



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE *BRICKELLIA*
CAVANILLESII Y ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA DEL ACEITE ESENCIAL OBTENIDO
DE LAS PARTES AÉREAS DE LA ESPECIE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

CECILIA ELIZABETH GARCÍA NOLCK



MÉXICO, D.F.

2014



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: Profesor: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

VOCAL: Profesor: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

SECRETARIO: Profesor: Dra. Araceli Pérez Vásquez

1er. SUPLENTE: Profesor: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2° SUPLENTE: Profesor: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 124, DEPTO. DE FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ARACELI PÉREZ VÁSQUEZ

SUSTENTANTE (S):

CECILIA ELIZABETH GARCÍA NOLCK

ÍNDICE

	Página
1. ANTECEDENTES.	1
1.1. Compuestos orgánicos volátiles de las plantas.	1
1.2. Generalidades sobre la diabetes.	3
1.3. Antecedentes botánicos y etnobotánicos de la especie vegetal de <i>Brickellia cavanillesii</i> .	4
1.4. Antecedentes químicos.	5
1.5. Antecedentes farmacológicos.	9
2. OBJETIVOS.	11
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	12
3.1. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas.	12
3.2. Procedimientos generales.	12
3.3. Material vegetal.	13
3.4. Obtención y análisis del aceite esencial de <i>B. cavanillesii</i> y estándares.	13
3.4.1. Aislamiento del curcumeno (28) y espatulenol (38) de la esencia.	13
3.4.2. CG-EM.	14
3.4.3. MEFS con espacio de cabeza.	15
3.5. Evaluación de la actividad antidiabética del aceite esencial de <i>B. cavanillesii</i> .	15
3.5.1. Efecto hipoglucemiante agudo en animales normoglucémicos y diabéticos.	16
3.5.2. Efecto sobre la tolerancia a la sacarosa en animales normoglucémicos y diabéticos.	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	18
4.1. Efecto hipoglucemiante y antihiper glucémico del aceite esencial.	18
4.2. Análisis de aceite esencial por CG-EM.	20
4.2.2. Análisis por Cromatografía en capa delgada de la esencia.	25
4.2.3. Caracterización de los COV por MEFS.	26
5. CONCLUSIONES.	30
6. BIBLIOGRAFÍA.	31
7. ANEXOS.	34

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
ACA	Acarbosa
ANADEVA	Análisis de Varianza
°C	Grado Celsius
CDCl₃	Cloroformo Deuterado
CH₂Cl₂	Diclorometano
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada a nivel preparativo
CG	Cromatografía de Gases
CG-DF	Cromatografía de Gases acoplado a Detector de Ionización de Flama
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas
COV	Compuestos orgánicos volátiles
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
Δ	Desplazamiento químico
G	Gramo
H₂O_d	Agua Destilada
IDF	Federación Internacional de la Diabetes
Kg	Kilogramo
M	Metro
MEFS	Microextracción en Fase Sólida
mg	Miligramo
mL	Mililitro
μL	Microlitro
MHz	Mega Hertz
OMS	Organización Mundial de la Salud
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN-¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
STZ	Estreptozotocina
SSI	Solución Salina Isotónica
TMS	Tetrametilsilano
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación
UV	Ultravioleta

1. ANTECEDENTES.

1.1. Compuestos orgánicos volátiles de las plantas.

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) presentes en las plantas, son en general, metabolitos secundarios predominantemente de tipo mono y sesquiterpenoides y en algunos casos, compuestos aromáticos derivados del fenilpropano (ejem.: vainillina, eugenol) (Bruneton, 2001). Si bien todas las plantas intercambian volátiles no orgánicos (CO_2 , O_2) durante la fotosíntesis o la respiración, la mayoría de ellas también pueden liberar COV a partir de diferentes órganos, tales como flores, frutos y hojas (contenidos en glándulas, conductos o sacos), que transportados por difusión a través del aire, realizan numerosas funciones ecológicas y ambientales, como son: contribuir a la formación de ozono y generar aerosoles orgánicos secundarios en presencia de contaminantes antropogénicos, lo que reduce el impacto en el ambiente de estos últimos (Salvito, *et al.*, 2004). También, algunos terpenoides influyen en los niveles de radicales hidroxilo atmosféricos y en la permanencia atmosférica del metano, un gas de efecto invernadero importante (Tholl, *et al.*, 2006). Desde un punto de vista ecológico, se sabe también que actúan como “semioquímicos”, “infoquímicos” y “feromonas” (Herrmann, 2010). Finalmente, la liberación de COV de algunas plantas lesionadas, no solo afecta a los herbívoros o patógenos que la dañaron, sino también puede ser una señal de alarma para las plantas vecinas y desencadenar en ellas respuestas de defensa (Salvito, *et al.*, 2004).

Con el desarrollo de la destilación, se hizo posible separar del material botánico estas sustancias o sus mezclas, permitiendo la obtención de los aceites esenciales (también llamados esencias o aceites volátiles) los cuales son productos de composición generalmente muy compleja, extraídos principalmente de plantas aromáticas (la mayoría de ellas pertenecientes a las familias Asteraceae, Lamiaceae y Apiaceae) y que pueden contener no solo COV sino también compuestos de degradación originados por los diferentes procesos de obtención de los aceites (ejem.: chamazuleno) (Hüsni y Özek, 2013).

Para la obtención de las esencias se recomienda principalmente el uso de la técnica por arrastre en vapor de agua (en especial la hidrodestilación) (FHEUM,

2013; USP 35, 2012; EP, 2007), aunque también es posible obtenerlos por expresión, la cual se aplica principalmente en el caso de los epicarpios de cítricos.

Por lo que respecta a los usos que las esencias han recibido a lo largo de su historia, estos son amplios y variados. La primera y más rentable de sus aplicaciones fue el uso como perfumes o fragancias. Incluso en la actualidad es conocida su importancia en la industria perfumera y cosmética en su intento de encontrar nuevas fragancias secretas y difíciles de imitar que alcanzan altos precios en el mercado. En el caso de la industria alimenticia, su uso se ha extendido debido a la gran preocupación que rodea el uso de aditivos sintéticos potencialmente dañinos. Además, a lo largo de la historia, se ha puesto de manifiesto las propiedades farmacológicas de los aceites esenciales, como agentes antimicrobianos, antivirales, antinociceptivos, antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenos, repelentes de insectos, molusquicidas, antialérgicos (Amorati, *et al.*, 2013; Nizar, *et al.*, 2013; Adorjan y Buchbauer, 2010), lo que ha incrementado su uso en algunos campos relacionados con la salud como son la fitoterapia y la aromaterapia.

En cuanto al control de calidad de los aceites esenciales, la determinación de su composición en las materias primas es útil para validar la identidad de algunos componentes botánicos, de ahí la importancia de establecer su composición y discriminar entre sus contaminantes. Así mismo, la cantidad de aceite volátil presente en ciertos productos botánicos es un marcador también de la calidad de la materia prima (Rubiolo, *et al.*, 2010; Bicchi, *et al.*, 2008; Salgueiro *et al.*, 2009; Heng, *et al.*, 2013).

Existen diferentes técnicas analíticas utilizadas para determinación de la identidad y caracterización de los componentes presentes en los aceites esenciales como son, las cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas. Las técnicas cromatográficas permiten identificar a los componentes, mientras que las espectrométricas y espectroscópicas son las más apropiadas para la caracterización de los mismos. El problema de estas últimas es que precisa de componentes aislados y puros por lo que, en general, se emplean acopladas con otras técnicas de separación. La técnica cromatográfica más importante para el análisis de las esencias es la cromatografía de gases (CG), acoplada a un

detector de ionización flama (CG-DF) o a un espectrómetro de masas (CG-EM) (Franz, 2010; ISO-1709 e ISO-22972).

A partir de la aplicación de la CG-EM o CG-DF se puede determinar la abundancia de los componentes en función de su porcentaje relativo, su porcentaje normalizado a un estándar interno de abundancia y/o realizar una cuantificación verdadera de uno o más componentes mediante un método validado (Rubiolo, *et al.*, 2008).

1.2. Generalidades de la diabetes.

Según datos de la organización mundial de la salud, existen en la actualidad 437 millones de personas con diabetes y de acuerdo con la Federación Internacional de la Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), en 2011 murieron 4.8 millones de personas a consecuencia de la diabetes, que gastaron 471 billones de dólares en atención médica y la mitad, tenía menos de 60 años de edad (IDF, 2013). Por su parte, la OPS (Organización Panamericana de la Salud) y la OMS han señalado que esta enfermedad se encuentra entre las principales causas de muerte y discapacidad en Latinoamérica (OPS, 2012; OMS, 2012).

Por lo que respecta a nuestro país, en 2011 de cada 100 mil personas que murieron, 70 fallecieron por diabetes; actualmente, las tasas de mortalidad más altas se ubican en el Distrito Federal (99.6 de cada 100 mil personas), seguido de Veracruz (84.3 de cada 100 mil) y Puebla (81.6 muertes) (ENSANUT, 2012).

La diabetes mellitus se presenta cuando el páncreas no produce insulina, o bien, la que se produce no es utilizada de manera eficiente por el organismo. La insulina regula la entrada de glucosa en las células para su transformación en energía. Cuando falta la insulina, la glucosa se acumula en la sangre, con lo que se incrementa la concentración sanguínea de glucosa. En los casos en los que la diabetes no es controlada se genera un estado de hiperglucemia que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas especialmente el nervioso y cardiovascular (OMS, 2012; Stolar, 2010; Surya, *et al.*, 2014).

Actualmente se reconoce que existen varias clases de diabetes, sin embargo, las más importantes son las de tipo 1 y 2. La primera es conocida como insulino dependiente, juvenil o de inicio de la infancia, la cual se caracteriza por

una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de la hormona. La diabetes tipo 2 (DMT2), llamada también no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta surge de una utilización ineficiente de la insulina (OMS, 2012).

Para el tratamiento de esta enfermedad se utilizan diferentes antidiabéticos orales (Martínez-Castelao, *et al.*, 2012) los cuales se clasifican en:

- Fármacos secretagogos de insulina: sulfonilureas, meglitinidas, inhibidores de dipeptidil-peptidasa 4 (iDPP4).

- Fármacos que estimulan la acción periférica de la insulina: metformina, pioglitazona.

- Fármacos que inhiben las enzimas α -glucosidasas a nivel intestinal (retrasan la absorción de glucosa): acarbosa, miglitol.

Algunas plantas medicinales bien reconocidas por sus propiedades antidiabéticas y usadas en las prácticas médicas tradicionales de varias comunidades rurales, también se están perfilando como una opción a la terapéutica contra la diabetes. (Arumugam, *et al.*, 2013, Ramírez, *et al.*, 2012; Mata, *et al.*, 2012). Dentro de las plantas medicinales más utilizadas en nuestro país para tratar esta enfermedad se encuentra la especie vegetal *Brickellia cavanillesii*, la cual es una de las 306 especies mexicanas más utilizadas para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II (DMT2) (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Escandón-Rivera, *et al.*, 2012).

1.3. Antecedentes botánicos y etnobotánicos de la especie vegetal *Brickellia cavanillesii*.

Brickellia cavanillesii (Cass.) A. Gray (Asteraceae) es una planta que se distribuye a lo largo de toda la República Mexicana y se le conoce comúnmente como “atanasia amarga”, “prodigiosa” y “hierba del becerro” (Escandón-Rivera, *et al.*, 2012). Florece entre los meses de septiembre a diciembre y puede llegar a medir de 1 a 3 metros de largo, sus hojas tienen forma ovada de color verde (Figuras 1-3), opuestas, pecioladas; los tallos son rojizos, velludos y ásperos; sus flores son amarillas muy claro que se agrupan en forma de cabezuelas colgantes.

La planta tiene sabor amargo y es utilizada para tratar afecciones del estómago, la diarrea, la gastritis, la atonía secretora y motriz del aparato gastrointestinal. También se le atribuyen propiedades vermífugas y antidiabéticas. Actualmente es una de las 306 especies más utilizadas para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II (DMT2) (Anales del IMN., 1894; Martínez, 1989; Poss, *et al.*, 2003; Johnson, *et al.*, 2006; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Por su eficacia popular en los mercados de nuestro país se comercializa sola o en combinación con otras hierbas (Escandón-Rivera, *et al.*, 2012).



