



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Compuestos inhibidores de las enzimas alfa-
glucosidasas aislados a partir de la especie medicinal
Ligusticum porteri Coulter & Rose (Apiaceae)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA:

STEPHANIE IVETTE WILSON PALMA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Secretario: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

1er. Suplente: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2° Suplente: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de
Química, Universidad Nacional Autónoma de México.**

Asesor del tema:

Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Sustentante:

C. Stephanie Ivette Wilson Palma

Índice

	Página
Lista de Abreviaturas y Símbolos	III
Lista de Cuadros	IV
Lista de Esquemas	IV
Lista de Figuras	V
Lista de Gráficas	VI
1. Antecedentes	1
1.1 Antecedentes de la especie <i>Ligusticum porteri</i> Coulter & Rose (Apiaceae).	1
1.1.1 Aspectos botánicos, químicos y farmacológicos de la especie <i>Ligusticum porteri</i> .	1
1.1.2 Estudios Químicos y Farmacológicos.	4
1.2 α -Glucosidasas en el tratamiento de la diabetes.	12
2. Planteamiento del Problema y Objetivos	16
3. Parte experimental	17
3.1 Ensayos biológicos.	17
3.1.1 Inhibición de la actividad de las enzimas α -glucosidasas.	17
3.2 Estudio químico de la raíz de <i>Ligusticum porteri</i> .	18
3.2.1 Material vegetal.	18
3.2.2 Procedimientos generales de análisis.	18
3.2.2.1 Análisis cromatográficos.	18
3.2.2.2 Caracterización de los productos naturales.	19
3.2.3 Preparación del extracto orgánico.	20
3.2.4 Fraccionamiento preliminar.	20
3.2.4.1 Aislamiento y purificación de la Z-ligustílida (1).	20

3.2.4.2 Aislamiento del Z-3-butilidenftálido (2), ansaspirólida (40) y dihidro-ansaspirólida (41).	22
3.2.4.3 Aislamiento de la Z-6,6',7,3'- α -diligustílida (3) a partir de la fracción primaria F₈ .	24
4. Resultados y discusión	25
4.1 Elucidación estructural de los dímeros aislados.	28
4.1.1 Caracterización de la ansaspirólida (40).	28
4.1.2 Caracterización de la dihidro-ansaspirólida (41).	35
4.2 Efecto de los productos naturales sobre las enzimas α -glucosidasas.	42
5. Conclusiones	44
6. Perspectivas	45
7. Bibliografía	46

Lista de Abreviaturas y Símbolos

	Significado
°C	Grado Celsius
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
AcOEt	Acetato de etilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COSY	Correlación homonuclear ¹ H- ¹ H
EMIE	Espectroscopía de masas por la técnica de impacto electrónico
eV	Electron volts
g	Gramos
Hex	Hexano
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces ¹ H- ¹³ C
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple ¹ H- ¹³ C
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramos
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Mega Hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nm	Nanómetro
PNPG	<i>p</i> -nitrofenol- α -D-glucopiranosido
ppm	Partes por millón
T	Temperatura

Lista de Abreviaturas y Símbolos

	Significado
TMS	Tetrametilsilano
uma	Unidad de masa atómica
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micra

Lista de Cuadros

		Página
1	Actividad enzimática de las fracciones primarias de <i>L. porteri</i> sobre las enzimas α -glucosidasas.	27
2	Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz; CDCl_3) de los compuestos 40 y 41 .	35

Lista de Esquemas

		Página
1	Extracción y fraccionamiento del extracto de diclorometano-metanol (1:1) de la raíz de <i>L. porteri</i> .	21
2	Aislamiento y purificación del Z-3-butilidenftálico (3), ansaspirólida (40) y dihidro-ansaspirólida (41) a partir de la fracción activa primaria F₃ .	24

Lista de Figuras

Fig.		Página
1	Ejemplos de las principales especies del género <i>Ligusticum</i> distribuidas en el continente Americano.	2
2	<i>Ligusticum porteri</i> Coulter & Rose (Apiaceae).	3
3	Principales ftálidos aislados a partir de la raíz de <i>L. porteri</i> .	6
4	Principales terpenos y compuestos aromáticos aislados a partir de la raíz de <i>L. porteri</i> .	7
5	Monografía farmacopéica de la raíz de la especie <i>L. porteri</i> .	9
6	Mecanismo de acción de las enzimas α -glucosidasas.	13
7	Estructura cristalina de la enzima α -glucosidasa I.	15
8	Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción activa secundaria F₃ .	23
9	Espectro de ¹ H-RMN de la ansaspirólida (40).	29
10	Espectro de ¹³ C-RMN de la ansaspirólida (40).	30
11	Espectro de ¹ H-RMN COSY de la ansaspirólida (40).	31
12	Espectro de ¹³ C-RMN HSQC de la ansaspirólida (40).	32
13	Espectro de ¹³ C-RMN HMBC de la ansaspirólida (40).	33
14	Propuesta de cicloadición de la Z-ligustílida (1) y del Z-3-butilidentfálido (2) para la formación de la ansaspirólida (40).	34
15	Espectro de ¹ H-RMN de la dihidro-ansaspirólida (41).	37
16	Espectro de ¹³ C-RMN de la dihidro-ansaspirólida (41).	38

Lista de Figuras
(continuación)

Fig.		Página
17	Espectro de ^1H -RMN COSY de la dihidro-ansaspirólida (41).	39
18	Espectro de ^{13}C -RMN HSQC de la dihidro-ansaspirólida (41).	40
19	Espectro de ^{13}C -RMN HMBC de la dihidro-ansaspirólida (41).	41
20	Hidrólisis enzimática del <i>p</i> -nitrofenol- α - <i>D</i> -glucopiranosido (PNPG).	42

Lista de Gráficas

Gráfica		Página
1	Efecto del extracto orgánico de diclorometano-metanol (1:1) sobre la actividad enzimática de la enzima α -glucosidasa.	26
2	Efecto de los compuestos a) ansaspirólida (40) y b) dihidro-ansaspirólida (41) sobre la actividad de las α -glucosidasas.	43

1. Antecedentes

1.1 Antecedentes de la especie *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae).

1.1.1 Aspectos botánicos, químicos y farmacológicos de la especie *Ligusticum porteri*.

El género *Ligusticum* (Apiaceae), que deriva del latín *Ligustikon* o *Ligystikos*, que significa “proveniente de la región de Liguria”, incluye 25 especies localizadas principalmente en el continente americano desde el sur de las Montañas Rocallosas en los Estados Unidos de América del Norte (Nuevo México, Colorado, Wyoming, Idaho, Utah, Nevada, Montana y Arizona) hasta el norte de la Sierra Madre Occidental (Chihuahua, Durango y Sonora). En el continente americano se encuentran ampliamente distribuidas las siguientes 11 especies: *L. scothicum*, *L. tenuifolium*, *L. filicinum*, *L. porteri*, *L. grayi*, *L. hultenii*, *L. canadense*, *L. californicum*, *L. canbyi*, *L. apiifolium* y *L. verticillatum* (**Figura 1**). De estas especies sólo, *L. filicinum*, *L. tenuifolium*, *L. grayi* y *L. porteri* se utilizan en las prácticas médicas populares para aliviar dolores estomacales, diarrea y otros desórdenes gastrointestinales. También, se emplean y se comercializan bajo el nombre de “osha”, para el tratamiento del resfriado, la tos, el insomnio, las reumas y las picaduras de alacrán (Mathías y Constance, 1944; Linares y Bye, 1987; González y Tena, 2004, Terrell y Fennell, 2009).

Ligusticum porteri Coulter & Rose (Apiaceae) es una especie monoica; perenne; que presenta tallos firmes, caulescentes y ramificados que miden entre 50 y 100 cm de altura. Sus raíces son fibrosas, axonomórficas, perennes y la mayoría presentan pocas raíces de tipo adventicio desde la corona. Las hojas son ovadas, pecioladas y trenado-pinnadas; excluyendo a los pecíolos miden entre 15 y 28 cm de largo y de 12 a 20 cm de ancho; con lóbulos obtusos o agudos y dentados. Sus inflorescencias en forma de sombrilla son blancas. Sus frutos son esquizocárpicos y oblongos, miden entre 5 y 8

mm de largo y de 2 a 4 mm de ancho. Sus semillas son aplanadas dorsalmente en la sección transversal y acanaladas bajo los tubos (**Figura 2**) (Mathías y Constance, 1944; Cronquist *et al.*, 1997; Galaviz *et al.*, 1994).

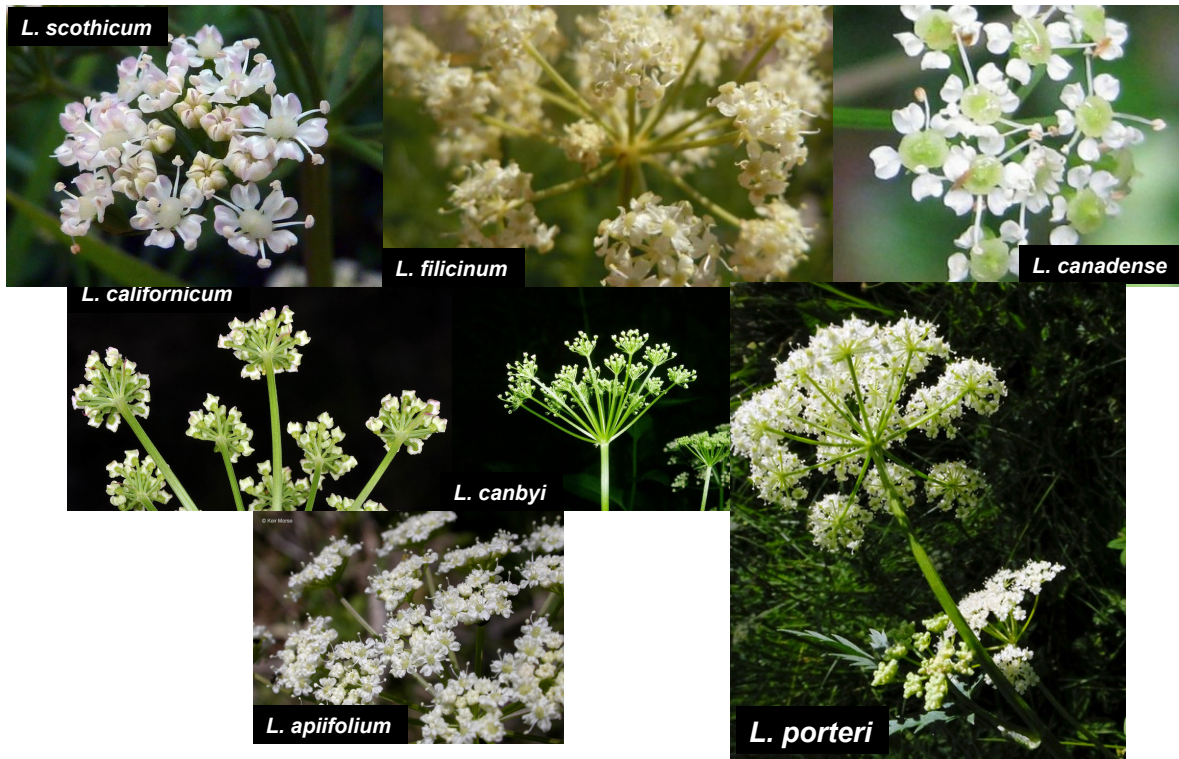


Figura 1. Ejemplos de las principales especies del género *Ligusticum* distribuidas en el continente Americano (<http://www.botanicayjardines.com>).



Figura 2. *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae).

En México, en el estado de Chihuahua y el Distrito Federal, la planta se conoce comúnmente con los nombres de “chuchupate”, “chuchupati”, “chuchupatle”, “hierba del cochino”, “raíz de angélica” y “osha”. Desde el punto de vista etnomédico, la raíz se ha utilizado en los municipios de Guazápares y Guachochic, Chihuahua, para el dolor “precipitado”, los cólicos y para limpiar los oídos con señales de piojos. En otros municipios como Chínipas y Nabogame el uso de la planta esta indicado para tratar

dolores generales, flatulencias y otros desórdenes gastrointestinales. En el siglo XVIII, Juan de Esteyneffer, describe en el libro *Florilegio Medicinal de Todas las Enfermedades* su empleo para tratar flatulencias y cólicos (Esteyneffer, 1978).

En 1994, Arturo Argueta consigna el uso del cocimiento de la raíz de la especie para quitar el dolor de pulmón y el cansancio ocasionados por un exceso de trabajo.

Otros usos referidos al chuchupate en México, lo designan como condimento para carnes y frijoles; en ceremonias mágico-religiosas realizadas por los Tarahumaras y Zunis; y el empleo de la infusión para aliviar dolores de estómago, cólicos, úlceras, diarrea, enfermedades respiratorias (incluyendo bronquitis, neumonía, tuberculosis, resfriado y tos), para tratar la diabetes y como agente analgésico. Las raíces pulverizadas aparecen también señaladas para prevenir infecciones cuando se aplican de manera tópica en heridas y cortaduras (Bye, 1985; Linares y Bye, 1987; Appelt, 1985; Ortiz *et al.*, 2007).

Finalmente, en el estado de Sonora, en el marco de la flora medicinal Pima de Yecora, la infusión se usa para curar resfriados, tos, estómago suelto, falta de sueño, picaduras de alacrán y reumas. De lo anterior se deduce que el uso medicinal de *L. porteri* se basa principalmente en el conocimiento de esta planta por varios grupos indígenas de nuestro país.

1.1.2 Estudios Químicos y Farmacológicos.

Las raíces de la especie *L. porteri* han sido objeto de numerosas investigaciones desde el punto de vista químico. Los metabolitos secundarios aislados y caracterizados en estos estudios pertenecen principalmente a las categorías de los terpenoides, los fenilpropanoides y los ftálicos. Este último grupo de constituyentes en particular la Z-ligustílida (**1**), el Z-3-butilidenftálico (**2**), y el dímero diligustílida (**3**) representan los productos mayoritarios presentes en la especie (Delgado *et al.*, 1988; Brindis *et al.*, 2011; Juárez-Reyes, 2012; León *et al.*, 2011a y 2011b). En las **Figuras 3 y 4** se ilustran algunos ejemplos de los metabolitos aislados de *L. porteri*.

Recientemente, se realizó un estudio con la finalidad de establecer los componentes volátiles de la especie mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM). Este estudio condujo a la identificación de 31 metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial obtenido por hidrodestilación. De nueva cuenta, los ftálicos Z-ligustílida (**1**) y el Z-3-butilidenftálico (**2**), junto con el α -acoradieno (**11**), el eudesman-2,4(15)-1-trieno (**12**), el β -felandreno (**13**), el timol (**14**) y el acetato de sabinilo (**15**), representaron los principales componentes. Por otra parte, con la finalidad de complementar esta investigación se aplicó la técnica de microextracción en una fase gaseosa utilizando diferentes fases sólidas (SPME). En este trabajo los componentes más importantes identificados fueron: el *p*-cimeno (**16**), el α -terpineno (**17**), el ectocarpeno (**18**) y el *trans*-verbenol (**19**) (Juárez-Reyes, 2012; Rivero *et al.*, 2012).

Finalmente, se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación simultánea de los marcadores Z-ligustílida (**1**) y Z-3-butilidenftálico (**2**) presentes en el extracto orgánico. Este conjunto de resultados, permitió la generación de la monografía farmacopéica de la planta que se encuentra publicada en la segunda edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (**Figura 5**; FHEUM, 2013).

