



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PARÁMETROS DE CALIDAD, EFICACIA Y SEGURIDAD DE *Vauquelinia corymbosa* Y *Salvia circinata*.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. LAURA CECILIA FLORES BOCANEGRA

TUTORA PRINCIPAL

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2017



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	Dr. Alfredo Ortega Hernández
VOCAL	Dr. Rogelio Pereda Miranda
VOCAL	Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
VOCAL	Dr. Adolfo Andrade Cetto
SECRETARIO	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

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

PUBLICACIONES

Flores-Bocanegra, L., Pérez-Vásquez, A., Torres-Piedra, M., Bye, R., Linares, E., Mata, R. 2015. α -Glucosidase Inhibitors from *Vauquelinia corymbosa*. *Molecules*, 20, 15330-15342.

Flores-Bocanegra, L., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Mata, R. 2017. α -Glucosidase Inhibitors from *Salvia circinata*. *Journal of Natural Products*, 80, 1584-1593.

CONGRESOS

10^a Reunión Internacional de Investigación de Productos Naturales. Cartel: Inhibidores de α -glucosidasas de *Vauquelinia corymbosa*. Mayo 2014, Mérida, Yucatán.

56th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Cartel: New α -Glucosidase Inhibitors from *Vauquelinia corymbosa*. Agosto 2015. Cupper Mountain, Colorado, Estados Unidos de América.

58th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Cartel: New α -Glucosidase Inhibitors from *Salvia circinata*. Agosto 2017. Portland, Oregon, Estados Unidos de América.

58th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Cartel: Antihyperglycemic Potential of *Salvia circinata*. Agosto 2017. Portland, Oregon, Estados Unidos de América.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química por ofrecerme los recursos necesarios para poder concluir con mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado (número de becario 270411).

A la Dra. Rachel Mata, le agradezco el permitirme formar parte de su grupo de trabajo durante tanto tiempo, pero sobre todo gracias por ser una tutora tan entregada y siempre brindarme su apoyo incondicional. Es usted un ejemplo a seguir y una persona que ha marcado de manera muy importante mi vida.

Al Dr. Alfredo Ortega Hernández y al Dr. Francisco Hernández Luís miembros de mi comité tutorial, por sus valiosas aportaciones y comentarios constructivos para la realización del presente proyecto.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz, gracias por su valiosa asesoría y ayuda incondicional. Pero en especial gracias por la complicidad y por la bonita amistad que surgió a lo largo de todos estos años.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez, por su asesoría técnica, por su ayuda constante y por haber contribuido de manera significativa en mi formación profesional.

Al Dr. Martín González Andrade, por su colaboración en la realización de los estudios de dinámica molecular y por proveernos la enzima de *R. obeum* que resultó de gran utilidad para el desarrollo del presente trabajo.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	II
RESUMEN	IV
ABSTRACT.....	VIII
1 ANTECEDENTES	1
1.1 Generalidades sobre la Diabetes mellitus.	1
1.1.2 Complicaciones relacionadas con la DMT2.	2
1.1.3 Regulación de glucosa.	2
1.1.4 Tratamiento de la Diabetes Mellitus.....	4
1.1.4.1 Agentes terapéuticos que actúan sobre la captura y el transporte de glucosa.	5
1.1.4.2 Agentes terapéuticos que actúan aumentando la secreción de insulina.	7
1.1.4.3 Enzimas α -glucosidasas y agentes farmacológicos que inhiben su actividad.....	9
1.1.4.3.1 Generalidades de las enzimas α -glucosidasas.	9
1.1.4.3.2 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.	11
1.2 Generalidades sobre las especies vegetales estudiadas.	16
1.2.1 Género <i>Salvia</i>	16
1.2.1.1 Composición química y propiedades farmacológicas del género <i>Salvia</i>	17
1.2.1.2 <i>Salvia circinata</i> Cavanilles (Lamiaceae).	21
1.2.1.2.1 Estudios fitoquímicos y farmacológicos de <i>S. circinata</i>	22
1.2.2 Género <i>Vauquelinia</i>	22
1.2.2.1 <i>Vauquelinia corymbosa</i> Bonpland (Rosaceae).	23
1.2.2.1.1 Estudios fitoquímicos y farmacológicos de <i>V. corymbosa</i>	24
2 HIPÓTESIS	25
3 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	26
4 DESARROLLO EXPERIMENTAL	29
4.1 Métodos generales.....	29
4.1.1 Análisis cromatográficos.	29
4.2 Material vegetal.....	30
4.3 Estudio químico de la especie <i>S. circinata</i>	30
4.3.1 Preparación de los extractos.....	30
4.3.2 Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios.....	31
4.4 Estudio químico de la especie <i>V. corymbosa</i>	36
4.4.1 Preparación y fraccionamiento preliminar del extracto acuoso.	36
4.4.2 Aislamiento, purificación e identificación de los de los metabolitos secundarios a partir de la fracción orgánica de la infusión.	37
4.5 Estudios farmacológicos.....	40

4.5.1 Estudios <i>in vitro</i> .	40
4.5.1.1 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre enzimas α -glucosidasas.	40
4.5.1.2 Determinación de los parámetros cinéticos de la inhibición.	41
4.5.2 Estudios farmacológicos <i>in vivo</i> .	42
4.5.2.1 Preparación y administración de muestras.	42
4.5.2.2 Determinación de la toxicidad aguda en ratones.	42
4.5.2.3 Evaluación de la eficacia antidiabética preclínica en ensayos agudos.	43
4.5.2.3.1 Determinación de la concentración de glucosa en sangre.	43
4.5.2.3.2 Inducción de hiperglucemia experimental.	44
4.5.2.3.3 Evaluación del potencial hipoglucemiante agudo.	44
4.5.2.3.4 Evaluación del potencial antihiperglucémico en una curva de tolerancia a la glucosa.	45
4.5.2.3.5 Evaluación del potencial antihiperglucémico en una curva de tolerancia a la sacarosa.	45
4.5.2.3.6 Análisis estadísticos.	46
4.6 Estudios <i>in silico</i> .	46
4.6.1 Cálculos teóricos del diámetro circular.	46
4.6.2 Estudios de acoplamiento molecular.	48
4.6.3 Estudios de dinámica molecular.	49
4.6.3.1 Acoplamiento molecular.	49
4.6.3.2 Simulación de la dinámica molecular.	49
4.7 Pruebas de identidad y composición.	50
4.7.1 Desarrollo del perfil cromatográfico de la fracción orgánica de la infusión de <i>S. circinata</i> .	50
4.7.1.1 Preparación de la matriz de trabajo.	50
4.7.1.2 Validación del método analítico para la cuantificación simultanea de amarisólida (1) y pedalitina (6).	50
4.7.1.2.1 Linealidad del sistema.	51
4.7.1.2.2 Linealidad del método y exactitud.	51
4.7.1.2.3 Precisión del sistema.	52
4.7.1.2.4 Límite de cuantificación y límite de detección.	52
4.7.1.2.5 Cuantificación de amarisólida (1) y pedalitina (6).	52
4.7.2 Perfil cromatográfico de <i>V. corymbosa</i> .	53
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	54
5.1 Estudio químico y farmacológico de la especie <i>S. circinata</i> .	54
5.1.1 Toxicidad aguda del extracto acuoso.	54
5.1.1.2 Eficacia preclínica del extracto acuoso de <i>S. circinata</i> como agente antidiabético.	55
5.1.2 Estudio químico: Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios.	58
5.1.3 Potencial antihiperglucémico de los metabolitos aislados de <i>S. circinata</i> .	71
5.1.4 Pruebas de composición	77
5.1.4.1 Establecimiento del perfil cromatográfico de la fracción orgánica de la infusión.	77
5.1.4.2 Validación del método analítico.	79
5.1.4.2.1 Linealidad del sistema.	79
5.1.4.2.2 Linealidad y exactitud del método.	81
5.1.4.2.2.1 Linealidad del método.	81

5.1.4.2.2.2 Exactitud del método	84
5.1.4.2.3 Precisión.....	85
5.1.4.2.4 Limite de detención y límite de cuantificación.	87
5.1.4.2.5 Cuantificación de amarisólida (1) y pedalitina (6) en diferentes extractos de <i>S. circinata</i>	89
5.2.1 Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios.....	91
5.2.2 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la actividad de las α -glucosidasas.....	92
5.2.2.1 Cinética enzimática y estudios de acoplamiento molecular.	93
5.2.3 Determinación de la toxicidad aguda.	97
6 CONCLUSIONES.....	100
REFERENCIAS.....	102
ANEXOS	110

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Agentes terapéuticos que favorecen la traslocación de GLUT4 por activación de las vías MAP y PI3K.	5
Figura 2.	Agentes terapéuticos que favorecen la expresión de GLUT4 por agonismo de receptores PPAR γ .	6
Figura 3.	Gliflocinas, fármacos antidiabéticos que inhiben a SGLT2.	7
Figura 4.	Agentes hipoglucemiantes de acción directa en el páncreas.	8
Figura 5.	Inhibidores de la enzima DDP4.	9
Figura 6.	Mecanismo de hidrólisis de enzimas α -glucosidasas con retención de la configuración anomérica.	10
Figura 7.	Fármacos inhibidores de las α -glucosidasas y sus precursores naturales.	13
Figura 8.	Productos naturales inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.	14
Figura 9.	Principales tipos de metabolitos presentes en el género <i>Salvia</i> .	18
Figura 10.	Tipos y ejemplos selectos de diterpenoides del género <i>Salvia</i> .	19
Figura 11.	<i>Salvia circinata</i> Cavanilles (Lamiaceae).	21
Figura 12.	Metabolitos aislados de las partes aéreas de <i>S. circinata</i> .	22
Figura 13.	<i>Vauquelinia corymbosa</i> Bonpland (Rosaceae).	23
Figura 14.	Metabolitos aislados de las partes aéreas de <i>V. corymbosa</i> .	24
Figura 15.	Efecto hipoglucemiante agudo de la infusión de <i>S. circinata</i> en ratones normoglucémicos (A) e hiperglucémicos (B). ABC: área bajo la curva; VEH: vehículo; GLI: glibenclamida. Cada barra representa el promedio \pm error estándar de la media para cada grupo (n = 6). ANADEV A de una vía, <i>post hoc</i> Dunnett (* p < 0.05 y *** p < 0.001).	56
Figura 16.	Curva de tolerancia a la glucosa de la infusión de <i>S. circinata</i> en ratones normoglucémicos (A-B) e hiperglucémicos (C-D). ABC: área bajo la curva; VEH: vehículo; MFT: metformina; IS: infusión de <i>S. circinata</i> . Cada barra o punto representa el promedio \pm error estándar de la media para cada grupo (n = 6). (A) y (C) ANADEV A de dos vías, <i>post hoc</i> Bonferroni (* p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001). (B) y (D) ANADEV A de una vía, <i>post hoc</i> Dunnett (*** p < 0.001).	57
Figura 17.	Curva de tolerancia a la sacarosa de la infusión de <i>S. circinata</i> en ratones normoglucémicos (A) e hiperglucémicos (B). VEH: vehículo; ACA: acarbosa; IS: infusión de <i>S. circinata</i> . Cada punto representa el promedio \pm error estándar de la media para cada grupo (n = 6). ANADEV A de dos vías, <i>post hoc</i> Bonferroni (* p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001).	58

Figura 18.	Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas de <i>S. circinata</i> .	59
Figura 19.	Espectro de ¹ H-RMN (500 MHz, CD ₃ OD) de la 6,6",3"-trihidroxi-7,3',7"- <i>O</i> -trimetiloniflavona (17).	61
Figura 20.	Espectro de ¹³ C-RMN (125 MHz, CD ₃ OD) de la 6,6",3"-trihidroxi-7,3',7"- <i>O</i> -trimetiloniflavona (17).	62
Figura 21.	Espectros de ¹ H-RMN (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de las amarisólidas (1 , 13-16).	65
Figura 22.	Espectros de ¹³ C-RMN (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de las amarisólidas (1 , 13-16).	66
Figura 23.	Correlaciones clave en el espectro de HMBC de las amarisólidas 15 y 16 .	69
Figura 24.	Correlaciones clave en los espectros de NOESY de las amarisólidas (13-16).	69
Figura 25.	Comparación de los espectros de DC de las amarisólidas (1 , 13-16).	71
Figura 26.	Reacción de hidrólisis en la determinación espectrofotométrica de inhibición de las enzimas α-glucosidasas.	72
Figura 27.	Comparación de la estructura de las enzimas α-glucosidasas de <i>R. obeum</i> (azul) y de la maltasa-glucoamilasa de humano (verde). (A) Alineación 3D de las enzimas. (B) Sitios catalíticos de <i>R. obeum</i> .	73
Figura 28.	Efecto inhibitorio sobre la enzima α-glucosidasa de <i>R. obeum</i> . (A) Curva del control positivo; (B) curva de la amarisólida (1); (C) curva de la pedalitina (6).	74
Figura 29.	Curva de tolerancia a la sacarosa de (A) amarisólida (1) y (B) pedalitina (6) en ratones normoglucémicos. VEH: vehículo; ACA: acarbosa. Cada punto representa el promedio ± error estándar de la media para cada grupo (n = 6). ANADEVIA de dos vías, <i>post hoc</i> Bonferroni (* <i>p</i> < 0.05, ** <i>p</i> < 0.01 y *** <i>p</i> < 0.001).	75
Figura 30.	Modelo estructural en 3D de los complejos formados con la α-glucosidasa de <i>R. obeum</i> . (A) acarbosa, (B) amarisólida (1) y (C) pedalitina (6). Sitios y aminoácidos involucrados en la unión entre la α-glucosidasa de <i>R. obeum</i> con (D) acarbosa, (E) amarisólida (1) y (F) pedalitina (6).	76
Figura 31.	Análisis de la trayectoria de los estudios de dinámica molecular. (A) Gráfico de la energía total del sistema en función del tiempo. (B) La RMSD en función del tiempo. ACA: acarbosa.	77
Figura 32.	Perfil cromatográfico representativo de la composición química de la partes aéreas de <i>S. circinata</i> . (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.	78
Figura 33.	Curvas de calibración de amarisólida (1) para la evaluación de la linealidad del sistema. (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.	80
Figura 34.	Curvas de calibración de pedalitina (6) para la evaluación de la linealidad del sistema. (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.	81
Figura 35.	Linealidad del método para la cuantificación de amarisólida (1). (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.	82

	Página
Figura 36. Linealidad del método para la cuantificación de pedalitina (6). (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.	83
Figura 37. Curvas de calibración para la determinación de LD y LC de amarisólida (1). (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.	88
Figura 38. Curvas de calibración para la determinación de LD y LC de pedalitina (6). (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.	89
Figura 39. Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas de <i>V. corymbosa</i> .	91
Figura 40. Gráfico de Linewaver-Burk para el compuesto 23 sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa de levadura.	94
Figura 41. (A) Modelo estructural de los complejos formados entre la α -glucosidasa de levadura y acarbosa (morado), 20 (anaranjado) y 23 (amarillo); Representación 3D del sitio de unión entre la enzima de levadura con los ligandos: (B) acarbosa, (C) 20 y (D) 23 .	96
Figura 42. Modelos estructurales de los complejos formados por la acarbosa (morado) y 23 (amarillo) con las enzimas humanas: (A) 3LPP, (B) 3TOP y (C) 2QMJ. Representación 3D de los sitios de unión entre 23 (amarillo) con las enzimas humanas: (D) 3LPP, (E) 3TOP y (F) 2QMJ.	97
Figura 43. Reacción de hidrólisis de glucósidos cianogénicos.	98
Figura 44. Perfil cromatográfico representativo de la composición química del extracto acuso de <i>V. corymbosa</i>	99

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Plantas medicinales del género <i>Salvia</i> más utilizadas en México.	20
Tabla 2. Toxicidad aguda del extracto acuoso de <i>S. circinata</i> .	55
Tabla 3. Datos espectroscópicos de ¹ H-RMN (500 MHz) y ¹³ C-RMN (125 MHz) de la 6,6",3"-trihidroxí-7,3',7"- <i>O</i> -trimetiloniflavona (17) en CD ₃ OD.	63
Tabla 4. Datos de ¹ H-RMN (500 MHz) de las amarisólidas (13-16) DMSO- <i>d</i> ₆ .	67
Tabla 5. Datos de ¹³ C-RMN (125 MHz) de las amarisólidas (13-16) en DMSO- <i>d</i> ₆ .	68
Tabla 6. Efecto inhibitorio de los metabolitos de <i>S. circinata</i> sobre las α-glucosidasas de rata.	73
Tabla 7. Resultados experimentales de la curva de calibración de la amarisólida (1).	79
Tabla 8. Resultados experimentales de la curva de calibración de la pedalitina (6).	80
Tabla 9. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema.	80
Tabla 10. Resultados experimentales para la linealidad del método para amarisólida (1).	82
Tabla 11. Resultados experimentales para la linealidad del método para pedalitina (6).	83
Tabla 12. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método.	84
Tabla 13. Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de amarisólida (1).	84
Tabla 14. Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de pedalitina (6).	85
Tabla 15. Repetibilidad del método para la cuantificación de amarisólida (1).	86
Tabla 16. Repetibilidad del método para la cuantificación de pedalitina (6).	86
Tabla 17. Resultados para LD y LC de la amarisólida (1).	87
Tabla 18. Resultados para LD y LC de la pedalitina (6).	88
Tabla 19. Cuantificación de amarisólida (1) en extractos de <i>S. circinata</i> .	90
Tabla 20. Cuantificación de pedalitina (6) en extractos de <i>S. circinata</i> .	90
Tabla 21. Efecto inhibitorio de los compuestos aislados de <i>V. corymbosa</i> sobre la actividad enzimática de α-glucosidasas de levadura y de rata.	92
Tabla 22. Toxicidad aguda de los extractos acuoso y orgánico de <i>V. corymbosa</i> .	98

LISTA DE ABREVIATURAS

[α]_D	Rotación óptica específica
¹³C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
¹H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
Å	Angström
ABC	Área bajo la curva
ACA	Acarbosa
AcOEt	Acetato de etilo
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por adenosina 5-monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ANADEVA	Análisis de varianza
CCA	Cromatografía en colimna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CH₂Cl₂	Cloruro de metileno
CH₃CN	Acetonitrilo
CH₃OH	Metanol
CD₃OD	Metanol deuterado
CTG	Curva de tolerancia a la glucosa
CTS	Curva de tolerancia a la sacarosa
DC	Dicroísmo circular
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
DL₅₀	Dosis letal media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DM	Diabetes Mellitus
EEM	Erros estándar de la media

EM-AR	Espectrometría de masas de alta resolución
FDA	Food and Drug Administration
GLI	Glibenclamida
<i>i.p.</i>	Administración intraperitoneal
IR	Espectroscopia de infrarrojo
<i>ki</i>	Constante de inhibición
<i>m/z</i>	Relación masa carga
MTF	Metformina
NA	Nicotinamida
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
PDB	Protein Data Bank
<i>p.o.</i>	Administración oral
STZ	Estreptocina
TDDFT	Teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo
RMSD	Desviación cuadrática media-media
UV	Ultravioleta
VEH	Vehículo

RESUMEN

En el presente trabajo se describe el estudio químico y farmacológico de las especies vegetales *Vauquelinia corymbosa* Bonpland (Rosaceae) y *Salvia circinata* Cavanilles (Asteraceae) las cuales se consumen en México como auxiliares en el tratamiento de la diabetes mellitus. Con este trabajo se generó la información científica que sustenta la seguridad y eficacia preclínicas de ambas especies, y el uso tradicional de estas plantas.

El estudio químico de *S. circinata* nos condujo al aislamiento de dos metabolitos descritos para la especie la amarisolida (**1**) y la pedalitina (**6**). Además, se logró el aislamiento de las amarisolidas B-E (**13-16**) diterpenoides de tipo clerodano glucosilados, la biflavona 6,6",3"-trihidroxi-7,3',7"-*O*-trimetiloniflavona (**17**) y los flavonoides 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,6-dihidroxi-7-metoxi-4H-cromen-4-ona (**18**) y apigenin-7-*O*- β -D-glucósido (**19**). La caracterización química de estos productos se realizó mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas y quirópticas. De los productos aislados las amarisolidas **13-16** y la biflavona **17** son nuevas entidades químicas, mientras que los productos **18** y **19** se describen por primera vez para la especie.

La seguridad y eficacia preclínica de esta especie se estableció mediante ensayos farmacológicos *in vivo*. En primer lugar, se realizó un estudio de la toxicidad aguda del extracto acuoso obtenido de las partes aéreas de *S. circinata*, con este procedimiento se demostró que el extracto no provoca ningún efecto tóxico en ratones y, por lo tanto, se considera inocuo bajo las condiciones de experimentación [dosis letal media (DL₅₀) > 5 g/kg].

La eficacia antidiabética preclínica del mismo extracto se demostró evaluando su efecto en una curva de tolerancia a la sacarosa (CTS) en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos. Los resultados revelaron que el extracto acuoso tiene la capacidad de disminuir significativamente el pico postprandial de glucosa (* $p < 0.05$). Sin embargo, los efectos observados durante la curva de tolerancia a la glucosa (CTG) e hipoglucemiante agudo fueron poco significativos.

Con la finalidad de identificar los metabolitos activos del extracto acuoso se evaluó el efecto inhibitorio de todos los productos aislados (**1**, **6** y **13-19**) contra las enzimas α -glucosidasas de rata y de la bacteria *Ruminococcus obeum*. Los resultados revelaron que todos los metabolitos poseen efecto inhibitorio contra las enzimas de rata, siendo más activos los flavonoides (**6**, **17-19**). Además, los metabolitos mayoritarios (**1** y **6**) inhiben de manera importante a la α -glucosidasa de *R. obeum*.

Para demostrar el efecto *in vivo* de inhibición de las enzimas α -glucosidasas de los productos **1** y **6** se evaluó su en una CTS en ratones normoglucémicos. Los resultados permitieron establecer que ambos productos tienen efecto *in vivo* pues ayudan a controlar el pico postprandial de glucosa, siendo más activo el metabolito **6**.

Con el objetivo de completar los estudios de inhibición de **1** y **6**, se realizaron análisis de acoplamiento y dinámica molecular, los resultados de este procedimiento sugieren que ambos productos podrían unirse al sitio catalítico de la enzima de *R. obeum* formando complejos estables mediante la formación de puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals.

Finalmente, se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), de utilidad para las pruebas calidad de identidad y composición para la especie.

El estudio químico del extracto acuoso de la especie *V. corymbosa* condujo al aislamiento y caracterización de diversos metabolitos secundarios que incluyen a la prunasina (**10**), piceína (**11**), (-)-*epi*-catequina (**12**) y varios flavonoles glucosilados como son el hiperósido (**20**), isoquercetina (**21**), quercitrina (**22**) y quercetin-3-*O*-(6"-benzoil)- β -D-galactósido (**23**); además de la metilarbutina (**24**). La elucidación estructural de estos productos se realizó por comparación de sus datos espectroscópicos con los previamente reportados en la literatura. Todos los productos aislados de *V. corymbosa* (**10-12** y **20-24**) son entidades químicas conocidas reportadas por primera vez para la especie en el presente trabajo.

Se realizó la evaluación enzimática de todos los productos obtenidos a partir del extracto de *V. corymbosa* (**10-12** y **20-24**) con la finalidad de identificar a los principios activos responsables de la actividad inhibitoria. Para la evaluación *in vitro* se utilizaron las α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae* y de rata. Los resultados demuestran que todos los metabolitos evaluados inhiben la actividad de estas enzimas, siendo más importante el efecto de los flavonoles glucosilados (**20-23**).

El producto más activo contra ambas enzimas fue quercetin-3-*O*-(6''-benzoil)- β -D-galactósido (**23**), por esta razón se seleccionó para realizar una cinética enzimática contra la α -glucosidasa de *S. cerevisiae*, los resultados demuestran que este producto se comporta como inhibidor de tipo mixto. Adicionalmente, se realizaron cálculos de acoplamiento molecular de este producto con las enzimas isomaltasa de *S. cerevisiae*, sacarasa-isomaltasa humana N-terminal, maltasa-glucoamilasa humana N-terminal y maltasa-glucoamilasa humana C-terminal. Los resultados sugieren que el producto puede unirse a estas enzimas en diferentes sitios y con diferentes afinidades, la mejor estabilidad se observó para el complejo formado con la enzima isomaltasa de *S. cerevisiae*.

Los estudios de toxicidad aguda en ratones de los extractos acuoso y orgánico de las partes aéreas de *V. corymbosa* utilizando el método de Lorke permitió establecer que el extracto acuoso no es tóxico bajo las condiciones de estudio ($DL_{50} > 5$ g/kg); sin embargo, el extracto orgánico produjo signos característicos de cianosis en los ratones con una $DL_{50} = 2.6$ mg/kg. Con estas observaciones es evidente la necesidad de informar el riesgo potencial del consumo de esta planta.

Además del estudio de las dos especies ya mencionadas, se desarrolló brevemente la investigación del potencial antihiper glucémico de la perfoliatina A (**25**), metabolito mayoritario de la especie vegetal *Melampodium perfoliatum* Cavanilles (Asteraceae) (Anexo 5).

El potencial antihiper glucémico de la perfoliatina A (**25**) se demostró *in vivo* durante una CTS en ratones normoglucémicos e hiper glucémicos. Los resultados demuestran que el producto **25** es efectivo en la disminución del pico postprandial de glucosa, corroborando su efecto antihiper glucémico. El producto **25** se evaluó también en el ensayo *in vitro* de inhibición de las enzimas α -glucosidasas de rata y de *R. obeum*. Mediante este procedimiento se estableció que efectivamente el compuesto **25** tiene la capacidad de inhibir la actividad de ambas enzimas.

Finalmente, para completar el estudio de la perfoliatina A (**25**) se realizó un ensayo de cinética enzimática contra la enzima de *R. obeum*. Así, se logró determinar que este producto es un inhibidor de tipo no competitivo de la enzima de *R. obeum*.

En conjunto la información científica inédita generada en el presente trabajo describe la composición química y las propiedades farmacológicas de las especies *S. circinata* y *V. corymbosa*. Así mismo, esta información establece las pautas para sustentar el uso racional de ambas especies en la medicina popular mexicana para el tratamiento de la diabetes.

ABSTRACT

An infusion (IS) prepared from the aerial parts of *Salvia circinata* did not provoke acute toxicity in mice ($LD_{50} > 5000$ mg/kg). IS showed poor hypoglycemic and antihyperglycemic effects (100-570 mg/kg) when tested in normal and hyperglycemic mice using an acute and oral glucose tolerance tests, respectively. However, IS possessed antihyperglycemic action *in vivo* during an oral sucrose tolerance test (OSTT, 31.6-316 mg/kg), suggesting the presence of α -glucosidase inhibitors in *S. circinata*. Extensive fractionation of an organic extract of the aerial parts (OE) of the plant yielded one new biflavone (**17**) and four new neoclerodane diterpenoids glucosides (**13-16**) along with the known compounds amarisolide (**1**), pedalitin (**6**), apigenin-7-*O*- β -D-glucoside (**19**) and flavone 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,6-dihydroxy-7-methoxy-4*H*-chromen-4-one (**18**). The new compounds were given the trivial names of 6,6",3'''-trihydroxy-7,3',7'''-*O*-trimethyl loniflavone and amarisolides B-E (**13-16**), respectively. Compounds **1**, **6**, **17-19** were active against mammal α -glucosidases; **1** and **6** were also active against a recombinant α -glucosidase from *Ruminococcus obeum* and reduced significantly the postprandial peak during an OSTT in healthy mice, consistent with their α -glucosidase inhibitory activity. Molecular docking and dynamic studies revealed that compounds **1** and **6** might bind to α -glucosidases at the catalytic center of the enzyme.

The α -glucosidase inhibitory activity of an aqueous extract and compounds from the aerial parts of *V. corymbosa* was demonstrated with yeast and rat small intestinal α -glucosidases. The aqueous extract inhibited yeast α -glucosidase with a half maximal inhibitory concentration

(IC₅₀) of 28.6 µg/ml. Bioassay-guided fractionation of the extract led to the isolation of several compounds, including one cyanogenic glycoside [prunasin (**10**)], five flavonoids [(-)-*epi*-catechin (**12**), hyperoside (**20**), isoquercetin (**21**), quercitrin (**22**) and quercetin-3-*O*-(6"-benzoyl)-β-galactoside (**23**)] and two simple aromatic compounds [picein (**11**) and methylarbutin (**24**)]. The most active compound was **23** with IC₅₀ values of 30 µM in the case of yeast α-glucosidase, and 437 µM in the case of the mammalian enzyme. According to the kinetic analysis performed with the yeast enzyme, this compound behaved as mixed-type inhibitor; the calculated inhibition constant (*K_i*) was 50 µM. Molecular docking analyses with yeast and mammalian α-glucosidases revealed that compound **23** bind differently to these enzymes. Altogether, the results of this work suggest that preparations of *V. corymbosa* might delay glucose absorption *in vivo*.

All together the results of this investigation will contribute to the rational use of *S. circinata* and *V. corymbosa* for the treatment of diabetes in Mexican folk medicine.

1 ANTECEDENTES

1.1 Generalidades sobre la Diabetes mellitus.

Los primeros reportes sobre la diabetes se encuentran documentados en el papiro de Ebers, documento redactado en el antiguo Egipto, cerca del año 1500 antes de nuestra era. Desde entonces, la comprensión de las causas y la búsqueda de tratamientos han sido constantes en el quehacer médico. La diabetes es una patología compleja, pero prácticamente todos los pacientes, en mayor o menor medida, presentan deficiencias en la secreción de insulina y/o resistencia de los tejidos a la acción de esta hormona. En consecuencia los pacientes presentan una hiperglucemia crónica. Los niveles elevados de glucosa conducen a la glucotoxicidad que provoca la apoptosis de las células β y, por lo tanto, una disminución de la síntesis y secreción de insulina (Bilous y Donnelly, 2010; O'Rahilly, 2009).

La diabetes mellitus se clasifica en diferentes tipos con base en las causas que producen la enfermedad. Así, la tipo 1 (DMT1) se debe a la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, en consecuencia el organismo pierde la capacidad de producir insulina; la tipo 2 (DMT2) es consecuencia de un defecto doble de resistencia a la acción de la insulina, combinado con la incapacidad de fabricar suficiente insulina para vencer la resistencia. La DMT2 es la forma más frecuente de diabetes en personas mayores de 40 años (80-90 % de los casos). Se le conoce también como diabetes del adulto, aunque su incidencia en adolescentes y preadolescentes con obesidad ha incrementado notablemente en las últimas décadas (Bilous y Donnelly, 2010; Kahn et al., 2006; Pérez-Fuentes et al., 2014).

Según la OMS y los criterios definidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, el diagnóstico de diabetes se basa en los valores de glucemia en ayuno y postprandial. Niveles altos de glucosa en ayuno y la intolerancia a la glucosa se consideran estados metabólicos intermedios entre la homeostasis normal de glucosa y la diabetes. La primera

condición está definida por niveles de glucosa en ayuno entre 110 y 126 mg/dl; cuando hay intolerancia a la glucosa los valores de glucemia se encuentran entre 140 y 200 mg/dl después de 2 h de la administración de una solución elaborada con 75 g de glucosa. Si una persona presenta valores de glucemia superiores en ayuno o tras la ingesta de glucosa, valores de hemoglobina glucosilada (HbA1c) superiores a 6.5%, y alguno de los síntomas de la enfermedad (poliuria, polidipsia o polifagia) se diagnostica como diabética (OMS, 2017; SSA, 2010).

1.1.2 Complicaciones relacionadas con la DMT2.

La hiperglucemia crónica provoca complicaciones microvasculares, en particular en la retina, mesangio renal y en las células de Schwann de la glía nerviosa. Esto sucede porque las células y tejidos son incapaces de limitar el transporte de glucosa, por lo que se activan rutas metabólicas que generan productos tóxicos. Una de estas vías es la de los polioles, en donde la glucosa se reduce a sorbitol, mismo que provoca estrés osmótico y oxidativo. También se activan la proteína cinasa C (PKC) y la síntesis de productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés). Estas especies glucosiladas pueden formar enlaces con el colágeno de la microvasculatura, provocando el engrosamiento de los vasos, así como la reducción de su permeabilidad y elasticidad. Además, los AGEs están relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno y la liberación de mediadores inflamatorios. Dichos fenómenos conducen a isquemia y a la reducción del suministro de nutrientes en la microvasculatura y, por ende, a la aparición de daños en los órganos que irrigan, originando retinopatías, nefropatías y neuropatías, entre otros daños (Bilous y Donnelly, 2010).

1.1.3 Regulación de glucosa.

Para tener un mejor entendimiento del tratamiento farmacológico de la diabetes, es importante comprender la homeostasis de glucosa en el organismo. La relevancia del control de glucosa, radica en el hecho de que ésta es la principal fuente de energía para el cerebro, y su control fisiológico debe garantizar un aporte de energía continuo a pesar del consumo

ANTECEDENTES

intermitente de alimentos y de las variaciones por la demanda metabólica (Bilous y Donnelly, 2010).

La fuente de glucosa para el cuerpo son los carbohidratos de la dieta, los cuales están en forma de polisacáridos o disacáridos (i.e. almidón, sacarosa, y lactosa, principalmente). Para que estos productos se digieran es necesario su hidrólisis mediante las enzimas α -amilasas (salival y pancreática) y α -glucosidasas (intestinal). Estas enzimas degradan los carbohidratos complejos a sus correspondientes monosacáridos hidrosolubles que se absorben en el intestino delgado y pasan a la circulación portal. El paso de monosacáridos a través de las membranas celulares se lleva a cabo mediante los transportadores de glucosa. A nivel intestinal intervienen GLUT2, GLUT5 y SGLT1 que transportan glucosa, fructosa y galactosa-glucosa, respectivamente (Bilous y Donnelly, 2010; Guyton y Hall, 2011).

La hormona que regula la concentración de la glucosa en sangre es la insulina, que se produce y almacena en vesículas en las células β -pancreáticas, y se secreta en respuesta a diversos estímulos como son la presencia de glucagón y estímulo vagal; sin embargo, el principal inductor de la secreción de insulina es la glucosa. La secreción de insulina mediada por glucosa sucede cuando la glucemia alcanza niveles mayores a 90 mg/dl, posteriormente la glucosa entra a las células β -pancreáticas por medio del transportador de glucosa GLUT2 en donde se metaboliza por la vía glucolítica para producir ATP. El aumento intracelular de ATP provoca el cierre de canales de K^+ ATP con lo que se despolariza la célula, se activan los canales de Ca^{2+} y, finalmente, se favorece la liberación de insulina a través de la exocitosis de las vesículas que la contienen (Bilous y Donnelly, 2010; Guyton y Hall, 2011).

Cabe mencionar que la insulina también se libera en respuesta a la producción de las dos hormonas intestinales (incretinas), el péptido similar al glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). Estos péptidos se producen tras la ingesta de una carga oral de glucosa o de alimentos y aumentan la secreción de insulina por una acción directa sobre las células β -pancreáticas. La acción de estas incretinas sólo dura unos cuantos minutos

después de la carga de carbohidratos, ya que la enzima sérica dipeptidilpeptidasa 4 (DPP4) se encarga de inactivarlas (Bilous y Donnelly, 2010; Campbell y Drucker, 2013; Guyton y Hall, 2011).

Para llevar a cabo la regulación de glucosa, la insulina que se libera en la circulación sistémica se une a receptores de insulina que se encuentran localizados en la membrana celular y tienen actividad de tirosina-cinasa. La activación de estos receptores provoca su autofosforilación para iniciar así una cascada de señalización que impulsa dos vías: la de la cinasa activada por mitogéno (MAP) y la regulada por la activación de fosfoinositol 3-cinasa (PI3K). La activación de estas dos vías aumenta el transporte de glucosa mediado por GLUT4 (músculo y tejido adiposo), la producción de glicógeno y la síntesis de proteínas involucradas en el metabolismo de la glucosa (Bilous y Donnelly, 2010; Guyton y Hall, 2011).

1.1.4 Tratamiento de la Diabetes Mellitus.

El tratamiento de la diabetes pretende evitar el progreso de la enfermedad mediante el control de la glucosa en sangre a través de cambios en el estilo de vida y el uso de agentes terapéuticos adecuados. Los fármacos que se usan en la clínica para tratar la DM, ya sean estos de origen natural y/o de síntesis, actúan sobre diferentes blancos moleculares que intervienen en algún punto en las vías del metabolismo de carbohidratos. Los principales agentes terapéuticos que se conocen a la fecha actúan sobre cualquiera de los siguientes blancos: enzimas α -glucosidasas y α -amilasas, transportadores de glucosa, receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR), proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), incretinas y canales de K^+ _{ATP}. En los siguientes párrafos se presentan algunos ejemplos de plantas medicinales, metabolitos secundarios y productos de síntesis que actúan sobre los blancos mencionados anteriormente. Los inhibidores de las α -glucosidasas se abordarán más adelante y con mayor profundidad por su relevancia en el presente trabajo (Carramiñana, 2014; Kabade et al., 2016; Ríos et al., 2016).

1.1.4.1 Agentes terapéuticos que actúan sobre la captura y el transporte de glucosa.

Los agentes antidiabéticos que modifican el transporte de glucosa ejercen su efecto mediante un incremento de la expresión o translocación de los transportadores GLUT4, o bien por la inhibición de los cotransportadores SGLT2. Estos últimos se encargan de la reabsorción renal de glucosa hasta en un 90 %. La metformina (un análogo sintético de la galegina, principio activo de la planta antidiabética *Galega officinnalis*) es el fármaco de primera elección para la DMT2. Este medicamento favorece la captura de glucosa en las células del músculo esquelético por la activación de MAP. Cabe mencionar que un gran número de productos naturales que favorecen la captura de glucosa en miocitos y adipocitos *in vitro*, podrían activar las vías PI3K y MAP. Las estructuras y fuentes naturales de algunos de ellos se muestran en la Figura 1 (Carramiñana, 2014; Charan K. C. y Murthy, 2015; Kabade et al., 2016; Ríos et al., 2016).

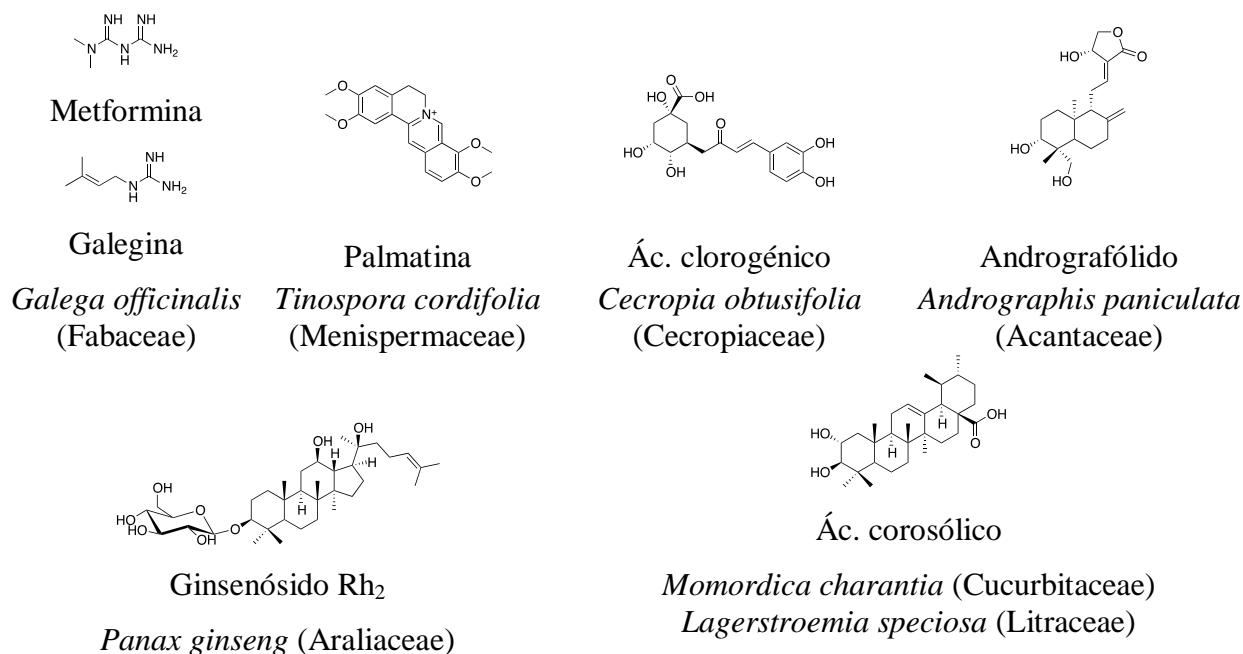


Figura 1. Agentes terapéuticos que favorecen la traslocación de GLUT4 por activación de las vías MAP y PI3K.

El efecto agonista de numerosos productos naturales a los receptores nucleares PPAR favorece la expresión de los transportadores GLUT4; ésta estrategia terapéutica se emplea para

disminuir la tolerancia a la glucosa. Los PPARs (PPAR α - δ) son una familia de receptores que intervienen en la activación de factores de transcripción que codifican para un gran número de proteínas relacionadas con diferentes funciones en el organismo. Por esta razón, se buscan fármacos con una alta selectividad por los receptores PPAR γ que intervienen en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos y carbohidrato. Las tiazolidindionas son medicamentos de primera elección para tratar la diabetes y constituyen el prototipo de los agonistas de PPAR γ . Así, la pioglitazona ha demostrado mejorar la resistencia a la insulina sin tener importantes efectos adversos relacionados con su uso. El estudio farmacológico de diversas especies vegetales ha permitido descubrir extractos y productos activos en modelos animales cuyo mecanismo de acción antihiper glucemiante involucra la activación de los receptores PPAR γ ; algunos ejemplos se muestran en la Figura 2 (Carramiñana, 2014; Charan y Murthy, 2015; Kabade et al., 2016; Ríos et al., 2016; Sabina y Venkatesan, 2017).

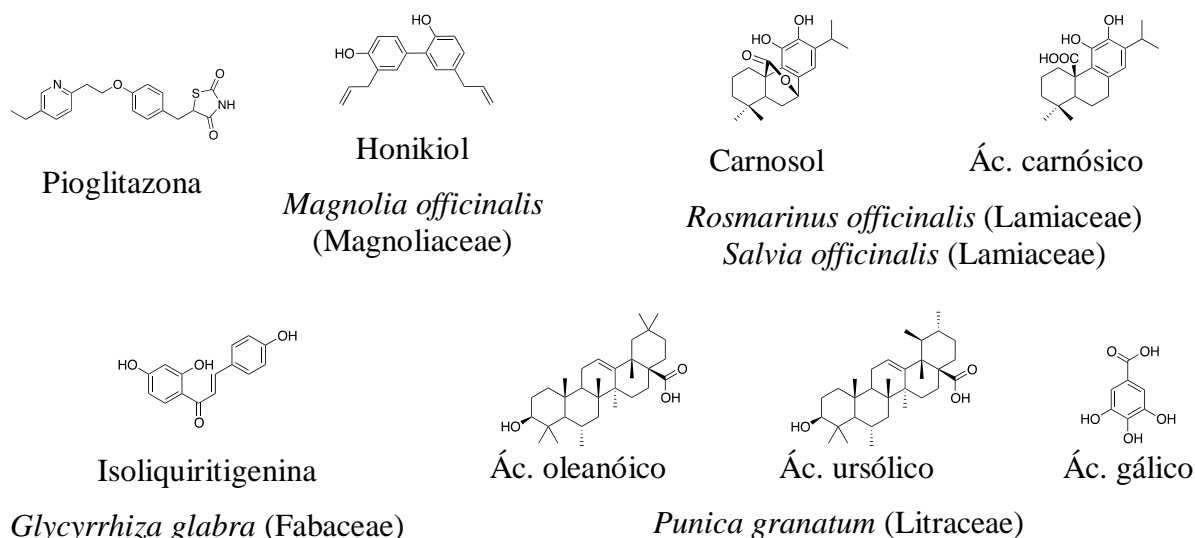


Figura 2. Agentes terapéuticos que favorecen la expresión de GLUT4 por agonismo de receptores PPAR γ .

La búsqueda de nuevos fármacos antidiabéticos ha permitido el desarrollo de un nuevo grupo de moléculas sintéticas que favorecen la eliminación renal de glucosa por inhibición selectiva de los cotrasportadores SGLT2, las gliflocinas. Estos productos tienen su origen en la chalcona floricina que se aisló por primera vez del manzano (*Malus domestica*). Este flavonoide

inhibe de forma competitiva a los cotransportadores SGLT1 y SGLT2. Los estudios de relación estructura química-actividad biológica permitieron el desarrollo de las gliflocinas que son inhibidores selectivos de SGLT2. Las gliflocinas se usan actualmente en la clínica para tratar la DMT2 se muestran en la Figura 3 (Carramiñana, 2014; Charan y Murthy, 2015; Kabade et al., 2016; Ríos et al., 2016).

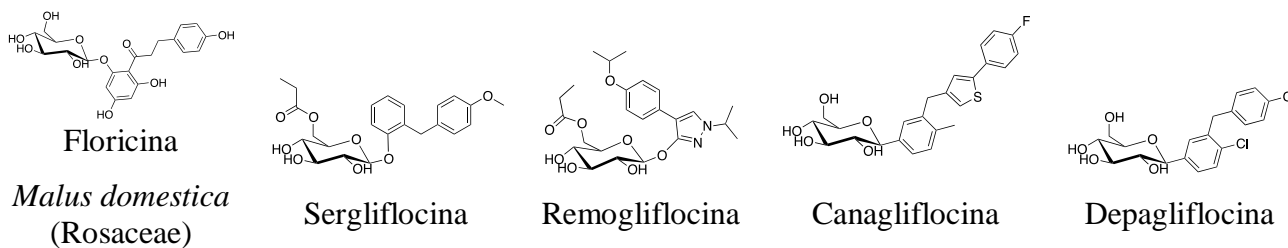


Figura 3. Gliflocinas, fármacos antidiabéticos que inhiben a SGLT2.

1.1.4.2 Agentes terapéuticos que actúan aumentando la secreción de insulina.

Dentro de los agentes farmacológicos que aumentan la secreción de insulina existen dos tipos principalmente, aquellos que producen su efecto por acción directa sobre célula β -pancreática y aquellos que aumentan la producción de GLP-1.

Al primer grupo pertenecen las sulfonilureas (glibenclamida) y las meglitinidas (repaglinida). Estos fármacos actúan por unión directa en los sitios SUR1 y KIR6, respectivamente, de los canales de K^+ _{ATP} presentes en la membrana de la célula β -pancreática. Estos hipoglucemiantes orales son ampliamente utilizados en la terapia actual contra la diabetes ya sea en monoterapia o en combinación con biguanidas, tiazolidindionas o con inhibidores de α -glucosidasas. Por otro lado, algunos productos de origen natural que se usan para tratar la diabetes producen el mismo efecto, algunos ejemplo de ellos se muestran en la Figura 4 (Carramiñana, 2014; Charan y Murthy, 2015; Kabade et al., 2016; Patel et al., 2012).

ANTECEDENTES

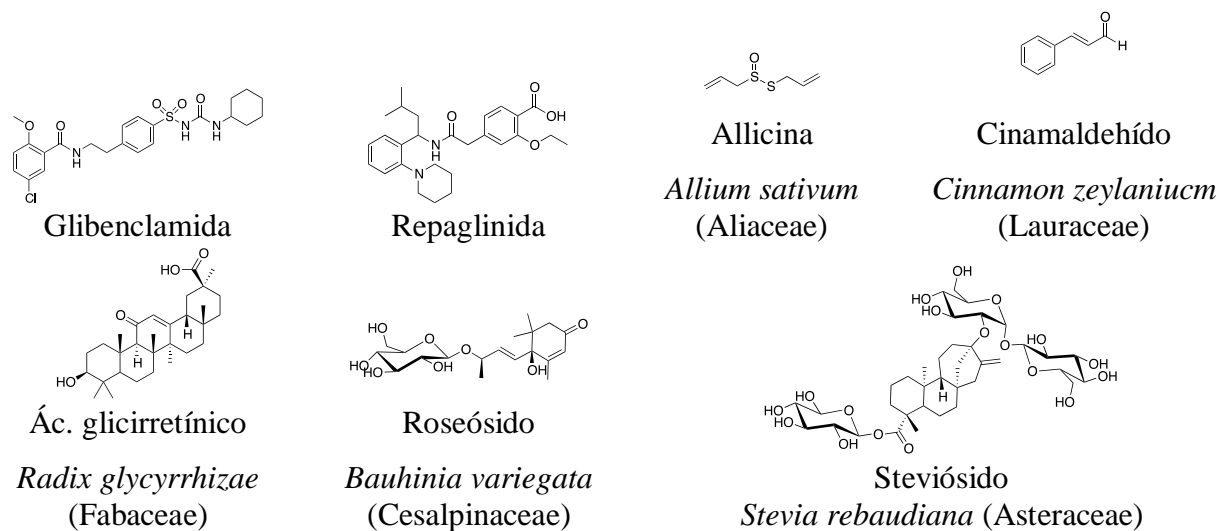
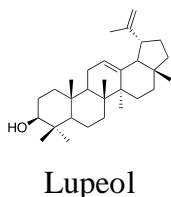
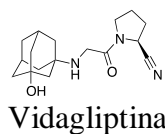


Figura 4. Agentes hipoglucemiantes de acción directa en el páncreas.

Los fármacos que aumentan la secreción de insulina por vía extrapancreática actúan como miméticos de GLP-1 o inhibiendo la actividad de DPP4. El producto que se comercializa actualmente es la exenatida, un derivado sintético de la hormona exenidina-4 que se descubrió en la saliva del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*). El efecto incretina de la exenatida se debe a que este producto funciona como mimético del GLP-1. De manera adicional, se ha demostrado que extractos de *Cichorium intybus* (Asteraceae) y de *Agave tequilana* (Agavaceae) aumentan la actividad de GLP-1 (Campbell y Drucker, 2013; Carramiñana, 2014; Quintanilla-García et al., 2010; Ríos et al., 2016)

Otro tipo de fármacos que aumentan la secreción de insulina por vía extrapancreática son los inhibidores de DPP4; estos evitan la degradación de las incretinas favoreciendo así su actividad por mayor tiempo. A este grupo pertenecen las gliptinidas, inhibidores competitivos de DPP4. Estudios *in vitro* han permitido comprobar que algunas plantas antidiabéticas inhiben a DPP4; sin embargo, no se ha logrado caracterizar los principios activos de todas ellas. En la Figura 5 se muestran algunos ejemplos (Campbell y Drucker, 2013; Carramiñana, 2014; Quintanilla-García et al., 2010; Ríos et al., 2016).

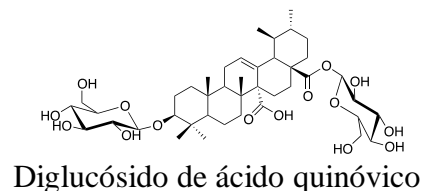
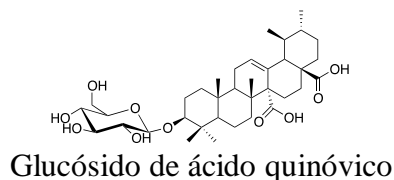
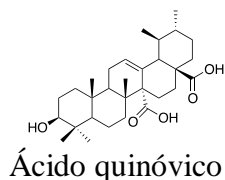


Hedera nepalensis (Araliaceae)

Pterocarpus marsupium (Fabaceae)

Eugenia jambolana (Mirtaceae)

Agonia cretica (Zigofilaceae)



Fagonia cretica (Zigofilaceae)

Figura 5. Inhibidores de la enzima DDP4.

1.1.4.3 Enzimas α -glucosidasas y agentes farmacológicos que inhiben su actividad.

1.1.4.3.1 Generalidades de las enzimas α -glucosidasas.

Las enzimas α -glucosidasas pertenecen a las glucosidasas hidrolasas que se encargan de catalizar la hidrólisis de enlaces O-, N- y S glucosídicos para liberar carbohidratos en forma de hemiacetales. Estas enzimas están presentes en una gran cantidad de organismos y llevan a cabo funciones importantes en el metabolismo de carbohidratos y en el procesamiento de glicoproteínas (Okuyama et al., 2016; Ghani, 2015).

Las glucosidasas hidrolasas se clasifican en más de 100 familias (GH1-GH100); las α -glucosidasas de interés para el presente trabajo pertenecen a las familias G13 y G31. Esta clasificación las agrupa con base en la similitud de sus secuencias de aminoácidos, por lo que existe una alta conservación en la maquinaria catalítica y en los mecanismos moleculares de reacción dentro de los miembros de una misma familia. Las enzimas de la familia GH31 son el blanco terapéutico de los fármacos inhibidores de α -glucosidasas utilizados en el tratamiento de la DMT2 (Lin et al., 2016; Okuyama et al., 2016; Ghani, 2015).

ANTECEDENTES

Las α -glucosidasas de la familia GH31 llevan a cabo reacciones de hidrólisis con retención de la configuración anomérica; esta reacción sucede en presencia de un agente con un par conjugado ácido-base y de un nucleófilo como glutamato y aspartato. La reacción procede en dos etapas mediante una doble eliminación y la formación de un intermediario con unión covalente entre la enzima y el glucósido. En el primer paso de la reacción, un aminoácido actúa como nucleófilo atacando al centro anomérico desplazando a la aglicona o a un monómero de azúcar, permitiendo la formación del intermediario enzima-glucósido; en esta misma etapa, el resto de los aminoácidos dentro del sitio catalítico pueden funcionar como catalizadores ácidos ya que protonan al oxígeno del enlace glucosídico. En el segundo paso, el intermediario enzima-glucósido se hidroliza por acción de otro aminoácido que funciona como catalizador básico para desprotonar una molécula de agua, desplazando a la enzima del glucósido y liberando α -D-glucosa. El mecanismo detallado de esta reacción se presenta en la Figura 6. Las enzimas de la familia GH13 que participan en el metabolismo humano también tienen un mecanismo de hidrólisis con retención de la configuración anomérica, no obstante difieren de las enzimas de la familia GH31 en los aminoácidos que funcionan como catalizadores, así como en el reconocimiento molecular de sustratos e inhibidores (Lin et al., 2016; Nakai et al., 2005).

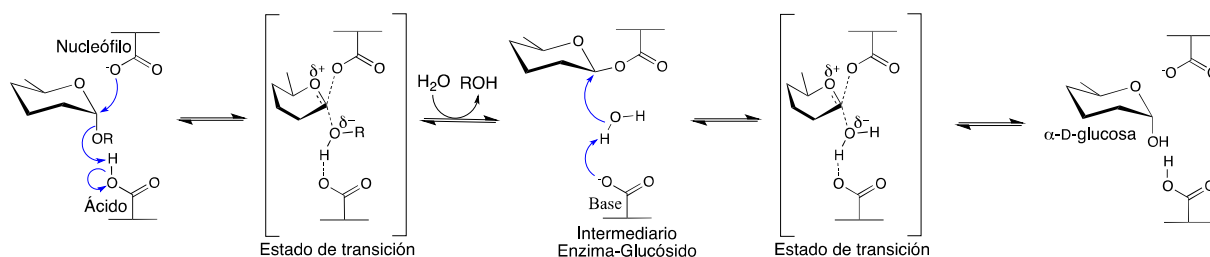


Figura 6. Mecanismo de hidrólisis de enzimas α -glucosidasas con retención de la configuración anomérica.