Figura 1. Planta de *B. cavanillesii* **Figura 2.** Flores de *B. cavanillesii* **Figura 3.** Hojas de *B. cavanillesii*

1.4. Antecedentes químicos.

Los primeros estudios químicos de la planta fueron realizados en el año 1958 por Flores y Herrán quienes aislaron y caracterizaron un glucósido de trimetoxiflavona a la que llamaron pendulina (1). Posteriormente, en 1960 estos mismos autores reportaron la presencia de otra flavona a la que le dieron el nombre de atanasina (2) (Flores y Herrán, 1958; 1960). Rodríguez y colaboradores (2006) describieron por primera vez para la planta la presencia del cromeno desmetilisoencecalina (3), la cual fue posteriormente confirmada por Escandón-Rivera (2012) quien determinó que es uno de los compuestos mayoritarios de la especie. También, Escandón-Rivera aisló y caracterizó doce compuestos adicionales: cinco flavonoides (4-8), dos cromenos (9 y 10), tres lactonas sesquiterpénicas (11-13), el ácido 3,5-dicafeoilquínico (14) y la cumarina

herniarina (**15**) (Escandón-Rivera, *et al.*, 2012; Mata, *et al.*, 2013; Rodríguez, *et al.*, 2006). [Tabla 1].

Palacios, también reportó el perfil cromatográfico por CLAE-EM del extracto orgánico íntegro (CH₂Cl₂-MeOH) en donde solamente se realizó la identificación con el uso de estándares de cinco flavonoles y seis derivados del ácido clorogénico (Palacios, 2009).

Tabla 1. Metabolitos aislados de *B. cavanillesii*.

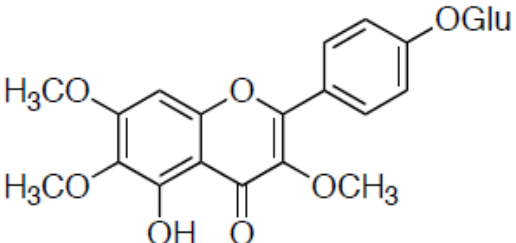
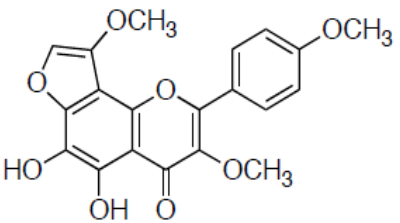
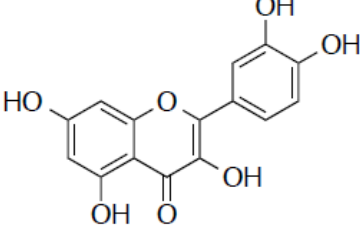
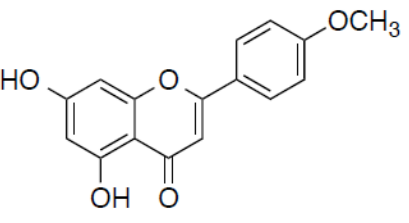
Categoría	Nombre y estructura	Fuente
Flavonoides	 <p>Pendulina (1)</p>	Flores y Herrán, 1958
	 <p>Atanasina (2)</p>	Flores y Herrán, 1960
	 <p>Quercetina (4)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012
	 <p>Acacetina (5)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012

Tabla 1. Metabolitos aislados de *B. cavanillesii* (Continuación).

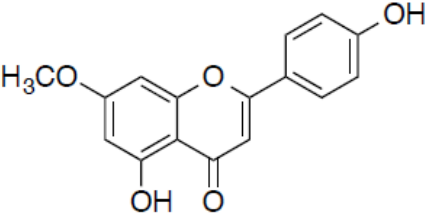
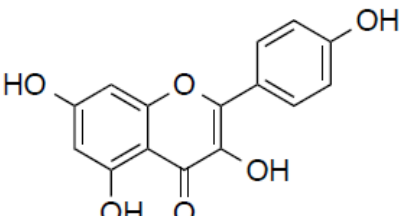
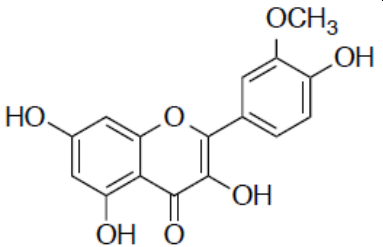
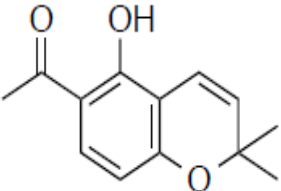
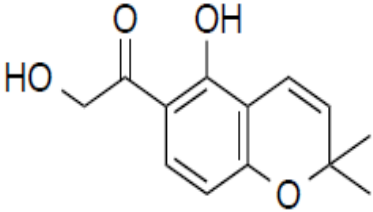
Categoría	Nombre y estructura	Fuente
Flavonoides	 <p>Genkwanina (6)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012
	 <p>Camperol (7)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012
	 <p>Isoramnetina (8)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012
Cromenos	 <p>6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (3)</p>	Rodríguez, <i>et al</i> 2006 Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012
	 <p>6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (9)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012

Tabla 1. Metabolitos aislados de *B. cavanillesii* (Continuación).

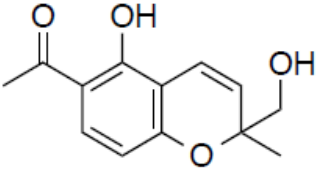
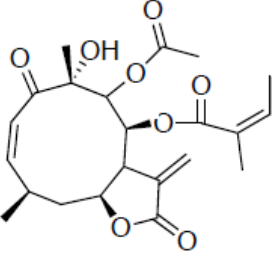
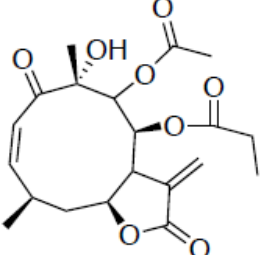
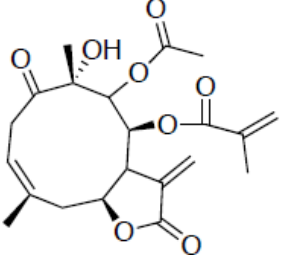
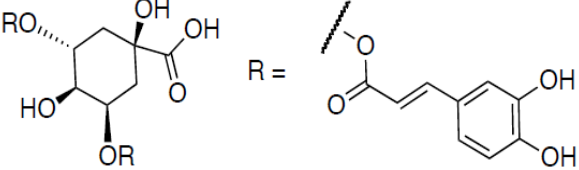
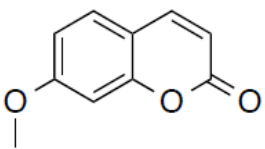
Categoría	Nombre y estructura	Fuente
Cromenos	 <p>6-acetil-5-hidroxi-2-hidroxi-metil-2-metil-2H-cromeno (10)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012
Lactonas sesquiterpénicas	 <p>Caleína A (11)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012
	 <p>Caleína C (12)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012
	 <p>Calealactona C (13)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012
Derivado del ácido caféico	 <p>Ácido 3,5-dicafeoilquínico (14)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012

Tabla 1. Metabolitos aislados de *B. cavanillesii* (Continuación).

Categoría	Nombre y estructura	Fuente
Cumarina	 <p style="text-align: center;">Herniarina (15)</p>	Escandón-Rivera, <i>et al.</i> , 2012

1.5. Antecedentes farmacológicos.

Los usos médicos de *B. cavanillesii* se han reportado desde 1894 en los Anales del Instituto Médico Nacional. Se realizó un estudio inicial para conocer si la planta servía como tónico y tenífugo para tratar las fiebres palúdicas, finalmente se registra que la planta carecía de esas propiedades pero no era tóxica (Anales del INM, 1905). En 1907 se documentaron varias investigaciones clínicas donde se reporta que las gotas de tintura de la planta son eficaces como agente aperitivo y no como eupéptico, y en otro ensayo clínico se logró observar que también aliviaban de manera moderada los trastornos dispépticos (Anales del INM, 1907). Para 1908 se reportó que el extracto fluido de la planta es capaz de mejorar el apetito de un paciente anoréxico, mejoró a un paciente convaleciente de pleuresía y fue capaz de disminuir la atonía gástrica además de mejorar notablemente la gastralgia (Anales INM, 1908).

En 2009, Palacios demostró la inocuidad del extracto íntegro total (CH₂Cl₂-MeOH) de acuerdo a los criterios del método de Lorke, ya que hasta la dosis de 5 g/kg no se observó efecto alguno en ratones. También, Palacios estableció el potencial antinociceptivo de este mismo extracto en los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal, lo que confirmó la presencia de compuestos antinociceptivos en la planta. Por otra parte, también se establecieron las propiedades gastroprotectoras del extracto íntegro total, *in vivo* utilizando el modelo de lesiones inducidas con etanol absoluto en ratas (en un rango entre 10 y 300 mg/kg). El efecto fue dosis dependiente y la DE₅₀ calculada para el extracto orgánico en este modelo fue de 30 mg/kg. Posteriormente, fue evaluada la actividad anti-*Helicobacter pylori* del extracto íntegro, el aceite esencial y la

desmetilisoencecalina (**3**), compuesto mayoritario de la especie, los cuales inhibieron de manera significativa el crecimiento de la bacteria. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) fueron de 2.5, 20, y 10 µg/mL, respectivamente, lo que permitió corroborar la eficacia atribuida a la planta para aliviar la gastritis y padecimientos relacionados.

Las propiedades antiespasmódicas del aceite esencial, la infusión y el extracto orgánico fueron evaluadas en la prueba de tránsito intestinal con carbón activado en ratones. Los tres extractos provocaron la disminución del tránsito del carbón de manera dependiente de la dosis (Palacios, 2009). La desmetilisoencecalina (**3**) también fue evaluada encontrándose que actúa como un agente espasmolítico de la planta.

La actividad antibacteriana también fue evaluada y se utilizó el método de difusión en agar sobre una batería de bacterias gram positivas y negativas. Tanto el aceite esencial como el extracto orgánico presentaron una actividad moderada solamente contra la bacteria *Bacillus subtilis* a las concentraciones de 750 y 1000 µg/mL.

En 2012, Escandón-Rivera y colaboradores demostraron que la infusión de *B. cavanillesii* posee propiedades hipoglucemiantes y antihiperoglucémicas, ya que fue eficaz *in vivo* para controlar los niveles de glucosa en ayunas y posprandial en ratones diabéticos, además de inhibir de manera significativa la actividad de las enzimas α-glucosidasas *in vitro* (Escandón-Rivera, *et al.*, 2012).

Finalmente, se evaluaron los compuestos mayoritarios de *B. cavanillesii* en ensayos de tipo agudo y de tolerancia a la sacarosa. Los resultados de estos ensayos permitieron establecer los efectos antihiperoglucémicos e hipoglucemiantes de la desmetilisoencecalina (**3**) y de las caleínas A (**11**) y C (**12**) (Escandón-Rivera, *et al.*, 2012).

2. OBJETIVOS.

- 2.1. Debido a las propiedades antidiabéticas demostradas para el extracto orgánico y la infusión de *B. cavanillesii*, como primer objetivo de este trabajo es realizar las evaluaciones farmacológicas pertinentes para establecer las propiedades hipoglucemiantes y antihiper glucémicas del aceite esencial, que no han sido reportadas a la fecha.
- 2.2. El aceite esencial de *B. cavanillesii* no ha sido analizado para conocer la composición química total del mismo, por lo tanto, el segundo objetivo de este proyecto es identificar y caracterizar a los componentes presentes en la esencia mediante su análisis por CG-EM y el cálculo de sus índices de retención, así como determinar el porcentaje relativo de cada uno de los componentes presentes en la esencia a partir del perfil cromatográfico obtenido.
- 2.3. Adicional al perfil cromatográfico generado en el objetivo anterior, y con la finalidad de generar una prueba de identidad química de utilidad para la identificación de los marcadores principales en el aceite, también se plantea generar el perfil por cromatografía en capa delgada de la esencia.
- 2.4. Finalmente, debido a que aún no han sido identificados y caracterizados los COV de la planta, como último objetivo de esta investigación, se pretende llevar a cabo su identificación y caracterización por CG, utilizando el método microextacción en fase sólida (MEFS).

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

3.1. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN-¹H) y de Carbono-13 (RMN¹³C) se realizaron en un aparato Unity Inova marca Varian, el cual operó a una frecuencia de 400 MHz para RMN-¹H y 100 MHz para RMN-¹³C. Se utilizó CDCl₃ como disolvente y los desplazamientos químicos [(δ , ppm)] se refieren al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se utilizó el programa MestreNova® para el análisis de los espectros de RMN monodimensionales y bidimensionales (versión 9). Estos análisis fueron realizados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

3.2. Procedimientos generales.

Los análisis cromatográficos por capa delgada (CCD) y a nivel preparativo (CCDP) se realizaron sobre placas de aluminio y de vidrio, respectivamente, recubiertas de gel sílice (60 F₂₅₄ Merck KGaA, Alemania) de diferentes dimensiones, y se utilizó como sistema de elución, tolueno-hexano-acetato de etilo (5:4:1). Como agentes reveladores se emplearon dos soluciones cromógenas: sulfato cérico amoniacal y anisaldehído [Tabla 2], seguido de calentamiento (110°C aprox.) para desarrollar el color. Adicionalmente las placas se visualizaron con una lámpara de luz UV (λ de onda corta 254 nm; λ de onda larga 355 nm).