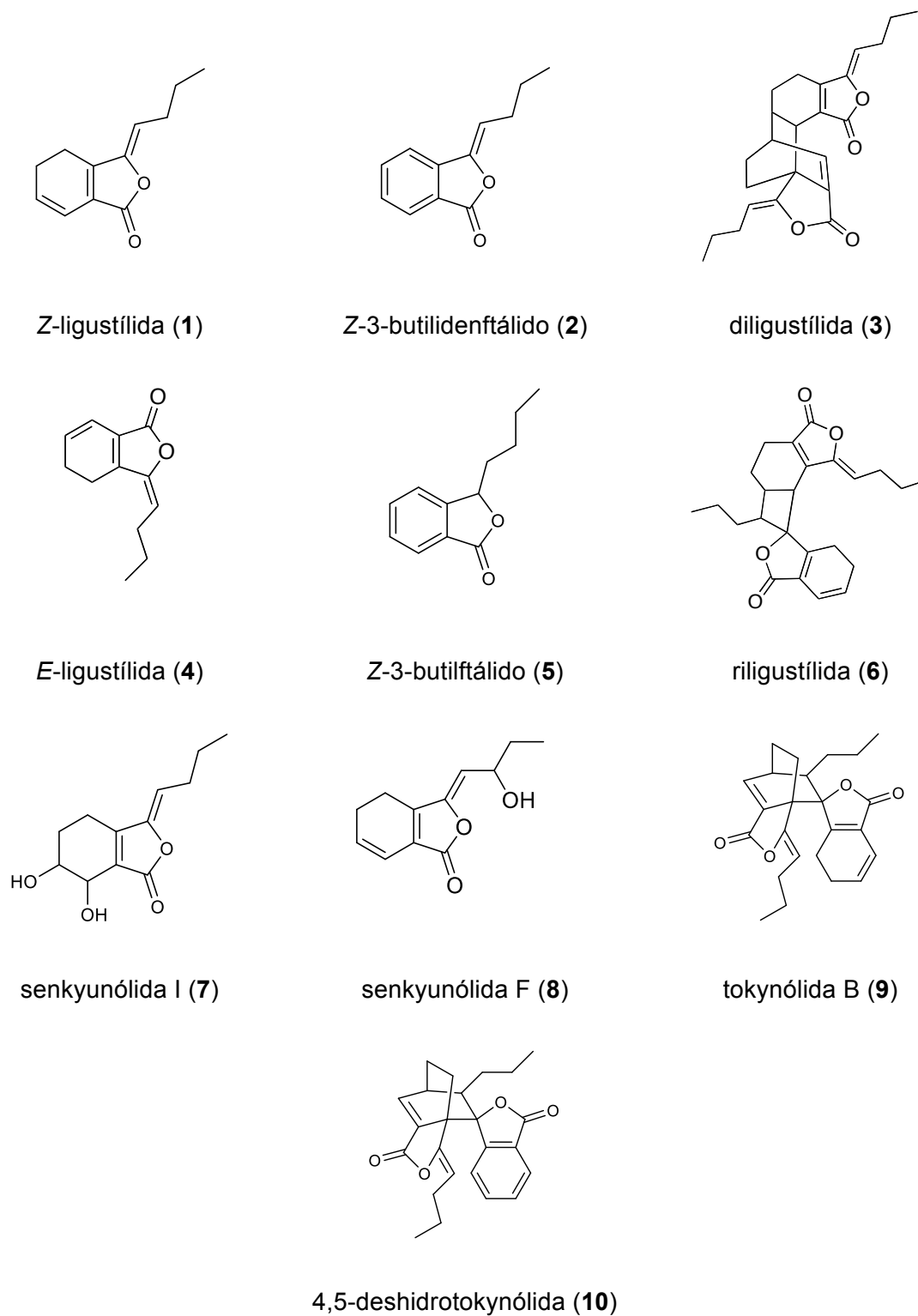


Figura 3. Principales ftálidos aislados a partir de la raíz de *L. porteri*.

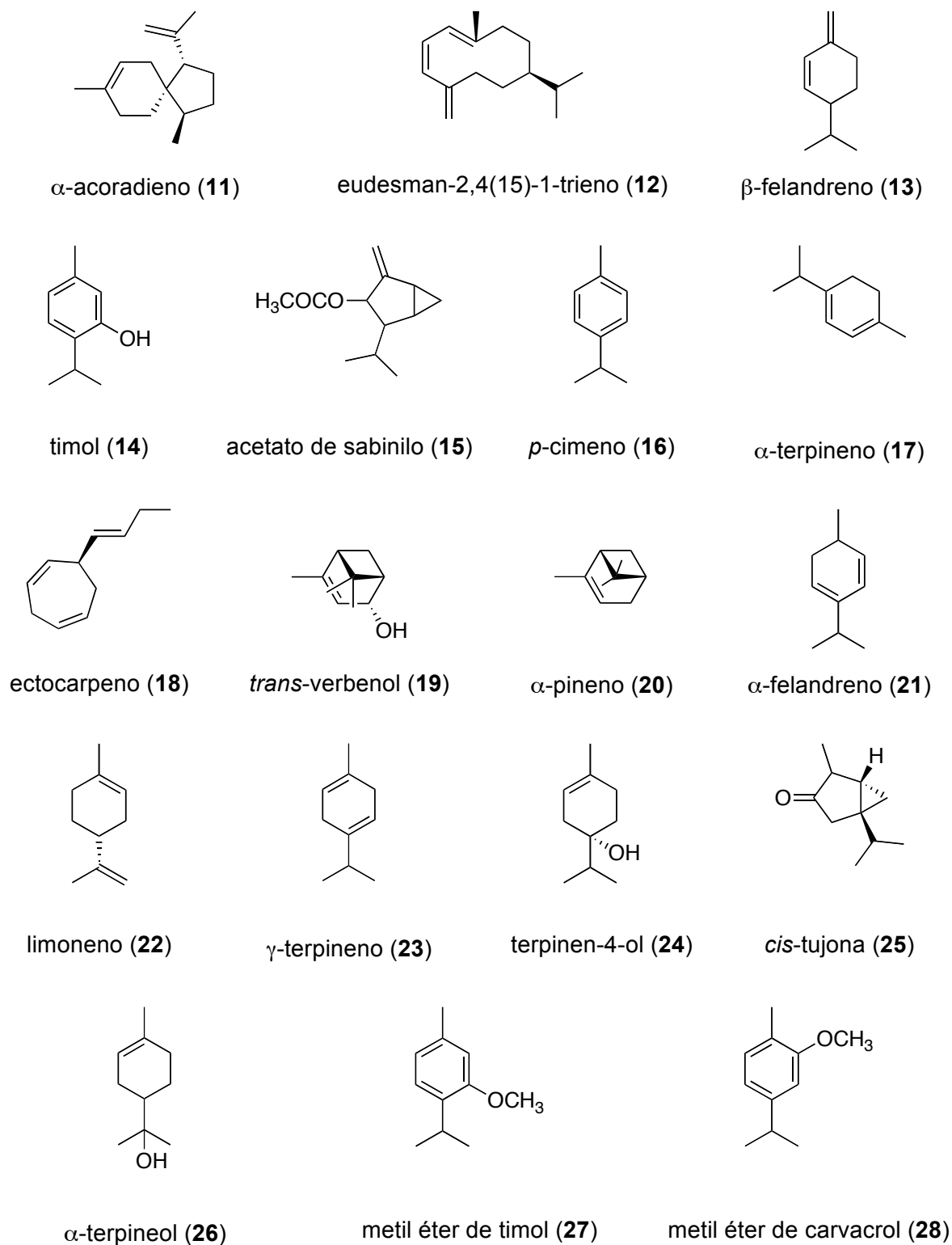
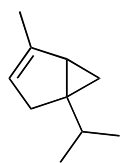
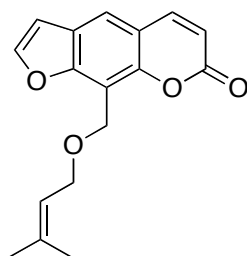


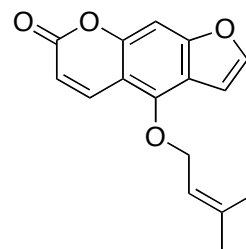
Figura 4. Principales terpenos y compuestos aromáticos aislados a partir de la raíz de *L. porteri*.



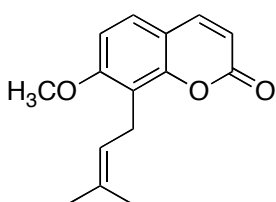
α -tujeno (29)



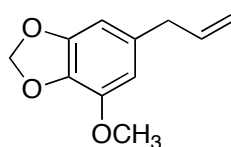
imperatorina (30)



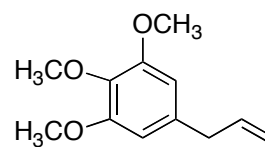
isoimperatorina (31)



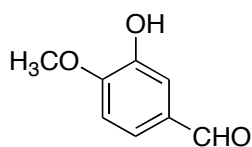
osthol (32)



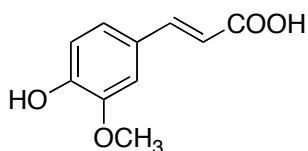
miristicina (33)



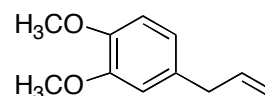
elemicina (34)



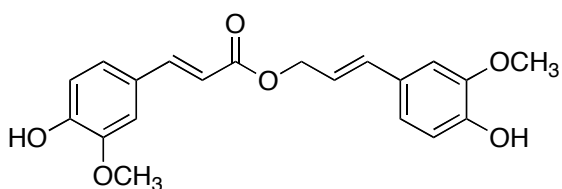
isovainillina (35)



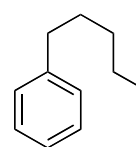
ácido ferúlico (36)



o-metileugenol (37)



ferulato de coniferilo (38)



pentilbenceno (39)

Figura 4. Principales terpenos y compuestos aromáticos aislados a partir de la raíz de *L. porteri* –continuación–.

VALORACIÓN. MGA-FH 0090. En un matraz redondo de 2 L, colocar 40.0 g de la droga vegetal seca en polvo (tamiz 500), 10 gotas de parafina líquida y 500 mL de agua como líquido de destilación. Agregar 0.5 mL de xileno en el tubo graduado. Destilar a una velocidad de 2 mL/min a 3 mL/min durante 4 h.

CONSERVACIÓN. A temperatura ambiente, en envases cerrados, sacos o costales protegidos de la luz y la humedad.

ANGÉLICA MEXICANA (CHUCHUPATE), RAÍZ

Ligusticum porteri Coulter & Rose

DEFINICIÓN. Consiste de la raíz seca de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose. Familia Apiaceae. Contiene no menos de 2.6 por ciento de derivados de ftálicas, expresados como Z-ligustilida ($C_{12}H_{14}O_2$; MM 190.2) y 6,6',7,3'-diligustilida ($C_{24}H_{28}O_4$; MM 380.5), calculado con referencia a la droga vegetal seca.

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA. MGA-FH 0040.

Hierba monoica perenne de hasta 1 m de altura. Consiste en raíces axonomórficas con pocas raíces adventicias desde la corona, fibrosas y coronadas sobre la raíz principal, de 6 cm a 12 cm de longitud y de 3 cm a 4 cm de diámetro. La cara externa es rugosa y café-oscuro y la cara interior es de café a amarillo pardo. Olor característico, aromático, agradable y picante.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA. MGA-FH 0040.

Polvo en corte fino de color café oscuro. Examinar al microscopio en campo claro. El polvo muestra las siguientes características diagnósticas: tejido colenquimático en médula y córtex, dentro del cual se encuentran abundantes cavidades secretoras de contenido lipoproteico; haces de fibras vasculares con organización anómala debido a la presencia de floema intraxilar; los vasos presentan una ornamentación helicoidal; entre el colénquima y los haces vasculares se encuentran haces de fibras en diferenciación, con paredes celulósicas gruesas y sinuosas, y felema constituido por células grandes y colapsadas de paredes gruesas lignificadas.

ENSAYO DE IDENTIDAD. MGA-FH 0050.

Soporte. Gel de sílice GF₂₅₄.

Fase móvil. Mezcla de cloruro de metileno:metanol (95:5).

Preparación de referencia 1. Solución de Z-ligustilida a una concentración de 1.0 mg/mL en cloruro de metileno.

Preparación de referencia 2. Solución de Z-6,6',7,3'-diligustilida a una concentración de 1.0 mg/mL en cloruro de metileno.

Preparación de referencia 3. Solución de Z-butilidenftálica a una concentración de 1.0 mg/mL en cloruro de metileno.

Preparación de la muestra. En un matraz redondo de 100 mL, colocar 5.0 g de la droga vegetal seca en corte fino y 50 mL de una mezcla de cloruro de metileno:metanol (1:1). Calentar a reflujo durante 30 min. Filtrar y concentrar a sequedad a presión reducida. Preparar una solución del extracto orgánico con una concentración de 1.0 mg/mL en una de mezcla de cloruro de metileno:metanol (1:1).

Revelador. SR de sulfato cérico amónico-ácido sulfúrico.

Procedimiento. Aplicar por separado, 10 µL de cada preparación. Desarrollar la cromatoplaque y permitir que el frente del eluyente recorra el 90 por ciento de la longitud de la placa. Secar al aire durante 5 min. Examinar bajo lámpara de luz UV a 254 nm y 365 nm. Rociar el revelador. Calentar a 100°C durante 1 min hasta la aparición de color.

Interpretación. El cromatograma obtenido con las preparaciones de referencia presenta tres manchas coloridas perfectamente separadas, correspondientes a 6,6',7,3'-diligustilida, a Z-ligustilida y a Z-butilidenftálica. En orden creciente de valores de R_F una mancha de color café claro (6,6',7,3'-diligustilida), una mancha color rojo (Z-ligustilida) y una mancha color violeta (Z-butilidenftálica). El cromatograma obtenido con la preparación de la muestra presenta las tres manchas que corresponden respectivamente a la 6,6',7,3'-diligustilida a la Z-ligustilida y a la Z-butilidenftálica.

CENIZAS TOTALES. MGA-FH 0060. No más de 7.0 por ciento. Determinar en 1.0 g de la raíz en corte fino.

CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO. MGA-FH 0060. No más de 1.0 por ciento.

MATERIAL EXTRAÍBLE. MGA-FH 0070. Método 2. No menos de 20.0 por ciento. Utilizar una mezcla de cloruro de metileno:metanol (1:1).

PÉRDIDA FOR SECADO. MGA-FH 0080. No más de 11.0 por ciento. Determinar en 1.0 g de la droga vegetal en corte fino. Secar a 105°C.

VALORACIÓN. MGA 0241, CLAR.

Fase móvil 1. Acetonitrilo.

Fase móvil 2. Mezcla de agua:ácido acético glacial al 0.5 por ciento.

Preparación de referencia 1. Solución de Z-ligustilida con una concentración de 1.0 mg/mL en acetonitrilo.

Preparación de referencia 2. Solución de Z-6,6',7,3'-diligustilida con una concentración de 1.0 mg/mL en acetonitrilo.

Preparación de referencia 3. Solución de Z-butilidenftálica con una concentración de 1.0 mg/mL en acetonitrilo.

Preparación de la muestra. En un matraz redondo de 1 000 mL colocar 50 g de la droga vegetal en corte fino y 500 mL de una mezcla de cloruro de metileno:metanol (1:1), macerar a temperatura ambiente durante siete días. Filtrar y concentrar a sequedad bajo presión reducida. Preparar una solución de extracto orgánico a una concentración de 1.0 mg/mL en acetonitrilo.

ANGÉLICA MEXICANA (CHUCHUPATE), RAÍZ

Figura 5. Monografía farmacopéica de la raíz de la especie *L. porteri* (FHEUM, 2013).

Desde el punto de vista farmacológico, y a pesar de su amplio uso en la medicina tradicional, esta especie no ha sido objeto de muchas investigaciones conducentes a establecer su eficacia y validar sus usos medicinales. Así, en el año 2007, Déciga-Campos y colaboradores comprobaron la inocuidad del extracto de diclorometano-metanol (1:1), evaluando su toxicidad aguda mediante el método de Lorke y su genotoxicidad en el ensayo de Ames (Déciga-Campos *et al.*, 2007).

También, se estableció el potencial antinociceptivo de diferentes preparados de la planta (extracto orgánico, aceite esencial e infusión) en los modelos convencionales de la placa caliente y de estiramiento abdominal. Los resultados obtenidos indican que la infusión y el aceite esencial presentaron un efecto analgésico significativo en ambos modelos a las dosis de 31.6 y 100 mg/kg, respectivamente. En contraste, el extracto orgánico presentó una actividad importante a las tres diferentes dosis ensayadas (75, 150 y 300 mg/kg) siendo este efecto, a la dosis de 300 mg/kg, similar al de la dipirona (100 mg/kg) en el modelo de estiramiento abdominal. En conjunto, estos resultados validan el uso popular de la especie como agente analgésico (Juárez-Reyes, 2011).

Posteriormente, Cégiela-Carlio *et al.* (2005) demostró que el aceite esencial (100 mg/kg) preparado a partir de las raíces incrementa de manera importante la actividad antimicrobiana del norfloxaco contra una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente al antibiótico. En este mismo estudio, también se evaluó el potencial antitumoral de los extractos preparados en etanol y agua contra las líneas celulares cancerosas humanas de mama (MCF-7/A2) y de colon (HCT8/E11). Por otra parte, Zuluaga-Quiceno (2009) evaluó el potencial antibacteriano de la especie contra la bacteria *Helicobacter pylori*. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto orgánico presenta una actividad anti-*H. pylori* significativa (CMI 31.25 µg/mL) (Cégiela-Carlio *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Zuluaga-Quiceno, 2009).

Recientemente, se demostró que el extracto de diclorometano-metanol (1:1) de las raíces de *L. porteri*, administrado por vía oral en ratones normales y diabéticos, presenta un efecto hipoglucemiante no dependiente de la dosis (56.2 mg/kg). Este efecto fue similar al de la glibenclamida (10 mg/kg) utilizado como control positivo. Posteriormente, se evaluó el efecto del extracto en experimentos de tolerancia a la

glucosa y a la sacarosa. La primera serie de experimentos permitió establecer que el extracto provocó una disminución del pico posprandial a las diferentes dosis ensayadas, indicando que modifica el transporte del monosacárido por un mecanismo aún no establecido. Por otro lado, en los ensayos de tolerancia a la sacarosa, el extracto orgánico sólo disminuyó de manera importante el pico posprandial a la dosis de 100 mg/kg; este efecto se relacionó con una inhibición de las enzimas α -glucosidasas intestinales (Ortiz-Andrade, 2006; Brindis *et al.*, 2011). Este mismo efecto se evidenció al evaluar la actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas del Z-3-butilidenftálico (**2**; $CI_{50} = 58.5 \pm 3.3$ mM). La evaluación de los compuestos **1** y **3** permitió establecer que ambos productos no afectan de manera importante la actividad de la enzima. Sin embargo, la evaluación de los productos naturales **1** y **3** *in vivo* demostró que éstos presentan una actividad antihiper glucemiante significativa, ya que afectan la absorción de la glucosa por un mecanismo de transporte aún no establecido. En este mismo estudio, los análisis de acoplamiento molecular permitieron establecer que **2** se une a la enzima α -glucosidasa en un sitio muy próximo al sitio catalítico, pero diferente al de la acarbosa ($K_i = 4.9$ mM). Estos resultados permitieron establecer por primera vez el potencial como inhibidores de las α -glucosidasas de este tipo de compuestos (Brindis *et al.*, 2011).