La diferencia en el reconocimiento molecular de diferentes sustratos da la pauta para agrupar a las enzimas α -glucosidasas dentro de tres grupos o tipos (I-III). Las enzimas de tipo I pertenecen a la familia GH13 y se encuentran en bacterias, actinomicetos e insectos, estas enzimas muestran mayor afinidad por sustratos heterogéneos (sacarosa o compuestos glucosilados) que por sustratos homogéneos (oligosacáridos de maltosa) y prácticamente no

hidrolizan sustratos de tipo polimérico (almidón). Las enzimas de tipo II y III pertenecen a la familia GH31 y prefieren sustratos de tipo homogéneo poliméricos y prácticamente no actúan sobre sustratos heterogéneos. Las enzimas de tipo II se encuentran en el reino fúngico mientras que las de tipo III están presentes en plantas y animales (Lin et al., 2016; Nakai et al., 2005).

Las enzimas α -glucosidasas humanas se encuentran en la membrana celular de los enterocitos del intestino delgado y se encargan de hidrolizar los carbohidratos complejos provenientes de la dieta como almidón, dextrinas y disacáridos, para liberar α -D-glucosa y otros monosacáridos que se absorben a nivel intestinal. Las principales α -glucosidasas intestinales que participan en la digestión de los carbohidratos son las subunidades N- y C-terminales de las enzimas maltasa-glucoamilasa (N-MGAM y C-MGAM) y sacarasa-isomaltasa (N-SI y C-SI). Ambas enzimas (MGAM y SI) tienen actividad de maltasa; sin embargo, cada una de ellas tiene diferente actividad según su afinidad hacia sustratos específicos. La subunidad N-MGAM tiene actividad de maltasa mientras que la subunidad C-MGAM tiene actividad de amilasa. La subunidad N-SI actúa como isomaltasa y la C-SI como sacarasa. La distribución de estas enzimas en el intestino delgado es muy dinámica y varía por secciones anatómicas; en general, la actividad maltasa de N-MGAM se conserva igual a lo largo de todo el intestino delgado y la actividad de amilasa de C-MGAM es mayor en la región cercana a la válvula ileocecal; por otro lado, la actividad de isomaltasa de N-SI es similar en el yeyuno e íleon mientras que la mayor actividad sacarasa de C-SI se encuentra en el íleon (Lin et al., 2016; Nakai et al., 2005).

1.1.4.3.2 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.

La hiperglucemia posprandial contribuye de manera significativa al desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares, principalmente de enfermedades cardiovasculares, por esta razón es importante disminuir los picos de glucosa después de consumir alimentos. Dentro de todos los fármacos antidiabéticos, los inhibidores de las enzimas α -glucosidasas son los más efectivos en disminuir la hiperglucemia postprandial, por ello representan una herramienta farmacológica importante en el control de la DMT2. De hecho, recientemente, la Federación Internacional de Diabetes publicó un algoritmo para el tratamiento de la diabetes en donde se

ANTECEDENTES

considera a los inhibidores de las α -glucosidasas como fármacos de primera, segunda y tercera elección. Estos fármacos actúan inhibiendo la acción de las α -glucosidasas intestinales con la finalidad de retardar la digestión y absorción de los carbohidratos provenientes de la dieta, controlando así los niveles de glucosa y previniendo la hiperglucemia posprandial (Derosa y Maffioli, 2012; Ghani, 2015). Los inhibidores de las enzimas α -glucosidasas se usan en monoterapia o en combinación con hipoglucemiantes orales que no han funcionado adecuadamente en el control de la glucosa posprandial; sin embargo, estos fármacos son más efectivos en el tratamiento de pacientes recién diagnosticados con DMT2 o en condiciones prediabéticas. El uso de estos medicamentos está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad a estos fármacos, en pacientes con cetoacidosis, en casos de enfermedad inflamatoria intestinal o úlceras en el colon, en personas con obstrucción intestinal o con desórdenes digestivos. Los efectos adversos provocados por el uso de estos medicamentos son flatulencias en un 78 % y diarrea en un 14 % de los pacientes. La medicación con inhibidores de α -glucosidasas debe iniciarse con dosis bajas e ir aumentándola gradualmente para evitar la aparición de los efectos adversos e identificar la mínima dosis adecuada para controlar la hiperglucemia posprandial (Derosa y Maffioli, 2012).

Los medicamentos inhibidores de las α -glucosidasas que se emplean actualmente en el tratamiento de la DMT2 son acarbosa, miglitol y voglibosa (Figura 7, Ghani, 2015). La acarbosa se introdujo al mercado en el año 1990 en Alemania con el nombre de GlucobayTM, y actualmente es el fármaco inhibidor de las enzimas α -glucosidasas más utilizado en la clínica. Es un pseudotetrasacárido que contiene un átomo de nitrógeno entre la primera y segunda unidad de glucosa, y se aisló por primera vez de la bacteria *Actinoplanes utahences*. Existe una gran similitud estructural entre la acarbosa y los sustratos naturales de las α -glucosidasas, por lo que la acarbosa se comporta como un inhibidor competitivo de estas enzimas. La afinidad de la acarbosa por las glucosidasas es diversa y presenta mejor actividad contra enzimas glucoamilasas seguido de sacarasas, maltasas y, por último, dextranasas. Además de controlar efectivamente la hiperglucemia posprandial, la acarbosa ofrece un efecto cardioprotector mediante la reducción de la presión sanguínea, la mejora de los niveles de triglicéridos en sangre y la disminución de la

inflamación; también, favorece la liberación de GLP1 (Dash, et al., 2017; Derosa y Maffioli, 2012, Ghani, 2015).

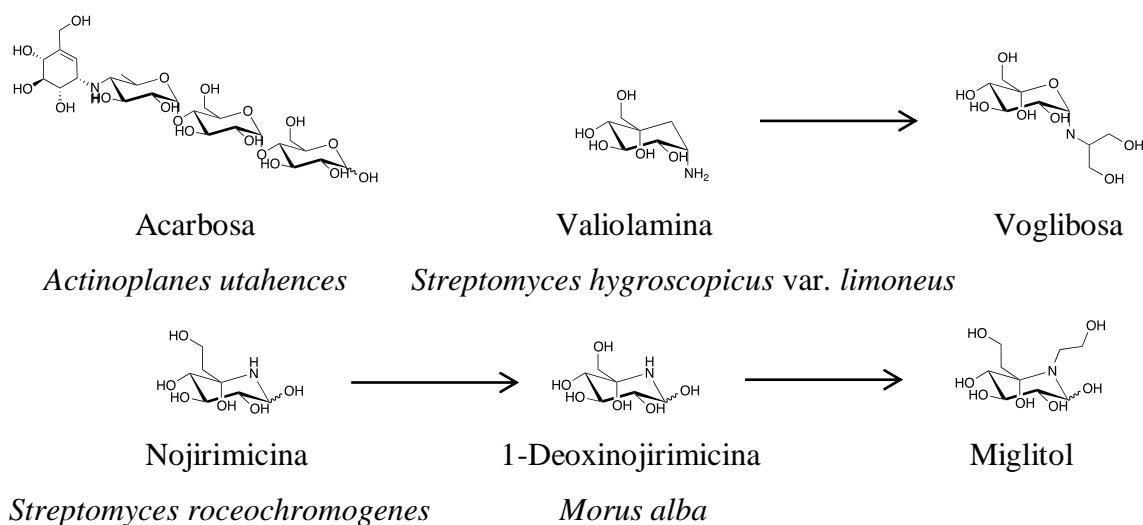


Figura 7. Fármacos inhibidores de las α -glucosidasas y sus precursores naturales.

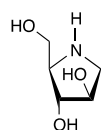
El miglitol es un análogo de la D-glucosa en el cual el oxígeno que forma parte del anillo pirano esta remplazado por un átomo de nitrógeno; este producto es un derivado sintético del alcaloide nojirimicina. Este es un metabolito secundario aislado de *Streptomyces roseochromogenes* que sirvió como prototipo para la síntesis de derivados con mejor actividad como inhibidores de α -glucosidasas. De los derivados de síntesis, la 1-desoxinojirimicina se seleccionó como base para la obtención de derivados N-hidroxilados, de los cuales el miglitol resultó ser el más activo. Cabe mencionar, que posteriormente se descubrió que la 1-desoxinojirimicina es un producto natural de la especie vegetal *Morus alba*. El miglitol es un inhibidor reversible de las enzimas α -glucosidasas que se aprobó como medicamento para tratar la DMT2 en 1999 y disminuye la aparición de retinopatía mediante el control de la presión sanguínea (Dash et al., 2017; Ghani, 2015).

La voglibosa es un derivado semisintético del producto natural valiolamina aislado de *Streptomyces hygroscopicus var. limoneus*. La estructura química de la voglibosa consiste en un núcleo de tetraol-ciclohexano, análogo de la glucosa. Es el fármaco inhibidor de las α -

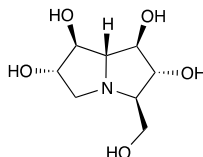
glucosidasas de más reciente incorporación en el mercado que inhibe a glucoamilasas, sacarosas y maltasas. Además, de disminuir la digestión de los carbohidratos, este fármaco promueve la liberación de GLP1 y controla los niveles de insulina en sangre; también se ha demostrado que mejora la secreción y sensibilidad de insulina (Dash et al., 2017; Ghani, 2015; Ríos et al., 2016).

Como puede observarse con los ejemplos anteriores, los productos naturales son una importante fuente de compuestos inhibidores de α -glucosidasas y, especialmente, en el reino vegetal existen numerosas especies que son valoradas por sus propiedades antihiper glucémiantes; generalmente, la actividad de estas se debe a la presencia de fenoles, flavonoides y derivados del ácido caféico (Andrade-Cetto et al., 2008; Kumar et al., 2012; Mata et al., 2013; Yang et al., 2015). Mencionar todos los compuestos naturales que hasta la fecha han sido descritos como inhibidores de α -glucosidasas resultaría demasiado extenso, por lo tanto, en la Figura 8 sólo se presentan ejemplos selectos (Dash et al., 2017; Ghani, 2015; Kumar et al., 2011; Ríos et al., 2016

Iminoazúcares

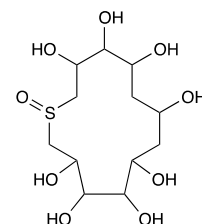


1,4-dideoxi-1,4-imino-D-arabinol
Angylocalyx boutiqueanus
(Fabaceae)



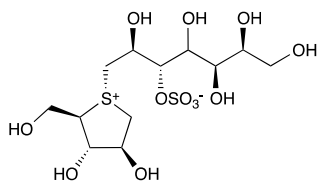
(+)-Casuarina
Cuasarina equisetifolia
(Casuarinaceae)

Ciclitoles

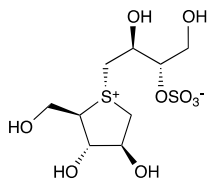


Thiociclitol
Salacia reticulata
(Celastraceae)

Tioazúcares



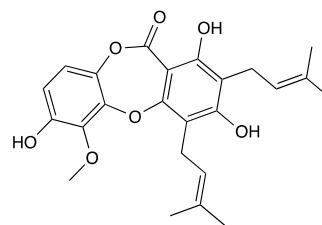
Kotalanol



Salicinol

Salacia reticulata
(Celastraceae)

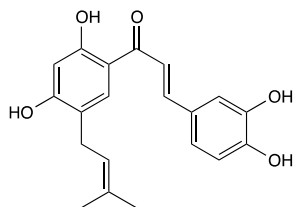
Depsidonas



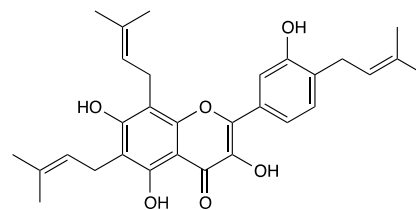
Brevipsidona D
Garcinia brevipedicellata
(Clusiaceae)

Figura 8. Productos naturales inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.

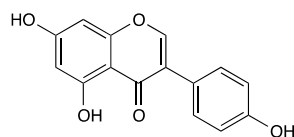
Flavonoides



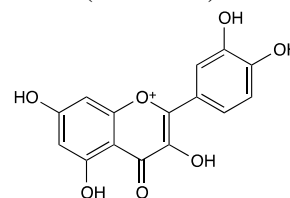
Brousochalcona A
Broussonetio papyrifera
(Moraceae)



Dorsilurina F
Dorstenia sp.
(Moraceae)

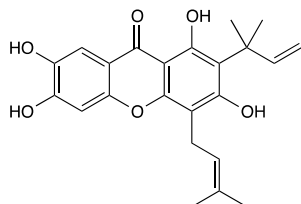


Genisteina
Flemingia vestia (Fabaceae)
Vicia faba (Fabaceae)
Glycine max (Fabaceae)

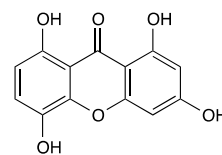


Cianidina
Rubus sp. (Rosaceae)
Vaccinium sp. (Ericaceae)
Malus domestica (Rosaceae)

Xantonas

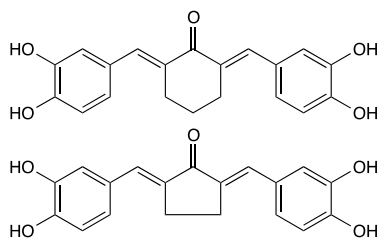


Brousochalcona A
Broussonetio papyrifera
(Moraceae)



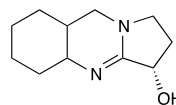
Tetrahidroxi-xantona
Swertia mussoti
(Gentianaceae)

Curcuminoides

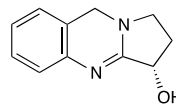


Curcuma longa
(Zingiberaceae)

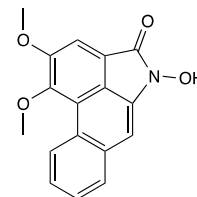
Alcaloides



Vasicinol



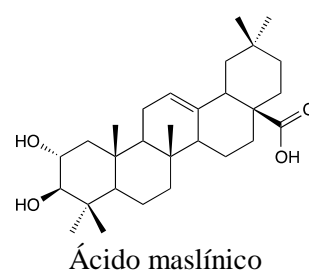
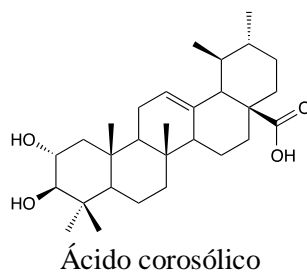
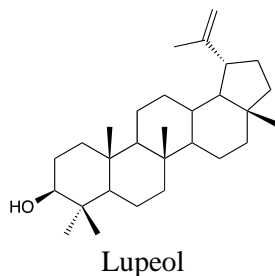
Vasicina
Adhatoda vasica
(Acanthaceae)



Piperumbellactama C
Piper umbellatum
(Piperaceae)

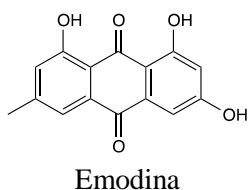
Figura 8. Productos naturales inhibidores de las enzimas α -glucosidasas (Continuación).

Terpenoides

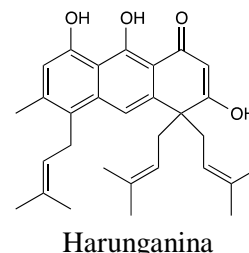


Lagerstroemia speciosa (Litraceae)

Antraquinonas

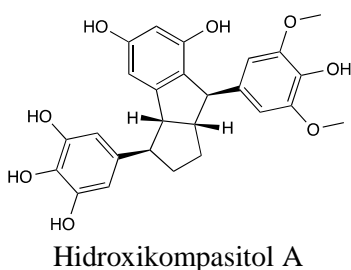


Polygonum multiflorum (Polygonaceae)



Harungana madagascarensis (Hypericaceae)

Estilbenos



Syagrus romanzoffiana (Arecaceae)

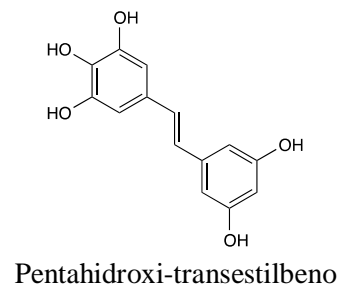
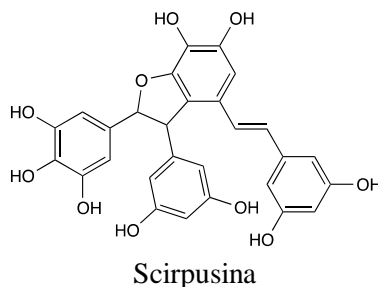


Figura 8. Productos naturales inhibidores de las enzimas α -glucosidasas (Continuación).

1.2 Generalidades sobre las especies vegetales estudiadas.

1.2.1 Género *Salvia*.

El género *Salvia* (Lamiaceae) incluye arbustos trepadores y hierbas anuales o perennes con flores que presentan cáliz y corola bilabiados. Es el género más diverso de su familia y comprende aproximadamente 1000 especies, las cuales según Bentham (1876) se pueden dividir en los subgéneros *Calosphace*, *Leonia*, *Salvia* y *Sclarea* (Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez, 2011; Wu et al., 2012). Las salvias se distribuyen ampliamente en todo el mundo. Sin embargo,

la mayor diversidad se concentra en tres regiones principales; la más importante se encuentra en el centro y sur del continente Americano en donde crecen aproximadamente 500 especies; la segunda zona, se ubica en Asia central y el Mediterráneo en donde habitan alrededor de 250 especies; y, finalmente, en la zona este del continente Asiático con alrededor de 90 especies. México posee la mayor diversidad de especies en el mundo ya que cuenta con 300 especies de las cuales el 88% son endémicas. Las especies mexicanas pertenecen en su mayoría al subgénero *Calosphace*, aunque algunas pocas pertenecen al subgénero *Leonia*. Las regiones que contienen el mayor número de especies de salvias en México incluyen las zonas montañosas del centro y sur del país y los bosques de las zonas áridas y desérticas (Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez, 2011; Wu et al., 2012).

1.2.1.1 Composición química y propiedades farmacológicas del género *Salvia*.

El estudio químico de diversas especies de *Salvia* ha permitido establecer que el género es una valiosa fuente de metabolitos secundarios bioactivos; sus productos característicos (Figura 9) incluyen metabolitos secundarios de tipo terpenoide (monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, sesterterpenoides, y triterpenoides), esteroides, y polifenoles, principalmente flavonoides (Bonito et al., 2011; Reza et al., 2016; Wu et al., 2012). Los diterpenoides constituyen el grupo de productos naturales más abundantes y representativos de las salvias (*ca.*, 70%); su variedad estructural es grande pues se han descrito diterpenoides de tipo abietano, clerodano, pimarano y labdano, siendo los dos primeros los más diversos. En la Figura 10 se presentan ejemplos selectos de metabolitos de tipo diterpenoide presentes en algunas salvias (Reza et al., 2016; Wu et al., 2012). Cabe mencionar que de las 1000 especies del género, únicamente alrededor de 134 especies han sido estudiadas con el objetivo de establecer su composición química y sus propiedades farmacológicas (Reza et al., 2016; Wu et al., 2012).

Gracias a la enorme diversidad de la composición química del género *Salvia*, sus especies ofrecen una gran variedad de propiedades medicinales, siendo valoradas por su uso en el tratamiento de diversos padecimientos desde la antigüedad. *S. miltiorrhiza* Bunge, es una de ellas

la cual ha sido empleada en china por siglos como auxiliar para el tratamiento de la diabetes (Huang et al., 2015). En México, el uso de salvias para el tratamiento de numerosos padecimientos es un hecho bien documentado; algunas de las más utilizadas se indican en la Tabla 1 (Aguilar et al, 1994; Clebsch, 2005; Dziurzynski et al., 2013; Firuzi et al., 2013; Instituto Nacional Indigenista, 1994; Reza et al., 2016; Wang, 2010; Wu et al., 2012). Por esta razón, el estudio farmacológico del género ha llamado la atención de diversos grupos de investigación alrededor del mundo, y como producto de estos trabajos se ha logrado demostrar que diversas especies poseen propiedades antimicrobianas, antivirales, antifúngicas, antihelmínticas, antioxidantes, citotóxicas, anti-VIH, y antidiabéticas, por mencionar algunas (Firuzi et al., 2013; Moridi Farimani et al., 2011; Reza et al., 2016; Weng y Wang, 2000; Wu et al., 2012).

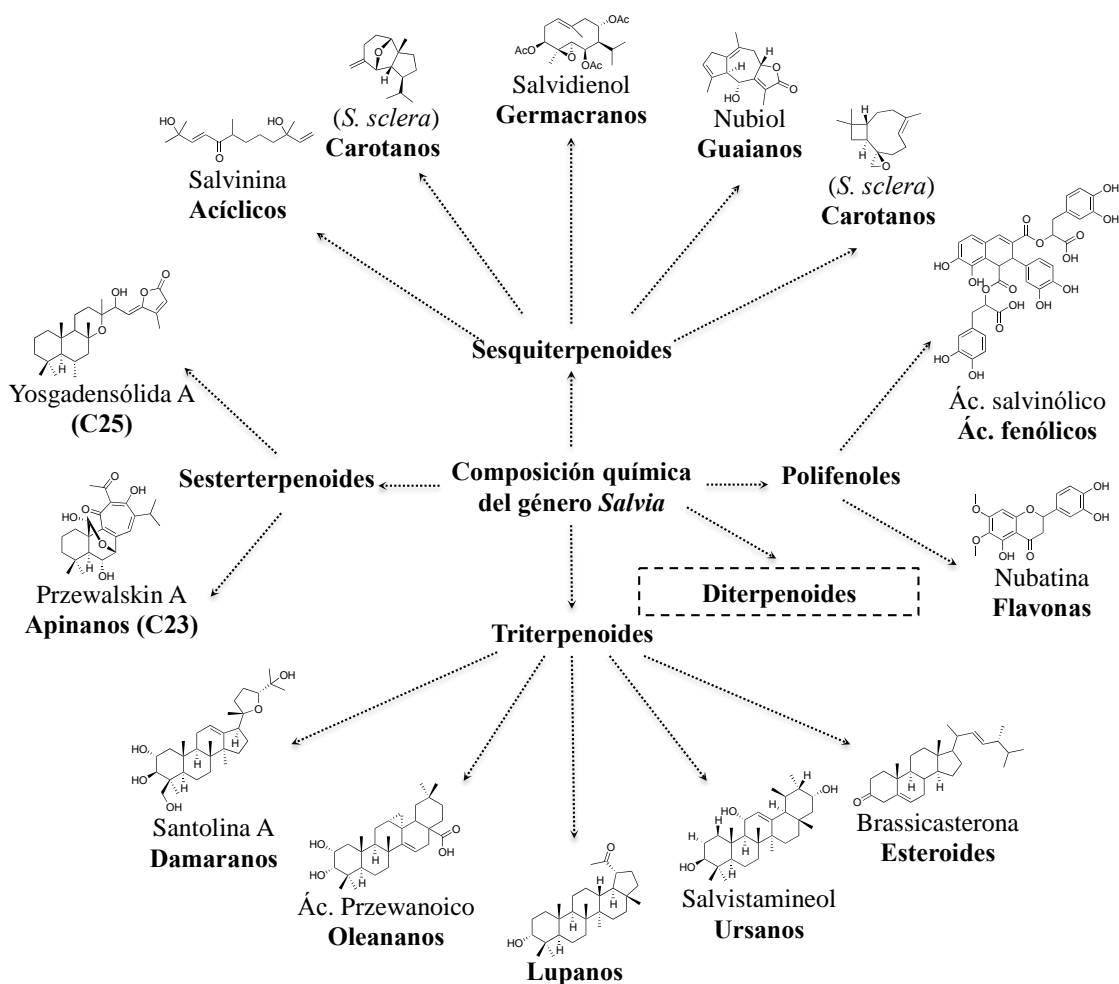


Figura 9. Principales tipos de metabolitos presentes en el género *Salvia*.

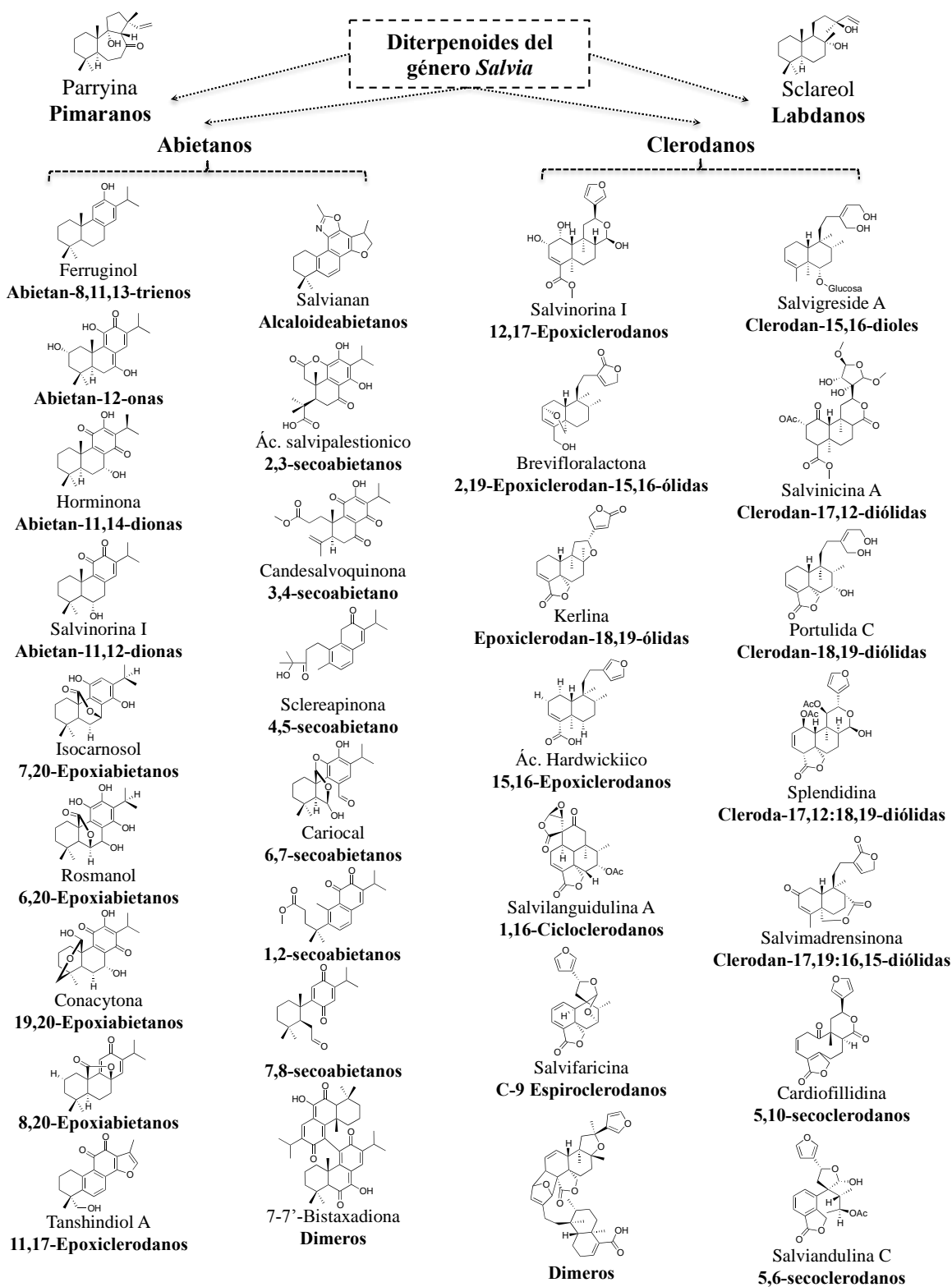


Figura 10. Tipos y ejemplos selectos de diterpenoides del género *Salvia*.

Tabla 1. Plantas medicinales del género *Salvia* más utilizadas en México.

Uso medicinal	Especie
Tratamiento de la diarrea	<i>S. adenophora</i> Fernald <i>S. mexicana</i> Sessé & Mociño <i>S. microphylla</i> Bunge <i>S. pinguifolia</i> Fernald <i>S. polystachya</i> Ortega <i>S. reptans</i> Jacquin
Antirreumático	<i>S. amarissima</i> Ortega <i>S. divinorum</i> Epling & Játiva
Tratamiento de disentería	<i>S. coccinea</i> Buchoz
Tratamiento del dolor	<i>S. divinorum</i> <i>S. hispanica</i> Garsault
Tratamiento de tos y bronquitis	<i>S. elegans</i> Vahl <i>S. lavanduloides</i> Kunth <i>S. regla</i> Cavanilles
Tratamiento del insomnio	<i>S. elegans</i> <i>S. microphylla</i> <i>S. fulgens</i> Cavanilles
Anticoncéptico	<i>S. leucantha</i> Cavanilles
Antipalúdico	<i>S. shannoni</i> Donnell

Con relación a la actividad antidiabética del género *Salvia*, diversos estudios han demostrado que algunas especies son hipoglucémiantes y/o antihiperoglucémiantes. Las especies con actividad hipoglucémiante son *S. miltiorrhiza* (Raoufi et al., 2015), *S. splendens* Sellow (Fatma Abd-Elkader et al., 2012), *S. hypoleuca* Benthham (Estakhr y Javdan, 2011), *S. officinalis* Linnaeus (Lachenmeier y Walch, 2011), *S. fruticosa* Miller (Perfumi et al., 1991) y *S. hispanica* (Beltran-Orozco y Vargas-Martinez 2011). En relación a la actividad de *S. miltiorrhiza* se ha establecido que el principio activo de la especie es el ácido salvinólico el cual incrementa la secreción de insulina por activación de la vía AMPK (Raoufi et al., 2015). También se ha establecido que el efecto hipoglucémiante de *S. officinalis* se debe a la presencia de diterpenoides agonistas de los receptores PPAR γ , relacionados en el transporte de glucosa (Lachenmeier y Walch, 2011). Con respecto a *S. hispanica* conocida con el nombre común de chía, la cual es valorada en México por sus propiedades alimenticias y medicinales desde tiempos prehispánicos; recientemente se ha comprobado que el consumo de las semillas de ésta planta favorece la reducción de peso en pacientes con DMT2 (Vuksan, 2017).

También, se ha demostrado que algunas especies contienen principios inhibidores de la actividad enzimática de las α -glucosidasas y entre ellas destacan *S. syriaca* Linnaeus (Bahadori et al., 2016), *S. santolinifolia* Boissier (Bahadori et al., 2016), *S. limbata* Meyer, *S. atropatana* Epling, *S. nemerosa* Linnaeus, *S. multicaulis* Vahl (Eskandani et al., 2016) y *S. moorcraftiana* Wallich (Khan et al., 2002); en la mayoría de los casos esta actividad se atribuye a la presencia de compuestos polifénolicos. Sin embargo, en un estudio reciente sobre la especie *S. chamaedryoides* Cavanilles, se comprobó que algunos de sus diterpenoides inhiben las α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae in vitro* (Bisio et al., 2017).

1.2.1.2 *Salvia circinata* Cavanilles (Lamiaceae).

Salvia circinata (Syn: *S. amarissima*) es una planta herbácea perenne que mide de 30 cm a 2 m de altura y crece de forma silvestre en pastizales, matorrales y bosques xerófilos (Figura 11). La distribución de *S. circinata* es muy basta dentro del territorio mexicano, encontrándose en el Valle de México, Michoacán, Hidalgo, Guanajuato, Morelos, Chiapas, Oaxaca y San Luis Potosí. La especie es de gran interés en la medicina popular de nuestro país pues se usa en el tratamiento de la diabetes, úlceras y parásitos (Calderón y Rzedowski, 2010; López et al., 2010). Así, en la localidad de Huauchinango en el estado de Puebla se consume por sus propiedades antidiabéticas y, por su eficacia a nivel popular, los lugareños la llaman insulina (Comunicación personal, Bye Robert, Instituto de Biología, UNAM; MEXU R. Bye y E. Linares 37855).



Figura 11. *Salvia circinata* Cavanilles (Lamiaceae).

1.2.1.2.1 Estudios fitoquímicos y farmacológicos de *S. circinata*.

Estudios químicos de la especie *S. circinata* reportan el aislamiento de algunos diterpenoides de tipo clerodano y seco-clerodanos los cuales incluyen a la amarisólida (**1**), teotihuacanina (**2**) y amarisinas A-C (**3-5**), además del flavonoide pedalitina (**6**), sus estructuras se muestran en la Figura 12 (Bautista et al., 2015; Bautista et al, 2016; Maldonado et al., 1996). El estudio de las propiedades farmacológicas de la especie es escaso, hasta el momento sólo se cuenta con el trabajo realizado por Bautista y colaboradores (2015; 2016), quienes demostraron la actividad citotóxica de los compuestos **2-5** contra líneas celulares tumorales de humano y su efecto modulador sobre la línea celular MCF-7 resistente a vinblastina.

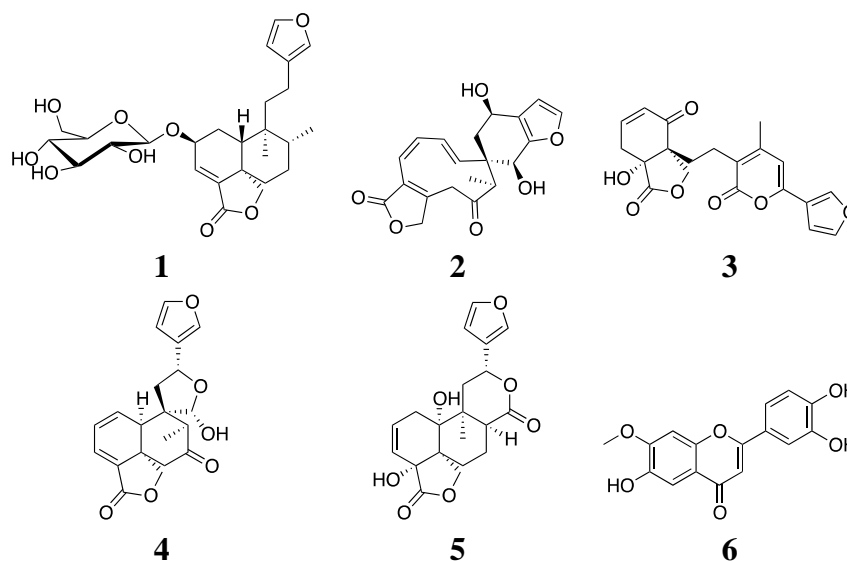


Figura 12. Metabolitos aislados de las partes aéreas de *S. circinata*.

1.2.2 Género *Vauquelinia*.

El género *Vauquelinia* pertenece a la familia de las rosáceas; son árboles pequeños y/o arbustos que crecen en zonas áridas y semiáridas de México y Estados Unidos. Humboldt y Bonpland describieron el género en 1807 y, posteriormente, el botánico José Francisco Correa le dio su nombre en honor al químico y farmacéutico francés Louis Nicolas Vauquelin. El género *Vauquelinia* comprende once especies *V. angustifolia* Rydberg, *V. australis* Standley, *V.*

californica Sargent, *V. corymbosa* Bonpland, *V. heterodon* I. M. Johnston, *V. karwinskyi* Maxim, *V. latifolia* Standley, *V. pauciflora* Standley, *V. potosina* Standley, *V. retherfordii* I. M. Johnston, y *V. torreyi* S. Watson. De estas, sólo *V. corymbosa* ha sido sujeto de estudios químicos y biológicos (Hess y Henrickson 1987; Rzedowski y Calderón, 2005).

1.2.2.1 *Vauquelinia corymbosa* Bonpland (Rosaceae).

Es una especie polimorfa y calcifílica que habita regiones semiáridas, desde el sur de los Estados Unidos en Texas hasta el altiplano mexicano en el estado de Hidalgo y se le encuentra principalmente en los matorrales xerófilos de Querétaro, Guanajuato e Hidalgo; y las regiones áridas de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. La especie se conoce con los nombres comunes de palo alto, laurel y serrucho (por la forma de sus hojas). *V. corymbosa* es un árbol pequeño o arbusto de copa redondeada con ramas jóvenes siendo muy variada la forma y tamaño de sus hojas (Figura 13; Hess y Henrickson 1987; Rzedowski y Calderón, 2005).



Figura 13. *Vauquelinia corymbosa* Bonpland (Rosaceae).

La información etnomédica sobre la especie es muy escasa; sin embargo, tras una investigación de campo realizada en la población de San Borja, Chihuahua se encontró que esta planta se emplea como auxiliar en el tratamiento de la DMT2; los pobladores refieren que consumen la planta en forma de infusión y la beben como agua de uso (Comunicación personal, Bye Robert, Biología, UNAM; MEXU R. Bye y E. Linares 36951).

1.2.2.1.1 Estudios fitoquímicos y farmacológicos de *V. corymbosa*.

Trumbull y col. (1975) publicaron el estudio químico y farmacológico de un extracto orgánico elaborado con etanol a partir de las partes aéreas de *V. corymbosa*; en ese estudio describieron la presencia en la planta de tres triterpenoides, los ácidos ursólico (**7**) y betulínico (**8**), así como el uvaol (**9**) (Figura 14). En ese mismo trabajo, se describe la actividad antitumoral del extracto y los metabolitos **7-9**. Posteriormente, en un estudio *in vitro* que precede al presente (Flores-Bocanegra, 2014), se demostró que el extracto acuoso de la planta y sus fracciones orgánica y acuosa inhibían la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* ($CI_{50} = 28.6, 39.1$ y 75.6 ppm, respectivamente). De manera adicional, se inició el estudio químico de fracción más activa de la cual se aisló prunasina (**10**), piceína (**11**) y (-)-*epi*-catequina (**12**); los metabolitos **10** y **12** se caracterizaron como inhibidores mixtos de la enzima de levadura. Desafortunadamente, al disponer de una pequeña cantidad de muestra vegetal no fue posible obtener otros constituyentes de la planta (Flores-Bocanegra, 2014; Trumbull et al., 1975).

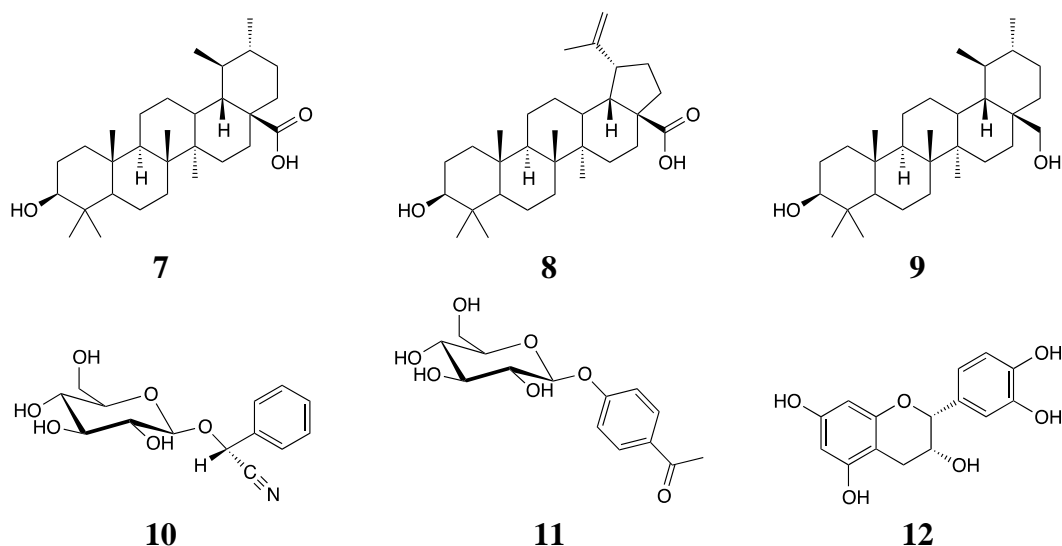


Figura 14. Metabolitos aislados de las partes aéreas de *V. corymbosa*.

2 HIPÓTESIS

El uso popular de las especies *Salvia circinata* Cav. (Lamiaceae) y *Vauquelinia corymbosa* Bonpl. (Rosaceae), así como consideraciones de tipo quimiotaxonómico, sugieren que los preparados medicinales tradicionales de estas especies poseen propiedades hipoglucemiantes y/o antihiperoglucémicas debido a la presencia de principios activos susceptibles de purificación mediante el empleo de los métodos químicos apropiados.

3 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

La DMT2 es un grave problema de salud a nivel mundial con un impacto económico negativo en los sistemas de salud oficiales de la mayoría de los países y, en particular, en aquellos en vías de desarrollo. De manera particular, México ocupa el sexto lugar en el mundo por el número de diabéticos, con aproximadamente 11.5 millones de mexicanos adultos diagnosticados con la enfermedad (FID 2015) y un porcentaje alto de estos pacientes no cuentan con la atención médica adecuada. Así, resulta evidente que el sistema nacional de salud mexicano no cuenta con los recursos necesarios para atender de manera eficiente el creciente número de pacientes diabéticos; por lo tanto, ante los estragos de la enfermedad y la necesidad de tratamientos eficaces, seguros, accesibles y baratos, la población, principalmente la de escasos recursos, consume plantas medicinales como primera opción terapéutica, propiciando así el uso de la fitoterapia. Esta práctica ha adquirido un gran auge a nivel mundial, apoyándose en múltiples argumentos, entre las que destacan: la firme creencia de que lo natural es sinónimo de inocuo, la carencia de atención médica oficial oportuna, el alto costo de los medicamentos alopáticos y, en muchas regiones del mundo, simplemente por el apego a las tradiciones. Este incremento en el uso de remedios herbolarios ha generado un mercado creciente y poco regulado de plantas medicinales, pues desafortunadamente la información científica que respalde la eficacia, inocuidad, desarrollo sustentable, composición química y otros aspectos farmacéuticos de estos recursos es muy escasa (ENSANUT, 2013; FID, 2015; OMS, 2017).

En este marco de referencia, se inició la presente investigación con el objetivo de determinar la eficacia preclínica como agentes hipoglucemiantes y/o antihiperoglucémicos y establecer los parámetros de calidad de *Salvia circinata* Cav. (Lamiaceae) y *Vauquelinia corymbosa* Bonpl. (Rosaceae) con el propósito de fomentar su uso racional. De manera adicional, se pretendía descubrir principios activos útiles en el tratamiento de la diabetes, en particular de inhibidores de las enzimas α -glucosidasas. Estos agentes son los más eficaces para el control de la hiperglucemia postprandial, además de que ayudan a disminuir la aparición de complicaciones micro y macrovasculares y no provocan aumento de peso, además son altamente

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

seguros pues no provocan episodios de hipoglucemia (Dash et al., 2017; Ghani 2015; Moorthy, et. al., 2012; Ríos et al., 2016).

Para el cumplimiento de estos objetivos generales se plantearon los siguientes particulares:

A. Establecer la toxicidad aguda de los extractos de *S. circinata* y *V. corymbosa* aplicando el protocolo descrito por Lorke.

B. Determinar el potencial hipoglucemiante agudo en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos de una infusión obtenida a partir de las partes aéreas de *S. circinata* mediante la aplicación de un ensayo farmacológico *in vivo*.

C. Determinar el potencial antihiperglucémico de las especies *V. corymbosa* y *S. circinata* mediante un ensayo *in vitro* de inhibición de las enzimas α -glucosidasas. El resultado permitirá sugerir futuros estudios conducentes a determinar la eficacia de los mismos preparados en ensayos farmacológicos *in vivo*.

D. Aislar y purificar los metabolitos secundarios presentes en las especies *V. corymbosa* y *S. circinata* a través de la aplicación de procedimientos fitoquímicos apropiados; y realizar su caracterización aplicando las técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas.

E. Identificar los principios activos de las especies seleccionadas, determinando el efecto de los metabolitos secundarios en los niveles de glucosa en modelos *in vivo* y determinando su actividad inhibitoria *in vitro* sobre las enzimas α -glucosidasas.

F. Determinar el tipo de inhibición de los principios activos mediante un ensayo de cinética enzimática, y realizar estudios de acoplamiento molecular o dinámica molecular para

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

predecir sus posibles sitios de unión a las enzimas α -glucosidasas y complementar los resultados de la cinética enzimática.

G. Establecer los perfiles cromatográficos de las especies seleccionadas mediante cromatografía de líquidos con el objetivo de contribuir al desarrollo de los parámetros de identidad de las especies.

H. Desarrollar y validar un método cromatográfico para la cuantificación de los metabolitos activos con el propósito de establecer una prueba de composición de tipo farmacopéica, indispensable para el control de calidad de las drogas crudas y sus preparados farmacéuticos.

4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Métodos generales.

4.1.1 Análisis cromatográficos.

El análisis de las muestras de prueba por cromatografía en capa delgada (CCD) se realizó sobre placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas con gel de sílice 60 F₂₄₅ (Merk, NJ, EE.UU.) empleando distintos sistemas de elución. Se utilizó una lámpara de UV (254 y 365 nm) para la visualización de las placas y como agente revelador se utilizó una solución de sulfato cérico amoniacal al 10% en ácido sulfúrico [12 g de Ce₂(SO₄)₃ en 22.5 ml de H₂SO₄ y 350 ml de H₂O]; para desarrollar el color las placas se calentaron a 110 °C aproximadamente por un minuto. El fraccionamiento de extractos y la purificación de los compuestos por cromatografía en columna abierta (CCA) se llevó a cabo en columnas de vidrio de distintas dimensiones empacadas con Sephadex® (LH-20; Sigma-Aldrich-Fluka, MO, EE.UU.) o con gel de sílice (60, 0.063-0.200; Merk, NJ, EE.UU.), empleando diversos sistemas de elución y aplicando técnicas convencionales. Para la purificación de los compuestos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), se utilizaron dos cromatógrafos, el primero de ellos equipado con una bomba cuaternaria modelo 2535, y dos detectores, uno de UV 2998 con arreglo de fotodiodos y un detector LSD 2424, además de un colector de fracciones automático. Se utilizó una columna de fase reversa XBridge C₁₈ con distintos gradientes de elución utilizando CH₃CN y H₂O_{dd} acidificada con 0.1% de ácido fórmico, se trabajó a un flujo de 17.0 ml/min. El segundo cromatógrafo está equipado con una bomba cuaternaria y un detector de UV 996 con arreglo de fotodiodos, se utilizó una columna SymmetryPrep RP-C8 y como sistema de elución se utilizó CH₃CN-H₂O a un flujo de 2.6 ml/min. El control de los equipos, la adquisición y el procesamiento de los datos se realizó en los programas Empower 3 y 2 (Waters, Milford, MA, EE.UU.), respectivamente. Para el establecimiento de los perfiles cromatográficos se utilizó CLAE y cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLUE-EM) ambas en fase reversa. Para el establecimiento del perfil obtenido por CLAE se empleó una columna Symmetry C₁₈ y un gradiente de elución de CH₃CN y H₂O_{dd} acidificada con

0.05% de ácido acético, con un flujo de trabajo de 6 ml/min . El cromatógrafo utilizado está equipado con una bomba cuaternaria y un detector de UV 996 con arreglo de fotodiodos. Para el control del equipo, la adquisición y procesamiento de los datos se utilizó el programa Empower 2 (Waters, Milford, MA, EE.UU). Para el establecimiento de perfiles por CLUE-EM se trabajó con una columna BEH C₁₈ y con un gradiente de elución de CH₃CN y H₂O_{dd} cada fase acidificada con 0.1% de ácido fórmico, con un flujo de trabajo fue de 0.3 ml/min. El cromatógrafo utilizado esta equipado con una bomba cuaternaria, un automuestreador, un detector de UV con arreglo de fotodiodos, una fuente de ionización de electroespray y un detector LSD SQ 2. Para el control del equipo, la adquisición y procesamiento de los datos se utilizó el programa Acquity (Waters, Milford, MA, EE.UU).

4.2 Material vegetal.

Las partes aéreas de *Vauquelinia corymbosa* se colectaron el 26 de febrero de 2012, en la localidad de San Borja, Chihuahua, México. Las partes aéreas de *Salvia circinata* se colectaron el 9 de junio de 2014, en el poblado de Huauchinango, Puebla, México. Las dos especies fueron proporcionadas e identificadas botánicamente por el Dr. Robert Bye y la M. en C. Edelmira Linares, ambos, investigadores del Instituto de Biología de la UNAM. Una muestra de referencia de cada planta se depositó en el Herbario Nacional (MEXU), R. Bye y E. Linares 36951 y 37855, respectivamente. Al recibir las muestras vegetales se dejaron secar a temperatura ambiente y al aire libre durante un periodo de 15 días y, al cabo de este tiempo, las plantas se pulverizaron en un molino de cuchillas Thomas Wiley Modelo 4.

4.3 Estudio químico de la especie *S. circinata*.

4.3.1 Preparación de los extractos.

El extracto acuoso se obtuvo por infusión a partir de las partes aéreas secas y molidas, para ello se colocaron 200 g del material vegetal en contacto con 5.5 l de agua a ebullición durante 20 min. Al cabo de este tiempo, el preparado se filtró para descartar el material vegetal, la infusión

resultante se concentró a sequedad para obtener 19 g del extracto acuoso total. El extracto orgánico se preparó vía maceración exhaustiva durante una semana, a partir de 820 g del material vegetal utilizando como disolvente una mezcla de CH₂Cl₂-CH₃OH (1:1). Posteriormente, el preparado se filtró para descartar el material vegetal y el extracto se concentró a sequedad, de este procedimiento se obtuvieron 200 g del extracto orgánico.

4.3.2 Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios.

El extracto orgánico (150 g) se sometió a un fraccionamiento primario mediante CCA sobre gel de sílice (5 kg), la elución se realizó con un gradiente el cual comenzó con un sistema de Hex-AcOEt (100:0 → 0:100) e incrementando la polaridad hasta un sistema de AcOEt-CH₃OH (0:100 → 80:20). Se colectaron eluatos de 500 ml los cuales se combinaron por su similitud cromatográfica para generar ocho fracciones primarias (O1-O8). A partir de la fracción O6 (5.2 g), eluida con Hex-AcOEt (1:9), precipitaron 3.87 g del compuesto amarisólida (**1**) (Maldonado et al., 1996).

Amarisólida (1): Sólido blanco; pf 206-208 °C; $[\alpha]_D^{20} + 64.73$ (1 mg/ml, CH₃OH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 206 (0.423); ECD (CH₃OH, c 0.1 mM, 0.1 cm); $\Delta\epsilon -7.53$ (210 nm), -7.43 (250 nm); IR (FTIR) ν_{\max} 3386, 1783, 1765 cm⁻¹; ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ_H (ppm): 7.36 (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H-15), 7.29 (1H, t, $J = 1.3$ Hz, H-16), 6.77 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-3), 6.34 (1H, dd, $J = 1.9, 0.9$ Hz, H-14), 4.62 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-2), 4.47 (1H, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.42 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-19a), 4.03 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-19b), 3.84 (1H, dd, $J = 11.8, 2.4$ Hz, H-6a'), 3.51 (1H, $J = 11.8, 6.6$ Hz, H-6b'), 3.17 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 3.15 (1H, m, H-5') 3.11 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-2'), 3.10 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-4'), 2.64 (1H, m, H-12a), 2.35 (1H, m, H-12b), 2.15 (1H, d, $J = 12.9$, H-10), 2.08 (3H, s, H-14), 1.79 (1H, ddd, $J = 13.8, 12.0, 12.0$ Hz, H-1a), 1.72 (1H, m, 6a), 1.56 (1H, m, H-8), 1.55 (1H, m, H-7), 1.47 (2H, m, H-11), 1.31 (1H, m, H-1b), 1.21 (1H, m, 6b), 0.89 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-17), 0.62 (3H, s, H-20); ¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ_C (ppm): 170.2 (C-18), 143.3 (C-4), 142.3 (C-15), 138.3 (C-16), 130.3 (C-3), 125.7 (C-13), 110.7 (C-14), 101.9 (C-1'), 76.9 (C-5'), 76.7 (C-3'), 74.1 (C-2'), 71.2 (C-19), 70.6 (C-4'),

DESARROLLO EXPERIMENTAL

69.7 (C-2), 61.6 (C-6'), 45.7 (C-5), 39.6 (C-10), 37.8 (C-9), 37.7 (C-8), 36.2 (C-8), 33.6 (C-6), 27.4 (C-11), 26.1 (C-7), 17.0 (C-12), 16.6 (C-20), 14.5 (C-17).

La fracción O5 (6.3 g), eluida con Hex-AcOEt (2:3), se aplicó sobre una columna de SEPHADEX (volumen muerto 250 ml) utilizando CH₃OH como eluyente, de este proceso se obtuvieron seis fracciones terciarias (O5-1/O5-6). A partir de la fracción O5-6 (423.5 mg) precipitaron 368.0 mg de la flavona pedalitina (**6**) (Maldonado et al., 1996), el producto se identificó por coelución cromatográfica con una muestra de referencia.

Para la resolución de la fracción O5-3 (91.0 mg), se utilizó CCA en SEPHADEX utilizando como mezcla de elución CH₃OH-acetona en proporción (1:1), este proceso permitió la obtención de 10.3 mg del biflavonoide 6,6''',3'''-trihidroxi-7,3',7''-O-trimetiloniflavona (**17**) y 15.5 mg del flavonoide 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,6-dihidroxi-7-metoxi-4H-cromen-4-ona (**18**) (Bhardwaj et al., 1988).

6,6''',3'''-trihidroxi-7,3',7''-O-trimetiloniflavona (17): polvo amarillo; pf 223–225 °C; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 271 (3.8), 330 (3.2) nm; IR (FTIR) ν_{\max} 3252, 2925, 1663 cm⁻¹; ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} (ppm): 7.32 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-6'), 7.39 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.38 (1H, dd, $J = 7.3, 2.1$, H-6'''), 7.30 (1H, d, $J = 2.2$, H-2'''), 6.96 (1H, d, $J = 8.6$, H-5'''), 6.86 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.71 (1H, s, H-8), 6.67 (1H, s, H-8''), 6.53 (1H, s, H-3), 6.49 (1H, s, H-3''), 3.92 (3H, s, OCH₃-7), 3.92 (3H, s, OCH₃-7''), 3.90 (3H, s, OCH₃-3'), 3.89 (3H, s, OCH₃-7'''); ¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} (ppm): 184.2 (C-4'''), 184.1 (C-4), 166.7 (C-2), 165.5 (C-2''), 156.3 (C-6''), 156.2 (C-6), 153.0 (C-3'''), 152.5 (C-4'), 152.4 (C-8a''), 152.3 (C-8a), 149.9 (C-3'), 148.7 (C-4'''), 147.6 (C-5), 147.6 (C-5''), 131.9 (C-1'), 131.9 (C-7''), 131.8 (C-7), 125.5 (C-1'''), 122.2 (C-6'), 120.5 (C-6'''), 117.2 (C-5'), 114.4 (C-2'''), 113.0 (C-5'''), 111.0 (C-2), 107.1 (C-4a''), 107.0 (C-4a), 104.5 (C-3'), 104.3 (C-3), 92.4 (C-8), 92.3 (C-8''), 57.4 (OCH₃-7), 57.4 (OCH₃-7''), 57.0 (OCH₃-3'), 56.9 (OCH₃-3'''); EM-AR m/z 643.1430 [M + H]⁺ (calculada para C₃₄H₂₆O₁₃, [M + H]⁺ = 643.1452).

