbenoxolone, a topically active, cytoprotective agent in the upper gastrointestinal tract, was used as a positive control. Carbenoxolone improves mucus synthesis in human gastric mucosa, and some animal species, including rats, due to an increment in the *N*-acetylneuraminic acid-containing mucoproteins. In addition this compound, prolong the half-life of gastric mucosal cells by reducing the rate of cell turnover (Navarrete et al., 2002).

3.3. Gastroprotective effect of compounds 1 and 2

The major common 4-phenylcoumarin of the stem-barks and leaves of both *Hintonia* species, namely 5-*O*-[β-D-apiofuranosyl]- (1 → 6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (1) as well as chlorogenic acid (2) (Fig. 2), which is present in significant amount in the leaves of both species

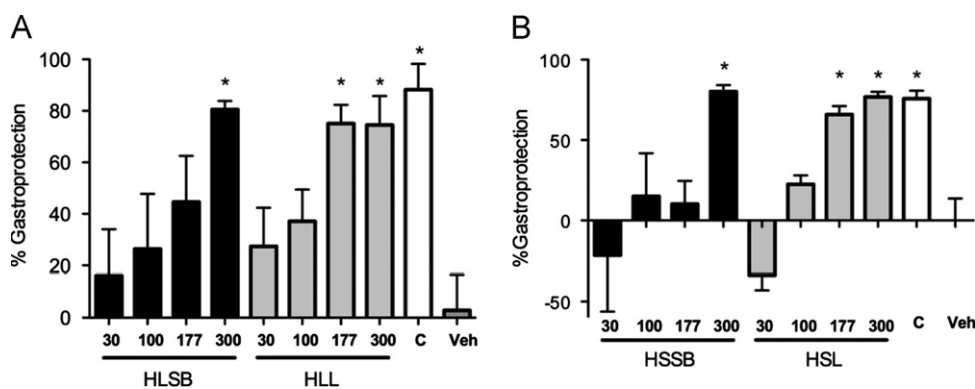


Fig. 1. Gastroprotective effect of different doses of (A) *Hintonia latiflora* stem-bark (HLSB; 30–300 mg/kg p.o.) and leaves (HLL; 30–300 mg/kg p.o.) aqueous extracts; and (B) *Hintonia standleyana* stem-bark (HSSB; 30–300 mg/kg p.o.) and leaves aqueous extract (HSL; 30–300 mg/kg p.o.). Bars represent the mean SEM ($n=6$). $p < 0.05$, significantly different from the vehicle; one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test.

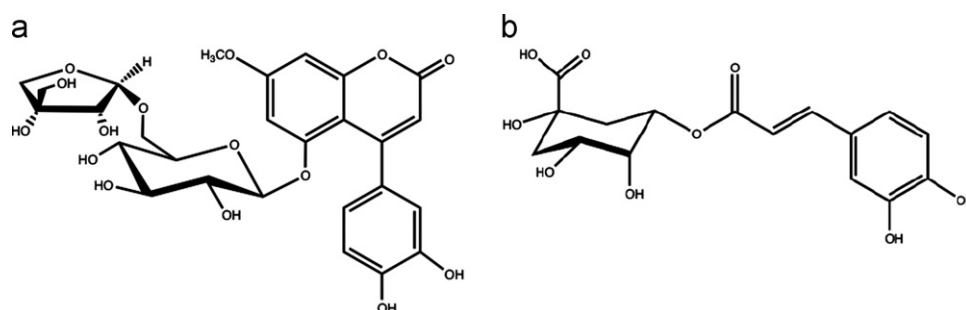


Fig. 2. Structures of 5-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (1) and chlorogenic acid (2).

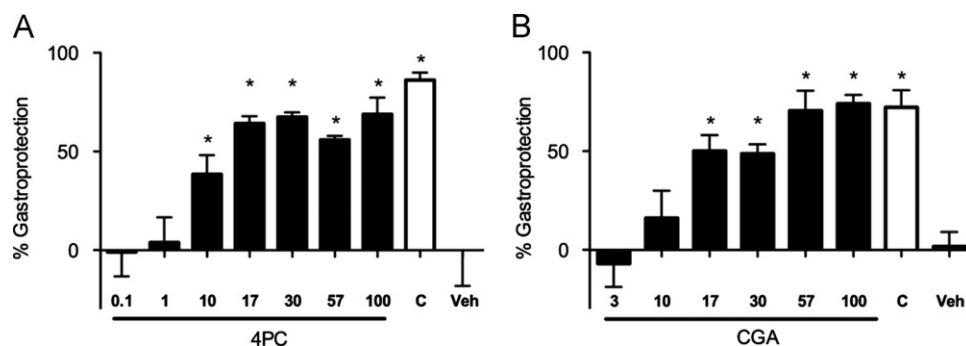


Fig. 3. Gastroprotective effect of different doses of (A) compound 1 (4PC; 0.1–100 mg/kg p.o.); and (B) compound 2 (CGA; 3–100 mg/kg p.o.). Bars represent the mean SEM ($n=6$). $p < 0.05$, significantly different from the vehicle; one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test.

(Cristians et al., 2009; Mata et al., 2008) were next evaluated. Compound 2 gastroprotective effect was significant in the range from 17 to 100 mg/kg (Fig. 3B, Table S4); the effect was dose dependent and the percentage of gastric injuries inhibition showed its maximum at the dose of 100 mg/kg ($74.04 \pm 4.4\%$), with a calculated ED_{50} of 26 mg/kg. In the case of compound 1 (Fig. 3A, Table S3) an ED_{50} of 15 mg/kg was calculated; the action became significant ($p < 0.05$) from 10 to 100 mg/kg but the pharmacological effect attained with 17 mg/kg ($64.21 \pm 3.7\%$) was similar to that with 100 mg/kg ($68.85 \pm 8.4\%$).

Compounds 1 and 2 showed lower values of ED_{50} compared with the four extracts tested revealing that they are indeed gastroprotective active principles of the plant although it is possible that the other 4-phenylcoumarins and/or cucurbitacins present in the plant contribute to the pharmacological effect. A combination of compounds 1 ($ED_{25} = 7.5$ mg/kg) and 2 ($ED_{25} = 13$ mg/kg) was tested to

find out preliminarily any possible interaction between both compounds. The mixture showed a significant gastroprotective effect ($42.9 \pm 9.6\%$) similar to the ED_{50} for each compound (Fig. 4, Table S5) suggesting that compounds 1 and 2 acted independently in an additive manner. This preliminary finding suggests that 1 and 2 share a common gastroprotective mechanism of action (Berebaum, 1989; Miranda et al., 2001).

3.4. Effect of L-NAME, NEM and indomethacin pretreatment in compounds 1 and 2 gastroprotection

The non-protein endogenous sulfhydryl (NP-SH) compounds are important for the maintenance of gastric mucosal integrity (Hiraishi et al., 1999; Matsuda et al., 1999). Those SH-groups have the ability of binding the free radicals generated by noxious agents thus controlling the production and nature of mucus (Andreo et al., 2006). The

administration of a SH-blocker such as *N*-ethylmaleimide (NEM; 10 mg/kg) significantly increased the effects of ethanol on gastric mucosa injury, reversing the gastroprotective effect of compounds **1** (DE₅₀=15 mg/kg) and **2** (DE₅₀=26 mg/kg) (Fig. 5B). These results suggested that the gastroprotective effect of both *Hintonia* compounds implicated a strong participation of the NP-SH compounds that are relevant in the mucosal protection against harmful injuries.

Nitric oxide (NO) and prostaglandins are also involved in protection and healing of gastric mucosa. These endogenous gastroprotective factors modulate mucosal blood flow by stimulating mucus secretion, inhibit neutrophil adherence and activation,

regulate the alkaline response to acid and protect the stomach against ulcerogenic agents (Allen and Flemström, 2005; Wallace, 2001). Therefore, in order to determine if NO and prostaglandins are likewise involved in the mechanism of action of compounds **1** and **2**, the animals were pretreated with *L*-NAME (70 mg/kg) or indomethacin (10 mg/kg), respectively. Neither *L*-NAME nor indomethacin (Fig. 5A and C) inhibited the gastroprotective action elicited by compounds **1** and **2** when compared to the control groups. Thus, overall results revealed the gastroprotective effect of **1** and **2** was not mediated by NO nor prostaglandins but endogenous sulfhydryl groups, sharing a common molecular mode of action. The latter finding is consistent with the possible additive effect observed when a mixture both compounds was tested.

Although chlorogenic acid and 4-phenylcoumarins have demonstrated several pharmacological properties including antidiabetic (Cristians et al., 2009; Matsui et al., 2006) and antioxidant (Sato et al., 2011; Wu et al., 2012, inter alia), no gastroprotective action has been previously reported. Thus, this activity is novel for both type of compounds, but many plants having gastroprotective action contain chlorogenic acid (Chung et al., 2011; Monforte et al., 2012; Tapia et al., 2004, inter alia). Altogether, the polyphenolic nature of compounds **1** and **2** as well as the antiinflammatory (Shen et al., 2012), antioxidant and the free radical scavenging (Sato et al., 2011; Wu et al., 2012, inter alia), properties demonstrated for chlorogenic acid might contribute to the stability of the gastric mucosal defense, which upon damage shows a reduction on the concentration of NP-SH compounds (Andreio et al., 2006; Salim, 1999).

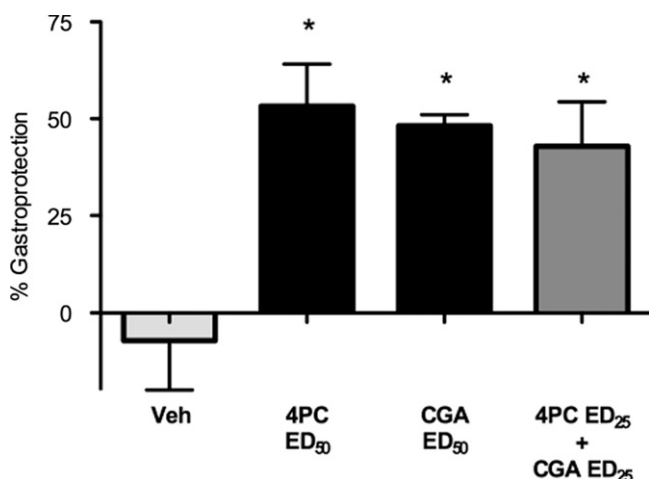


Fig. 4. Gastroprotective effects of ED₅₀ of compound **1** (4PC; 15 mg/kg p.o.), ED₅₀ of compound **2** (CGA; 26 mg/kg p.o.) and the mixed ED₂₅ of compounds **1** and **2** (4PC; 7.5 mg/kg, CGA; 13 mg/kg p.o.). Bars represent the mean ± SEM (*n*=6). Bars represent the mean ± SEM (*n*=6). **p* < 0.05, significantly different from the vehicle; one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test.

4. Conclusions

The findings of the present investigation provided scientific support for the centennial popular use of the stem-barks of both *Hintonia* species for treating gastric complaints.

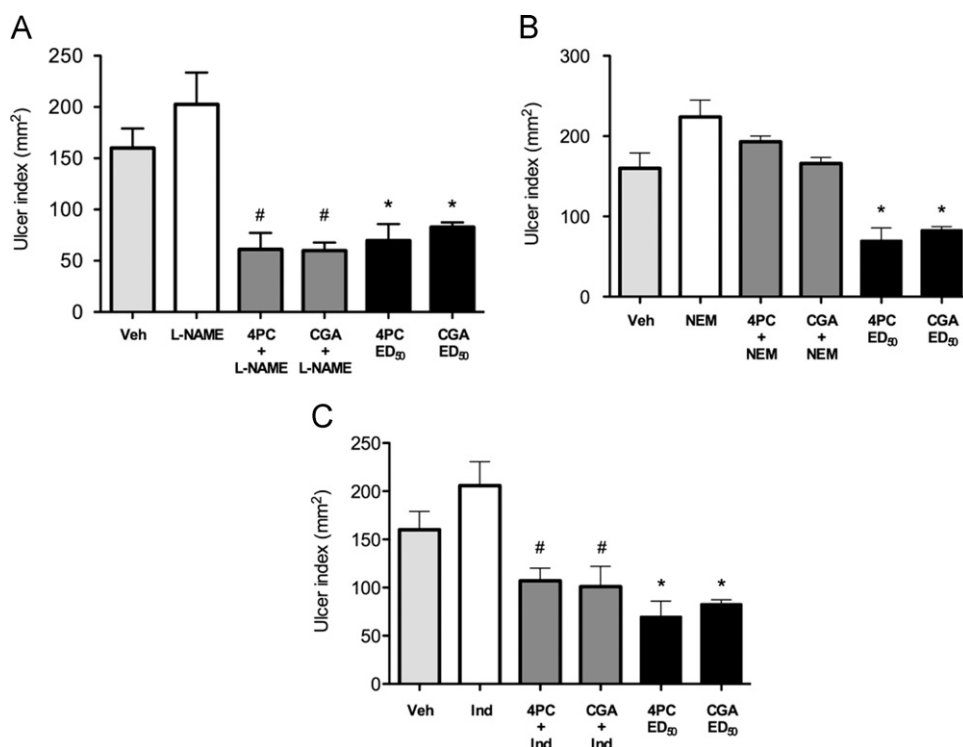


Fig. 5. Effect of ED₅₀ of compound **1** (4PC; 15 mg/kg p.o.) and ED₅₀ of compound **2** (CGA; 26 mg/kg p.o.) on ethanol-induced gastric ulcers in rats pretreated with (A) *L*-NAME (70 mg/kg i.p.), (B) NEM (10 mg/kg s.c.) and (C) indomethacin (10 mg/kg s.c.). Bars represent the mean ± SEM (*n*=6). **p* < 0.05, significantly different from the vehicle, #*p* < 0.05, significantly different from the drug-pretreated group; one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test.

The gastroprotective effect of the leaves aqueous extracts provides an alternative for the popularly used crude drug, being a valuable discovery in terms of natural resources conservation. Compounds **1** and **2** play an important role in the gastroprotective action of the aqueous extracts and their common mechanism, related with NP-SH groups, is consistent with an additive interaction.

Acknowledgements

This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). This work was supported by grants from DGAPA-UNAM (IN218110) and CONACyT (150966; 99395). We thank I. Rivero and A. Pérez for their valuable technical assistance. Cristians acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and UNAM.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.11.025>.