Por último, la evaluación farmacológica de los ftálicos mayoritarios **1–3**, presentes en los diferentes preparados, permitió establecer que estos compuestos son los principios responsables de las actividades neuroprotectoras, relajantes de la musculatura lisa, antibacterianas y antisépticas de la especie (Kuang *et al.*, 2006; Chan, 2007; Brindis *et al.*, 2011).

1.2 α -Glucosidasas en el tratamiento de la diabetes.

La diabetes mellitus tipo II (DM-II) es una enfermedad crónica degenerativa, ocasionada por la deficiente acción de la insulina, ya sea por resistencia, insuficiente concentración en plasma de ésta o ambas, lo que conduce a un estado de elevación de las concentraciones plasmáticas de glucosa. Este padecimiento representa un gran problema de salud pública a nivel mundial debido a su elevada tasa de prevalencia.

En el mundo se estima que alrededor de 150 millones de personas tienen diabetes y se proyecta que este número tendrá un incremento del 114% para el año 2030 (Li *et al.*, 2005). La prevalencia de DM-II en la población mexicana entre 20 y 65 años de edad, es del 13% y está directamente relacionada con la edad. Esta enfermedad se encuentra asociada a numerosas complicaciones agudas y crónicas como son: las enfermedades micro y macro-vasculares, las neuropatías, las nefropatías, la retinopatía y el pie diabético, por mencionar a las más importantes (Baron, 1998).

En la terapéutica convencional, el mejor tratamiento para controlar los niveles de glucosa sanguínea posprandial en la DM-II es la prescripción médica de hipoglucemiantes orales, siempre en combinación con una dieta balanceada baja en el consumo de carbohidratos, además de un adecuado programa de ejercicio físico. Aunque existen varios medicamentos para tratar a la DM-II, algunos tienen la desventaja de ser hepatotóxicos y ocasionar otros efectos adversos que incluyen trastornos gastrointestinales (Tewari *et al.*, 2003). En la actualidad, existen seis principales categorías de hipoglucemiantes orales: las biguanidas (metformina), las sulfonilureas (tolbutamida), las glinidinas (repaglinida), las tiazolidinedionas (pioglitazona), los inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa IV (sitagliptina) y los inhibidores de las enzimas α -glucosidasas (acarbose) (Nathan, 2007).

De los grupos de fármacos mencionados, los inhibidores de las enzimas α -glucosidasas son ampliamente utilizados como tratamiento inicial de pacientes con DM-II, debido a que inhiben de forma competitiva y reversible a una serie de enzimas α -glucosidasas intestinales retrasando y, en parte, impidiendo la absorción de los hidratos de carbono en el intestino. En consecuencia, su acción principal consiste en disminuir la

hiperglucemia posprandial; estudios recientes realizados en sujetos sanos sugieren que el uso de éstos inhibidores en la terapéutica no sólo se basa en una digestión retardada de los carbohidratos complejos, sino también sobre algunos efectos en el metabolismo de estos carbohidratos en el colón (Campbell *et al.*, 1996).

Las enzimas α -glucosidasas (**Figura 6**) son carbohidrasas que catalizan la liberación de glucosa desde el extremo no reducido de sus sustratos y se encuentran ampliamente distribuidas en microorganismos, tejidos animales y plantas, y su especificidad depende de la fuente a partir de la cual son obtenidas.

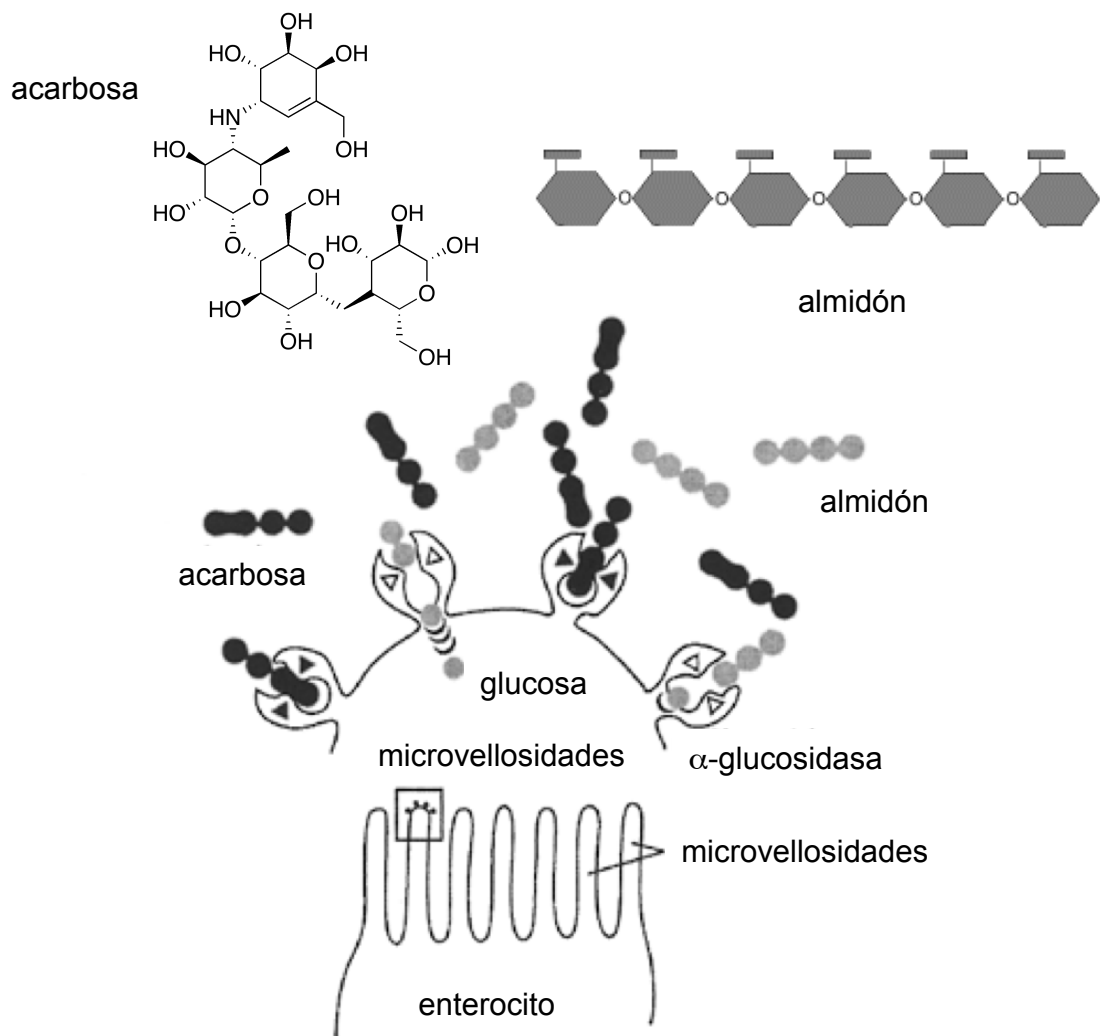
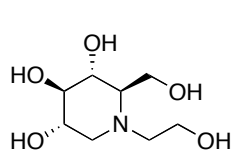
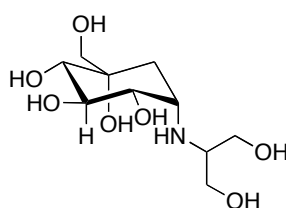


Figura 6. Mecanismo de acción de las enzimas α -glucosidasas.

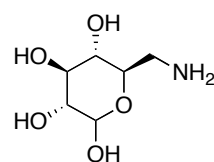
Así, las enzimas aisladas a partir de bacterias, levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) o insectos, pertenecen a la familia de enzimas tipo I (**Figura 7**), que se caracterizan por mostrar una mayor actividad hacia sustratos como la sacarosa y el *p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (PNPG) y muy poca actividad hacia otros sustratos como son los oligosacáridos de maltosa, lo que implica que estas enzimas reconocen a la estructura de la glucosa presente en sus sustratos. Existe otro grupo de enzimas obtenidas de mamíferos, denominadas α -glucosidasas de tipo II, las cuales hidrolizan, de manera selectiva sustratos como la maltosa o los α -glucanos, incluyendo al almidón soluble y glucógeno. Así, por ejemplo, la hidrólisis del piranosido de *p*-nitrofenil-2-deoxi- α -D-hexoarabinosa catalizada por las enzimas de tipo II, no se realiza con las enzimas de tipo I, sugiriendo que el hidroxilo libre en la posición 2 de la glucosa es esencial para la actividad selectiva de las enzimas α -glucosidasa de tipo I. Por otra parte, la secuencia parcial de residuos de aminoácidos que contiene el sitio catalítico de estos dos tipos de enzimas también es diferente, la familia I se caracteriza por presentar cuatro regiones catalíticas, en contraste, la familia II sólo presenta dos regiones catalíticas responsables de la actividad enzimática. Este complejo de enzimas son inhibidas por derivados de amino azúcares sintetizados por algunas cepas de la familia de los Actinomycetales, uno de los más importantes inhibidores, es la acarbosa (Glucobay®) potente inhibidor de las enzimas α -glucosidasa, glucoamilasa, α -amilasa y CGTasa. Otros inhibidores de las enzimas α -glucosidasas son el miglitol (Remeron®), la voglibosa (Volix®, Basen®), la nojirimicina (Inouye *et al.*, 1968; Reese y Parrish, 1971; Asano *et al.*, 1994) y la 1-desoxinojirimicina (Asano *et al.*, 1994).



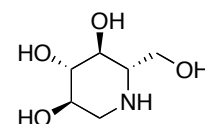
miglitol



voglibosa



nojirimicina



1-desoxi-nojirimicina

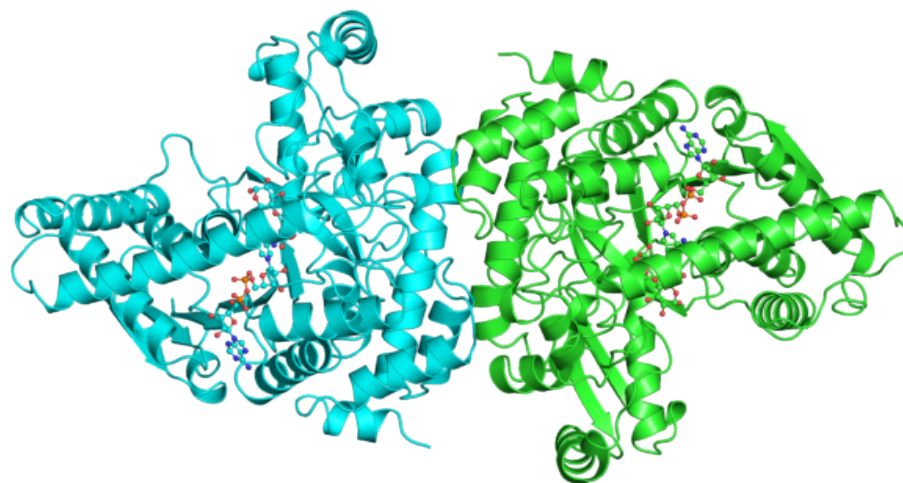


Figura 7. Estructura cristalina de la enzima α -glucosidasa I.

2. Justificación y Objetivos

El presente trabajo se generó como parte de un proyecto enfocado a la búsqueda de metabolitos secundarios de origen vegetal, con un efecto sobre las enzimas α -glucosidasas con un posible uso en la terapéutica para el tratamiento de la diabetes, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevas alternativas para tratar esta enfermedad que representa un grave problema de salud pública.

Así, el objetivo general es realizar la reinvestigación química de la especie *Ligusticum porteri* Coulter & Rose con la finalidad de aislar e identificar compuestos adicionales con actividad sobre las enzimas α -glucosidasas.

Para el cumplimiento de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- a) Realizar un estudio químico biodirigido de la especie medicinal *L. porteri*, mediante la evaluación de su efecto sobre la enzima α -glucosidasa de levadura.
- b) Establecer la naturaleza química de los principios activos adicionales presentes en la especie.
- c) Realizar la evaluación farmacológica *in vitro* de los metabolitos secundarios adicionales aislados a partir de la planta.

3. Parte experimental

3.1 Ensayos biológicos.

3.1.1 Inhibición de la actividad de las enzimas α -glucosidasas.

La evaluación de la actividad sobre las enzimas α -glucosidasas se determinó mediante la metodología descrita por Oki *et al.* (1999) con algunas modificaciones (Brindis *et al.*, 2011; Rivera-Chávez *et al.*, 2012). A continuación se describe con detalle el procedimiento:

Preparación de la mezcla de reacción: 1 U/mL de la enzima α -glucosidasa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma) se incubó durante 30 min a 30°C en un buffer de fosfatos (100 mM, pH 7).

Procedimiento: el ensayo se realizó en placas de Elisa de 96 pozos (250 μ L de capacidad). Para cada muestra de prueba se prepararon once diluciones seriadas, hasta obtener concentraciones finales en un rango entre 50–800 μ g/mL. A continuación, se transfirieron a los pozos de la placa 10 μ L de las diluciones de prueba conteniendo las concentraciones indicadas, 20 μ L de la solución de la enzima y 60 μ L de buffer de fosfatos (100 mM, pH 7). Posteriormente, la placa se incubó durante 10 min a 37°C. Al término de este período de incubación, se adicionaron a cada pozo, 10 μ L del sustrato *p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (PNPG; 5 mM); enseguida se determinó la absorbancia de las muestras, a tiempo cero, utilizando un lector de placas de ELISA, marca BIO-RAD modelo 680 a 415 nm. Posteriormente, se incubó por segunda vez la placa a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia con la finalidad de estimar el contenido de *p*-nitrofenol. Como control positivo se utilizó acarbosa. Los resultados representan el promedio de tres réplicas \pm EMM. El porcentaje de inhibición de las muestras se determinó utilizando la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ inhibición} = 1 - (A_{415t_n} - A_{415t_0}) \times 100$$

A_{415t_n} : valor de absorbancia de la muestra; A_{415t_0} : valor de absorbancia al tiempo cero

Los valores de CI_{50} (concentración requerida para inhibir en un 50% la actividad de la enzima) se calcularon a partir del ajuste de las curvas obtenidas del porcentaje de inhibición vs concentración, utilizando un análisis de regresión no lineal Hill-1 en el programa Origin 8.0.

3.2 Estudio químico de la raíz de *Ligusticum porteri*.

3.2.1 Material vegetal.

Las raíces de la especie medicinal *Ligusticum porteri* (Apiaceae) se recolectaron en la Sierra Tarahumara, estado de Chihuahua, México, en Junio del año 2011. La identidad y la clasificación de la especie se establecieron por el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). Un ejemplar de referencia (voucher: Bye 36707) se depositó en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

3.2.2 Procedimientos generales de análisis.

3.2.2.1 Análisis cromatográficos.

La cromatografía por adsorción en columna abierta (cca) se realizó en columnas de vidrio sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula 0.063–0.200 mm, malla 70–230 μm ASTM), utilizando diferentes sistemas de elución.

Los análisis cromatográficos por cromatografía en capa fina de tipo analítico (ccf) y preparativo (ccfp) se realizaron sobre placas de aluminio o de vidrio de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5–7.0 μm ASTM) de diferentes dimensiones; estos análisis se realizaron de acuerdo a las técnicas

convencionales y empleando diversos sistemas de elución (Spangenberg *et al.*, 2011). Como agente revelador se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal. Para desarrollar el color fue necesario calentar a 110°C durante un minuto.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (clae) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, EUA) equipado con un detector UV Dual 2487. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower 2 (Waters). Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente. La purificación de los compuestos se realizó empleando una columna empacada con gel de sílice (Nova-Pak® sílice gel) con un tamaño de partícula de 6 μm , con un diámetro interno de 4.6 mm y una longitud de 250 mm. La elución se realizó en un sistema isocrático con una mezcla binaria constituida por hexano-AcOEt (75:25). Las longitudes de onda (λ) utilizadas para la detección de los compuestos fueron 270 y 285 nm.

3.2.2.2 Caracterización de los productos naturales.

De manera general la caracterización de los productos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. El registro de los espectros se efectuó en la Unidad de Servicios Analíticos e Instrumentales (USAI), Facultad de Química, UNAM.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de 400 MHz (^1H)/100 MHz (^{13}C) se registraron en un espectrómetro Varian Innova 500. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS), utilizado como estándar interno. En todos los casos se utilizó CHCl_3-d como disolvente. Los espectros de masas por la técnica de impacto electrónico (EMIE) se generaron en un espectrómetro de masas JEOL JMSAX505HA utilizando el método de introducción directa a 70 eV y un barrido de 33 a 700 unidades de masa-carga (m/z) por segundo. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital JASCO J720.