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2-(3,4-dimetoxifenil)-5,6-dihidroxi-7-metoxi-4H-cromen-4-ona (18): Sólido amarillo; pf 212-214 °C; ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H (ppm): 7.68 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-6'), 7.56 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 7.10 (1H, dd, *J* = 8.7 Hz, H-5'), 6.96 (1H, s, H-3), 6.93 (1H, s, H-8), 3.90 (3H, s, OCH₃-7), 3.86 (3H, s, OCH₃-3'), 3.83 (3H, s, OCH₃-4'); ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H (ppm): 182.8 (C-4), 163.8 (C-2), 155.0 (C-7), 152.6 (C-5), 150.2 (C-8a), 149.6 (C-3'), 146.7 (C-4'), 130.5 (C-6), 123.6 (C-1'), 120.5 (C-6'), 112.3 (C-5'), 110.0 (C-2'), 105.7 (C-4a), 104.0 (C-3), 91.8 (C-8), 56.9 (OCH₃-7), 56.4 (OCH₃-3'), 56.3 (OCH₃-4').

La fracción primaria O6 (20 mg) se resolvió mediante CCA en SEPHADEX, la cual se eluyó con CH₃OH; este proceso permitió la purificación de 15.5 mg de apigenin-7-*O*-β-D-glucósido (**19**) (Švehlíková et al., 2004).

Apigenin-7-*O*-β-D-glucósido (19): Sólido amarillo; pf 230-232 °C; ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H (ppm): 7.92 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2' y H-6'), 6.95 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3' y H-5'), 6.83 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 6.71 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 5.08 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-1"), 3.89 (1H, d, *J* = 12.1, 2.3 Hz, H-6a"), 3.67 (1H, d, *J* = 12.1, 5.8 Hz, H-6b"), 3.54 (1H, m, H-2"), 3.45 (2H, m, H-3" y H-5"), 3.36 (1H, m, H-4").

La fracción primaria O7 (25 g) se sometió a un proceso de separación mediante CCA sobre gel de sílice (700 g) la cual se eluyó usando un gradiente comenzando en Hex-AcOEt (20:80 → 0:100) hasta llegar a un sistema de AcOEt-CH₃OH (100:0 → 80:20), de este proceso se obtuvieron cuatro fracciones secundarias (O7-1/O7-4). Las fracciones O7-1 (53.0 mg) y O7-2 (75.3 mg) se resolvieron mediante CLAE en fase reversa usando una columna Xbridge C₁₈ mediante un gradiente de elución comenzando con un sistema de CH₃OH-H₂O_{dd} (3:7) acidificada con 0.1% de ácido fórmico e incrementando de forma lineal la proporción del disolvente más polar durante 15 min hasta llegar a una proporción de 50% de H₂O acidificada, el flujo de trabajo fue 17.0 ml/min. De este proceso se aislaron los diterpenoides, amarisólida B (**13**; 17.0 mg) y amarisólida C (**14**; 25.0 mg) a partir de la fracción O7-1 y amarisólida D (**15**; 21.0 mg) y amarisólida E (**16**; 12.5 mg) a partir de la fracción O7-2.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Amarisólida B (13): Sólido vitreo; $[\alpha]_D^{20} + 54.73$ (1 mg/ml, CH₃OH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 206 (0.412); ECD (CH₃OH, c 0.1 mM, 0.1 cm); $\Delta\epsilon -8.94$ (210 nm), -8.98 (250 nm); IR (FTIR) ν_{\max} 3378, 1763, 1705 cm⁻¹; ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ_H (ppm): 6.63 (1H, d, $J = 6.4$, H-3), 4.53 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-19b), 4.43 (1H, m, H-2), 4.29 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 3.97 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-19a), 3.65 (1H, dd, $J = 11.3, 2.5$ Hz, H-6a'), 3.34 (1H, m, H-6b'), 3.10 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 3.10 (1H, m, H-5') 2.94 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-2'), 2.96 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-4'), 2.61 (1H, m, H-12a), 2.32 (1H, m, H-12b), 2.12 (1H, d, $J = 12.9$, H-10), 2.05 (3H, s, H-14), 1.76 (1H, ddd, $J = 13.8, 12.0, 12.0$ Hz, H-1a), 1.69 (1H, m, 6a), 1.53 (1H, m, H-8), 1.52 (1H, m, H-7), 1.44 (2H, m, H-11), 1.28 (1H, m, H-1b), 1.18 (1H, m, 6b), 0.74 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-17), 0.51 (3H, s, H-20); ¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ_C (ppm): 208.7 (C-13), 168.7 (C-18), 142.8 (C-4), 130.6 (C-3), 101.9 (C-1'), 77.0 (C-5'), 76.8 (C-3'), 73.9 (C-2'), 70.5 (C-19), 70.3 (C-4'), 69.2 (C-2), 61.2 (C-6'), 45.1 (C-5), 39.3 (C-10), 36.8 (C-9), 36.0 (C-12), 35.8 (C-8), 33.6 (C-6), 30.3 (C-11), 30.0 (C-14), 27.2 (C-7), 25.7 (C-1), 17.3 (C-20), 15.5 (C-17); EM-AR m/z 469.2403 [M + H]⁺ (calculada para C₂₄H₃₆O₉, [M + H]⁺ = 469.2438).

Amarisólida C (14): Sólido vitreo; $[\alpha]_D^{20} + 43.05$ (1 mg/ml, CH₃OH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 207 (0.514); ECD (CH₃OH, c 0.1 mM, 0.1 cm); $\Delta\epsilon -6.92$ (208 nm), -7.29 (250 nm); IR (FTIR) ν_{\max} at 3385, 1749 cm⁻¹; ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ_H (ppm): 7.45 (1H, t, $J = 1.6$ Hz, H-16), 6.63 (1H, d, $J = 6.4$, H-3), 4.79 (1H, m, H-15), 4.47 (1H, m, H-2), 4.38 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-19b), 4.31 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.00 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-19a), 3.60 (1H, dd, $J = 11.0, 2.5$ Hz, H-6a'), 3.44 (1H, m, H-6b'), 3.11 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 3.11 (1H, m, H-5'), 2.97 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-4'), 2.94 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-2'), 2.37 (1H, m, H-12a), 2.27 (1H, d, $J = 12.6$, H-10), 2.06 (1H, m, H-12b), 1.80 (1H, ddd, $J = 13.8, 12.0, 12.0$ Hz, H-1a), 1.72 (1H, m, 6a), 1.71 (1H, m, H-8), 1.54 (1H, m, H-11a), 1.43 (1H, m, H-11b), 1.34 (1H, m, H-1b), 1.25 (1H, m, 6b), 1.24 (1H, m, H-7), 0.80 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-17), 0.54 (3H, s, H-20); ¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ_C (ppm): 174.2 (C-14), 168.8 (C-18), 146.4 (C-16), 142.6 (C-4), 132.8 (C-13), 130.7 (C-3), 101.9 (C-1'), 76.9 (C-5'), 76.7 (C-3'), 73.6 (C-2'), 70.6 (C-19), 70.4 (C-15), 70.0 (C-4'), 69.0 (C-2), 61.1 (C-6'), 45.1 (C-5), 39.2 (C-10), 37.4 (C-9), 35.8 (C-8), 34.9 (C-11), 33.3

DESARROLLO EXPERIMENTAL

(C-6), 27.2 (C-7), 25.7 (C-1), 17.8 (C-12), 17.2 (C-20), 15.4 (C-17); EM-AR m/z 509.2352 $[M + H]^+$ (calculada para $C_{26}H_{36}O_{10}$, $[M + H]^+ = 509.2387$).

Amarisólida D (15): Sólido vitreo; $[\alpha]_D^{20} + 67.90$ (1 mg/ml, CH_3OH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 207 (0.631); ECD (CH_3OH , c 0.4 mM, 0.1 cm); $\Delta\epsilon -16.4$ (208 nm), -16.5 (250 nm); IR (FTIR) ν_{max} at 3396, 1754 cm^{-1} ; 1H -RMN (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 6.67 (1H, d, $J = 6.3$, H-3), 6.04 (1H, t, $J = 0.7$ Hz, H-16), 5.91 (1H, d, $J = 0.8$ Hz, H-14), 4.47 (1H, m, H-2), 4.38 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-19b), 4.30 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.02 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-19a), 3.67 (1H, dd, $J = 11.6, 2.5$ Hz, H-6a'), 3.45 (3H, s, OCH_3), 3.34 (1H, m, H-6b'), 3.11 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 3.11 (1H, m, H-5'), 2.98 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-4'), 2.97 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-2'), 2.25 (1H, d, $J = 12.9$, H-10), 2.09 (1H, m, H-12b), 1.76 (1H, ddd, $J = 13.8, 12.0, 12.0$ Hz, H-1a), 1.67 (1H, m, 6a), 1.67 (1H, m, H-8), 1.56 (1H, m, H-12a), 1.54 (2H, m, H), 1.54 (1H, m, H-7), 1.34 (1H, m, H-1b), 1.25 (1H, m, 6b), 0.80 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-17), 0.56 (3H, s, H-20); ^{13}C -RMN (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 171.0 (C-15), 170.0 (C-13), 169.2 (C-18), 143.2 (C-4), 130.0 (C-3), 117.2 (C-16), 104.7 (C-14), 102.0 (C-1'), 77.4 (C-5'), 77.2 (C-3'), 74.0 (C-2'), 70.9 (C-19), 70.7 (C-4'), 69.1 (C-2), 61.8 (C-6'), 56.5 (OCH_3), 45.6 (C-5), 39.5 (C-10), 37.7 (C-9), 35.9 (C-8), 33.9 (C-12), 33.7 (C-6), 27.6 (C-11), 26.8 (C-1), 26.2 (C-7), 17.6 (C-20), 15.9 (C-17); EM-AR m/z 539.2452 $[M + H]^+$ (calculado para $C_{27}H_{38}O_{11}$ $[M + H]^+ = 539.2492$).

Amarisólida E (16): Sólido vitreo; $[\alpha]_D^{20} + 59.21$ (1 mg/ml, CH_3OH); ECD (CH_3OH , c 0.9 mM, 0.1 cm); $\Delta\epsilon -15.92$ (208 nm), -12.91 (251 nm); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 207 (0.614); IR (FTIR) ν_{max} at 3396, 1750 cm^{-1} ; 1H -RMN (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 7.13 (1H, sa, H-16), 6.66 (1H, d, $J = 6.3$, H-3), 5.92 (1H, sa, H-15), 4.46 (1H, m, H-2), 4.39 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-19b), 4.30 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.02 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-19a), 3.64 (1H, dd, $J = 11.0, 2.5$ Hz, H-6a'), 3.45 (3H, s, OCH_3), 3.33 (1H, m, H-6b'), 3.10 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 3.10 (1H, m, H-5'), 2.95 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-4'), 2.93 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, H-2'), 2.33 (1H, m, H-12a), 2.24 (1H, d, $J = 12.9$, H-10), 2.09 (1H, m, H-12b), 1.81 (1H, ddd, $J = 13.8, 12.0, 12.0$ Hz, H-1a), 1.71 (1H, m, 6a), 1.60 (1H, m, H-7), 1.54 (1H, m, H-8), 1.53 (1H, m, H-11a), 1.44 (1H, m, H-11b), 1.34 (1H, m, H-1b), 1.25 (1H, m, 6b), 0.79 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-17), 0.56 (3H, s, H-

20); ^{13}C -RMN (125 MHz, CD_3OD) δ_{H} (ppm): 171.2 (C-14), 168.8 (C-18), 143.0 (C-16), 142.6 (C-4), 137.9 (C-13), 130.8 (C-3), 102.5 (C-15), 102.0 (C-1'), 77.0 (C-5'), 76.7 (C-3'), 73.5 (C-2'), 70.8 (C-4'), 70.6 (C-19), 69.2 (C-2), 61.2 (C-6'), 56.1 (OCH_3), 45.1 (C-5), 39.2 (C-10), 37.4 (C-9), 35.7 (C-8), 34.7 (C-11), 33.3 (C-6), 27.2 (C-7), 25.7 (C-1), 17.7 (C-12), 17.3 (C-20), 15.5 (C-17); EM-AR m/z 539.2455 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_{11}$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 539.2492$).

4.3.2.1 Hidrólisis enzimática de las amarisólidas (1, 13-16).

Las amarisólidas **1**, **13-16** (5 mg) se disolvieron en un buffer de fosfatos (5 ml, 100 mM, pH 7), y en cada caso se adicionó 10 g de una enzima β -glucosidasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), las muestras se mantuvieron en incubación a 40 °C durante 15 días. Al cabo de éste periodo las mezclas de reacción se extrajeron con CHCl_3 (3 \times 5 ml), las fracciones acuosas resultantes se analizaron y compararon mediante CCD y rotación óptica para caracterizar la naturaleza del carbohidrato resultante.

4.4 Estudio químico de la especie *V. corymbosa*.

4.4.1 Preparación y fraccionamiento preliminar del extracto acuoso.

El extracto acuoso se preparó vía infusión, para ello 500 g de las partes aéreas secas y molidas de *V. corymbosa* se pusieron en contacto con 14 l de agua a ebullición durante 30 min, al cabo de este tiempo el preparado se filtró y el material vegetal se desechó. La infusión resultante se fraccionó preliminarmente mediante la técnica de reparto en disolventes utilizando AcOEt (3 \times 14 l), la extracción se realizó exhaustivamente. Las fracciones orgánica y acuosa resultantes se colectaron y se concentraron a sequedad para obtener 5.5 g de la fracción orgánica y 8.5 g de la fracción acuosa. Adicionalmente, se prepararon 250 ml de la infusión siguiendo el protocolo anteriormente descrito, la infusión resultante se concentró a sequedad para obtener 240 mg del extracto acuoso total.

4.4.2 Aislamiento, purificación e identificación de los de los metabolitos secundarios a partir de la fracción orgánica de la infusión.

El fraccionamiento de la fracción orgánica de la infusión de *V. corymbosa* se realizó mediante CCA, para ello la muestra (5.0 g) se aplicó sobre una columna empacada con SEPHADEX (volumen muerto 750 ml), la cual se eluyó de manera isocrática utilizando como disolvente CH₃OH. Durante el fraccionamiento se colectaron eluatos de 10 ml, los cuales posteriormente se combinaron de acuerdo a su similitud cromatográfica generando diez fracciones secundarias (FO1-FO10). La fracción FO3 (363 mg) se reconstituyó en CH₃OH, y de este proceso se precipitó un sólido el cual se recuperó por filtración para obtener 250 mg de prunasina (**10**) (Isaza et al., 2001).

Prunasina (10): Sólido blanco; pf 139–140 °C; ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H (ppm): 7.54 (2H, m, H-4 y H-8), 7.46 (3H, m, H-5, H-6 y H-7), 6.01 (1H, s, H-2), 4.18 (1H, d, *J* = 7.1 Hz, H-1'), 3.07 (4H, m, H-2', H-3', H-4' y H-5'), 3.64 (1H, m, H-6a'), 3.48 (1H, m, H-6b'); ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C (ppm): 133.9 (C-3), 129.8 (C-6), 129.2 (C-5 y C-7), 127.6 (C-4 y C-8), 119.0 (C-1), 101.4 (C-1'), 77.5 (C-3'), 76.7 (C-5'), 73.4 (C-2'), 70.1 (C-4'), 66.8 (C-2), 61.3 (C-6').

La resolución de la fracción FO6 (85.0 mg) se realizó mediante CLAE en su modalidad de fase reversa, para ello se utilizó la columna SymmetryPrep RP-C8 y como sistema de elución se utilizó CH₃CN-H₂O_{dd} en proporción 2:8 a un flujo de 2.6 ml/min, este procedimiento condujo al aislamiento de los flavonoides hiperósido (**20**; 5 mg), isoquercetina (**21**; 5 mg), quercitrina (**22**; 8 mg) y quercetin-3-*O*-(6''-benzoil)-β-D-galactósido (**23**; 50 mg) (Hasan et al., 2006; Napolitano et al., 2012; Vvedenskaya et al., 2004; Wei et al., 2007).

Hiperósido (20): Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ_H (ppm): 7.71 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.58 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 5.24 (1H, d, *J* = 7.51 Hz, H-1''), 3.73 (1H, dd, *J* =

DESARROLLO EXPERIMENTAL

11.9, 2.4 Hz, H-6a"), 3.67 (1H, m, H-5"), 3.63 (1H, m, H-2"), 3.51 (1H, m, H-6b"), 3.34 (1H, dd, $J = 9.8, 7.5$ Hz, H-3"), 3.30 (1H, dd, $J = 7.5$ Hz, H-4").

Isoquercetina (21): Sólido amarillo; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} (ppm): 7.70 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.58 (1H, dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.24 (1H, d, $J = 7.51$ Hz, H-1"), 3.70 (1H, dd, $J = 11.9, 2.4$ Hz, H-6a"), 3.67 (1H, m, H-5"), 3.62 (1H, m, H-2"), 3.50 (1H, m, H-6b"), 3.34 (1H, dd, $J = 9.8, 9.5$ Hz, H-3"), 3.30 (1H, dd, $J = 9.5$ Hz, H-4").

Quercitrina (22): Sólido amarillo; pf 187-189 °C; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} (ppm): 7.33 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.30 (1H, dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.37 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.34 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-1"), 4.21 (1H, dd, $J = 3.4$ Hz, 1.7, H-2"), 3.74 (1H, dd, $J = 9.3, 3.4$ Hz, H-3"), 3.34 (1H, m, H-4"), 3.41 (1H, dd, $J = 9.6, 6.1$ Hz, H-5"), 0.93 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-6"); $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CD_3OD) δ_{C} (ppm): 178.2 (C-4), 164.5 (C-7), 161.8 (C-5), 157.9 (C-8a), 148.4 (C-4'), 145.0 (C-3'), 134.8 (C-3), 121.6 (C-1'), 121.4 (C-6'), 115.5 (C-5'), 114.9 (C-2'), 104.5 (C-1"), 102.1 (C-4a), 98.4 (C-6), 93.2 (C-8), 71.8 (C-2"), 70.7 (C-5"), 70.6 (C-4"), 70.5 (C-3"), 16.2 (C-6").

Quercetin-3-O-(6"-benzoil)- β -D-galactósido (23): Sólido amarillo; pf = 201-203 °C; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} (ppm): 7.75 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.73 (2H, dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H-3" y H-7"), 7.58 (1H, dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, H-6'), 7.48 (1H, dddd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H-5"), 7.30 (2H, dd, $J = 7.5$ Hz, H-4" y H-6"), 6.87 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.24 (1H, d, $J = 7.51$ Hz, H-1"), 4.48 (1H, m, H-6a"), 4.30 (1H, dd, $J = 8.0, 7.0$ Hz, H-6b"), 3.87 (1H, m, H-5"), 3.83 (1H, m, H-2"), 3.60 (1H, dd, $J = 9.8, 7.5$ Hz, H-3"), 3.84 (1H, dd, $J = 7.5$ Hz, H-4").

La fracción FO2 (525 mg) se reconstituyó en una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ en una proporción de 1:1, a partir de este procedimiento cristalizaron 260 mg del compuesto aromático simple conocido como piceína (**11**) (Schroeder et al., 1996).

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Piceína (11): Sólido blanco, pf 192-194 °C; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ_{H} (ppm): 7.93 (2H, dd, $J = 8.9, 2.1$ Hz, H-3 y H-5), 7.13 (2H, dd, $J = 9.0, 2.1$ Hz, H-2 y H-6), 5.02 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1'), 2.54 (3H, s, H-8), 3.39 (1H, m, H-3'), 3.29 (2H, m, H-2', H-5'), 3.20 (1H, m, H-4'), 3.70 (1H, m, H-6a'), 3.48 (1H, m, H-6b'); $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ_{C} (ppm): 196.5 (C-7), 161 (C-1), 130.8 (C-4), 130.2 (C-3 y C-5), 115.8 (C-2 y C-6), 99.8 (C-1'), 77.1 (C-3'), 76.5 (C-5'), 73.1 (C-2'), 69.6 (C-4'), 60.6 (C-6'), 26.5 (C-8)

La fracción FO4 (119 mg) se sometió a un fraccionamiento secundario utilizando CCA en gel de sílice (100 g), la columna se eluyó con diferentes sistemas comenzando con Hex-AcOEt (50:50 \rightarrow 0:100), posteriormente se incrementó la polaridad de la mezcla de elución con AcOEt- CH_3OH (100:0 \rightarrow 80:20), de este procedimiento se obtuvieron cuatro fracciones secundarias (FOV4-1/FOV4-4); a partir de la fracción FOV4-3 (6.5 mg), la cual eluyó con una mezcla de Hex-AcOEt 8:2, se obtuvieron 5 mg del compuesto aromático metilarbutina (**24**) (Lutterbach y Stockigt, 1995).

Metilarbutina (24): Sólido blanco, pf 154-156 °C; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} (ppm): 7.97 (2H, dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, H-2 y H-6), 7.15 (2H, dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, H-3 y H-5), 5.01 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1"), 3.90 (1H, dd, $J = 12.1, 2.2$ Hz, H-6a"), 3.87 (3H, s, H-1'), 3.70 (1H, dd, $J = 12.2, 5.5$ Hz, H-6b"), 3.48 (1H, m, H-2"), 3.47 (2H, m, H-3" y H-5"), 3.40 (1H, m, H-4").

La resolución de la fracción FO7 (580 mg) se realizó mediante CCA en SEPHADEX (volumen muerto 100 ml) utilizando como disolvente CH_3OH , este procedimiento permitió la obtención de 210 mg del flavonoide (-)-*epi*-catequina (**12**) (Davis et al., 1996).

(-)-*epi*-catequina (12): pf 180-182 °C; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ_{H} (ppm): 7.93 (1H, m, H-2'), 7.36 (1H, dd, $J = 7.8, 0.8$ Hz, H-6'), 7.29 (1H, dd, $J = 8.1, 1.0$ Hz, H-5'), 6.70 (1H, dd, $J = 2.3, 1.0$ Hz, H-6), 6.68 (1H, dd, $J = 2.2, 1.0$ Hz, H-8), 5.40 (1H, sa, H-2), 4.74 (1H, sa, H-3), 3.56 (1H, dd, $J = 16.4, 4.6$ Hz, H-4a), 3.43 (1H, dd, $J = 16.4, 4.6$ Hz, H-4b); $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ_{C} (ppm): 159.1 (C-7), 159.0 (C-8a), 158.6 (C-5), 147.4 (C-3'), 147.3 (C-4'),

132.6 (C-1'), 119.7 (C-6'), 116.8 (C-2'), 116.5 (C-5'), 100.6 (C-4a), 97.1 (C-6), 96.2 (C-8), 80.5 (C-2), 67.4 (C-3), 30.1 (C-4).

4.5 Estudios farmacológicos.

4.5.1 Estudios *in vitro*.

4.5.1.1 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre enzimas α -glucosidasas.

Para la evaluación del efecto inhibidor de extractos, fracciones y compuestos puros se utilizaron las α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae* (α Sc, 0.4 U/ml), intestinales de rata (α Ir 40 mg de polvo/ml) y de *Ruminococcus obeum* (α Ro, 5.2 mg/ml). Las muestras a evaluar se disolvieron en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7) o en CH₃OH, hasta obtener concentraciones de 10000 ppm para los extractos y fracciones, y de 30 mM para los compuestos puros. Como control positivo se utilizó acarbosa disuelta en buffer de fosfatos (30 mM). El procedimiento general consistió en la adición de alícuotas de 0-10 μ l de las muestras a evaluar más un volumen fijo de la enzima por cada pozo (10 μ l de α Sc, 10 μ l de α Ir ó 5 μ l de α Ro), esta mezcla de inhibidor-enzima se colocó en incubación a 37 °C durante 10 min, posteriormente, se añadió 10 μ l de sustrato *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*NPG, 5 mM para α Sc, 10 mM para α Ir y 20 mM para α Ro), inmediatamente después, se leyó la absorbancia de las muestras al tiempo cero (t_0). La mezcla de reacción se colocó en incubación a 37 °C durante 30 min para la evaluación con α Sc y α Ir, y durante 3 h para la evaluación con α Ro. Después del periodo de incubación, se leyeron las absorbancias, el cálculo de los porcentajes de inhibición se obtuvo por comparación con un blanco (ausencia de inhibidor) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{A_{405t}}{A_{405b}}\right) \times 100 \qquad \text{Ecuación 1}$$

En donde A_{405t} es la absorbancia corregida de la sustancia de prueba ($A_{405t_{\text{final}}} - A_{405t_{\text{inicial}}}$) y A_{405c} es la absorbancia del blanco corregida ($A_{405b_{\text{final}}} - A_{405b_{\text{inicial}}}$) (Copeland, 2000).

DESARROLLO EXPERIMENTAL

La concentración de inhibidor requerida para inhibir el 50% de la actividad enzimática (CI_{50}) se calculó mediante un ajuste de regresión no lineal, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{100}}{1 + (I/CI_{50})^s} \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde A_{100} es el porcentaje máximo de inhibición enzimática, I es la concentración de inhibidor y s es el grado de cooperatividad (Copeland, 2000).

4.5.1.2 Determinación de los parámetros cinéticos de la inhibición.

Para determinar que tipo de inhibidores son los productos activos se siguió el protocolo descrito en el inciso anterior. Se construyeron curvas de inhibición por sustrato en un intervalo de concentraciones de 0-2 mM de *p*NPG con diferentes concentraciones de inhibidor (20-80% de inhibición). Los resultados obtenidos se analizaron mediante una curva de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk y las constantes de inhibición se calcularon mediante un análisis de regresión no lineal con la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{\max}S}{k_m(1 + [I]/k_i) + S(1 + [I]/\alpha k_i)} \quad \text{Ecuación 3}$$

En donde v es la velocidad inicial en ausencia y presencia de inhibidor, S e I son las concentraciones de sustrato e inhibidor, respectivamente, V_{\max} es la velocidad máxima de reacción, k_m es la constante de Michaelis-Menten, k_i es la concentración de inhibición competitiva y αk_i es la constante de inhibición no competitiva (Copeland, 2000). El análisis de los datos se realizó con el programa GraphPadPrism (version 5.0, GraphPad Inc., La Jolla, CA, EE.UU.).

4.5.2 Estudios farmacológicos *in vivo*.

Para la experimentación en animales se utilizaron ratones macho de la cepa ICR, con edad de entre 3-4 semanas y peso corporal de 25-30 g que se obtuvieron a través de Envigo México RMS (Ciudad de México, México). Todos los animales de experimentación se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, en ambiente controlado a una temperatura (22 ± 1 °C), ciclo de luz y oscuridad de 12 h, con acceso libre al agua y alimento estándar. Todos los protocolos experimentales se realizaron en conformidad con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Salud Animal (NOM-062-ZOO-1999) y con los lineamientos internacionales para el uso y cuidado de animales de experimentación. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM: FQ/CICUAL/134/16 (Protocolo de toxicidad, Lorke) y FQ/CICUAL/132/16 (Ensayos hipoglucemiante agudo y antihiperoglucémicos).

4.5.2.1 Preparación y administración de muestras.

Las muestras y las sustancias que se utilizaron como controles positivos se prepararon en suspensión usando como vehículo una solución salina isotónica (NaCl 0.9%, SSI) con 0.05% de Tween 80. La administración se realizó por vía intragástrica (*p.o*) mediante sondas de acero inoxidable a razón de 0.2 ml/10 g de peso.

4.5.2.2 Determinación de la toxicidad aguda en ratones.

Para establecer la toxicidad aguda de los extractos (acuoso y orgánico) de *V. corymbosa* y acuoso de *S. circinata* se aplicó el protocolo descrito por Lorke (1983). El procedimiento se realizó en dos etapas independientes, para cada una se utilizaron doce ratones divididos en cuatro grupos ($n = 3$). Las dosis administradas en la primera etapa fueron 10, 100 y 1000 mg/kg, mientras que en la segunda etapa se administraron dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg. En cada

DESARROLLO EXPERIMENTAL

etapa se tuvo un grupo control el cual se administró únicamente con vehículo (SSI con 0.05% de Tween 80). Dentro de la primera hora después de la administración de los tratamientos, los animales se mantuvieron en observación para identificar efectos tóxicos agudos, cambios en el comportamiento o bien para registrar el número de muertes. Durante catorce días posteriores a la administración se registraron diariamente los pesos de todos los animales. Al cabo del periodo de catorce días, los animales que sobrevivieron se sacrificaron en una cámara de CO₂ y se realizó la disección de los órganos internos (corazón, riñones, hígado y pulmones) para realizar un análisis macroscópico y descartar posibles lesiones. El valor de la dosis letal media (DL₅₀) se obtuvo calculando la media geométrica entre la dosis más baja en donde se presentó la muerte de un animal y la dosis en la que no se presentó ninguna muerte; en el caso en el que no se presente muerte de ningún animal de experimentación en ninguna de las dosis ensayadas, se considera que la DL₅₀ es mayor a 5 g/kg (Lorke, 1983).

4.5.2.3 Evaluación de la eficacia antidiabética preclínica en ensayos agudos.

La determinación el potencial antidiabético de las especies seleccionadas se realizó aplicando protocolos experimentales bien establecidos que permiten determinar el efecto hipoglucemiante agudo y el efecto antihiper glucémico durante curvas de tolerancia a carbohidratos (glucosa y sacarosa), los experimentos se realizaron en ratones normo e hiper glucémicos (Ovalle-Magallanes et al., 2014).

4.5.2.3.1 Determinación de la concentración de glucosa en sangre.

Se realizó una incisión en la cola de los ratones para recolectar la sangre de la vena caudal. La concentración de la glucosa sanguínea (mg/dl) se determinó por el método de glucosa-oxidasa en un glucómetro comercial (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, EE.UU.). Con los valores obtenidos se calculó el porcentaje de variación de glucosa aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ variación de glucosa} = \frac{G_t - G_b}{G_b} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

DESARROLLO EXPERIMENTAL

En donde G_t corresponde a los niveles de glucosa a cada tiempo de medición y G_i es el valor de la glucosa basal. Los valores de los porcentajes de variación de glucosa se graficaron en función del tiempo para obtener los gráficos de curso temporal.

Adicionalmente, se determinó el área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales de la variación de glucosa. El ABC se calculó mediante el método de los trapezoides aplicando la siguiente ecuación:

$$ABC = \sum_{t_0}^{t_n} \left(\frac{\%V_0 + \%V_i}{2} \right) \times (t_i - t_0) + \left(\frac{\%V_i + \%V_j}{2} \right) \times (t_j - t_i) + \dots \quad \text{Ecuación 5}$$

En donde los subíndices 0, i , j , n , etc., representan los valores de % de variación de glucemia a los diferentes tiempos de medición (t).

4.5.2.3.2 Inducción de hiperglucemia experimental.

Durante cuatro horas previas al experimento, los animales se mantuvieron en condiciones de ayuno con acceso libre al agua. Posteriormente, se administró por vía intraperitoneal (*i.p.*) una dosis única de 50 mg/kg de nicotinamida (NA, Sigma Aldrich, EE.UU.) disuelta en SSI. Después de treinta minutos, se administró por vía *i.p.* una dosis única de 130 mg/kg de estreptozotocina (STZ, Sigma Aldrich, EE.UU.) disuelta en un buffer de citratos (0.1 M, pH 4.5). La administración de ambas sustancias se realizó a razón de 0.1 ml/10 g de peso. Al cabo de 7 días después del tratamiento, se midieron los niveles de glucosa de todos los animales de experimentación, aquellos con niveles ≥ 200 mg/dl se consideraron hiperglucémicos y se utilizaron para la segunda etapa experimental.

4.5.2.3.3 Evaluación del potencial hipoglucemiante agudo.

El extracto acuoso de *S. circinata* se administró en un rango de dosis de 100-570 mg/kg. El potencial hipoglucemiante agudo se realizó en ratones normo e hiperglucémicos. Antes de

DESARROLLO EXPERIMENTAL

comenzar el experimento, se privó de alimento a los animales y se determinó la glucosa basal o al tiempo cero. Posteriormente, los animales se dividieron en cinco grupos (n = 6); el grupo control de vehículo se administró únicamente con SSI con 0.5% con Tween 80, y el grupo control positivo recibió una dosis de 15 mg/kg de glibenclamida (GLI, Sigma Aldrich, EE.UU.), los tres grupos restantes recibieron dosis fijas de la muestra a evaluar. La toma de muestras sanguíneas se realizó a las 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas después de la administración de los tratamientos. Con los valores obtenidos se construyeron las gráficas de curso de temporal de variación de glucosa y el ABC del curso temporal.

4.5.2.3.4 Evaluación del potencial antihiper glucémico en una curva de tolerancia a la glucosa.

La evaluación del potencial antihiper glucémico en ratones normo e hiper glucémicos durante una curva de tolerancia a la glucosa del extracto acuoso de *S. circinata* se determinó a en un rango de dosis de 100-570 mg/kg. Todos los animales se mantuvieron en ayuno con libre acceso al agua durante 4 h antes de comenzar el experimento. Al cabo de este tiempo, se midió la concentración de glucosa basal. Un grupo se administró solamente con el vehículo (SSI-Tween 80 al 0.05%), al control positivo se les administró 200 mg/kg de metformina (MTF, Sigma Aldrich, EE.UU.), los tres grupos restantes se administraron con el extracto. Después de treinta minutos de la administración de los tratamientos, los animales recibieron una carga oral de 1 g/kg de glucosa (Sigma Aldrich, EE.UU.). La concentración de glucosa se determinó a los tiempos 30, 60, 90 y 120 min después del carbohidrato. Con los valores obtenidos, se construyeron las gráficas de curso temporal y de ABC.

4.5.2.3.5 Evaluación del potencial antihiper glucémico en una curva de tolerancia a la sacarosa.

Se determinó el potencial antihiper glucémico durante una curva de tolerancia a la sacarosa del extracto acuosos de *S. circinata* (31.6-316 mg/kg) y de los compuestos **1** y **6** (1.0-10 mg/kg).

La evaluación de los extractos se realizó en ratones normo e hiperglucémicos, mientras que la evaluación de los compuestos puros se realizó sólo en ratones normoglucémicos. Cuatro horas antes de comenzar el experimento, todos los animales se privaron de alimento y se mantuvieron con acceso libre al agua. Al comenzar el experimento se determinó la concentración de la glucosa basal de los ratones y se dividieron en cinco grupos (n = 6). El grupo de control de vehículo se administró solamente con SSI con 0.05% de Tween 80, al grupo control positivo se le administró una dosis de 5 mg/kg de acarbosa (ACA, Sigma Aldrich, EE.UU.), los tres grupos restantes se administraron con dosis fijas de las muestras a evaluar. Después de treinta minutos de la administración de los tratamientos, todos los animales recibieron una carga oral de 2 g/kg de sacarosa (Sigma Aldrich, EE.UU.). Posterior a la administración del carbohidrato, se determinó la concentración de glucosa en sangre a los tiempos 30, 60, 90 y 120 min. Con los resultados obtenidos se construyeron las curvas de curso temporal de la variación de glucosa.

4.5.2.3.6 Análisis estadísticos.

Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media. La estimación de la diferencia estadística significativa se calculó mediante un análisis de varianza (ANADEVA) de dos vías seguido de un análisis *post-hoc* de Bonferroni comparando con el grupo vehículo; o bien, se determinó mediante un ANADEVA de una vía seguida de un análisis *post-hoc* de Dunnett comparando con el grupo de vehículo. Para el cálculo de las diferencias estadísticas se utilizó el programa GraphPad Prism (version 5.0, GraphPad Inc., La Jolla, CA, EE.UU.).

4.6 Estudios *in silico*.

4.6.1 Cálculos teóricos del dicroísmo circular.

Los estudios de dicroísmo circular se realizaron para establecer la configuración absoluta de los centros estereogénicos de los diterpenos **1**, **13-16**. Para realizar la búsqueda de conformeros de mínima energía se consideró la configuración relativa previamente establecida mediante RMN, así entonces se realizó la búsqueda de conformeros para los dos posibles

DESARROLLO EXPERIMENTAL

enantiómeros, neoclerodano y *ent*-neoclerodano para cada diterpenoide. La búsqueda conformacional se realizó con el programa Spartan'02 (Wavefunction, Inc.) utilizando el método Monte Carlo con el campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94 (Molecular Mechanics Force Field). Para los enantiómeros se consideró una conformación de media silla para el ciclohexeno y de silla ligeramente distorsionada para el ciclohexano (Toscano, et al., 2001), permitiendo el libre giro de todos los enlaces rotables (sp^3). Con las estructuras seleccionadas se realizó la optimización geométrica empleando el programa Gaussian 09 (Gaussian, Inc.) utilizando el funcional de teoría DFT con un nivel de teoría de B3LYP/6-311G+2dp. De los conformeros generados se seleccionaron aquellos de mínima energía en una ventana de 0-3 kcal mol⁻¹. La población conformacional se expresa en términos de fracción molar, y se calculó con el programa FracMol (Anexo 3). Posteriormente, los espectros de dicroísmo circular se calcularon a partir de las fuerzas de rotación dipolares (Rvelocity) y de las energías de excitación (nm) de los conformeros seleccionados. La predicción de los espectros se realizó utilizando la teoría de los funcionales de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) con un nivel de teoría de B3LYP/6-31G+d. Se tomaron en cuenta 30 estados excitados para cada conformero y se construyó la gráfica de $\Delta\epsilon$ en función de λ , para el cálculo se aplicó la siguiente ecuación:

$$\Delta\epsilon(\sigma) = \frac{1}{2.296 \times 10^{-39}} \times \frac{1}{\Delta\sigma\sqrt{\pi}} \sum_i \sigma_i R_i e \left[\left(-\frac{\sigma - \sigma_i}{\Delta\sigma} \right)^2 \right] \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde σ es el número de onda (cm^{-1}), $\Delta\sigma$ es la mitad del ancho de la banda a la altura 1/e del pico, σ_i y R_i son el número de onda de excitación y la fuerza de rotación en el *i*ésimo estado, respectivamente (Nugroho y Morita, 2014).

Una vez obtenidos los espectros teóricos, estos se compararon con los espectros experimentales. El grado de concordancia entre ambos resultados fue solamente basado en la inspección de visual para identificar la similitud entre los espectros.

4.6.2 Estudios de acoplamiento molecular.

Para los estudios de acoplamiento molecular se utilizaron como blancos moleculares las siguientes α -glucosidasas: isomaltasa de *S. cerevisiae* (PDB: 3A4A), sacarasa-isomaltasa humana N-terminal (PDB: 3LPP), maltasa-glucoamilasa humana N-terminal (PDB: 2QMJ) y la maltasa-glucoamilasa humana C-terminal (PDB:3TOP), las estructuras cristalográficas de las proteínas se descargaron del Protein Data Bank con los códigos PDB anteriormente indicados. Para la preparación de las proteínas utilizadas se utilizó la interfaz gráfica AutoDock 4.2 (AutoDockTool 1.4.5) en donde se agregaron todos los átomos de hidrógeno y cargas de Kollman.

Los ligandos que fueron sujetos de estudio para el acoplamiento molecular fueron la acarbosa como un control y los compuestos **20** y **23**. Las estructuras de estos compuestos se construyeron con el programa Spartan'02 (www.wavefunction.com) y su optimización geométrica se realizó con el programa HyperChem 8.0. Posteriormente, los ligandos se prepararon mediante la adición de cargas atómicas de Gasteiger-Marsilli y de los hidrógenos polares mediante el programa AutoDock 4.2 (AutoDockTool 1.4.5).

La predicción de las posibles conformaciones de los complejos enzima-ligando se realizó con el programa AutoDock 4.2 (AutoDockTool 1.4.5) mediante un algoritmo genético lamarckiano (LGA). Como primer paso, se realizó un estudio de acoplamiento molecular ciego utilizando un tamaño de caja de $126 \times 126 \times 126 \text{ \AA}$ en los ejes x, y, z centrada a la proteína. Posteriormente, se seleccionó la conformación de menor energía y a partir de ella se realizó un nuevo estudio de acoplamiento molecular ahora con una caja más pequeña ($40 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$ en los ejes x, y, z) y centrada en el ligando. Los cálculos se realizaron en una población de 150 individuos con 2.5×10^6 evaluaciones energéticas y 100 corridas. Los resultados fueron analizados con PyMol (De Lano y Scientific, 2002).

4.6.3 Estudios de dinámica molecular.

4.6.3.1 Acoplamiento molecular.

El estudio de acoplamiento molecular se realizó sobre la estructura de la enzima de *R. obeum* (PDB: 3N04); y como ligandos, se utilizaron las estructuras de la acarbosa como control positivo y los compuestos **1** y **6**. Las estructuras se construyeron en el programa HyperChem 8 y la minimización energética se realizó en el programa Gaussian 09 (Gaussian Inc. Wallinford, CT) con un nivel de teoría de DTF B3LYP/3-21G. La preparación de la enzima y los ligandos, y el cálculo de acoplamiento molecular se realizaron de acuerdo con el protocolo descrito en el inciso anterior. El tamaño de la caja para cálculo ciego fue de $60\text{\AA} \times 60\text{\AA} \times 60\text{\AA}$ en los ejes x, y, z; y para el refinamiento del cálculo el tamaño de la caja se fijó a $30\text{\AA} \times 30\text{\AA} \times 30\text{\AA}$ en los ejes x, y, z y centrada en el ligando. Los resultados se analizaron con los programas AutoDockTools y con PyMOL.

4.6.3.2 Simulación de la dinámica molecular.

A partir de los resultados del estudio de acoplamiento molecular, se seleccionaron los complejos enzima-ligando de menor energía y se procesaron en la plataforma Antechamber para generar las topologías adecuadas para el módulo LeaP de AMBER. Para todas las estructuras y los complejos seleccionados, se realizó la adición de los hidrógenos usando el modulo LeaP con el conjunto de parámetros de parm99, también se adicionaron iones de Na^+ hasta neutralizar el sistema, además se realizó la solvatación de las estructuras mediante la selección de una caja octaédrica que utiliza un modelo de moléculas de agua de TIP3P. El número de átomos en la simulación fue de 70000 y se mantuvo constante durante la simulación. El estudio de dinámica molecular se realizó a 1 atm, 37 °C y volumen constante durante un periodo de 20 ns. Se monitoreó la energía total del sistema durante la simulación y se calculó el desplazamiento cuadrático medio de la raíz ponderada (RSMD) de la masa de los átomos del sistema y se calcularon las energías libres de unión mediante mecánica molecular.

4.7 Pruebas de identidad y composición.

4.7.1 Desarrollo del perfil cromatográfico de la fracción orgánica de la infusión de *S. circinata*.

Los análisis cromatográficos de la fracción orgánica (AcOEt) de la infusión de *S. circinata* se realizaron mediante la técnica de CLUE-EM en una columna BEH Shield C₁₈ (1.7 μm, 2.1 × 100 mm, 0.3 ml/min) a una temperatura de 40 °C. La elución se realizó con CH₃CN-H₂O_{dd} (0.1 % ácido fórmico en ambas fases) comenzando con 5:95 e incrementando linealmente la proporción hasta llegar a 100% de CH₃CN en un periodo de 12 min. El detector de masas se programó de la siguiente manera: modo de ionización por electro spray (ESI) a una temperatura de desolvatación de 150 °C y flujo de gas nitrógeno de 550 l/h. Espectrómetro de masas tipo cuadrupolo simple SQD2 ajustado para coleccionar datos de 100 a 1000 *m/z*. El voltaje de ionización para los modos positivo y negativo fue de 3.5 y 2.5 kv, respectivamente. Los metabolitos mayoritarios de la infusión, amarisólida (**1**) y pedalitina (**6**), se identificaron mediante co-elución con compuestos de referencia y la comparación de sus espectros de masas y UV.

4.7.1.1 Preparación de la matriz de trabajo.

La matriz de trabajo (50 μg/ml de la fracción de AcOEt derivada de la infusión) y el estándar **1** (1 mg/ml) se disolvieron en una mezcla de CH₃OH-H₂O (1:1), mientras que **6** (1 mg/ml) se disolvió en CH₃OH. Antes de inyectar las soluciones resultantes en el cromatógrafo se filtraron a través de membranas de nylon Acrodisc[®] 0.20 m x 13 mm de diámetro.

4.7.1.2 Validación del método analítico para la cuantificación simultánea de amarisólida (1**) y pedalitina (**6**).**

La validación del método analítico descrito anteriormente, se realizó siguiendo los lineamientos establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos de la International Conference on Harmonisation (ICH; Q2 (R1) 2005).

4.7.1.2.1 Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se estableció construyendo curvas de calibración para los productos **1** y **6** (5, 10, 25, 50 y 100 µg/ml), en ambos casos se realizaron seis replicas de cada curva. Las curvas se realizaron a partir de diluciones independientes a partir de las soluciones de referencia de cada uno de los estándares. Los datos se analizaron estadísticamente mediante regresión lineal de las variables concentración del estándar (x) y ABC de la respuesta (y). Con los datos obtenidos se calculó la ordenada al origen (b_0), pendiente de la recta (b_1), coeficiente de determinación (R) y coeficiente de correlación (R^2). Los criterios establecidos para la linealidad del sistema según la ICH son: $R^2 > 0.98$; $R \geq 0.999$.

4.7.1.2.2 Linealidad del método y exactitud.

Para establecer la linealidad del método se construyeron curvas con seis replicas para los estándares de **1** y **6** (10, 50 y 75 µg/ml). A cada solución se le adicionó un volumen constante de la solución correspondiente a la matriz de trabajo para obtener una concentración de 50 µg/ml. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal entre la cantidad adicionada (x) contra la cantidad recuperada (y), además se calcularon los valores de b_0 , b_1 , R y R^2 . Los parámetros de linealidad del método deben cumplir con valores de $R^2 > 0.98$; $R \geq 0.999$.

Posteriormente, con los mismos resultados obtenidos se calculó la exactitud del método determinando el porcentaje de recobro para cada una de las soluciones analizadas, para esto se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100 \qquad \text{Ecuación 7}$$

Se calculó la media aritmética (\bar{X}) y el coeficiente de variación (CV) de los porcentajes de recobro para cada nivel de concentración adicionado. Se considera que el método analítico es exacto si los porcentajes de recobro están en un rango de 98-102 % con un $CV \leq 2.0\%$.

4.7.1.2.3 Precisión del sistema.

La precisión del sistema se determinó en términos de repetibilidad mediante la análisis por sextuplicado de soluciones de los estándares **1** y **6** a una concentración de 50 µg/ml. Con los datos obtenidos se calculó la desviación estándar (DE) y el CV de las respuestas analíticas observadas, para cada uno de los estándares. El criterio de aceptación establece que para que un método tenga repetibilidad el CV no debe ser mayor a 2.0 %.

4.7.1.2.4 Límite de cuantificación y límite de detección.

Para determinar los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se construyeron curvas de calibración de **1** a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1.0, 5.0 y 10.0 µg/ml y **6** usando concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 y 5.0 µg/ml, para ambos casos las curvas se analizaron por triplicado. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para cada estándar, y se calcularon los parámetros b_0 , b_1 , R y R^2 . Las ecuaciones utilizadas para calcular los LD y LC se presentan a continuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \quad \text{Ecuación 9}$$

4.7.1.2.5 Cuantificación de amarisólida (1) y pedalitina (6).

La cuantificación de los estándares **1** y **6** se realizó en dos lotes de la especie (Julio y Noviembre). A partir de ambos lotes se preparó el extracto orgánico total (infusión), y la fracción orgánica de AcOEt de la infusión, siguiendo lo descrito en el punto **4.3.1**. Todas las muestras fueron inyectadas a una concentración de 500 µg/ml por triplicado.

4.7.2 Perfil cromatográfico de *V. corymbosa*.

El perfil cromatográfico del extracto acuoso de las partes aérea de *V. corymbosa* se desarrolló mediante CLAE en fase reversa. Se utilizó una columna Symmetry C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 150 mm), y como fase móvil se empleó un sistema de CH₃CN-H₂O_{dd} al 0.05% de ácido acético, la elución comenzó con un sistema 1:4 y se incrementó linealmente hasta llegar a una proporción de 1:1 en 20 min, estas condiciones se mantuvieron constantes durante 5 min; posteriormente, la proporción de la mezcla se cambia a 4:1 en una gradiente lineal de 5 min. Se trabajó con un flujo de 0.6 ml/min y con un volumen de inyección de 20 μl de una solución de 4 mg/ml del extracto acuoso.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados del presente trabajo se discutirán en dos secciones principales. En la primera, se presentan los resultados sobre la investigación farmacológica y química de la especie *Salvia circinata* y, en la segunda, los de *Vauquelinia corymbosa*.

5.1 Estudio químico y farmacológico de la especie *S. circinata*.

5.1.1 Toxicidad aguda del extracto acuoso.

La especie *S. circinata* es una planta medicinal valorada en México por su uso medicinal como agente antidiabético. Sin embargo, no hay información acerca de un uso prolongado a lo largo de la historia, ni documentación sobre la inocuidad y utilización eficaz de la especie (OMS 2000). Por lo tanto, en la primera fase del trabajo se determinó la toxicidad aguda en ratones ya que la información que surge de estos experimentos es de gran utilidad para la identificación preliminar de efectos tóxicos sobre algún órgano en específico y las dosis apropiadas para los estudios *in vivo*. En este trabajo se determinó la toxicidad aguda del extracto acuoso de *S. circinata* aplicando el protocolo descrito por Lorke (1983), mismo que permite la obtención de resultados reproducibles con el empleo de un número mínimo de animales de experimentación, considerando así la protección y los derechos de los animales. Los resultados indicaron que la administración oral del extracto acuoso en ratones no provoca cambios en el comportamiento, ni daño en órganos internos, según la inspección macroscópica. En ninguna de las fases del experimento, se observó el deceso de los animales de experimentación y, por lo tanto, la DL₅₀ es mayor a 5 g/kg (Tabla 2). De acuerdo al criterio de Lorke, el preparado popular de la planta es inocuo para ratones ya que no produce efectos tóxicos aún a dosis elevadas. Claro está, que un efecto farmacológico observado *in vitro* o en modelos animales no es necesariamente aplicable a seres humanos. Por esta razón, estos estudios de ser posible deben realizarse también a nivel clínico.

Tabla 2. Toxicidad aguda del extracto acuoso de *S. circinata*.

Primera fase		Segunda fase	
Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad
10	0/3	1600	0/3
100	0/3	2900	0/3
1000	0/3	5000	0/3

5.1.1.2 Eficacia preclínica del extracto acuoso de *S. circinata* como agente antidiabético.

La demostración de la eficacia requiere de una serie de datos farmacológicos, tanto preclínicos como clínicos que para sustentar las alegaciones sobre una determinada propiedad. El nivel de las pruebas y la gradación de las recomendaciones deben corresponder a la naturaleza de la enfermedad que se quiere tratar. En el caso específico del estudio farmacológico para establecer el potencial antidiabético de la infusión de *S. circinata*, este se hizo a nivel preclínico. Para ello se utilizaron modelos farmacológicos en roedores ampliamente descritos en la literatura (Fröde y Medeiros, 2008; Ovalle-Magallanes et al., 2014; Tahara et al., 2008).

En primer término, se estableció el efecto hipoglucemiante agudo en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos y, para la inducción de la hiperglucemia, se utilizó nicotinamida-estreptozotocina (NA 50 mg/kg-STZ 130 mg/kg). Este modelo experimental es de utilidad en estudios *in vivo* relacionados con la diabetes; pues la coadministración de NA evita un daño total de las células β -pancreáticas, de tal manera, que los animales desarrollan problemas metabólicos y perfiles bioquímicos similares a aquellos que se presentan en los humanos que padecen DMT2; además, la secreción de insulina no se abate totalmente ya que los animales responde al tratamiento con glibenclamida (Ghosh y Rangan, 2015; Szkudelski, 2012). Los resultados de este experimento se presentan en las gráficas de la Figura 15; de manera general, la administración oral del extracto a las dosis evaluadas ocasiona una moderada disminución de la concentración de glucosa en sangre. De manera particular, en los ratones normoglucémicos únicamente a la dosis más alta (570 mg/kg) se observó una disminución significativa de los niveles plasmáticos de glucosa (Figura 15A, $*p < 0.05$); en cambio, en los ratones

hiperglucémicos los niveles del carbohidrato descendieron con las dosis de 316 y 570 mg/kg (Figura 15B, $*p < 0.05$). En ambos casos el efecto hipoglucemiante global fue moderado, y mucho menor que el que se observó para el control positivo, la glibenclamida.

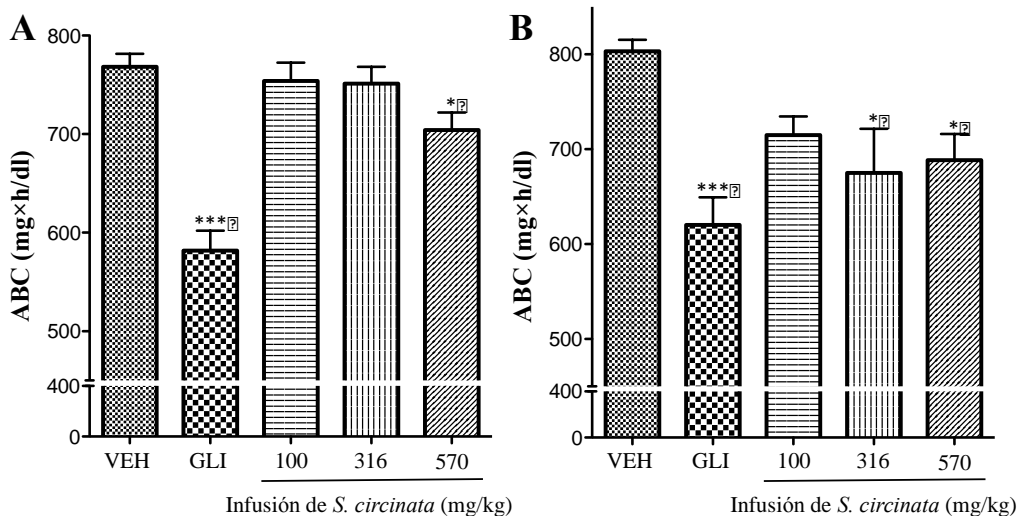


Figura 15. Efecto hipoglucemiante agudo de la infusión de *S. circinata* en ratones normoglucémicos (A) e hiperglucémicos (B). ABC: área bajo la curva; VEH: vehículo; GLI: glibenclamida. Cada barra representa el promedio \pm error estándar de la media para cada grupo ($n = 6$). ANADEVA de una vía, *post hoc* Dunnett ($*p < 0.05$ y $***p < 0.001$).

El efecto antihyperglucémico del preparado tradicional se evaluó en curvas de tolerancia a la glucosa y sacarosa. Para la curva de tolerancia a la glucosa (CTG), la metformina se utilizó como un control positivo. Los resultados de la CTG se muestran en las gráficas de la Figura 16 y, claramente, se aprecia que la administración oral de la infusión en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos no provocó una disminución de la glucosa en ninguna de las dosis evaluadas. Estos resultados permiten descartar, de manera preliminar, un efecto secretagogo o sensibilizador a la acción de la insulina por parte de la infusión de la planta en estudio.

Finalmente, se realizó una curva de tolerancia a la sacarosa (CTS) empleando como control positivo a la acarbosa. En este ensayo, la infusión fue muy activa, tanto en ratones normoglucémicos como hiperglucémicos. En la fase realizada con ratones normoglucémicos se

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

observó que la administración oral del extracto acuoso disminuyó significativamente el pico posprandial de la glucosa con las dosis de 100 y 316 mg/kg (Figura 17A, $**p < 0.01$), además el efecto fue comparable al del control positivo. Así mismo, la administración del extracto acuoso a ratones hiperglucémicos provocó un efecto antihiperoglucémico significativo al disminuir el pico posprandial a todas las dosis evaluadas (Figura 17B, $*p < 0.05$). Con base en estos resultados, se puede concluir que la especie *S. circinata* biosintetiza metabolitos secundarios que pueden actuar como inhibidores de las α -glucosidasas (Suzuki et al., 2016).