References

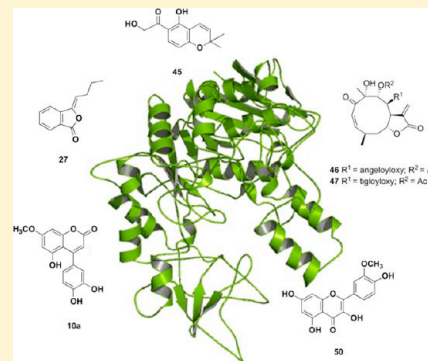
- Allen, A., Flemström, G., 2005. Gastrointestinal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 288, C1–C19.
- Andreo, M.A., Rodríguez Ballesteros, K.V., Hiruma-Lima, C.A., Machado da Rocha, L.R., Monteiro Souza, Brito, Vilegas, W., A.R., 2006. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 431–441.
- Argotte-Ramos, R., Ramírez-Ávila, G., Rodríguez-Gutiérrez, M.C., Ovilla-Muñoz, M., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M., González-Cortázar, M., Álvarez, L., 2006. Antimalarial 4-phenylcoumarins from the stem bark of *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products* 69, 1442–1444.
- Argueta, A.V., Cano, L.M., Rodarte, M.E., 1994. Atlas de las Plantas Medicinales de México. Instituto Nacional Indigenista, México, DF.
- Berebaum, M.C., 1989. What is synergy? *Pharmacological Reviews*, 93–129 1989.
- Bye, R., 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany* 40, 103–124.
- Chávez-Piña, A., Sandoval, A., Arrieta, J., Reyes, B., Flores, A.M., Navarrete, A., 2009. Gastroprotective effect of β -lupeol: role of prostaglandins, sulfhydryls and nitric oxide. *Revista Latinoamericana de Química* 37, 133–143.
- Chung, C.P., Hsia, S.M., Lee, M.Y., Chen, H.J., Cheng, F., Chan, L.C., Kuo, Y.H., Lin, Y.L., Chiang, W., 2011. Gastroprotective activities of Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) on the growth of the stomach cancer AGS cell line and indomethacin-induced gastric ulcers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 6025–6033.
- Cristians, S., Guerrero-Analco, J.A., Pérez-Vásquez, A., Palacios-Espinosa, F., Ciangherotti, C., Bye, R., Mata, R., 2009. Hypoglycemic activity of extracts and compounds from the leaves of *Hintonia standleyana* and *Hintonia latiflora*: potential alternatives to the use of the stem bark of these species. *Journal of Natural Products* 72, 408–413.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G.E., Navarrete, A., Mata, R., 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 334–342.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). 2001. Secretaría de Salud, México, DF.
- Guerrero-Analco, A., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R., 2007. Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry* 68, 2087–2095.
- Guerrero-Analco, J.A., Hersch-Martínez, P., Pedraza-Chaverri, A., Navarrete, A., Mata, R., 2005. Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Medica* 71, 1099–1105.
- Hiraishi, H., Shimada, T., Ivey, K.J., Terano, A., 1999. Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289, 103–109.
- Korec, R., Heinz-Sensch, K., Zoukas, T., 2000. Effects of the neoflavonoid coumestrol, one of the antidiabetic active substances of *Hintonia latiflora*, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Drug Research* 50, 122–128.
- Korecova, M., Hladicova, M., Korec, R., 2006. *Hintonia latiflora* in patients with type 2 diabetes: a long-term study. *Zeitschrift für Phytotherapie* 27, 272–278.
- Landa, E., 1913. Estudio del Copalchi de Jojutla (*Coutarea latiflora*). *Anales del Instituto Médico Nacional* 12, 146–158.
- Lorke, D., 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 275–287.
- Martínez-Pérez, A., López, P.A., Gil-Muñoz, A., Cuevas-Sánchez, J.A., 2012. Plantas silvestres útiles y prioritarias identificadas en la Mixteca Poblana, México. *Acta Botanica Mexicana* 98, 73–98.
- Mata, R., Camacho, M.R., Cervera, E., Bye, R., Linares, E., 1990. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 29, 2037–2040.
- Mata, R., Del Rayo Camacho, M., Mendoza, S., Del Carmen Cruz, M., 1992. A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 31, 3199–3201.
- Mata, R., Acevedo, L., Méndez-Bautista, D.I., Guerrero-Analco, J.A., Rivero, B., Rodríguez, J.M., 2008. Development and validation of liquid chromatography method for quantification of the active markers of *Hintonia standleyana* and *Hintonia latiflora* crude drugs. *Pharmaceutical Biology* 46, 105–110.
- Mata, R., Navarrete, A., Cristians, S., Hersch, P., Bye, R., 2009. Monografías Científicas de las Plantas Medicinales de México: Copalchi. Sentido Giratorio Ediciones, Mexico City.
- Matsuda, H., Li, Y., Yoshikawa, M., 1999. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sciences* 65, 27–32.
- Matsui, T., Ogunwande, I.A., Abesundara, K.J.M., Matsumoto, K., 2006. Anti-hyperglycemic potential of natural products. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 6, 349–356.
- Miranda, H., Sierralta, F., Pinardi, G., 2001. An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception. *Anesthesia & Analgesia* 93, 430–435.
- Monforte, M.T., Lanuzza, F., Pergolizzi, S., Mondello, F., Tzakou, O.Galati, 2012. Protective effect of Calmintha officinalis Moench leaves against alcohol-induced gastric mucosa injury in rats. Macroscopic, histologic and phytochemical analysis. *Phytotherapy Research* 26, 839–844.
- Monroy-Ortiz, C., Castillo-España, P., 2007. Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca.
- Navarrete, A., Trejo-Miranda, J.L., Reyes-Trejo, L., 2002. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrateaceae) with gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 383–388.
- Noster, S., Kraus, L., 1990. In vitro antimalarial activity of *Coutarea latiflora* and *Exostema caribaeum* extracts on *Plasmodium falciparum*. *Planta Medica* 56, 63–65.
- Paris, R.R., Bastien, M., 1960. Apropos of the hypoglycemic action of 2 drugs named "copalchi": *Coutarea latiflora* (Rubiaceae) and *Croton niveus* (Euphorbiaceae). *Annales Pharmaceutiques Françaises* 18, 205–219.
- Pinto, A., Capasso, A., Sorrentino, L., 1997. Experimental animal studies on the hypoglycemic effects of a copalchi extract. *Drug Research* 47, 829–833.
- Reguero, M.T., Mata, R., Bye, R., Linares, E., Delgado, G., 1987. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine: cucurbitacins from *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products* 50, 315–316.
- Reher, G., Kraus, L., 1984. New neoflavonoids from *Coutarea latiflora*. *Journal of Natural Products* 47, 172–174.
- Robert, A., 1979. Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 77, 761–767.
- Rojas, A., Hernández, L., Pereda-Miranda, R., Mata, R., 1992. Screening for antimicrobial activity of crude extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 35, 275–283.
- de Sahagún, B., 1988. Historia general de las cosas de Nueva España: primera versión íntegra del texto castellano del manuscrito conocido como Códice Florentino (1540–1585). Alianza Editorial, Madrid.
- Salim, S., 1999. Role of oxygen-derived free radicals in mechanism of acute and chronic duodenal ulceration in the rat. *Digestive Diseases and Sciences* 35, 73–79.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K., 2011. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics* 403, 136–138.
- Shen, W., Qui, R., Zhang, J., Wang, Z., Wang, H., Hu, C., Zhao, Y., Bie, M., Wang, Y., Fu, Y., Chen, M., Lu, D., 2012. Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. *Brain Research Bulletin* 88, 487–494.
- Tapia, A., Rodríguez, J., Theoduloz, C., López, S., Feresin, E.G., Schmeda-Hirschmann, G., 2004. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 155–161.
- Terres, J., 1913. Informe rendido por el Director del Instituto a la Secretaría de Instrucción Pública y Bellas Artes de los trabajos realizados por el establecimiento del 1 de julio de 1911 al 31 de diciembre de 1912. *Anales del Instituto Médico Nacional* 12, 104–129.
- Wallace, J.L., 2001. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. *The American Journal of Medicine* 110, 19S–23S.
- Wan, B.Y.C., Gottfried, S., 1985. Cytoprotective action of carbenoxolone sodium on ethanol-induced gastric lesions in rats and its inhibition by indomethacin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 37, 739–741.
- Wu, X., Lin, S., Zhang, X., 2012. Antioxidant and antiapoptotic properties of chlorogenic acid on human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Medicinal Plants Research* 6, 708–715.

Mexican Antidiabetic Herbs: Valuable Sources of Inhibitors of α -Glucosidases[†]

Rachel Mata,* Sol Cristians, Sonia Escandón-Rivera, Krutzkaya Juárez-Reyes, and Isabel Rivero-Cruz

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

ABSTRACT: Type II-diabetes mellitus (TII-DM) has been regarded as one of the most important public health problems in all nations in the 21st century. Although allopathic therapies remain the most important for the initial management of TII-DM, herbal remedies have gained wide acceptance for treating this condition. These alternative therapies are particularly valued in countries such as Mexico, rich in medicinal plants strongly attached to the cultural values of the population. Medicinal plants are prized sources of α -glucosidase inhibitors, which delay the liberation of glucose from complex carbohydrates, retarding glucose absorption, and thus controlling the characteristic hyperglycemia of TII-DM. Among the plant species used for treating diabetes in Mexico only 38 have been analyzed for their inhibitory activity of α -glucosidases. Most of these studies, reviewed in the present work, have focused on the evaluation of different types of extracts on the activity of α -glucosidases from diverse sources. Four species have been thoroughly analyzed in order to discover novel α -glucosidase inhibitors, namely, *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* (Rubiaceae), *Ligusticum porteri* (Apiaceae), and *Brickellia cavanillesii* (Asteraceae). Their ethnomedical uses, pharmacological and toxicological studies, chemical composition, and antihyperglycemic principles with α -glucosidase inhibitory activity are summarized.



INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a polygenic complex metabolic disorder characterized by hyperglycemia. Many people suffer from diabetes mellitus type II (TII-DM), which is associated with low insulin production or insulin resistance due to genetic and/or epigenetic causes. TII-DM has been regarded as one of the most important public health problems in all nations in the 21st century, since the disease leads to serious complications resulting in increasing disability and reduction of life expectancy.^{1,2} The best treatment for TII-DM involves hyperglycemic control using appropriate therapies and a healthy lifestyle. Although metformin remains the most important oral agent for the initial management of TII-DM, there are increasing numbers of second- and third-line pharmacological agents for this condition.³ These include sulfonylureas, thiazolidinediones, incretin-based therapies, and α -glucosidase inhibitors. Frequently, these drugs are combined to make the treatment more efficient due to synergistic effects.⁴ The most recent incretin-based therapies are unable to halt the progression of TII-DM, possibly because they do not increase secretion of endogenous insulin analogue glucagon-like peptide-1 (GLP-1). However, recent evidence suggests that G-protein-coupled receptor (GPCR) agonists, inhibitors of α -glucosidases, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists, metformin, bile acid mimetics, and bile acid sequestrants represent new approaches to the management of TII-DM via modification of endogenous GLP-1 secretion.⁵

α -Glucosidases are membrane-bound enzymes of the GH31 family that hydrolyze larger carbohydrate molecules to glucose and related monosaccharides.³ Most of these enzymes are located in the brush border of the small intestine, where they

catalyze the final step in the digestive process of carbohydrates. Hence, α -glucosidase inhibitors can delay the liberation of glucose from dietary complex carbohydrates, retarding glucose absorption and lowering the postprandial blood glucose peak. Consequently, α -glucosidase inhibitors are useful to prevent the progression of the disease and for treating prediabetic conditions.⁴

The best known α -glucosidase inhibitors are acarbose and miglitol; the former is a natural product isolated initially from an *Actinoplanes* strain, and the second is the *N*-hydroxyethyl analogue of 1-deoxynojirimycin, isolated from *Morus* spp.^{3–5} Unfortunately, these products produce gastrointestinal complaints.³ In recent years many efforts have been made to identify effective inhibitors of α -glucosidases from natural sources in order to find lead compounds for the development of new drugs or herbal preparations useful for the treatment of diabetes.^{6,7} As a result of this endeavor, a few natural products with inhibitory properties against α -glucosidases have been isolated from plants, mostly flavonoids and alkaloids, but also including some terpenoids and anthocyanin glycosides.^{6–10}

As elsewhere, the incidence of diabetes in Mexico is very high, with the number of cases also increasing rapidly.¹¹ A significant segment of the population believes that treatment with plants is safer and less expensive than with allopathic medicine. Furthermore, some patients stop their conventional treatments and begin using plants. This situation is not unusual

Special Issue: Special Issue in Honor of Lester A. Mitscher

Received: December 14, 2012

Published: February 11, 2013

in a country like Mexico that is rich in medicinal plants strongly attached to the cultural values of the population.^{12,13}

According to recent reviews, in Mexico there are at least 383 plant species employed for the treatment of TII-DM, but only a few of these have been investigated for their preclinical or clinical efficacy.^{12,14–20} With this in mind, it is important to pursue the pharmacological research of a few of these species to support their rational use and to discover new herbal-based therapies for the treatment of diabetes.