3.2.3 Preparación del extracto orgánico.

La preparación del extracto orgánico en mediana escala se realizó a partir del material vegetal seco y molido (2.5 kg), mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente, empleando como disolvente de extracción una mezcla binaria compuesta por CH_2Cl_2 -MeOH (1:1). El proceso se repitió tres veces obteniéndose 375 g de un residuo viscoso marrón.

3.2.4 Fraccionamiento preliminar.

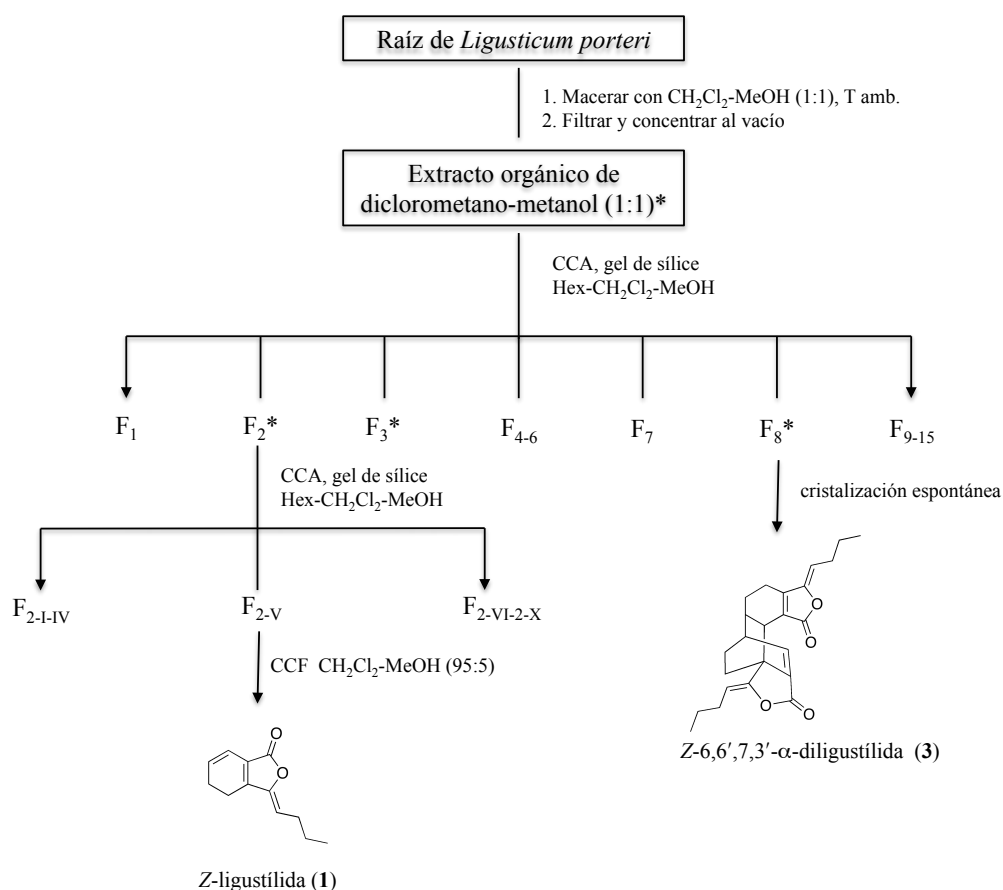
El extracto orgánico resultante (200 g) se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante una CCA utilizando como adsorbente gel de sílice (2.5 kg). El proceso de elución se efectuó utilizando hexano, mezclas de Hex- CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 y mezclas de CH_2Cl_2 -MeOH en orden creciente de polaridad. Se obtuvieron un total de 193 fracciones, de 500 mL cada una, que fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica en un conjunto de 15 fracciones primarias (F_1 - F_{15}). De estas quince fracciones, F_2 , F_3 y F_8 presentaron una actividad biológica importante en el ensayo de inhibición de la actividad de las enzimas α -glucosidasas indicado en el inciso 3.1.1 de esta sección experimental.

3.2.4.1 Aislamiento y purificación de la Z-ligustílida (1).

El aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales presentes en la fracción activa primaria F_2 [4.8 g; Hex- CH_2Cl_2 (9:1)] se realizó mediante una CCA de gel de sílice [400 g; sistema de elución: hexano, mezclas de Hex- CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 y mezclas de CH_2Cl_2 -MeOH]. Este proceso generó un conjunto de diez fracciones secundarias, F_{2-I} - F_{2-X} , reunidas de nueva cuenta, con base en su homogeneidad cromatográfica. Sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de gel de sílice de la fracción secundaria F_{2-V} utilizando un sistema de elución de CH_2Cl_2 -MeOH (95:5) permitieron la obtención de 200 mg de un aceite amarillo caracterizado como la Z-ligustílida (1;

Esquema 1) por comparación con una muestra auténtica (Delgado *et al.*, 1998; Brindis *et al.*, 2011; Rivero *et al.*, 2012).

En el **Esquema 1** se resumen los procesos de extracción y fraccionamiento primario.



Esquema 1. Extracción y fraccionamiento del extracto de diclorometano-metanol (1:1) de la raíz de *L. porteri*.

Z-ligustilida (1): ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.3 (dt, 1H, *J* 2.1, 9.6 Hz, H-7); 6.1 (dt, 1H, *J* 4.3, 9.6 Hz, H-6); 5.2 (t, 1H, *J* 8.1 Hz, H-8); 2.6 (dt, 2H, *J* 1.8, 9.9 Hz, H-4); 2.5 (dt, 2H, *J* 2.1, 9.9 Hz, H-5); 2.4 (dt, 2H, *J* 7.4, 8.1 Hz, H-9); 1.5 (dt, 2H, *J* 7.4, 7.4 Hz, H-10); 0.9 (t, 3H, *J* 7.4 Hz, H-11); ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 167.7 (C-1), 148.6 (C-3), 147.1 (C-3a), 129.9 (C-6), 124.0 (C-7a), 117.2 (C-7); 113.0 (C-8), 28.2 (C-9), 22.5 (C-5), 22.4 (C-10), 18.6 (C-4), 13.8 (C-11).

3.2.4.2 Aislamiento del Z-3-butilidenftálido (2), de la ansaspirólida (40) y dihidro-ansaspirólida (41).

Con la finalidad de obtener los principios minoritarios presentes en la fracción primaria activa **F₃** (100 mg), se realizó una separación mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). El cromatograma resultante se ilustra en la **Figura 8** y como se ilustra, la fracción contenía dos picos mayoritarios caracterizados como la dihidro-ansaspirólida (**41**; 12.1 mg; t_R 2.64 min) y el Z-3-butilidenftálido (**2**; 18 mg; t_R 3.25 min) (Delgado *et al.*, 1998; Brindis *et al.*, 2011; Rivero *et al.*, 2012).

Z-3-butilidenftálido (2): ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.9 (dd, 1H, J 1.0, 7.7 Hz, H-7); 7.7 (t, 1H, J 7.3 Hz, H-5); 7.6 (dd, 1H, J 1.0, 7.8 Hz, H-4); 7.5 (t, 1H, J 7.3 Hz, H-6); 5.6 (t, 1H, J 7.8 Hz, H-8); 2.5 (dt, 2H, J 7.3, 7.8 Hz, H-9); 1.6 (dt, 2H, J 7.3, 7.3 Hz, H-10); 1.0 (t, 3H, J 7.3 Hz, H-11); ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 167.4 (C-1), 145.8 (C-3), 139.6 (C-3a), 134.2 (C-5), 129.4 (C-6), 119.6 (C-4), 124.5 (C-7a), 125.3 (C-7); 109.5 (C-8), 27.8 (C-9), 22.6 (C-10), 13.8 (C-11).

Por otra parte, el remanente de la fracción primaria **F₃** (3.4 g) se recomatografió mediante CCA sobre gel de sílice (70 g), utilizando como fase móvil Hex, mezclas de Hex-AcOEt, AcOEt y mezclas de AcOEt-MeOH en orden creciente de polaridad. Se colectaron 127 eluatos de 30 mL cada uno y se analizaron por CCF. El proceso generó un total de 21 grupos de fracciones secundarias (**F₃₋₁-F₃₋₂₁**) reunidas con base en su homogeneidad cromatográfica. En el **Esquema 2** se resume este proceso de aislamiento y purificación.

La resolución de la fracción secundaria activa **F₃₋₉** (35.4 mg) mediante sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de gel de sílice, utilizando como sistema de elución una mezcla de Hex-AcOEt (1:1), permitió el aislamiento de 10.4 mg de un líquido aceitoso amarillo identificado como la ansaspirólida (**40**) (Lim *et al.*, 2006).

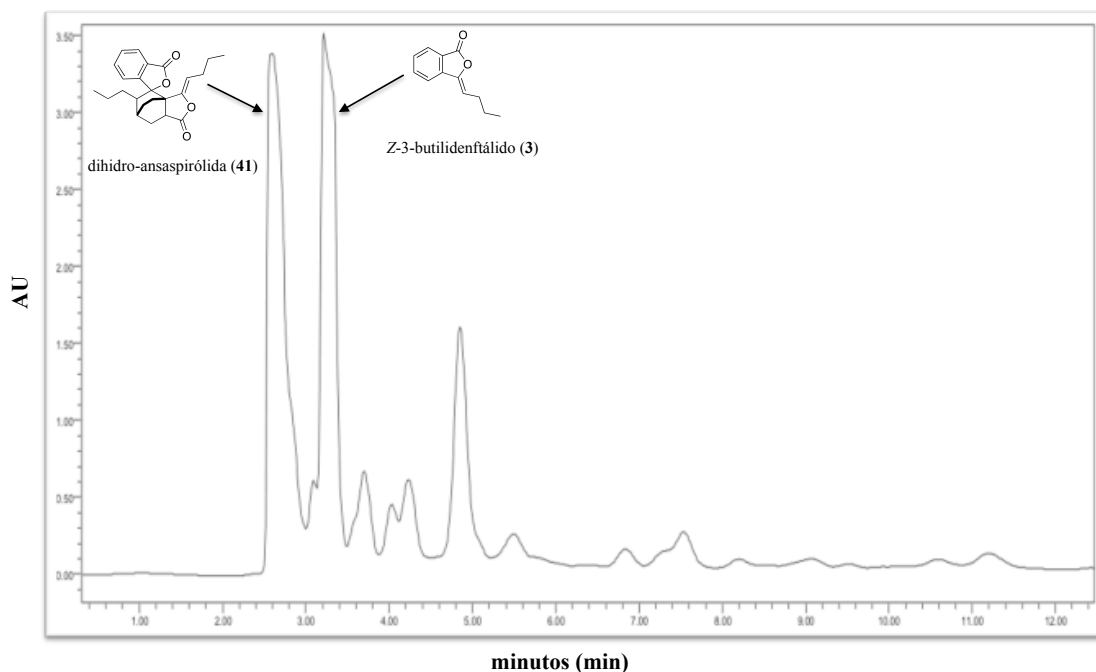
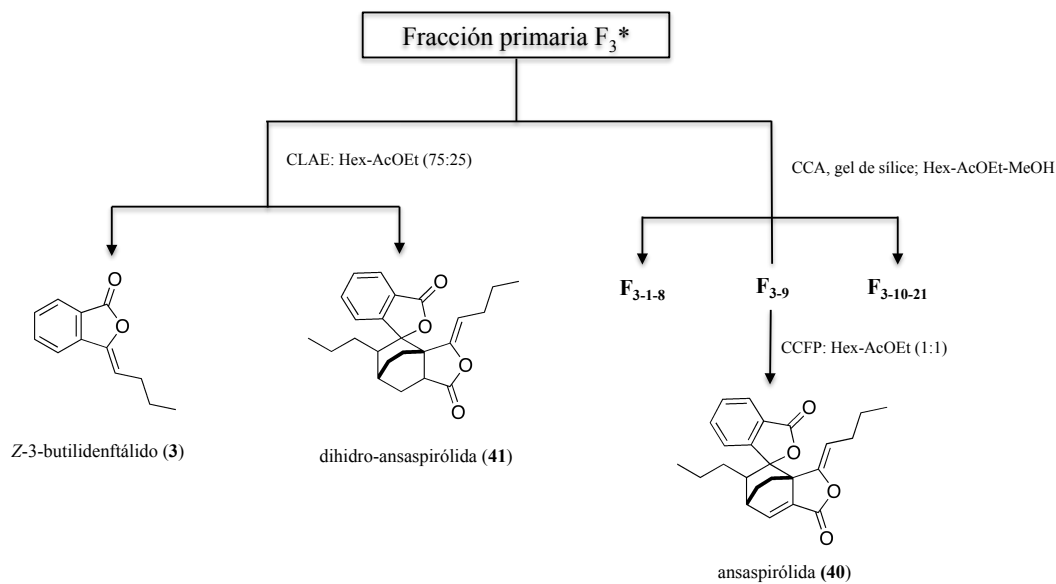


Figura 8. Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción activa secundaria **F₃**. Condiciones de análisis: Columna Nova-Pak silica gel; Sistema de elución Hex-AcOEt (75:25); Flujo de 1.0 mL/min; Detector UV/visible, λ 270 y 285 nm; Picos: t_R 2.64 min (**41**) y t_R 3.25 min (**3**).

3.2.4.3 Aislamiento de la Z-6,6',7,3'- α -diligustílida (**3**) a partir de la fracción primaria **F₈**.

De la fracción primaria **F₈** cristalizaron de manera espontánea 820 mg de un sólido blanco cristalino, con un punto de fusión de 127–129°C. Este producto fue identificado por comparación con una muestra auténtica como la Z-6,6',7,3'- α -diligustílida (**3**; **Esquema 1**) (Delgado *et al.*, 1998; Brindis *et al.*, 2011; León *et al.*, 2011; Rivero *et al.*, 2012).



Esquema 2. Aislamiento y purificación del Z-3-butilidenftálido (**3**), la ansaspirólida (**40**) y la dihidro-ansaspirólida (**41**) a partir de la fracción activa primaria F_3 .

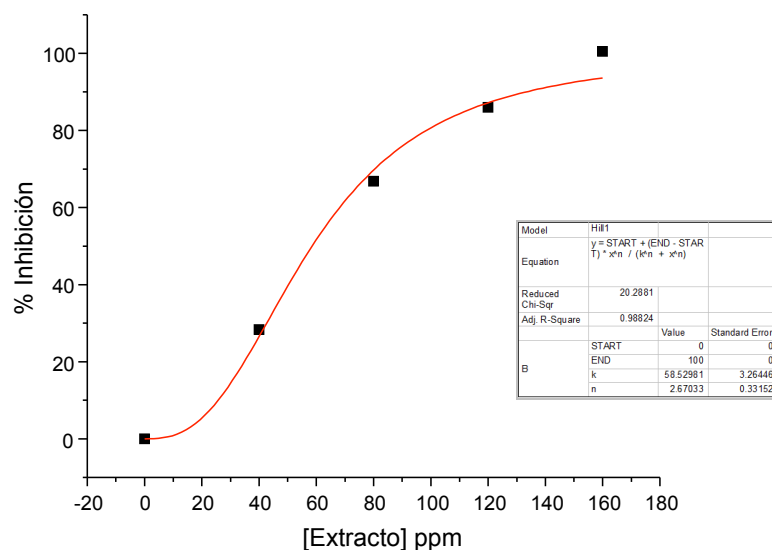
Z-6,6',7,3'- α -diligustílida (3): $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 7.5 (d, 1H, J 6.5 Hz, H-7'); 5.3 (t, 1H, J 7.5 Hz, H-8); 4.9 (t, 1 H, J 7.5 Hz, H-8'); 3.2 (d, 1H, J 8.5 Hz, H-7); 2.97–2.95 (m, 1H, H-6'); 2.53–2.21 (q, 2H, J 7.5 Hz, H-6); 2.20 (q, 2H, J 7.5 Hz, H-9); 2.11–2.05 (m, 3H, H-4, H-4a'); 2.01 (q, 2H, J 7.5 Hz, H-9'); 1.96–1.80 (m, 3H, H-5, H-4b', H-5'); 1.4 (q, 1H, J 7.5 Hz, H-10); 1.27 (td, 2H, J 2.9, 12.1 Hz, H-10'); 1.17–1.11 (m, 2H, H-5, H-5'); 0.88 (t, 3H, J 7.5 Hz, H-11); 0.86 (t, 3H, J 7.5 Hz, H-11'); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ 168.4 (C-1), 149.9 (C-3), 154.6 (C-3a), 19.8 (C-5), 27.4 (C-6), 36.7 (C-4), 127.5 (C-7a), 41.6 (C-7); 112.9 (C-8), 28.1 (C-9), 23.2 (C-10), 14.2 (C-11), 164.3 (C-1'), 150.5 (C-3'), 47.6 (C-3a'), 27.4 (C-5'), 34.1 (C-6'), 31.1 (C-4'), 134.3 (C-7a'), 142.0 (C-7'); 108.8 (C-8'), 26.6 (C-9'), 23.3 (C-10'), 14.2 (C-11').