Tabla 2. Composición de los agentes reveladores utilizados.

Agente Revelador	Composición	Referencia
Sulfato cérico amoniacal	-Sulfato cérico amoniacal 12g	
	-Ácido sulfúrico 22.5 mL	
	-Hielo 350 g	
Anisaldehído	-Anisaldehído 0.5 mL	EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0
	-Ácido acético glacial 10.0 mL	
	-Metanol 85.0 mL	
	-Ácido sulfúrico 5.0 mL	

3.3. Material vegetal.

Un lote de la planta de *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray utilizada en el presente estudio, fue recolectado en Yecapixtla en el Estado de Morelos, en el mes de marzo de 2013. La clasificación botánica y recolección de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye Boettler, investigador del Instituto de Biología, UNAM. Un ejemplar de referencia (Bye & Linares 2764) se depositó en el Herbario Nacional (MEXU) del mismo Instituto.

Para este estudio se utilizaron las partes aéreas secas de *Brickellia cavanillesii*, y se realizó su fragmentación en un Molino de cuchillas THOMAS-Wiley Modelo 4.

3.4. Obtención y análisis del aceite esencial de *B. cavanillesii* y de estándares.

En un matraz bola de 1000 mL se colocaron 50 gramos del material vegetal y 500 mL de H₂O_d. Se utilizó un aparato Clevenger y se llevó a cabo el proceso de hidrodestilación por un periodo de 2 h, el hidrodestilado (75 mL) se recolectó en un matraz Erlenmeyer que se encontraba dentro de un baño de hielo. Posteriormente el hidrodestilado se sometió a un proceso de reparto con CH₂Cl₂ grado HPLC (3 X 75 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, y el disolvente fue eliminado por evaporación in vacuo a 30 °C, generándose un líquido amarillo viscoso.

3.4.1. Aislamiento del curcumeno (28) y espatulenol (38) de la esencia.

El aislamiento de curcumeno (28) y espatulenol (38), se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa delgada nivel preparativo (CCDP), utilizando placas de vidrio de gel sílice y 30 mg de esencia disuelta en 500 µL de CH₂Cl₂. La placa se colocó en una cámara saturada con la mezcla de elución Tolueno-Hexano-AcOEt (5:4:1), una vez finalizado el proceso de elución se dejó evaporar el disolvente de la placa. A partir de este procedimiento se obtuvieron 8.3 mg de espatulenol (38) y 7.0 mg de curcumeno. (28).

Espatulenol (38): Líquido incoloro. RMN-1H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.45 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-7b), 0.47 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-1a), 1.06 (3H, s, H-8), 1.07 (3H, s, H-9), 1.30 (3H, s, H-11), 4.68 (1H, s, H-10a), 4.71 (1H, s, H-10b). RMN-13C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.6 (C-8), 20.5 (C-1), 24.9 (C-2), 26.3 (C-11), 26.9 (C-5), 27.7 (C-1a), 28.9 (C-9), 30.1 (C-7b), 39.0 (C-3), 41.9 (C-6), 53.6 (C-4a), 54.6 (C-7a), 81.2 (C-7), 106.5 (C-10), 153.8 (C-4).

Curcumeno (28): Líquido incoloro. RMN-1H (400 MHz, CDCl₃) δ 1.21 (d, J = 7 Hz, 3H), 1.53 (s, 3H), 1.60-1.67 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.80–1.95 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.55–2.65 (m, 1H), 5.10 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 7.8 Hz, 2H). RMN-13C (100 MHz, CDCl₃) δ 17.6, 20.9, 22.4, 25.7, 26.1, 38.5, 39.0, 124.6, 126.9, 129.0, 131.3, 135.1, 144.6.

3.4.2. CG-EM.

Para la caracterización de los componentes presentes en el aceite esencial, se empleó un cromatógrafo de gases marca Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas LECO Pegasus 4D. La columna utilizada fue una DB-5 (5% Fenil-metilsilicona; 10 m x 0.18 mm, 0.18 μ m de espesor de película). El programa de temperatura del horno fue de 40°C (3 min), 20°C/min hasta 300°C (5 min). Se empleó Helio como gas acarreador (Praxair, grado 5.0, ultra alta pureza) con una velocidad de 1 mL/min. La temperatura del inyector se estableció en 300 °C modo "splitless", la de la línea de transferencia fue de 250°C y la de la fuente de ionización de 200°C. Los análisis se realizaron por la técnica de impacto electrónico a 70 eV, utilizando el modo de barrido total del espectro de 45 a 500 m/z para la identificación de iones y lograr la caracterización de los componentes.

Los analitos presentes en la esencia se identificaron mediante el cálculo computacional de sus índices de retención (software Chroma TOF[®]), utilizando una serie homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₂₄) y mediante el análisis de cada uno de los espectros de masas, utilizando la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST) en conjunto con datos descritos en la literatura.

3.4.3. MEFS con espacio de cabeza.

Los compuestos orgánicos volátiles fueron obtenidos por el método de MEFS en donde se emplearon cuatro fibras de diferente polaridad: Divinilbenceno/Carboxeno en Polidimetilsiloxano (DVB/CAR-PDMS 50/30 μ m), Polidimetilsiloxano (PDMS 100 μ m), Carboxeno/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS 75 μ m) y Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB 65 μ m). Las fibras se acondicionaron durante 2 h previas al experimento en un puerto de inyección split/splitless de CG a 250 °C.

Se utilizaron 40 mg de material vegetal, los cuales fueron introducidos en un vial con tapón oradado y membrana de silicona, enseguida se agregaron 500 mg de NaCl y 15 mL de agua grado HPLC, la mezcla se agitó con un agitador magnético a 125 rpm. Una vez sujeto el vial con pinzas para soporte se introdujo la fibra a un espacio de 2 cm del volumen de la mezcla (espacio de cabeza) por un tiempo de exposición de 15 min. Luego del tiempo establecido, las fibras fueron retiradas y colocadas en el inyector del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas, para la desorción de las muestras. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.5. Evaluación de la actividad antidiabética del aceite esencial de *B. cavanillesii*.

Para realizar los ensayos de la actividad antidiabética, todos los experimentos se manejaron conforme a la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manipulación de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999), manteniendo a los animales con acceso libre al agua y alimento. Se utilizaron un total de 80 ratones macho de la cepa ICR con un peso entre 20-30 g (40 ratones para el ensayo de la actividad hipoglucemiante y 40 ratones para la actividad antihiper glucémica), los animales se dividieron en cinco grupos para cada experimento (8 ratones para cada grupo), los cuales se mantuvieron en ayuno de 8 h antes de realizar las evaluaciones, teniendo acceso libre al agua.

La recolección de las muestras sanguíneas se realizó a partir de la vena caudal de los animales, mediante una pequeña incisión al final de la cola. La

glucemia se determinó mediante por el método enzimático de la glucosa oxidasa, utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra 2™, Jonhson-Jonhson Denvene, MA, USA).

La variación porcentual de glucemia se calculó de acuerdo a la siguiente expresión matemática:

$$\%Variación\ de\ glucemia = \frac{(G_t - G_i)}{G_i} (100)$$

Donde Gi es la glucosa al tiempo cero (glucosa basal) y Gt es el valor de glucemia a los diferentes tiempos de muestreo. El porcentaje de variación de la glucemia se graficó con respecto al tiempo de medición. Las gráficas, análisis de varianza y pruebas t de Dunnett de los resultados de los estudios farmacológicos se analizaron con el programa computacional GraphPad Prism Versión 5.0.

La diabetes mellitus tipo II, se indujo en los ratones normoglucémicos mediante la administración inicial de una dosis de Nicotinamina Adenina Dinucleótido (NAD) de 50 mg/kg. Transcurridos 15 min, se realizó la administración de una dosis única de 130 mg/kg de estreptozotocina (STZ) disuelta en una solución amortiguadora de citratos 0.1 M (pH= 4.5). Tanto NAD como STZ fueron administradas vía intraperitoneal (0.1 ml/10 g peso).

Los niveles de glucosa se determinaron siete días después de la administración de la STZ, y aquellos que presentaron niveles de glucosa sanguínea mayores a 140 mg/dL fueron incluidos en el experimento.

3.5.1. Efecto hipoglucemiante agudo en animales normoglucémicos y diabéticos.

En ensayos independientes (ratones normoglucémicos e hiperglucémicos) se administraron a tres de los cinco grupos los tratamientos (31.6, 100 y 316 mg/kg) del aceite esencial de *B.cavanillesii*. Los dos grupos restantes fueron los controles: vehículo y positivo. El vehículo fue administrado con Solución Salina Isotónica (SSI) (0.9%) y el control positivo con glibenclamida (15 mg/kg). Los tratamientos y controles se mezclaron junto con Tween 80® al 0.05% como agente surfactante y su administración fue vía oral (0.2 ml/10g peso). Los niveles de

glucosa sanguínea se midieron a los tiempos 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 h posteriores a la administración de los tratamientos.

3.5.2. Efecto sobre la tolerancia a la sacarosa en animales normoglucémicos y diabéticos.

Tres de los cinco grupos de ratones normoglucémicos o diabéticos, recibieron las diferentes dosis del preparado de prueba (31.6, 100 y 316 mg/kg). Los dos grupos restantes corresponden a los controles vehículo y positivo. El vehículo consistió en SSI (0.9%) y el control positivo fue acarbossa (5 mg/kg). Una vez transcurridos 30 min se administraron a todos los animales una solución de sacarosa (3 g/kg) vía oral, finalmente los niveles de glucosa sanguínea se midieron a los 0, 30, 60, 90, 120, 180 min posteriores a la administración de la carga de la sacarosa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La especie vegetal *B. cavanillesi* fue seleccionada para este estudio considerando el criterio etnomédico ya que la planta es ampliamente utilizada y comercializada para tratar la gastritis, afecciones del estómago, diarrea, y diabetes. La actividad antidiabética de la planta ha sido confirmada a partir de los diversos ensayos farmacológicos realizados sobre el extracto acuoso y compuestos puros. Sin embargo, el aceite esencial no ha sido aún evaluado para establecer su potencial antidiabético y tampoco han sido identificados y caracterizados sus componentes principales. Considerando también el hecho de que las esencias, en general, han demostrado tener destacadas propiedades funcionales en beneficio de la salud del hombre, se determinó realizar los ensayos conducentes a determinar sus propiedades hipoglucemiantes y antihiper glucémicas. De manera adicional, se realizó un análisis por MEFS de la planta para conocer los COV de la misma.

Este capítulo se divide en dos partes. En la primera se describen y discuten los resultados obtenidos de las evaluaciones farmacológicas conducentes a determinar el potencial antidiabético del aceite esencial. La segunda parte se presentan y discuten los resultados obtenidos de la identificación y caracterización de los componentes identificados en la esencia, por CG y CCD así como de los análisis realizados para conocer el contenido de COV en la planta.

4.1. Efecto hipoglucemiante y antihiper glucémico del aceite esencial.

Los modelos farmacológicos ampliamente descritos en la literatura para evaluar el efecto hipoglucemiante agudo y tolerancia a la sacarosa, se utilizaron para establecer el potencial antidiabético de la esencia en animales sanos e hiper glucémicos mediante la determinación de sus efectos sobre los niveles de glucosa sanguínea y considerando que una de las principales estrategias en el tratamiento de la diabetes es la reducción de los niveles de glucemia.

Para determinar el efecto hipoglucemiante agudo, se realizó el ensayo descrito en la parte de desarrollo experimental (inciso 3.5.1.). Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 4a y 4b. En la Figura 4a se observa que en

animales sanos, el aceite esencial presenta un efecto hipoglucemiante moderado a las dosis de 100 y 316 mg/kg. Por otra parte la esencia no causa un efecto hipoglucemiante significativo en animales hiperglucémicos (Figura 4b). El efecto moderado que se observa en la prueba con animales normoglucémicos, puede deberse a la presencia del cromeno desmetilisoencecalina (**3**), ya que se ha reportado que este compuesto tiene una actividad hipoglucemiante significativa a las dosis de 10 y 31.6 mg/Kg al evaluarlo en ratones sanos (Escandón-Rivera, *et al.*, 2012).