■ FROM PLANTS TO α -GLUCOSIDASE INHIBITORS

Among the plant species highly prized for treating diabetes in Mexico only 38 have been analyzed for their inhibitory activity of α -glucosidases. Most of these studies have focused on the evaluation of different types of extracts (organic or aqueous) on the activity of α -glucosidases from different sources (e.g., baker's yeast, murine, *Bacillus stearothermophilus*, and pig intestine crude enzymatic preparation). Table 1 summarizes these studies and includes the plant species, the part of the plant used, the sample tested, and the inhibitory activity of α -glucosidase found by means of enzymatic testing and by in vivo tests, when performed.^{21–46} Only six of these studies have led to the isolation of new inhibitors of α -glucosidases,^{30,33,37,44–46} and only three were conducted on plants grown in Mexico.^{44–46} Thus, this review aims at describing the ethnomedical uses, preclinical pharmacological studies, and antidiabetic principles of the latter group of plants, inclusive of *Hintonia latiflora* (Sessé & Moc. ex DC.) Bullock (Rubiaceae), *Hintonia standleyana* Bullock (Rubiaceae), *Ligusticum porteri* Coult. & Rose (Apiaceae), and *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray (Asteraceae).^{44–48}

For conducting studies focused on the isolation of α -glucosidase inhibitors from *H. latiflora*, *H. standleyana*, *L. porteri*, and *B. cavanillesii*, first potential preclinical toxicity using the Lorke procedure was assessed.⁴⁹ This method measures acute toxicity for 14 days in mice using a range of doses between 10 and 5000 mg/kg, in two phases. Those plants lacking acute toxicity effects were then tested for their antidiabetic potential in vivo by means of well-known animal models; this issue is relevant since the initial bioassays selected should hold the potential to measure a reduction on blood glucose levels. For the antidiabetic action in vivo two sets of experiments are employed.^{50–52} In the first of these, the acute hypoglycemic activity in normoglycemic and diabetic animals (ICR mice or Wistar rats) is assessed. If feasible, subchronic (14 days) or chronic (30 days) experiments are also performed.⁵⁰ The second group of assays is used to measure the antihyperglycemic action of the extracts or compounds after a glucose [1 g/kg; oral glucose tolerance test, OGTT], sucrose [2 g/kg; oral sucrose tolerance test, OSTT], or starch [2 g/kg; oral starch tolerance test, OStarchTT] challenge, using normal and diabetic animals. These tests provide relevant information regarding peripheral utilization or absorption of glucose.⁵² In particular, the last two types of experiments are useful to detect inhibitors of α -glucosidases. In all tests, the animals are made diabetic with streptozotocin (STZ, 100 mg/kg for mice and 50 mg/kg for rats), after previous protection with nicotinamide (NA, 40 mg/kg for mice and 65 mg/kg for rats). This preliminary treatment with NA provokes partial protection against the oxidant action of STZ, leading to a diabetic syndrome much more like TII-DM.⁵³ After 7 days of NA-STZ administration, the animals were generally diabetic and included in the studies conducted subsequently. Glybenclamide

(Gly, 10 mg/kg) and acarbose (AC, 5 mg/kg) are used as positive controls, depending on the type of experiment. Percentage variation of glycemia for each group of animals is calculated with respect to the initial values at different periods of time. The results are plotted indicating blood glucose values or percentage of variation versus time at several doses. Alternatively, the area under the curve, integrated values over time at different doses, can be plotted.⁵⁰

For those extracts showing antihyperglycemic action in the OSTT, an in vitro inhibition test for α -glucosidases is carried out using a well-known spectrophotometric procedure.⁵⁴ This assay measures the ability of baker's yeast α -glucosidases to hydrolyze a suitable substrate (*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) in the presence of the potential inhibitor; AC is also used as positive control.

Finally, extracts with evident activity in the OSTT and enzymatic assay then are subjected to activity-guided fractionation to isolate the active principles. Once the compounds are obtained and characterized, they are tested in vitro for their α -glucosidase inhibitory activity. If the quantity of the active compounds is sufficient, in vivo antihyperglycemic studies using the OSTT are conducted. In addition, other relevant assays might be carried out.

***Hintonia latiflora* and *H. standleyana*.** *H. latiflora* belongs to the Mexican medicinal plant complex known as “copalchi”. This complex comprises several species of the genus *Croton* in the Euphorbiaceae family as well as several Rubiaceae of the genera *Coutarea*, *Exostema*, and *Hintonia*. There are three common features of species belonging to this plant complex: the first is their extremely bitter stem bark; second, their long-term use as a substitute of cinchona bark for healing fevers associated with malaria; and finally, their recent use for the treatment of TII-DM.⁵⁵ Owing to their employment as cinchona bark substitutes, the “copalchi” species of the Rubiaceae, namely, *H. latiflora*, *H. standleyana*, and *Exostema caribaeum*, are also known as “falsas quinas” (false cinchona barks).⁵⁵

H. latiflora and *H. standleyana* are endemic to Mexico and Northern Guatemala.⁵⁶ Many authors have treated *H. standleyana* as a synonym of *H. latiflora*.⁵⁷ However, morphological and molecular studies have demonstrated recently that the two plants should be recognized within the genus *Hintonia* as independent species.⁵⁸ Regarding their morphological differences, the flowers and leaves of *H. latiflora* are hairless and the leaves possess domatia on the back side; in contrast, the flowers of *H. standleyana* are white-pubescent and the leaves are hairy without domatia.⁵⁹ On the other hand, analysis of certain regions of ribosomal and chloroplast DNA has revealed low but important divergences in the base sequences of the two species. Thus, these findings provide genetic support for the segregation of the two *Hintonia* taxa.^{56,58}

In modern day Mexico, *H. latiflora* is used for the treatment of gastritis, urinary infections, pain, malaria, and diabetes.^{15,16} Owing to its antidiabetic effect, Mexican and several European drug companies have commercialized herbal products containing the stem bark of *H. latiflora* for more than nine decades.^{60,61} It is worth mentioning that the hypoglycemic properties of this plant were discovered in Mexico City at the Instituto Medico Nacional (IMN) at the beginning of the 20th century.⁶² When this institution closed in 1913, Dr. Antoni Novellas introduced Mexican “copalchi” to Spain for treating diabetes.⁶³

Table 1. Medicinal Plants and Isolated Compounds Used in Mexican Traditional Medicine with Inhibitory Activity against α -Glucosidases

family	plant	crude drug	extract/compound	source of α -glucosidases	IC ₅₀ /% inhibition	in vivo test	ID ₅₀ /% inhibition	ref(s)
Annonaceae	<i>Annona squamosa</i> L.	roots	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	22.3 ± 1.6%	ND ^a	ND ^a	21
	<i>Malmecia depressa</i> (Baill.) R.E. Fr.	roots, leaves	butanol extract	baker's yeast	21.0 µg/mL	oral maltose tolerance test	active at 96 mg/kg	22
Apiaceae	<i>Ligusticum porteri</i> J.M. Coult. & Rose	rhizomes	(Z)-3-butylenephthalide (27)	baker's yeast	2.35 mM	OSTT ^b	active at 56.2 mg/kg	45
	<i>Cuminum cyminum</i> L.	seeds	aqueous extract aqueous extract	baker's yeast rat intestine crude homogenate	40.0 ± 2.0% 24.0 ± 0.13 mg/mL	ND ^a	ND ^a	23, 24
Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i> L.	aerial parts	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	52.3 ± 4.1%	ND ^a	ND ^a	21
	<i>Artemisia absinthium</i> L.	aerial parts	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	67.7 ± 3.7%	ND ^a	ND ^a	21
	<i>Bidens pilosa</i> L.	aerial parts	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	41.8 ± 1.7%	ND ^a	ND ^a	21
	<i>Brickellia cavanillesii</i> (Cass.) A. Gray	aerial parts	aqueous extract	baker's yeast	0.169 mg/kg	OSTT ^b	active at 100 mg/kg	46
			6-hydroxyacetyl-5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene (45)	baker's yeast	0.42 mM			
Bignoniaceae			calein C (47)	baker's yeast	0.28 mM			
			isorhamnetin (50)	baker's yeast	0.16 mM			
			quercetin (52)	baker's yeast	0.53 mM			
		aerial parts	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	61.1 ± 1.7%	ND ^a	ND ^a	21
		aerial parts	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	60.6 ± 1.5%	ND ^a	ND ^a	21
		whole plant	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	12.0 ± 1.5%	ND ^a	ND ^a	21, 25
			aqueous extract	baker's yeast	2.3 mg/mL			
		branches, leaves, roots	hydroalcohol extract aqueous extract	rat intestine crude homogenate homogenate	32.3 ± 1.7% 0.73 mg/mL	OSTarchTT ^c	active at 250 mg/kg	21, 26
		bark	methanol extract	rat intestine crude homogenate	1.9 mg/mL	OSTT ^b	active at 100 mg/kg	27
		stems	methanol extract	rat intestine crude homogenate	3.43 mg/mL	OSTT ^b	active at 310 mg/kg	28
Bixaceae	<i>Cochlospermum vitifolium</i> (Willd.) Spreng.					oral maltose tolerance test	active at 310 mg/kg	21
	<i>Tournefortia mutabilis</i> Vent.						active at 310 mg/kg	21
Brassicaceae	<i>Lepidium virginicum</i> L.	leaves	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	18.0 ± 1.1%	ND ^a	ND ^a	21
	<i>Momordica charantia</i> L.	leaves, fruits	methanol extract	baker's yeast	12.72 ± 2.65 µg/mL	OSTT ^b (aqueous extract)	active at 600 mg/kg	29–31
			momordicoside A (54)	rat intestine acetone powder	21.71 ± 2.08%			
			momordicoside M (55)	rat intestine acetone powder	18.63 ± 2.34%			
			karaviloside III (56)	rat intestine acetone powder	15.85 ± 3.14%			
			charantoside C (57)	rat intestine acetone powder	13.61 ± 2.90%			
			momordicoside G (58)	rat intestine acetone powder	13.14 ± 2.17%			
			momordicoside C (59)	rat intestine acetone powder	12.98 ± 3.14%			
			7 β ,25-dihydroxycucurbita-5,23(E)-dien-19-yl 3-O- β -D-allopyranosyl (60)	rat intestine acetone powder	12.86 ± 3.47%			
			momordicoside F ₂ (61)	rat intestine acetone powder	12.50 ± 1.25%			
			momordicoside F ₁ (62)	rat intestine acetone powder	11.51 ± 2.73%			
			goyaglicoside-b (63)	rat intestine acetone powder	10.88 ± 0.83%			

Table 1. continued

family	plant	crude drug	extract/compound	source of α -glucosidases	IC ₅₀ /% inhibition	in vivo test	ID ₅₀ /% inhibition	ref(s)
Convolvulaceae	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	roots	momordicoside I (64) organic extract	rat intestine acetone powder rat intestine acetone powder	10.11 ± 3.47% 1.10 mg/mL	ND ^a ND ^a	ND ^a ND ^a	32–34
Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i> L.	leaves	peonidin YGM-3 (65) peonidin YGM-6 (66) hydroalcohol extract	rat intestine acetone powder rat intestine acetone powder rat intestine crude homogenate	193 μ M 200 μ M 58.0 ± 1.9%	oral maltose tolerance test	220 mg/kg ND ^a ND ^a	21
Fabaceae	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	branches	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	21.0 ± 3.1%	ND ^a	ND ^a	21, 35
			petroleum ether extract	baker's yeast	29.04 ± 14.51%			
			dichloromethane extract	baker's yeast	33.11 ± 9.61%			
			ethanol extract	baker's yeast	77.52 ± 8.33%			
			butanol extract	baker's yeast	109.0 μ g/mL	oral maltose tolerance test	active at 100 mg/kg	22
	<i>Leptolobium panamense</i> (Benth.) Sch. Rodr. & A.M.G. Azevedo	bark						
		fruits	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	30.1 ± 2.2%	ND ^a	ND ^a	21
Lamiaceae	<i>Tamarindus indica</i> L.	aerial parts,	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	31.1 ± 2.3%	ND ^a	ND ^a	21
	<i>Marrubium vulgare</i> L.	roots	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate		ND ^a	ND ^a	21
Lauraceae	<i>Persca americana</i> Mill.	leaves, bark,	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	17.9 ± 2.9%	ND ^a	ND ^a	21
		seeds	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate		ND ^a	ND ^a	21
Malvaceae	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	bark, leaves,	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	23.0 ± 3.9%	ND ^a	ND ^a	21
		fruits	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate		ND ^a	ND ^a	21
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	leaves	aqueous extract	murine intestine	6.21 μ g/mL	ND ^a	ND ^a	36, 37
			methanol extract	glucosidases mice intestine	1.80 μ g/mL	ND ^a	ND ^a	36, 37
			melicidin (67)	crude homogenate	32.18 μ g/mL	ND ^a	ND ^a	23
Monimiaceae	<i>Peumus boldus</i> Molina	leaves	aqueous extract	baker's yeast	~100%	ND ^a	active at 1 g/kg	21, 38
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	leaves, fruits	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	33.6 ± 3.0%	OSTT ^b	OSTT ^b	21, 38
			hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate		OSTT ^b	OSTT ^b	21, 38
	<i>Psidium guajava</i> L.	leaves	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	39.5 ± 3.0%	OSTT ^b	OSTT ^b	21, 24, 39, 40
			aqueous extract	rat intestine crude homogenate	60.8 ± 2.1 μ g/mL	oral maltose tolerance test	37.8% 29.6% 31.0%	21, 24, 39, 40
			aqueous extract	rat intestine crude homogenate	10.0 ± 0.04 mg/mL	OSTT ^b	OSTT ^b	21, 24, 39, 40
Onagraceae	<i>Ludwigia octovalvis</i> (Jacq.) P.H. Raven	aerial parts	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	82.7 ± 1.9%	ND ^a	ND ^a	21
Pinaceae	<i>Pinus</i> sp.	bark	ethanol extract	baker's yeast	0.025 μ g/mL	food intake tolerance test (postprandial blood glucose inhibition)	active at 250 mg/kg	41
Piperaceae	<i>Piper sanctum</i> (Miq.) Schtdl. ex C. DC.	leaves	hydroalcohol extract	porcine small intestine Bacillus stearothermophilus	155 μ g/mL 0.033 μ g/mL	ND ^a	ND ^a	21
Rosaceae	<i>Crataegus mexicana</i> DC.	roots, leaves, branches	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	10.5 ± 0.8%	ND ^a	ND ^a	21
	<i>Prunus serotina</i> Ehrh.	fruits	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	38.6 ± 1.6%	ND ^a	ND ^a	21
			hydroalcohol extract	rat intestine acetone powder	60.0 ± 5.0%	ND ^a	ND ^a	42
Rubiaceae	<i>Hintonia latiflora</i> (Sessé & Moc. ex DC.) Bullock	bark	hydroalcohol extract compound 10a compound 12a aqueous extract	rat intestine crude homogenate baker's yeast baker's yeast baker's yeast	39.2 ± 3.5% 62 μ M 208 μ M 88.0 ± 2.0%	OSTT ^b	active at 300 mg/kg	21, 44
Smlilaceae	<i>Smilax officinalis</i> Kunth	roots	aqueous extract	baker's yeast		ND ^a	ND ^a	23

Table 1. continued

family	plant	crude drug	extract/compound	source of α -glucosidases	IC ₅₀ /% inhibition	in vivo test	ID ₅₀ /% inhibition	ref(s)
Urticaceae	<i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol.	leaves	butanol extract	baker's yeast	14.0 μ g/mL	oral maltose tolerance test	active at 96 mg/kg	21, 22
Zingiberaceae	<i>Urtica dioica</i> L.	leaves	hydroalcohol extract	rat intestine crude homogenate	28.0 \pm 1.9%		ND ^a	25
	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	rhizomes	aqueous extract	baker's yeast	3.7 mg/mL	ND ^a	ND ^a	23, 43
				ethyl acetate extract	baker's yeast	22.0 \pm 2.0%	ND ^a	ND ^a

^aND = no data available. ^bOSTT: oral sucrose tolerance test. ^cOStarchTT: oral starch tolerance test.