4. Resultados y discusión

Con la finalidad de continuar con el estudio de los compuestos bioactivos presentes en la raíz de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose, se realizó la reinvestigación química de la planta para obtener los metabolitos con propiedades inhibitorias sobre las enzimas α -glucosidasas. Para el desarrollo del trabajo se siguió el siguiente protocolo:

- 1.- Preparación del extracto orgánico de diclorometano-metanol (1:1) en mediana escala.
- 2.- Evaluación *in vitro* del potencial inhibitorio del extracto orgánico sobre las enzimas α -glucosidasas.
- 3.- Realización del fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico mediante CCA.
- 4.- Aislamiento y purificación de los constituyentes presentes en las fracciones activas utilizando procesos cromatográficos convencionales.
- 5.- Caracterización de la estructura de los constituyentes activos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- 6.- Evaluación de los compuestos puros sobre las enzimas α -glucosidasas.

La evaluación del extracto utilizando el ensayo descrito en el inciso **3.1.1** permitió establecer que el extracto preparado a partir de las raíces de *L. porteri* presenta una $CI_{50} = 58.5 \pm 3.3 \mu\text{g/mL}$ (**Gráfica 1**). Como control positivo se empleó acarbosa ($CI_{50} = 0.5 \pm 0.02 \text{ mM}$). Con base en este resultado se estableció que *L. porteri* posee principios activos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.



Gráfica 1. Efecto del extracto orgánico de diclorometano-metanol (1:1) sobre la actividad enzimática de la enzima α -glucosidasa.

Posteriormente, con la finalidad de separar y purificar los constituyentes activos presentes en el extracto, se realizó un estudio químico biodirigido. Para ello, 200 g del extracto se sometieron a un fraccionamiento primario mediante una CCA utilizando gel de sílice como fase estacionaria. Este proceso generó quince fracciones primarias. Cada una de las fracciones primarias obtenidas se evaluó utilizando el mismo ensayo biológico que permitió establecer la actividad del extracto (**Cuadro 1**). Como se deduce del **Cuadro 1**, la mayor actividad se concentró en las fracciones **F₂**, **F₃** y **F₈**.

De la fracción **F₈** cristalizó de manera espontánea un dímero de ftálidos identificado como la Z-6,6',7,3'- α -diligustílida (**3**). El fraccionamiento secundario mediante CCA de la fracción **F₂** (4.8 g) generó diez fracciones secundarias. A partir de la fracción **F_{2-v}** se purificó, mediante sucesivas CCFP, a la Z-ligustílida (**1**; 0.008%). Por otra parte, la resolución por CLAE y CCA (**Figura 8**; **Esquema 2** parte experimental) de la fracción primaria **F₃** (3.5 g) condujo al aislamiento del Z-3-butilidenftálido (**2**), la ansaspirólida (**40**) y su dihidro derivado (**41**), con un rendimiento, relacionado al peso seco del material vegetal de 0.00072, 0.0004 y 0.0005%, respectivamente. Los

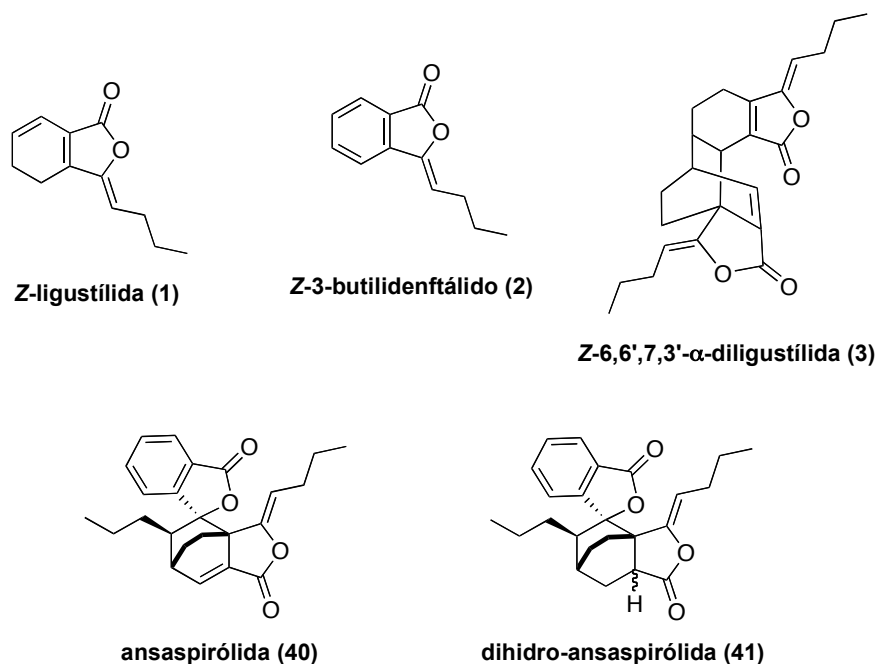
compuestos **1–3** se identificaron mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas registradas para muestras auténticas (Ríos *et al.*, 1998; Brindis *et al.*, 2011; León *et al.*, 2011; Rivero *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Actividad enzimática de las fracciones primarias de *L. porteri* sobre las enzimas α -glucosidasas.

Muestra	Actividad inhibitoria (CI ₅₀ , μ g/mL)
extracto orgánico	58.5 \pm 3.3 μ g/mL
F₂	14.3 \pm 0.2 μ g/mL
F₃	17.6 \pm 0.7 μ g/mL
F₈	30.2 \pm 2.5 μ g/mL
acarbosa^a	0.5 \pm 0.02 mM

^a control positivo

En consecuencia, en la presente sección sólo se discutirá la elucidación estructural de los dímeros de ftálicos ansaspirólida (**40**) y dihidro-ansaspirólida (**41**).



4.1 Elucidación estructural de los dímeros aislados.

De manera general, la elucidación estructural de los compuestos obtenidos en el presente estudio se realizó mediante la aplicación de métodos modernos de espectroscopia y de espectrometría.

4.1.1 Caracterización de la ansaspirólida (40).

El producto **40** se aisló como un líquido aceitoso amarillo. El análisis detallado de los espectros de RMN resultaron muy similares a los de la Z-6,6',7,3'- α -diligustílida (**3**) y en ambos casos permitieron evidenciar la presencia de dos unidades de ftálidos. La EMIE permitió determinar la fórmula molecular del compuesto como C₂₄H₂₆O₄ que permite doce grados de insaturación. El ión molecular fue observado en una relación de masa-carga (m/z) de 378 uma y el pico base en una m/z de 180 uma, lo cual sugirió su naturaleza dimérica.

Los espectros de RMN (**Cuadro 2; Figuras 9–13**) de **40** presentaron el perfil característico de un dímero de ftálidos sustituido en las posiciones 3,3a',8 y 6' (Lim *et al.*, 2006). Las evidencias más importantes observadas en los espectros de RMN (**Figuras 9 y 10**) se describen a continuación:

a) En δ_H 7.80 (d, $J = 7.2$ Hz, H-7), 7.58 (t, $J = 7.6$ Hz, H-5), 7.48 (t, $J = 7.6$ Hz, H-6) y 7.10 (d, $J = 8.0$ Hz, H-4) se observan cuatro conjunto de señales asignables a los protones aromáticos del núcleo del Z-3-butilidenftálido (**2**). En el espectro de ¹³C-RMN las señales para este anillo aromático aparecen en δ_C 152.4 (C-3a), 121.0 (C-4), 134.8 (C-5), 129.6 (C-6), 125.2 (C-7) y 126.2 (C-7a).

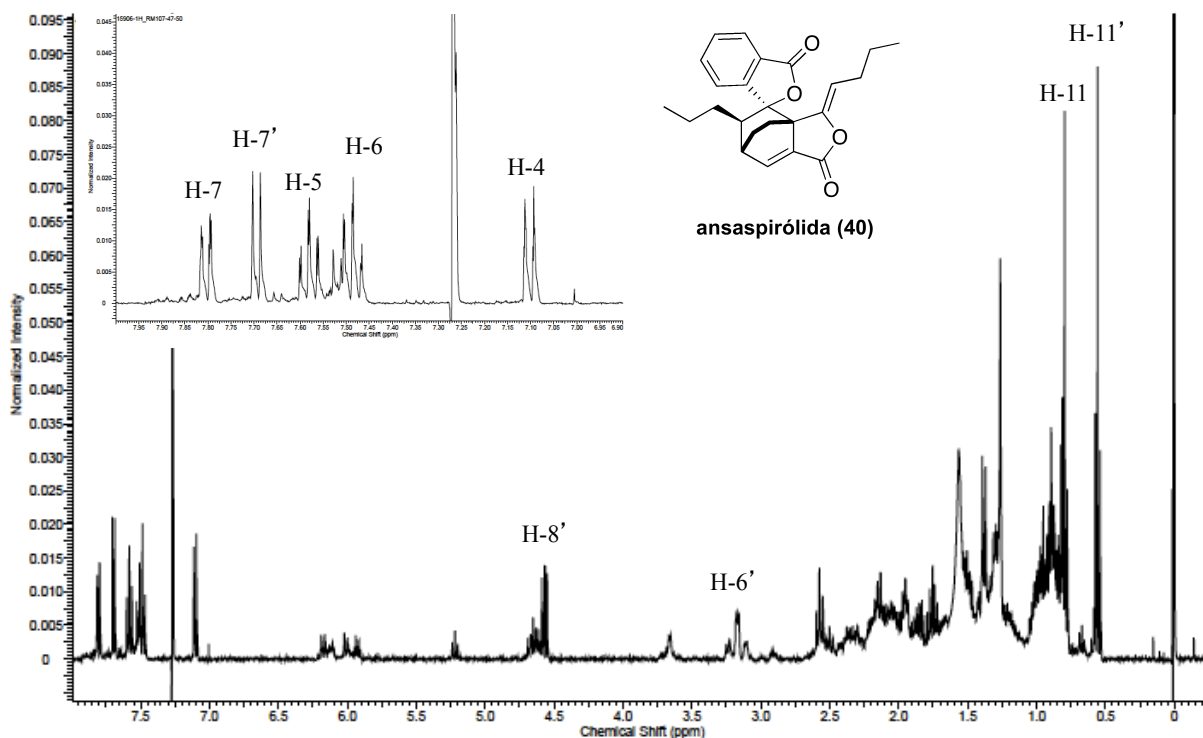


Figura 9. Espectro de ^1H -RMN de la ansapirólida (**40**).

b) En δ_H 7.69 (d, $J = 6.4$ Hz) y 4.56 (dd, $J = 6.8$ Hz) se observan señales adicionales para dos protones vinílicos. Este conjunto de señales se asignó a los protones H-7' y H-8', respectivamente con base en las correlaciones COSY observadas entre los protones vecinos H-6' y H-9' (**Figura 11**).

c) Finalmente, en δ_H 0.79 (t, $J = 7.2$ Hz) y 0.55 (t, $J = 7.2$ Hz) se aprecian dos tripletes asignables a dos grupos metilo. También, se observan dos grupos carbonilo en el espectro de ^{13}C -RMN en δ_C 170.0 (C-1) y 164.3 (C-1').

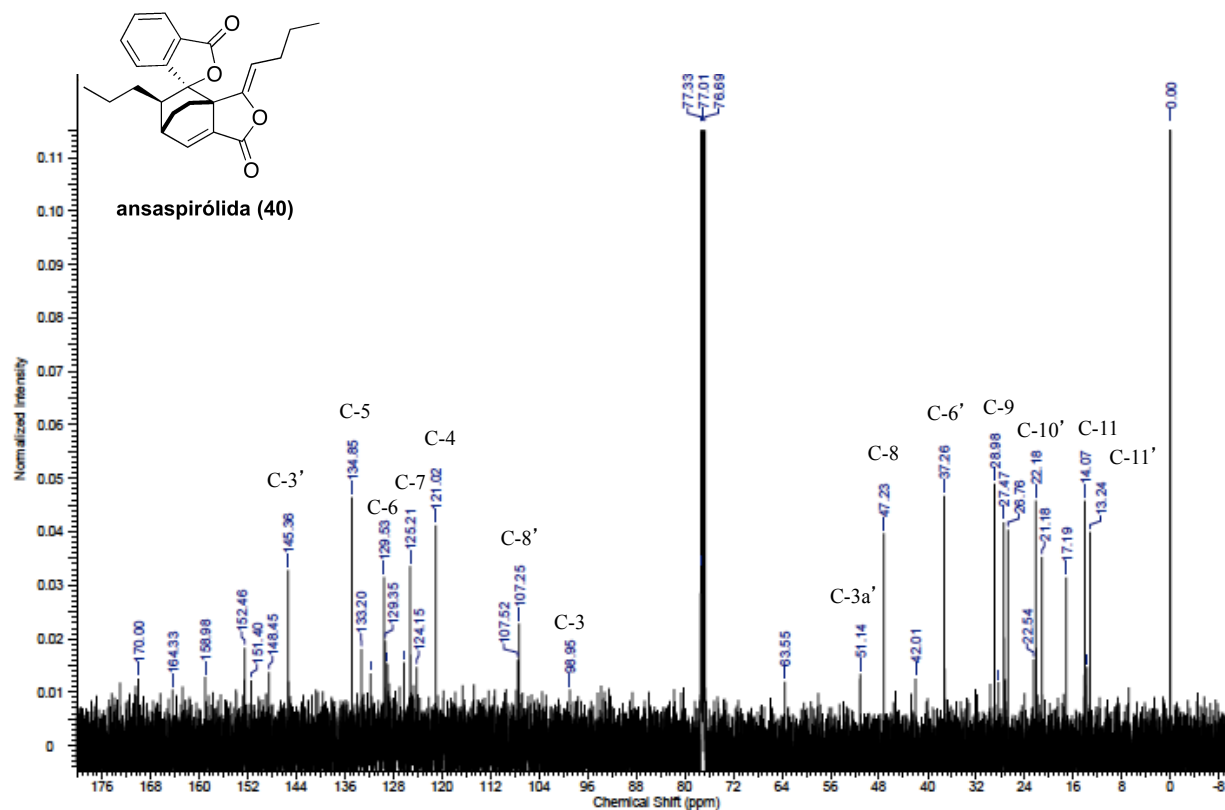


Figura 10. Espectro de ^{13}C -RMN de la ansaspírolida (**40**).

Este conjunto de señales, aunado con el análisis detallado de las correlaciones observadas en los espectros bidimensionales de HSQC y HMBC (**Figuras 12 y 13**), permitieron inferir que **40** es un dímero formado a partir de la condensación de la Z-ligustílida (**1**) y del Z-3-butilidenftálico (**2**) mediante una cicloadición de tipo Diels-Alder (**Figura 14**).

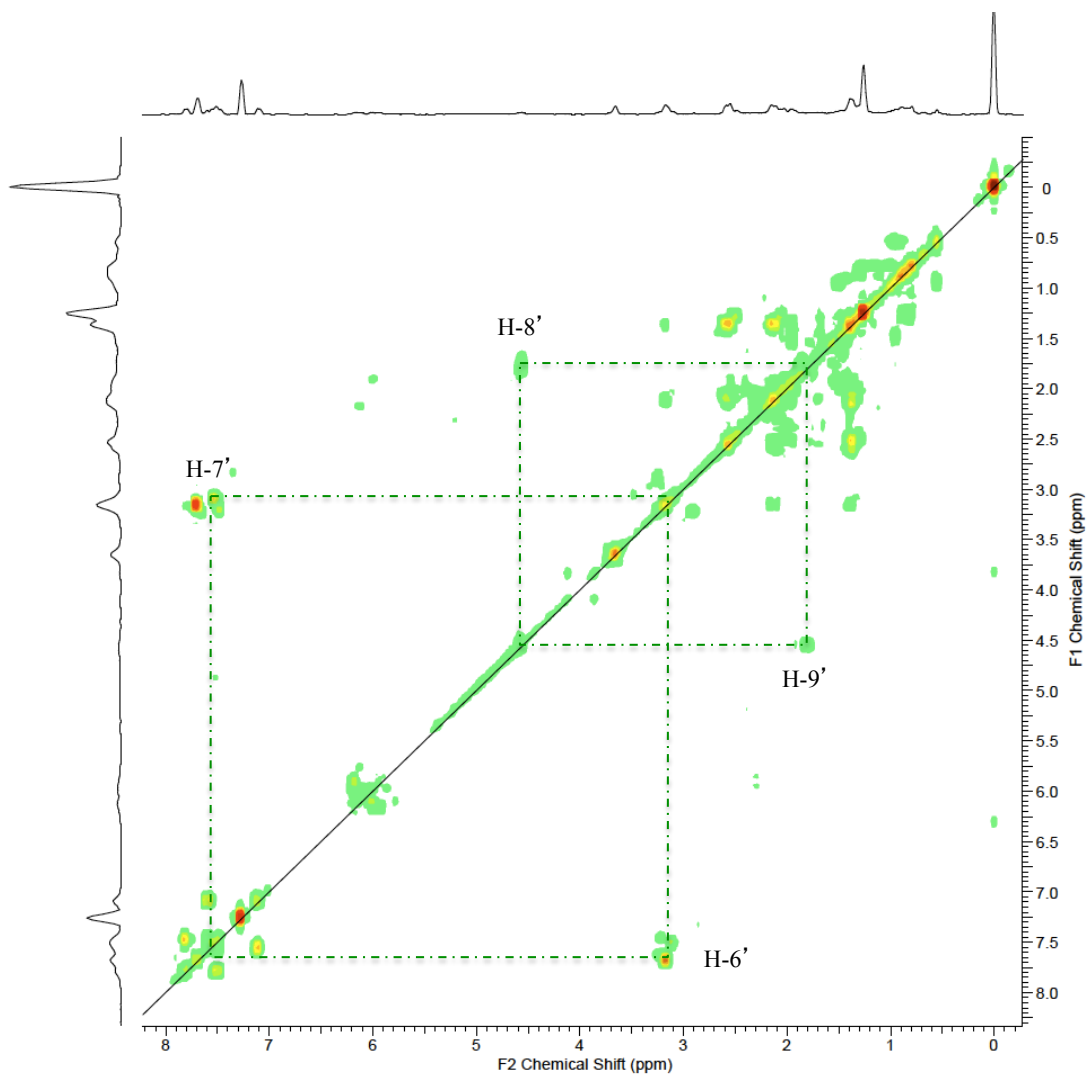
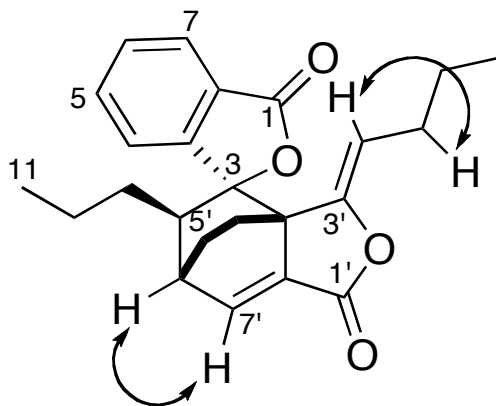


Figura 11. Espectro de ^1H -RMN COSY de la ansaspírolida (40).