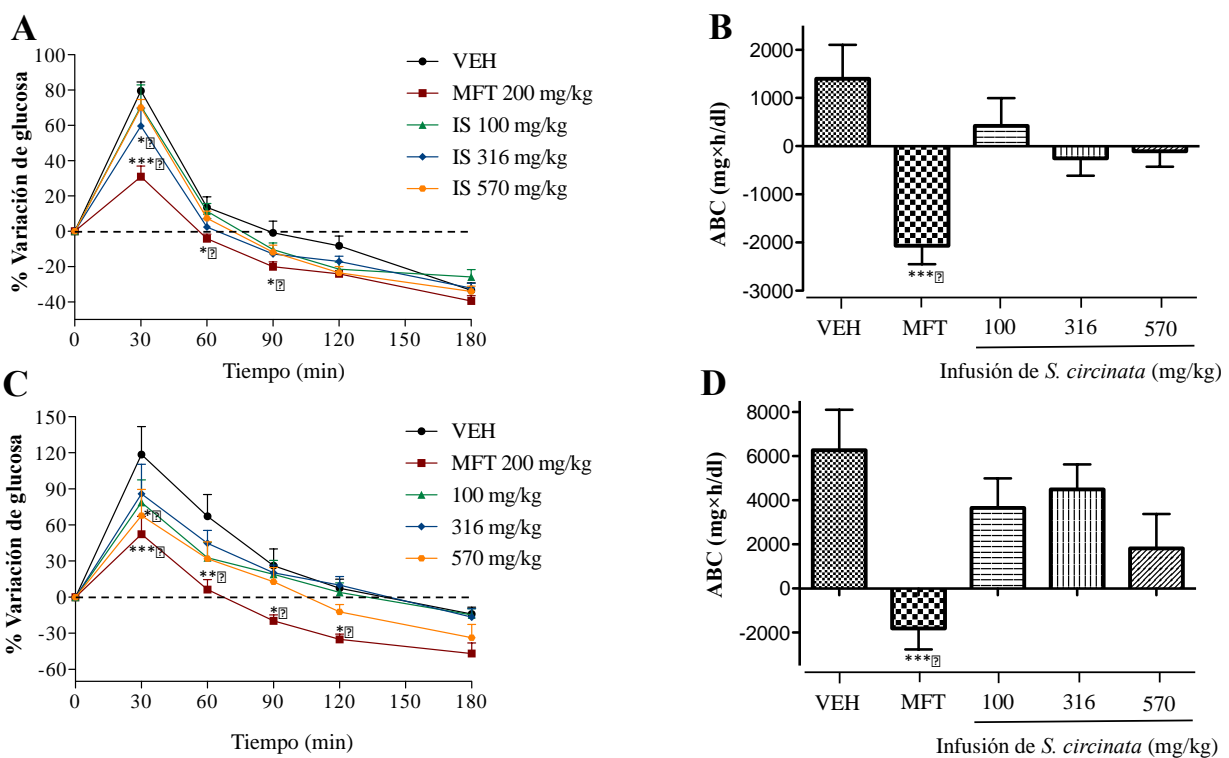


Figura 16. Curva de tolerancia a la glucosa de la infusión de *S. circinata* en ratones normoglucémicos (A-B) e hiperglucémicos (C-D). ABC: área bajo la curva; VEH: vehículo; MFT: metformina; IS: infusión de *S. circinata*. Cada barra o punto representa el promedio \pm error estándar de la media para cada grupo ($n = 6$). (A) y (C) ANADEVAs de dos vías, *post hoc* Bonferroni ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$). (B) y (D) ANADEVAs de una vía, *post hoc* Dunnett ($***p < 0.001$).

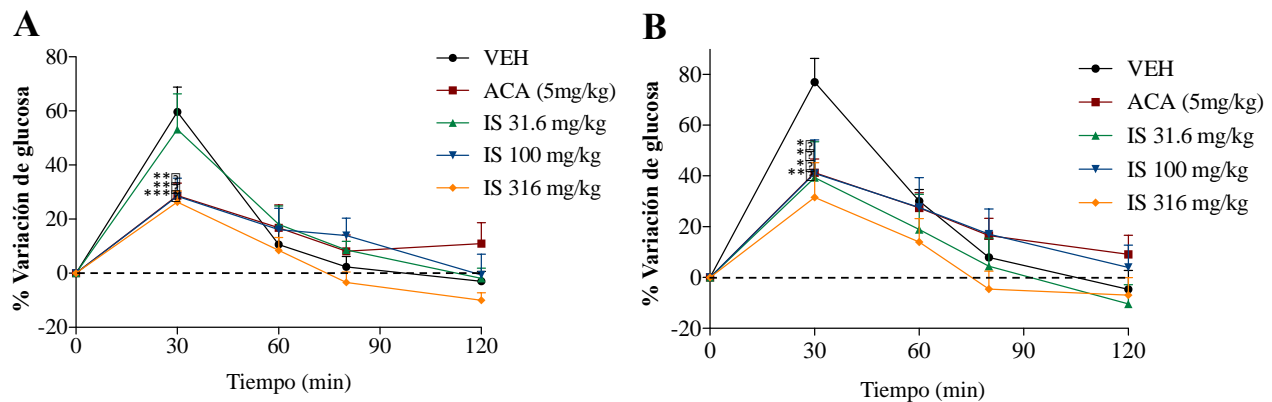


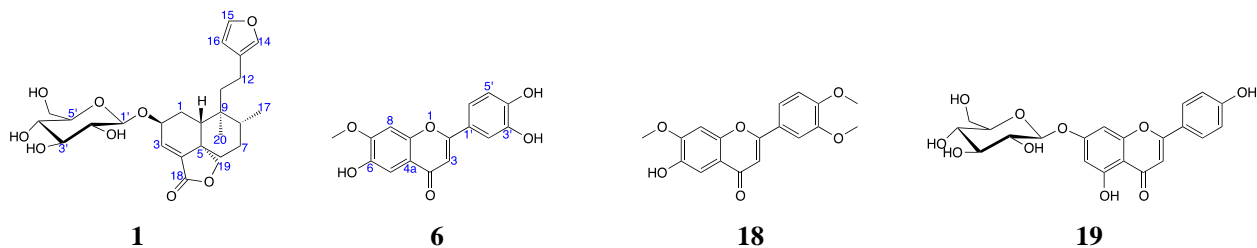
Figura 17. Curva de tolerancia a la sacarosa de la infusión de *S. circinata* en ratones normoglucémicos (A) e hiperglucémicos (B). VEH: vehículo; ACA: acarbose; IS: infusión de *S. circinata*. Cada punto representa el promedio \pm error estándar de la media para cada grupo (n = 6). ANADEVa de dos vías, *post hoc* Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

5.1.2 Estudio químico: Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios.

Con la finalidad de establecer la composición química e identificar los metabolitos activos de la especie, se realizó el estudio químico de un extracto orgánico obtenido por maceración de las partes aéreas de la planta con una mezcla de CH_2Cl_2 - CH_3OH (1:1). La comparación del perfil cromatográfico del preparado tradicional activo con el generado por el extracto de CH_2Cl_2 - CH_3OH (1:1) indicó que ambos compartían la mayoría de los metabolitos (Figura A1). El extracto orgánico fue más fácil de preparar y manipular, por lo tanto, se seleccionó para aislar los metabolitos activos de la planta. Después del fraccionamiento, mediante la aplicación de diversas técnicas cromatográficas, fue posible aislar los glucósidos de diterpenoides de tipo *neo*-clerodano amarisólida (**1**) y amarisólidas B-E (**13-16**), la biflavona 6,6",3"-trihidroxi-7,3',7"-O-trimetilniflavona (**17**) y las flavonas pedalitina (**6**), 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,6-dihidroxi-7-metoxi-4H-cromen-4-ona (**18**) y apigenin-7-*O*- β -D-glucósido (**19**); las estructuras de estos metabolitos se ilustran en la Figura 18. Los productos previamente descritos en la literatura (**1**, **6**, **18** y **19**), se caracterizaron por comparación de sus datos espectroscópicos (RMN) y espectrométricos (ESI-EM), con los reportados en la literatura especializada (Bhardwaj et al., 1988; Maldonado et al., 1996; Švehlíková et al., 2004); es importante mencionar que las flavonas

18 y **19** se describen por primera vez para *S. circinata*. Por otro lado, los compuestos **13-17** son entidades químicas nuevas. A continuación se describe su elucidación estructural.

Metabolitos conocidos



Metabolitos nuevos

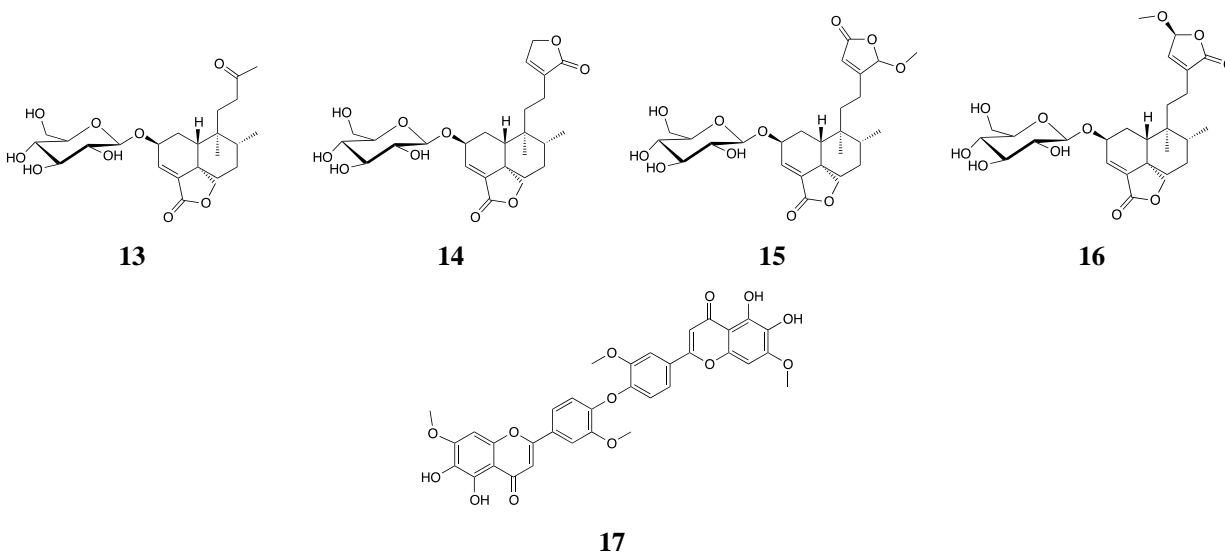


Figura 18. Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas de *S. circinata*.

El espectro de masas de alta resolución del compuesto **17**, obtenido mediante la técnica de ionización por electrospray en modo positivo (Anexo 1, Figura A2), muestra un ión correspondiente a la molécula protonada $[M + H]^+$ en el valor de m/z de 643.1430 correspondiente a una fórmula molecular de $C_{34}H_{26}O_{13}$ para el producto natural. En el espectro al IR (Anexo 1, Figura A3), se observan bandas características para grupos hidroxilo y carbonilo en 3252 y 1663 cm^{-1} , respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El perfil de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (Figuras 19-20) sugirió en principio que el producto era de naturaleza flavonoide. Sin embargo, como la mayoría de la señales se duplicaban era altamente factible que el producto fuera un dímero de flavonoide. Esta hipótesis se confirmó parcialmente con la fórmula molecular calculada que era compatible con un producto de tipo biflavona (Kumar et al., 2005; Oliveira et al., 2002). En el espectro de RMN- ^1H (Figura 19) se observan dos sistemas ABX asignables a los protones de dos anillos aromáticos trisustituídos correspondientes al anillo B para cada unidad de flavonoide; también, se observan dos singletes para los hidrógenos del anillo A pentasustituído de cada flavonoide, asignables a H-8 (δ_{H} 6.75) y H-8'' (δ_{H} 6.69); también, se aprecian dos señales características de los protones vinílicos del anillo C de cada unidad [H-3 (δ_{H} 6.58) y H-3'' (δ_{H} 6.55)]; por último, en la región comprendida entre δ_{H} 3.8 y 3.9 se observan señales características para cuatro grupos metoxilo. Las correlaciones observadas en el experimento NOESY para H-8 y H-8'' con los protones de dos de los grupos metoxilos permitieron situar a dos de estos grupos en C-7 y C-7''. Siguiendo el mismo razonamiento, las correlaciones H-2' (δ_{H} 7.43)/ OCH₃-3' (δ_{H} 3.96) y H-2''' (δ_{H} 7.33)/OCH₃-3''' (δ_{H} 3.94) condujeron a ubicar a los grupos metoxilos restantes en las posiciones C-3' y C-3''' (Anexo 1, Figura A4).

Las correlaciones H-6' (δ_{H} 7.42) \rightarrow C-4' (δ_{C} 152.5) y H-6''' (δ_{H} 7.38) \rightarrow C-4''' (δ_{C} 148.7) observadas en el espectro HMBC permitieron establecer que la unión entre las dos unidades de flavonoides era del tipo C-4'-O-C-4'''. La asignación completa del espectro de ^{13}C -RMN (Figura 20; Tabla 3) se realizó mediante las correlaciones registradas en los espectros bidimensionales HSQC y HMBC (Anexo 1, Figuras A5-A7). Con base en la evidencia anterior, el producto **17** se caracterizó como el biflavonoide 6,6'',3'''-trihidroxi-7,3',7''-O-trimetilniflavona, un nuevo producto natural.

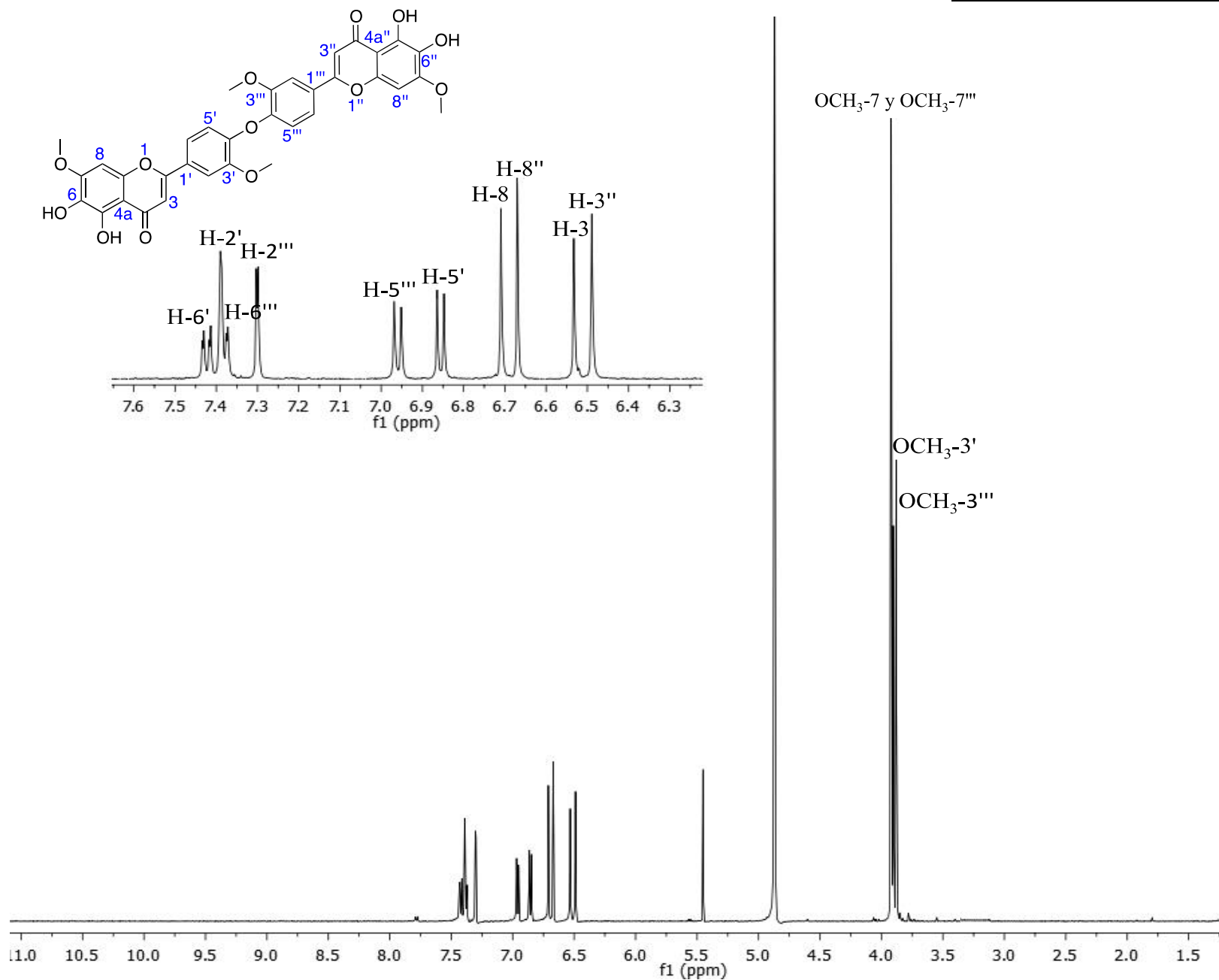


Figura 19. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) de la 6,6',3'''-trihidroxi-7,3',7''-O-trimetilniflavona (17).

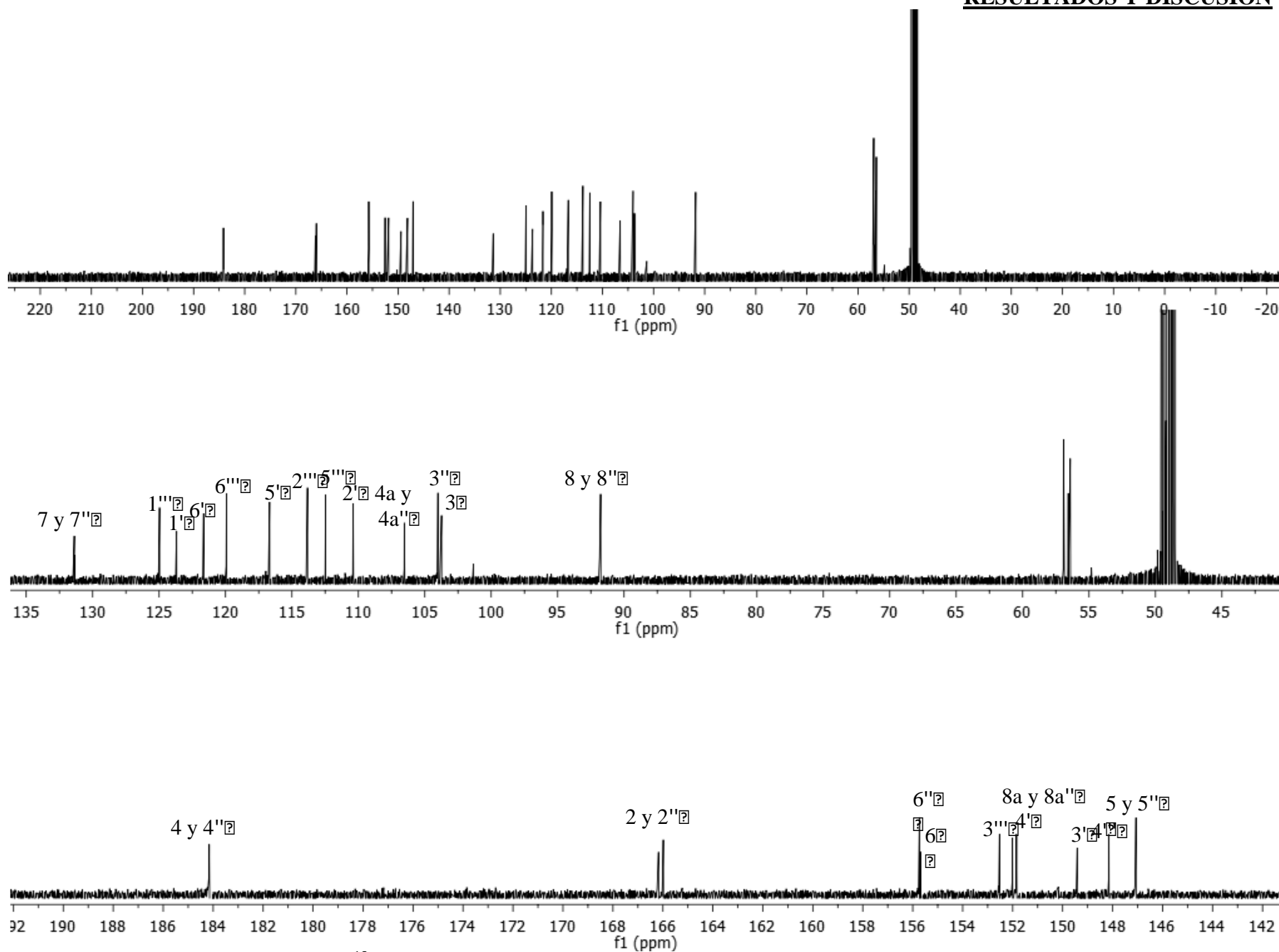


Figura 20. Espectro de ^{13}C -RMN (125 MHz, CD_3OD) de la 6,6'',3'''-trihidroxi-7,3',7''-*O*-trimetiloni flavona (**17**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3. Datos espectroscópicos de ^1H -RMN (500 MHz) y ^{13}C -RMN (125 MHz) de la 6,6'',3'''-trihidroxi-7,3',7''-*O*-trimetiloniflavona (**17**) en CD_3OD .

Posición	δ_c	Tipo de C	δ_H (<i>J</i> in Hz)
2	166.7,	C	
3	104.3,	CH	6.53, s
4	184.1,	C	
4a	107.0,	C	
5	147.6,	C	
6	156.2,	C	
7	131.8,	C	
8	92.4,	CH	6.71, s
8a	152.3,	C	
1'	131.9,	C	
2'	111.0,	CH	7.39, d (2.0)
3'	149.9,	C	
4'	152.5,	C	
5'	117.2,	CH	6.86, d (8.3)
6'	122.2,	CH	7.42, dd (8.4, 2.1)
2''	165.5,	C	
3''	104.5,	CH	6.49, s
4''	184.2,	C	
4a''	107.1,	C	
5''	147.6,	C	
6''	156.3,	C	
7''	131.9,	C	
8''	92.3,	CH	6.67, s
8a''	152.4,	C	
1'''	125.5,	C	
2'''	114.4,	CH	7.30, d 2.2
3'''	153.0,	C	
4'''	148.7,	C	
5'''	113.0,	CH	6.96, d (8.6)
6'''	120.5,	CH	7.38, dd (7.3, 2.1)
OCH ₃ -7	57.4,	CH ₃	3.92, s
OCH ₃ -3'	57.0,	CH ₃	3.90, s
OCH ₃ -7''	57.4,	CH ₃	3.92, s
OCH ₃ -3'''	56.9,	CH ₃	3.89, s

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los productos **13-16** se obtuvieron como sólidos amorfos. Sus fórmulas moleculares se obtuvieron por espectrometría de masas de alta resolución mediante ionización por electrospray en modo positivo. En los espectros correspondientes las moléculas protonadas $[M+H]^+$ se observaron en una m/z de 469.2403, 509.2352, 539.2452 y 539.2455 (Anexo 1, Figuras A9-A12) a partir de los cuales se establecieron las fórmulas moleculares $C_{25}H_{36}O_9$ (**13**), $C_{26}H_{36}O_{10}$ (**14**), $C_{27}H_{38}O_{11}$ (**15**) y $C_{27}H_{38}O_{11}$ (**16**) para los productos naturales. En los espectros al IR de los cuatro diterpenoides se observan bandas atribuibles a grupos hidroxilo (3396 a 3385 cm^{-1}) y a una γ -lactona- α,β -insaturada (1756 a 1749 cm^{-1}).

Los espectros de RMN de los productos **13-16** muestran una gran similitud con los espectros de la amarisólida (**1**) sugiriendo que todos presentan el mismo núcleo clerodánico. En común, los espectros de los cinco compuestos (**1, 13-16**) revelan la presencia de un grupo γ -lactona- α,β -insaturada fusionada en C-4 y C-5, así como una unidad de β -glucopiranosilo unida a un hidroxilo β orientado en la posición C-2 del diterpenoide. Con el objetivo de demostrar la naturaleza β del enlace glicosídico y la configuración D de la glucosa se realizó la hidrólisis enzimática de **1, 13-16** con una β -glucosidasa adquirida comercialmente, y se comparó la glucosa resultante con una muestra de referencia mediante CCD y rotación óptica. Así entonces, la conformación anómerica β se establece por la hidrólisis realizada por la enzima β -glucosidasa, además esto se confirma con el valor de la constante de acoplamiento ($J = 7.7\text{ Hz}$) observada para el proton anomérico en el espectro de H^1 -RMN. Por otra parte, el comportamiento cromatográfico en CCD y la rotación óptica ($[\alpha]_D^{20} + 30$) de la glucosa resultante fue idéntico al de una muestra estándar, corroborando así la naturaleza D del azúcar, este resultado era de esperarse pues es bien conocido que la L-glucosa no se produce en plantas.

El análisis comparativo de los espectros de **1, 13-16** (Figuras 21 y 22), revelan que el anillo de furano β -sustituido presente en **1** está sustituido por un grupo metilcetona en **13**, por una γ -lactona- α,β -insaturada en **14** y por un grupo metiléter ceto- γ -lactol en los productos **15** y **16**. La asignación completa de los datos de RMN se presenta en las Tablas 4 y 5, y se estableció mediante los experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HMBC (Anexo, Figuras A13-A28).

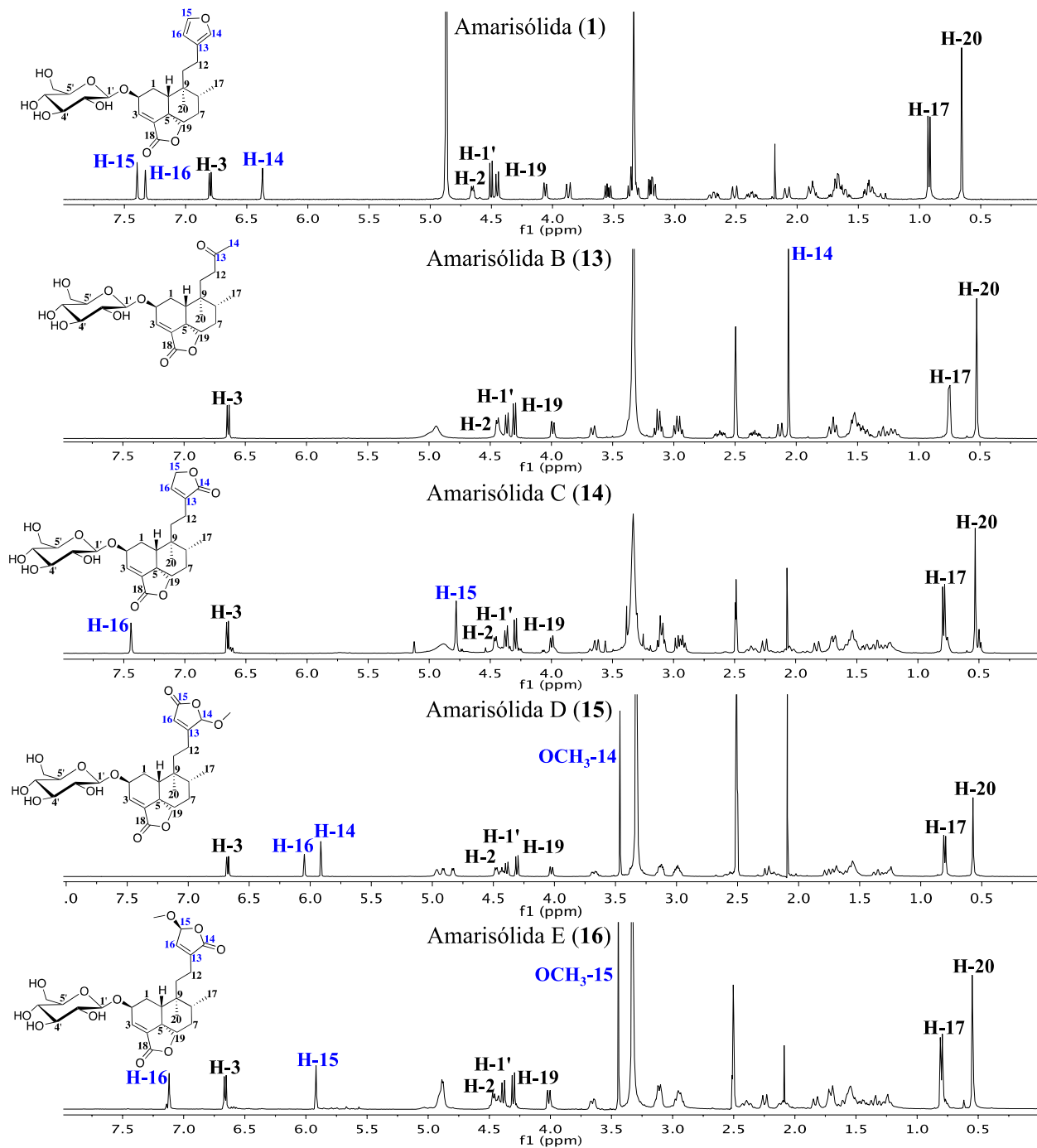


Figura 21. Espectros de ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) de las amarisolidas (1, 13-16).

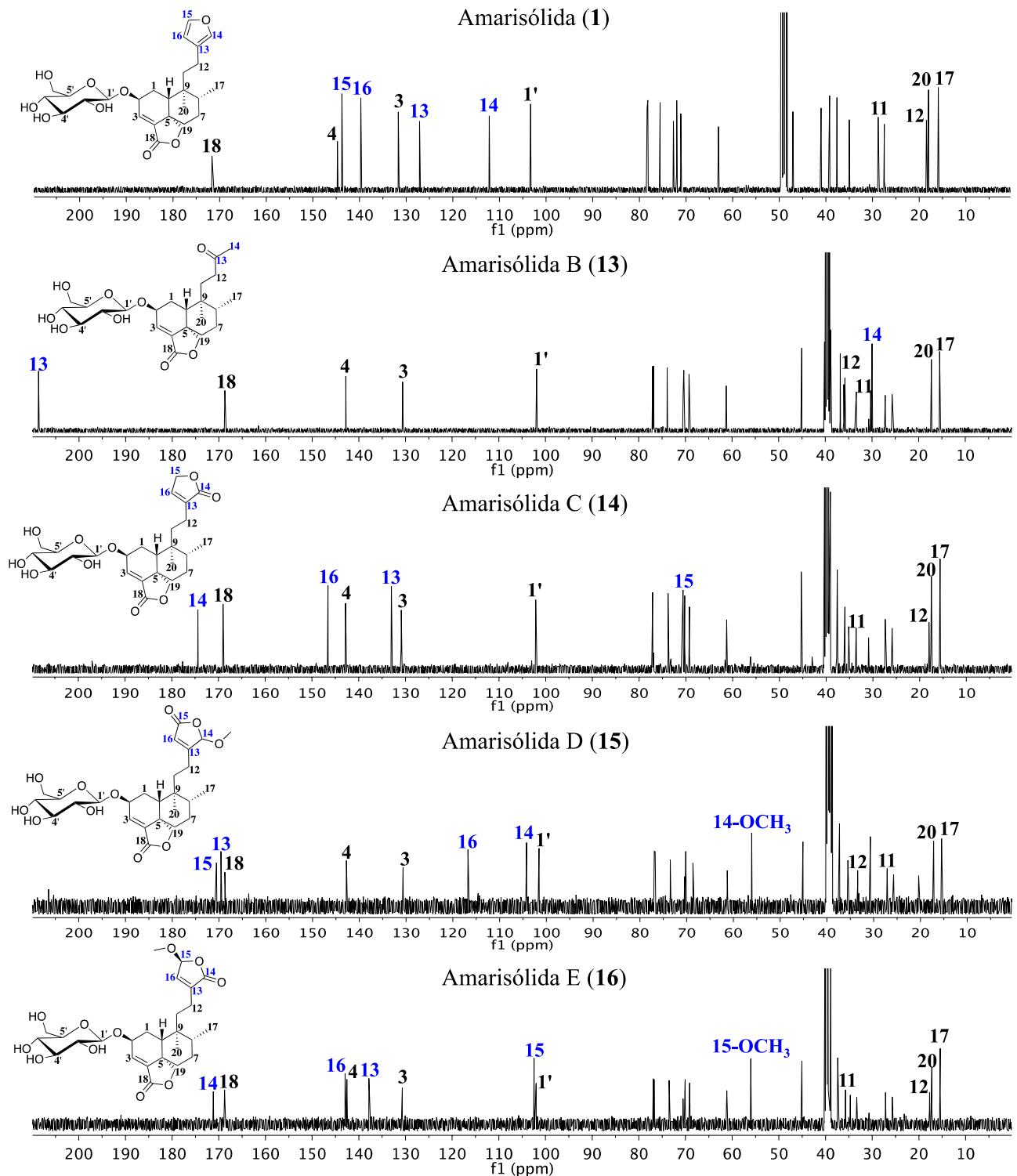


Figura 22. Espectros de ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) de las amarisolidas (1, 13-16).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4. Datos de ^1H -RMN (500 MHz) de las amarisólidas (**13-16**) DMSO- d_6 .

Posición	δ , multiplicidad (<i>J</i> , Hz)			
	13	14	15	16
1	1.76, d (13.8) 1.28, m	1.80, d (13.6) 1.34, m	1.76, d (13.7) 1.34, m	1.81, d (13.8) 1.34, m
2	4.43, m	4.47, m	4.47, m	4.46, d (6.3)
3	6.63, d (6.4)	6.63, d (6.4)	6.67, d (6.3)	6.66, d (6.3)
6	1.69, m 1.18, m	1.72, m 1.25, m	1.67, m 1.25, m	1.71, m 1.25, m
7	1.52, m	1.24, m	1.54, m	1.60, m
8	1.53, m	1.71, m	1.67, m	1.54, m
10	2.12, d (12.9)	2.27, d (12.6)	2.25, d (12.9)	2.24, d (12.9)
11	1.44, m	1.54, m 1.43, m	1.54, m	1.53, m 1.44, m
12	2.61, m 2.32, m	2.37, m 2.06, m	1.56, m 2.09, m	2.33, m 2.09, m
14	2.05, s		5.91, d (0.8)	
15		4.79, m		5.92, brs
16		7.45, t (1.6)	6.04, t (0.7)	7.13, brs
17	0.74, d (6.6)	0.80, d (6.6)	0.80, d (6.4)	0.79, d (6.5)
19	3.97, d (8.1) 4.53, d (8.1)	4.00, d (8.3) 4.38, d (8.2)	4.02, d (8.3) 4.38, d (8.2)	4.02, d (8.3) 4.39, d (8.2)
20	0.51, s	0.54, s	0.56, s	0.56, s
1'	4.29, d (7.7)	4.31, d (7.7)	4.30, d (7.7)	4.30, d (7.7)
2'	2.94, m	2.94, m	2.97, m	2.93, m
3'	3.10, m	3.11, m	3.11, m	3.10, m
4'	2.96, m	2.97, m	2.98, m	2.95, m
5'	3.10, m	3.11, m	3.11, m	3.10, m
6'	3.65, d (11.3) 3.34, m	3.60, d (12.5) 3.44, m	3.67, d (11.6) 3.34, m	3.64, d (11.6) 3.33, m
OCH ₃			3.45, s	
OCH ₃				3.45, s

Tabla 5. Datos de ^{13}C -RMN (125 MHz) de las amarisólidas (**13-16**) en DMSO- d_6 .

Posición	δ , tipo de C							
	13		14		15		16	
1	25.7,	CH ₂	25.7,	CH ₂	26.8,	CH ₂	25.7,	CH ₂
2	69.2,	CH	69.0,	CH	69.1,	CH	69.2,	CH
3	130.6,	CH	130.7,	CH	131.0,	CH	130.8,	CH
4	142.8,	C	142.6,	C	143.2,	C	142.6,	C
5	45.1,	C	45.1,	C	45.6,	C	45.1,	C
6	33.6,	CH ₂	33.3,	CH ₂	33.7,	CH ₂	33.3,	CH ₂
7	27.2,	CH ₂	27.2,	CH ₂	26.2,	CH ₂	27.2,	CH ₂
8	35.8,	CH	35.8,	CH	35.9,	CH	35.7,	CH
9	36.8,	C	37.4,	C	37.7,	C	37.4,	C
10	39.3,	CH	39.2,	CH	39.5,	CH	39.2,	CH
11	30.3,	CH ₂	34.9,	CH ₂	27.6,	CH ₂	34.7,	CH ₂
12	36.0,	CH ₂	17.8,	CH ₂	33.9,	CH ₂	17.7,	CH ₂
13	208.7,	C	132.8,	C	170.0,	C	137.9,	C
14	30.0,	CH ₃	174.2,	C	104.7,	CH	171.2,	C
15			70.4,	CH	171.0,	C	102.5,	CH
16			146.4,	CH	117.2,	CH	143.0,	CH
17	15.5,	CH ₃	15.4,	CH ₃	15.9,	CH ₃	15.5,	CH ₃
18	168.7,	C	168.8,	C	169.2,	C	168.8,	C
19	70.5,	CH ₂	70.6,	CH ₂	70.9,	CH ₂	70.6,	CH ₂
20	17.3,	CH ₃	17.2,	CH ₃	17.6,	CH ₃	17.3,	CH ₃
1'	101.9,	CH	101.9,	CH	102.0,	CH	102.8,	CH
2'	73.9,	CH	73.6,	CH	74.0,	CH	73.5,	CH
3'	76.8,	CH	76.7,	CH	77.2,	CH	76.7,	CH
4'	70.3,	CH	70.0,	CH	70.7,	CH	70.8,	CH
5'	77.0,	CH	76.9,	CH	77.4,	CH	77.0,	CH
6'	61.2,	CH ₂	61.1,	CH ₂	61.8,	CH ₂	61.2,	CH ₂
OCH ₃					56.5,	OCH ₃		
OCH ₃							56.1,	OCH ₃

El punto de unión del fragmento etilo (C-11-C-12) al anillo correspondiente al metiléter cetog-lactol en los compuestos **15** y **16** se estableció con base en los desplazamientos químicos observados en el espectro de ^{13}C -RMN para los carbonos del anillo. Así, los desplazamientos de los centros C-13 en **15** y **16** (**15/16** δ_{C} 170.0/ 137.9), C-14 (**15/16** δ_{C} 104.7/171.2), C-15 (**15/16** δ_{C} 171.0/102.5) y C-16 (**15/16** δ_{C} 117.2/143.0), C-12 y C-11 [C-11 (**15/16** δ_{C} 27.6/34.7) y C-12 (**15/16** δ_{C} 33.9/17.7)] demuestran que C-12 se une al anillo en la posición C-14 en **15**, mientras que en **16** se une en el carbono C-15 (Du et al., 2015; Omosa et al., 2010; Omosa et al., 2014;

Wu et al., 2014). De manera adicional, las correlaciones observadas en los espectros de HMBC para H-12 y H-14 en **15** [H-12a → C-14; H-12b → C-14; y H-14 → C-12] y para H-12, H-14 y H15 en **16** [H-12a → C-16; H-12b → C-16; H-15 → C-13 y C-14] confirman esta propuesta (Figura 23; Anexo 1, Figuras A22 y A26).

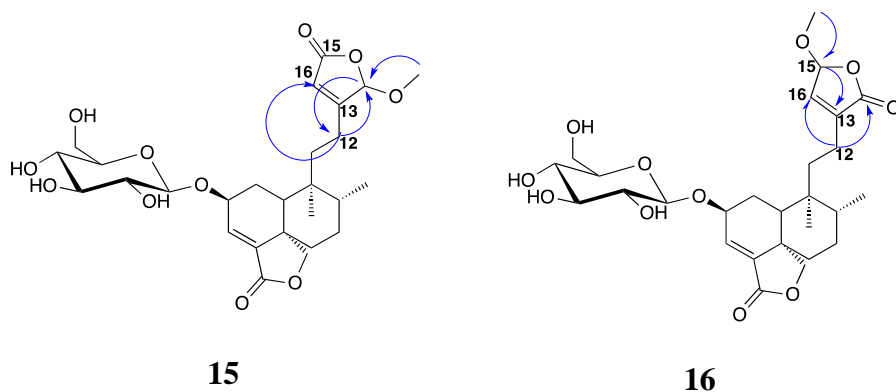


Figura 23. Correlaciones clave en el espectro de HMBC de las amarisolidas **15** y **16**.

La configuración relativa de los centros estereogénicos C-2, C-5, C-8, C-9 y C-10, para los compuestos **13-16**, se estableció mediante el análisis de los espectros NOESY (Anexo 1, Figuras A16, A20, A24 y A28). Las interacciones más importantes demostraron que la configuración relativa de estos centros en los productos naturales **13-16** es la misma que la descrita para la amarisolida (**1**) (Figura 24).

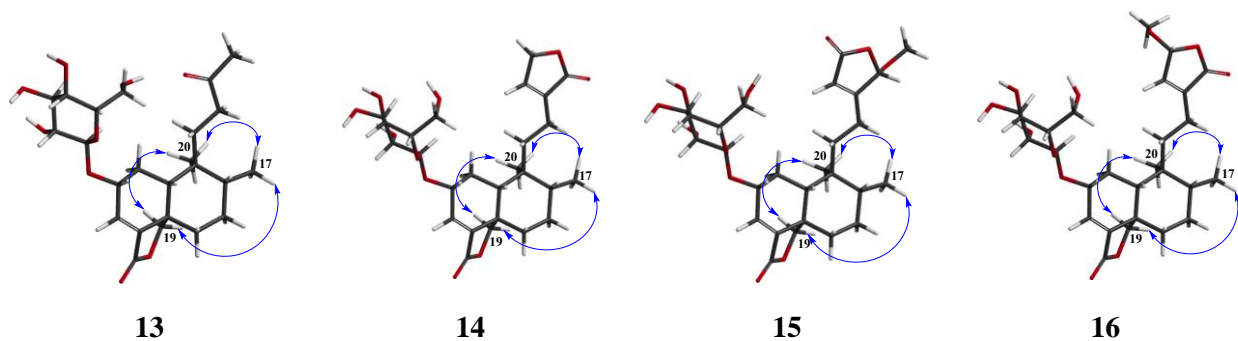


Figura 24. Correlaciones clave en los espectros de NOESY de las amarisolidas (**13-16**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de la γ -lactona- α,β -insaturada cercana al centro estereogénico C-5 sugiere que la configuración de estos productos (**1**, **13-16**) puede establecerse por dicroísmo circular. Los espectros teóricos se obtuvieron mediante cálculos de modelado molecular (TDDFT), considerando para la optimización de conformeros la configuración relativa previamente establecida, que consisten en un sistema *trans*-clerodano, coherente con los productos previamente descritos para el género *Salvia* (Bautista et al., 2014; Bisio et al., 2015; Toscano et al., 2001). Todos los conformeros dentro de una ventana de 3.0 kcal/mol se seleccionaron y optimizaron utilizando DFT con un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP. La información de los conformeros considerados para la predicción de los espectros se muestra en el Anexo 2. Los espectros experimentales muestran dos efectos Cotton negativos en ~ 208 y ~ 250 nm debido a las transiciones electrónicas: $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente, coherentes con la presencia de la γ -lactona- α,β -insaturada (Wu et al., 2014). La comparación de los espectros obtenidos (Figura 25) demuestra claramente que los experimentales son prácticamente iguales a los teóricos de los isómeros *neo*; por lo tanto, la configuración absoluta de los centros estereogénicos de los productos **1**, **13-16** corresponde a *2S,5S,8R,9R,10R*. Estos resultados son coherentes con lo descrito en la literatura, pues es bien conocido que la mayoría de los diterpenos del género *Salvia* son del tipo neoclerodanos y no *ent*-neoclerodano, esto debido razones biogénicas (Bautista et al., 2014; Bisio et al., 2015; Toscano et al., 2001). Estas evidencias proporcionan confiabilidad a la estrategia aplicada para determinar la configuración absoluta de los centros estereogénicos antes indicados.

Una vez establecida la configuración absoluta del núcleo diterpenoide en los productos naturales **15** y **16**, y siguiendo la misma estrategia, se calcularon los espectros de DCE para los posibles epímeros en las posiciones C-14 y C-15, respectivamente. Los resultados para el producto **16** demostraron que el espectro experimental concuerda con el espectro calculado para el epímero C-15S. Sin embargo, en el caso del producto **15** ninguno de los espectros teóricos concuerda totalmente con el experimental, por esta razón la configuración para el centro estereogénico C-14 no se estableció. Con base en la evidencia descrita los productos se caracterizaron como: *(2S,5S,8R,9R,10R)-2-(O- β -D-glucopiranosil)-neo-clerodane-3-en-9-*

oxobutil-18,19-ólida [amarisólida B (**13**)], (2*S*,5*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-2-(*O*- β -D-glucopiranosil)-*neo*-clerodane-3,13-dien-14,15;18,19-diólida [amarisólida C (**14**)], (2*S*,5*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-2-(*O*- β -D-glucopiranosil)-*neo*-clerodane-14-metoxi-3,13-dien-15,14;18,19-diólida [amarisólida D (**15**)] y (2*S*,5*S*,8*R*,9*R*,10*R*,15*S*)-2-(*O*- β -D-glucopiranosil)-*neo*-clerodane-15-metoxi-3,13-dien-14,15;18,19-diólida [amarisólida E (**16**)].

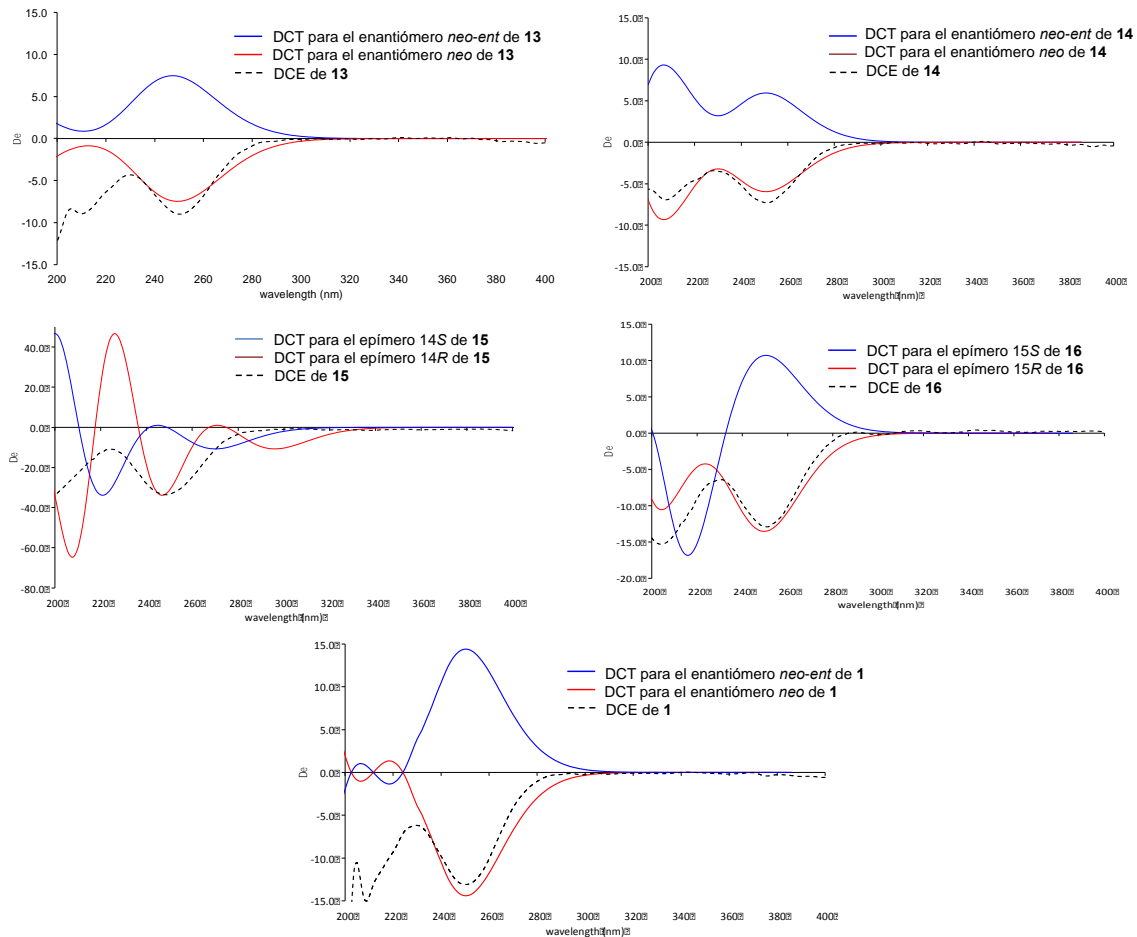


Figura 25. Comparación de los espectros de DC de las amarisólidas (**1**, **13-16**).

5.1.3 Potencial antihiper glucémico de los metabolitos aislados de *S. circinata*.

Con la finalidad de establecer el potencial antihiper glucémico de los productos aislados de *S. circinata* (**1**, **6** y **13-19**), se evaluó su efecto inhibitorio sobre las enzimas α -glucosidasas de

rata usando el protocolo descrito en la sección experimental. Este procedimiento se basa en la cuantificación espectrofotométrica del producto de hidrólisis del *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido en presencia de un inhibidor (Figura 26); de este modo, la cantidad de *p*-nitrofenol liberado de la hidrólisis es inversamente proporcional a la inhibición de la enzima (Oki et al., 1999).

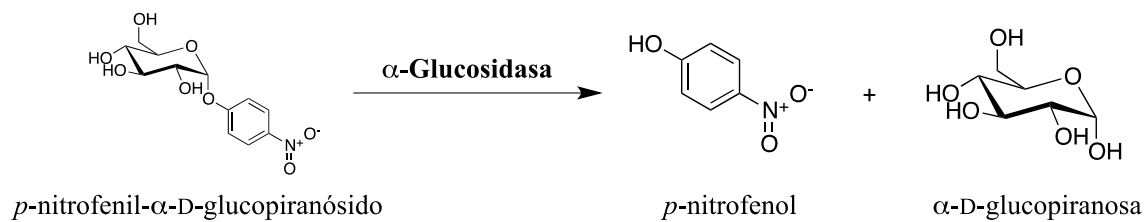


Figura 26. Reacción de hidrólisis en la determinación espectrofotométrica de inhibición de las enzimas α -glucosidasas.

Según los resultados obtenidos (Tabla 6), los productos de tipo flavonoide fueron los compuestos más activos, en particular el biflavonoide (**17**) que presentó una actividad 2.5 veces mejor que la del control positivo acarbosa. Por otro lado, entre los diterpenoides la amarisólida (**1**) presentó el mejor efecto inhibitorio. Con estos resultados, se comprueba que todos los metabolitos aislados de la especie contribuyen en diferentes grados con el efecto observado con el preparado tradicional.

Los metabolitos mayoritarios **1** y **6** presentes en la especie se evaluaron también contra la enzima α -glucosidasa obtenida del microorganismo *Ruminococcus obeum*. Esta bacteria forma parte de la flora normal del intestino en los humanos y participa en el metabolismo de los carbohidratos. La enzima se seleccionó como blanco molecular para el ensayo de inhibición de α -glucosidasas debido a que es un homólogo de la maltasa-glucoamilasa N-terminal (2QMJ) humana con un 85% de cobertura y una alta conservación del sitio catalítico (Figura 27). La 2QMJ está más relacionada filogenéticamente con la de *R. obeum* que con las enzimas de levadura o de rata; en consecuencia, la enzima resulta una mejor herramienta molecular para detectar inhibidores de α -glucosidasas efectivas para los humanos (Tan et al., 2017).

Tabla 6. Efecto inhibitorio de los metabolitos de *S.circinata* sobre las α -glucosidasas de rata.

Muestra	CI ₅₀ (mM) ^a	% de Inhibición ^c
Acarbosa ^b	0.10 ± 0.003	80.2
1	0.50 ± 0.032	70.6
6	0.81 ± 0.039	100.0
13	> 10.0	< 50.0
14	> 10.0	< 50.0
15	> 10.0	< 50.0
16	9.50 ± 0.840	56.0
17	0.04 ± 0.001	98.0
18	0.20 ± 0.012	100.0
19	1.80 ± 0.140	95.0

^aResultado del promedio ± la desviación estándar (n = 3); ^bControl positivo; ^c% de inhibición a una concentración máxima de 10.0 mM de inhibidor.

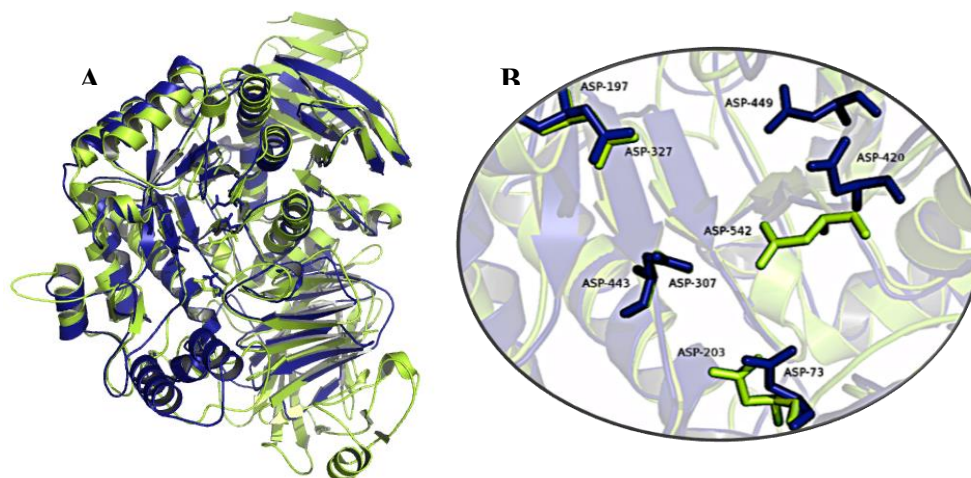


Figura 27. Comparación de la estructura de las enzimas α -glucosidasas de *R. obeum* (azul) y de la maltasa-glucoamilasa de humano (verde). (A) Alineación 3D de las enzimas. (B) Sitios catalíticos de *R. obeum*.

Para realizar la evaluación *in vitro* con la enzima de *R. obeum*, se aplicó el protocolo anteriormente descrito estandarizando las condiciones experimentales de temperatura, tiempo de incubación y la concentración de sustrato que fueran óptimas para el ensayo. Como control positivo se utilizó acarbosa la cual mostró un porcentaje de inhibición de 80% a una concentración de 4.0 mM y un valor de CI₅₀ de 1.03 ± 0.014 mM (Figura 28A). Los productos **1**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

y **6** resultaron muy activos con un valor de CI_{50} de 0.4 ± 0.019 y 0.06 ± 0.003 mM, respectivamente; su efecto inhibitorio fue mejor que el del control positivo. Estos resultados sugieren que ambos productos tendrían la capacidad de inhibir de manera similar a la enzima humana maltasa-glucosidasa.