The first written report on the medicinal use of *H. latiflora* appeared in the 16th century in the *Florentine Codex* of Bernardino de Sahagún,⁶⁴ which is perhaps the major source of Aztec life in the years before the Spanish Conquest. The original source materials were records of conversations and interviews with indigenous populations in central Mexico. In this codex, a bitter stem bark is referred to by the local people as “chichic patli”, which means in Nahuatl “bitter medicine”. The drug was used as a eupeptic and diuretic agent. Several authorities have identified “chichic patli” of the *Florentine Codex* as *H. latiflora*.⁶⁵

In the 16th century, Francisco Hernández, the personal physician to King Philip II, in his book *Plants and Animals of the New Spain and its Virtues* described a plant named “copalxihuitl”, which resembled *H. latiflora* in appearance.⁶⁶

Next, in 1802, when the Royal Scientific Expedition to New Spain ended, two “copalchi” plants were described as being among the most important medicinal plants of New Spain. One “copalchi” was from Guadalajara and turned out to be *H. latiflora*, and the second was *Croton niveus*, a species of the Euphorbiaceae family. Both “copalchi” species were valued for their antiseptic and antipyretic properties.⁶⁷ The best testimony to the value of these two plants was their inclusion in the Torner Collection paintings, which were part of the documentation of the work of the Royal expedition commanded by Sessé and Mociño.⁶⁸

Croton niveus was introduced to Europe in 1817, through Hamburg in Germany.⁶⁰ Ten years later the plant was commercialized in Europe for the treatment of the fevers associated with malaria, although its virtues were recorded already in 1802 in the *Archivo del Real Jardín Botánico de Madrid*.⁶⁹ In 1868, the stem bark of *H. latiflora* was introduced in Europe as a substitute for *C. niveus* for the treatment of malaria.⁷⁰

From 1890 to 1913 the stem bark of *H. latiflora* was subjected to several chemical, pharmacological, and clinical investigations in Mexico City at the IMN. The results were published in the scientific journal of this center, namely, *Anales del Instituto Medico Nacional*.⁶² The more relevant findings of these studies included the isolation of a glycoside that was later rediscovered by German and French researchers; the compound was devoid of toxic effects and provoked diuresis and an increment in the body weight of the test animals.^{62,71–73} Most importantly, Landa demonstrated clinically the hypoglycemic properties of an extract of the plant and a glycosidic constituent (Figure 1).⁷⁴ After these investigations, researchers at the IMN recommended the use of “copalchi” as a diuretic and an antidiabetic agent.⁷⁴ It is notable that in 1913, when IMN closed in Mexico City, Dr. Antoni Novellas, an erudite authority in the field of pharmacy, introduced the “Copalchi of Novellas” in Spain for the treatment of diabetes.⁶³

Later on, researchers in Germany and France corroborated the earlier work of these Mexican scientists. Thus, in the 1950s the stem bark of *H. latiflora* was investigated chemically and pharmacologically by Kaiser and Geyer (1955), who isolated two flavone glycosides, one of which having similar properties to that isolated by Terres in Mexico.⁷⁵ In 1960, Paris and Bastien in France established the antihyperglycemic effect of a methanol extract of *H. latiflora* in rabbits. In addition, the French researchers isolated a glycoside derivative named coutareoside, with a molecular formula of C₂₂H₂₄O₁₂, also regarded as a flavone glycoside.⁷⁶ Coutareoside, upon acid hydrolysis, yielded an aglycone (coutareagenin) with similar

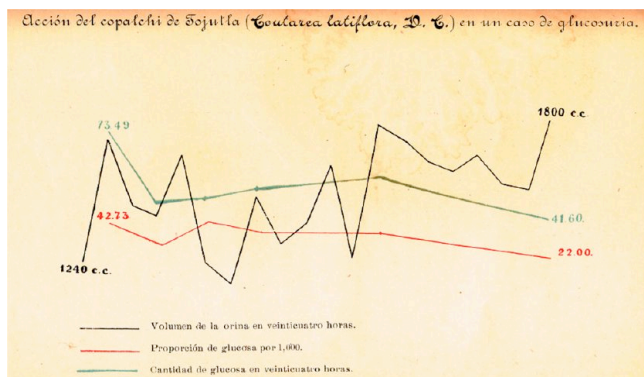


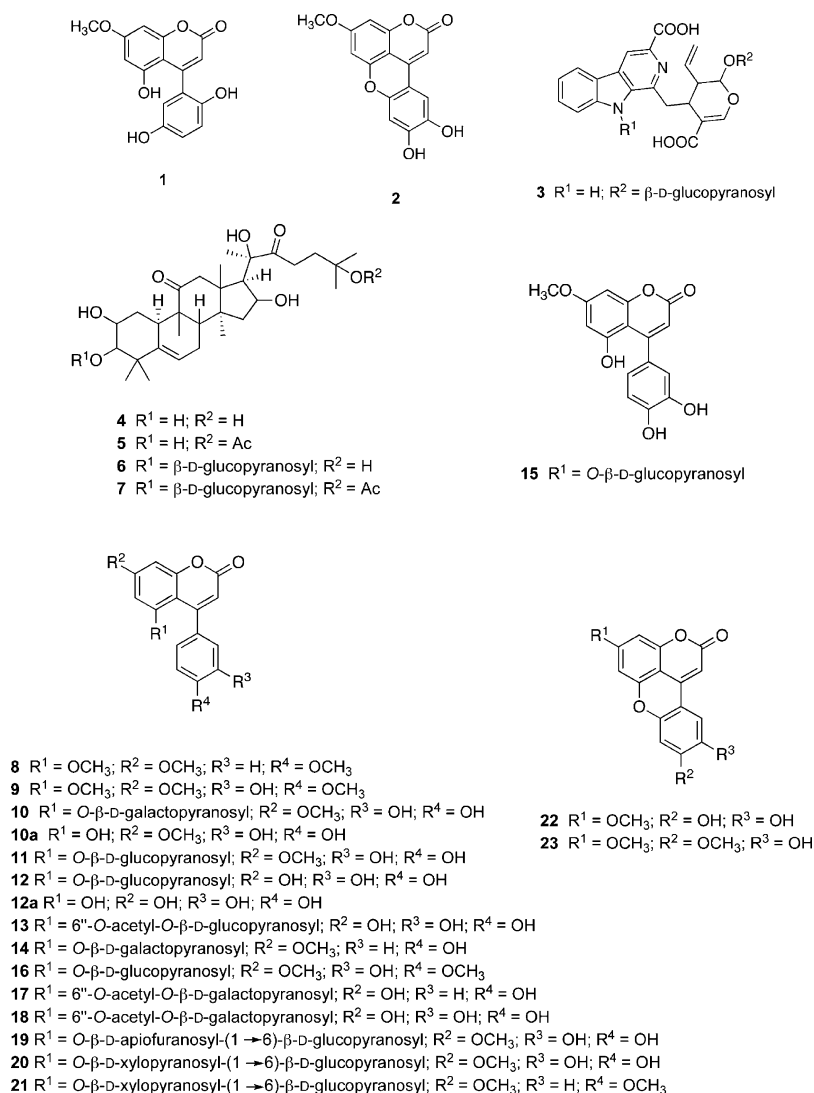
Figure 1. Hypoglycemic and diuretic effects exerted by a *Hintonia latiflora* hydroalcohol extract in a clinical trial conducted at IMN, Mexico City (adapted from ref 74). Urine volume during a 24 h period (black line); amount of glucose in urine during a 24 h period (green line); proportion of glucose per liter (red line).

properties to compound **10a**. After the earlier contribution of Paris and Bastien, Reher and Kraus reported on the isolation and structure elucidation of 7-methoxy-5,2',5'-trihydroxy-4-

phenylcoumarin (**1**) and 7-methoxy-4',5'-dihydroxy-4-phenyl-5,2'-oxidocoumarin (**2**) in 1984.⁷⁷

In 1997, an Italian group led by Capasso from the University of Palermo analyzed the hypoglycemic effect of the product Sucontral in Wistar rats for 30 days.⁷⁸ Sucontral is produced by Harras Pharma Curarina GmbH as a combination of a bioactive concentrate from the *Hintonia* plant plus antioxidative, neuroprotective vitamins and trace elements. In 1999, the first patent on the hypoglycemic properties of 4-phenylcoumarins was filed in Germany. In 2005, Vierling in her Ph.D. dissertation demonstrated that Sucontral has vasodilating effects in vitro and in vivo. Such activities were attributed to the inhibition of an intracellular calcium increase regulated by G-coupled proteins.⁷⁹ In the same year, the hypoglycemic efficacy and safety of Sucontral were tested in a monocenter open, uncontrolled study in 30 patients with TII-DM. After 12 months of therapy, fasting glucose was reduced by 20%, postprandial glucose by 19%, and the mean glycosylated hemoglobin by 10%. There were no hypoglycemic episodes or adverse events throughout the total treatment period. The product manufacturer sponsored this clinical study.⁸⁰

Chart 1



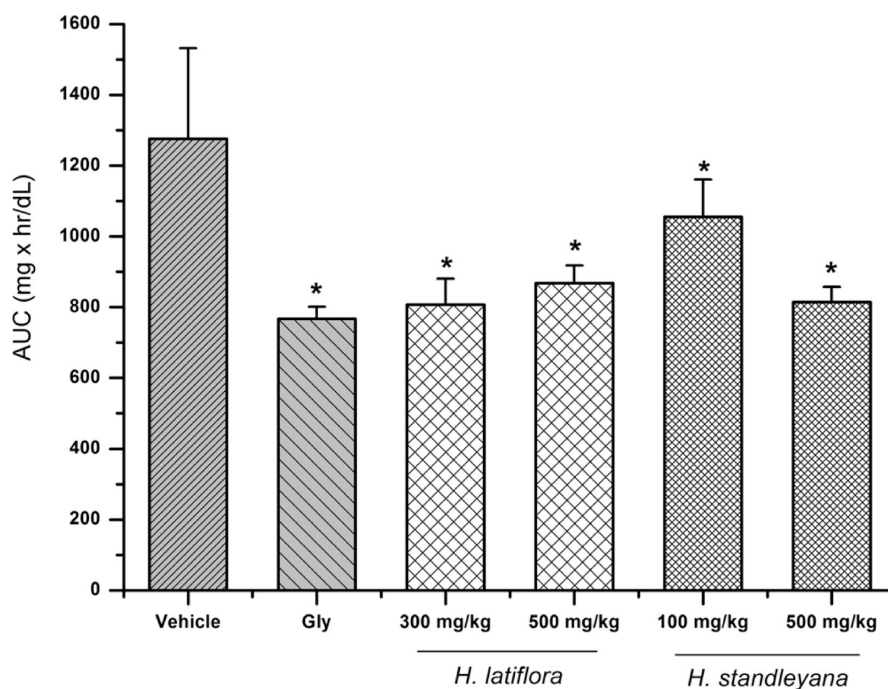


Figure 2. Effect of the aqueous extracts from the stem bark of *Hintonia latiflora* and *H. standleyana* on blood glucose levels in NA-STZ-diabetic mice in an acute hypoglycemic test (* $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's t -test for comparison with respect to vehicle).

From 1987 to the present our group has published several chemical and pharmacological studies on “copalchi”. The phytochemical analyses of the stem bark of these plants have allowed the discovery of cucurbitacins in a plant of the family Rubiaceae as well as the identification of several new 4-phenylcoumarin glycosides, a novel styrene, and desoxycordifolinic acid (3), an indole alkaloid.^{44,47,48,81–85} The isolated cucurbitacins are based on dihydrocucurbitacin F and were characterized as 23,24-dihydrocucurbitacin F (4), 25-acetyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (5), 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (6), and 25-*O*-acetyl-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (7).^{47,48,81} The 4-phenylcoumarins (8–23) obtained were 5,7,3',4'- or 5,7,4'-substituted with oxygenated functionalities, with the former having the most common pattern; the sugar portion is usually a monosaccharide (β -D-galactose, β -D-glucose, 6''-acetyl- β -D-glucose, or 6''-acetyl- β -D-galactose), although a few disaccharides were also found (β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose or β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose). In all cases, the saccharide unit is attached to the hydroxy group at C-5. According to its spectroscopic and physical properties, compound 10 was found to resemble the glycoside isolated by Mexican⁷⁴ researchers 100 years earlier and then later by German⁷⁵ and French⁷⁶ researchers. While pursuing these investigations, it was demonstrated that 4-phenylcoumarins undergo oxidative cyclization under aerobic alkaline conditions to give oxido-4-phenylcoumarins. Thus, 7-methoxy-5,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (10a) was converted to 7-methoxy-4',5'-dihydroxy-4-phenyl-5,2'-oxidocoumarin (22) by treatment with potassium hydroxide in methanol. Since the reaction took place only in basic conditions and in the presence of air, it might proceed via an oxidative phenol coupling process. Thus, if oxido-coumarins are natural products, they might be generated from simple 4-phenylcoumarins via an oxidative phenol coupling reaction.⁸⁶