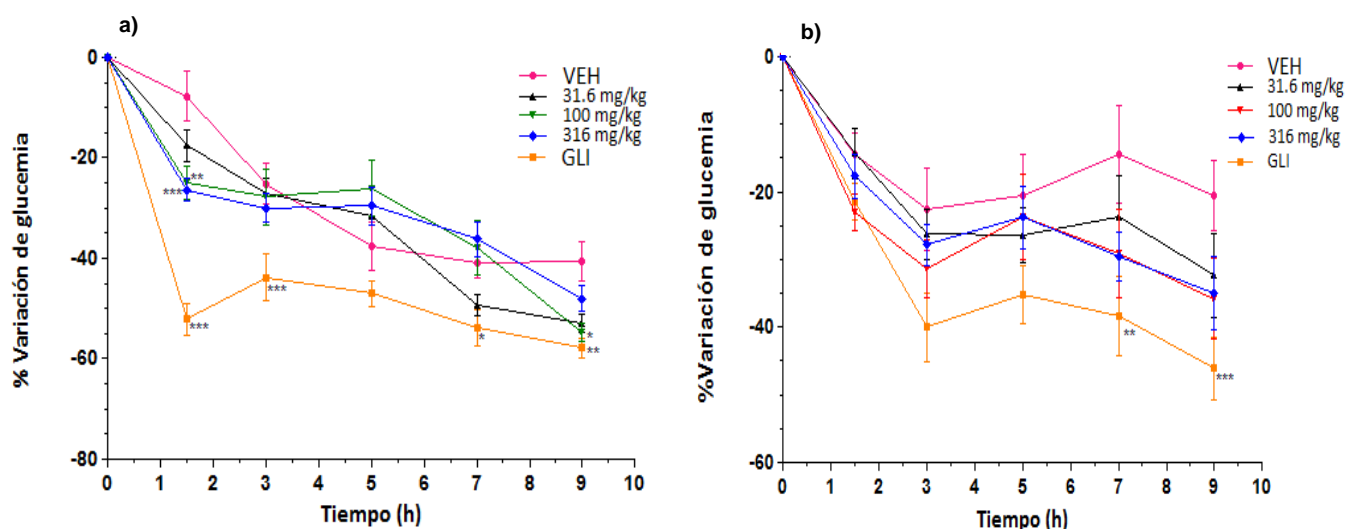


Figura 4. Efecto del aceite esencial de *Brickellia cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre en ratones normoglucémicos **a)** y diabéticos **b)**. Cada punto representa la media de seis determinaciones (n=6) ± EEM. Las diferencias estadísticamente significativa fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba t de Dunnett $p < 0.05$

Por lo que respecta a la actividad antihyperglucémica de la esencia los resultados se muestran en las Figuras 6a y 6b. En la Figura 6a se observa que el aceite esencial a las dosis más altas (100 y 316 mg/kg) inhiben de manera significativa ($p < 0.05$) el pico posprandrial en animales sanos y este efecto se observa también en los ratones hiperglucémicos a las tres dosis evaluadas (Figura 6b). Cabe mencionar que en este último caso, el efecto observado con la dosis de 316 mg/kg es similar al inducido por la acarbosa en animales hiperglucémicos.

Es probable que el efecto antihiper glucémico observado se deba una vez más a la presencia del compuesto desmetilisoencecalina (**3**) debido a que se ha reportado que este metabolito tiene un efecto significativo al evaluarlo en una prueba de tolerancia a la sacarosa a las dosis de 5.6, 10 y 31.6 mg/Kg, tanto en ratones normoglucémicos como en diabéticos (Escandón-Rivera, *et al.*, 2012).

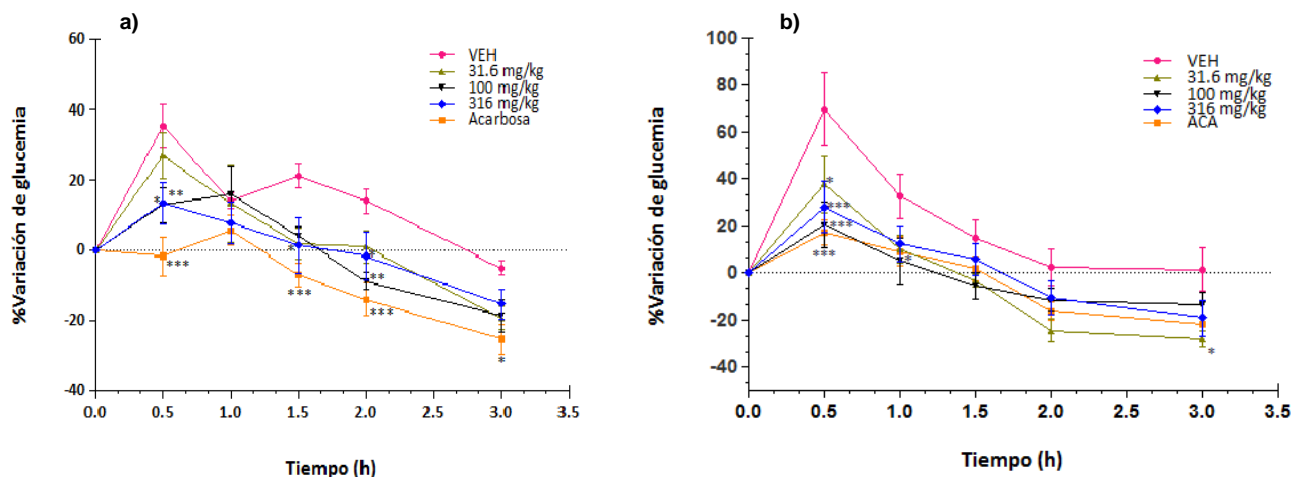


Figura 5 Efecto del aceite esencial de *Brickellia cavanillesii* en los niveles de glucosa en la sangre durante la prueba de tolerancia a la sacarosa (3g/kg) en ratones normoglucémicos **a)** y diabéticos **b)** Cada punto representa la media de seis determinaciones (n=6) ± EEM. Las diferencias estadísticamente significativa fueron calculadas por una ANOVA seguida por la prueba t de Dunett P< 0.05

4.2. Análisis del aceite esencial por CG-EM.

El aceite esencial utilizado en este estudio se obtuvo por hidrodestilación, utilizando un equipo Clevenger, el cual es el recomendado por la FHEUM. La cantidad promedio de aceite obtenido en tres réplicas utilizando 50 g de muestra/500mL de H₂O_d y 2h se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Rendimientos de la preparación del aceite esencial*

Masa de materia vegetal (g)	Masa de esencia (g)	Rendimiento (%)
50.0434	0.2235	0.45

*Promedio de tres repeticiones

Para la identificación de los componentes presentes en el aceite se seleccionó a la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM). El funcionamiento de la espectrometría de masas se basa en la capacidad de ionización que presenta una molécula orgánica en estado de vapor, al ser bombardeada por un haz de electrones con una energía aproximada de 70 eV. La molécula absorbe parte de esa energía utilizándola para desprenderse de un electrón, transformándose así en un ión molecular con carga positiva y un electrón desapareado. La energía adicional del haz de electrones de bombardeo puede disiparse en la ruptura de enlaces del ión molecular, produciéndose nuevos fragmentos de iones positivos de menor masa y de radicales neutros. El conjunto de máximos espectrales que corresponden a cada uno de los iones fragmentados de la molécula original, da lugar al espectro de masas a través del cual se obtiene información sobre la fórmula molecular ya que determina de manera exacta su masa atómica. De esta manera, se obtuvieron los espectros de masas de cada uno de los compuestos presentes en la esencia y se realizó la comparación del patrón de fragmentación correspondiente al ión molecular, el pico base y los fragmentos más característicos con los descritos en literatura y bases de datos especializadas (Adams, 1989; Adams, 1995, NIST, 2014). También, se obtuvieron los espectros de masas en las mismas condiciones de trabajo de los estándares comerciales: α -Bisabolol (**44**) β -Cariofileno (**24**), óxido de cariofileno (**39**), desmetilisoencecalina (**3**), y también de aquellos compuestos previamente aislados del aceite esencial: espatulenol (**38**) y curcumeno (**28**). Estas sustancias fueron utilizadas como elementos de referencia para establecer el orden de elución de los distintos compuestos, y poder realizar su identificación.

El cromatograma iónico total obtenido del aceite esencial de *B. cavanillesii* se muestra en la Figura 6 y los compuestos que se detectaron son enlistados en función de su orden de elución en la columna DB-5. A partir de esta primera aproximación se detectaron 31 compuestos en las proporciones porcentuales presentadas en la Tabla 4.

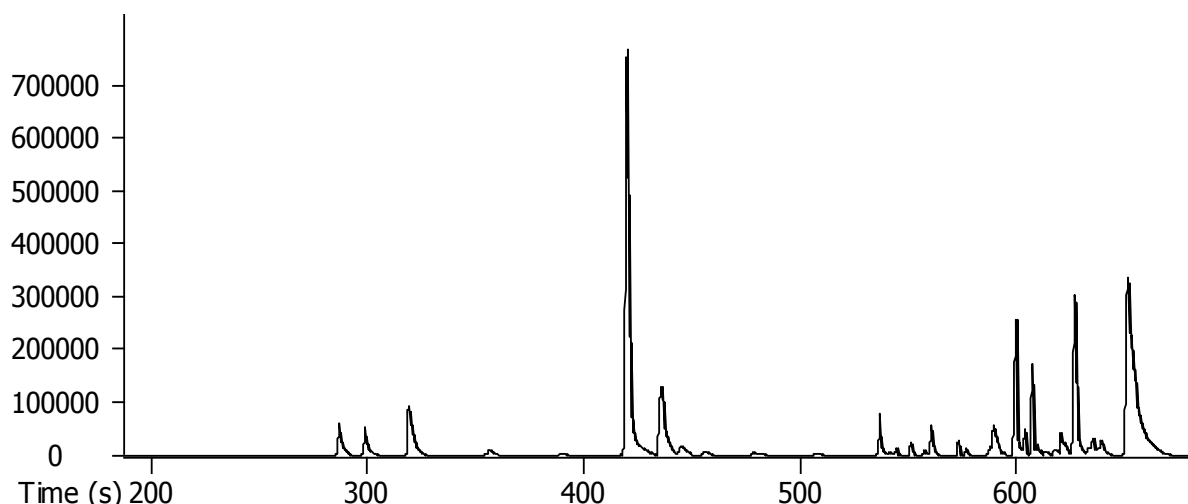


Figura 6. Cromatograma iónico total obtenido (CG-EM) del aceite esencial de *B. cavanillesii*. Las condiciones de trabajo se reportan en el capítulo de desarrollo experimental.

La información obtenida mediante CG-EM no es suficiente para establecer la caracterización total de los componentes presentes en la esencia, sin embargo se puede realizar una aproximación comparando el tiempo de retención de cada compuesto identificado con aquellos de sustancias de referencia conocidas. Los tiempos de retención muy cercanos o iguales entre un componente y una referencia (comercial o aislada) indican que podría tratarse del mismo compuesto. Aunque teóricamente el tiempo de retención de una molécula es una constante si se utilizan las mismas condiciones de trabajo, éstas son difícilmente reproducibles y suelen variar debido a que el tiempo de retención depende de la temperatura, la velocidad de flujo del gas transportador e incluso de la complejidad de la muestra. Por esta situación se utilizó como segundo sistema de identificación a los índices de retención (*IR*) obtenidos para cada uno de los componentes. Esta consideración se hizo debido a que los *IR* se ven afectados en menor medida por los factores anteriormente expuestos, además de que se emplean para reducir las fluctuaciones de los tiempos de retención, tanto por las condiciones del análisis

como por la composición de la muestra. Para obtener los índices de retención de los compuestos y los estándares, se utilizó la columna de mediana polaridad DB-5.

Los *IR*, propuestos inicialmente por Kováts (Van Den Dool, 1963), permiten la identificación de componentes de una mezcla problema con respecto a una serie homóloga de *n*-parafinas, basándose en una comparación entre la posición del pico de un compuesto problema y los picos de las *n*-parafinas anterior y posterior de la serie. Por definición, el índice de retención de Kováts para una *n*-parafina es igual a cien veces el número de átomos de carbono que presenta, independientemente de las columnas o condiciones cromatográficas utilizadas.