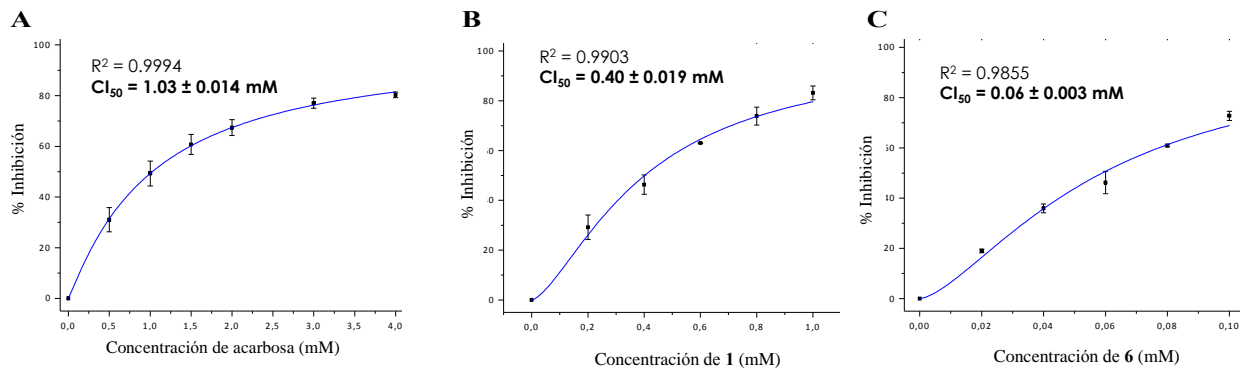


Figura 28. Efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa de *R. obeum*. (A) Curva del control positivo; (B) curva de la amarisólida (**1**); (C) curva de la pedalitina (**6**).

Con el objetivo de demostrar la actividad *in vivo* como agentes antihiper glucémicos inhibidores de la enzimas α -glucosidasas de los productos **1** y **6** se realizó una curva de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglu cémicos. Los resultados muestran que la administración oral de ambos productos provoca un notable efecto antihiper glucémico; la amarisólida (**1**) tiene la capacidad de inhibir significativamente (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$) el pico posprandial de glucosa a las dosis de 10 y 31.6 mg/Kg (Figura 29A), mientras que la pedalitina (**6**) tiene un efecto significativo (** $p < 0.01$) a partir de la dosis de 1.0 mg/Kg (Figura 29B). Ambos productos mostraron efectos dependientes de la dosis y similares a los del control positivo; en el caso de la pedalitina (**6**), en la dosis de 10.0 mg/Kg, se observó un efecto mejor que el de la acarbose.

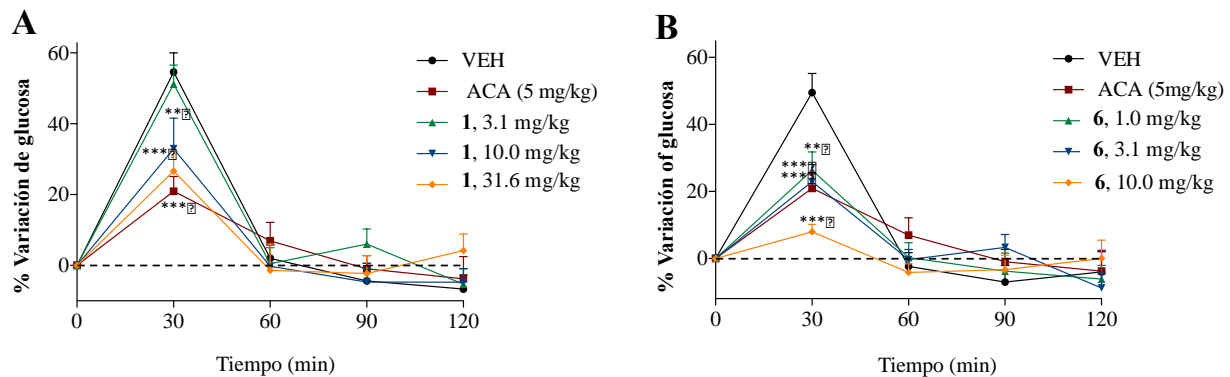


Figura 29. Curva de tolerancia a la sacarosa de (A) amarisólida (**1**) y (B) pedalitina (**6**) en ratones normoglucémicos. VEH: vehículo; ACA: acarbosa. Cada punto representa el promedio \pm error estándar de la media para cada grupo ($n = 6$). ANADEVIA de dos vías, *post hoc* Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

Con la finalidad de completar los estudios del efecto inhibitorio de los productos **1** y **6** se realizaron estudios de acoplamiento y dinámica molecular con la enzima α -glucosidasa de *R. obeum*. El acoplamiento molecular (AM) es un método computacional que busca formas de unión entre ligandos potenciales (un fármaco) y un blanco macromolecular (normalmente células, proteínas o procesos químicos), cuya estructura se conoce experimentalmente (Huey et al., 2007; Morris et al., 1998; Rudnitskaya et al., 2010; Scior et al., 2007). Así pues con los estudios de acoplamiento molecular de acarbosa, **1** y **6** con la enzima de *R. obeum* se logró establecer que las tres moléculas pueden interactuar con el sitio catalítico de la enzima, y que algunos de los aminoácidos que intervienen en las interacciones son iguales en los tres casos. La estructura de estos complejos se muestra en la Figura 30. Para **1** se observa que para la unión se forman puentes de hidrógeno con los aminoácidos Asp 197 y Arg 404 y los grupos hidroxilo de C-4' y C-2', respectivamente; además se aprecian interacciones de Van der Waals con los aminoácidos Glu 481, Ala 480, Asp 73, Trp 169, Ile 198 y Asp 307. Por otro lado, **6** interactúa con los aminoácidos Ile 234, Trp 305, Asp 197, Asp 307, Ile 198, Trp 271, Val 351, Phe 314 y Asp 73 mediante fuerzas de Van der Waals.

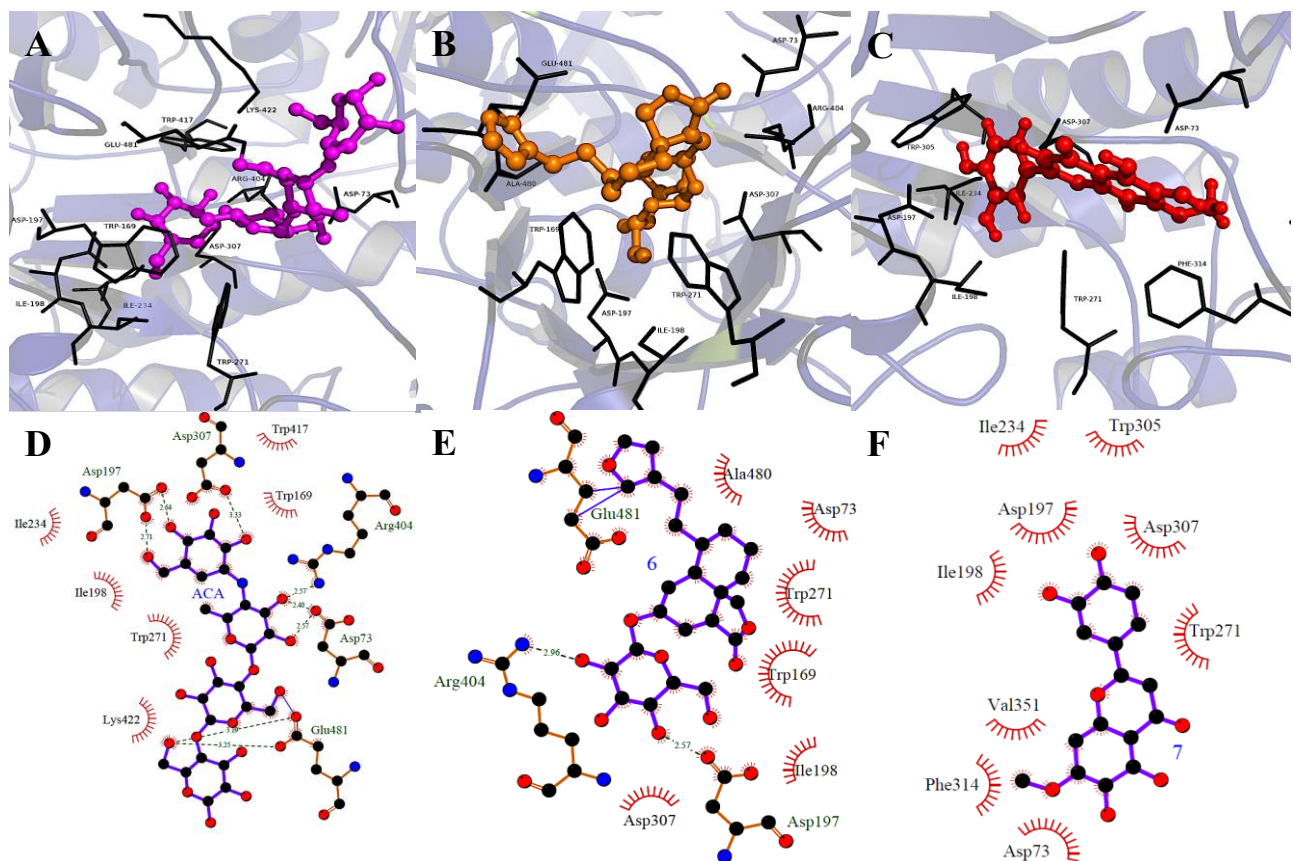


Figura 30. Modelo estructural en 3D de los complejos formados con la α -glucosidasa de *R. obeum*. (A) acarbose, (B) amarisolida (**1**) y (C) pedalitina (**6**). Sitios y aminoácidos involucrados en la unión entre la α -glucosidasa de *R. obeum* con (D) acarbose, (E) amarisolida (**1**) y (F) pedalitina (**6**).

Posteriormente, se realizó un análisis de dinámica molecular (DM) cuya aplicación al estudio de sistemas biológicos permite describir el tipo de unión y las fuerzas de interacción entre posibles fármacos y sus dianas moleculares bajo condiciones específicas. A diferencia de otros métodos de simulación molecular (proteína-receptor), la DM permite el estudio de un sistema a través del tiempo y no solamente en “un estado”; además hace posible la identificación de cambios conformacionales del receptor, lo que puede brindar información crucial para el diseño de fármacos. Una ventaja de realizar estudios de DM es que se pueden simular sistemas muy complejos en los que se describe explícitamente el disolvente, la presencia de iones, la temperatura y presión, así como la adición de cofactores, esto resulta de gran interés pues el sistema adquiere gran similitud con los sistemas biológicos reales generando resultados más

confiables (Cai et al, 2012; Meller, 2001; Phillips et al., 2005). Los resultados de la DM para la acarbosa, **1** y **6** indican que la energía total de los tres sistemas se mantiene constante a través del tiempo (20 ns), revelando que los complejos formados entre la enzima de *R. obeum* y los productos son estables. Según las energías calculadas para los sistemas, el complejo más estable se forma entre la enzima y la pedalitina (**6**) con un valor de ΔG de -31.26 ± 2.9 ; mientras que la estabilidad de los complejos formados con la acarbosa y la amarisólida (**1**) son similares entre sí, pues los valores de ΔG son del mismo orden de magnitud (-23.12 ± 4.6 , -20.03 ± 3.4 , respectivamente). Es importante mencionar que estos resultados correlacionan con las actividades *in vivo* e *in vitro* de los productos, pues el complejo más estable se forma con el producto que mostró la mejor actividad *in vivo*; por otro lado la acarbosa y la amarisólida (**1**) que tuvieron actividades similares formaron complejos con ΔG parecidos.

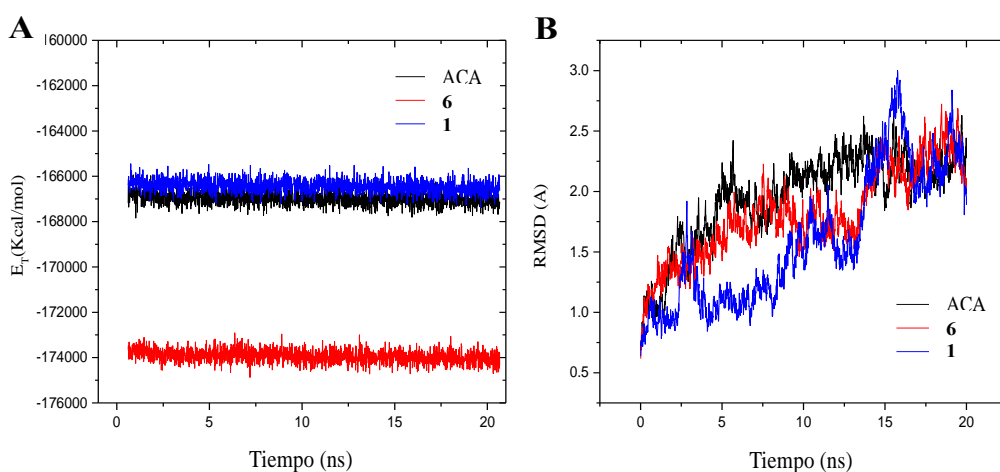


Figura 31. Análisis de la trayectoria de los estudios de dinámica molecular. (A) Gráfico de la energía total del sistema en función del tiempo. (B) La RMSD en función del tiempo. ACA: acarbosa.

5.1.4 Pruebas de composición

5.1.4.1 Establecimiento del perfil cromatográfico de la fracción orgánica de la infusión.

El desarrollo y validación de métodos analíticos son de gran importancia para establecer las pruebas de calidad (identidad y composición química) de una droga cruda y sus preparados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de CLAE para el desarrollo de métodos analíticos de plantas medicinales ha sido muy exitoso, sin embargo en los últimos años la CLUE se ha posicionado como una mejor herramienta analítica. La CLUE surgió como una mejora realizada a los equipos de CLAE, así la reducción del tamaño de partícula en las columnas para CLUE ($< 2.5 \mu\text{m}$) permite trabajar con presiones mucho mayores, mejorando notablemente la sensibilidad, resolución, y el tiempo de análisis (Mahamudur, 2017). Entonces como primer paso para el desarrollo del método, se establecieron las condiciones cromatográficas óptimas para la resolución y cuantificación de los dos metabolitos mayoritarios de la fracción de AcOEt de la infusión de *S. circinata* mediante CLUE acoplada con detectores de arreglo de fotodiodos (PDA) y de corriente iónica total (ESI-Negativo). El cromatograma generado representa la composición característica del preparado (Figura 32); la mejor resolución se obtuvo con una columna en fase reversa C_{18} con un sistema de elución en gradiente con una mezcla de $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ (0.1 % ácido fórmico en ambas fases). La identificación de los picos cromatográficos se realizó mediante co-elución con muestras de referencia de los metabolitos mayoritarios **1** y **6**, los cuales se seleccionaron como compuestos marcadores activos para establecer las pruebas de identidad y composición para *S. circinata*.

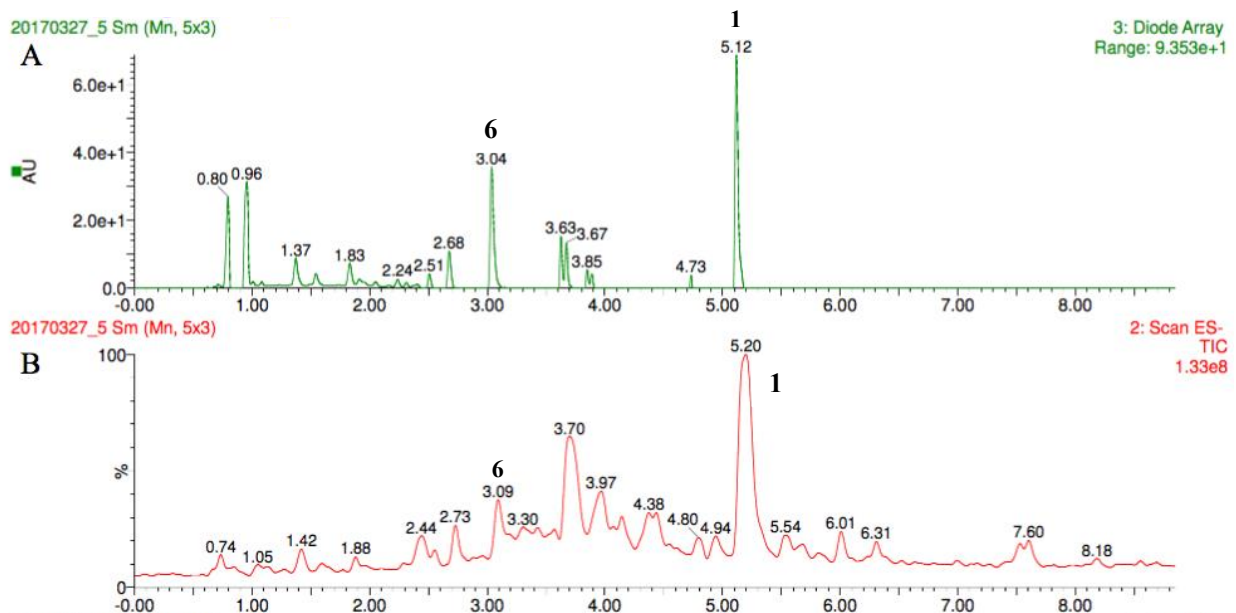


Figura 32. Perfil cromatográfico representativo de la composición química de la partes aéreas de *S. circinata*. (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.

5.1.4.2 Validación del método analítico.

Una vez establecido el método se procedió a su validación. Este proceso tiene como objetivo demostrar que la estrategia experimental desarrollada es adecuada para el propósito planteado. Para validar un método es necesario generar la información que demuestre científicamente que dicho método cumple con las características de desempeño aprobadas por las Guías de Validación de la FDA (ICH Q2 (R1), 2005).

5.1.4.2.1 Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema corresponde a la capacidad de un método para obtener respuestas analíticas directamente proporcionales a la concentración de un analito en un intervalo de concentraciones pertinentes para la aplicación del método (ICH Q2 (R1), 2005). La linealidad del sistema se estableció construyendo curvas de calibración de **1 y 6** (5, 10, 25, 50 y 100 µg/ml); la respuesta analítica se determinó midiendo el ABC de los picos cromatográficos registrados en UV y ESI-Negativo para ambos productos. En las Tablas 7-9 y en las Figuras 33-34 se muestran los resultados.

Tabla 7. Resultados experimentales de la curva de calibración de la amarisólida (**1**).

C (µg/ml)	UV (ABC)						DE	CV (%)
	1	2	3	4	5	6		
5	18094	25170	21104	19575	22329	18094	2707.30	0.13
10	54823	52243	52482	54425	49938	54823	1957.93	0.04
25	134457	141685	138187	136563	132710	134457	3465.16	0.03
50	275974	283748	281201	279250	283903	275974	3323.09	0.01
100	561157	549994	554844	571603	550632	561157	8982.28	0.02

C (µg/ml)	ESI-Negativo (ABC)						DE	CV (%)
	1	2	3	4	5	6		
5	51001	50769	52540	51749	56711	51001	2169.19	0.04
10	95597	82464	112864	124375	126408	95597	16946.93	0.16
25	241115	227813	222140	216018	241010	241115	10060.79	0.04
50	319111	371431	354766	372633	393094	319111	24740.35	0.07
100	529297	592053	553990	588622	565136	529297	23162.24	0.04

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 8. Resultados experimentales de la curva de calibración de la pedalitina (6).

C (µg/ml)	UV (ABC)						DE	CV (%)
	1	2	3	4	5	6		
5	211732	256461	278321	246396	262618	211732	22245.69	0.09
10	463143	653036	601003	585019	617732	463143	64498.64	0.11
25	1440052	1580782	1643280	1652953	1652552	1440052	81494.77	0.05
50	3111063	3141937	3366926	3364001	3278864	3111063	108119.77	0.03
100	6524917.0	6498129	6556761.0	6836398	6715604	6524917.0	129350.95	0.02

C (µg/ml)	ESI-Negativo (ABC)						DE	CV (%)
	1	2	3	4	5	6		
5	43349	53585	44209	50046	40826	43349	4692.46	0.10
10	69592	90313	95132	74078	82093	69592	9570.67	0.12
25	138733	146716	142703	143380	146267	138733	2875.93	0.02
50	218219	217153	224207	218620	225570	218219	3436.99	0.02
100	363882	367645	368469	350873	365886	363882	6434.92	0.02

Tabla 9. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema.

	Amarisólida (1)		Pedalitina (6)	
	UV	ESI-Negativo	UV	ESI-Negativo
b₀	5636.35 ± 4957.824	5252.80 ± 3618.541	67082.26 ± 93223.559	3229.93 ± 13963.918
b₁	-4337.55 ± 28.552	64101.76 ± 208.386	-87538.57 ± 536.886	48524.57 ± 80.420
R	0.9997	0.9996	0.9992	0.9929
R²	0.9994	0.9921	0.9985	0.9859

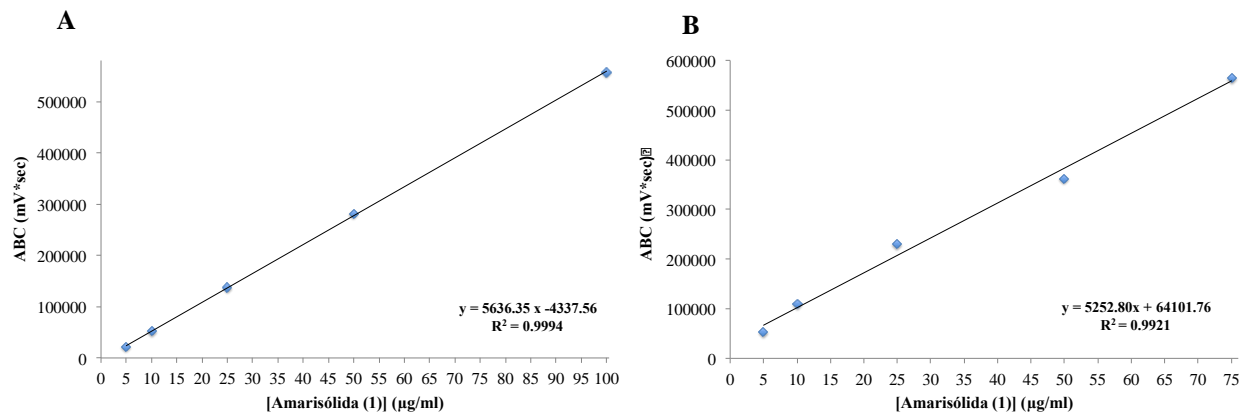


Figura 33. Curvas de calibración de amarisólida (1) para la evaluación de la linealidad del sistema. (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.

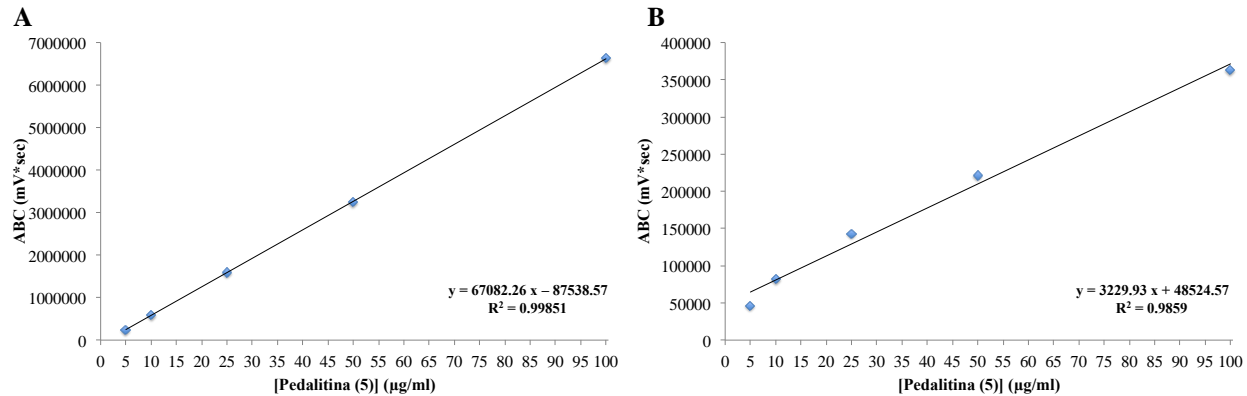


Figura 34. Curvas de calibración de pedalitina (6) para la evaluación de la linealidad del sistema. (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.

Como puede observarse los valores de R y R^2 de las curvas de los dos estándares con ambos detectores se encuentran dentro de los límites establecidos según la ICH, por lo que se puede concluir que la linealidad del sistema se cumple para los dos estándares dentro del rango de concentraciones analizadas y tomando en cuenta la respuesta analítica de los dos detectores.

5.1.4.2.2 Linealidad y exactitud del método.

5.1.4.2.2.1 Linealidad del método.

Para evaluar la linealidad del método se realizaron curvas de calibración para cada estándar (1 y 6) recuperados de la matriz de trabajo. Las concentraciones adicionadas de los estándares a la matriz fueron de 10, 50 y 75 µg/ml. La respuesta de la cantidad recuperada para cada estándar se realizó considerando el valor de la respuesta de la matriz de trabajo sin adición de ningún estándar. En las Tablas 10-12 se muestran los resultados obtenidos de respuesta analítica y los análisis de regresión lineal, y en las Figuras 35-36 se muestran las curvas de calibración de los productos 1 y 6, respectivamente.

Estos resultados demuestran que el método es lineal cuando se utiliza el detector PDA, sin embargo los resultados obtenidos con el detector de masas presentan un R^2 menor debido a la complejidad de la matriz de trabajo y a la alta sensibilidad del detector.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 10. Resultados experimentales para la linealidad del método para amarisólida (1).

Concentración amarisólida (1) (µg/ml)	Concentración adicionada (µg/ml)	UV		ESI-Negativo	
		ABC	Concentración recuperada (µg/ml)	ABC	Concentración recuperada (µg/ml)
10	10	53526.7	10.3	106508.2	8.1
10	10	52018.7	10.0	97484.2	6.4
10	10	52899.7	10.2	121958.2	11.0
10	10	53575.7	10.3	116190.2	9.9
10	10	52732.7	10.1	103732.2	7.5
10	10	53746.7	10.3	111520.2	9.0
50	50	279631.7	50.4	287190.2	42.5
50	50	277854.7	50.1	285778.2	42.2
50	50	277207.7	50.0	324900.2	49.6
50	50	280653.7	50.6	354246.2	55.2
50	50	274478.7	49.5	355258.2	55.4
50	50	286176.7	51.5	286057.2	42.3
75	75	427925.7	76.7	406975.2	65.3
75	75	429602.7	77.0	374397.2	59.1
75	75	432576.7	77.5	388159.2	61.7
75	75	419131.7	75.1	422042.2	68.1
75	75	429993.7	77.1	382963.2	60.7
75	75	415209.7	74.4	387419.2	61.6

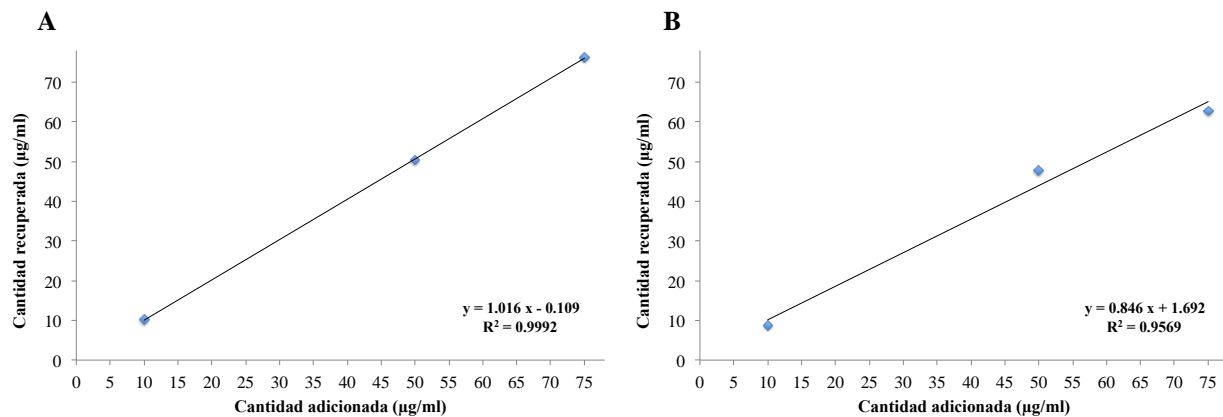


Figura 35. Linealidad del método para la cuantificación de amarisólida (1). (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11. Resultados experimentales para la linealidad del método para pedalitina (6).

Concentración pedalitina (1) (µg/ml)	Concentración adicionada (µg/ml)	UV		ESI-Negativo	
		ABC	Concentración recuperada (µg/ml)	ABC	Concentración recuperada (µg/ml)
10	10	586417.4	10.0	80070.0	9.8
10	10	599844.4	10.2	81061.0	10.1
10	10	603108.4	10.3	81254.0	10.1
10	10	591584.4	10.1	80704.0	10.0
10	10	602845.4	10.3	80385.0	9.9
10	10	586079.4	10.0	80177.0	9.8
50	50	3314582.4	50.7	210819.0	50.2
50	50	3332391.4	51.0	205130.0	48.5
50	50	3303805.4	50.6	209424.0	49.8
50	50	3299712.4	50.5	210137.0	50.0
50	50	3325451.4	50.9	209950.0	50.0
50	50	3324878.4	50.9	210793.0	50.2
75	75	5102205.4	77.4	255608.0	64.1
75	75	5083990.4	77.1	251532.0	62.9
75	75	4953243.4	75.1	255979.0	64.2
75	75	5105545.4	77.4	251706.0	62.9
75	75	4968173.4	75.4	252464.0	63.1
75	75	5003233.4	75.9	252276.0	63.1

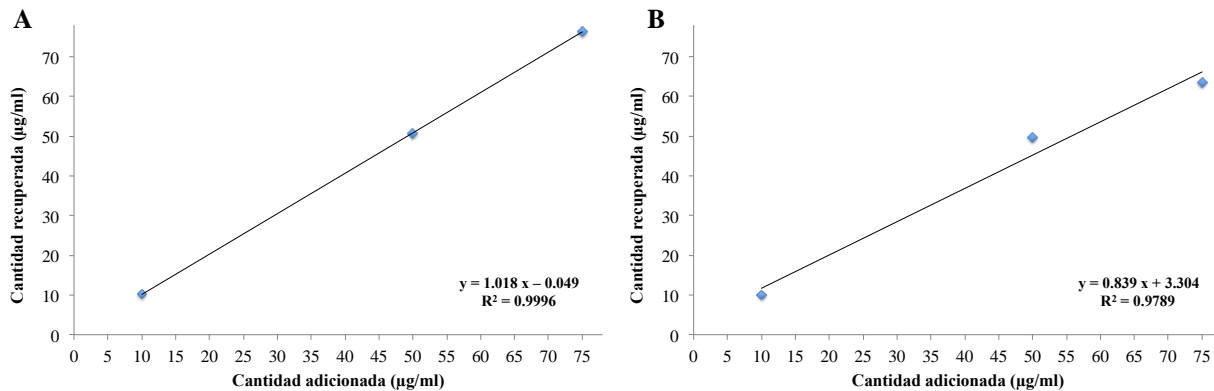


Figura 36. Linealidad del método para la cuantificación de pedalitina (6). (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.

Tabla 12. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método.

	Amarisólida (1)		Pedaltina (6)	
	UV	ESI-Negativo	UV	ESI-Negativo
b₀	1.016 ± 0.007	0.846 ± 0.045	1.018 ± 0.005	0.839 ± 0.031
b₁	-0.109 ± 0.387	1.692 ± 2.350	-0.049 ± 0.275	3.304 ± 1.611
R	0.9996	0.9782	0.9998	0.9894
R²	0.9992	0.9569	0.9996	0.9789

5.1.4.2.2.2 Exactitud del método

La exactitud del método se refiere a la concordancia entre el valor de la concentración de estándar recuperada y el valor de referencia (concentración adicionada); así este parámetro de desempeño se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro. Los resultados se muestran en las Tablas 13-14.

Tabla 13. Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de amarisólida (1).

Conc adicionada (µg/ml)	Recobro (%)	UV			ESI-Negativo			
		\bar{X}	DE	CV (%)	Recobro (%)	\bar{X}	DE	CV (%)
10	102.7				80.7			
10	100.0				63.6			
10	101.6				110.1			
10	102.7				99.2			
10	101.3				75.4			
10	103.1	101.9	1.17	0.011	90.3	86.6	16.83	0.194
50	100.8				84.9			
50	100.1				84.4			
50	99.9				99.3			
50	101.1				110.5			
50	98.9				110.9			
50	103.1	100.7	1.40	0.014	84.5	95.7	12.88	0.133
75	102.3				87.0			
75	102.7				78.8			
75	103.4				82.3			
75	100.2				90.9			
75	102.7				80.9			
75	99.2	101.7	1.64	0.016	82.1	83.7	4.45	0.053

Tabla 14. Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de pedalitina (6).

Conc adicionada (µg/ml)	UV				ESI-Negativo			
	Recobro (%)	\bar{X}	DE	CV (%)	Recobro (%)	\bar{X}	DE	CV (%)
10	100.5				97.7			
10	102.5				100.7			
10	103.0				101.3			
10	101.2				99.6			
10	102.9				98.6			
10	100.4	101.7	1.18	0.012	98.0	99.3	1.49	0.015
50	101.4				100.5			
50	102.0				97.0			
50	101.1				99.6			
50	101.0				100.1			
50	101.8				100.0			
50	101.7	101.5	0.39	0.004	100.5	99.6	1.33	0.013
75	103.2				85.5			
75	102.8				83.8			
75	100.2				85.6			
75	103.2				83.9			
75	100.5				84.2			
75	101.2	101.8	1.38	0.014	84.1	84.5	0.82	0.010

Los resultados muestran que el recobro de ambos estándares usando los datos de UV se encuentran dentro del rango 98-102 %, con valores de CV por debajo del 2%; sin embargo, los porcentajes de recobro para las determinaciones realizadas por ESI-Negativo no entran dentro de los límites establecidos.

5.1.4.2.3 Precisión.

La precisión de un sistema o método se refiere a la concordancia entre resultados analíticos individuales aplicando el procedimiento repetidamente a una muestra del estándar de referencia. Para realizar la evaluación de la precisión de un sistema se debe considerar la dispersión de los datos individuales con relación a la media, esto expresado como la DE y el CV. En el presente trabajo se evaluó la precisión del sistema en términos de repetitividad con el análisis de seis replicas de cada estándar a una concentración definida (50 µg/ml). Para este análisis se determinó

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la respuesta analítica bajo las mismas condiciones experimentales, mismo analista y durante un intervalo corto de tiempo. Los resultados y el análisis estadístico de los mismos se muestran en la Tabla 15-16.

Tabla 15. Repetibilidad del método para la cuantificación de amarisólida (1).

Replica	Concentración adicionada (µg/ml)	UV		ESI-Negativo	
		Concentración recuperada (µg/ml)	ABC	Concentración recuperada (µg/ml)	ABC
1	50	49.7	275538	53.5	344970
2	50	49.5	274671	49.1	321831
3	50	50.6	280595	65.3	407116
4	50	50.5	280254	64.1	400568
5	50	50.4	279834	49.9	326220
6	50	50.5	280029	64.7	403771
		\bar{X}	278486.83	\bar{X}	367412.67
		DE	2646.38	DE	40683.55
		CV (%)	0.01	CV (%)	0.11

Tabla 16. Repetibilidad del método para la cuantificación de pedalitina (6).

Replica	Concentración adicionada (µg/ml)	UV		ESI-Negativo	
		Concentración recuperada (µg/ml)	ABC	Concentración recuperada (µg/ml)	ABC
1	50	48.4	3157587	44.5	192213
2	50	49.9	3260195	52.2	217285
3	50	49.7	3243890	48.2	204208
4	50	48.8	3187358	48.4	204772
5	50	49.0	3196298	47.0	200412
6	50	49.3	3221083	48.1	203959
		\bar{X}	3211068.50	\bar{X}	203808.17
		DE	38030.46	DE	8108.25
		CV (%)	0.01	CV (%)	0.04

Los resultados anteriores demuestran que el método es preciso pues en todas las determinaciones realizadas el CV calculado es menor al 2%.

5.1.4.2.4 Limite de detención y límite de cuantificación.

El límite de detección (LD) de un método analítico se refiere a la concentración mínima de analito presente en una muestra que puede ser detectada, y no necesariamente cuantificada. Mientras que el límite de cuantificación (LC) expresa la cantidad mínima de analito presente en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud. Para establecer ambos límites se realizaron curvas de calibración de cada estándar en un intervalo de concentraciones de 0.01 a 10 µg/ml; en las Tablas 17-18 se muestran los resultados obtenidos el análisis de regresión lineal.

Tabla 17. Resultados para LD y LC de la amarisólida (1).

Solución	C µg/ml	ABC datos de UV	ABC datos de ESI-Negativo
1	0.01	2	1413
2	0.01	3	1018
3	0.01	8	1151
4	0.1	2	2007
5	0.1	11	2458
6	0.1	14	1077
7	1	3639	10938
8	1	3541	11977
9	1	3508	9586
10	5	21185	52974
11	5	23130	57156
12	5	26443	58226
13	10	52045	115642
14	10	53062	120766
15	10	56757	117545
	b₀	- 1153.57 ± 671.26	- 151.04 ± 714.79
	b₁	5393.42 ± 133.71	11696.66 ± 142.38
	R	0.9960	0.9990
	R²	0.9921	0.9981
	S_{y/x}	1993.68	2122.95
	LD (µg/ml)	1.22	0.60
	LC (µg/ml)	3.70	1.82

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

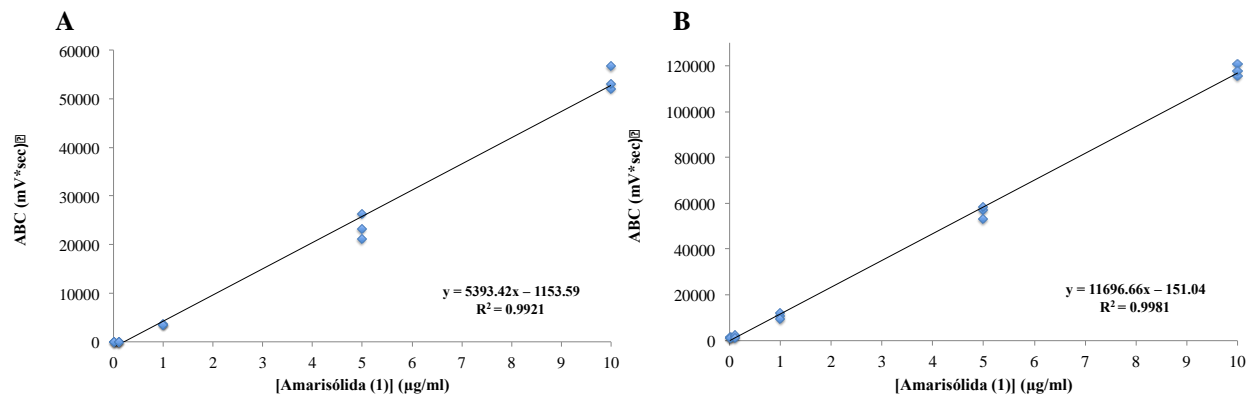


Figura 37. Curvas de calibración para la determinación de LD y LC de amarisolida (1). (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.

Tabla 18. Resultados para LD y LC de la pedalitina (6).

Solución	C µg/ml	ABC datos de UV	ABC datos de ESI-Negativo
1	0.01	609	0
2	0.01	787	0
3	0.01	695	0
4	0.1	1659	0
5	0.1	2424	0
6	0.1	1367	0
7	1	2513	1253
8	1	3327	1249
9	1	3520	1193
10	5	23652	14202
11	5	29244	11011
12	5	34382	12308
13	10	195949	34950
14	10	183909	40698
15	10	193025	41393
	b₀	- 1558.36 ± 1607.89	1109.40 ± 765.35
	b₁	38206.38 ± 704.97	7724.65 ± 335.56
	R	0.9977	0.9880
	R²	0.9956	0.9761
	S_{y/x}	5257.74	2502.67
	LD (µg/ml)	0.45	1.07
	LC (µg/ml)	1.38	3.24

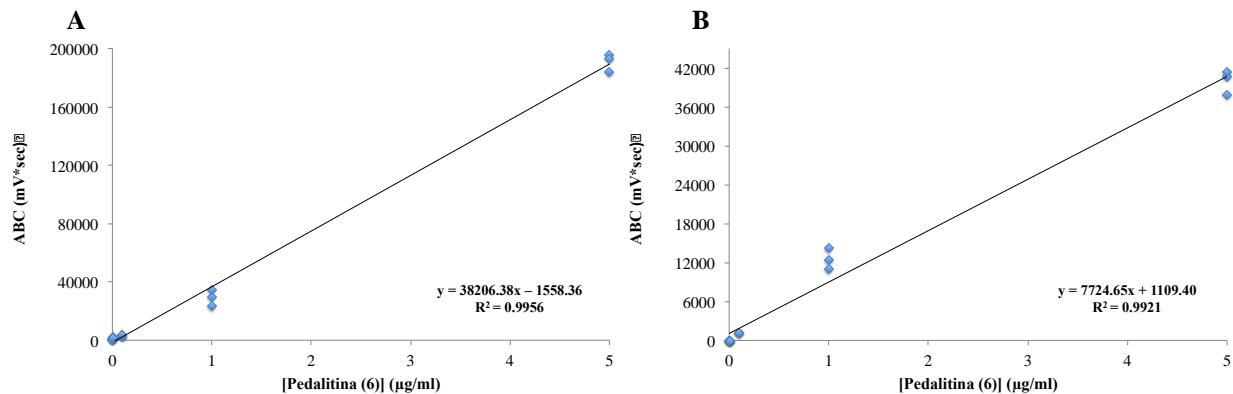


Figura 38. Curvas de calibración para la determinación de LD y LC de pedalitina (6). (A) Arreglo de diodos; (B) Corriente iónica total.

5.1.4.2.5 Cuantificación de amarisólida (1) y pedalitina (6) en diferentes extractos de *S. circinata*.

Al finalizar la validación del método analítico, se cuantificó el contenido de amarisólida (1) y pedalitina (6) en los extractos acuosos íntegros y en las fracciones de AcOEt obtenidas de la infusión de dos lotes diferentes (Julio y Noviembre). Todas las muestras se analizaron a una concentración de 500 µg/ml disueltas en CH₃OH-H₂O 1:1. Para calcular las concentraciones de 1 y 6 se utilizaron la ecuaciones de la rectas descritas para la linealidad del sistema (apartado 5.1.4.2.1 ver Tabla 9). Los resultados obtenidos se muestran como la concentración y el porcentaje de los estándares cuantificados en los extractos (Tablas 19-20). Como puede observarse la cantidad de amarisólida (1) varía según la fecha de colecta siendo más abundante en la época de noviembre, mientras que la cantidad de pedalitina (6) se conserva sin variación en ambos lotes.

En resumen, se validó un método analítico por CLUE para cuantificar amarisólida (1) y pedalitina (6) en el preparado tradicional de *S. circinata*; el método fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones evaluadas cuando se utilizó un detector de tipo PDA. El desarrollo del método utilizando IES⁻-EM requiere un mayor refinamiento en cuanto a linealidad

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

y exactitud del método, lo cual se podría lograr ajustando la concentración de la matriz adicionada. Por esta razón únicamente se cuantificó con los datos obtenidos por UV.

Tabla 19. Cuantificación de amarisolida (1) en extractos de *S. circinata*.

DATOS DE UV		Lote Julio			Lote Noviembre		
Muestra	Replica	ABC	Cantidad recuperada (µg/ml)	Porcentaje de 1	ABC	Cantidad recuperada (µg/ml)	Porcentaje de 1
Fracción de AcOEt	1	607387	108.5	21.7	1503322	267.5	53.5
	2	628993	112.4	22.5	1528336	271.9	54.4
	3	652895	116.6	23.3	1563567	278.2	55.6
		\bar{X}	112.5		\bar{X}	272.5	
		DE	4.04		DE	5.37	
		CV (%)	0.04		CV (%)	0.02	
Extracto acuoso	1	94432	17.5	3.5	154815	28.2	5.6
	2	94530	17.5	3.5	153992	28.1	5.6
	3	95817	17.8	3.6	154784	28.2	5.6
		\bar{X}	17.6		\bar{X}	28.2	
		DE	0.14		DE	0.08	
		CV (%)	0.01		CV (%)	0.003	

Tabla 20. Cuantificación de pedalitina (6) en extractos de *S. circinata*.

DATOS UV		Lote Julio			Lote Noviembre		
Muestra	Replica	ABC	Cantidad recuperada (µg/ml)	Porcentaje de 6	ABC	Cantidad recuperada (µg/ml)	Porcentaje de 6
Fracción de AcOEt	1	277156	5.4	1.1	264812	5.3	1.1
	2	306812	5.9	1.2	277345	5.4	1.1
	3	326853	6.2	1.2	307294	5.9	1.2
		\bar{X}	5.8		\bar{X}	5.5	
		DE	0.37		DE	0.33	
		CV (%)	0.06		CV (%)	0.06	
Extracto acuoso	1	13310	1.5	0.3	154815	1.4	0.3
	2	12088	1.5	0.3	153992	1.4	0.3
	3	12855	1.5	0.3	154784	1.4	0.3
		\bar{X}	1.5		\bar{X}	1.4	
		DE	0.01		DE	0.01	
		CV (%)	0.01		CV (%)	0.01	

5.2 Estudio fitoquímico y farmacológico de la especie *V. corymbosa*.**5.2.1 Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios.**

Con la finalidad de caracterizar los principios activos presentes en la especie, se realizó el estudio fitoquímico de un extracto acuoso obtenido por infusión de las partes aéreas de *V. corymbosa*. La selección de este extracto se realizó con base en su efecto inhibitorio de la actividad de la α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* ($CI_{50} = 28.5 \mu\text{g/ml}$). El extracto se sometió a varios procesos de fraccionamiento usando cromatografía, así se logró el aislamiento de la prunasina (**10**), un glucósido cianogénico, los flavonoides (-)-*epi*-catequina (**12**), hiperósido (**20**), isoquercetina (**21**), quercitrina (**22**) y quercetin-3-*O*-(6''-benzoil)- β -D-galactósido (**23**), y los compuestos aromáticos piceína (**11**) y metilarbutina (**24**) (Figura 39). La caracterización química de estos productos se realizó con base en el análisis de sus espectros de resonancia magnética y por comparación con los datos previamente reportados en la literatura. Es importante mencionar que estos productos se describen por primera vez para la especie en el presente trabajo (Davis et al., 1996; Hasan et al., 2006; Isaza et al., 2001; Lutterbach y Stockigt, 1995; Napolitano et al., 2012; Schroeder et al., 1996; Vvedenskaya et al., 2004; Wei et al., 2007). En el Anexo 3 se incluyen los espectros de RMN utilizados para la caracterización de estos productos (Figuras A29-40).

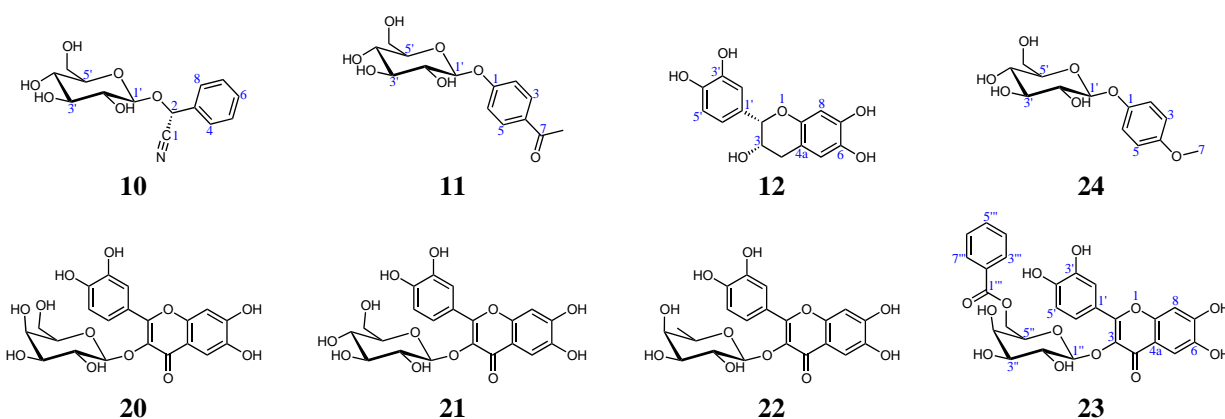


Figura 39. Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas de *V. corymbosa*.

5.2.2 Evaluación del efecto inhibitorio sobre la actividad de las α -glucosidasas.

Todos los compuestos aislados de la infusión de *V. corymbosa* se sometieron a una evaluación *in vitro* con la finalidad de determinar su efecto sobre la actividad enzimática de las α -glucosidasas de levadura y de un lisado intestinal de rata. Los metabolitos **12**, **20** y **21** son compuestos inhibidores bien caracterizados de la enzima α -glucosidasa de levadura, y junto con la acarbosa, se consideraron como controles positivos durante la evaluación (Isaza et al., 2001; Nicollier et al., 1983). Los resultados de estas determinaciones indicaron que los productos **10**, **12** y **20-23** inhiben la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura de manera dependiente de la concentración; por otro lado, todos los productos aislados de *V. corymbosa* (**10-12** y **20-24**) inhiben la actividad enzimática de las α -glucosidasas de mamífero (lisado intestinal de rata), los valores de las CI_{50} y de los % de inhibición se muestran en la Tabla 21. El metabolito más activo fue el compuesto **23** y su actividad resultó mejor que la del control positivo (acarbosa). Comparando la actividad de **23** con la del compuesto **20** se puede sugerir que la benzoilación del grupo hidroxilo en C-6" incrementa notablemente la actividad inhibitoria sobre estas enzimas.

Tabla 21. Efecto inhibitorio de los compuestos aislados de *V. corymbosa* sobre la actividad enzimática de α -glucosidasas de levadura y de rata.

Muestras	α -glucosidasa de levadura		α -glucosidasas de rata	
	CI_{50} (mM) ^a	% de Inhibición ^d	CI_{50} (mM) ^a	% de Inhibición ^d
Acarbosa ^b	0.50 \pm 0.23	89.7	0.10 \pm 0.003	80.2
10	1.60 \pm 0.07	95.2	ND ^c	44.5
11	Inactivo	-	10.68 \pm 0.96	52.6
12 ^b	0.30 \pm 0.02	99.6	ND ^c	15.2
20 ^b	0.40 \pm 0.02	67.8	1.98 \pm 0.15	65.1
21 ^b	0.06 \pm 0.005	99.0	1.63 \pm 0.11	71.0
22	ND ^c	45.0	3.34 \pm 0.38	59.7
23	0.03 \pm 0.006	95.6	0.43 \pm 0.03	75.8
24	Inactivo	-	ND ^c	39.3

^aResultado del promedio \pm la desviación estándar (n = 3); ^bControles positivos; ^cNo determinado; ^d% de inhibición a una concentración máxima de 10.0 mM de inhibidor.

Por otro lado, los resultados sugieren que la naturaleza del azúcar en los glucósidos **20-22** tiene un impacto directo sobre la inhibición enzimática de las α -glucosidasas. Así el compuesto **21** que posee un residuo de β -D-glucosa resultó más activo que el compuesto **20** en donde el carbohidrato es una β -D-galactosa, mientras que el producto **22** que contiene una α -D-ramnosa fue el menos activo de los flavonoides glucosilados que se evaluaron en el presente trabajo.

De manera adicional, la presencia de los compuestos **20-22** podría tener un efecto positivo en la actividad antihiper glucémica *in vivo*, pues tras ingerir la infusión estos se hidrolizan a quercetina que posee un efecto inhibitorio notable sobre las α -glucosidasas ($CI_{50} = 0.03$ mM para la enzima de levadura y $CI_{50} = 0.216$ mM para la enzimas intestinales de rata; Khayat, 2006; Kim et al., 2011).

Aunque el efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de las α -glucosidasas de flavonoides es bien conocida, el efecto del glucósido **10** se describe por vez primera. Este punto resulta de interés ya que las infusiones y/o decocciones de *Eriobotrya japonica* y *Prunus amygdalus*, que se utilizan en países orientales para el tratamiento de la diabetes, tienen un alto contenido de glucósidos cianogénicos; estos preparados son antihiper glucémicos *in vivo* pero carecen de efecto hipoglucemiante (Khayat, 2006; Nicollier et al., 1983; Zhou et al., 2008). Por lo tanto, se podría inferir que los glucósidos cianogénicos presentes en estas especies pueden provocar un efecto antihiper glucémico por un mecanismo de acción mediado por la inhibición de las α -glucosidasas.

5.2.2.1 Cinética enzimática y estudios de acoplamiento molecular.

Con la finalidad de caracterizar el tipo de interacción entre la enzima α -glucosidasa de levadura y **23**, se realizó el ensayo de cinética enzimática generando curvas de saturación por sustrato a diferentes concentraciones de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido y del inhibidor **23**. El gráfico de Lineweaver-Burk del compuesto **23** (Figura 40) consiste en rectas con diferentes pendientes que se interceptan en el cuadrante (x, -y); este tipo de comportamiento se debe a la

presencia de un inhibidor reversible de tipo mixto, lo que correlaciona con lo descrito en la literatura ya que la mayoría de los productos naturales de tipo flavonoide se comportan de esta manera (Priscilla et al., 2014; Xu, 2010). El valor calculado de k_i del compuesto **23** es de 0.05 ± 0.02 mM ($R^2 = 0.9925$) mientras que el valor para el control positivo de acarbosa es de 156.1 mM (Rivera-Chávez et al., 2013). El valor menor de la k_i del producto **23** refleja una mayor afinidad por la enzima lo que explica su buena actividad y mayor efecto como inhibidor en comparación con la acarbosa.

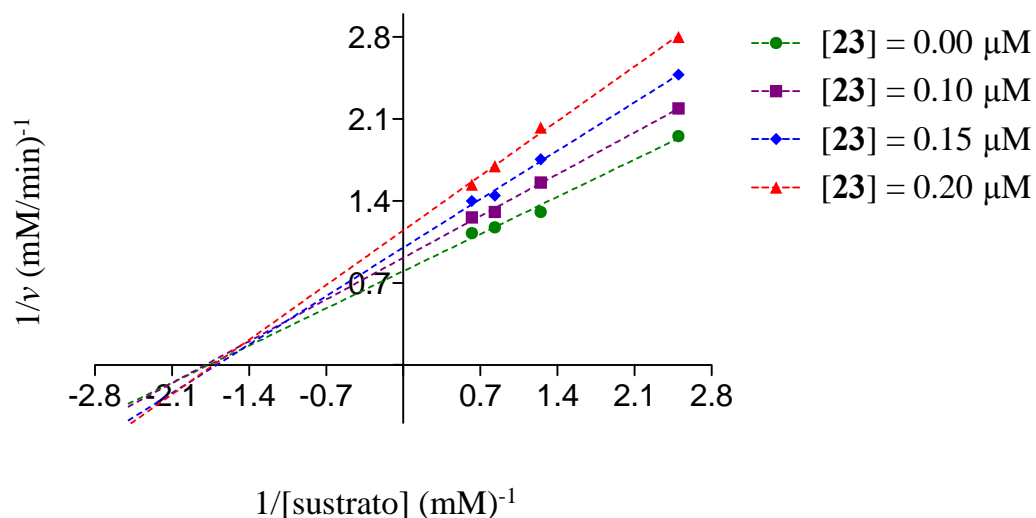


Figura 40. Gráfico de Lineweaver-Burk para el compuesto **23** sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa de levadura.