More recently, our research group studied *H. standleyana* and reinvestigated *H. latiflora*; the preclinical toxicity protocol used revealed that none of the extracts of the stem bark of both *Hintonia* are toxic to mice. Moreover, these extracts did not induce mutagenic effects using *Salmonella typhimurium* strains when assayed by the Ames test.⁸⁷ The hypoglycemic effects of the organic extract and of compounds 5 and 19 from *H. standleyana* were established in both acute and chronic experiments.⁴⁷ Furthermore, the hypoglycemic activity of cucurbitacin-type compounds was demonstrated for the first time. In a different study, the efficacies of extracts and several isolates from *H. latiflora* were compared. The extracts (50 mg/kg each time) and compounds 3, 4, 10–12, 19, and 20 (15 mg/kg each time) were administered orally twice a day to diabetic rats, for a period of 30 days. The results showed that both the extracts and compounds 4, 10–12, 19, and 20 induced significantly more pronounced hypoglycemic effects in diabetic rats than controls, although compound 3 was inactive. An extract of *H. latiflora* and compound 12 restored blood glucose levels to normal values, with the effect comparable to that of Gly. Compounds 10 and 11 also restored blood glucose levels to near normal values by the end of the experiment. During this study, it was also demonstrated that the extract of *H. latiflora* regulated both hepatic glycogen and plasma insulin levels ($p < 0.05$). These data suggested that its hypoglycemic effect is due in part to stimulation of insulin secretion and regulation of hepatic glycogen metabolism. Comparison of the hypoglycemic activity of the 4-phenylcoumarins tested established that the most active compounds possess a free hydroxy group at C-7 in the 4-phenylcoumarin core. On the other hand, comparison of the activity of all glycosides tested indicated that the nature of the sugar moiety (glucose, galactose, β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose, or β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose) had little or no influence on the biological activity.⁴⁸

Infusions of the stem bark of both *Hintonia* species were prepared in the manner used popularly. For 20 g of dry stem

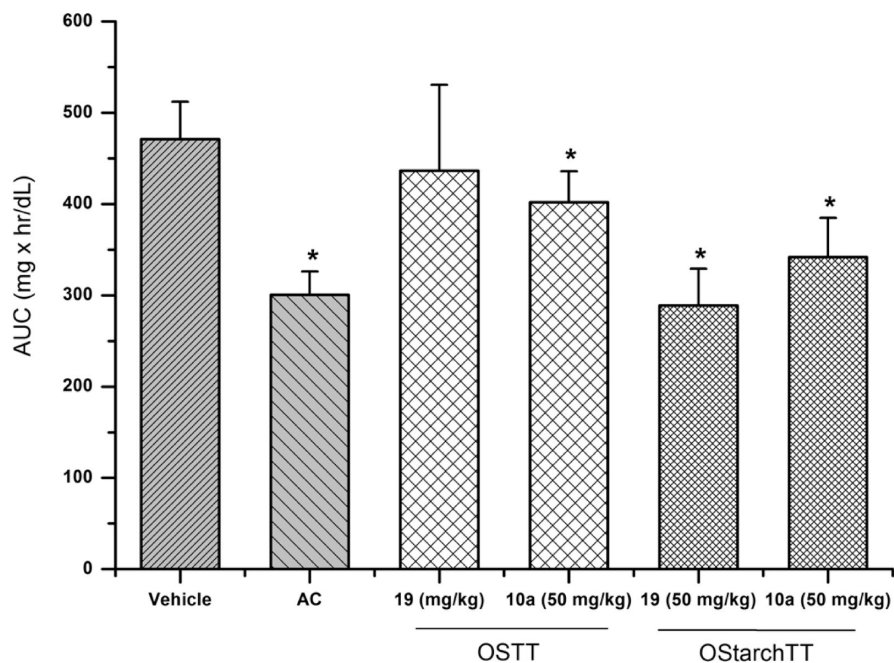


Figure 3. Effect of compounds **19** and **10a** from *Hintonia latiflora* on blood glucose levels in NA-STZ-diabetic mice after an oral sucrose or starch load (2 g/kg in both cases; * $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's t -test for comparison with respect to vehicle).

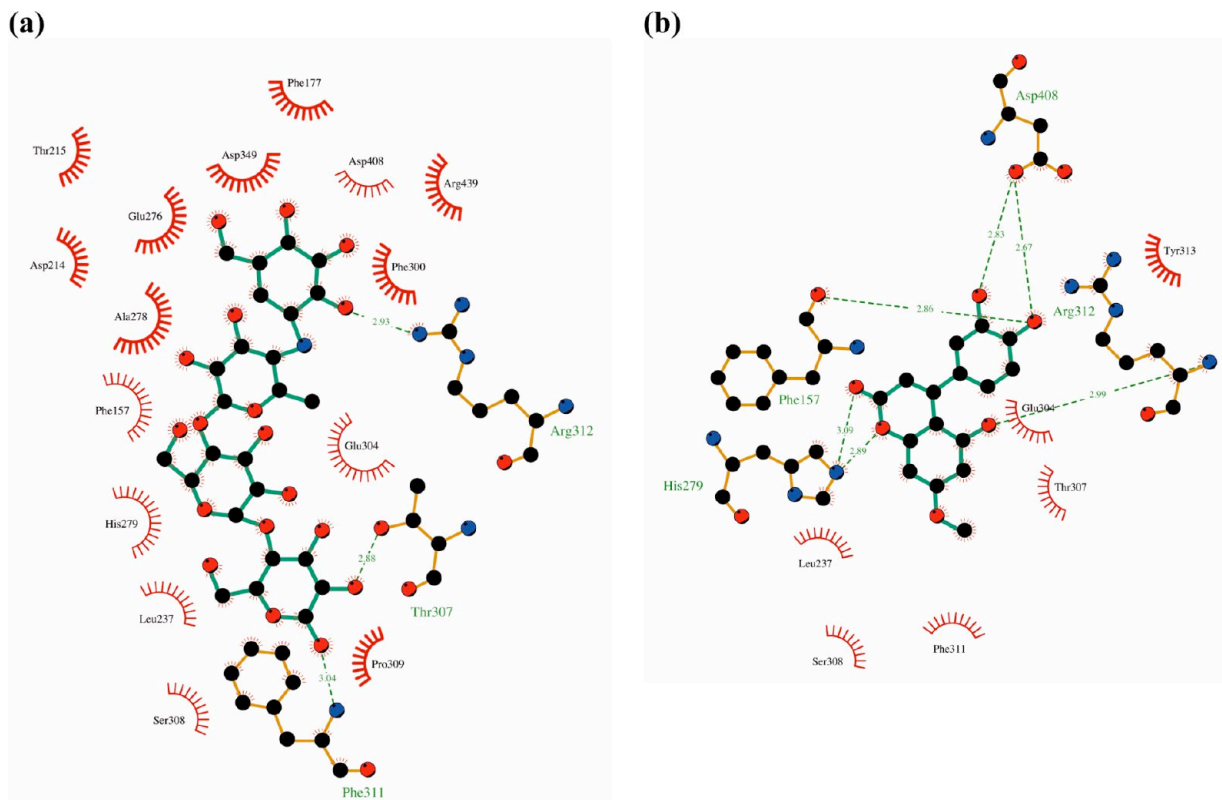
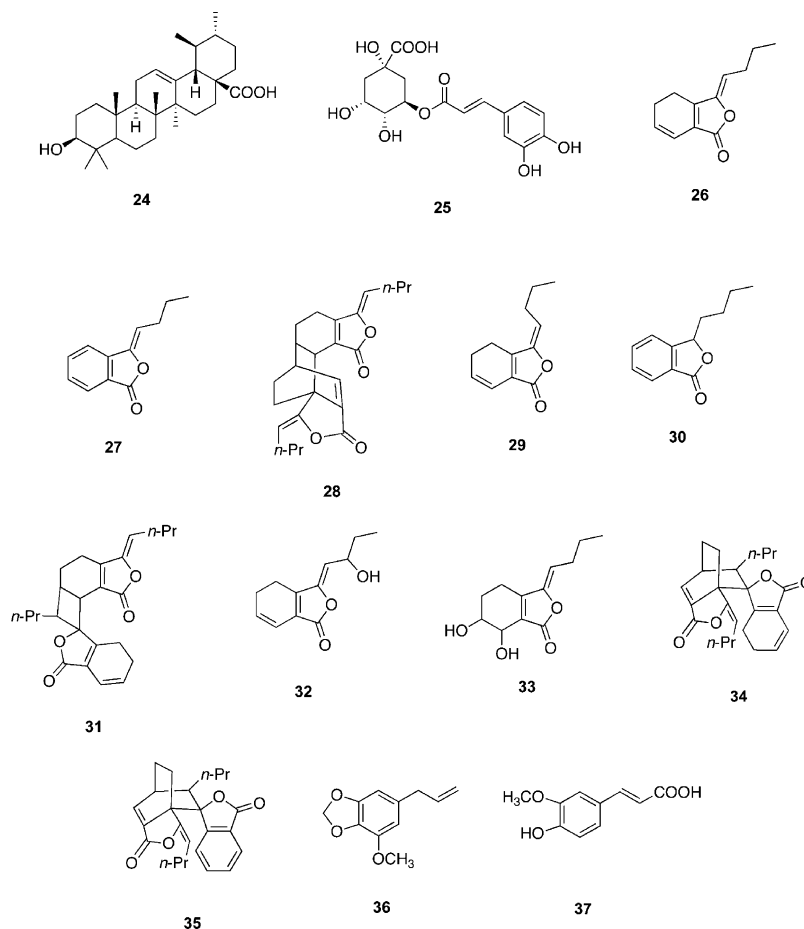


Figure 4. Docking results using the structural model of α -glucosidase: site of binding of acarbose, which comprises the catalytic site of the enzyme; binding conformation of compound **10a**. Graphic plotted using LigPlot.

bark, 500 mL of boiling distilled water was used. The resulting infusions were not toxic ($LD_{50} \geq 5$ g/kg) but were active in all the hypoglycemic and OSTT experiments in mice (Figure 2). The notable antihyperglycemic action observed in the OSTT suggested that the aqueous extracts also contained inhibitors of α -glucosidases. In addition, the major components of the

infusions were 4-phenylcoumarin glycosides; in the case of *H. latiflora* the most abundant compound was **20**, and for *H. standleyana*, the most relevant was **19**. On the basis of the above results, reliable, reproducible, and accurate high-performance liquid chromatography (HPLC)–UV methods were developed

Chart 2



for the quantitative determination of compounds **20** and **19** in infusions of *H. standleyana* and *H. latiflora*, respectively.⁸⁸

The *in vitro* α -glucosidase inhibitory activity of several glycosides present in the infusions was tested; in addition the aglycones **10a** and **12a** were evaluated. The results indicated that both aglycones **10a** and **12a** inhibited the activity of yeast α -glucosidases in a concentration-dependent manner; the IC_{50} values were 62 and 208 μ M, respectively, compared with 569 μ M for AC. For the most active aglycone (**10a**) the results were corroborated *in vivo* by means of an OSTT in NA-STZ-diabetic mice. The results of this experiment clearly revealed that **10a** decreased the postprandial peak (Figure 3) at a concentration of 50 mg/kg.

The binding site of **10a** was estimated by a docking study, performed using the program AutoDock4, a protein model built by homology with *Bacillus cereus* α -glucosidase, which possessed the highest sequence identity (38.9%) with α -glucosidases from yeast employed for the theoretical study. The results predicted that **10a** binds to the yeast α -glucosidases in the same pocket as AC ($K_i = 0.024 \mu$ M) with a K_i value of 4.56 μ M (Figure 4).

Interestingly, **10a** and glycoside **19** were also very active in an OStarchTT (Figure 3), thus indicating that both compounds possess also α -amylase inhibitory activity.

Since the stem bark of *Hintonia* has been commercialized extensively, both locally and outside of Mexico, and is usually harvested from wild plants, the populations are now scarce and in danger of extinction.⁸⁹ Therefore, it is important to protect these valuable resources by regulating their commercialization

and finding similar therapeutic alternatives. In order to reach this goal, we decided to determine if the leaves of both *Hintonia* species possess the same antidiabetic efficacy and safety as their individual stem bark. Indeed, CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) extracts of the leaves from *H. standleyana* and *H. latiflora* both caused a significant decrease in blood glucose levels, in both normal and diabetic rats, when compared with vehicle-treated groups ($p < 0.05$). These extracts did not provoke death or damage, behavioral alterations, or lesions or bleeding of the internal tissues of the animals, throughout the experiments conducted.⁴⁴

From the hypoglycemic extract of the leaves of *H. standleyana*, the new 4-phenylcoumarins **17** and **18** were obtained. The analogous extract of *H. latiflora* yielded the 4-phenylcoumarin **21** along with several known compounds, including ursolic acid (**24**). As expected, compounds **17** and **18** showed hypoglycemic activity. In addition, HPLC profiles of the leaf extracts of both plants revealed the presence of several hypoglycemic 4-phenylcoumarins isolated from the stem bark as well as chlorogenic acid (**25**).⁴⁴ The overall results indicated that the leaves of both species possess similar antidiabetic action to their stem bark. Therefore, the leaves from these taxa could represent an alternative to the use of their stem bark, which would contribute to the conservation of both these Mexican medicinal plants.⁴⁴

The traditional uses of both *Hintonia* species to alleviate pain, malaria, and stomach ulceration suggested also their analgesic and gastroprotective properties.^{14–16} Therefore, a series of appropriate pharmacological tests was performed in order to validate these hypotheses.

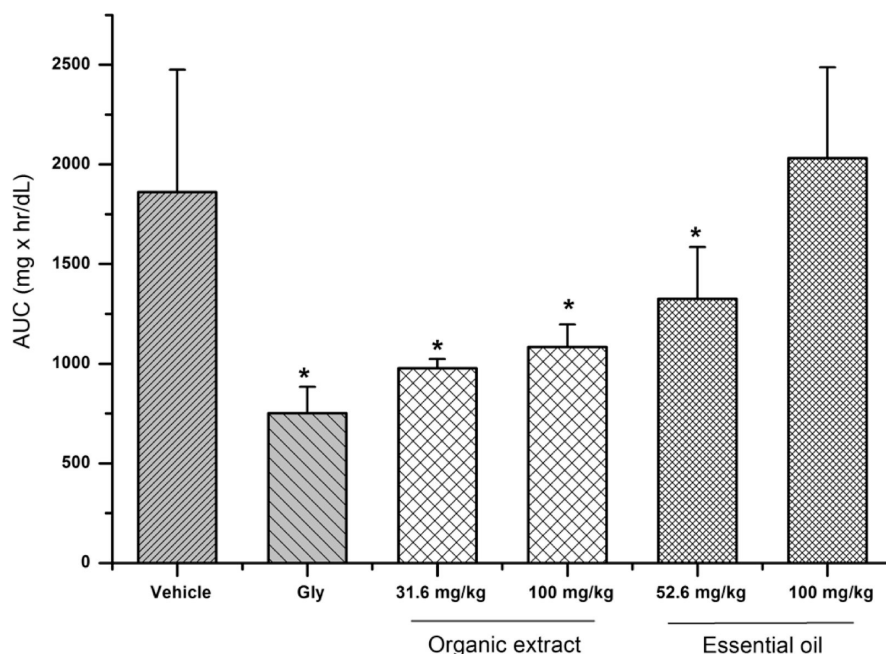


Figure 5. Effect of the organic extract and essential oil from the roots of *Ligusticum porteri* on blood glucose levels in NA-STZ-diabetic mice in an acute hypoglycemic test (* $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's t -test for comparison with respect to vehicle).