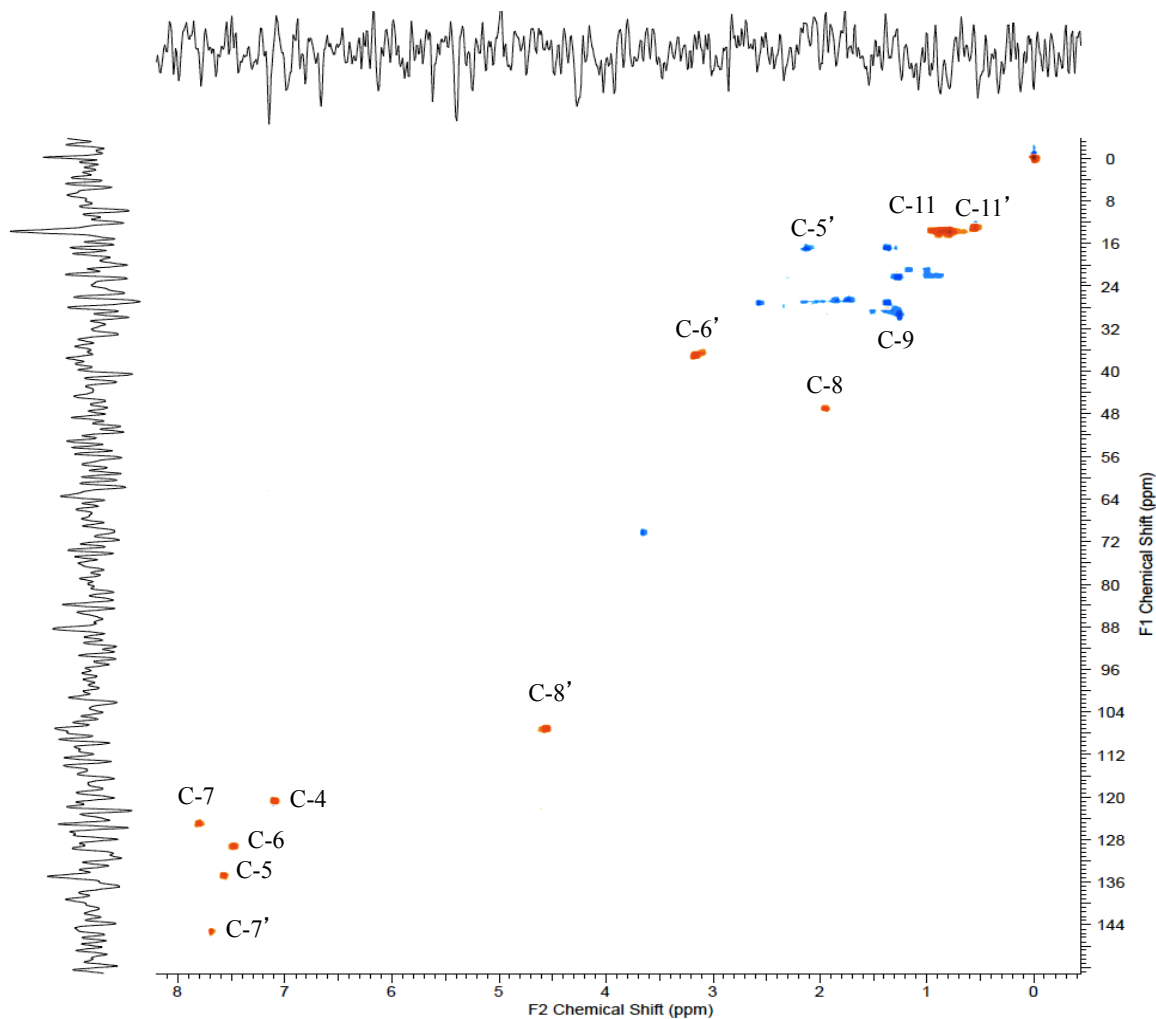
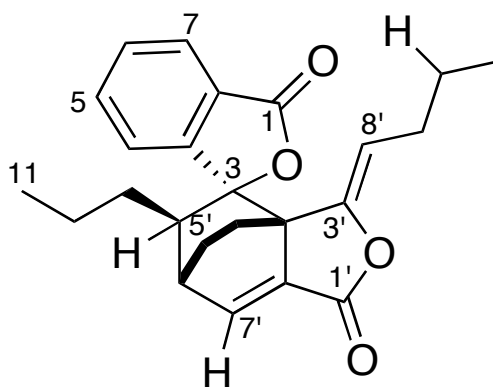


Figura 12. Espectro de ^{13}C -RMN HSQC de la ansaspírolida (40).



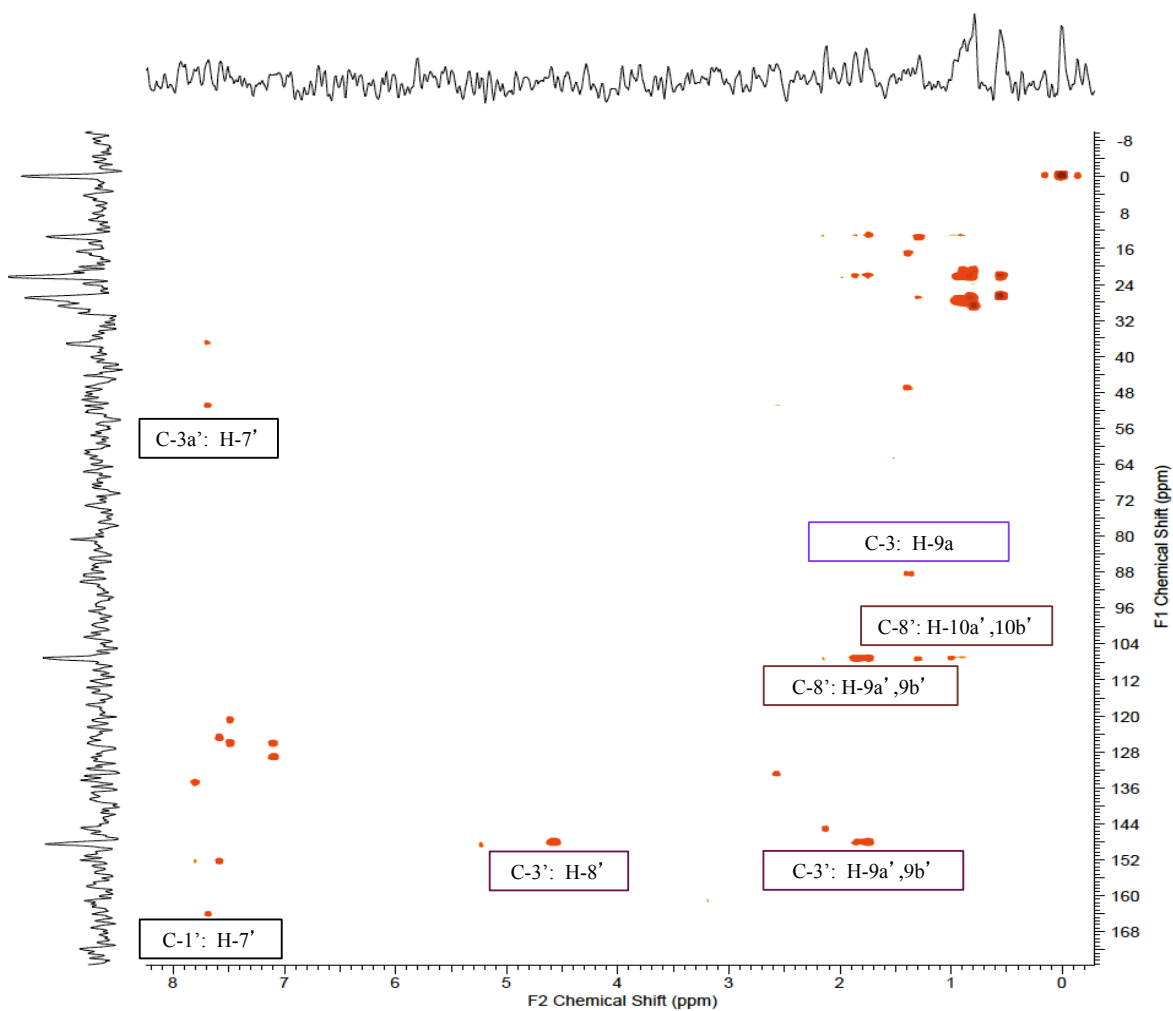
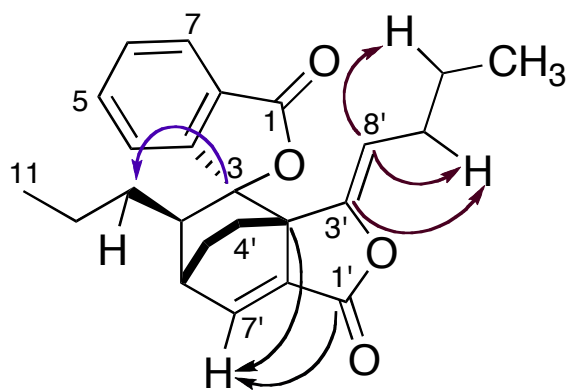


Figura 13. Espectro de ¹³C-RMN HMBC de la ansaspírolida (40).



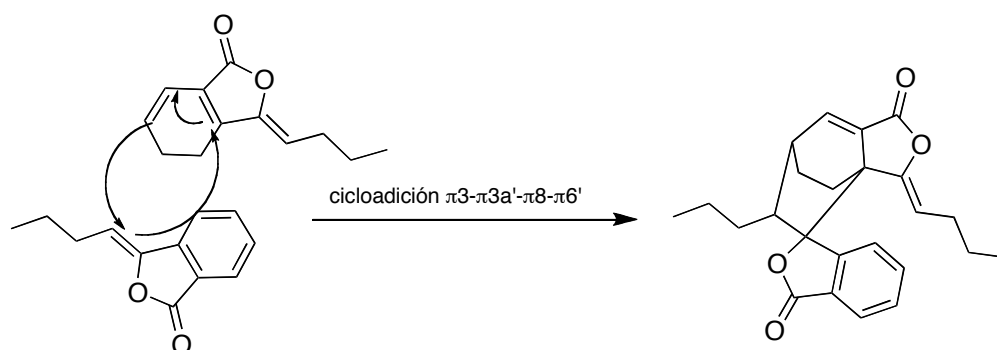
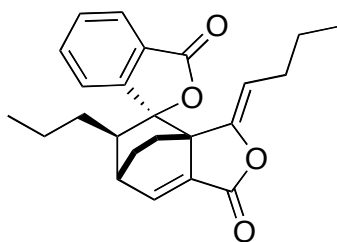


Figura 14. Propuesta de cicloaddición de la Z-ligustílida (**1**) y del Z-3-butilidenftálide (**2**) para la formación de la ansaspírolida (**40**).

Con base en los datos descritos, el producto **40** se caracterizó como la Z-3,8,3a',6'-4,5-dehidro-3,3a',8,6'- α -diligustílida que tiene como nombre trivial ansaspírolida (**40**). Este producto fue aislado previamente de la especie medicinal china *L. chuanxiong* (Lim *et al.*, 2006) y de la especie relacionada *Angelica sinensis* (Deng *et al.*, 2006) y las constantes espectroscópicas y espectrométricas se encuentran en perfecta armonía con las descritas en la literatura. Como el valor de rotación óptica fue idéntico al descrito en la literatura se asumió que la configuración de los centros quirales presentes es la misma.



ansaspírolida (40)

Cuadro 2. Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl₃) de los compuestos **40** y **41**.

posición	ansaspirólida (40)		dihidro-ansaspirólida (41)	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1		170.0		170.9
3		88.6		90.4
3a		152.4		156.8
4	7.10 (d, $J = 8$ Hz, 1H)	121.0	7.32 (d, $J = 10$ Hz, 1H)	122.4
5	7.58 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H)	134.8	7.56 (t, $J = 10$ Hz, 1H)	133.1
6	7.48 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H)	129.6	7.45 (t, $J = 10$ Hz, 1H)	128.6
7	7.80 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H)	125.2	7.80 (d, $J = 10$ Hz, 1H)	125.0
7a		126.2		126.5
8	1.94 (dd, $J = 7.2$ Hz, 1H)	47.2	2.47 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H)	46.6
9	1.50 (m, 1H); 1.38 (m, 1H)	28.9	1.50 (m, 2H); 1.37 (m, 1H)	29.9
10	1.27 (m, 1H); 0.89 (m, 1H)	21.2	0.80 (m, 2H)	21.3
11	0.79 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)	14.1	0.82 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)	14.2
1'		164.3		170.9
3'		148.4		147.6
3a'		51.1		40.6
4'	2.56 (dd, $J = 9.6$ Hz, 1H) 1.36 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H)	27.5	1.37 (m, 2H)	20.9
5'	2.12 (dd, $J = 9.2$ Hz, 1H) 1.38 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H)	17.2	1.92 (m, 2H)	19.9
6'	3.17 (dd, $J = 6.4$ Hz, 1H)	37.3	2.40 (m, 1H)	40.4
7'	7.69 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H)	145.4	2.35 (m, 2H)	31.9
7a'		133.2	1.80 (m, 2H)	45.5
8'	4.56 (dd, $J = 6.8$ Hz, 1H)	107.2	5.73 (dd, $J = 7$ Hz, 1H)	120.3
9'	1.86 (m, 1H); 1.75 (m, 1H)	26.8	1.76 (m, 1H); 1.65 (m, 1H)	24.6
10'	0.99 (m, 2H)	22.2	0.80 (m, 2H)	20.4
11'	0.55 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)	13.2	0.77 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)	14.2

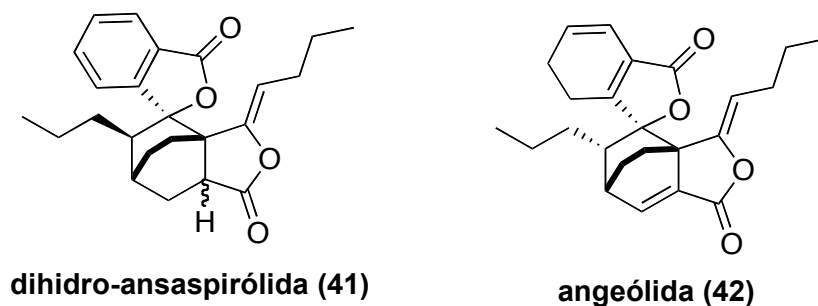
4.2.2 Caracterización de la dihidro-ansaspirólida (**41**).