Aplicando estos dos sistemas de caracterización, así como el uso de estándares se pudo detectar primeramente, la presencia de monoterpenos, representando el 19.97 % del total de la composición de la esencia, de los cuales el alcanfor (**20**) es el que se encontró en una mayor proporción (12.47%). Los sesquiterpenos se encontraron en mayor proporción (55.67 %) y el contenido de ellos se concentró principalmente en el curcumeno (**28**) con un 7.10 %, el espatulenol (**38**) con una proporción de 12.95%, y óxido de cariofileno (**39**) con un 13.0 %. Sin embargo, de todos los compuestos identificados, el cromeno desmetilisoencecalina (**3**) es el que resultó ser el compuesto mayoritario (19.92%). La presencia en grandes proporciones del cromeno (**3**) es importante en primer lugar, desde un punto de vista del control de calidad de la especie, ya que es uno de los marcadores de *B. cavanillesii* (Escandón-Rivera, *et al.*, 2012). Por otra parte Escandón-Rivera y colaboradores demostraron los efectos hipoglucemiante y antihiper glucémico de este metabolito (Escandón-Rivera, *et al.*, 2012) y también establecieron mediante un ensayo *in vitro*, el efecto moderado del cromeno (**3**) sobre las enzimas α -glucosidasas, lo que se encuentra en armonía con la actividad farmacológica observada para el aceite esencial.

Tabla 4. Composición química del aceite esencial de *B. cavanillesii*

No.	Compuesto	IR ^a	Contenido (%) ^b	Identificación ^c
16	α -Pinoeno	993	1.19	IR,EM
17	Camfeno	1010	1.31	IR,EM
18	β -Pinoeno	1048	1.78	IR,EM
19	Eucaliptol	1116	0.60	IR,EM
20	Alcanfor	1241	12.47	IR,EM
21	Pinocarvona	1266	0.51	IR,EM
22	1,2,3-Trimetilciclopenteno	1277	2.11	IR,EM
23	Isopinocanfon	1279	2.11	IR,EM
24	β-Cariofileno	1529	2.50	IR,EM,Ref
25	β -Cubebeno	1542	0.15	IR,EM
26	α -Ocimeno	1568	0.31	IR,EM
27	Germacreno D	1585	0.33	IR,EM
28	Curcumeno	1592	7.10	IR,EM,Ref
29	α -Selineno	1612	0.33	IR,EM
30	Germacreno A	1631	1.10	IR,EM
31	δ -Cadineno	1632	1.09	IR,EM
32	<i>cis</i> - α -Farneseno	1643	0.64	IR,EM
33	Calameneno	1645	0.64	IR,EM
34	α -Calacoreno	1672	0.02	IR,EM
35	Hediacariol	1676	0.26	IR,EM
36	Nerolidol-E	1684	3.01	IR,EM
37	Óxido de aromandreno-(2)	1698	0.22	IR,EM
38	Espatulenol	1713	12.95	IR,EM,Ref
39	Óxido de Cariofileno	1715	13.00	IR,EM,Ref
40	Carotol	1738	2.83	IR,EM
41	Epóxido de Humuleno II	1746	0.54	IR,EM
42	τ -Cadinol	1781	1.33	IR,EM
43	β -Eudesmol	1800	4.28	IR,EM
44	α-Bisabolol	1829	1.34	IREM,Ref
45	Óxido de Ledeno II	1841	2.05	IR,EM
3	Desmetilisoencecalina	1881	19.92	IR,EM,Ref
Total identificados			98.05	
	Compuestos hidrocarbonados		20.62	
	Compuestos oxigenados		77.38	
	Monoterpenos hidrocarbonados		4.28	
	Monoterpenos oxigenados		15.69	
	Sesquiterpenos hidrocarbonados		13.91	
	Sesquiterpenos oxigenados		41.76	
	Otros compuestos oxigenados		19.92	
	Otros compuestos hidrocarbonados		2.43	

^a Índice de retención experimental columna polar (DB5)

^b Porcentajes de área de cada uno de los compuestos.

^c IR, índices de retención; EM, Espectro de masas; Ref, estándares comerciales o aislados.

4.2.2. Análisis por Cromatografía en capa delgada de la esencia.

Finalmente, se obtuvo también un cromatograma en capa delgada de la esencia y estándares seleccionados, con el fin de generar una prueba de identidad rápida, cualitativa y complementaria a la CG. Se utilizaron cromatoplasmas de gel de sílice de HTPLC (High Performance Thin Layer Chromatography, por sus siglas en inglés) y como agente revelador anisaldehído. Los estándares seleccionados fueron los mismos que se emplearon para la CG: **24**, **28**, **38**, **39**, **44** y **3** y los resultados obtenidos se pueden ver en la Figura 8. En esta imagen se pueden identificar solamente algunos de los estándares utilizados. Primeramente, no se detecta la presencia de α -bisabolol (**44**), ya que como se observó por CG, se encuentra en muy baja proporción. También, no existe diferencia en la elución, entre el curcumeno (**28**), que presenta un color violeta intenso y el β -cariofileno (**24**), que presenta un color rosa tenue, esto debido a que presentan el mismo factor de retención, por lo cual no es posible identificarlos de manera inequívoca por CCD en el aceite esencial. Los compuestos fácilmente distinguibles fueron el cromeno (**3**) que se detectó en un tono amarillo muy tenue, el óxido de cariofileno (**39**) que presenta una mancha fucsia brillante y finalmente el espatulenol (**38**) que reveló en un tono azul oscuro.

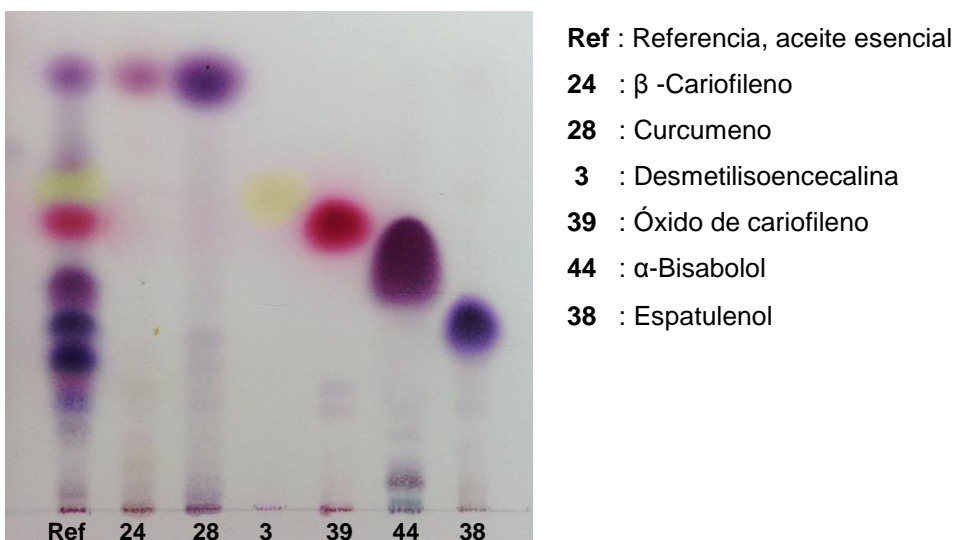


Figura 8. Cromatoplasca por HPTLC del aceite esencial, e identificación de sus estándares. Mezcla de elución: Tolueno-Hexano-Acetato de etilo (4:6:1). Concentración ensayada 1 μ g/mL.

4.2.3. Caracterización de los COV por MEFS.

Para realizar la identificación y caracterización de los compuestos orgánicos volátiles (COV) directamente de las partes aéreas secas de *B. cavanillesii* se utilizó el método de microextracción en fase sólida (MEFS), en combinación con la CG-EM. La MEFS es un método rápido y sencillo, de bajo precio y no utiliza disolventes, ni tratamientos complejos para obtener la muestra, además de que es adecuada para la detección de analitos en bajas concentraciones (de hasta ppb) (Yang, *et al.*, 2013). Presenta otras ventajas inherentes como que permite la automatización, y puede aplicarse tanto al análisis de muestras líquidas como gaseosas. Con la MEFS no es necesaria la extracción total de los analitos o el equilibrio perfecto, pero sí, que sea consistente el tiempo de muestreo, la temperatura, la polaridad de la fibra y la fuerza iónica. La MEFS ha demostrado ser una técnica de monitoreo muy útil en la industria alimenticia, de aromatizantes y bebidas, así como en el sector ambiental. Actualmente también se está utilizando como complemento al análisis de los aceites esenciales o alternativa al estudio de los mismos (Balasubramanian, *et al.*, 2011; Zhang, *et al.*, 2010; Bicchi, *et al.*, 2011).

El dispositivo de MEFS más utilizado es el fabricado por Supelco y consiste en una fibra de sílice fundida, recubierta por distintos polímeros, fijada a una aguja de acero inoxidable. Existen varios tipos de recubrimientos de fibras y su selección dependerá de los analitos analizados (IOFI, 2010):

- (a) Polidimetilsiloxano (PDMS): no-polar
- (b) Poliacrilato (PA): medianamente-polar
- (c) Carbowax (polietilenglycol): polar
- (d) Mezclas
 - (i) Carboxeno/PDMS
 - (ii) PDMS/divinilbenceno (DVB)
 - (iii) Carbowax/DVB

La técnica consiste en el uso de algunas de las fibras mencionadas que cuando está en contacto directo con la muestra (inmersa en una solución salina de NaCl o NaK), los analitos se reparten entre el disolvente y la fibra. Cuando la fibra esta solo en contacto con la fase gaseosa (espacio de cabeza, HS por sus siglas

en inglés) en un vial cerrado, los analitos se reparten entre el HS, la fibra y la solución. Después de un tiempo de extracción, la fibra se inserta en el inyector del cromatógrafo de gases para volatilizar a los analitos presentes en la fibra.

Con la finalidad de optimizar la extracción de volátiles presentes en las partes aéreas secas de *B. cavanillesii*, se ensayaron diferentes cantidades de NaCl (250 y 500 mg), tiempos de extracción (10, 15 y 20 min), cantidad de muestra (20 y 40 mg) y cuatro diferentes tipos de fibras (DVB/CAR en PDMS [fibra gris], PDMS [fibra roja], CAR/PDMS [Negra] y PDMS/DVB [azul]). Los resultados obtenidos después de estos ensayos permitieron determinar que 40 mg de planta, 500 mg de NaCl y 15 minutos de extracción, se obtienen resultados reproducibles.

Los resultados de los análisis por CG realizados se muestran en la [Tabla 5] y en la Figura 9. En ella se puede observar que las fibras polares (con CAR) como CAR/PDMS no se logra la identificación de la desmetilisoencecalina (**3**), un marcador muy importante de la planta, o está presente en muy baja proporción (DVB/CAR en PDMS, 2.68 %). Sin embargo, cuando la polaridad de la fibra cambia, se puede detectar en una mayor proporción como en el caso de las fibras no polares azul y roja. De las cuatro fibras utilizadas, la que permitió detectar todos los estándares utilizados, presentes en el aceite esencial de *B. cavanillesii* fue la fibra con recubrimiento PDMS, la cual podría utilizarse de manera adicional al estudio de la esencia, con la finalidad de identificar los posibles marcadores de *B. cavanillesii*.

Figura 9. CG de los compuestos volátiles de *B. cavanillesii* en las cuatro fibras analizadas **a)** DVB/CAR en PDMS **b)** PDMS **c)** CAR/PDMS y **d)** PDMS/DVB.