During our earlier work on *H. latiflora*, the in vitro anti-*Plasmodium falciparum* activity of the extracts or isolates was not demonstrated.⁸⁶ However, a recent paper by Argotte-Ramos et al. has reported that an ethyl acetate extract of the stem bark of *H. latiflora* provoked suppression of induced parasitemia with *Plasmodium berghei* in mice. Bioassay-directed fractionation of the active extract using in vitro and in vivo assays indicated that **15** is the active principle.⁹⁰

Antinociceptive effects were determined in mice using the well-known hot-plate and writhing models.⁹¹ The results obtained indicated that the organic extract of *H. standleyana* reduced significantly the number of abdominal constrictions in a similar manner to metamizole when assayed in the writhing test. Moreover, this extract was also able to demonstrate an antinociceptive effect in the hot-plate test, but in this case the effect was less potent than that of morphine. Altogether, these results suggested that the extract of *H. standleyana* used is able to reduce inflammatory pain and has a nociceptive effect in mice. The metabolite responsible for this antinociceptive activity was found to be compound **6**, which reduced the acetic acid-induced abdominal constrictions in mice significantly. In addition, this compound produced a significant increase in thermal latency in the hot-plate test. Thus, compound **6** was able to produce antinociception in both inflammatory and central pain models in mice.⁹¹

The aqueous extracts from the stem bark (HLSB and HSSB) and leaves (HLL and HSL) of *H. latiflora* and *H. standleyana* were assessed for their gastroprotective effect by means of a conventional ethanol-induced gastric injury model in rats using carbenoxolone as positive control. Compounds **19** and **25** were also assayed.⁹² HLSB, HSSB, HLL, and HSL provoked a significant gastroprotective effect [$80.5 \pm 3.35\%$ ($ED_{50} = 184.7$ mg/kg); $80.26 \pm 3.96\%$; $75.1 \pm 7.26\%$ ($ED_{50} = 109.1$ mg/kg); and $76.85 \pm 3.17\%$ ($ED_{50} = 149.7$ mg/kg) of gastroprotection, respectively]. Compounds **19** and **25**, present in all the extracts, were also active [$68.85 \pm 8.4\%$ ($ED_{50} = 15$ mg/kg) and $74.04 \pm 4.4\%$ ($ED_{50} = 26$ mg/kg) of gastroprotection, respectively], and

their mode of action involved nonprotein sulfhydryl endogenous compounds, since only pretreatment with *N*-ethylmaleimide inhibited their gastroprotective action.⁹²

In addition to vanilla, the tomato, and chocolate, "copalchi" has been a gift from Mexico to the world.

Ligusticum porteri. The rhizomes of *Ligusticum porteri* are used widely to treat inflammatory, respiratory, and gastrointestinal complaints and infectious diseases. More recently, its use as an antidiabetic herbal drug has been described by several authors.^{18,19,93} The plant is used widely, not only in Mexico but also in the United States. The most popular common names are "osha" and "Porter's licorice-root" in the U.S., whereas in Mexico the drug is better known as "hierba del cochino" (pig's herb) and "chuchupate".^{55,94,95} A review of relevant medicinal species of the genus *Ligusticum*, including botanical and pharmacological aspects, was published recently.⁹⁶ Therefore, only selected features concerning these topics will be highlighted.⁹⁶

Chemical investigation on *L. porteri* by the group of Delgado in Mexico City led to the isolation and identification of several phthalides including compounds **26–35**.^{97–99} From the pharmacological point of view the plant has been also investigated. The most relevant results included a demonstration that the essential oil prepared from the roots increased the antimicrobial activity of norfloxacin against a norfloxacin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*.¹⁰⁰ More recently, the sedative, spasmolytic,¹⁰¹ and cytotoxic¹⁰² properties were demonstrated for several compounds isolated from this plant.

Following our general experimental strategy, the results of toxicity studies revealed that different preparations made up from the roots of the plant, including a CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) extract, an aqueous extract, and the essential oil, were devoid of toxic and genotoxic effects.⁸⁷ In the Lorke test, the extract exhibited a medium lethal dose (LD_{50}) of 1 g/kg, while for the essential oil and the aqueous extract the LD_{50} values were higher than 5000 mg/kg.⁸⁷

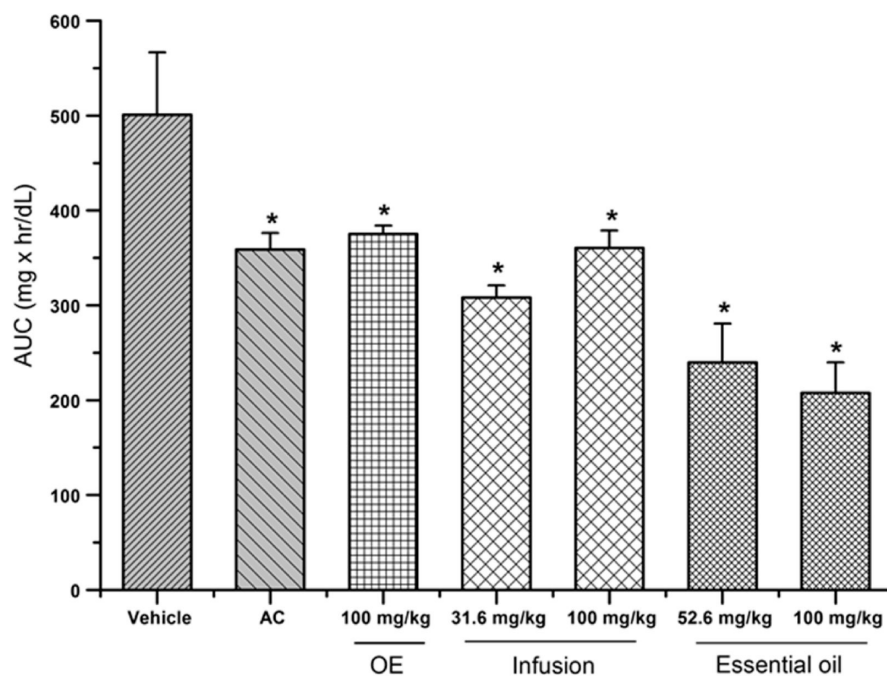


Figure 6. Effect of the organic extract (OE), infusion, and essential oil from the roots of *Ligusticum porteri* on blood glucose levels in NA-STZ-diabetic mice after an oral sucrose load (2 g/kg; * $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's t -test for comparison with respect to vehicle).

When tested as potential hypoglycemic agents, the three preparations were very active (31.6, 52.6, and 100 mg/kg), causing a significant decrease of blood glucose levels in NA-STZ-diabetic mice (Figure 5).⁴⁵ During the OGTT they provoked a significant decrease of the postprandial peak in diabetic mice, while in the OSTT they lowered glucose levels in both diabetic and normal mice, revealing that the inhibition of α -glucosidase could be mediating the observed antihyperglycemic effect. Among the preparations evaluated, the essential oil (56.2 and 100 mg/kg) was the most active (Figure 6).⁴⁵

Altogether, the results of evaluation of the different preparations revealed that *L. porteri* shows much potential as a blood glucose lowering agent in a diabetic condition. Furthermore, the OSTT revealed that the extract possesses active principles capable of inhibiting the intestinal α -glucosidase enzymes, although according to the OGTT assay other mechanisms might be involved in their action.

In order to determine the α -glucosidase inhibitors of *L. porteri*, the active organic extract was subjected to assay-guided fractionation to yield (*Z*)-ligustilide (**26**), (*Z*)-3-butyldenephthalide (**27**), and diligustilide (**28**) as the major active components. In addition, myristicin (**36**) and ferulic acid (**37**) were isolated.⁴⁵

The inhibitory effects of the three phthalides **26–28** on the activity of α -glucosidases were tested in vitro. The results revealed that only **27** inhibited the activity of yeast α -glucosidases in a concentration-dependent manner. The IC_{50} calculated was 2.35 mM (AC = 0.42 mM). A kinetic analysis showed that **27** inhibited the activity of the enzyme with a K_i of 4.86 μ M vs a K_i of 0.46 μ M for AC. From Dixon plots, compound **27** was characterized as a mixed-type inhibitor.⁴⁵ Accordingly, a docking analysis predicted that **27** binds to the enzyme in a different pocket than AC but that the binding site is close to the catalytic site; the predicted K_i was 11.48 μ M. An in vivo OSTT corroborated the above results, since compound **27** (56.2 mg/kg) was also able to lower the postprandial peak.⁴⁵

Consequently, with the antihyperglycemic activity displayed by the organic extract, a method for quantifying the major active compounds was developed and validated.¹⁰³ Since the essential oil was the most active in the OSTT, this preparation was also analyzed by different chromatographic techniques. GC-MS analysis allowed the identification of 30 constituents, representing ~99% by weight of the total content; the most important feature of the oil was the presence of a high percentage of phthalides (24.41% of **27** and 20.20% of **26**) and sesquiterpenes (10.69%).¹⁰³

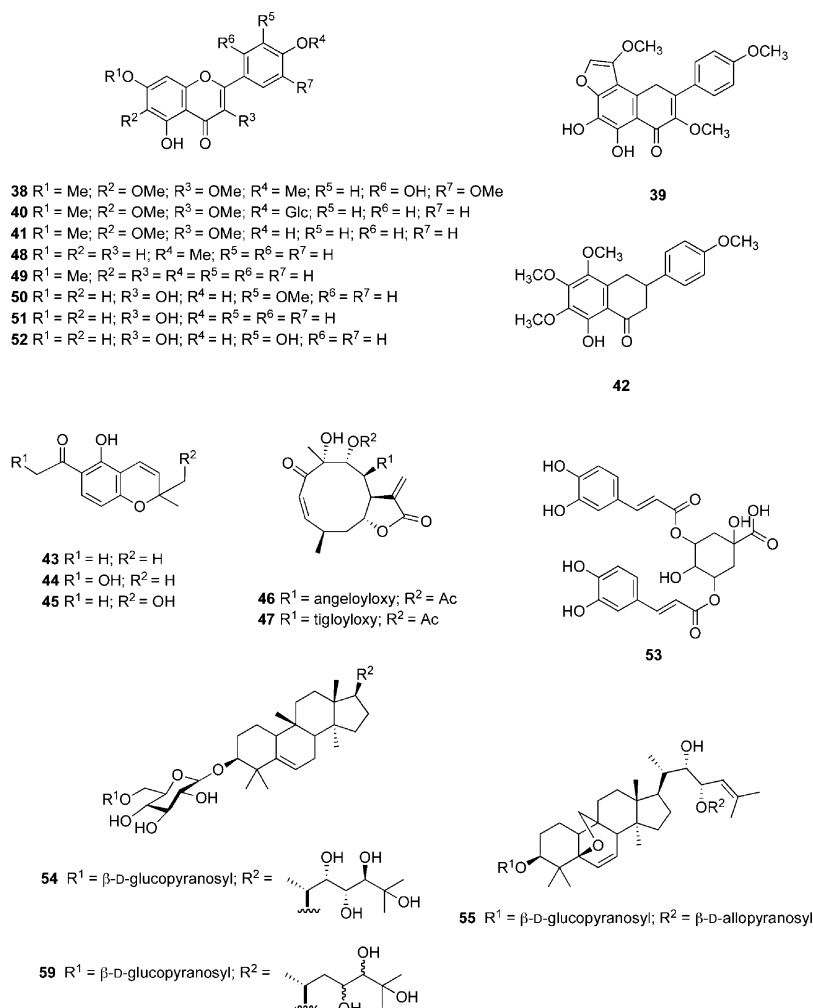
Phthalides **26–28** were tested also in the OGTT, and only **26** and **27** (10, 31.2, and 56.2 mg/kg) were able to lower blood glucose levels in NA-STZ-diabetic mice, suggesting that their mode of action involves other mechanisms yet to be demonstrated.⁴⁵

Other investigations related to ferulic acid (**37**) have demonstrated its ability to increase glucose transport in vitro, to stimulate insulin secretion, and to decrease blood glucose levels in diabetic mice.¹⁰⁴

In conclusion, *L. porteri* preparations and some of its constituents exhibit potent antihyperglycemic effects. (*Z*)-3-Butyldenephthalide (**27**) displayed a significant antihyperglycemic effect by inhibiting the activity of intestinal and yeast α -glucosidases. Compound **27** seems to be the principal α -glucosidase inhibitor of the different preparations of this plant. In this regard, it is important to point out that Goldhaber-Pasillas and co-workers¹⁰⁵ analyzed the morphogenetic response of *L. porteri* and found that the leaf and stem calli extracts both contain **27**. These results demonstrated that in vitro cultures of *L. porteri* possess the biosynthetic machinery for the generation of this valuable metabolite.