El análisis detallado de los espectros de RMN del producto **41** (**Figuras 15–19**) permitió establecer que se trata de un dímero de ftálico (Ogawa *et al.*, 1997; Ríos *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2006; León *et al.*, 2011a; León *et al.*, 2011b). El ión molecular en el EMIE del producto natural corresponde a la fórmula C₂₄H₂₈O₄, la cual permite once insaturaciones. Los espectros de RMN (**Cuadro 2**) del

compuesto **41** mostraron similitud con los de la ansaspirólida (**40**), observándose las siguientes señales en el producto **41**:

a) En la región aromática del espectro de ^1H -RMN se aprecian un conjunto de señales para un anillo aromático disustituido asignables a cuatro protones en δ_{H} 7.80 (d, $J = 10$ Hz, H-7), 7.56 (t, $J = 10$ Hz, H-5), 7.45 (t, $J = 10$ Hz, H-6) y 7.32 (d, $J = 10$ Hz, H-4) las cuales correlacionan en el espectro HSQC con las absorciones en δ_{C} 156.8 (C-3a), 122.4 (C-4), 133.1 (C-5), 128.6 (C-6), 125.0 (C-7) y 126.5 (C-7a). Además, en el espectro de ^{13}C -RMN se observan señales para tres carbonos cuaternarios en δ_{C} 90.4 (C-3), 147.6 (C-3') y 45.5 (C-7a'), y en la zona de carbonilos dos señales en $\delta_{\text{C}} \sim 170$ (C-1 y C-1').

b) En la región comprendida en el intervalo δ_{H} 0.80–2.4 en el espectro de ^1H -RMN se aprecian señales para siete metilenos. Así, la principal diferencia entre los espectros de RMN de los productos **40** y **41** radica en la ausencia del conjunto de señales para una doble ligadura vinílica ($\delta_{\text{H}} \sim 7.69$, H-7'; $\delta_{\text{C}} \sim 133.2$, C-7a') en **41**. Por lo tanto, los desplazamientos químicos observados en los espectros de ^1H y ^{13}C unidimensionales, así como las correlaciones observadas en los espectros COSY, HSQC y HMBC (**Figuras 18–19**) comprobaron que el compuesto **41** era el dihidro derivado de la Z-3,8,3a',6'-4,5-dehidro-3,3a',8,6'- α -diligustílida y se denominó con el nombre trivial de dihidro-ansaspirólida (**41**). Este producto es idéntico al dihidro-derivado obtenido por la hidrogenación catalítica de la angeólida (**42**) y por lo tanto, representa un nuevo producto natural (Banerjee *et al.*, 1982). Finalmente, por analogía con el producto **40** se asume que la configuración en C-3, C-8 y C-6' en el producto **41** es idéntica, restando por establecer la configuración de C-7a'.



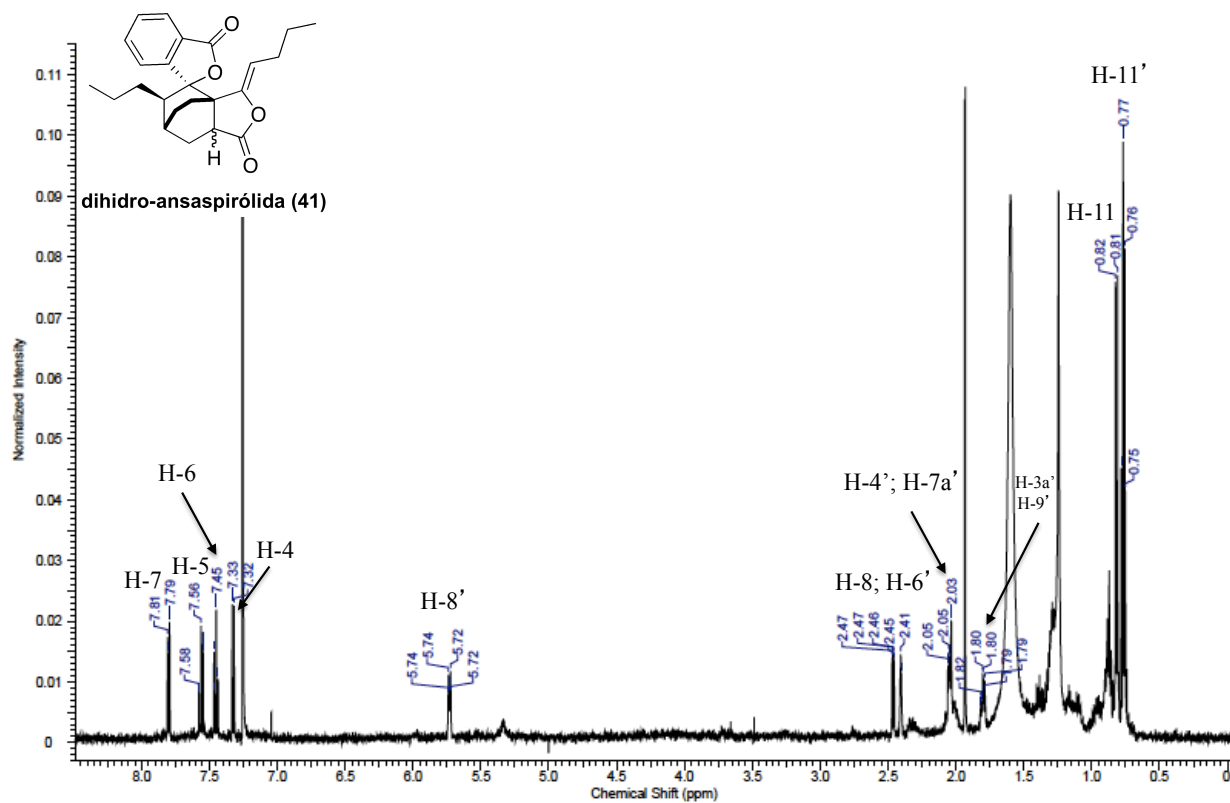


Figura 15. Espectro de ^1H -RMN de la dihidro-ansapirólida (41).

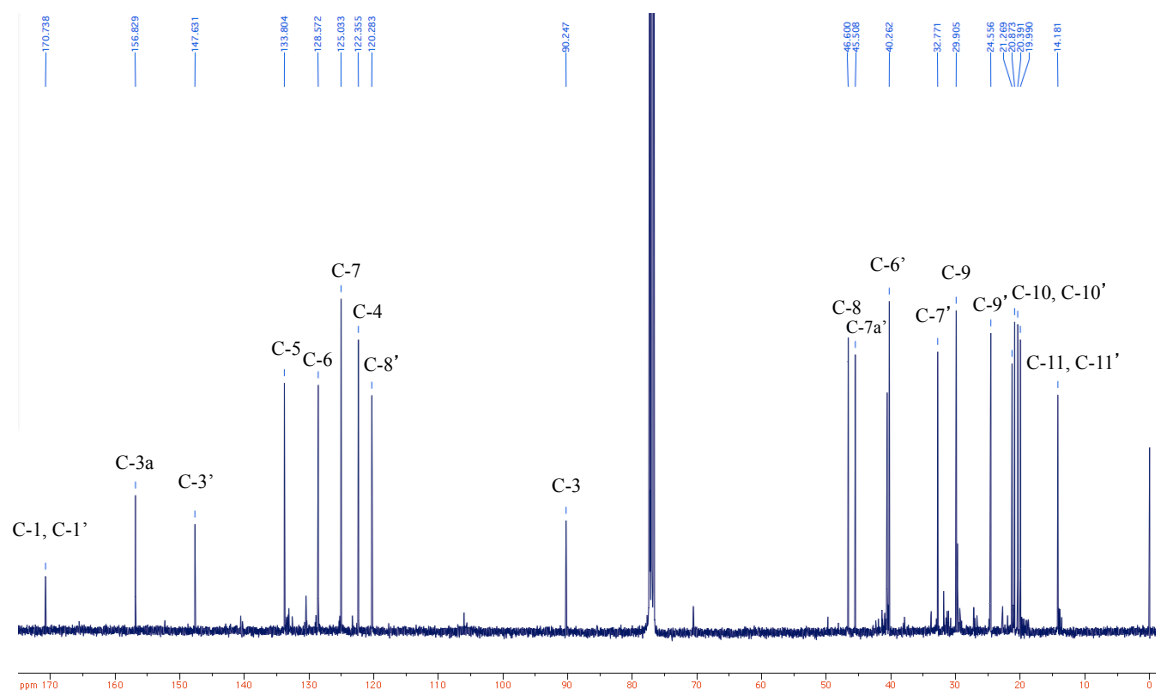
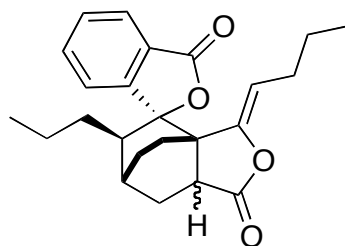


Figura 16. Espectro de ^{13}C -RMN de la dihidro-ansaspirólida (41).



dihidro-ansaspirólida (41)

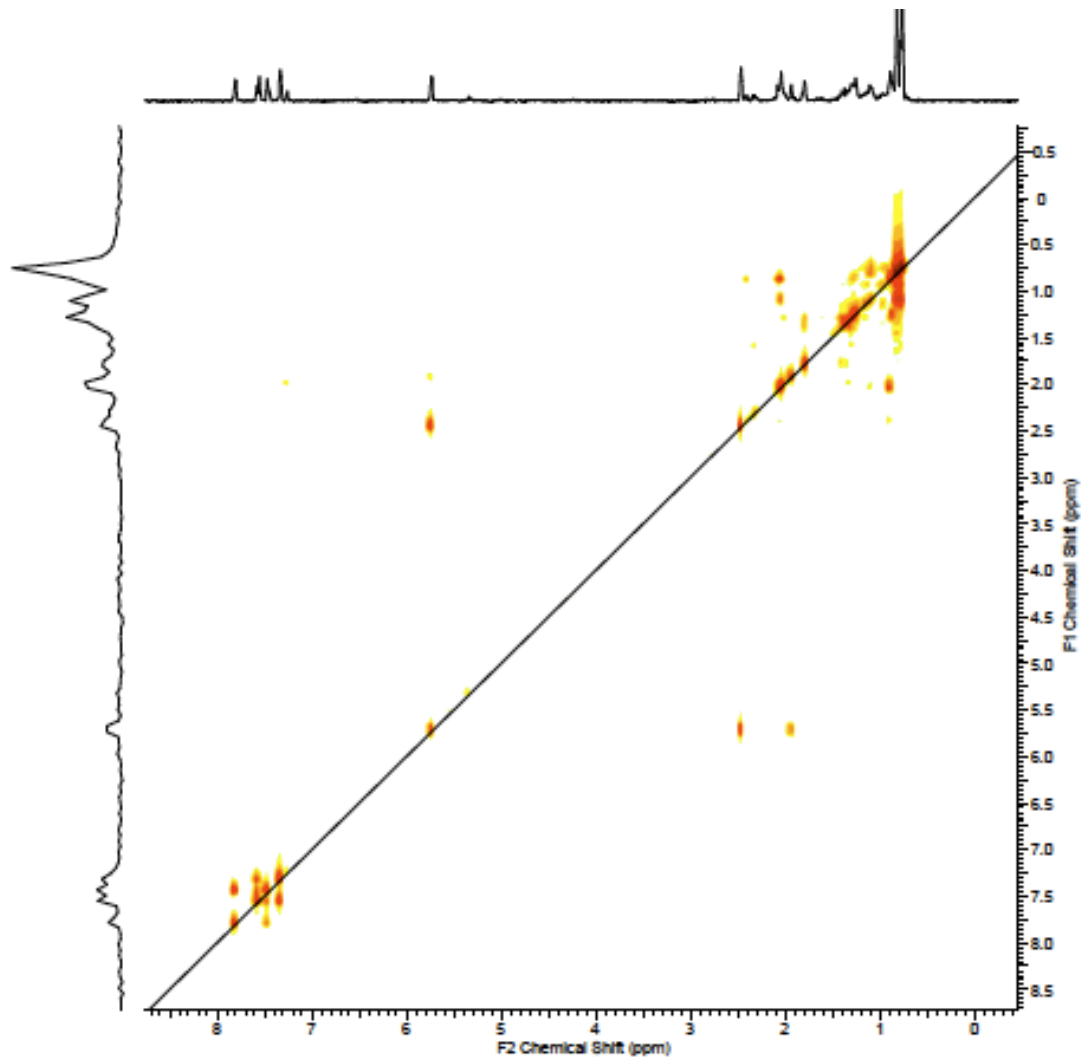


Figura 17. Espectro de ^1H -RMN COSY de la dihidro-ansaspírolida (41).

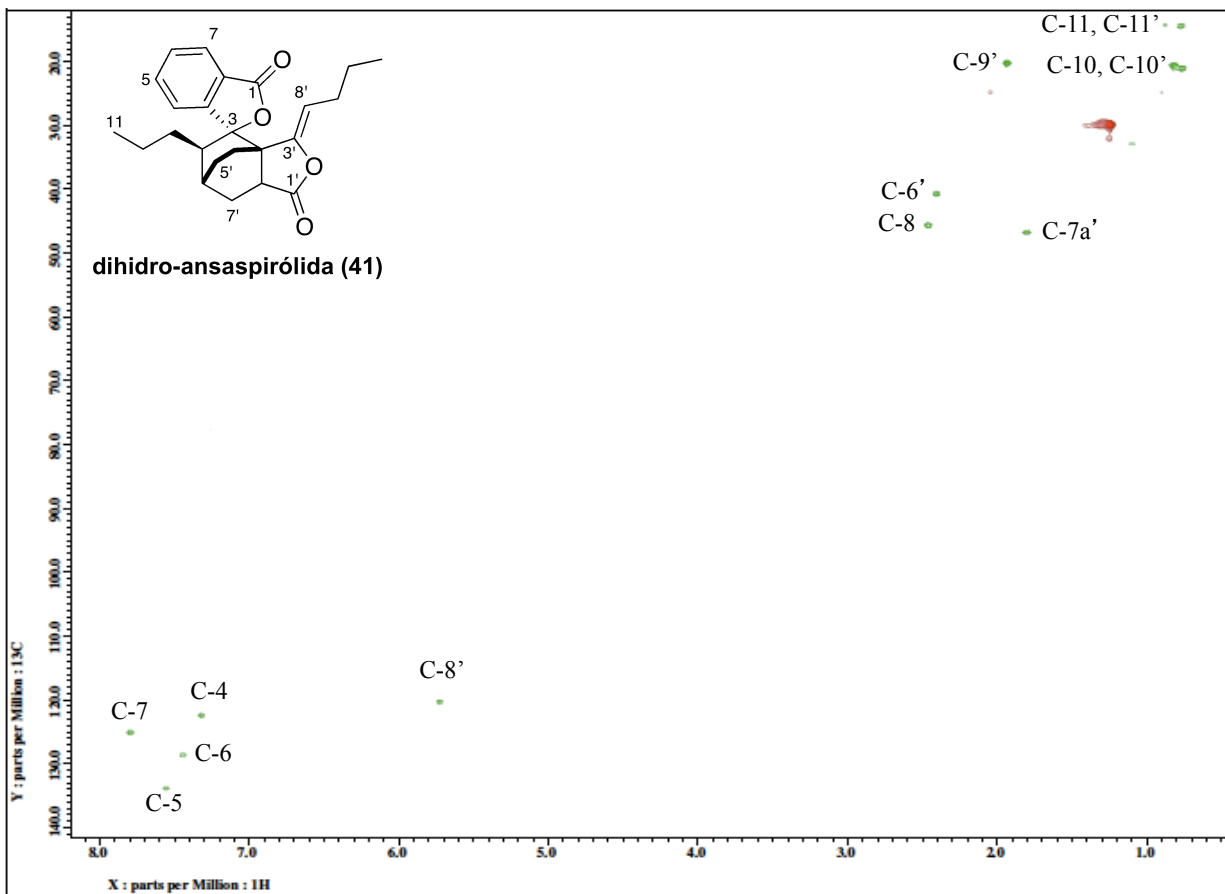


Figura 18. Espectro de ^{13}C -RMN HSQC de la dihidro-ansaspírolida (**41**).