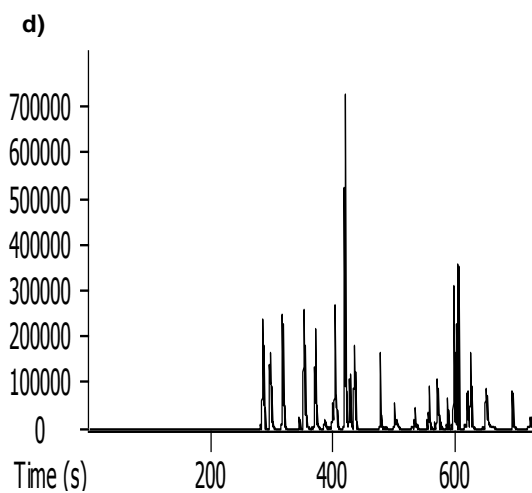
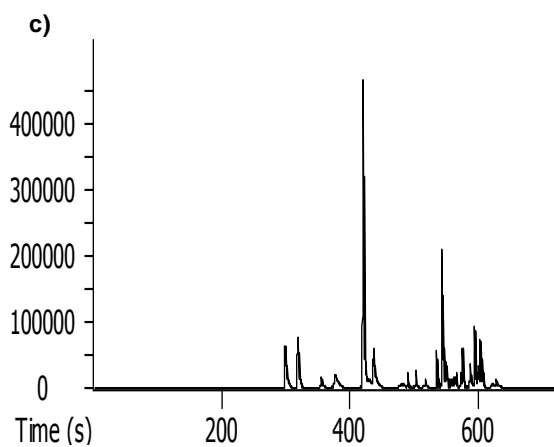
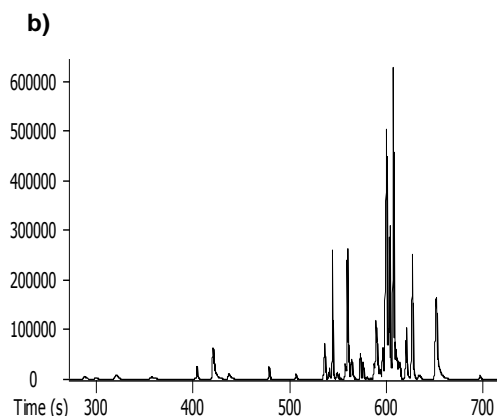
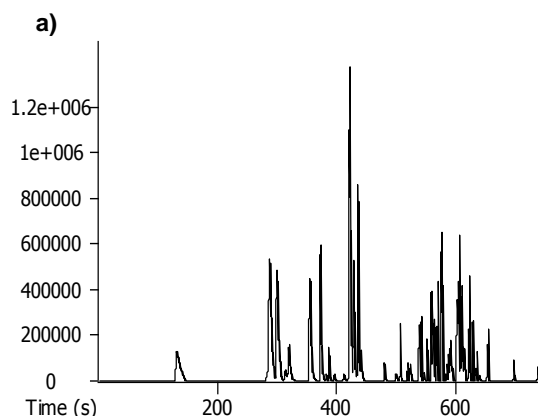


Tabla 5. Análisis por MEFS de los COV de *B. cavanillesii*

	Compuesto	IR	DVB/CAR en PDMS ^a	PDMS ^b	CAR/PDMS ^c	PDMS/DVB ^d
16	α-Pineno	996	4.25	0.44	3.55	3.19
17	Camfeno	1018	4.35	0.45	2.56	1.60
18	β-Pineno	1046	7.19	0.82	2.41	1.21
46	o-Cimeno	1109	0.95	-	-	5.45
47	D-Limoneno	1111	6.80	-	-	5.45
19	Eucaliptol	1113	1.91	0.36	2.00	5.45
48	4-Heptin-3-ol	1145	1.35	-	-	-
49	Camfenol	1222	0.19	-	-	-
20	Alcanfor	1242	4.06	1.79	9.89	5.10
21	Pinocarvona	1261	1.40	-	1.84	0.88
22	1,2,3-Trimetilciclopenteno	1277	-	0.31	2.75	1.22
23	Isopinocanfon	1278	1.16	0.29	2.75	-
50	4-Carvomentenol	1288	0.32	-	-	-
51	Isobornil formato	1381	0.32	0.10	0.22	-
52	Timol	1429	0.25	-	-	-
53	α-Cubebeno	1526	-	3.83	-	-
24	β-Cariofileno	1527	3.31	3.83	4.01	1.99
25	β-Cubebeno	1539	1.17	1.24	-	-
26	α-Ocimeno	1563	0.98	-	4.07	1.79
27	Germacreno D	1580	1.33	0.41	4.07	1.55
28	Curcumeno	1591	5.02	10.90	1.04	8.90
54	α-Zingibereno	1604	1.11	1.80	-	-
29	α-Selineno	1607	0.66	0.79	1.19	-
30	Germacreno A	1627	0.67	1.25	0.42	-
31	δ-Cadineno	1632	1.79	-	2.71	2.61
32	cis-α-Farneseno	1641	1.37	1.83	-	0.50
33	Calameneno	1639	0.33	0.81	1.42	0.88
34	α-Calacoreno	1666	0.11	0.01	-	0.08
35	Hediculariol	1678	1.36	1.22	2.18	-
36	Nerolidol-E	1682	2.68	1.97	1.61	1.94
37	Óxido de aromadendreno-(2)	1698	0.22	0.13	-	-
38	Espatuleno	1714	4.40	7.58	3.83	4.12
39	Óxido de cariofileno	1716	3.77	7.69	3.54	5.02
55	trans-Crisantemal	1723	-	7.64	14.35	1.89
40	Carotol	1738	3.15	4.38	4.00	7.00
41	Epóxido de Humuleno II	1748	0.87	0.93	-	-
56	α-Muurolol	1780	-	2.73	-	-
57	4,4-Dimetiltetraciclo-(6,3,2,0)(2,5)0(1,8)tridecan-9-ol	1782	2.90	-	2.60	3.38
42	τ-Cadinol	1783	2.90	-	-	3.31
43	β-Eudesmol	1800	1.12	3.81	2.14	5.49
58	Epóxido de Isoaromadendreno	1804	3.56	-	-	5.58
44	α-Bisabolol	1829	0.52	-	-	-
45	Óxido de Ledeno II	1843	0.56	-	-	-
3	Desmetilisoencecalina	1883	2.68	10.68	-	8.48

^aDVB/CAR en PDMS (Divinilbenceno/Carboxeno en Polidimetilsiloxano), ^bPDMS (Polidimetilsiloxano), ^cCAR/PDMS (Carboxeno/Polidimetilsiloxano) ^d,PDMS/DVB (Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno).

5. CONCLUSIONES.

-Se realizaron los estudios farmacológicos conducentes a establecer el potencial antidiabético del aceite esencial, considerando el uso popular de la planta y los estudios previos realizados con otros preparados de la especie. Los resultados obtenidos permitieron determinar a nivel preclínico las propiedades antihiperoglucémicas de la esencia.

-Se analizó el aceite esencial obtenido por hidrodestilación y se logró identificar el 98.0 % de los componentes totales de la esencia. Los resultados muestran que el cromeno (**3**), es el compuesto mayoritario (19.92%), lo que permite confirmar que es un marcador de la especie. Adicional a este compuesto, se encontraron en grandes cantidades al alcanfor (**20**) con 12.47 %), óxido de cariofileno (**39**) con 13.0 %, espatulenol (**38**) con 12.95% y curcumeno (**28**) con 7.10 %.

- Se realizó una CCD de la esencia y se pudo determinar la presencia, principalmente del curcumeno (**28**), óxido de cariofileno (**39**) y la desmetilisoencecalina (**3**), lo cual podría establecerse como una prueba de identidad química para la especie.

- Se determinó la composición de los COV por MEFS con espacio de cabeza y se pudo determinar que la mejor fibra es la PDMS, ya que permite detectar principalmente, la presencia del cromeno **3**, así como de los demás estándares utilizados.

6. BIBLIOGRAFÍA.

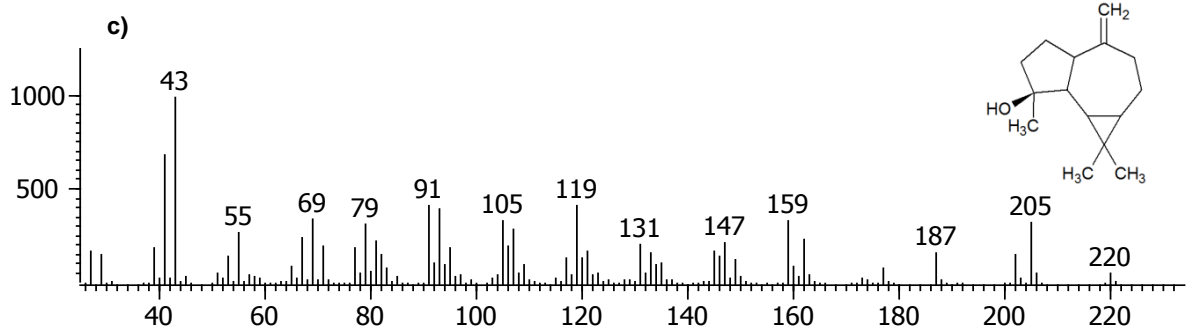
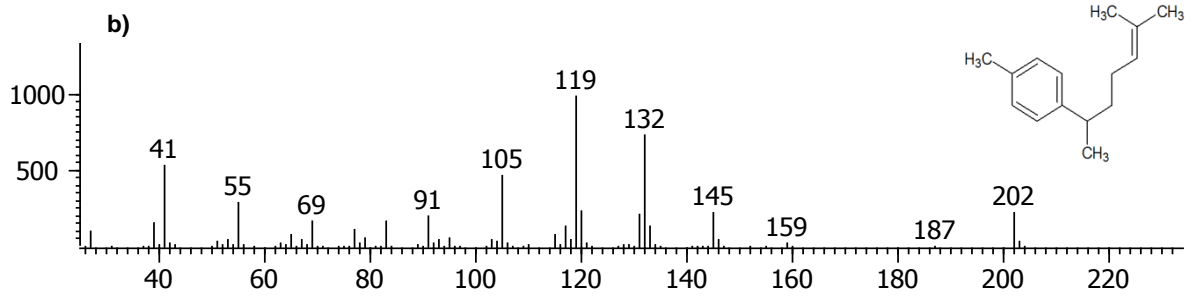
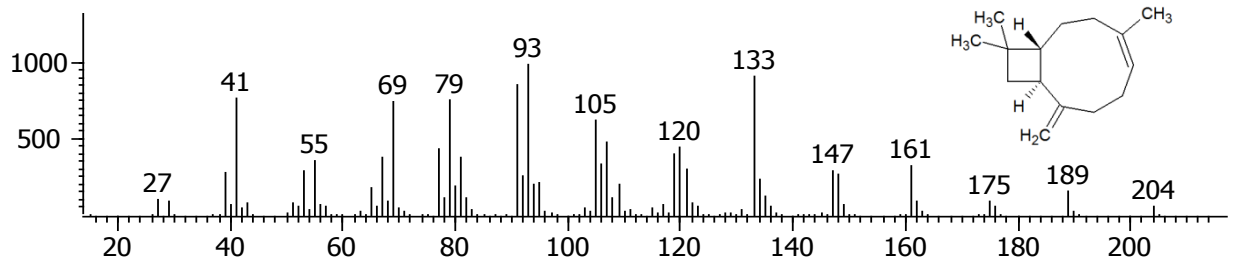
- Adams, R.P. Identification of Essential Oil by Ions Trap Mass Spectrometry. San Diego. Academic. (Ed) 1989.
- Adams, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy (Ed) 1995. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL.
- Adorjan, B., y Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 407–426.
- Amorati, R., Foti, M.C., Valgimigli, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. (2013) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 10835–10847.
- Anales del Instituto Médico Nacional, Continuación de “El estudio”. Oficina tipográfica de la secretaría de fomento (1894).
- Anales del Instituto Médico Nacional, Tomo VII; Oficina tipográfica de la secretaría de fomento. Abril (1905).
- Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo VII; Oficina tipográfica de la secretaría de fomento (1907).
- Anales del Instituto Médico Nacional. Anales DKr instituto 118. (1908).
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycemic effect used in treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 325–348.
- Arumugam, G., Manjula, P., Paari, N. (2013). A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus *Journal of Acute Disease*, 2, 196–200.
- Balasubramanian, S., Panigrahi, S. (2011). Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food Bioprocess Technology*, 4,1–26.
- Bicchi, C., Liberto, E., Matteodo, M., Sgorbini, B., Mondello, L., D’Acampora B., Costa, R., and Rubiolo, P. (2008). Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour and Fragrance. Journal*, 23, 382–391
- Bicchi, C., Cagliero, C., Rubiolo, P. (2011). New trends in the analysis of the volatile fraction of matrices of vegetable origin: a short overview. A review. *Flavour and Fragrance. Journal*, 26, 321–325
- Bruneton, Jean. Terpenos y esteroides, en: Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. Bruneton, Jean (Ed.), 2001.
- EP. European Pharmacopoeia; European Council:Published in accordance with the Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia (European Treaty Series N 50 sexta edición volumen I pp.249–252, 400
- ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Recuperado el 5 de mayo de 2014. <http://ensanut.insp.mx/>
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., Mata, R. (2012). α -glucosidase inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *Journal of Natural Products*, 75, 968–974.