***Brickellia cavanillesii*.** *Brickellia cavanillesii* (syn: *Brickellia squarrosa* (Cav.) B.L. Robinson) is a perennial herb endemic to Mexico, where it is known commonly as “prodigiosa”, “atanasia amarga”, and “hamula”, among other names. *B. cavanillesii* alone or in combination with other herbs is currently commercialized

Chart 3



widely for the treatment of ulcers, dyspepsia, and diabetes.^{14–18,20,106,107}

The first description of the medicinal value of *B. cavanillesii* was provided by Francisco Hernández in his monumental work *Plants and Animals of the New Spain and Its Virtues*. According to Hernández, the plant was considered effective as a carminative, cathartic, and analgesic.⁶⁶ Similar uses were documented three centuries after in the *Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México*.¹⁰⁷ Like “copalchi”, *B. cavanillesii* was the subject of comprehensive chemical, pharmacological, and clinical investigations at the IMN from 1894 to 1913. The most significant findings included the efficacy of the plant for relieving stomachache, dyspepsia, and teniasis.¹⁰⁸

The use of this species for treating diabetes is recent, and the first written report appeared toward the end of the last century.¹⁰⁹ However, the related species, *B. grandiflora* and *B. californica*, which are also called “prodigiosa” and “hamula”, have historical uses in the Mexican and Native American herbal traditions for alleviating high blood glucose levels.¹¹⁰ Thus, it is highly probable that the use of *B. cavanillesii* for treating diabetes arose from its employment as a substitute herb of *B. grandiflora* and *B. californica*.

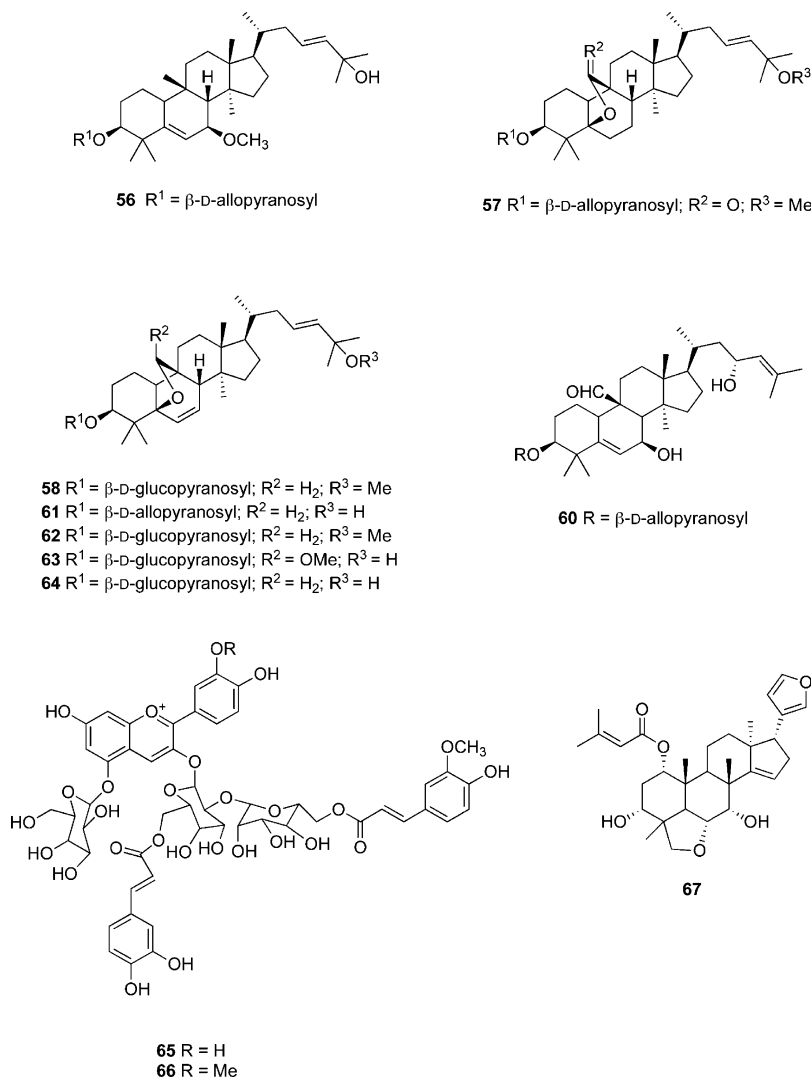
During the second half of the 20th century, a few phytochemical studies conducted on the aerial parts of this species resulted in the isolation and characterization of several

flavonoids (38–42)^{111–113} and the chromene demethylisocellcalin (43).¹¹⁴ In addition, recent pharmacological investigation has revealed that a methanol extract of the plant induced smooth muscle relaxation when tested in a rat aorta isolated preparation.¹¹⁵

As part of our research program, it was demonstrated that the infusion prepared from the dried plant material of *B. cavanillesii* showed notable hypoglycemic and antihyperglycemic actions.⁴⁶ In the acute preliminary experiments, the aqueous extract (100 and 316 mg/kg) decreased blood glucose levels in normal and diabetic mice, with this effect being similar to that produced by Gly. In OGTT and OSTT, the treatments provoked a significant decrease of the postprandial peak. The glucose lowering effect was more pronounced in diabetic mice at doses of 100 and 316 mg/kg; it also inhibited the activity of yeast α -glucosidases with an IC₅₀ of 0.169 mg/mL.⁴⁶

Bioassay-guided fractionation of the aqueous extract led to the isolation of several compounds including three chromenes (43–45), two sesquiterpene lactones [caleins B (46) and C (47)], several flavonoids [acacetin (48), genkwanin (49), isorhamnetin (50), kaempferol (51), and quercetin (52)], and dicaffeoylquinic acid (53). Kaempferol (51) and quercetin (52) are well-known α -glucosidase inhibitors. The remaining compounds were evaluated, and the results revealed that the new chromene 45, calein C (47), and isorhamnetin (50) were the most active, with IC₅₀ values of 0.42, 0.28, and 0.16 mM,

Chart 4



respectively, similar to those of AC and quercetin (**52**; IC₅₀ = 0.34 and 0.53 mM, respectively). The best activity found for **47** in comparison to **46** suggested that the nature of the acyl residue at C-8 has an effect on the resultant enzymatic activity.⁴⁶ Kinetic analysis has revealed that **47** (K_i = 1.91 mM) and **50** (K_i = 0.41 mM) behave as mixed-type inhibitors, while **45** acts as a noncompetitive inhibitor (K_i = 0.13 mM).⁴⁶ A docking study predicted that **50** binds in the catalytic region of the α -glucosidases and forms hydrogen bonds with aspartic acids 214 and 349, located at the catalytic site of the enzyme. The predicted K_i value was 7.9 μ M, while that for AC was 0.024 μ M. Calein C (**47**) also bound close to the catalytic site of the enzyme with a K_i value of 0.30 μ M. Finally, compounds **43–45** bind more probably on a region different from the catalytic area, with K_i values of 13, 96, and 120 μ M, respectively.⁴⁶ Although flavonoids are well-known inhibitors of α -glucosidases, the observation of inhibitory activity of these enzymes by sesquiterpene lactones and chromenes is novel.

Altogether, the above findings have indicated that the aqueous extract of *B. cavanillesii* analyzed possesses active principles potentially useful to attenuate fast and postprandial hyperglycemic conditions. These effects are due in part to its high content of metabolites with significant inhibitory activity against α -glucosidase. However, the results of the OGTT

clearly indicated that *B. cavanillesii* also contains compounds affecting glucose uptake or utilization and/or insulin secretion or action. Indeed, quercetin (**52**),¹¹⁶ the major infusion metabolite, potentiates insulin secretion and protects β -cell function and viability against oxidative damage. On the other hand, kaempferol (**51**) improved insulin secretory function and synthesis in the β -cells and human islets.¹¹⁷ The main active components of the related species *B. grandiflora* and *B. californica* are flavonoids,¹¹⁸ but in the case of *B. cavanillesii*, chromenes **43–45** and the sesquiterpene lactones **46** and **47** play an important role in the overall activity.

CONCLUDING REMARKS

This review has attempted to integrate relevant information concerning four plant species used widely in Mexico for treating diabetes and clearly points out future directions for the research on medicinal plants employed traditionally for the treatment of TII-DM in Mexico. The outcome of preclinical toxicological pharmacological testing as well as the documented consumption of the plants for more than four centuries permits these to be considered harmless when ingested. These four species are effective in vivo for controlling fasting and postprandial blood glucose levels in animal models of TII-DM, thus representing good phytotherapeutic agents possess-

ing multitarget active constituents that may act synergistically at different levels. It also shows, once again, that traditional remedies hold the potential for the discovery of new α -glucosidase inhibitors useful for the development of new agents for the treatment of diabetes. Although some flavonoids are well-known α -glucosidase inhibitors, the discovery of phthalides, 4-phenylcoumarins, chromenes, and sesquiterpene lactones as inhibitors of these relevant enzymes is new. Beyond the discovery of novel α -glucosidase inhibitors, the results outlined revealed the potential of these plants for developing new widely accepted phytotherapeutic preparations for treating TII-DM on a rational basis.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: 525-55-6225289. Fax: 525-55-6225329. E-mail: rachel@unam.mx.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

[†]This work contains information taken in part from the Ph.D. theses of S. Cristians and S. Escandón-Rivera. Adapted from an invited symposium lecture presented at the International Congress on Natural Products Research 2012 (New York City, July 28–August 1, 2012) to celebrate the 75th volume of the *Journal of Natural Products* and its forerunner journal, *Lloydia*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from DGAPA-UNAM (IN212913) and CONACyT (150966; 99395). R.M. acknowledges the valuable contribution of several graduate students (F. Calzada, M. C. Camacho, J. A. Guerrero-Analco, and F. Brindis), postdoctoral fellows (Drs. M. Déciga and M. González), and colleagues (Drs. A. Navarrete, R. Bye, E. Linares, and P. Hersch-Martínez). We are indebted to the Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (DGSCA), UNAM, for providing the resources to carry out computational calculations through the KanBalam System.

DEDICATION

Dedicated to Dr. Lester A. Mitscher, of the University of Kansas, for his pioneering work on the discovery of bioactive natural products and their derivatives.

REFERENCES

- (1) Scully, T. *Nature* **2012**, *485*, S2–S3.
- (2) Chen, L.; Magliano, D. J.; Zimmet, P. Z. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2012**, *8*, 228–236.
- (3) El-Kaissi, S.; Sherbeen, S. *Curr. Diabetes Rev.* **2011**, *7*, 392–405.
- (4) Israili, Z. H. *Am. J. Ther.* **2011**, *18*, 117–152.
- (5) Holst, J. J.; McGill, M. A. *Clin. Drug Invest.* **2012**, *32*, 1–14.
- (6) Borges de Melo, E.; Silveira-Gomes, A.; Carvalho, I. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10277–10302.
- (7) Matsui, T.; Ogunwande, I. A.; Abesundara, K. J. M.; Matsumoto, K. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 109–120.
- (8) Tundis, R.; Loizzo, M. R.; Menichini, F. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2010**, *10*, 315–331.
- (9) Wardrop, D. J.; Waidyarachchi, S. L. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1431–1468.
- (10) Kumar, S.; Narwal, S.; Kumar, V.; Prakash, O. *Pharmacog. Rev.* **2011**, *5*, 19–29.
- (11) Gutiérrez, J. P.; Rivera-Dommarco, J.; Shamah-Levy, T.; Villalpando-Hernández, S.; Franco, A.; Cuevas-Nasu, L.; Romero-Martínez, M.; Hernández-Ávila, M. *Encuesta Nacional de Salud y*

Nutrición 2012: Resultados Nacionales; Instituto Nacional de Salud Pública: Cuernavaca, Mexico, 2012; p 196.

- (12) Aguilar-Contreras, A.; Xolalpa-Molina, S. *Ciencia* **2002**, *53*, 24–35.
- (13) Barba de Piña-Chan, B. *Ciencia* **2002**, *53*, 18–23.
- (14) Díaz, J. L. *Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México: Monografías Científicas I*; IMEPLAM: Mexico City, 1976; p 329.
- (15) Martínez, M. *Las Plantas Medicinales de México*; 6th ed.; Ediciones Botas: Mexico City, 1989; pp 22, 91, 121, 136, 331, 393, 454, 498, 608.
- (16) Argueta, A. V.; Cano, L. M.; Rodarte, M. E. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*; INI: Mexico City, 1994; p 1786.
- (17) Hernandez-Galicia, E.; Aguilar-Contreras, A.; Aguilar-Santamaria, L.; Roman-Ramos, R.; Chavez-Miranda, A. A.; Garcia-Vega, L. M.; Flores-Saenz, J. L.; Alarcon-Aguilar, F. J. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **2002**, *45*, 118–124.
- (18) Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. J. *Ethnopharmacol.* **2005**, *99*, 325–348.
- (19) Alarcón-Aguilar, F. A.; Roman-Ramos, R. In *Traditional Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants*; Soumyanath, A., Ed.; CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, 2006; Chapter 9, pp 179–194.
- (20) Romero-Cerecero, O.; Reyes-Morales, H.; Aguilar-Santamaria, L.; Huerta-Reyes, M.; Tortoriello-Garcia, J. *BLACPM* **2009**, *8*, 380–388.
- (21) Ramírez, G.; Zavala, M.; Perez, J.; Zamilpa, A. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2012**, ID701261.
- (22) Andrade-Cetto, A.; Becerra-Jiménez, J.; Cardenas-Vazquez, R. J. *Ethnopharmacol.* **2008**, *116*, 27–32.
- (23) Ranilla, L. G.; Kwon, Y. I.; Apostolidis, E.; Shetty, K. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4676–4689.
- (24) Alagesan, K.; Thennarasu, P.; Kumar, V.; Sankarnarayanan, S.; Balsamy, T. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2012**, *3*, 316–322.
- (25) Önal, S.; Timur, S.; Okutucu, B.; Zihnioglu, F. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2005**, *35*, 29–36.
- (26) Aguilar-Santamaria, L.; Ramirez, G.; Nicasio, P.; Alegria-Reyes, C.; Herrera-Arellano, A. J. *Ethnopharmacol.* **2009**, *124*, 284–288.
- (27) Ortiz-Andrade, R.; Torres-Piedra, M.; Sanchez-Salgado, J. C.; Garcia-Jimenez, S.; Villalobos-Molina, R.; Ibarra-Barajas, M.; Gallardo-Ortiz, I.; Estrada-Soto, S. *Rev. Lat. Am. Quim.* **2009**, *37*, 122–132.
- (28) Ortiz-Andrade, R.; Garcia-Jimenez, S.; Castillo-España, P.; Ramirez-Avila, G.; Villalobos-Molina, R.; Estrada-Soto, S. J. *Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 48–53.
- (29) Mahomoodally, M. F.; Subratty, A. H.; Gurib-Fakim, A.; Choudhary, M. I.; Nahar Khan, S. *Sci. World J.* **2012**, ID285284.
- (30) Nhiem, N. X.; Kiem, P. V.; Minh, C. V.; Ban, N. K.; Cuong, N. X.; Tung, N. H.; Ha, L. M.; Ha, D. T.; Tai, B. H.; Quang, T. H.; Ngoc, T. M.; Kwon, Y. I.; Jang, H. D.; Kim, Y. H. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 720–724.
- (31) Uebanso, T.; Arai, H.; Taketani, Y.; Fukaya, M.; Yamamoto, H.; Mizuno, A.; Uryu, K.; Hada, T.; Takeda, E. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2007**, *53*, 482–488.
- (32) Matsui, T.; Ueda, T.; Oki, T.; Sugita, K.; Terahara, N.; Matsumoto, K. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1948–1951.
- (33) Matsui, T.; Ueda, T.; Oki, T.; Sugita, K.; Terahara, N.; Matsumoto, K. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1952–1956.
- (34) Matsui, T.; Ebuchi, S.; Kobayashi, M.; Fukui, K.; Sugita, K.; Terahara, N.; Matsumoto, K. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7244–7248.
- (35) Tunsaringkarn, T.; Rungsiyothin, A.; Ruangrunsi, N. J. *Health Res.* **2008**, *22*, 29–33.
- (36) Bhat, M.; Zinjarde, S. S.; Bhargava, S. Y.; Kumar, A. R.; Joshi, B. N. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2011**, ID810207.
- (37) Pérez-Gutiérrez, R. M.; Damián-Guzmán, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 1516–1524.
- (38) Sugimoto, K.; Hosotani, T.; Kawasaki, T.; Nakagawa, K.; Hayashi, S.; Nakano, Y.; Inui, H.; Yamanouchi, T. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2010**, *46*, 205–211.