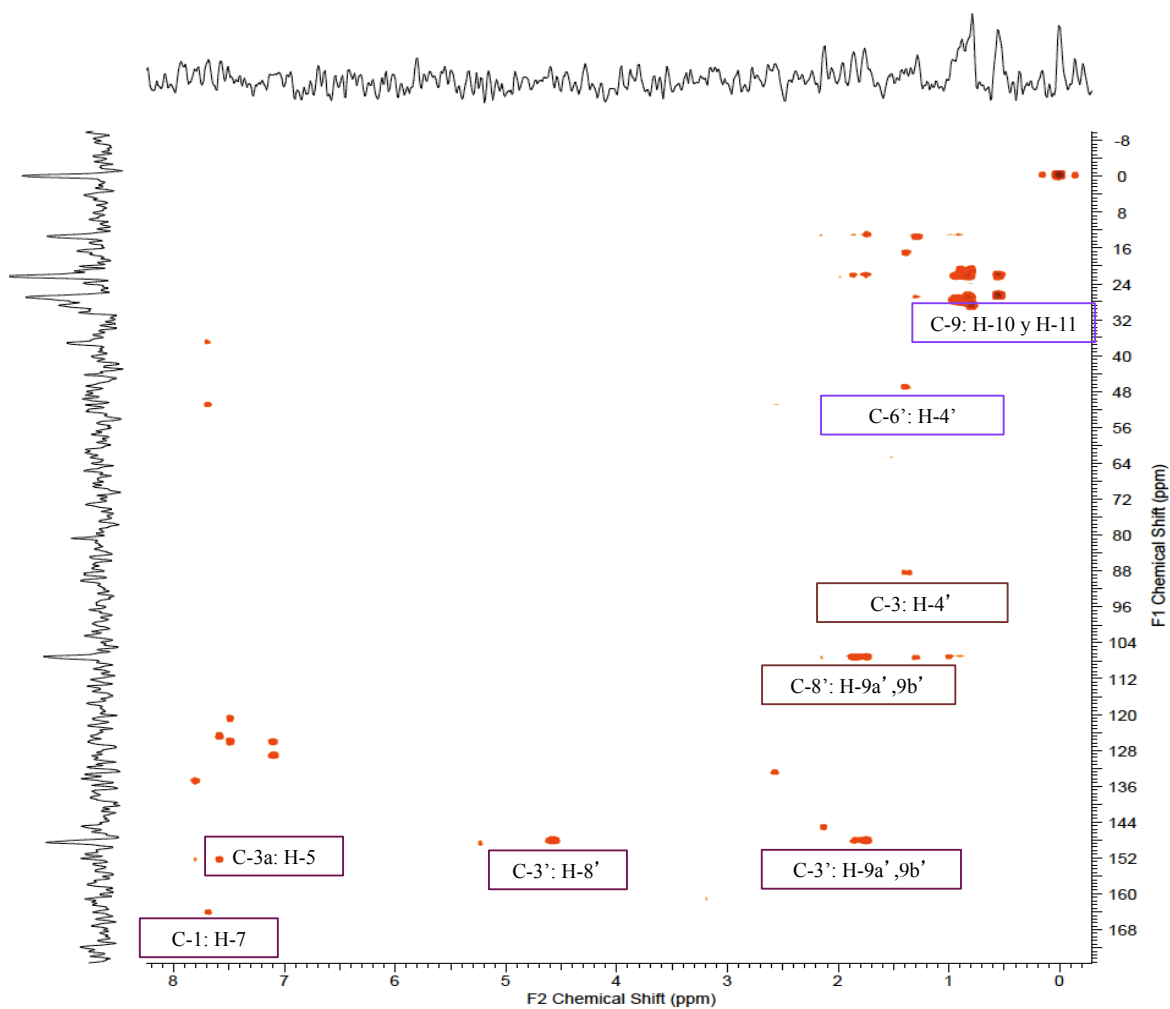
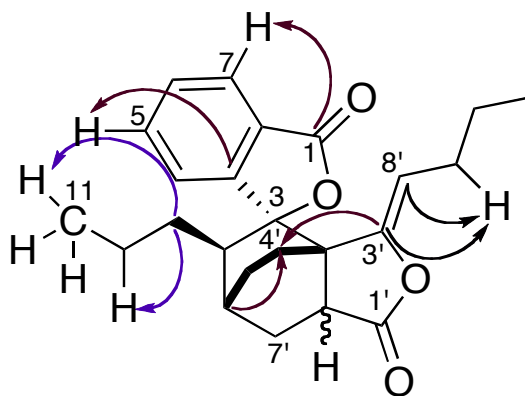


Figura 19. Espectro de ^{13}C -RMN HMBC de la dihidro-ansaspirlidina (**41**).



4.3 Efecto de los productos naturales sobre las enzimas α -glucosidasas.

Para determinar el efecto de los compuestos aislados sobre las enzimas α -glucosidasas se utilizó un ensayo espectrofotométrico utilizando como sustrato al *p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (PNPG) (Oki *et al.*, 1999; Brindis *et al.*, 2011; Rivera-Chávez *et al.*, 2012).

El método utilizado para determinar la actividad enzimática se basa en la cuantificación del *p*-nitrofenol generado a partir de la hidrólisis del sustrato PNPG en presencia de la α -glucosidasa purificada a partir de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 20**). La cantidad de *p*-nitrofenol cuantificado correlaciona directamente con la actividad de la α -glucosidasa.

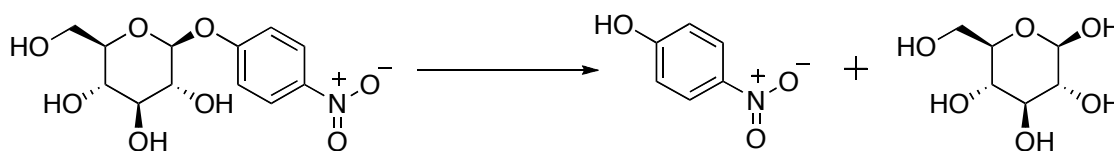
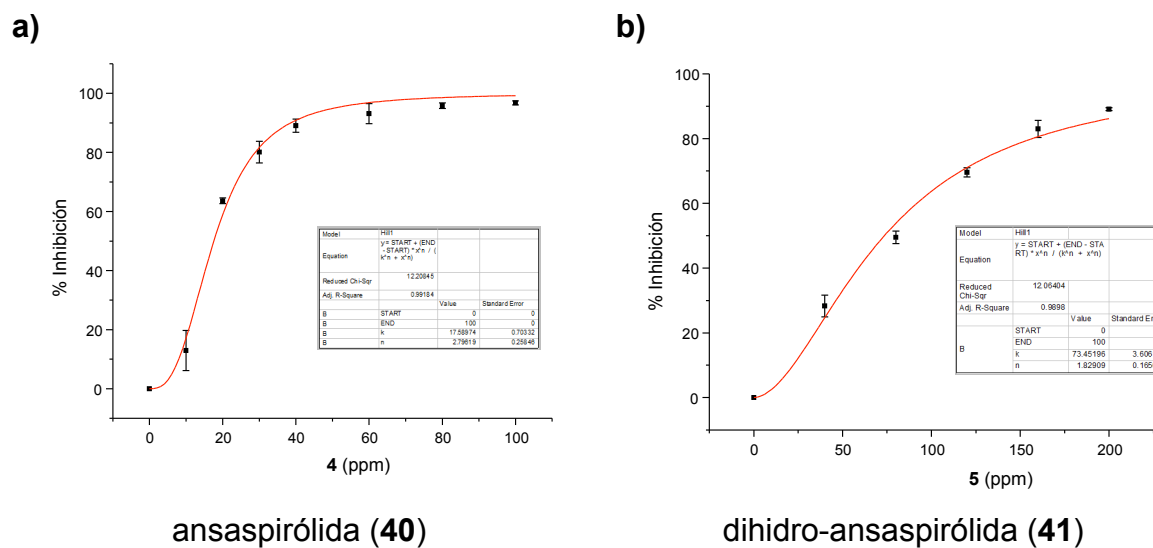


Figura 20. Hidrólisis enzimática del *p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (PNPG).

Los resultados de las determinaciones (**Gráficas 2a y 2b**) indican que los productos **40** y **41** inhiben la actividad de las α -glucosidasas de manera dependiente de la concentración. La ansaspirólida (**40**) presentó la mayor actividad con un valor de CI_{50} = 46.53 μ M, este efecto fue cerca de catorce veces mayor que el de la acarbosa (CI_{50} = 521.71 μ M), conocido inhibidor de la α -glucosidasa empleado como control positivo (Oki *et al.*, 1999; Brindis *et al.*, 2011; Rivera-Chávez *et al.*, 2012).

Por otra parte, la dihidro-ansaspirólida (**41**; CI_{50} = 0.19 mM) también inhibió la actividad enzimática de manera importante con respecto a la acarbosa. En conjunto estos resultados indican que ambos productos podrían constituir nuevos prototipos estructurales para el tratamiento de la diabetes.



Gráfica 2. Efecto de los compuestos **a)** ansaspírolida (**40**) y **b)** dihidro-ansaspírolida (**41**) sobre la actividad de las α -glucosidasas.

5. Conclusiones

a) La especie medicinal *Ligusticum porteri* es una fuente potencial de compuestos activos de interés en la terapéutica para el tratamiento de la diabetes.

b) El fraccionamiento biodirigido del extracto total obtenido a partir de las raíces de *L. porteri* permitió el aislamiento y la caracterización de varios ftálidos, incluyendo dos productos naturales reportados por primera vez para la especie, caracterizados como ansaspirólida (**40**) y dihidro-ansaspirólida (**41**), con actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas.

c) Finalmente, el presente trabajo constituye una aportación original al conocimiento químico y a la actividad biológica como inhibidores de las enzimas α -glucosidasas de los ftálidos aislados a partir de la especie objeto de estudio.

6. Perspectivas

a) Continuar con el estudio químico de *L. porteri* con la finalidad de establecer los componentes minoritarios activos presentes.

b) Completar el perfil cromatográfico por CLAE para identificar a los ftálidos presentes en la especie objeto de estudio.

c) Establecer la configuración de los centros estereogénicos presentes en el compuesto **41**.

7. Bibliografía

- ✓ Appelt, G.D. Pharmacological aspects of selected herbs employed in hispanic folk medicine in the San Luis Valley of Colorado, USA: I. *Ligusticum porteri* (Osha) and *Matricaria chamomilla* (Manzanilla). *Journal of Ethnopharmacology*, **1985**, *13*, 51–55.
- ✓ Argueta, V.A., Cano, A.L., Rodarte, M.E. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México. **1994**, p 759.
- ✓ Asano, N., Tomioka, E., Kizu, H., Matsui, K. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydr. Res.* **1994**, *253*, 235–245.
- ✓ Banerjee, S.K., Gupta, B.D., Sheldrick, W.S., Höfle, G. Angeolide, a novel lactone from *Angelica glauca*. *Liebigs Annalen der Chemie*, **1982**, *4*, 699–707.
- ✓ Baron, A.D. Postprandial hyperglycemia and α -glucosidase inhibitors. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **1998**, *40*, S51–S55.
- ✓ Brindis, F., Rodríguez, R., Bye, R., González-Andrade, M., Mata, R. (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -glucosidase inhibitor. *Journal of Natural Products*, **2011**, *74*, 314–320.
- ✓ Bye, R.A. Medicinal plants of the Tarahumara Indians of Chihuahua, México. In: RA Tyson & DV Elerick (eds). *Two mummies from Chihuahua, México. A multidisciplinary study*. San Diego Museum Papers No. 19. San Diego Museum of Man. **1985**, pp 77–103.
- ✓ Campbell, L.K., White, J.R., Campbell, R.K. Acarbose: its role in the treatment of diabetes mellitus. *The Annals of Pharmacotherapy*, **1996**, *11*, 1255–1262.
- ✓ Cégiela-Carlio, P., Bessiere, J.M., David, B., Mariotte, A.M., Gibbons, S., Dijoux-Franca, M.G. Modulation of multi-drug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus* by Osha (*Ligusticum porteri* L., Apiaceae) essential oil compounds. *Journal of Flavour and Fragrance*, **2005**, *20*, 671–675.

-
- ✓ Chan, S.S., Cheng, T.Y., Lin, G. Relaxation effects of ligustilide and senkyunolide A, two main constituents of *Ligusticum chuanxiong*, in rat isolated aorta. *Journal of Ethnopharmacology*, **2007**, *111*, 677–680.
 - ✓ Cronquist, A., Holmgren, N.H., Holmgren, P.K. Intermountain flora. *Vascular plants of the intermountain west, USA*. Vol. 3 Part A. Subclass Rosidae (except Fabales). The New York Botanical Garden Bronx. New York. USA. **1997**, p 340–341, 365–367.
 - ✓ Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Ángeles-López, G.E., Navarrete, A., Mata, R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **2007**, *110*, 334–342.
 - ✓ Delgado, G., Reza-Garduño, R.G., Toscano, R.A., Bye, R., Linares, E. Secondary metabolites from the roots of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae). X-Ray structure of Z-6.6', 7.3a'-diligustilide. *Heterocycles*, **1988**, *27*, 1305–1312.
 - ✓ Deng, S., Chen, S.N., Lu, J., Wang, Z.J., Nikolic, D., Van Breemen, R.B., Santarsiero, B.D., Mesezar, A., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Pauli, G.F. GABAergic phthalide dimers from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Phytochemical Analysis*, **2006**, *17*, 398–405.
 - ✓ Deng, S., Chen, S.N., Yao, P., Nikolic, D., Van Breemen, R.B., Bolton, J.L., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Pauli, G.F. Serotonergic activity-guided phytochemical investigation of the roots of *Angelica sinensis*. *Journal of Natural Products*, **2006**, *69*, 536–541.
 - ✓ Esteyneffer, J. Florilegio Medicinal de Todas las Enfermedades. *Academia Nacional de Medicina*. México. **1978**.
 - ✓ Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, México, **2013**.
 - ✓ Galaviz, A., Galaviz, C., Galaviz, L., Duarte, C. Flora medicinal Pima de Yecora, Sonora. *Flora medicinal indígena de México: treinta y cinco monografías del atlas*

- de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol. I.* Instituto Nacional Indigenista, México. **1994**, p 90–105.
- ✓ González, E., González E., López, I., Tena, F. Plantas Medicinales de Durango y Regiones Aledañas. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. **2004**.
 - ✓ <http://www.botanicayjardines.com>
 - ✓ Inouye, S., Tsuruoka, T., Ito, T., Niida, T. Structure and synthesis of nojirimycin. *Tetrahedron*, **1968**, 23, 2125–2144.
 - ✓ Juárez-Reyes, K. Pruebas de composición para establecer el control de calidad de la planta medicinal *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. **2009**.
 - ✓ Juárez-Reyes, K. Pruebas de eficacia, identidad y seguridad de la especie medicinal *Ligusticum porteri* (Apiaceae). Tesis de Maestría. Posgrado Ciencias Químicas, UNAM. **2012**.
 - ✓ Kuang, X., Yao, Y., Du, J.R., Liu, Y.X., Wang, C.Y., Qian, Z.M. Neuroprotective role of Z-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice. *Brain Research*. **2006**, 1102, 145–153.
 - ✓ León, A., Chávez, M.I., Delgado, G. ¹H and DOSY NMR spectroscopy analysis of *Ligusticum porteri* rhizome extracts. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2011a**, 49, 469–476.
 - ✓ León, A., Toscano, R.A., Tortoriello, J., Delgado, G. Phthalides and other constituents from *Ligusticum porteri*; sedative and spasmolytic activities of some natural products and derivatives. *Natural Product Research*, **2011b**, 25, 1234–1242.
 - ✓ Li, Y., Xu, C., Zhang, Q., Liu, J.Y., Tan, R.X. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 98, 329–333.
 - ✓ Lim, L.S., Shen, P., Gong, Y.H., Yong, E.L. Dimeric progestins from rhizomes of *Ligusticum chuanxiong*. *Phytochemistry*, **2006**, 67, 728–734.
 - ✓ Linares, E., Bye, R.A. Study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*, **1987**, 19, 153–183.

-
- ✓ Mathias, M.E., Constance, L. Umbelliferae. *North America Flora*. **1944**, *28B*, 143–148.
 - ✓ Naito, T., Katsuhara, T., Niitsu, K., Ikeya, Y., Okada, M., Mitsushashi, L.H. Phthalide dimers from *Ligusticum chuangxiong* Hort. *Heterocycles*, **1991**, *32*, 2433–2441.
 - ✓ Nathan, D.M. Finding new treatments for diabetes—how many, how fast... how good?. *The New England Journal Medicine*, **2007**, *40*, 356–437.
 - ✓ Ogawa, Y., Mori, Y., Maruno, M. and Wakamatsu, T. Diels-Alder Reaction of Ligustilide giving Levistolide A and Tokinolide B. *Heterocycles*, **1997**, *45*, 1869–1872.
 - ✓ Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y. Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, *47*, 550–553.
 - ✓ Ortiz, B.I., Shields, K.M., Clauson, K.A., Clay, P.G. Complementary and alternative medicine use among Hispanics in the United States. *The Annals of Pharmacotherapy*, **2007**, *41*, 994–1004.
 - ✓ Reese, E.T., Parrish, F.W. Nojirimycin and D-glucose-1, 5-lactone as inhibitors of carbohydrases. *Carbohydrates Research*, **1971**, *18*, 381–388.
 - ✓ Reza Garduño-Treviño, R.G. Aislamiento y caracterización de los ftálicos de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Umbelliferae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. **1987**.
 - ✓ Reza Garduño-Treviño, R.G. Ftálicos de la familia Umbelliferae. Tesis de Maestría. Posgrado Ciencias Químicas, UNAM. **1991**.
 - ✓ Ríos, M.Y., Delgado, G., Toscano, R.A. Chemical reactivity of phthalides. Relay Synthesis of diligustilide, Rel-(3'R)-3',8'-dihydrodilugustilide and wallichilide. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 3355–3366.
 - ✓ Rivera-Chávez, J., González-Andrade, M., González, M.C., Glenn, A.E., Mata, R. Thielavins A, J and K: α -Glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*, **2013**, *94*, 198–205.

- ✓ Rivero, I., Juárez, K., Zuluaga, M., Bye, R., Mata, R. Quantitative HPLC method for determining two of the major active phthalides from *Ligusticum porteri* roots. *Journal of AOAC International*, **2012**, *95*, 84–91.
- ✓ Spangenberg, B., Poole, C.F., Weins, C. Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey. Springer. Berlín. **2011**.
- ✓ Terrell, B., Fennell, A. Osha (bear root): *Ligusticum porteri* J.M. Coult. & Rose var. *porteri*. *Native Plants Journal*, **2009**, *10*, 110–117.
- ✓ Tewari, N., Tiwari, V.K., Mishra, R.C., Tripathi, R.P., Srivastava, A.K., Ahmad, R., Srivastava, R., Srivastava, B.S. Synthesis and bioevaluation glycosyl ureas as alpha-glucosidase inhibitors and their effect on mycobacterium. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2003**, *11*, 2911–2922.
- ✓ Zuluaga-Quiceno, M. Pruebas de composición, identidad y eficacia selectas de utilidad para el aseguramiento de la calidad de la droga cruda de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae). Tesis de Maestría. Posgrado Ciencias Químicas, UNAM. **2009**.