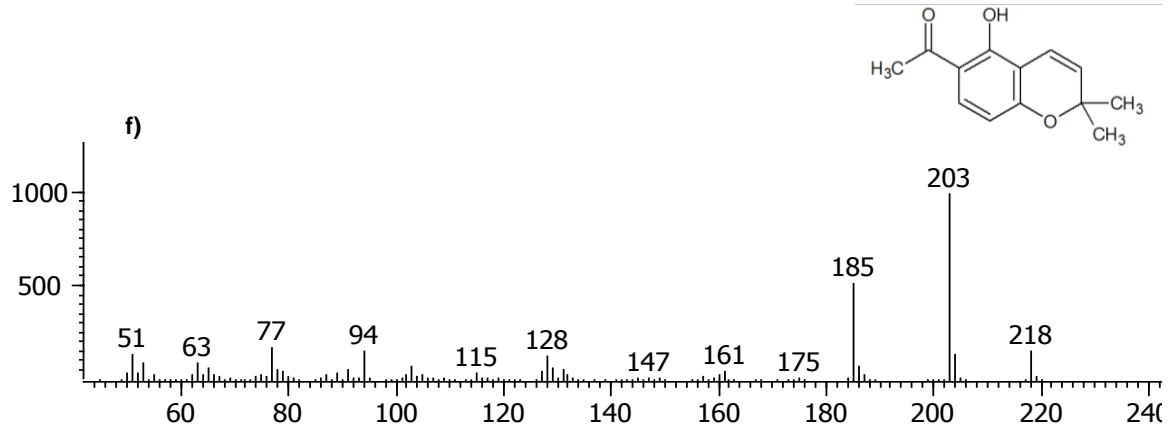
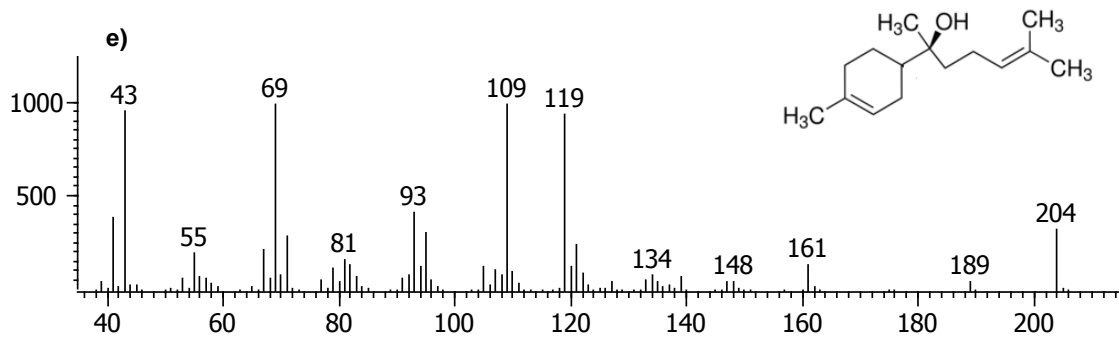
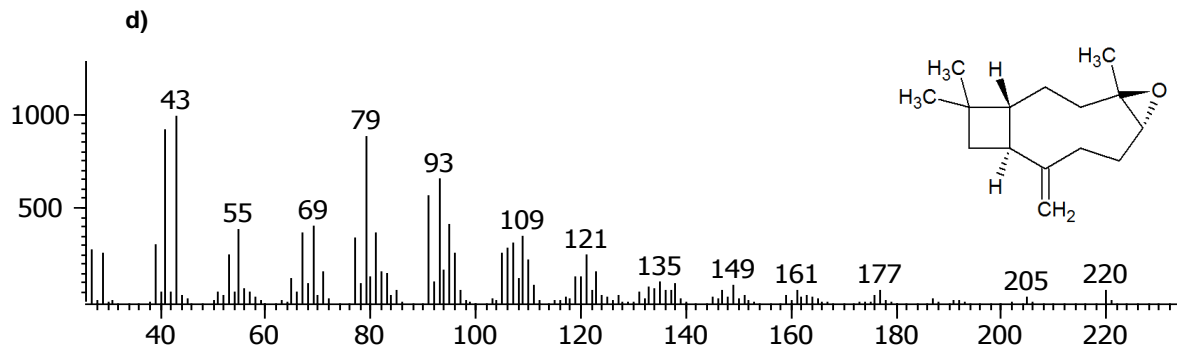
- FEHUM. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2001). Secretaría de Salud, México D.F pp. 33–35.
- Flores, S., Herrán, J. (1958). The structure of pendulin and penduletin: a new flavonol glucoside isolated from *Brickellia pendula*. *Tetrahedron*, 2, 308–315.
- Flores, S., Herrán, J. (1960). Atanasina: A new flavone from *Brickellia squarrosa* (Cav) Robinson. *Chemistry and Industry*, 12, 291.
- Franz, C.M. (2010). Essential oil research: past, present and future. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 112–113.
- Heng, M.Y., Tan, S.N., Yong, J.W., Ong, E.S. (2013). Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Trends in Analytical Chemistry*, 50, 1–10.
- Herrmann, E. Volatiles—An Interdisciplinary Approach, en: The Chemistry and Biology of Volatiles. Herrmann E., (Ed.), 2010. 1–8p.
- Hüsni, C.B., and Özek, T. Analysis of Essential Oils and Fragrances by Gas Chromatography. en: Gas Chromatography, Poole, C., (Ed.), 2012, 22, 519–529.
- IDF. Internacional de la Diabetes, ATLAS de la Diabetes de la DIF, 6° edición.
- IOFI, 2010 Working Group on Methods of Analysis. Guidelines for solid-phase micro-extraction (SPME) of volatile flavour compounds for gas-chromatographic analysis, from the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavor Industry (IOFI). *Flavour and Fragrance Journal*, (Recommended Practice).
- ISO 1709:1985. Essential oil, Analysis by Gas Chromatography on Capillary Columns- General Method.
- ISO 22972:2004, Essential oils-Analysis by Gas Chromatography on Chiral Capillary Columns-General Method.
- Johnson, L., Strich, H., Taylor, A., Timmermann, B., Malone, D., Teufel-Shone, N., Drummond, R., Woosley, R., Pereira, E., y Martínez, A. (2006). Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the Southern United States. *Phytotherapy Research*, 20, 259–255.
- Martínez-Castelao, A., Górriz, J.L., Sola, E., Morillas, C., Jover, A., Coronel, F., Navarro-González, J., De Álvaro, F. (2012). A propósito de las discrepancias entre documentos de consenso, guías de práctica clínica y normativa legal en el tratamiento de la diabetes tipo 2. *Nefrología*, 32, 419-26.
- Martínez, M. Las plantas medicinales de México. Editorial Botas, México, D.F. (1989).
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez, K., Rivero, I. (2013). Mexican antidiabetic Herbs: valuable sources of Inhibitors of α -glucosidases. *Journal of Natural Products*, 76, 468–483.
- Nizar, Y., Saad, C.D., Muller, A.L. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28, 269–279.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 58p.
- OMS. Recuperado el 5 de mayo de 2014, de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>

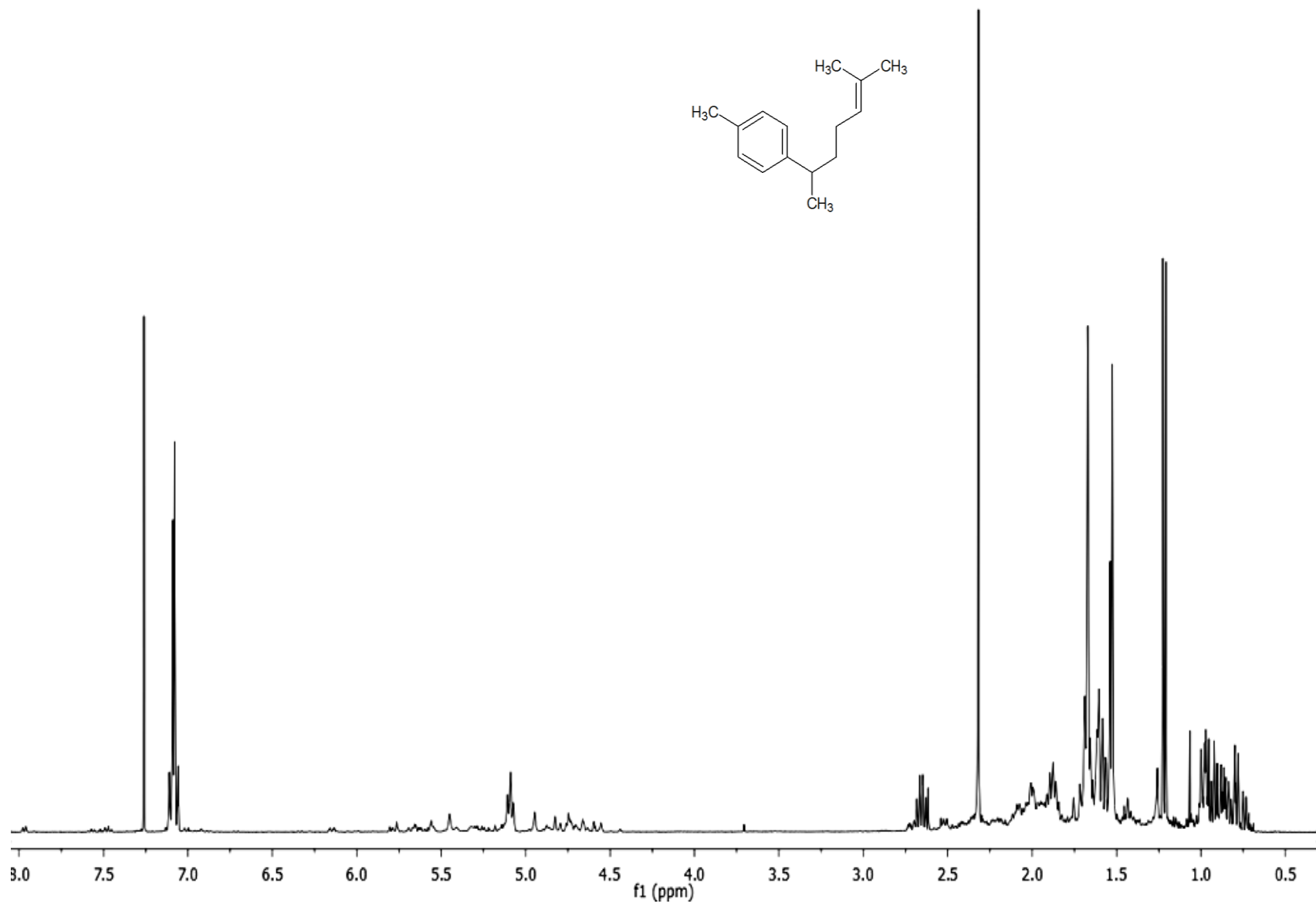
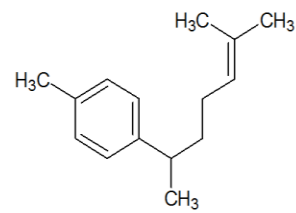
- OPS. Recuperado el 5 de mayo de 2014, de Organización Panamericana de la Salud: www.paho.org/mex/
- Palacios, F. (2009). Pruebas selectas de identidad, eficacia y composición de *Brickellia cavanillesii* (Cass) A. Gray y *B. Veronicifolia* (Kunth) A. Gray (Asteraceae). Tesis de doctorado UNAM.
- Poss, J.E., Jezewski, M.A., González-Stuart, A. (2003). Home remedies for type 2 Diabetes used by Mexican Americans in El paso, Texas. *Clinical Nursing Research*, 12, 304–323.
- Ramírez, G., Zavala M., Pérez, J., Zamilpa, A. (2012). In Vitro Screening of Medicinal Plants Used in Mexico as Antidiabetics with Glucosidase and Lipase Inhibitory Activities, ID 701261, 6 pages.
- Rodríguez-López, V., Moreno-Escobar, A., Ávila-Torres, O., y Tlahuext, H. (2006). 6-Acetyl-5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene. *Acta Crystallographica*, E62, o3616–o3617.
- Rubiolo, P, Liberto, E., Sgorbini, B., Russo, R., Veuthey, J.L., Bicchi, C. (2008) Fast-GC-conventional quadrupole mass spectrometry in essential oil analysis. *Journal of Separation Science*, 31, 1074–84
- Rubiolo, P., Sgorbini, P., Liberto, E., Cordero, C. y Bicchi, C. (2010). Essential oils and volatiles: simple preparation and analysis. A review. *Flavour Fragrance Journal*, 25, 282–290.
- Salvito, D.T., Vey, M.G.H., Senna, R.J. (2004). Fragrance materials and their environmental impact. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 105–108.
- Surya, S., Salam, A.D., Tomy, D.V., Carla, B., Kumar, R.A., Sunil, C. (2014). Diabetes mellitus and medicinal plants-a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 337–347.
- Srinivasan, K., and Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian Journal of Medical Research*, 125, 451-472.
- Stolar, M. (2010). Glycemic control and complications in type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Medicine*, 123, S3–S11.
- Tholl, D.E., Boland, W., Loreto, F., Ursula, S.R., Schnitzler, R. and J.P. (2006) Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, 45, 540–560.
- USP 35 NF 30. United States Pharmacopoeia, U.S Pharmacopoeia Convention. (2012) Rockville, USA. Volumen I pp 43.
- Van Den Dool H., Kratz P.D. (1963). A generalization of the Retention Index System including lineal temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatograph*, 11, 463–471.
- Yang, C; Wang, J; Li D. (2013). Microextraction techniques for the determination of volatile. *Analytica Chimica Acta*, 799, 8–22.
- and semivolatile organic compounds from plants: A review
- Zhang, Z., Li, G. (2010). A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchemical Journal*, 95, 127–139.