- (39) Wang, B.; Liu, H. C.; Hong, J. R.; Li, H. G.; Huang, C. Y. *J. Sichuan Univ.* **2007**, *38*, 298–301.
- (40) Deguchi, Y.; Osada, K.; Uchida, K.; Kimura, H.; Yoshikawa, M.; Kudo, T.; Yasui, H.; Watanuki, M. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *72*, 923–931.
- (41) Kim, Y. M.; Jeong, Y. K.; Wang, M. H.; Lee, W. Y.; Rhee, H. I. *Nutrition* **2005**, *21*, 756–761.
- (42) Pinto, M. D. S.; Ranilla, L. G.; Apostolidis, E.; Lajolo, F. M.; Genovese, M. I.; Shetty, K. *J. Med. Food* **2009**, *12*, 278–291.
- (43) Rani, M. P.; Padmakumari, K. P.; Sankarikutty, B.; Cherian, O. L.; Nisha, V. M.; Raghu, K. G. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2011**, *62*, 106–110.
- (44) Cristians, S.; Guerrero-Analco, J. A.; Pérez-Vasquez, A.; Palacios-Espinosa, F.; Ciangherotti, C.; Bye, R.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 408–413.
- (45) Brindis, F.; Rodríguez, R.; Bye, R.; González-Andrade, M.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 314–320.
- (46) Escandón-Rivera, S.; González-Andrade, M.; Bye, R.; Linares, E.; Navarrete, A.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 968–974.
- (47) Guerrero-Analco, J. A.; Hersch-Martínez, P.; Pedraza-Chaverri, J.; Navarrete, A.; Mata, R. *Planta Med.* **2005**, *71*, 1099–1105.
- (48) Guerrero-Analco, A.; Medina-Campos, O.; Brindis, F.; Bye, R.; Pedraza-Chaverri, J.; Navarrete, A.; Mata, R. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2087–2095.
- (49) Lorke, D. *Arch. Toxicol.* **1983**, *54*, 275–287.
- (50) Verspohl, E. J. *Planta Med.* **2002**, *68*, 581–590.
- (51) Srinivasan, K.; Ramarao, P. *Indian J. Med. Res.* **2007**, *125*, 451–472.
- (52) Fröde, T. S.; Medeiros, Y. S. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *115*, 173–183.
- (53) Masiello, P.; Broca, C.; Gross, R.; Roye, M.; Manteghetti, M.; Hillaire-Buys, D.; Novelli, M.; Ribes, G. *Diabetes* **1998**, *47*, 224–229.
- (54) Oki, T.; Matsui, T.; Osajima, Y. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 550–553.
- (55) Linares, E.; Bye, R. A. *J. Ethnopharmacol.* **1987**, *19*, 153–183.
- (56) Stranzinger, S.; Szentpéteri, J. L.; Borhidi, A. *Acta Bot. Hung.* **2006**, *48*, 435–440.
- (57) Ochoterena-Booth, H. *Systematics of Hintonia Bullock and the Portlandia Complex (Rubiaceae)*. Ph.D. Thesis, Cornell University, Ithaca, NY, 2000.
- (58) Motley, T. J.; Wurdarck, K. J.; Delprete, P. G. *Am. J. Bot.* **2005**, *92*, 316–329.
- (59) Borhidi, A. *Rubiaceae de México*; Akadémiai Kiadó: Budapest, 2006; p 340.
- (60) Arévalo, R. In *Nueva Recopilación de Monografías Mexicanas y Tesis Inaugurales de Materia Médica*; Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento: Mexico City, 1897; pp 66–77.
- (61) Lozoya, X. *Plantas y Luces en México: La Real Expedición Científica a Nueva España (1787–1803)*; Ediciones del Serbal: Barcelona, 1984; pp 98, 188.
- (62) Terres, J. *An. Inst. Med. Nac.* **1913**, *12*, 104, 109, 118, 129.
- (63) *La Vanguardia*; Barcelona, August 6, 1913; p 2.
- (64) Sahagún, B. In *Historia General de las Cosas de Nueva España. Primera Versión Íntegra del Texto Castellano del Manuscrito Conocido Como Códice Florentino*; Alianza Editorial Quinto Centenario: Madrid, 1988.
- (65) Dibble, C. E.; Anderson, A. J. O. *History of the Things of New Spain: Book 11, Earthly Things*; The University of Utah: Salt Lake City, UT, 1963; p 613.
- (66) Hernández, F. *Historia de las Plantas de Nueva España*; Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Imprenta Universitaria: Mexico City, 1943; Vol. 2, Books 3 and 4.
- (67) Mociño, J. M. In *Anales de Historia Natural 1799–1804*; Fernández-Pérez, J., Ed.; Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología: Madrid, 1993; Vol. 3, No. 15, pp 288–296.
- (68) McVaugh, R. *Botanical Results of the Sessé & Mociño Expedition (1787–1803): A Guide to Relevant Scientific Names of Plants*; Hunt Institute for Botanical Documentation: Pittsburgh, PA, 2000; pp 226, 463, 471.
- (69) Rodríguez-Nozal, R.; Gonzalez-Bueno, A. *Acta Hisp. Med. Sci. Hist. Illus.* **1995**, *15*, 375–399.
- (70) Noster, S. Untersuchung der Copalchi-Rinden unter besonderer Berücksichtigung von *Coutarea hexandra* (Jacq.) Schum., *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem & Schult., *Exostema mexicanum* Gray und *Hintonia latiflora* (Sessé & Mociño ex DC.) Bullock. Ph.D. Thesis, Universität Hamburg, Hamburg, 1992.
- (71) Loaeza, A. *An. Inst. Med. Nac.* **1906**, *8* (408), 510.
- (72) Loaeza, A. *An. Inst. Med. Nac.* **1907**, *9* (178), 246.
- (73) Loaeza, A. *An. Inst. Med. Nac.* **1908**, *10*, 154–155.
- (74) Landa, E. *An. Inst. Med. Nac.* **1913**, *12*, 146–158.
- (75) Kaiser, H.; Geyer, H. *Arch. Pharm. Ber.* **1955**, *288*, 595–608.
- (76) Paris, R.; Bastien, M. *Ann. Pharm. Fr.* **1960**, *18*, 205–219.
- (77) Reher, G.; Kraus, L. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 172–174.
- (78) Pinto, A.; Capasso, A.; Sorrentino, L. *Arzneim. Forsch.* **1997**, *47*, 829–833.
- (79) Vierling, C. Zum vasodilatierenden Effekt des antidiabetisch wirkenden *Hintonia-latiflora*-Extraktes: *In-vitro*- und *In-vivo*-Messungen. Ph.D. Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, 2005.
- (80) Korecova, M.; Hladicova, M.; Korec, R. *Z. Phytother.* **2006**, *27*, 272–278.
- (81) Reguero, M. T.; Mata, R.; Bye, R.; Linares, E.; Delgado, G. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 315–316.
- (82) Mata, R.; Calzada, F.; García, M. R.; Reguero, M. T. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 866–871.
- (83) Mata, R.; Calzada, F.; García, M. R. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 851–856.
- (84) Mata, R.; Del Rayo Camacho, M.; Cervera, E.; Bye, R.; Linares, E. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2037–2040.
- (85) Mata, R.; Del Rayo Camacho, M.; Mendoza, S.; Del Carmen Cruz, M. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3199–3201.
- (86) Mata, R. In *La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana*; Juan, M., Ed.; Secretaría de Salud: Mexico City, 1993; pp 143–156.
- (87) Déciga-Campos, M.; Rivero-Cruz, I.; Arriaga-Alba, M.; Castañeda-Corral, G.; Angeles-López, G.; Navarrete, A.; Mata, R. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 334–342.
- (88) Mata, R.; Acevedo, L.; Méndez-Bautista, D.; Guerrero-Analco, J.; Rivero-Cruz, B.; Rodríguez, J. *Pharm. Biol.* **2008**, *46*, 105–110.
- (89) Martínez-Pérez, A.; López, P. A.; Gil-Muñoz, A.; Cuevas-Sánchez, J. A. *Acta Bot. Mex.* **2012**, *98*, 73–78.
- (90) Argotte-Ramos, R.; Ramírez-Ávila, G.; Rodríguez-Gutiérrez, M. C.; Ovilla-Muñoz, M.; Lanz-Mendoza, H.; Rodríguez, M.; González-Cortázar, M.; Álvarez, L. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1442–1444.
- (91) Déciga-Campos, M.; Guerrero-Analco, J. A.; Quijano, L.; Mata, R. *Pharmacol., Biochem. Behav.* **2006**, *83*, 342–348.
- (92) Cristians, S.; Bye, R.; Navarrete, A.; Mata, R. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *145*, 530–535.
- (93) Olivas, M. P. *Plantas Medicinales del Estado de Chihuahua*; Universidad Autónoma de Ciudad Juárez: Ciudad Juárez, Mexico, 1999; pp 61–62.
- (94) Appelt, G. *J. Ethnopharmacol.* **1985**, *13*, 51–55.
- (95) Bye, R. *Econ. Bot.* **1986**, *40*, 103–124.
- (96) Turi, C.; Murch, S. J. *HerbalGram* **2010**, *89*, 40–51.
- (97) Delgado, G.; Reza Garduño, R. G.; Toscano, R. A.; Bye, R.; Linares, E. *Heterocycles* **1988**, *27*, 1305–1312.
- (98) Delgado, G.; Reza-Garduño, R. G.; Rios, M. Y.; Del Rio, F. *Planta Med.* **1992**, *58*, 570–571.
- (99) Delgado, G.; Garcia, P. E.; Roldan, R. I.; Bye, R.; Linares, E. *Nat. Prod. Lett.* **1996**, *8*, 145–150.
- (100) Cegiela-Carlio, P.; Bessiere, J. M.; David, B.; Mariotte, A. M.; Gibbons, S.; Dijoux-Franca, M. G. *Flavor Frag. J.* **2005**, *20*, 671–675.
- (101) León, A.; Toscano, R. A.; Tortoriello, J.; Delgado, G. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 1234–1242.
- (102) León, A.; Delgado, G. *J. Mex. Chem. Soc.* **2012**, *56*, 222–226.
- (103) Rivero, I.; Juárez, K.; Zuluaga, M.; Bye, R.; Mata, R. *J. AOAC Int.* **2012**, *95*, 84–91.
- (104) Prabhakar, P. K.; Doble, M. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 1119–112.

(105) Goldhaber-Pasillas, D.; Bye, R.; Chávez-Avila, V. M.; Mata, R. *Plant Growth Reg.* **2012**, *67*, 107–119.

(106) Castillo-España, P. *Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos*, 2nd ed.; Editorial UAEM: Cuernavaca, Mexico, 2007; p 405.

(107) Herrera, A.; Herrera, A. L.; Uribe, A.; Lasso de la Vega, J. M.; De Jauregui, M. F.; Calderón, J. B., Perez, S. *Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México* 3rd ed.; Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento: Mexico City; 1896; p 587.

(108) Loaeza, A. *An. Inst. Med. Nac.* **1907**, *9*, 303–304.

(109) Nicholson, M. S.; Arzeni, C. B. *Econ. Bot.* **1993**, *47*, 184–192.

(110) Moore, M. *Los Remedios: Traditional Herbal Remedies of the Southwest*; Red Crane Books: Santa Fe, NM, 1990; p 48, and references therein.

(111) Florez, S. E.; Herran, J. E. *Tetrahedron* **1958**, *2*, 308–315.

(112) Florez, S. E.; Herran, J. E. *Rev. Soc. Quím. Mex.* **1959**, *5*, 214–216.

(113) Florez, S. E.; Herrán, J. E. *Chem. Ind.* **1960**, *12*, 291.

(114) Rodríguez-López, V.; Moreno-Escobar, J.; Avila-Torres, O.; Tlahuext, H. *Acta Crystallogr.* **2006**, *E62*, 3616–3617.

(115) Aguirre-Crespo, F.; Castillo-España, F.; Villalobos-Molina, R.; López-Guerrero, J. J.; Estrada-Soto, S. *Pharm. Biol.* **2005**, *43*, 540–546.

(116) Youl, E.; Bardy, G.; Magous, R.; Cros, G.; Sejalon, F.; Virsolvy, A.; Richard, S.; Quignard, J. F.; Gross, R.; Petit, P.; Bataille, D.; Oiry, C. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161*, 799–814.

(117) Zhang, Y.; Liu, D. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *670*, 325–332.

(118) Ziegler, R. H. *Int. Appl. WO2000059522*, 2000.

■ NOTE ADDED AFTER ASAP PUBLICATION

This paper was published on the Web on February 11, 2013, with an error in the Figure 2 caption. The corrected version was reposted on March 4, 2013.