Con el objetivo de predecir el posible sitio y modo de unión de los compuestos **20** y **23** con las enzimas α -glucosidasas de levadura y de mamífero, se realizaron estudios de acoplamiento molecular con las siguientes enzimas: isomaltasa de levadura (3A4A), sacarasa-isomaltasa humana N-terminal (3LPP), maltasa-glucoamilasa humana N-terminal (2QMJ) y maltasa-glucoamilasa humana C-terminal (3TOP). Las enzimas humanas se seleccionaron para los cálculos de acoplamiento molecular pues con los resultados obtenidos de este estudio y con los resultados obtenidos *in vitro* con las enzimas de rata, se puede tener una idea más clara del efecto potencial del producto **23** como agente antihiperglucémico en mamíferos. Cabe mencionar que

en este caso no se utilizó la enzima de *R. obeum* porque a la fecha del estudio aún no se lograba la expresión de la enzima en la bacteria *Escherichia coli*.

Los resultados del acoplamiento molecular del producto **23** con la enzima de levadura revelan un posible sitio de unión cercano al sitio catalítico de la enzima; el análisis predice la formación de dos puentes de hidrógeno entre los aminoácidos Pro312 y Pro320 y los grupos hidroxilo de C-2' y C-7, respectivamente; también parecen intervenir interacciones electrostáticas de Van der Waals con los aminoácidos His280, Ser311, Thr310, Val308, Ser304, Asp325, Ile328 y Asp307 (Figura 41D). Por otro lado, los cálculos de acoplamiento molecular de **20** se realizaron con fines comparativos, los resultados muestran que **20** se une al sitio catalítico de la enzima formando puentes de hidrógeno entre los aminoácidos Asp307, Leu313 y Asp242 y los grupos hidroxilo de C-4', C-2" y C-7, respectivamente; algunas interacciones de Van der Waals se observan con los aminoácidos Phe314, Asn415, Lys156, Ser240, Tyr158, Ser241 and Arg315 (Figura 41C). Entonces, la interacción con la enzima de levadura simulada para los productos **20** y **23** es similar a la descrita para otros flavonoides; ésta involucra la interacción del anillo B del núcleo flavonoide que entra al sitio catalítico de la enzima, mientras que los anillos A y C interaccionan con regiones exteriores al sitio catalítico (Tadera et al., 2006).

Los resultados del estudio de acoplamiento con la enzima 3TOP muestran que el compuesto **23** puede unirse al mismo sitio al que se une la acarbosa; para la unión se forman puentes de hidrógeno con los aminoácidos Trp1369, Arg1510 y Asp1157 y los grupos hidroxilo de C-3', C-3" y C-2", respectivamente; además se aprecian interacciones de Van der Waals con los aminoácidos Asp1526, Phe1560, Phe1559, Met1421, Trp1355, Asp1420, Try1251, Thr1586, Ile1315, Ile1280 y Asp1279. Con respecto a los resultados del acoplamiento con la enzima 2QMJ, se observa que **23** se puede unir en un sitio lejano al de unión de la acarbosa y forma puentes de hidrógeno a través de los grupos hidroxilos de C-5, C-7, C-4' y C-4" con los aminoácidos Lys534, Arg520, Thr778 y Ala780, respectivamente; y además parecen existir interacciones de tipo Van der Waals con los aminoácidos Lys513, Phe535, Asn518, Lys776, Asp777, Leu286, Ala285, Val779 y His645. Finalmente, el acoplamiento entre la enzima 3LPP y **23** es cercano al sitio catalítico y se aprecian puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo en

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

C-5, C-2", C3" y el oxígeno del anillo pirano con los aminoácidos Ile808, Arg563, Leu311 y Lys805, respectivamente, mientras que algunas fuerzas de Van der Waals se establecen con los aminoácidos Glu538, His569, Lys805, Met314, Arg549, His674, Gln809, Val675, Asp806 y Asp563. Con estos resultados se podría inferir que el producto **23** se comportaría como un inhibidor competitivo de la enzima 3TOP (maltasa-glucoamilasa) pues, según los resultados del acoplamiento, se une en el sitio activo de la enzima, mientras que en la inhibición de las enzimas 2QMJ (maltasa-glucoamilasa) y 3LPP (sacarasa-isomaltasa) sería no competitiva pues los sitios de unión hipotéticos son distintos del sitio catalítico. Sin embargo, es necesario realizar ensayos de cinética enzimática con las enzimas puras para comprobar estas propuestas.

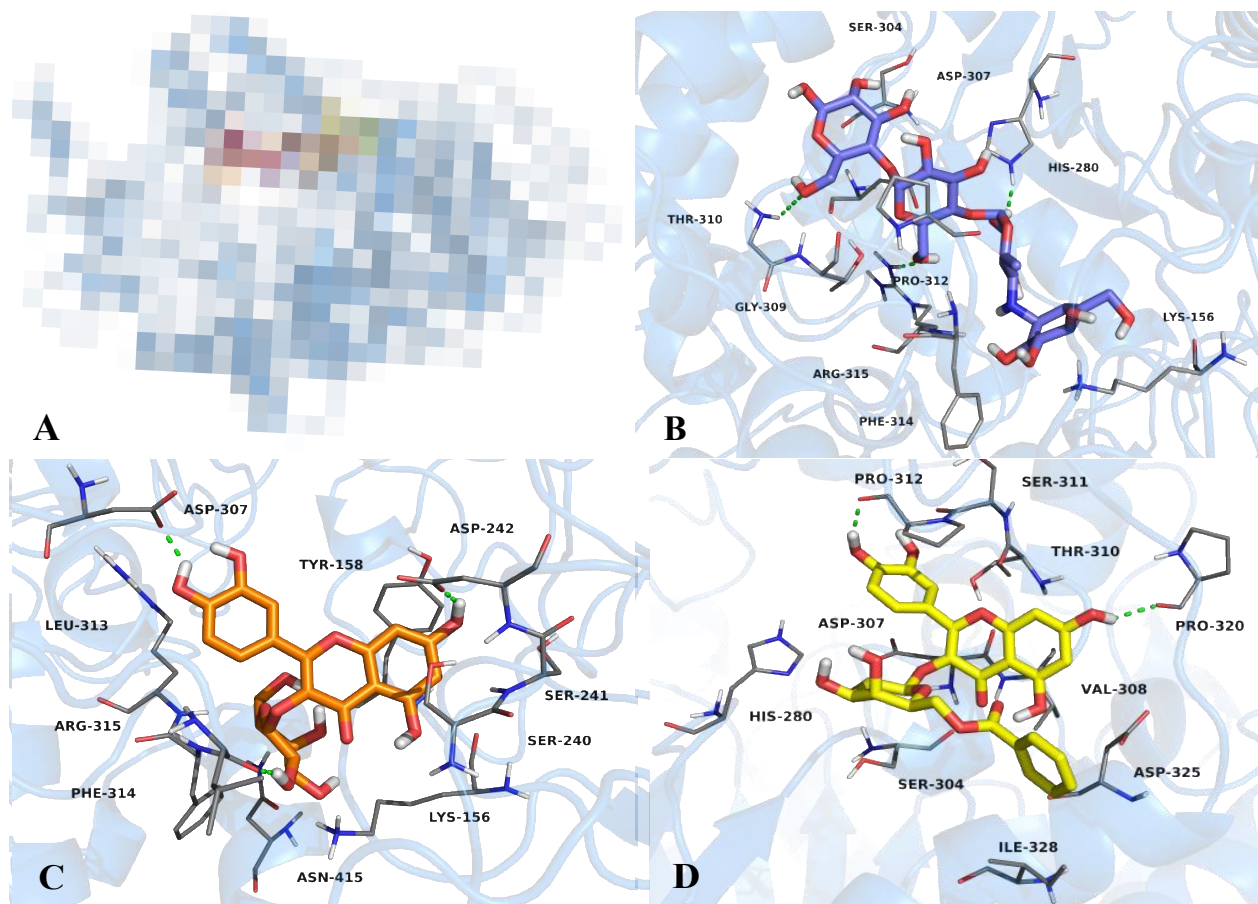


Figura 41. (A) Modelo estructural de los complejos formados entre la α -glucosidasa de levadura y acarbosa (morado), **20** (anaranjado) y **23** (amarillo); Representación 3D del sitio de unión entre la enzima de levadura con los ligandos: (B) acarbosa, (C) **20** y (D) **23**.

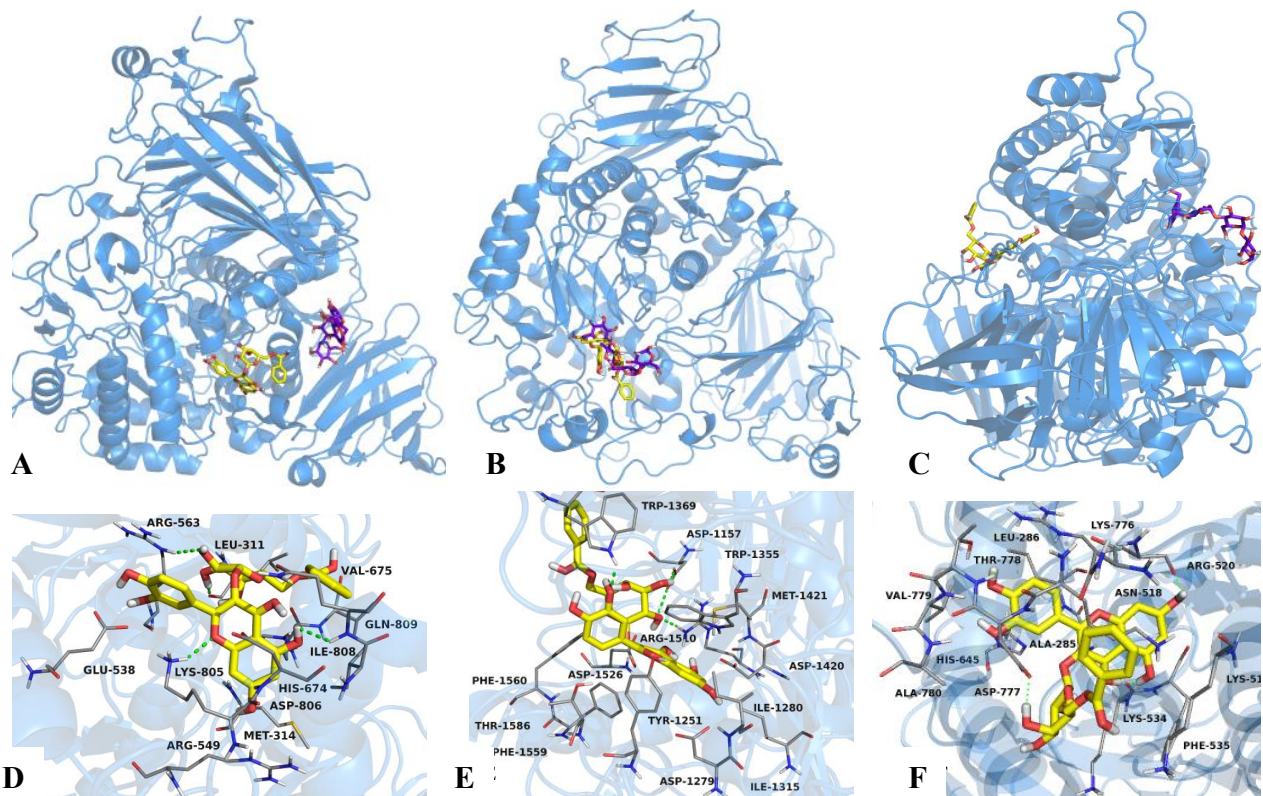


Figura 42. Modelos estructurales de los complejos formados por la acarbosa (morado) y **23** (amarillo) con las enzimas humanas: (A) 3LPP, (B) 3TOP y (C) 2QMJ. Representación 3D de los sitios de unión entre **23** (amarillo) con las enzimas humanas: (D) 3LPP, (E) 3TOP y (F) 2QMJ.

El análisis del acoplamiento molecular entre las α -glucosidasas humanas y de levadura revela que **23** puede unirse a estas enzimas con diferentes afinidades. Así, los valores calculados de las constantes de unión (k_i) son de 70.6 nM con la maltasa-glucoamilasa N-terminal; 133.1 μ M con la maltasa-glucoamilasa C-terminal; 2.3 mM sacarasa-isomaltasa N-terminal y, por último, un valor de k_i de 42.6 mM con la isomaltasa de levadura.

5.2.3 Determinación de la toxicidad aguda.

La presencia del glucósido cianogénico prunasina (**10**) en *V. corymbosa* y el hecho de que esta especie se consume en la medicina popular de nuestro país nos condujo a realizar la determinación de la toxicidad aguda de los preparados de la planta. Los resultados de este

estudio (Tabla 22) mostraron que la administración del extracto acuoso no provocó la muerte de los animales de experimentación; tampoco, se observó daño en órganos internos, ni cambios en el comportamiento animal; por lo tanto, la DL_{50} es mayor a 5 g/kg. Sin embargo, el extracto orgánico obtenido a partir de las partes aéreas de la planta (Tabla 22) resultó tóxico provocando signos característicos de cianosis y muerte en algunos animales de experimentación, la DL_{50} calculada para este extracto es de 2.6 g/kg.

Tabla 22. Toxicidad aguda de los extractos acuoso y orgánico de *V. corymbosa*.

Extracto acuoso				Extracto orgánico			
Primera fase		Segunda fase		Primera fase		Segunda fase	
Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad
10	0/3	1600	0/3	10	0/3	1600	0/3
100	0/3	2900	0/3	100	0/3	2900	3/3
1000	0/3	5000	0/3	1000	0/3	5000	3/3

Los glucósidos cianogénicos sufren un proceso de hidrólisis al entrar en contacto con las enzimas que se encuentran en el material vegetal, de esta reacción se genera en primer término un compuesto de tipo cianohidrina, que posteriormente se transforma en un aldehído y una molécula de cianuro de hidrógeno (HCN) (Figura 43); este proceso constituye un mecanismo de defensa de algunas especies vegetales ya que el HCN que se libera es altamente tóxico para los organismos que las consumen (Johansen et al., 2007; Zagrobelny et al., 2008).

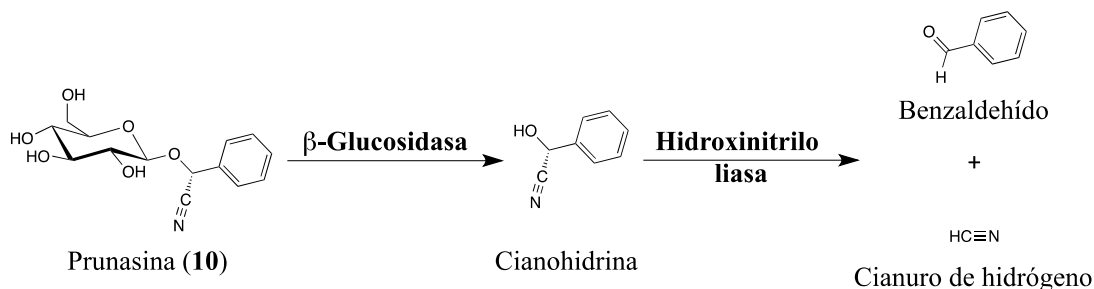


Figura 43. Reacción de hidrólisis de glucósidos cianogénicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este proceso puede acelerarse por diversos factores entre ellos un aumento de la temperatura. Por todo lo anterior, es coherente que el extracto acuoso no haya resultado tóxico pues se puede inferir que contiene una menor cantidad de **10** en comparación con el extracto orgánico, pues durante el proceso de preparación de la infusión es factible que el agua, a temperatura de ebullición, hidrolice el producto **10** en mayor grado. Este proceso es más lento durante la preparación del extracto orgánico que se lleva a cabo a temperatura ambiente.

Con la finalidad de demostrar que la cantidad de **10** presente en el extracto acuoso es baja, se estableció el perfil cromatográfico de este preparado utilizando la técnica de CLAE en fase reversa. Como se observa en la Figura 44, el compuesto **10** es uno de los metabolitos minoritarios del extracto; sin embargo, convendría alertar a los consumidores sobre el riesgo que conlleva el uso de esta planta medicinal. El establecimiento de este perfil permitió identificar la presencia de todos los metabolitos aislados del extracto, siendo entonces un perfil representativo de su composición y de utilidad para el desarrollo de pruebas de control de calidad de *V. corymbosa*.

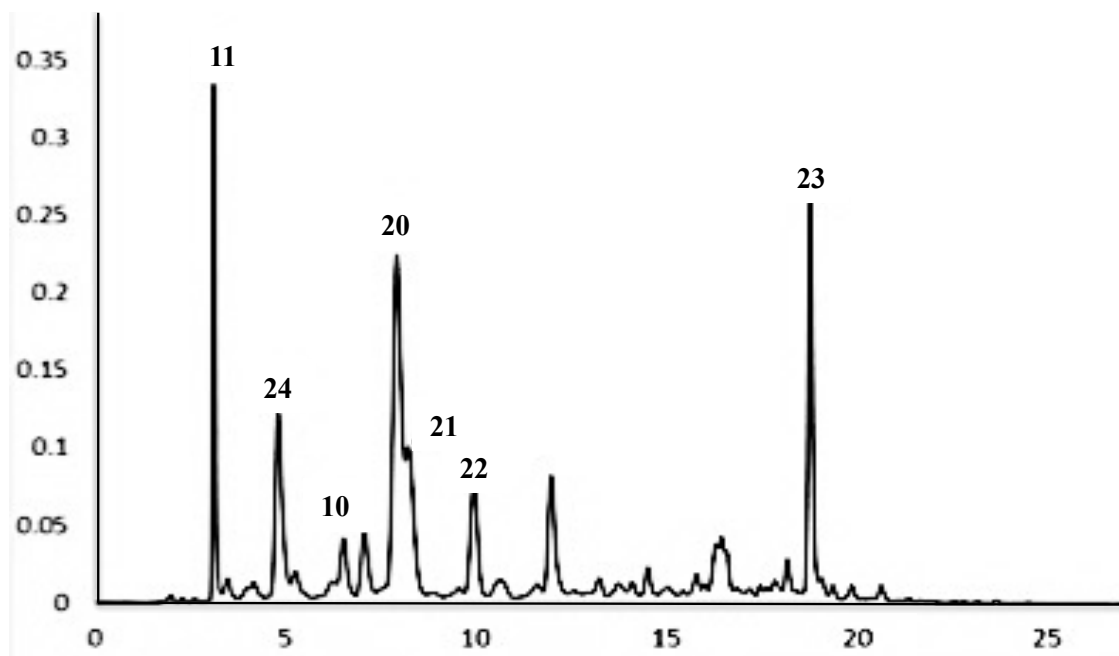


Figura 44. Perfil cromatográfico representativo de la composición química del extracto acuoso de *V. corymbosa*

6 CONCLUSIONES

I. La especie *S. circinata* posee actividad *in vivo* como agente antihiper glucémico en una curva de tolerancia a la sacarosa en ratón; el efecto *in vivo* se debe a un efecto inhibitorio de las enzimas α -glucosidasas. Esta información sustenta el uso de esta especie en la medicina popular para el tratamiento de la diabetes.

II. *S. circinata* biosintetiza diterpenoides de tipo clerodano y flavonoides que poseen actividad *in vitro* contra las α -glucosidasas. Además, los metabolitos mayoritarios (**1** y **6**) demostraron un buen efecto antihiper glucémico *in vivo*.

III. El efecto *in vivo* e *in vitro* de la amarisólida (**1**) concuerda con la información que sugiere que la presencia de diterpenoides en el género *Salvia* contribuye con su efecto antihiper glucémico, por lo tanto, éste no se debe únicamente a la presencia de compuestos polifenólicos en sus extractos. Se demostró por primera vez que los clerodanos glucosidados poseen efectos antihiper glucémicos *in vivo*.

IV. En el presente trabajo se describe, por primera vez, la presencia de productos de tipo biflavonoide en el género *Salvia*.

V. Los estudios de acoplamiento y dinámica molecular permiten predecir que los productos **1** y **6** pueden unirse al sitio catalítico de la enzima de *R. obeum* formando complejos estables mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

VI. Con los estudios *in vitro* utilizando la enzima de *R. obeum*, se logró demostrar que su empleo constituye una herramienta experimental promisorio para la búsqueda de productos inhibidores de las α -glucosidasas.

CONCLUSIONES

VII. Se establecieron pruebas para el control de calidad farmacopeico de la especie *S. circinata*. El método para establecer las pruebas de composición resultó lineal, preciso y exacto.

VIII. El estudio químico y farmacológico de *V. corymbosa* permitió establecer que los principios inhibidores de las α -glucosidasas son de tipo flavonoide glucosilado.

IX. Se determinó que el producto más activo (**23**) aislado de *V. corymbosa* se comporta como inhibidor mixto de la enzima α -glucosadas de levadura.

X. Se demostró la inocuidad del preparado de *V. corymbosa* que se emplea en la medicina popular. Sin embargo, debe advertirse a los consumidores acerca del riesgo por intoxicación ya que el contenido de glucósidos cianogénicos es alto.

XI. Esta información, en conjunto con los parámetros de eficacia y seguridad generados durante el estudio, contribuirá al uso medicinal racional de ambas especies para el tratamiento de la diabetes en las prácticas médicas populares de México.

REFERENCIAS

- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jáquez, P., López, M. E. (1994) *Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*. Instituto Mexicano del Seguro Social, México D. F., México, 107-110.
- Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J., Cárdenas-Vázquez, R. (2008) Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 27-32.
- Bahadori, M. B., Dinparast, L., Zengin, G., Sarikurkcu, C., Bahadori, S., Asghari, B., Movahhedini, N. (2016) Functional components, antidiabetic, anti-Alzheimer's disease, and antioxidant activities of *Salvia syriaca* L. *International Journal of Food Properties*, DOI: 10.1080/10942912.2016.1218893.
- Bahadori, M. B., Valizadeh, H., Asghari, B., Dinparast, L., Bahadori, S., Farimani, M. M. (2016) Biological Activities of *Salvia santolinifolia* Boiss. A Multifunctional Medicinal Plant. *Current Bioactive Compounds*, 12 (4), 297-305.
- Bhardwaj, D. K., Gupta, A. K., Jain, A., Shrawat, V. K. (1988) Synthesis of premtorin and its isomers. *Indian Journal of Chemistry*, 27B, 261-263.
- Bautista, E., Toscano, R. A., Ortega, A. (2014) 5,10-*seco-neo*-Clerodanes and *neo*-Clerodanes from *Salvia microphylla*. *Journal of Natural Products*, 77, 1088-1092.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Toscano, A. R., García-Peña, M. R., Ortega, A. (2015) Teotihuacanin, a Diterpene with an Unusual Spiro-10/6 System from *Salvia amarissima* with Potent Modulatory Activity of Multidrug Resistance in Cancer Cells. *Organic Letters*, 13, 3280-3282.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Ortiz-Pastrana, N., Toscano, A. R., Ortega, A. (2016) Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A-C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia*, 114, 1-6.
- Beltran-Orozco, M. C., Vargas-Martinez, M. G. (2011) Pharmacological activity of the chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Edible Plants in Traditional Medicine*, 151-178.
- Bilous, R., Donnelly, R. (2010) *Handbook of diabetes*. 4th ed. Singapur.
- Bisio, A., De Mieri, M., Milella, L., Schito, A. M., Parricchi, A., Russo, D., Alfei, S., Lapillo, M., Tuccinardi, T., Hamburger, M. (2017) Antibacterial and hypoglycemic diterpenoids from *Salvia chamaedryoides*. *Journal of Natural Products*, DOI:10.1021/acs.jnatprod.6b01053.
- Bonito, M. C., Cicala, C., Marcotullio, M. C. (2011) Biological activity of bicyclic and tricyclic diterpenoids from *Salvia* species of immediate pharmacological and pharmaceutical interest. *Natural Products Communication*, 6, 1205-1215.
- Cai, W., Li, J., Yip, S. (2012) *Molecular Dynamics*. In: *Comprehensive Nuclear Materials*. Vol. 1. Konings RJM, editor. Amsterdam: Elsevier; p. 249-265.

REFERENCIAS

- Calderón, R. G., Rzedowski, J. (2010) *Flora fanerogámica del Valle de México*. Ed. Instituto de Ecología. México.
- Campbell, E. J., Drucker, J. D. (2013) Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metabolism*, 17, 819-837.
- Carramiñana, B. F. C. (2014) Papel de los hipoglucemiantes orales clásicos en el tratamiento actual. *Semergen*, 40 (2), 9-15.
- Charan, K. C., Murthy, S. D. S. (2015) A review on management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 6 (1), 114-120.
- Clebsch, B. (2003) *The new book of Salvias*. Timber Press 2003, 269.
- Copeland, R.A. (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. 2nd edn. Wiley-VCH.
- Cornejo-Tenorio, G., Ibarra-Manríquez, G. (2011) Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 1279-1296.
- Dash, P. R., Badu, J. R., Srinivas, R. N. (2017) Reappraisal and perspectives of clinical drug-drug interaction potential of α -glucosidase inhibitors such as acarbose, voglibose and miglitol in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Xenobiotica*, 1-20. DOI: 10.1080/00498254.2016.1275063.
- Davis, A. L., Cai, Y., Davies, A. P. (1996) ^1H and ^{13}C NMR Assignments of some green tea polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 34, 887-890.
- De Lano, W., Scientific, L. D. (2002) De Lano: PyMOL versión 0.99. De Lano Scientific.
- Derosa, G., Maffioli, P. (2012) α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Archives of Medical Science*, 5 (8), 899-906.
- Du, K., De Mieri, M., Neugurger, M., Zietsman, C. P., Marston, A., van Vuuren, S. F., Ferreira, D., Hamburger, M., van der Westhuizen, J. J. (2015) Labdane and Clerodane Diterpenoids from *Colophospermum mopane*. *Journal of Natural Products*, 78, 2494-2504.
- Dziurzynski, T., Ludwiczuk, A., Glowniak, K. (2013) Biological activities of *Salvia* L. species. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 26, 326-330.
- ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2013. Gutiérrez J. P., Rivera J., Shamah T., Oropeza C., Hernández Ávila M., coordinadores. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública 2012.
- Eskandani, M., Bahadori, M. B., Zengin, G., Dinparast, L., Bahadori, S. (2016) Novel Natural Agents from Lamiaceae Family: An Evaluation on Toxicity and Enzyme Inhibitory Potential Linked to Diabetes Mellitus. *Current Bioactive Compounds*, 12 (1), 34-38.
- Estakhr, J., Javdan, N. (2011). Hypoglycemic properties of ethanolic extracts of *Salvia hypoleuca* in rats. *Pharmacologyonline*, 3, 354-360.

REFERENCIAS

- Fatma Abd-Elkader, M., Mohamed-Soubhi, M., Siham Mustafa, E.-S., Wafaa Mostafa, E. K. J. (2012) Polyphenolic profile and biological activity of *Salvia splendens* leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64, 1678-1687.
- Federación Internacional de Diabetes (2015) Atlas de Diabetes [en línea] disponible en <<http://www.diabetesatlas.org/>> [consulta: 30 marzo 2017].
- Firuzi, O., Miri, R., Asadollahi, M. (2013) Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities and phenolic contents of eleven *Salvia* species from Iran. *Iran Journal of Pharmacy Research*, 12, 801-810.
- Flores-Bocanegra, L. (2014) *Inhibidores de α -glucosidasa de Vauquelinia corymbosa*. Tesis UNAM.
- Fröde, T. S., Medeiros, Y. S. (2008) Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 173-183.
- Ghani, U. (2015) Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 103, 133-162.
- Ghosh, S., Rangan, L. (2015) Molecular Docking and Inhibition Kinetics of α -glucosidase Activity by Labdane Diterpenes Isolated from Tora Seeds (*Alpinia nigra* B.L. Burtt.). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, 1477-1489.
- Guyton, C. A., Hall, E. J. (2011) *Tratado de Fisiología médica*. 12^a ed. España.
- Hasan, S., Ahmed, I., Mondal, S., Uddin, J. S., Masud, M. M., Sadhu, K. S., Ishibashi, M. (2006) Antioxidant, antinociceptive activity and general toxicity study of *Dendrophthoe falcate* and isolation of Quercitrin as the major component. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 6, 355-360.
- Hess, J. W., Henrickson, J. (1987) *A taxonomic revisión of Vauquelinia (Rosaceae)*. Ed. The Botanical Research Institute of Texas. Los Angeles, CA. USA.
- Huang, M., Wang, P., Xu, S., Xu, W., Chu, K., Lu, J. (2015) Biological activities of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* on type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Pharmaceutical Biology*, 53, 1058-1065.
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., Goodsell, D. S. J. (2007) A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, 28, 1145-1152.
- International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Step 4 version. 13 p.
- Instituto Nacional Indigenista (1994). *Flora medicinal Indígena de México*. Vol. 1, Tomo 3; 1228, 1292.
- Instituto Nacional Indigenista (1994). *Flora medicinal Indígena de México*. Vol. 1, Tomo 2; 672, 696. 13.

REFERENCIAS

- Isaza, J. H., Ito, H., Yoshida, T. (2001). A flavonol glycoside-lignan ester and accompanying acylated glucosides from *Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry*, 58, 321-327.
- Johansen, H., Rasmussen, L. H., Olsen, C. E., Hansen, H. C. B. (2007) Rate of hydrolysis and degradation of the cyanogenic glycoside-dhurrin-in soil. *Chemosphere*, 67, 259-266.
- Kabade, D. M., Koppad, A., Khatawkar, A., Kabade, S. D., Ahmed, A. (2016) Oral hipoglycaemic agents in the management of type II diabetes mellitus. *Journal of Evidence Based Medicine and Healthcare*, 3 (45), 2272-2282.
- Kahn, S. E., Hull, R. L. Ultzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444, 840-846.
- Khan, T., Zahid, M., Asim, M., Shahzad-ul-Hussan, Z., Choudhary, M. I., Ahmad, V. U. (2002) Pharmacological activities of crude acetona extract and purified constituents of *Salvia moorcraftiana* Wall. *Phytomedicine*, 9 (8), 749-752.
- Khayat, E. (2006) Pharmaceutical composition for alleviating excess levels of sugar in diabetic patients. Patent; US 2006/0257508A1.
- Kim, S. H., Jo, S. H., Kwon, Y. I., Hwang, J. K. (2011) Effects of onion (*Allium cepa* L.) extract administration on intestinal α -glucosidases activities and spikes in postprandial blood glucose levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 3757-3769.
- Kumar, N., Singh, B., Bhandari, P., Gupta, A. P., Sanjay, K., Vijay, K. K. (2005) Biflavonoids from *Lonicera japonica*. *Phytochemistry*, 66, 2740-2711.
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O. (2011) α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*, 5 (9), 19-29.
- Kumar, S., Kumar, V., Rana, M., Kumar, D. (2012) Enzymes Inhibitors From Plants: An Alternative Approach To Treat Diabetes. *Pharmacognosy Communications*, 2, 18-33.
- Lachenmeier, D. W., Walch, S. G. (2011). The choice of thujone as drug for diabetes. *Natural Products Research*, 25 (20), 1890-1892.
- Lin, A. H.-M., Lee, B.-H., Chang, W.-C. (2016) Small intestine mucosal α -glucosidase: A missing feature of *in vitro* starch digestibility. *Foods Hidrocolloids*, 53, 163-171.
- Lorke, D. (1983) A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, 54, 275-287.
- López, F. C. E., Sánchez, D. M. G., Arrieta, B. D., Román, G. J. H. (2010). Estudio preliminar fitoquímico y de la actividad antimicrobiana de *Salvia amarissima* Ort. *Ciencia y Tecnología*, 9, 67-76.
- Lutterbach, R., Stockigt, J. (1995) Dynamics of the biosynthesis of methylursubin plant cells employing *in vivo* ^{13}C NMR without labeling. *Phytochemistry*, 40, 801-806.
- Mahamudur, I. (2017) Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Application toward the Determination of Lactose Content in Milk. Descarga de UNAM 13 Octubre 2017.

REFERENCIAS

- Maldonado, E., Cárdenas, J., Bojórquez, H., Escamilla, E. M., Ortega, A. (1996) Amarisolide, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*. *Phytochemistry*, 42, 1105-1108.
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I. (2013) Mexican Antidiabetic Herbs: Valuable Source of Inhibitors of α -Glucosidases. *Journal of Natural Products*, 76, 468-483.
- Meller J. (2001) *Molecular Dynamics*. Encyclopedia of life sciences, Nature Publishing Group, 1-8.
- Moridi Farimani, M., Bahadori, M. B., Taheri, S. (2011) Triterpenoids with rare carbon skeletons from *Salvia hydrangea*: antiprotozoal activity and absolute configurations. *Journal of Natural Products*, 74, 2200-2205.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free function. *Journal of Computational Chemistry*, 19, 1639-1662.
- Nakai, H., Okuyama, M., Kim, Y.-M., Saburi, W., Wongchawalit, J., Mori, H., Chiba, S., Kimura, A. (2005) Molecular analysis of α -glucosidase belonging to GH-family 31. *Biologia, Bratislava*, 60, 131-135.
- Napolitano, J. G., Lankin, D. C., Chen, S., Pauli, F. G. (2012) Complete ^1H NMR spectral analysis of ten chemical markers of *Ginkgo biloba*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50, 569-575.
- Nicollier, F. G., Pope, F. D., Thompson, C. A. (1983) Biological activity of dhurrin and other compounds from Johnson Grass (*Sorghum halepense*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 744-748.
- Norma Oficial Mexicana, 1999. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. México, 36 p.
- Nugroho, A., Morita, H. (2014) Circular dichroism calculation for natural products. *Journal of Natural Medicine*, 68, 1-10.
- Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y. (1999) Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 550-553.
- Okuyama, M., Saburi, W., Mori, H., Kimura, A. (2016) α -Glucosidases and α -1,4-glucan lyases; structures, functions, and physiological actions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 2727-2751.
- Oliveira, M. C. C., Carvalho, M. G., Silva, J. C., Werle, A. A. (2002) New Biflavonoid and Other Constituents from *Luxemburgia nobilis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13, 119-123.
- OMS (2002). Metodologías de investigación y evaluación de los medicamentos herbolarios.
- OMS (2017) [en línea] disponible en <http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/index1.html> [consulta: 30 marzo 2017].

REFERENCIAS

- Omosa, L. K., Midiwo, J. O., Derese, S., Yenesew, A., Peter, M. G., Heydenreich, M. (2010) *neo*-Clerodane diterpenoids from the leaf exudate of *Dodonaea angustifolia*. *Phytochemistry Letters*, 3, 217-220.
- Omosa, L. K., Amugune, B., Ndunda, B., Milugo, T. K., Heydenreich, M., Yenesew, A. (2014) Antimicrobial flavonoids and diterpenoids from *Dodonaea angustifolia*. *South African Journal of Botany*, 91, 58-62.
- O' Rahilly, S. (2009) Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature*, 462, 307-314.
- Ovalle-Magallanes, B., Medina-Campos O. N., Pedraza-Chaverri, J., Mata, R. (2015) Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry*, 110, 11-119.
- Patel D. K., Prasad, S. K., Kumar, R., Hemalatha, S. (2012) An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (4), 320-330.
- Pérez-Fuentes, R., Baez-Duarte, B. G., Zamora-Ginez, I., Ruiz-Vivanco, G., Pulido-Pérez, P., Nieva-Vázquez, A., Gonzalez-Mejia, M. E., Torres-Rasgado, E. (2014) Early decrease of insulin sensitivity in offspring of individuals with type 2 diabetes. The Mexican Diabetes Prevention Study. *Archives of Medical Research*, 45, 217-222.
- Perfumi, M., Arnold, N., Tacconi, R. (1991) Hypoglycemic activity of *Salvia fructicosa* Mill. From Cyprus. *Journal of ethnopharmacology*, 34, 135-140.
- Phillips, J., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26, 1781-802.
- Priscilla, D. H., Roy, D., Suresh, A., Kumar, V., Thirumurugan, K. (2014) Naringenin inhibits α -glucosidase activity: A promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 210, 77-85.
- Quintanilla-García, C., Zúñiga-Guajardo, S. (2010) El efecto incretina y su participación en la diabetes mellitus tipo 2. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 48, 509-520.
- Raoufi, S., Baluchnejadmojarad, T., Roghabi, M., Ghazanfari, T., Khojasteh, F., Mansouri, M. (2015) Antidiabetic potential of salvianolic acid B in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Pharmaceutical Biology*, 53 (12), 1803-1809.
- Reza, J. A., Zare, S., Firuzi, O., Xiao, J. (2016) Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. *Phytochemical Reviews*, 15, 829-867.
- Ríos, J. L., Francini, F., Schinella, G. R. (2016) Productos naturales para el tratamiento de la diabetes (I): Mecanismos de acción. *Revista de Fitoterapia*, 16 (1), 17-31.

REFERENCIAS

- Rivera-Chávez, J., González-Andrade, M., González, M. C., Glenn, A., Mata, R. (2013) Thielavins A, J and K: α -glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*, 94, 198-205.
- Rudnitskaya, A., Török, B., Török, M., (2010) Molecular docking of enzyme inhibitors. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 38, 261-265.
- Rzedowski, J., Calderón, R. G. (2005) *Flora del bajío y regiones adyacentes*. Ed. Instituto de Ecología. México.
- Sabina, Y., Venkatesan, J. (2017) Thiazolidinediones and PPAR orchestra as antidiabetic agents: From past to present. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 126, 879-893.
- Scior, T., Martínez, M. E., Salinas, S. E. (2007) Los modelos *in silico*, una herramienta para el conocimiento farmacológico. *Elementos*, 68, 45-48.
- Schroeder, C., Lutterbach, R., Stöckigt, J. (1996) Preparative biosynthesis of natural glucosides and fluorogenic substrates for β -glucosidases followed by *in vivo* ^{13}C NMR with high density plant cell cultures. *Tetrahedron*, 52, 925-934.
- Suzuki, K., Katsura, D., Sagara, M., Aoki, C., Nishida, M., Aso, Y. (2016) Postprandial Reactive Hypoglycemia Treated with a Low-dose Alpha-glucosidase Inhibitor: Voglibose May Suppress Oxidative Stress and Prevent Endothelial Dysfunction. *Internal Medicine*, 55, 949-953.
- Švehlíková, V., Bennett, R., Mellon, F. A., Needs, P. W., Piacente, S., Kroon, P. A., Bao, Y. (2004) Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-*O*-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Phytochemistry*, 65, 2323-2332.
- Szkudelski, T. (2012) Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine*, 237, 481-490.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamutsu, K., Matsuoka, T. (2006) Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52, 149-153.
- Tahara, A., Matsuyama-Yokono, A., Nakano, R., Someya, Y., Shibasaki, M., (2008) Effects of antidiabetic drugs on glucose tolerance in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic mice. *Hormone and Metabolic Research*, 40, 880-886.
- Tan, K., Tesar, C., Wilton, R., Keigher, L., Badnigg, G., Joachimiak, A. (2010) Novel α -glucosidase from human gut microbiome: substrate specificities and their switch. *FASEB Journal*, 24, 3939-3949.
- Toscano, A. R., Maldonado, A., Ortega, A., Cárdenas, J. (2001) Amarisolide monohydrate, a 2-(β -glucosyl)neoclerodane. *Acta Crystallographica*, C57, 846-847.
- Trumbull, E. R., Bianchi, E., Eckert, D. J., Wiedhopf, R. M., Cole, J. R. (1975) Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae). *Journal Pharmaceutical Sciences*, 65 (9), 1407-1408.

REFERENCIAS

- Vvedenskaya, I. O., Rosen, T. R., Guido, E. J., Russell, J. O., Millis, A. K., Vorsa, N. (2004) Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52,188-195.
- Wang, B. Q. (2010) *Salvia miltiorrhiza* chemical and pharmacological review of a medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants Reserch*, 4, 2813-2820.
- Wei, Y., Ito, Y. (2007) Isolation of hyperoside and luteolin-glucoside from *Agrimonia pilosa* ledeb using stepwise elution by High-Speed Countercurrent Chromatography. *The Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30, 1465-1473.
- Weng, X., Wang, W. (2000) Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*. *Food Chemistry*, 71, 489-493.
- Wu, T. H., Cheng, Y. Y., Liou, J. R., Way, T. D., Chen, C. J., Kuo, S. C., El-Shazly, M., Chang, F. R., Wu, Y. H., Liaw, C. C. (2014) Clerodane diterpenes from *Polyalthia longifolia* var. *pendula* protect SK-N-MC human neuroblastoma cells from β -amyloid insult. *RSC Advances*, 4, 23707-23712.
- Wu, Y.-B., Ni, Z.-Y., Shi, Q.-W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.-C., Cong, B. (2012) Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chemical Reviews*, 112, 5967-6026.
- Xu, H. (2010) Inhibition kinetics of flavonoids on yeast α -glucosidase merged whit docking simulations. *Protein and Peptide Letter*, 17, 1270-1279.
- Yang, Y., Lian, G., Yu, B. (2015) Naturally Occurring Polyphenolic Glucosidase Inhibitors. *Israel Journal of Chemistry*, 55, 268-284.
- Zagobelny, M., Bak, S., Lindberg, M. B. (2008) Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochemistry*, 69, 1457-1468.
- Zhou, X., Liu, B., Liu, L., Lou, Y., Guo, J., Ye, J. (2008) Manufacture of Vinegar Containing *Eriobotrya japonica* Extract. CN 101096629.

ANEXOS

Anexo 1. Espectros de masas y de RMN de la 6,6",3"-trihidroxi-7,3',7"-*O*-trimetiloniflavona (**17**) y de las amarisólidas B-E (**13-16**), productos aislados de *S. circinata*.

Anexo 2. Datos de los conforméros considerados para los cálculos de dicroísmo circular.

Anexo 3. Espectros de RMN de los productos aislados de *V. corymbosa*.

Anexo 4. Información suplementaria sobre los cálculos computacionales.

Anexo 5. Potencial antidiabético de la perfoliatina A, metabolito secundario de la especie vegetal *Melampodium perfoliatum* Cavanilles (Asteraceae).

Anexo 6. Publicaciones derivadas del proyecto.

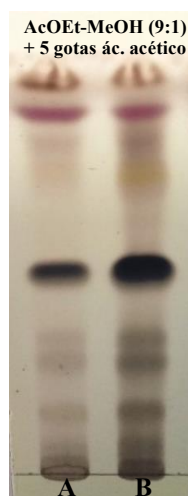


Figura A1. Perfiles cromatográficos de los extractos de *S. circinata*. (A) Extracto acuoso; (B) Extracto orgánico.

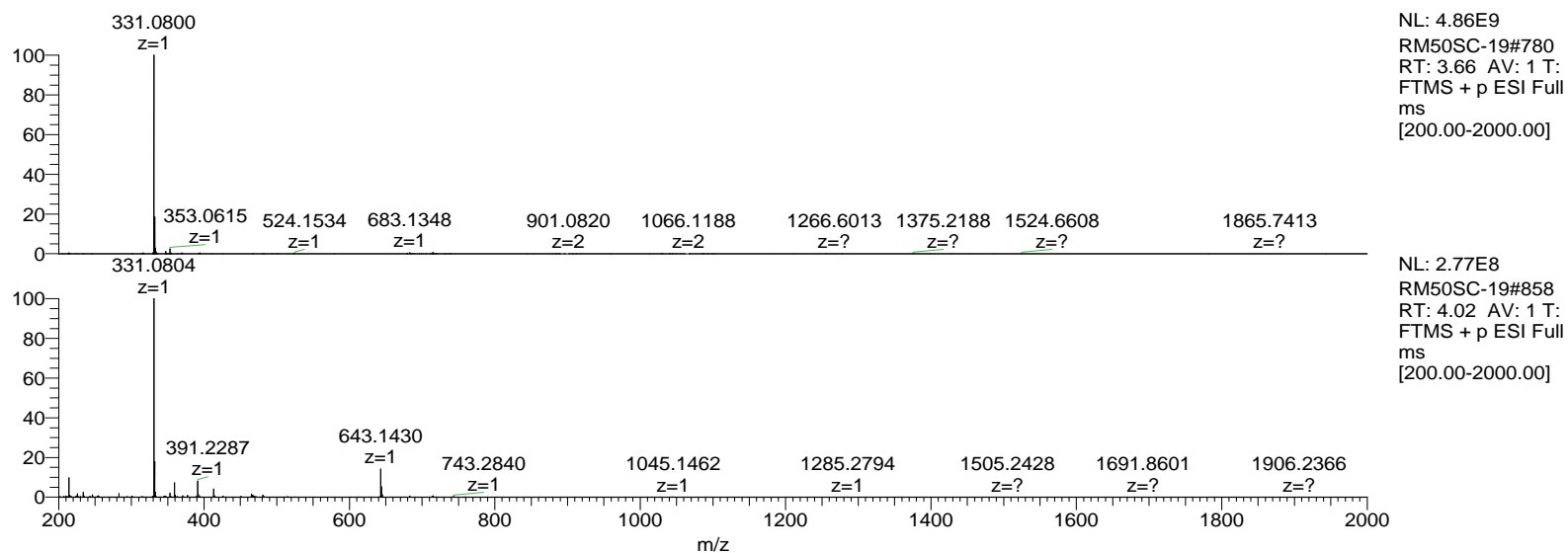


Figura A2. Espectro de EM-AR de la 6,6",3"-trihidroxi-7,3',7"-*O*-trimetiloniflavona (**17**).

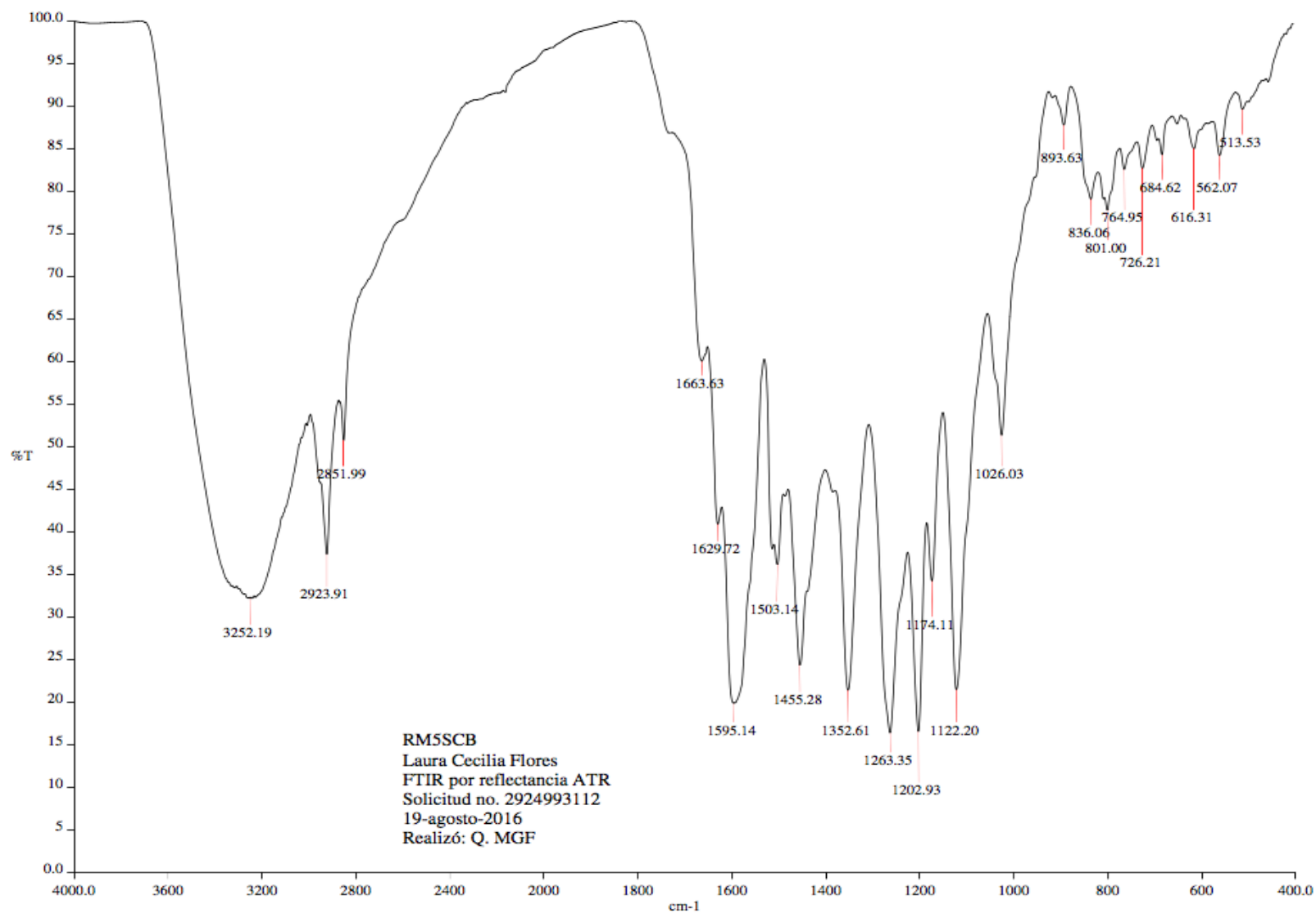


Figura A3. Espectro de FTIR por reflectancia ATR de la 6,6',3'''-trihidroxi-7,3',7''-O-trimetilniflavona (17).

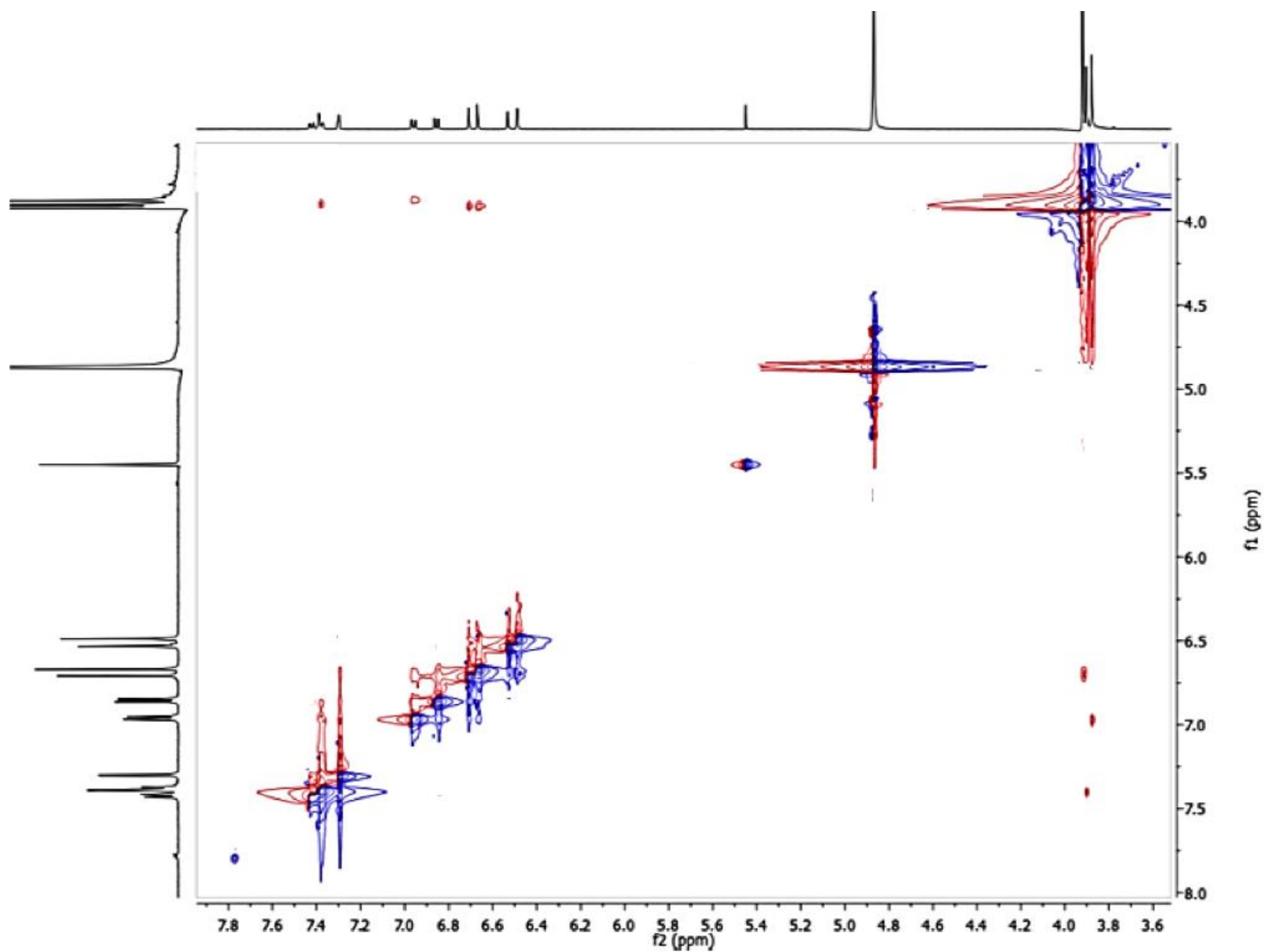


Figura A4. Espectro de NOESY (500 MHz, CD₃OD) de la 6,6'',3'''-trihidroxi-7,3',7''-O-trimetiloni flavona (17).

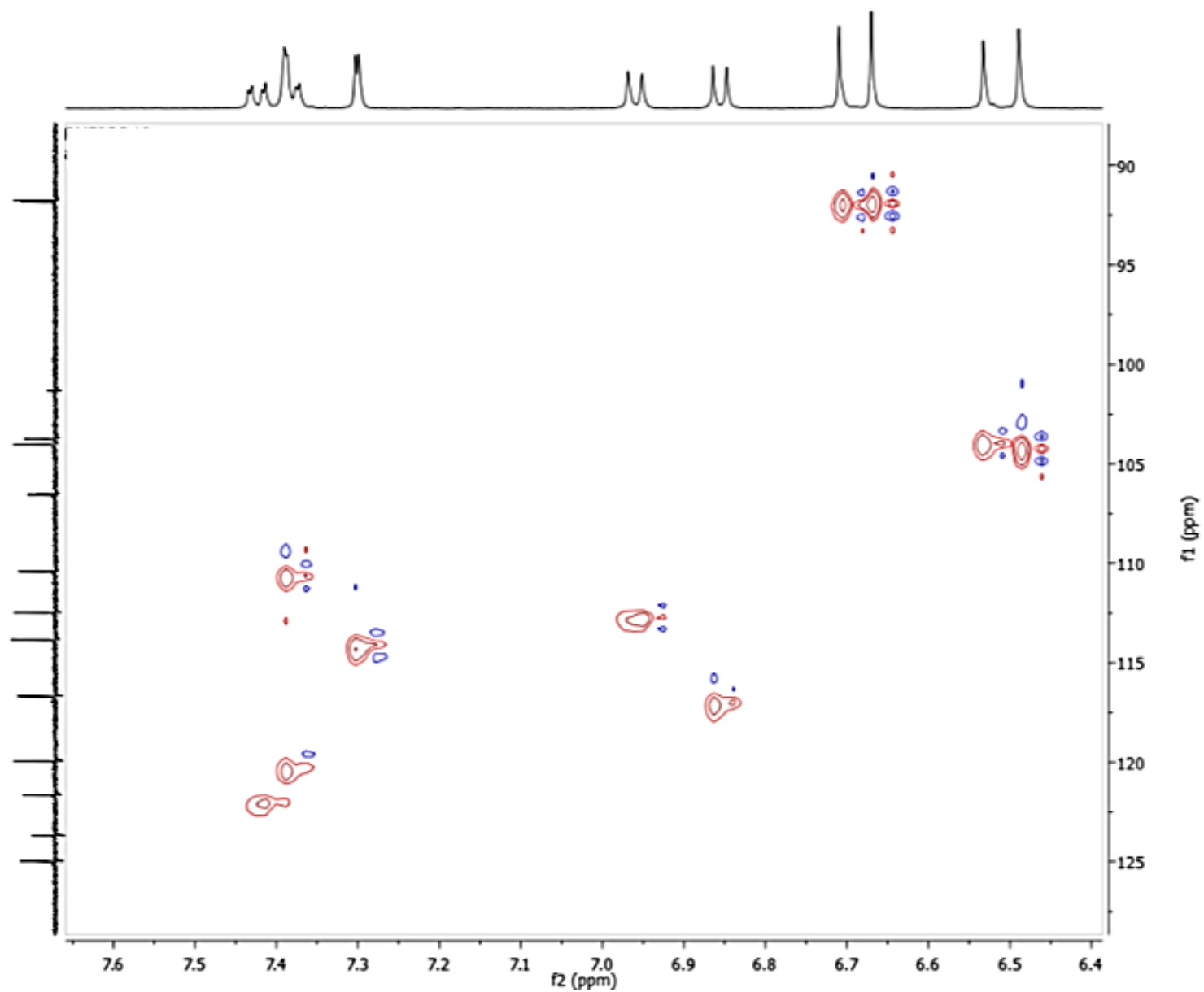


Figura A5. Espectro de HSQC (500 MHz, CD₃OD) de la 6,6'',3'''-trihidroxi-7,3',7''-O-trimetiloni flavona (**17**).