7. ANEXOS.

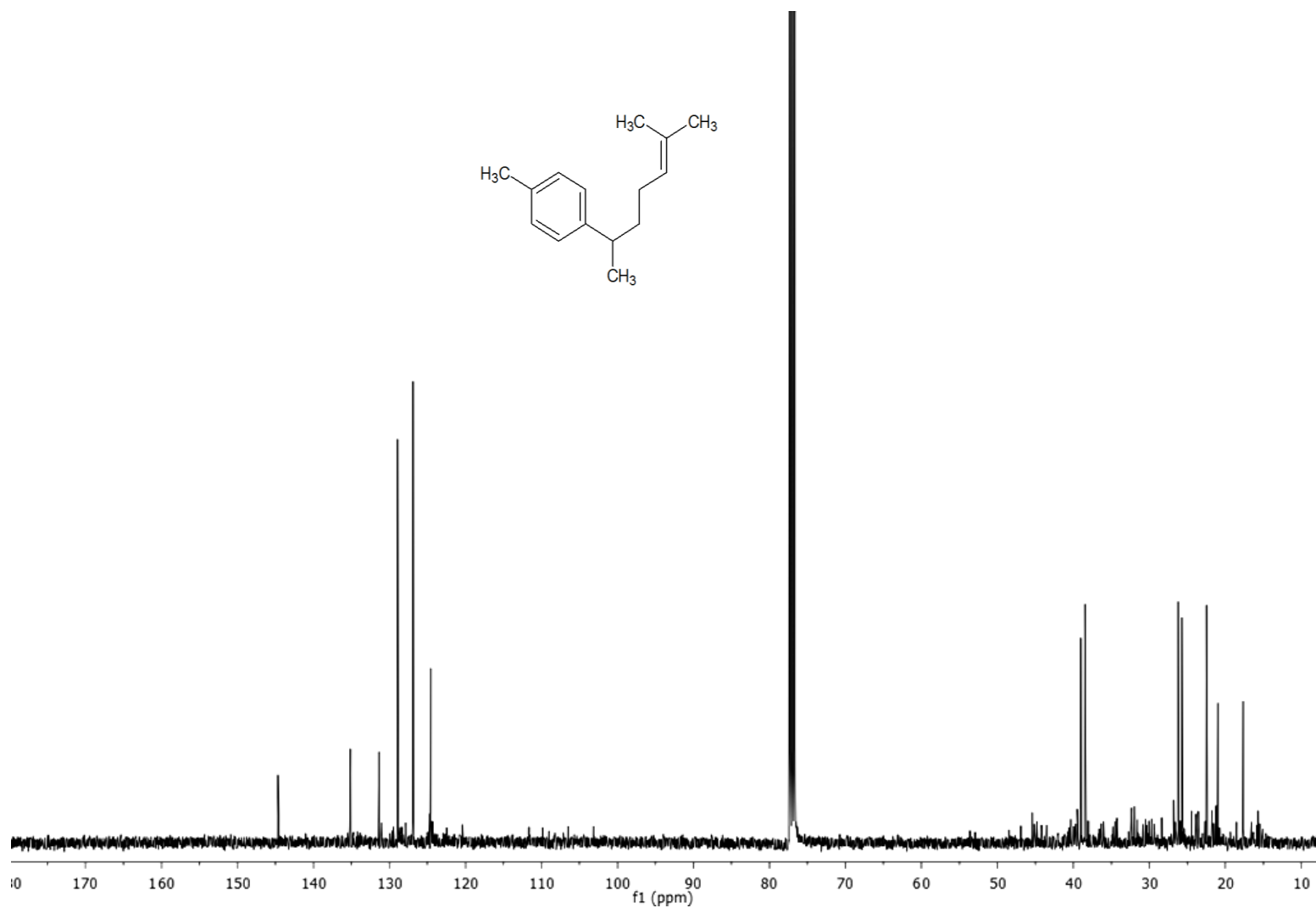
Espectros de masas de los estándares. **a)** β -cariofileno (**24**), **b)** Curcumeno (**28**) **c)** Espatuleno (**38**), **d)** Óxido de cariofileno (**39**), **e)** α - Bisabolol (**44**) y **f)** Desmetilisoencecalina (**3**).



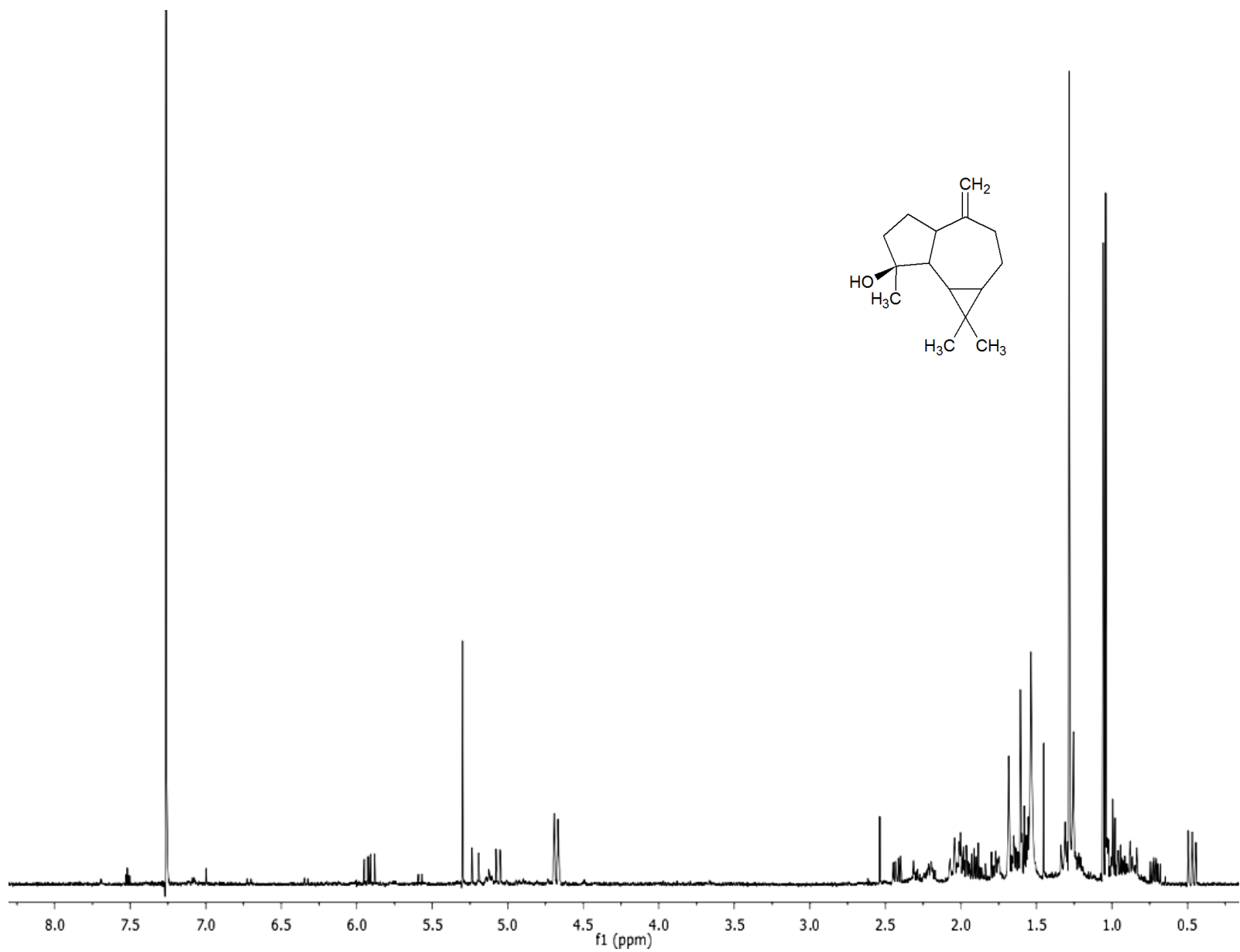




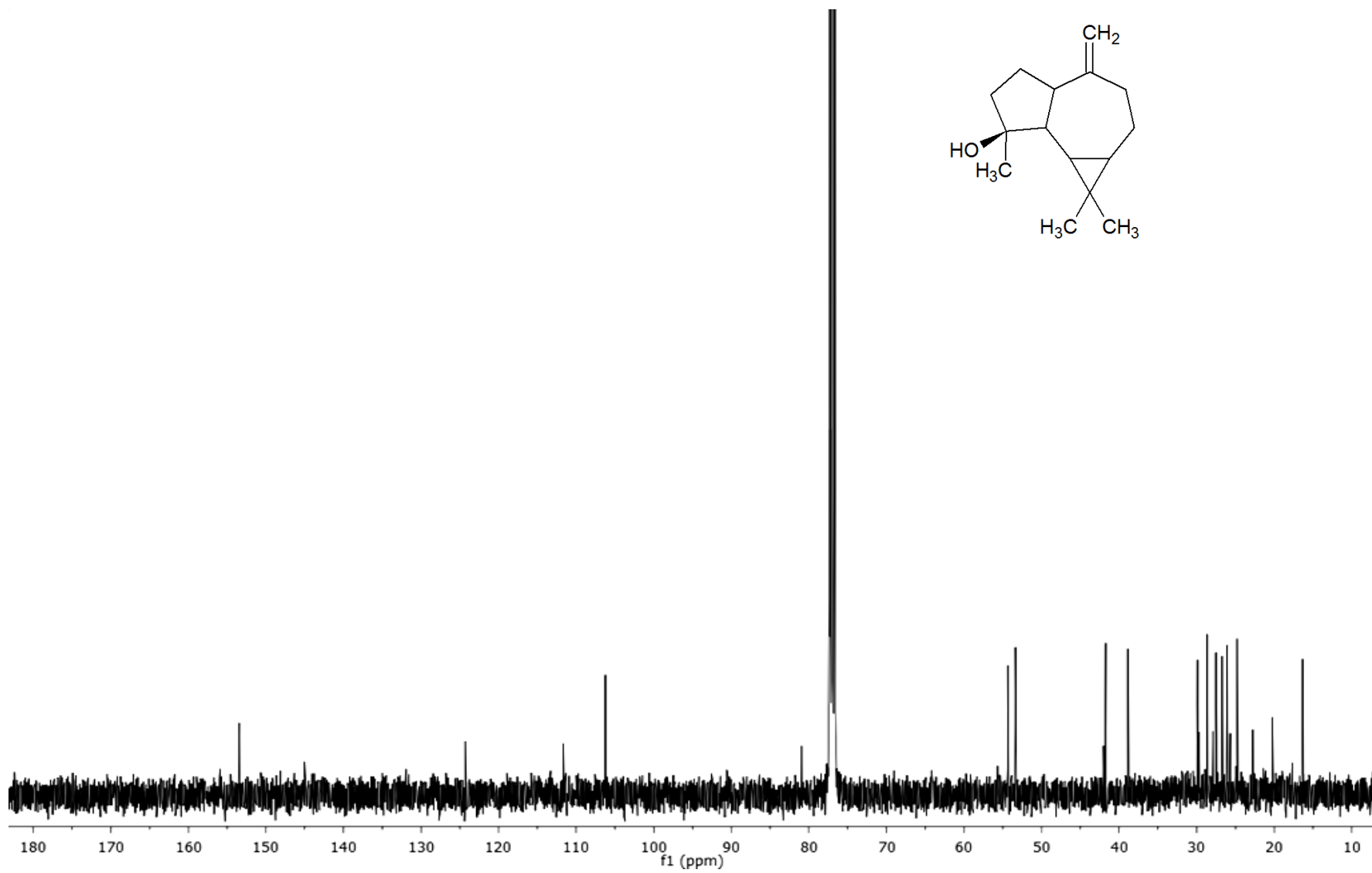
Espectro 1. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) del curcumeno (**28**).



Espectro 2. Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) del curcumeno (**28**).



Espectro 3. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) del espatulenol (**38**).



Espectro 4. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del espatulenol (**38**).