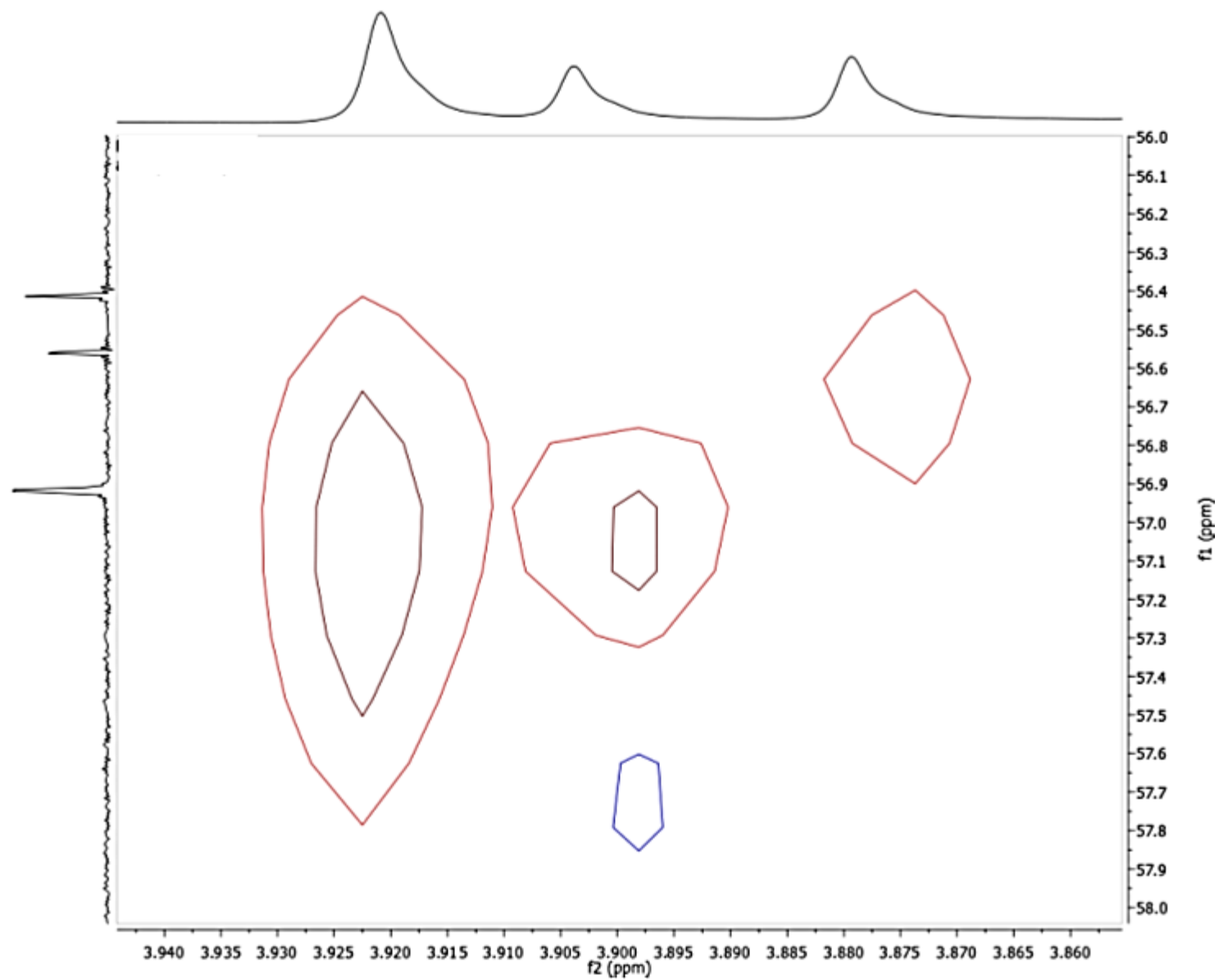


Figura A6. Espectro de HSQC (500 MHz, CD₃OD) de la 6,6'',3'''-trihidroxi-7,3',7''-O-trimetiloni flavona (17).

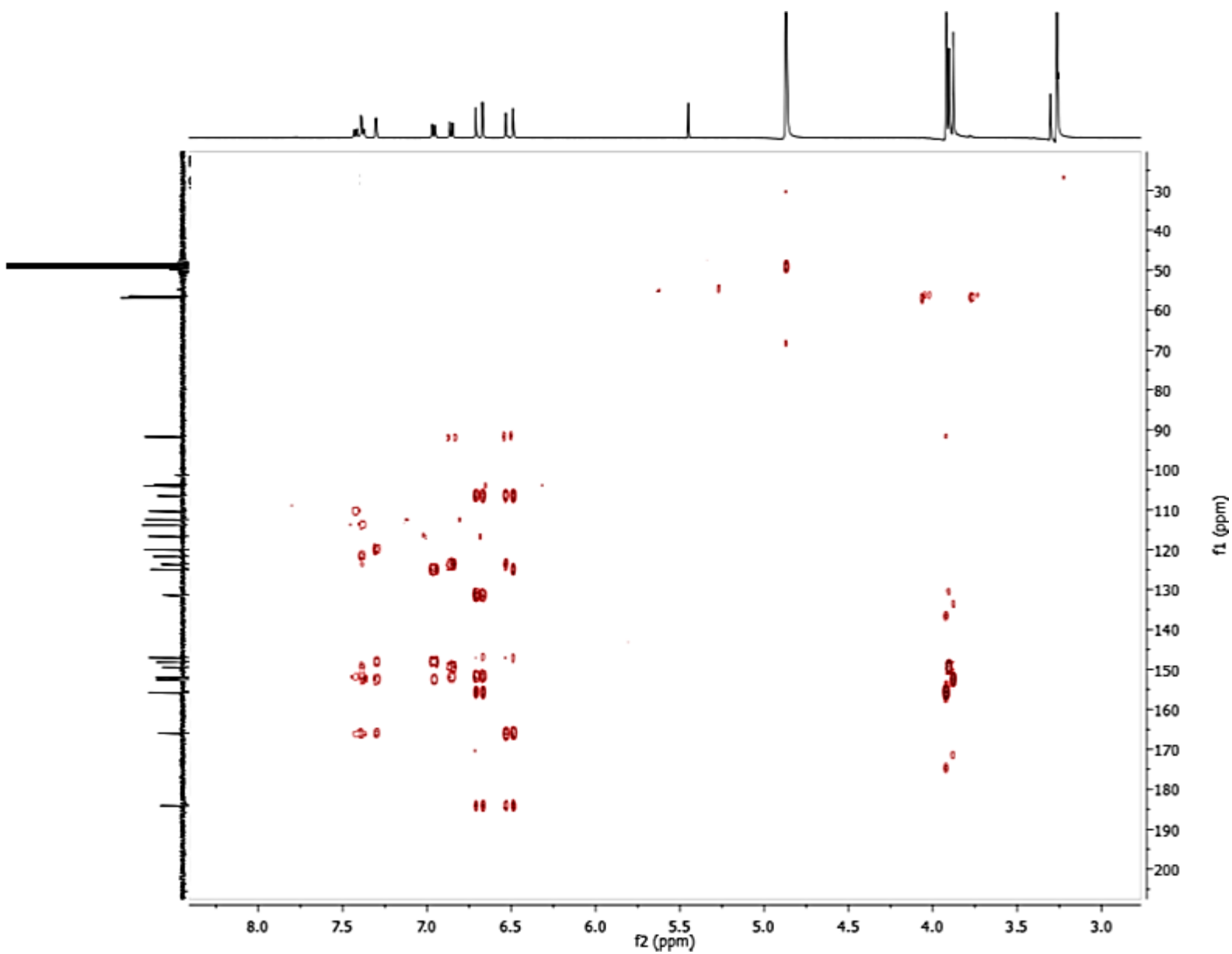


Figura A7. Espectro de HMBC (500 MHz, CD₃OD) de la 6,6'',3'''-trihidroxi-7,3',7''-O-trimetiloni flavona (**17**).

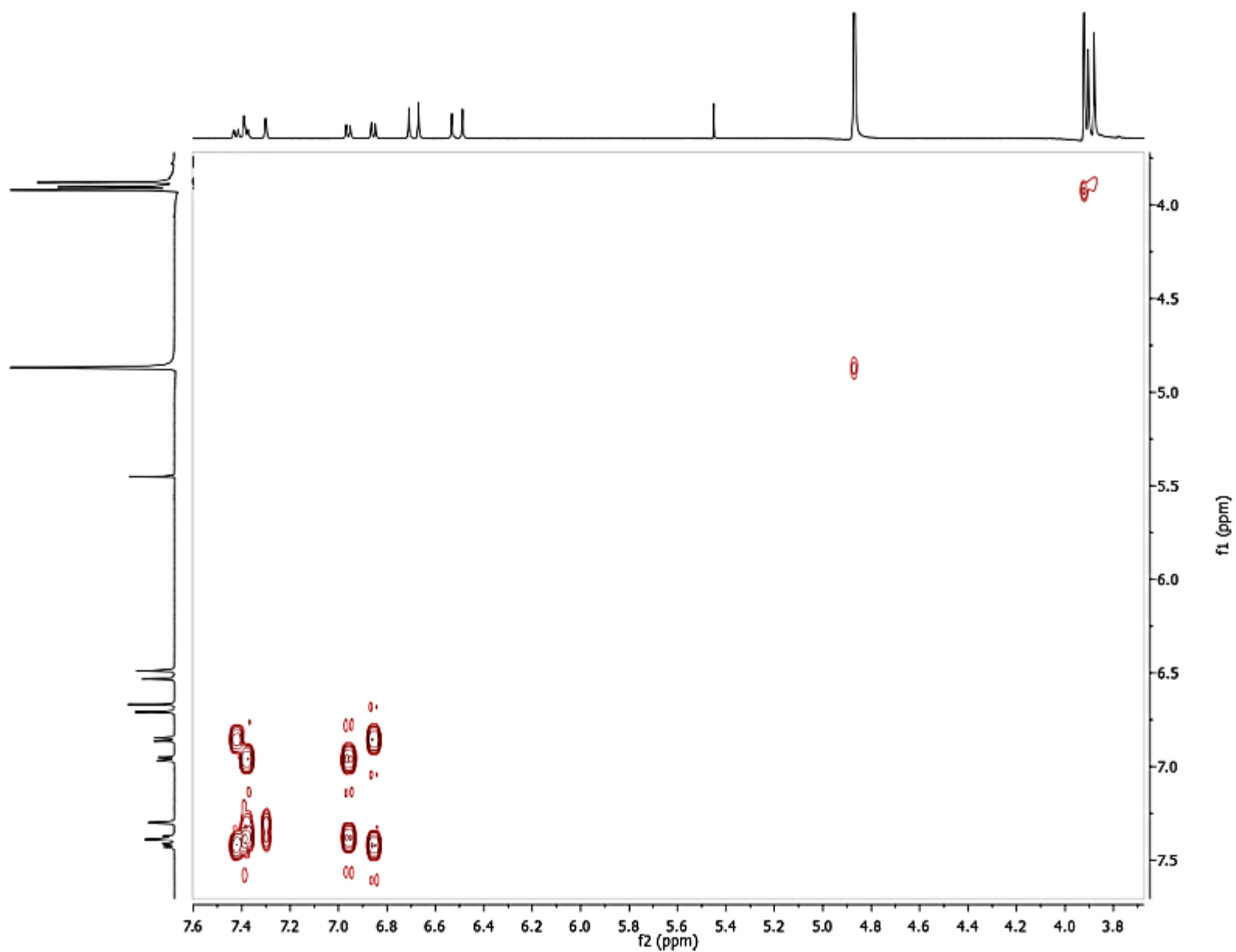
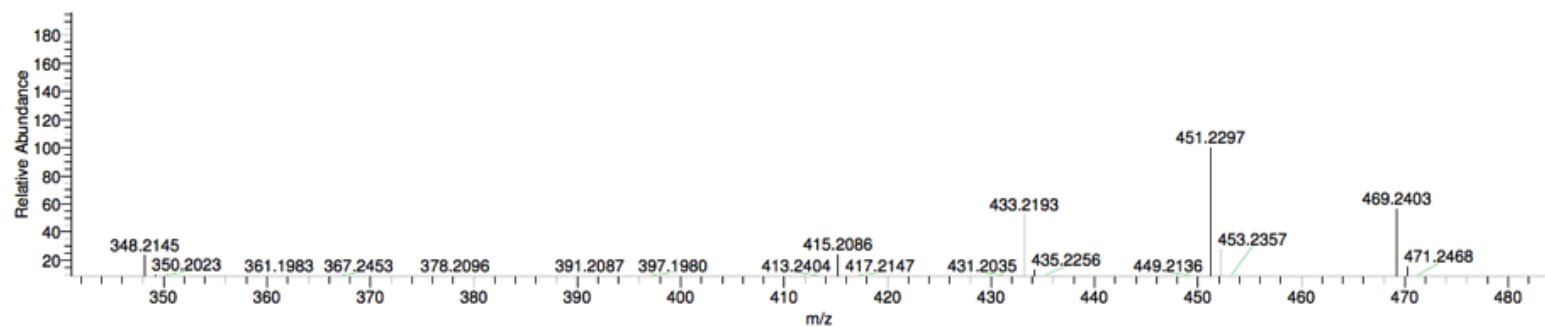


Figura A8. Espectro de COSY (500 MHz, CD₃OD) de la 6,6'',3'''-trihidroxi-7,3',7''-O-trimetiloni flavona (**17**).

RM5-26 #686 RT: 2.37 AV: 1 NL: 1.95E8
T: FTMS + c ESI Full ms [135.00-2000.00]



RM5-26 #690 RT: 2.39 AV: 1 NL: 5.92E9
T: FTMS - c ESI Full ms [135.00-2000.00]

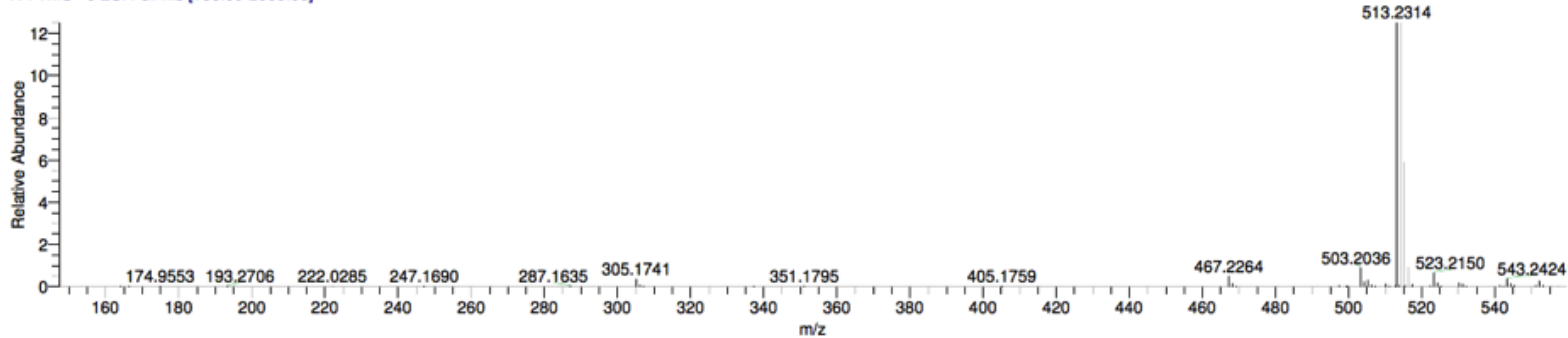
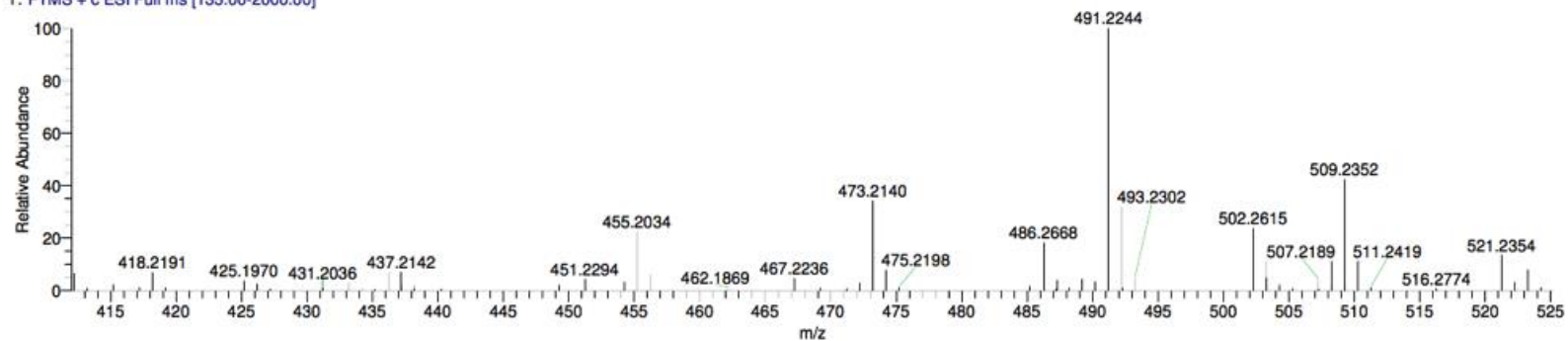


Figura A9. Espectro de EM-AR de la amarisólida B (13).

RM5-21 #726 RT: 2.48 AV: 1 NL: 5.26E7
T: FTMS + c ESI Full ms [135.00-2000.00]



RM5-21 #730 RT: 2.49 AV: 1 NL: 1.05E8
T: FTMS - c ESI Full ms [135.00-2000.00]

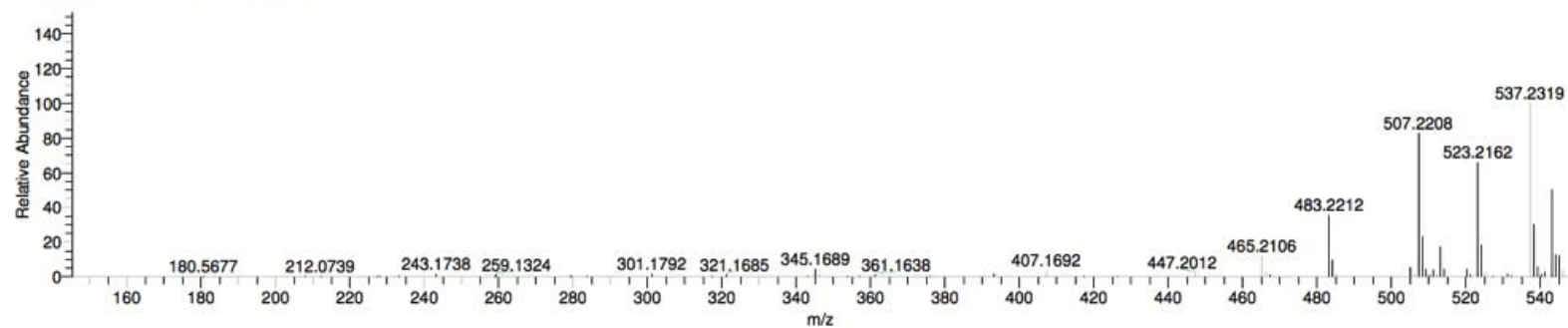
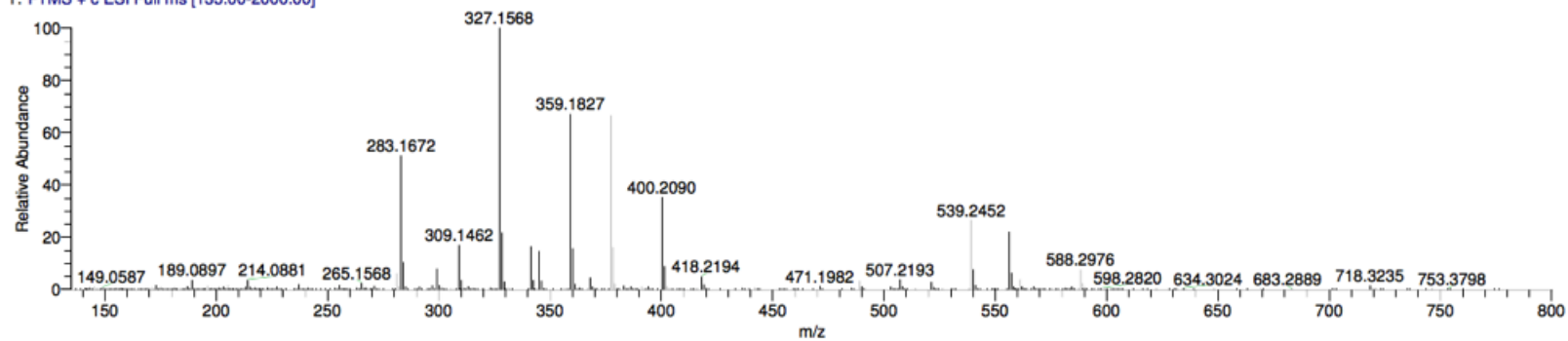


Figura A10. Espectro de EM-AR de la amarisólida C (14).

RM5-28 #766 RT: 2.63 AV: 1 NL: 1.67E9
T: FTMS + c ESI Full ms [135.00-2000.00]



RM5-28 #762 RT: 2.62 AV: 1 NL: 2.73E9
T: FTMS - c ESI Full ms [135.00-2000.00]

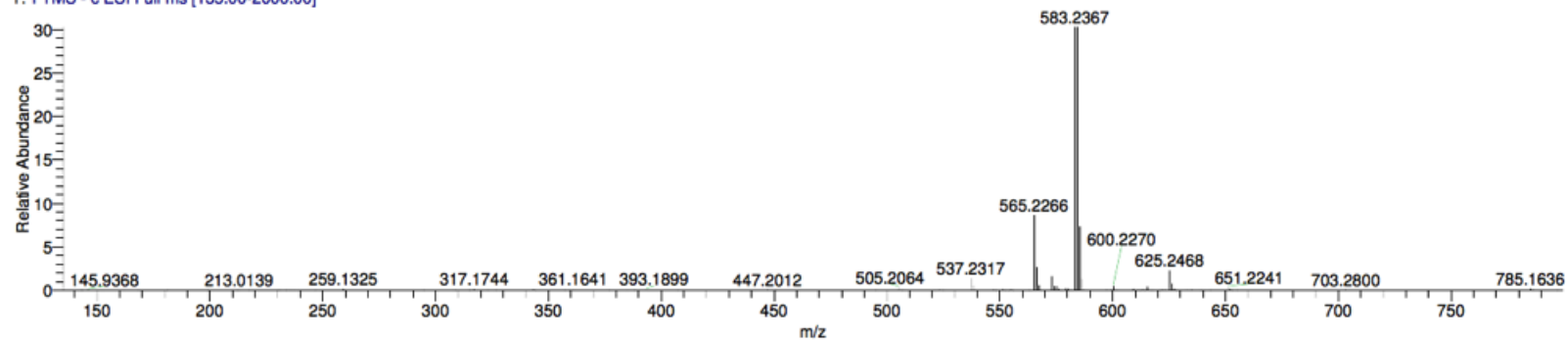


Figura A11. Espectro de EM-AR de la amarisólida D (15).

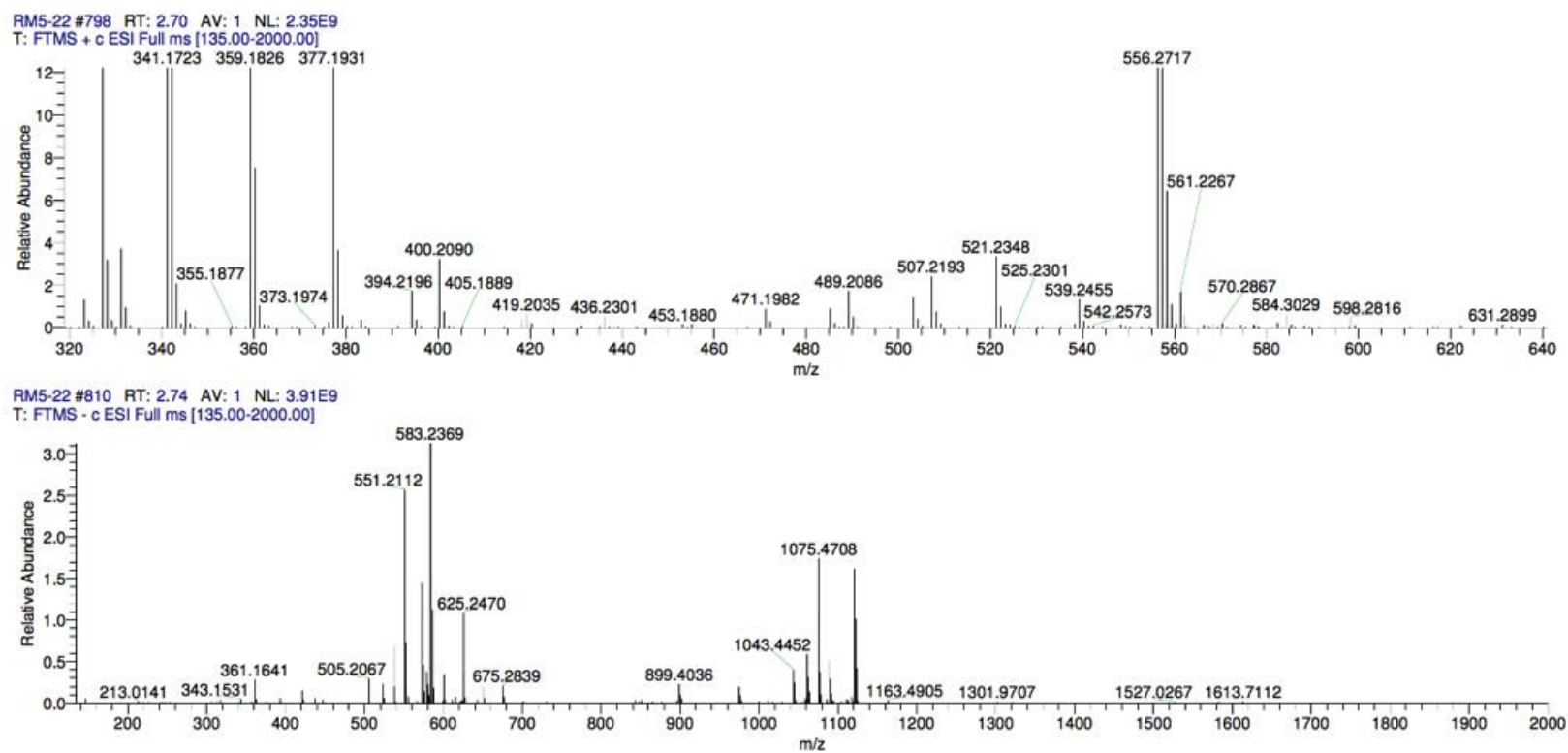


Figura A12. Espectro de EM-AR de la amarisólida E (16).

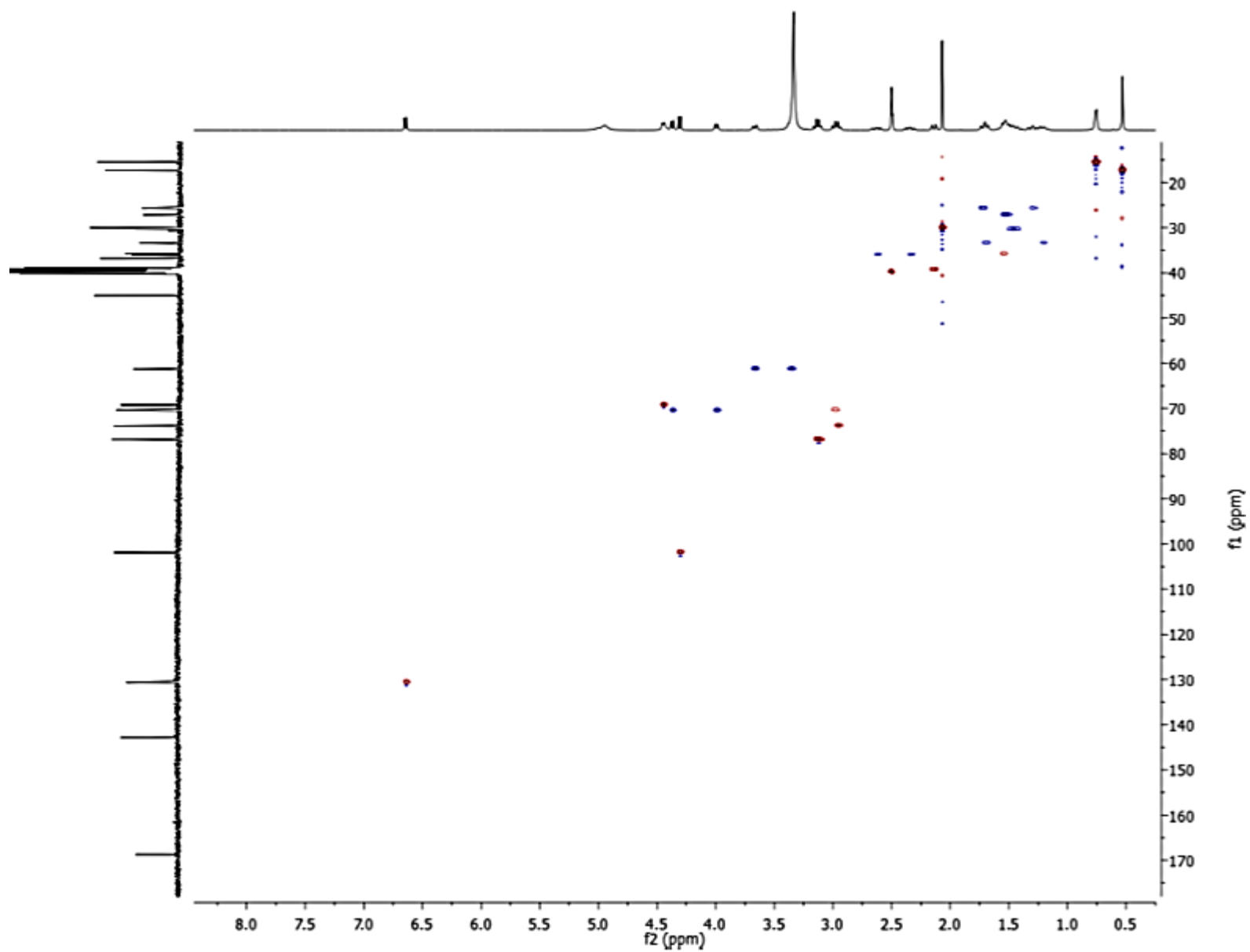


Figura A13. Espectro de HSQC (500 MHz, DMSO- d_6) de la amarisólida B (13).

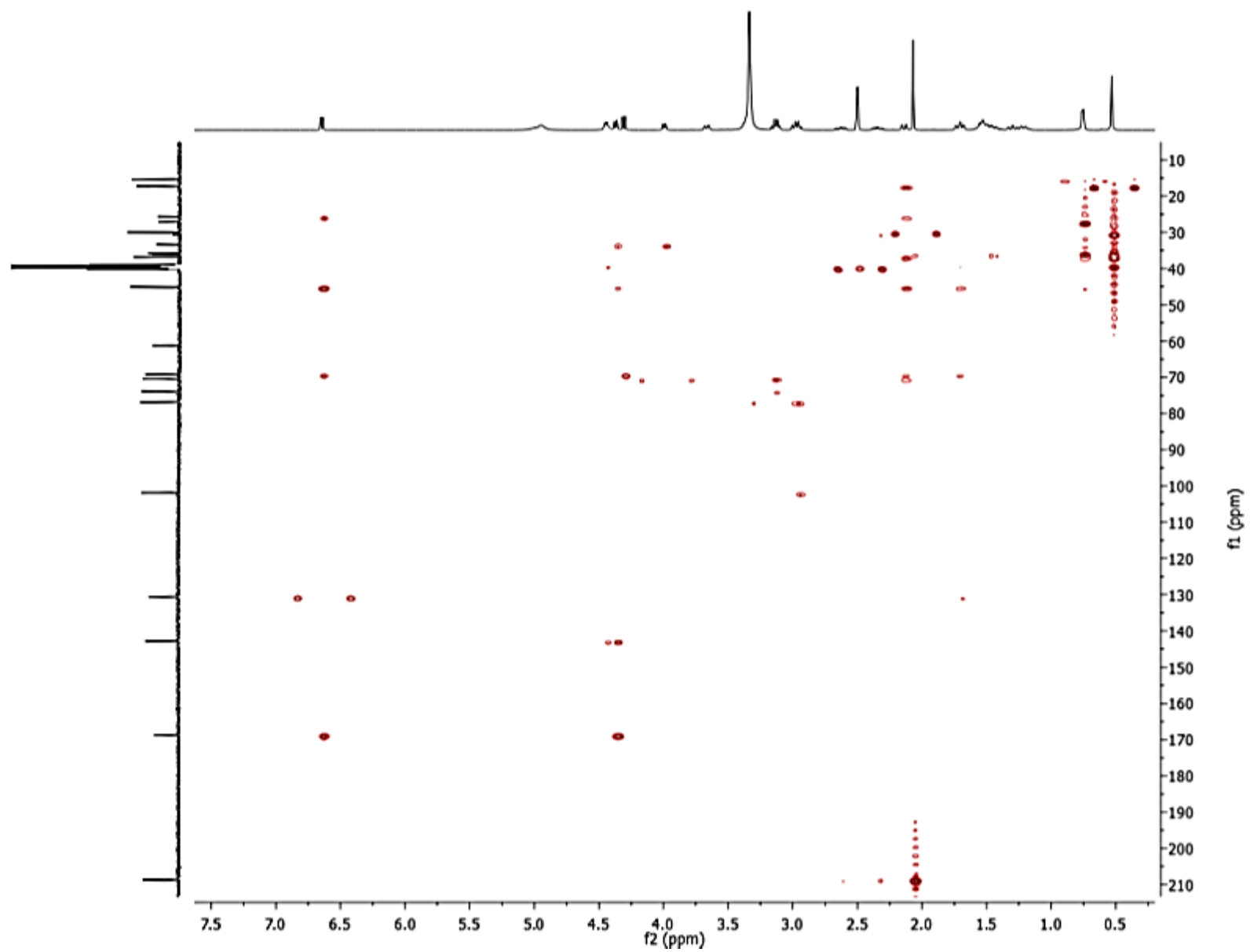


Figura A14. Espectro de HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de la amarisolida B (13).

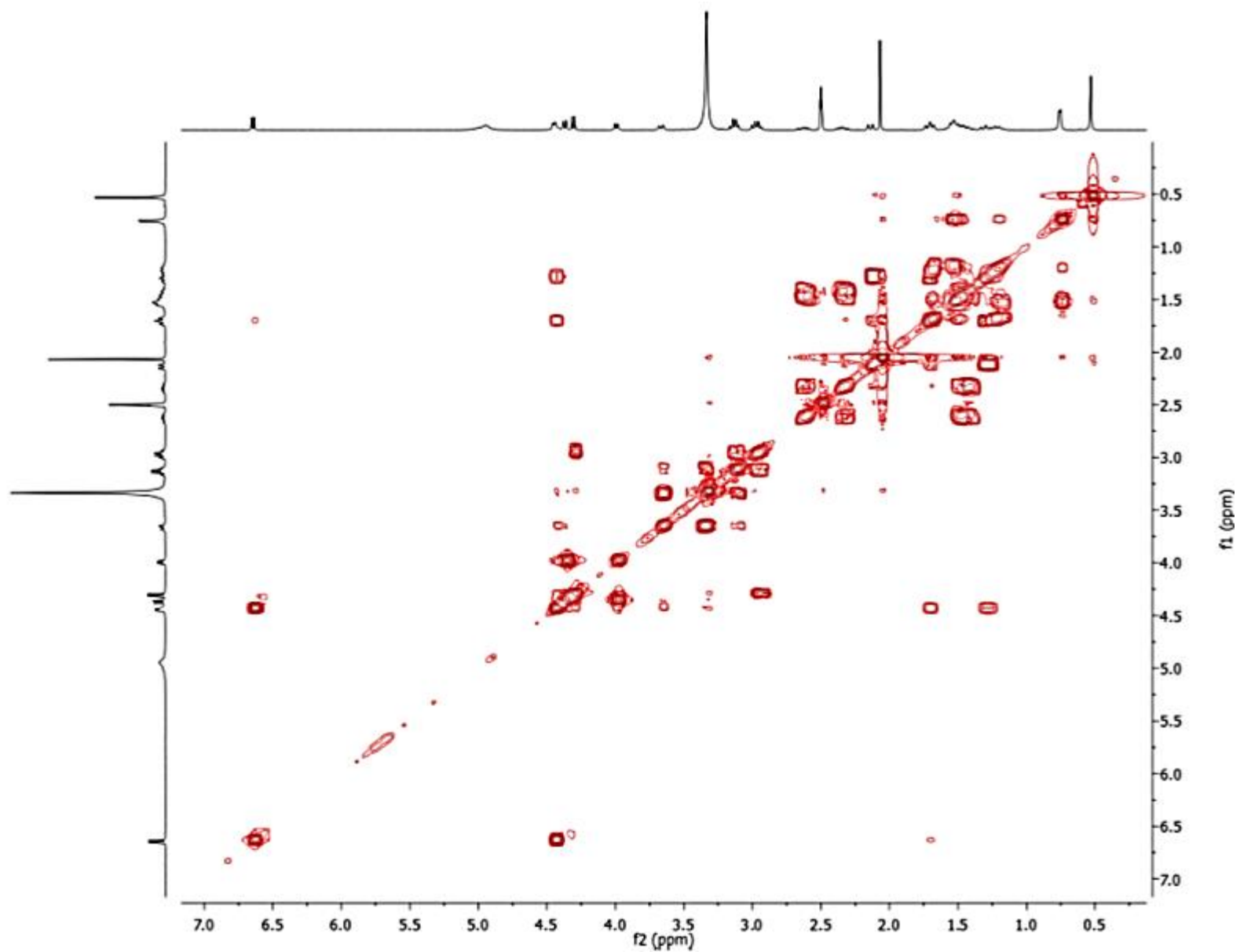


Figura A15. Espectro de COSY (500 MHz, DMSO- d_6) de la amarisólida B (13).

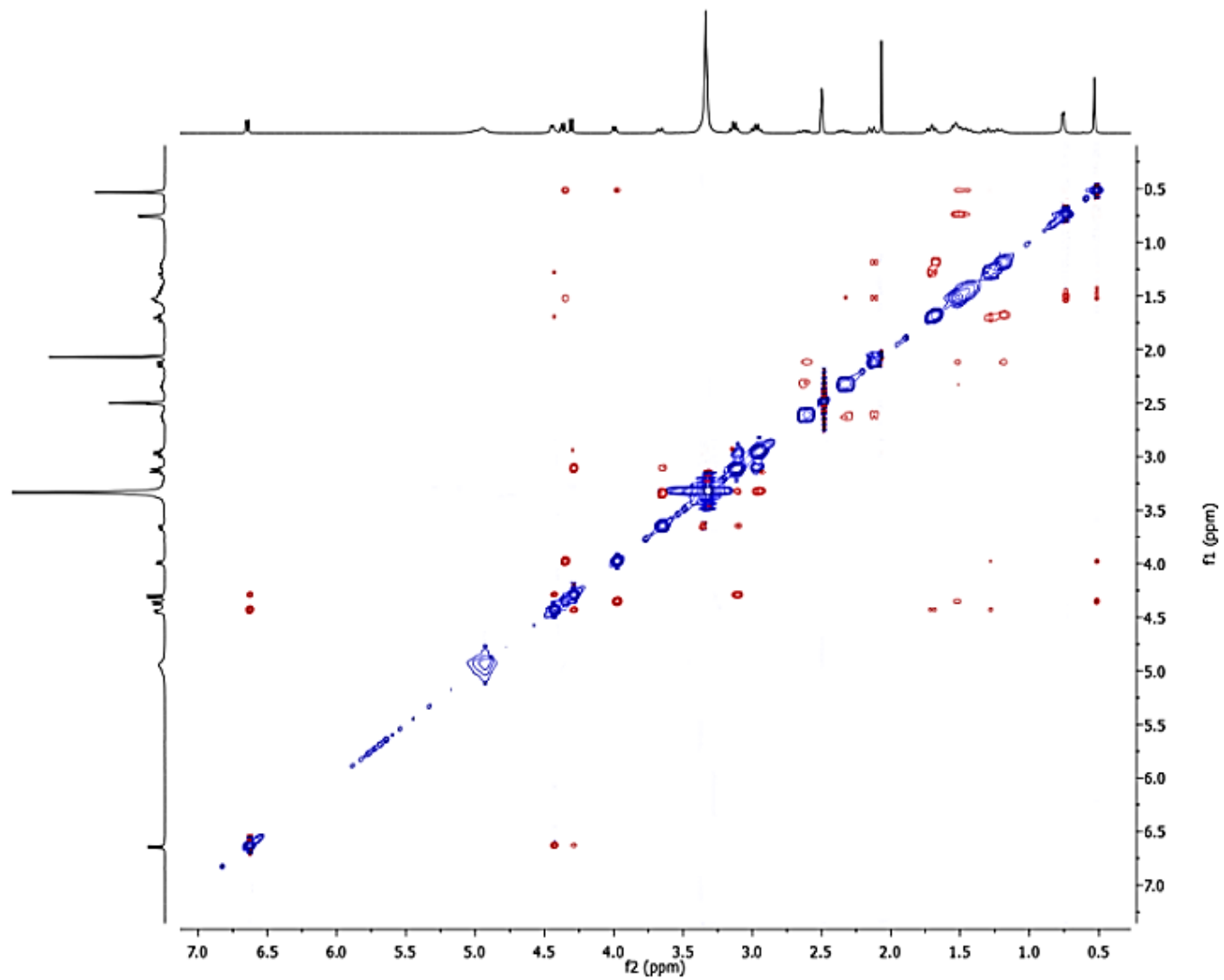


Figura A16. Espectro de NOESY (500 MHz, DMSO- d_6) de la amarisolida B (**13**).

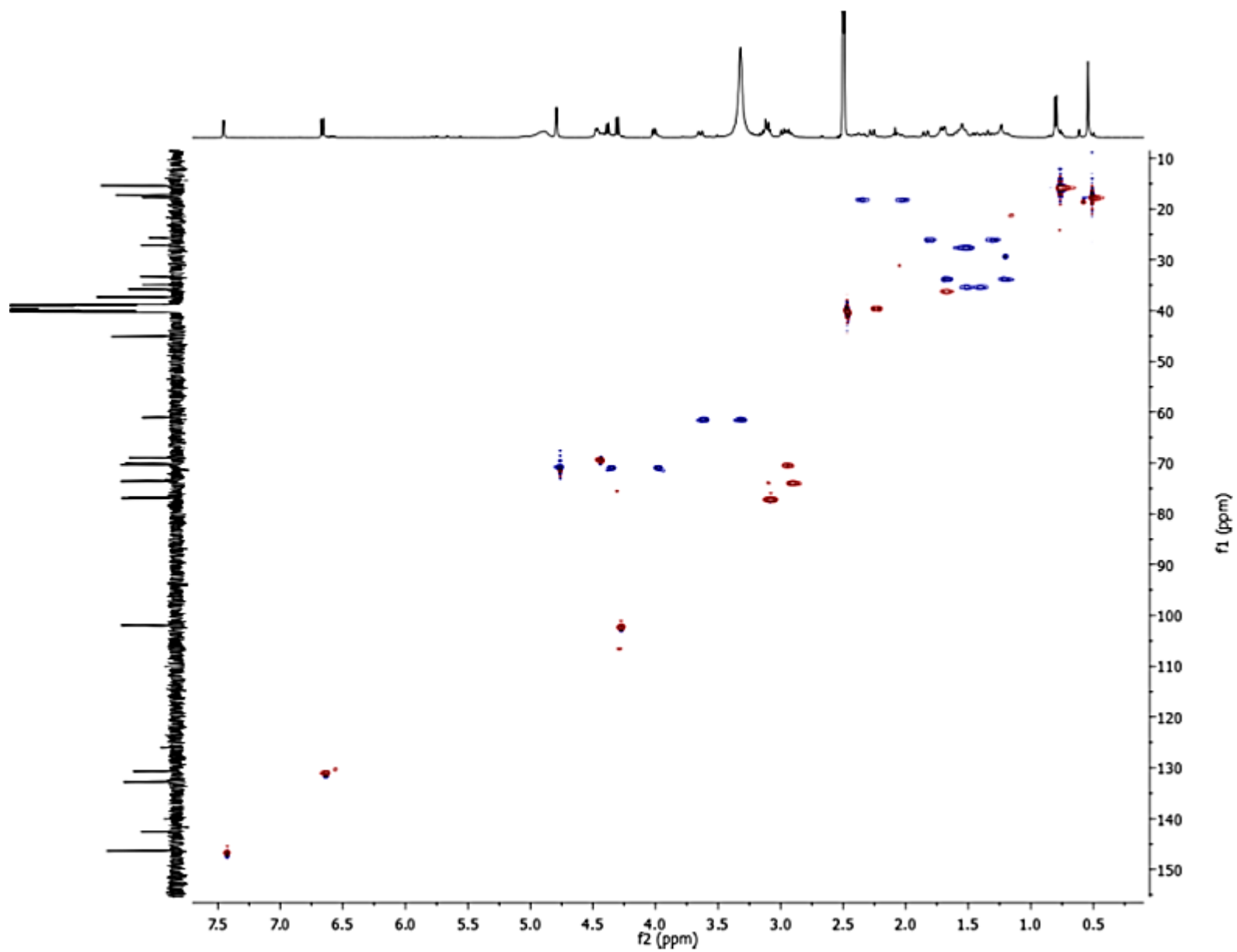


Figura A17. Espectro de HSQC (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de la amarisólida C (**14**).

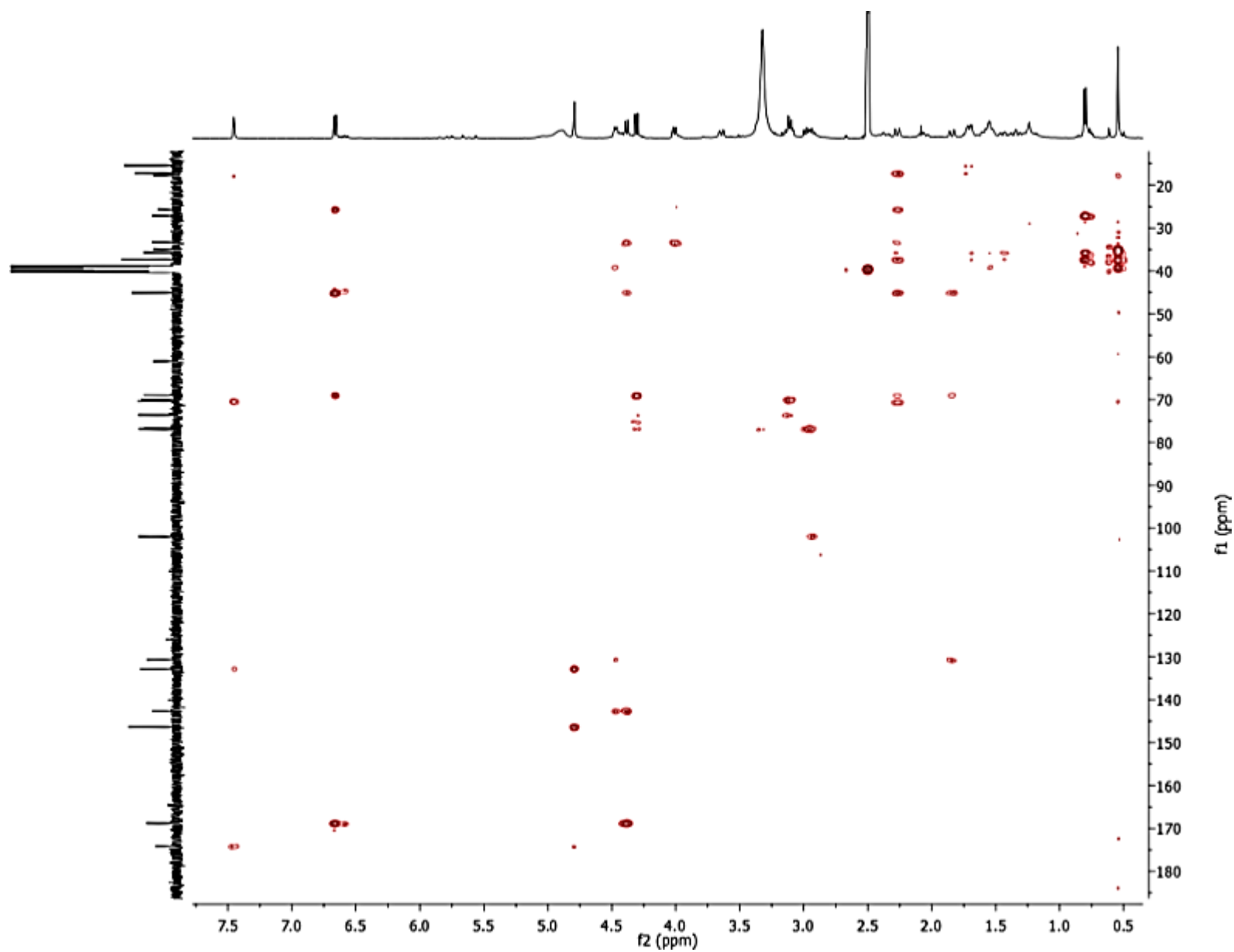


Figura A18. Espectro de HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de la amarisólida C (14).

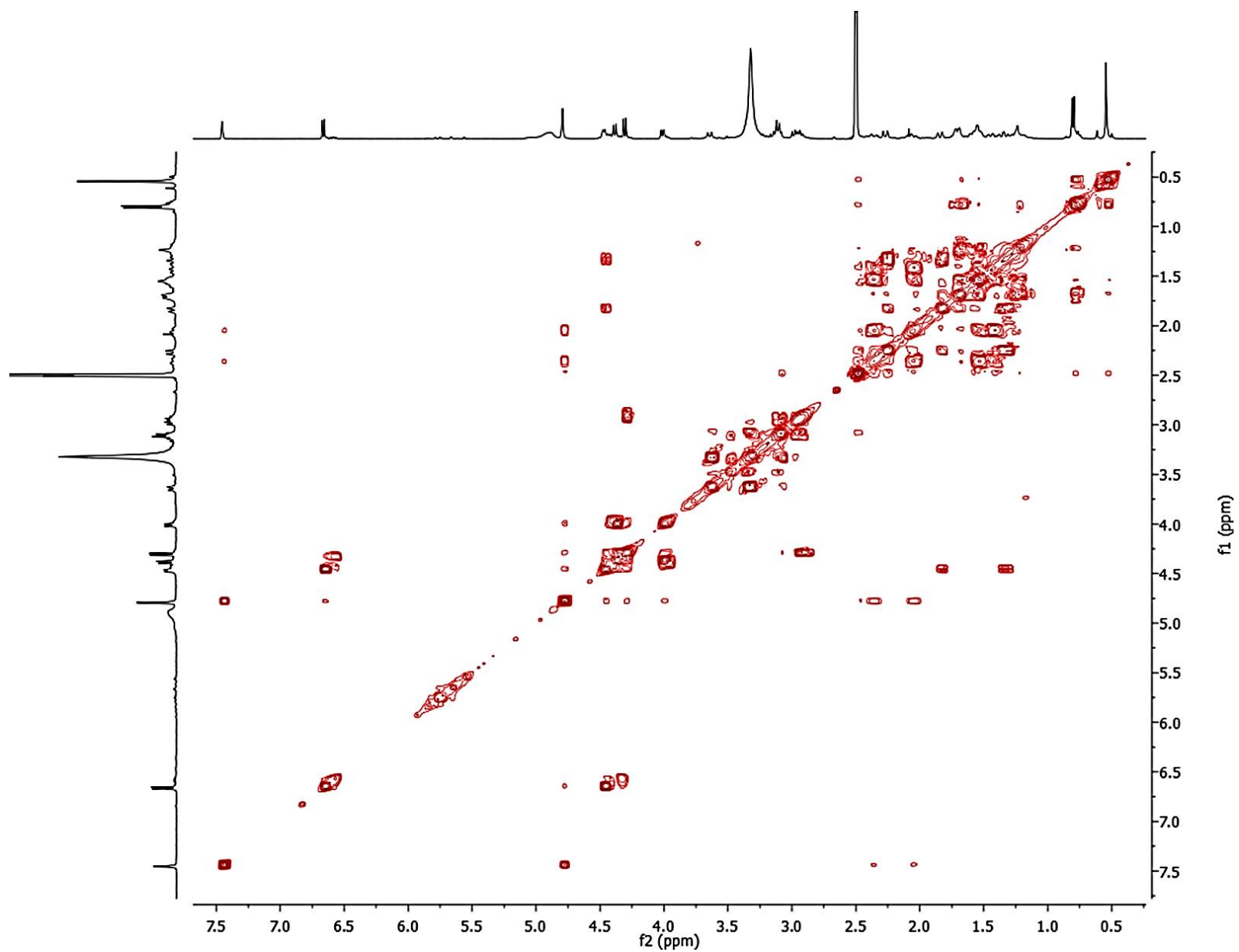


Figura A19. Espectro de COSY (500 MHz, DMSO- d_6) de la amarisólida C (**14**).

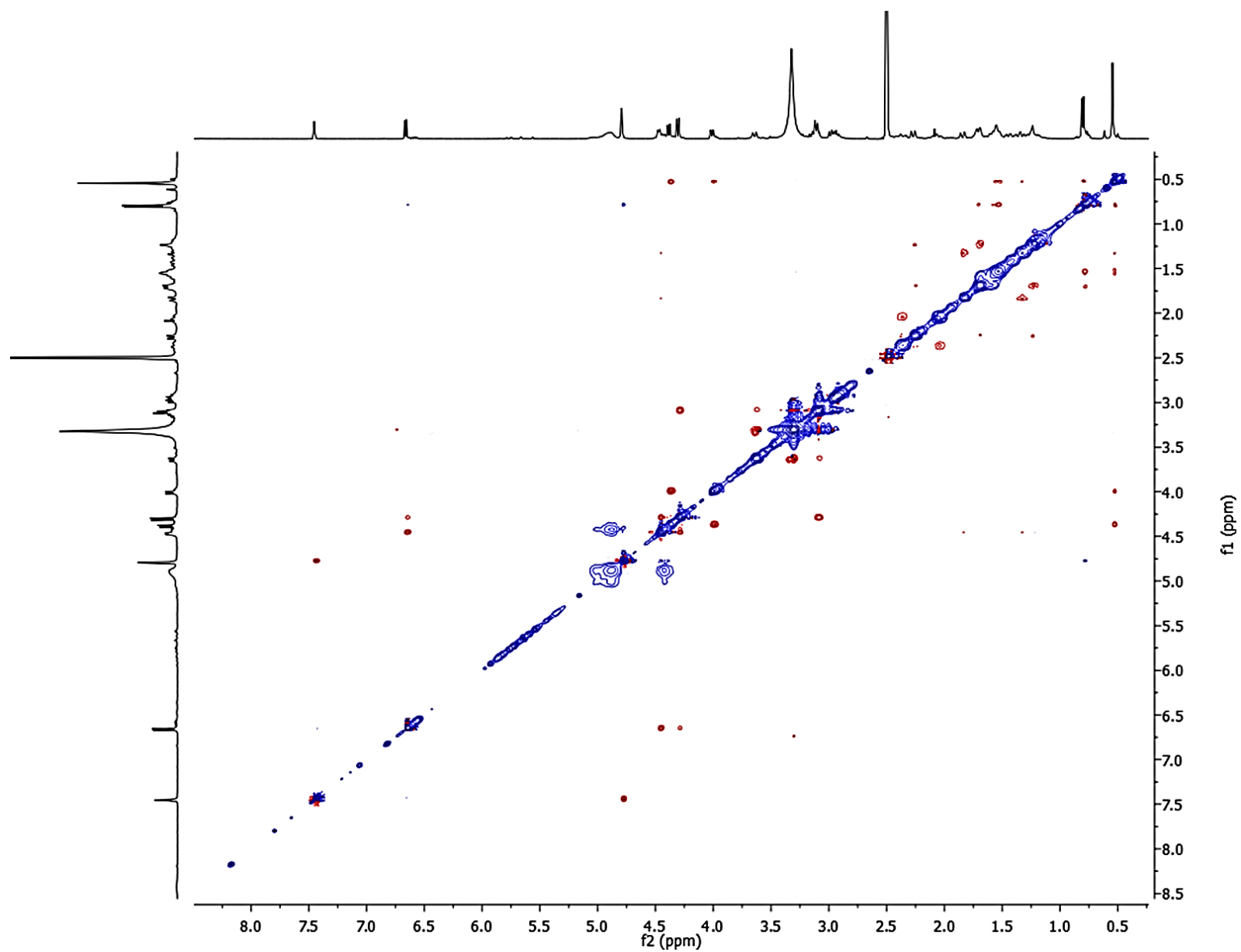


Figura A20. Espectro de NOESY (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de la amarisólida C (**14**).

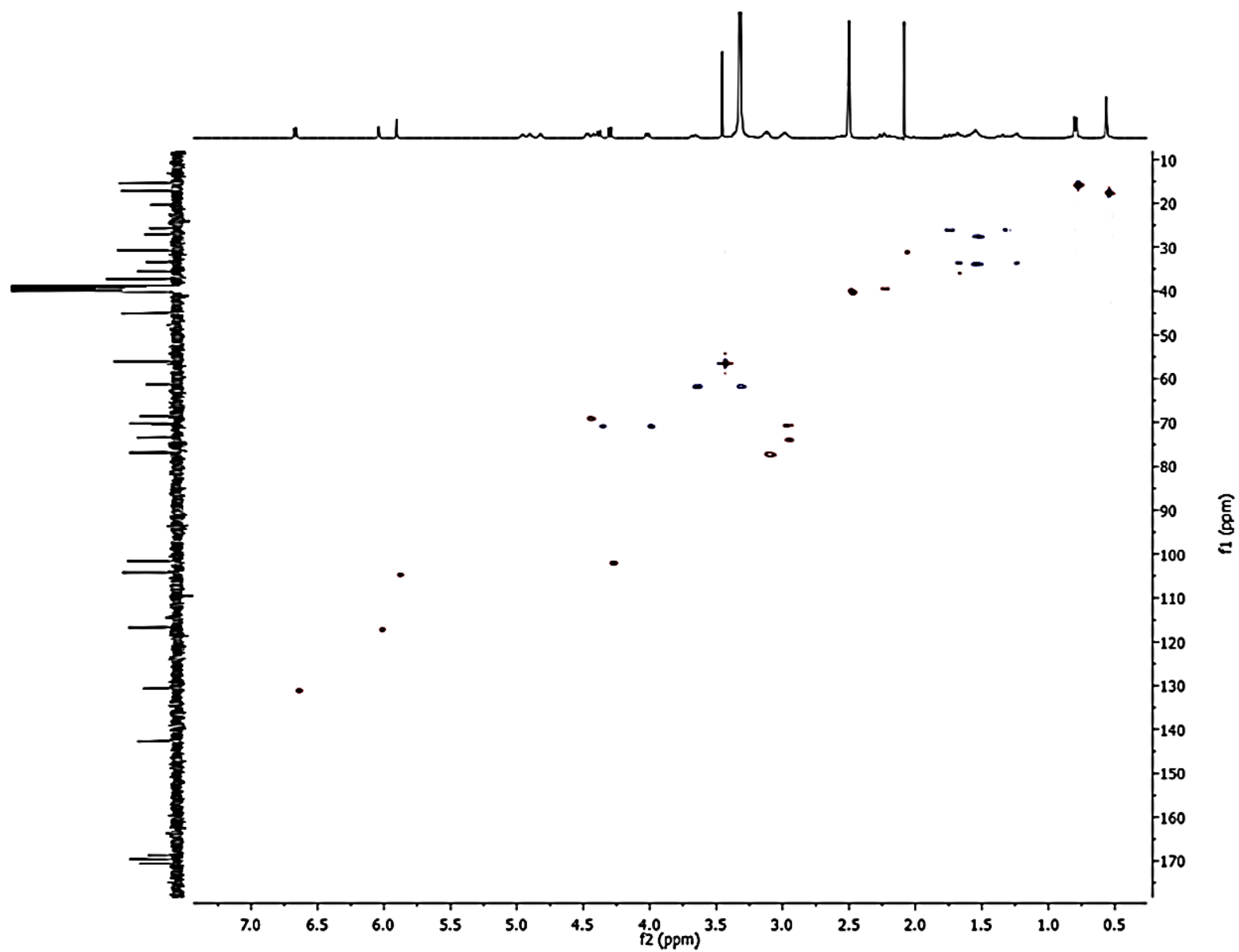


Figura A21. Espectro de HSQC (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de la amarisolida D (15).

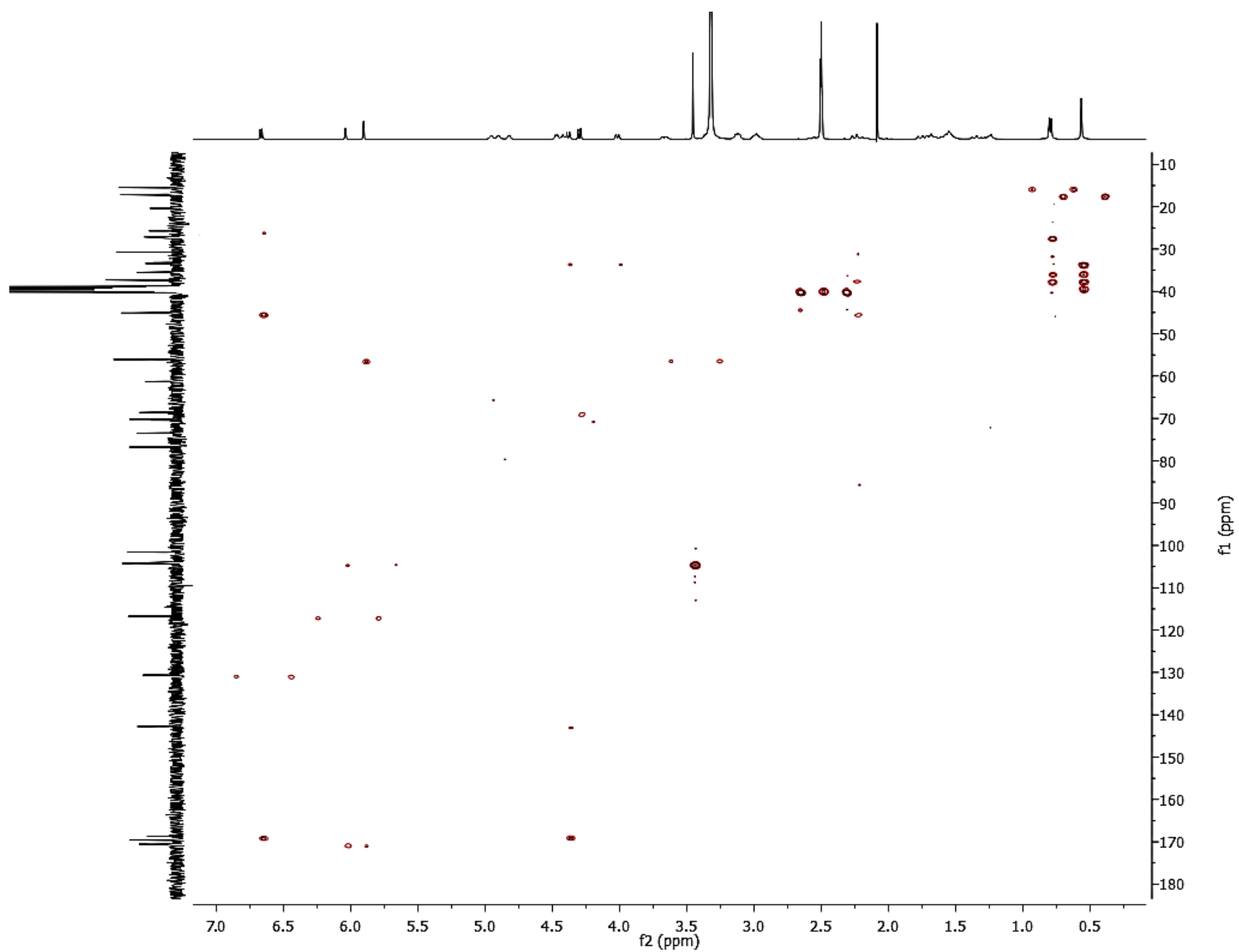


Figura A22. Espectro de HMBC (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de la amarisolida D (**15**).

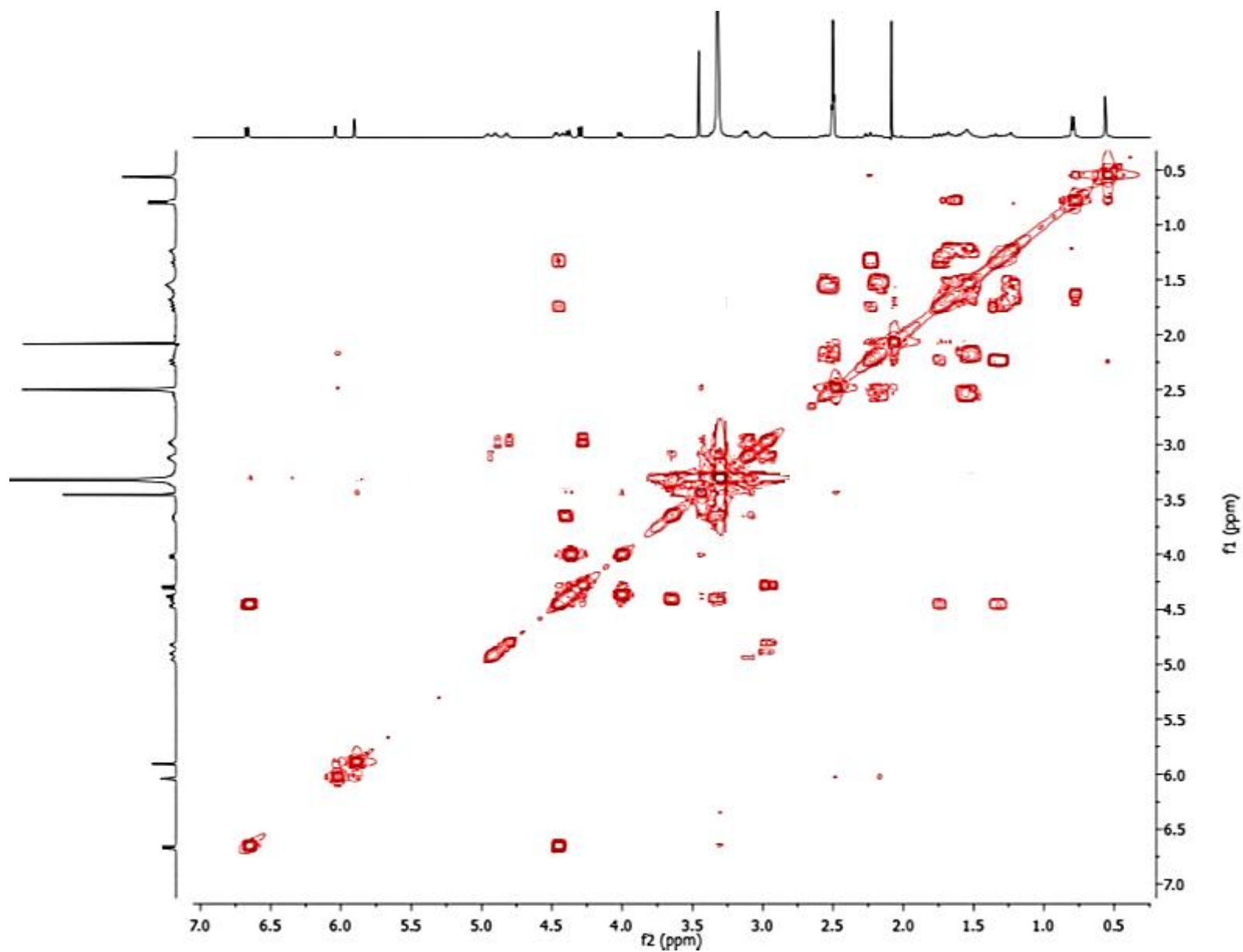


Figura A23. Espectro de COSY (500 MHz, DMSO- d_6) de la amarisólida D (**15**).

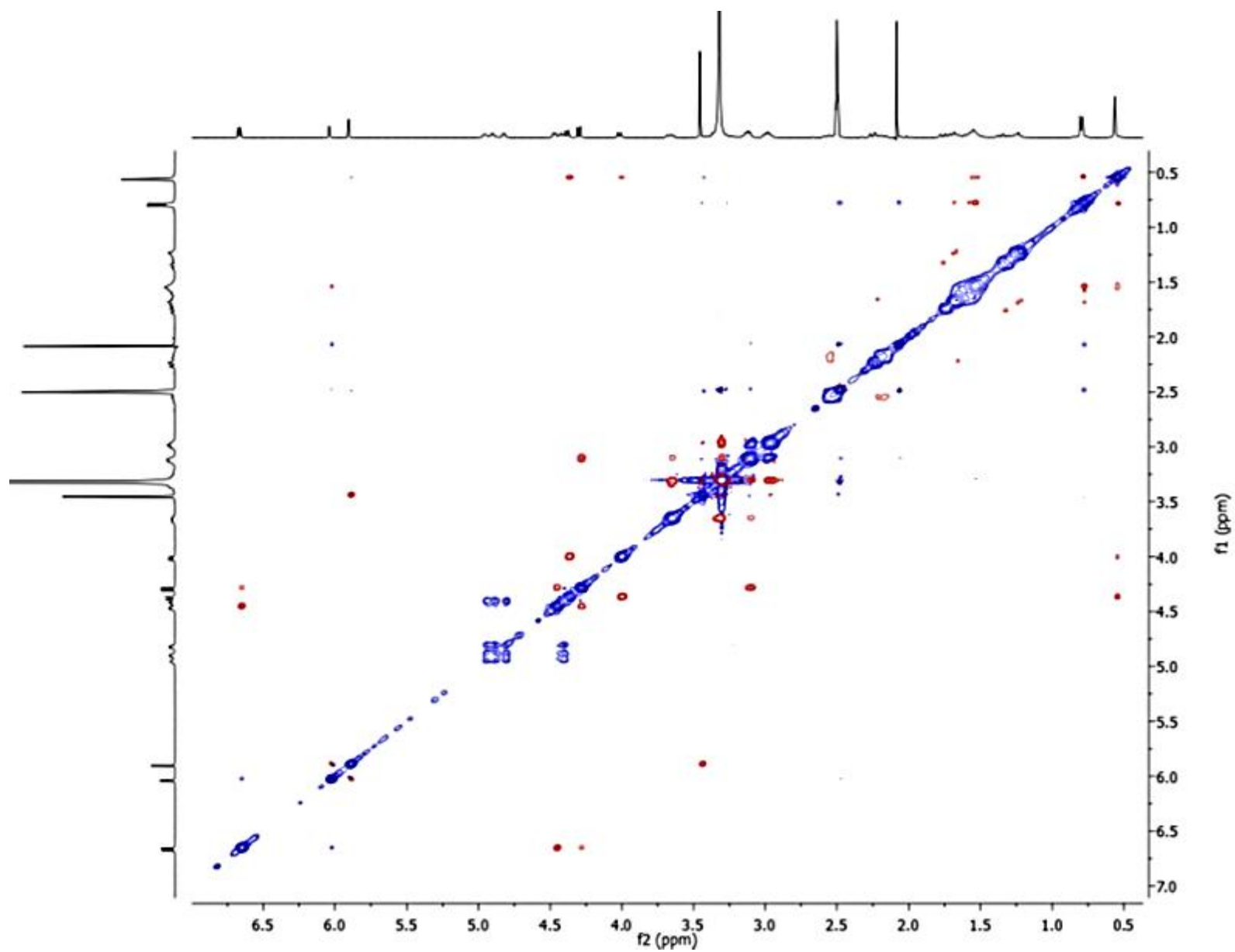


Figura A24. Espectro de NOESY (500 MHz, DMSO- d_6) de la amarisólida D (15).

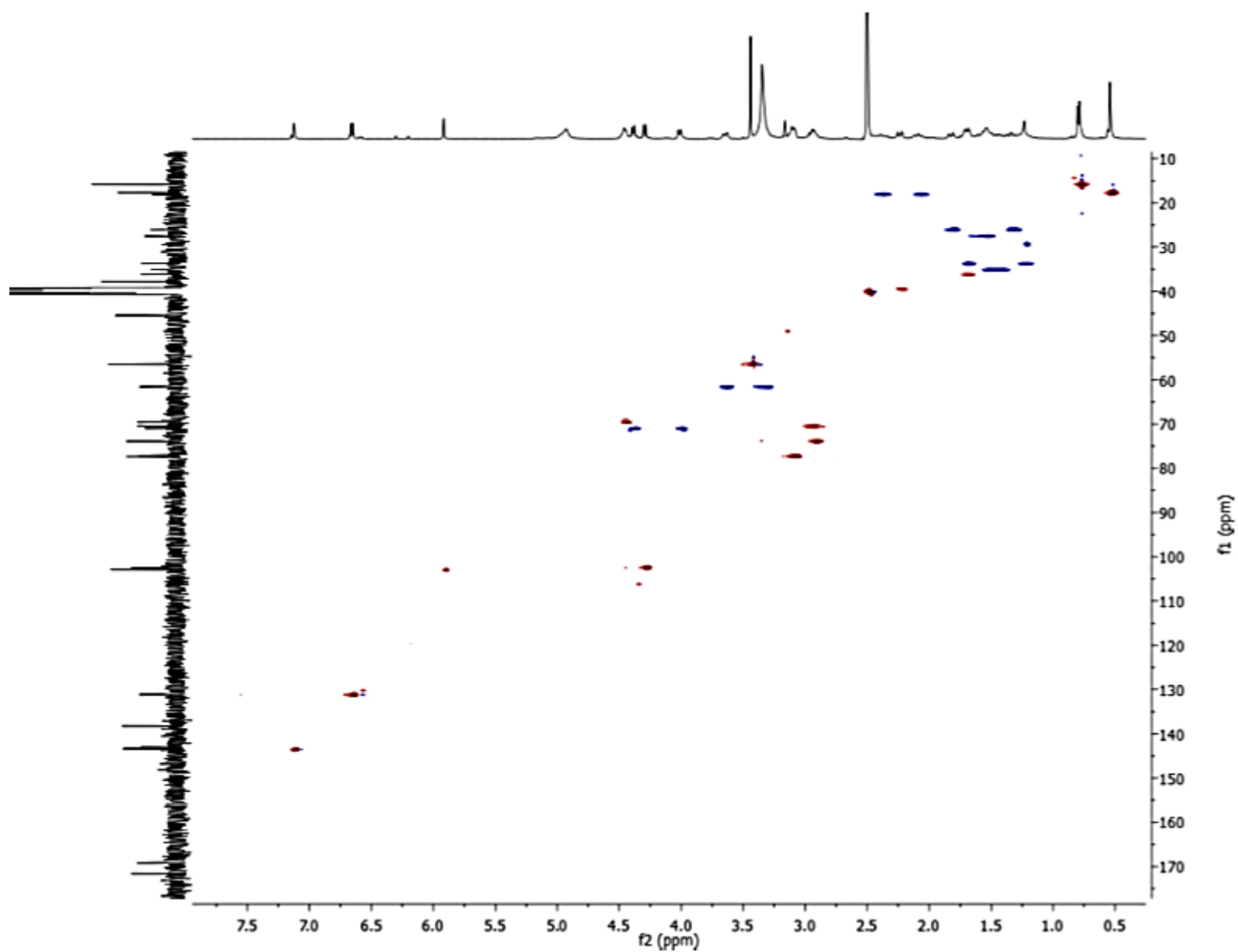


Figura A25. Espectro de HSQC (500 MHz, DMSO- d_6) de la amarisólida E (16).

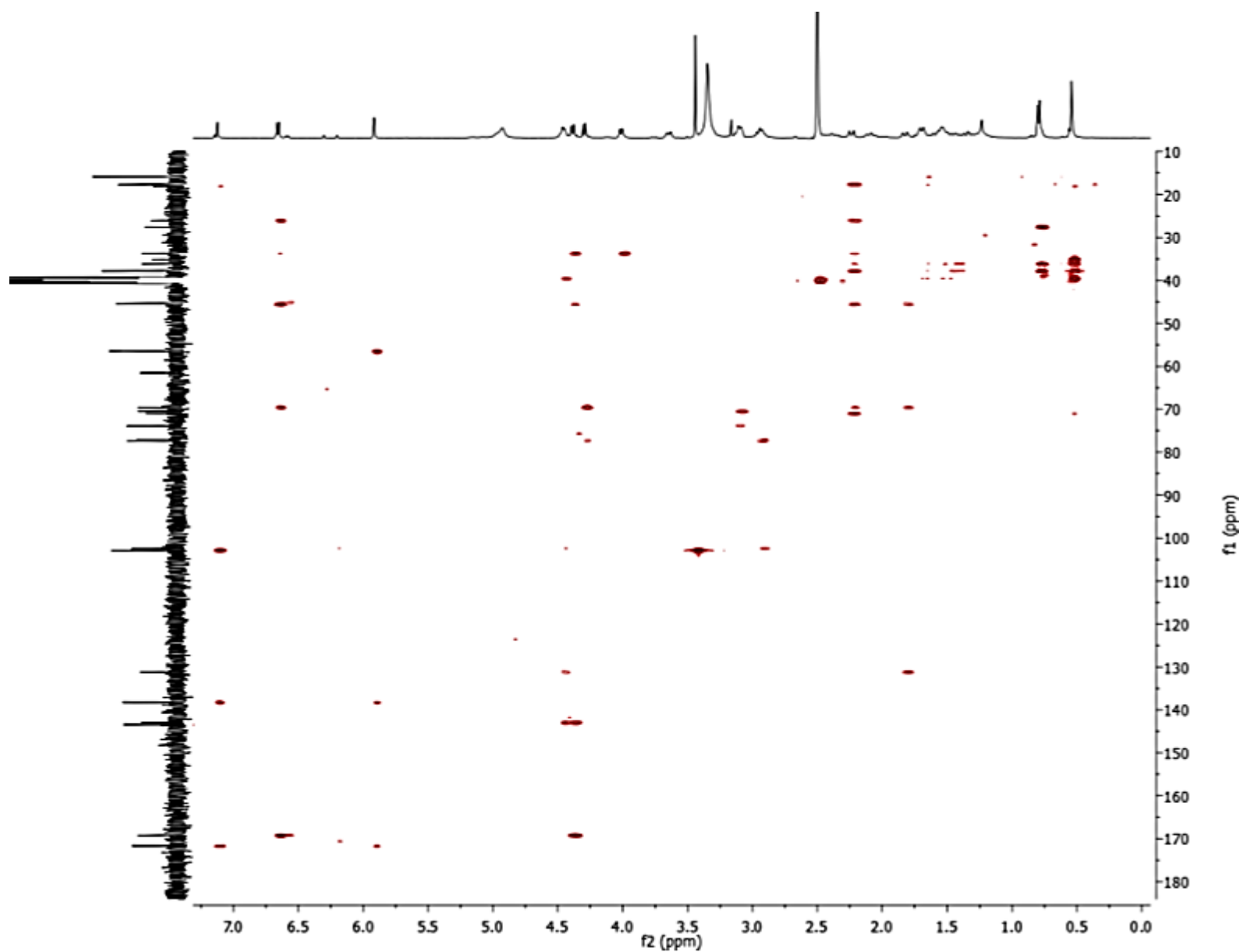


Figura A26. Espectro de HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) de la amarisólida E (16).

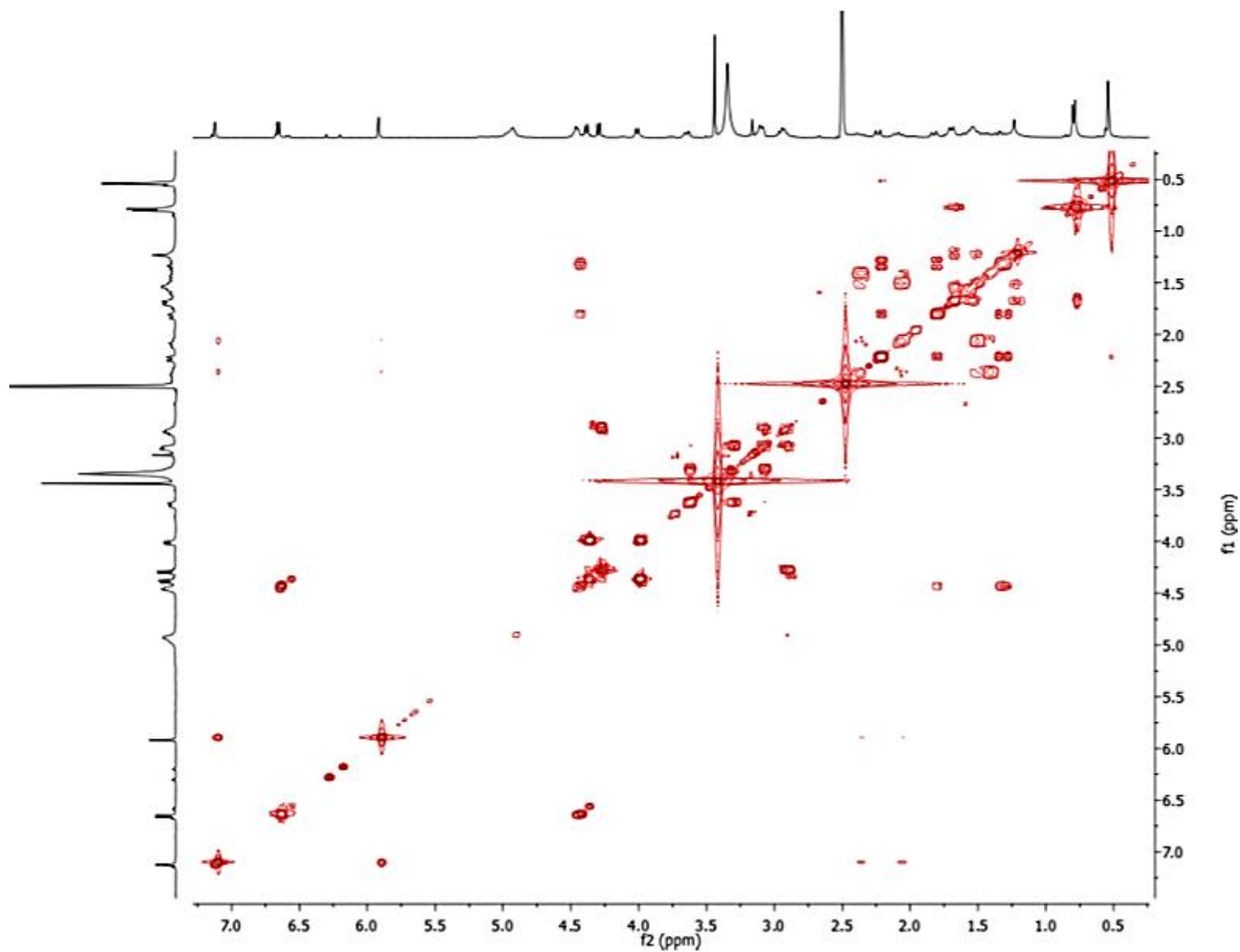


Figura A27. Espectro de COSY (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de la amarisólida E (**16**).

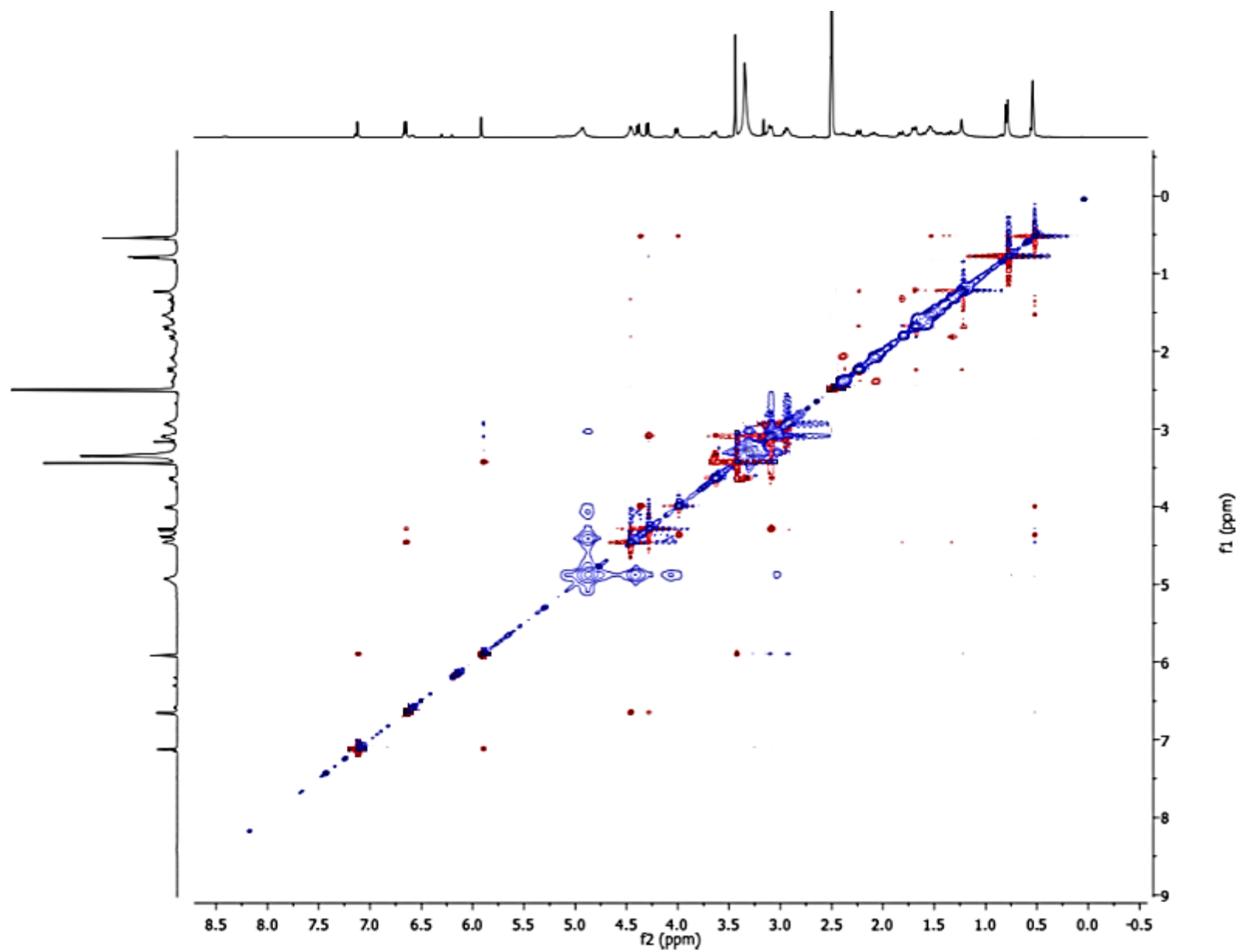


Figura A28. Espectro de NOESY (500 MHz, DMSO-*d*₆) de la amarisólida E (**16**).

Tabla A1. Confórmeros para el cálculo de diroísmo circular para la amarisólida (1).

Confórmero	Energía (Kcal/mol)	ΔG	Fracción molar
1	-676826.6191	0	0.3022867
2	-676826.5438	0.07530108	0.2662056
3	-676826.4754	0.143699561	0.2371787
4	-676826.3379	0.281124032	0.1880756
5	-676823.7846	2.834458153	2.53×10^{-03}
6	-676823.6955	2.923564431	2.17×10^{-03}
7	-676823.1552	3.46384968	8.73×10^{-04}
8	-676822.9776	3.641434727	6.47×10^{-04}
9	-676821.1641	5.454935737	3.03×10^{-05}
10	-676819.6524	6.966604918	2.36×10^{-06}
		Total	0.99999993

Tabla A2. Confórmeros para el cálculo de diroísmo circular para la amarisólida B (13).

Confórmero	Energía (Kcal/mol)	ΔG	Fracción molar
1	-629784.3567	0	0.2434889
2	-629784.3567	0	0.2434889
3	-629784.3102	0.04643574	0.2251324
4	-629784.3077	0.04894578	0.2241806
5	-629783.411	0.94565757	0.0493442
6	-629781.8014	2.55522072	3.26×10^{-03}
7	-629781.8014	2.55522072	3.26×10^{-03}
8	-629781.8008	2.55584823	3.26×10^{-03}
9	-629781.8008	2.55584823	3.26×10^{-03}
10	-629781.2699	3.08672169	1.33×10^{-03}
		Total	0.99999984

Tabla A3. Confórmeros para el cálculo de diroísmo circular para la amarisólida C (14).

Confórmero	Energía (Kcal/mol)	ΔG	Fracción molar
1	-724828.8241	0	0.5060065
2	-724828.2832	0.54091362	0.2030593
3	-724828.1533	0.67080819	0.1630796
4	-724828.009	0.81513549	0.1278192
5	-724823.1552	5.66892534	3.53×10^{-05}
6		Total	0.99999995

Tabla A4. Confórmeros para el cálculo de diroísmo circular para el epiméro 14- α de la amarisólida D (15).

Confórmero	Energía (Kcal/mol)	ΔG	Fracción molar
1	-771281.8566	0	0.7525361
2	-771281.1977	0.65888445	0.247464
		Total	

Tabla A5. Confórmeros para el cálculo de diroísmo circular para el epiméro 14- β de la amarisólida D (15).

Confórmero	Energía (Kcal/mol)	ΔG	Fracción molar
1	-771283.1804	0	0.4727889
2	-771283.1804	0	0.4727889
3	-771281.8997	1.28074791	5.44×10^{-02}
		Total	0.99999998

Tabla A6. Confórmeros para el cálculo de diroísmo circular para el epiméro 15- α de la amarisólida E (16).

Confórmero	Energía (Kcal/mol)	ΔG	Fracción molar
1	-1179219.765	0	0.4589292
2	-1179219.601	0.164407358	0.3477137
3	-1179218.866	0.899220397	0.1005877
4	-1179218.597	1.168421758	6.39×10^{-02}
5	-1179218.128	1.63779849	2.89×10^{-02}
		Total	

Tabla A7. Confórmeros para el cálculo de diroísmo circular para el epiméro 15- β de la amarisólida E (16).

Confórmero	Energía (Kcal/mol)	ΔG	Fracción molar
1	-1179219.975	0	0.9425435
2	-1179217.984	1.991086057	3.27×10^{-02}
3	-1179217.543	2.432224884	1.55×10^{-02}
4	-1179217.208	2.766687181	8.83×10^{-03}
5	-1179215.345	4.630388911	3.80×10^{-04}
		Total	

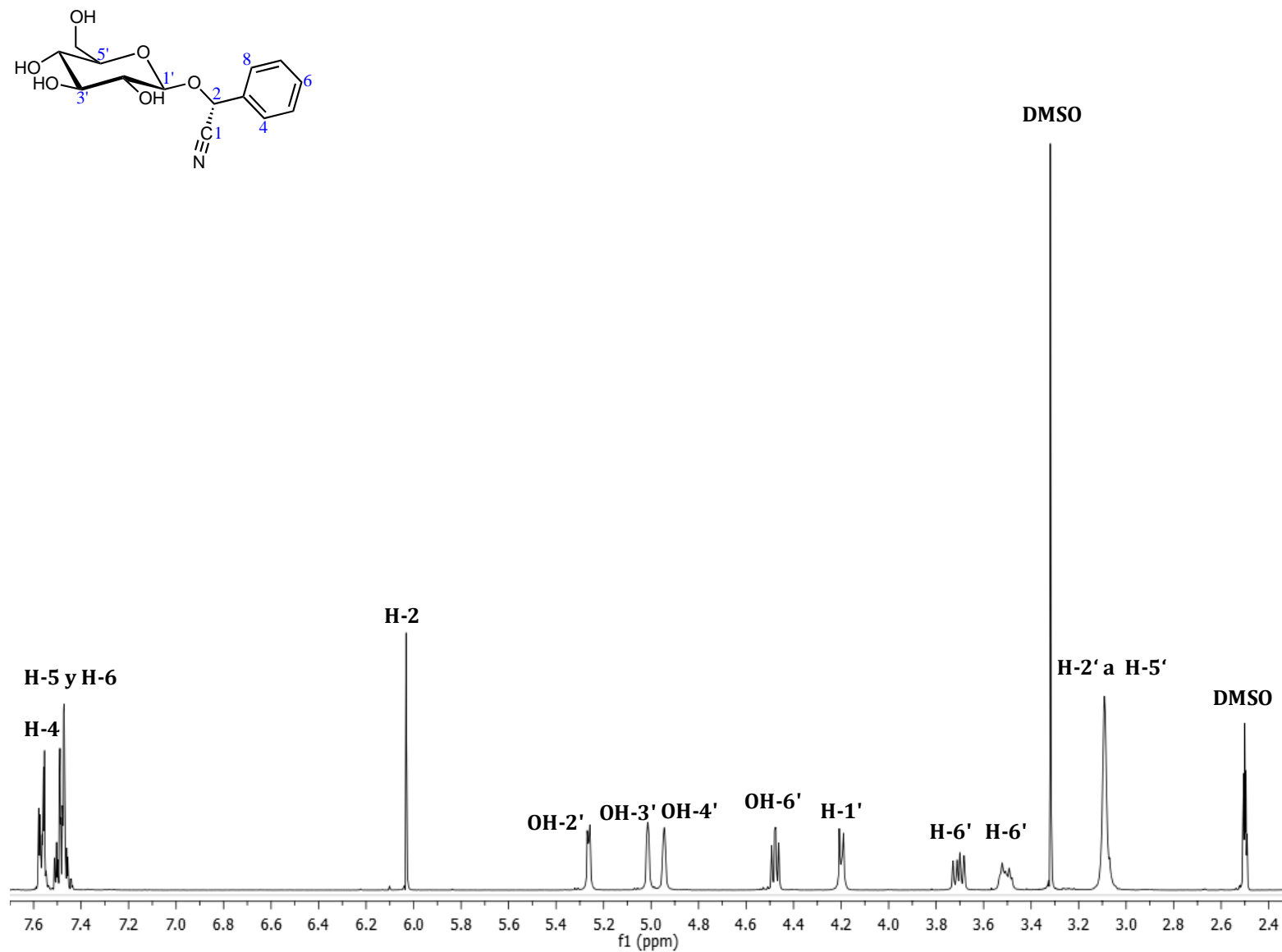


Figura A29. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de prunasina (10).

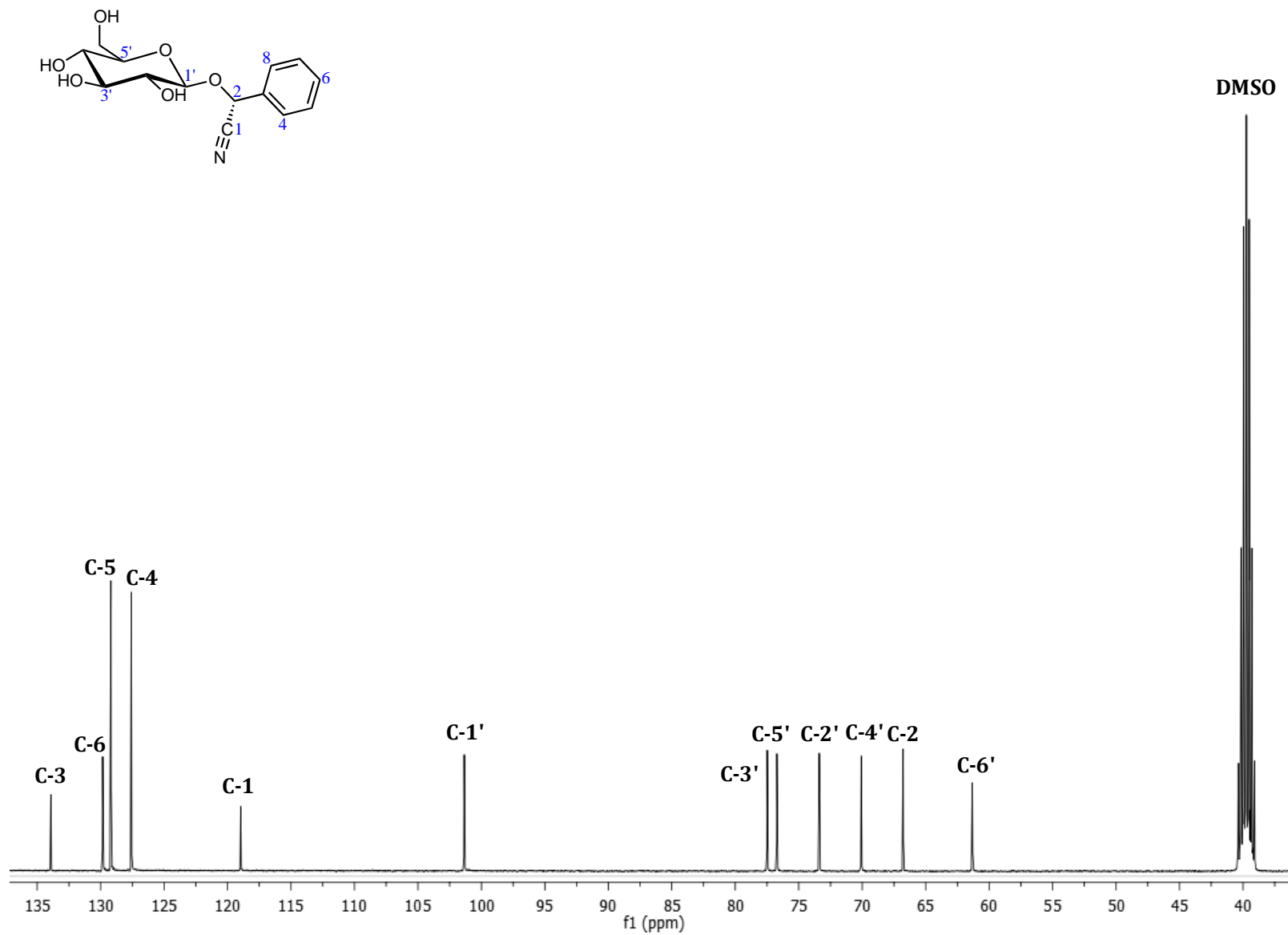


Figura A30. Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de prunasina (10).

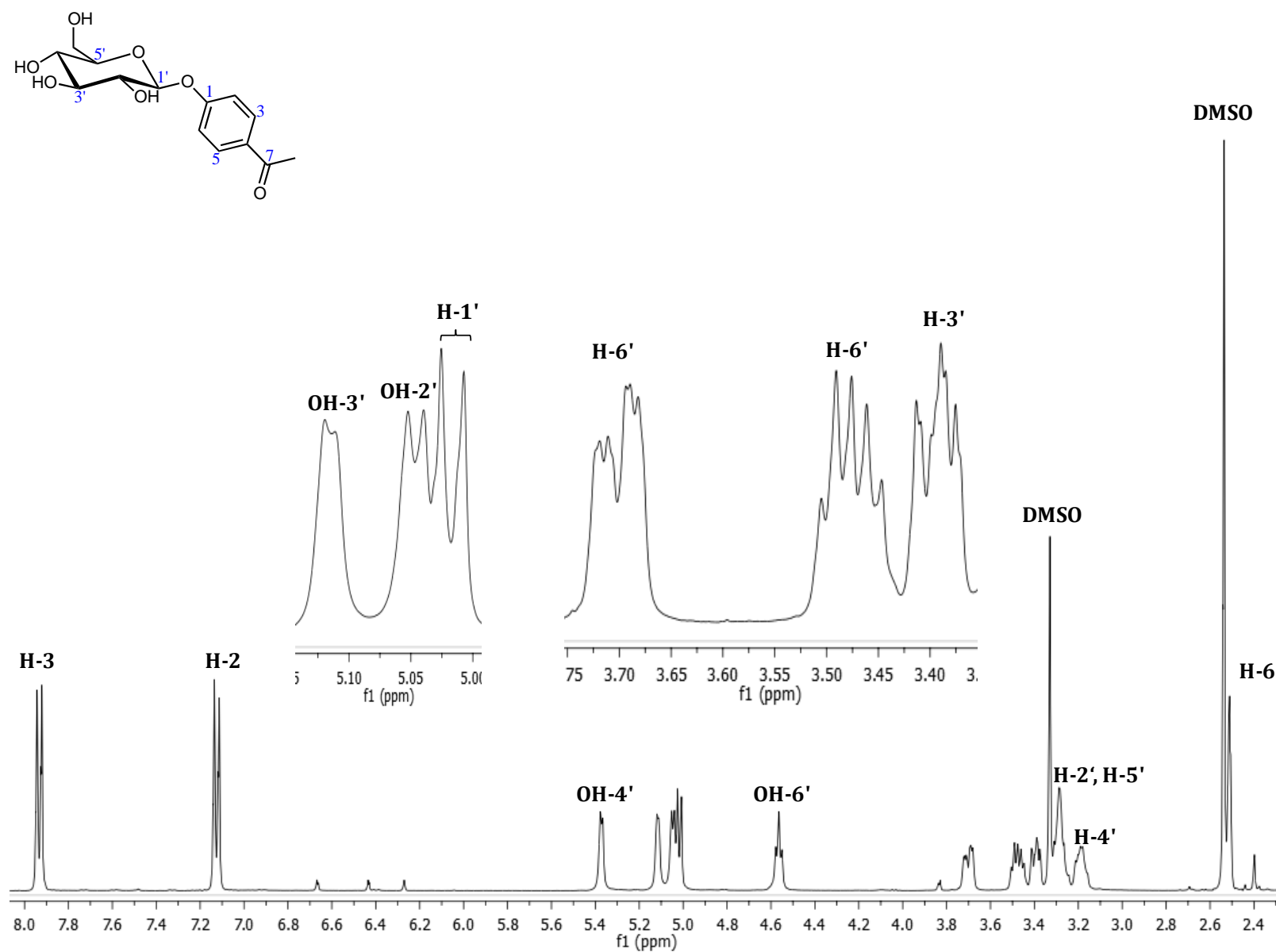


Figura A31. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) de piceína (11).

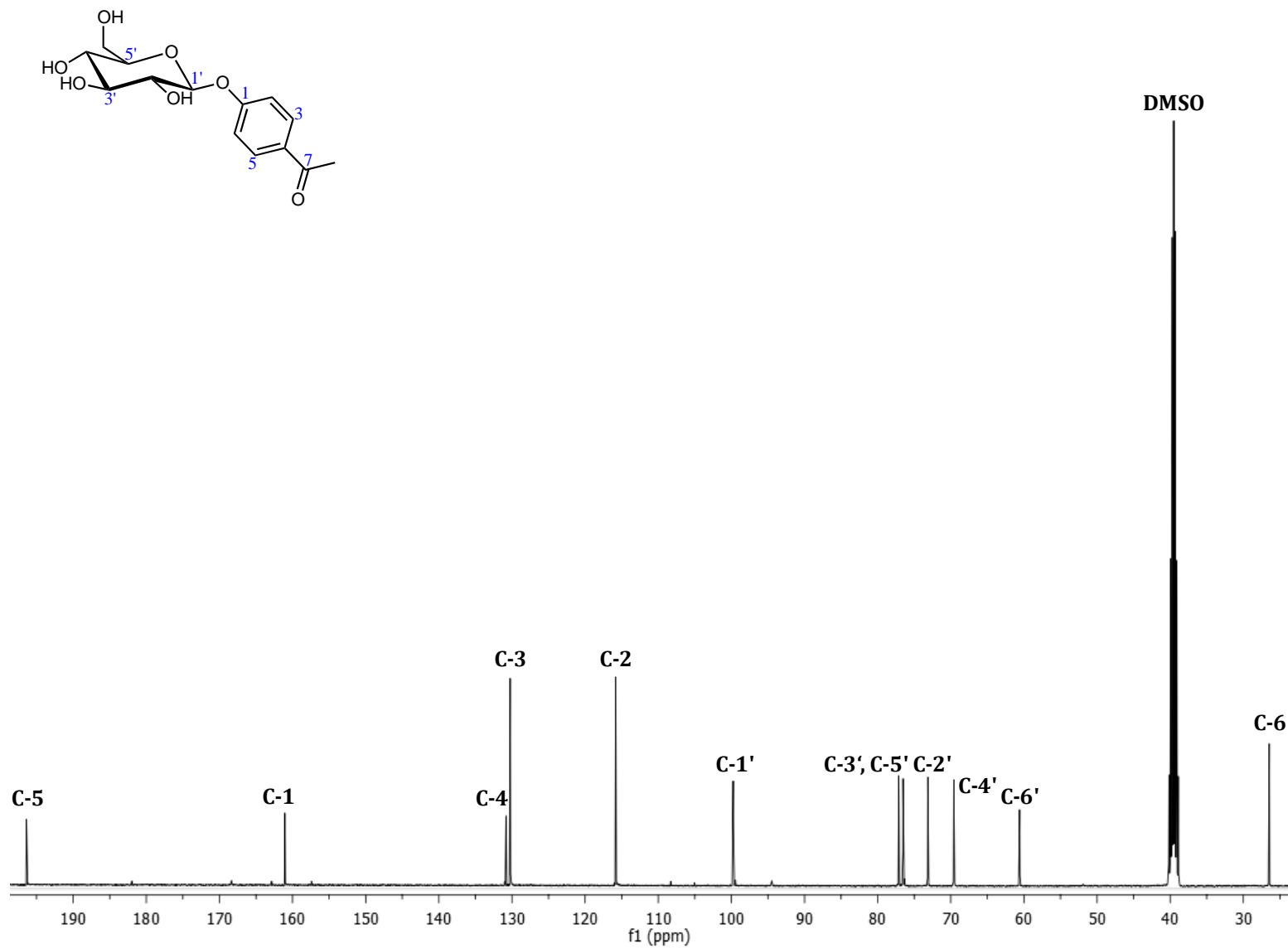


Figura A32. Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD) de piceína (11).

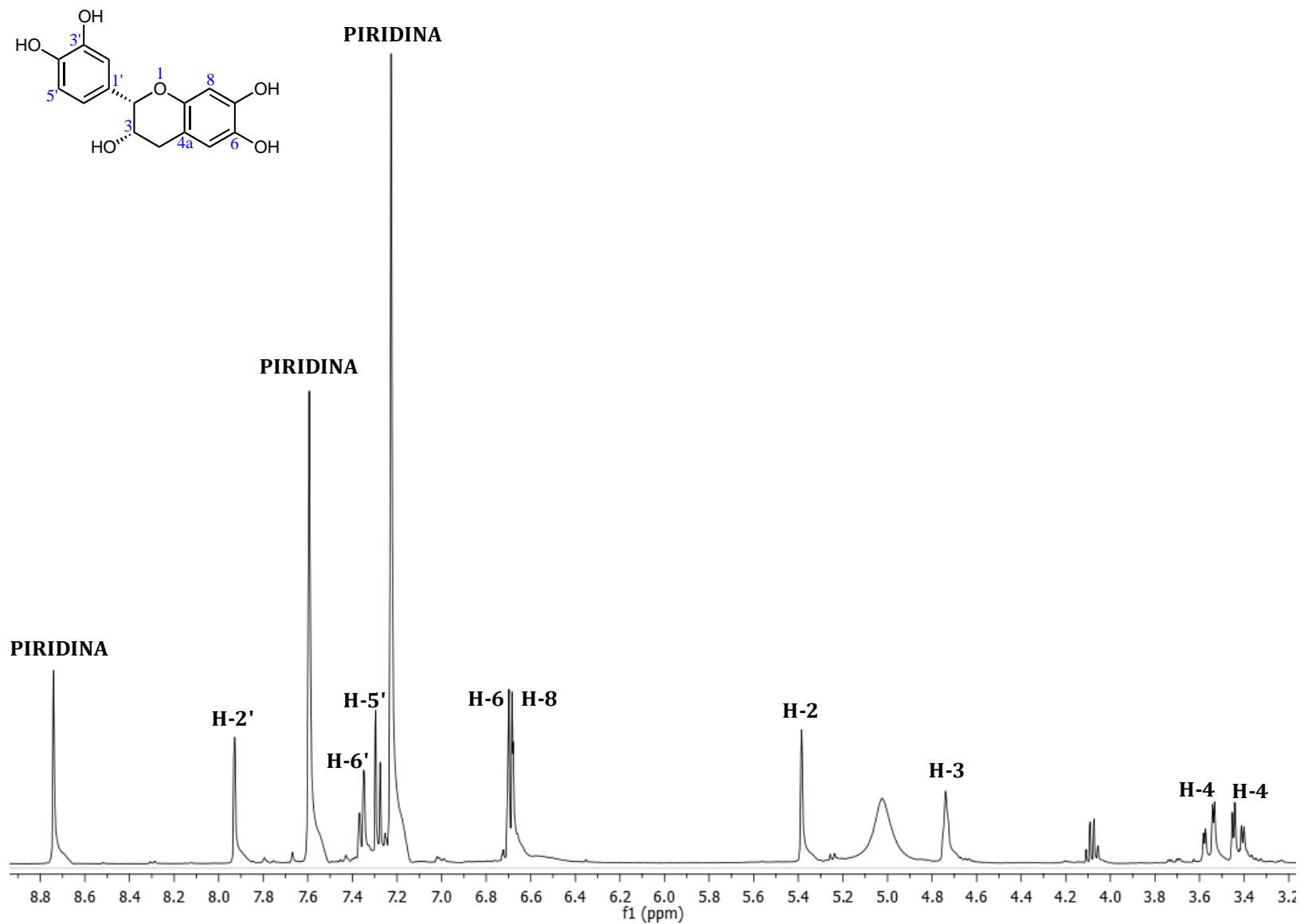


Figura A33. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de (-)-*epi*-catequina (12).

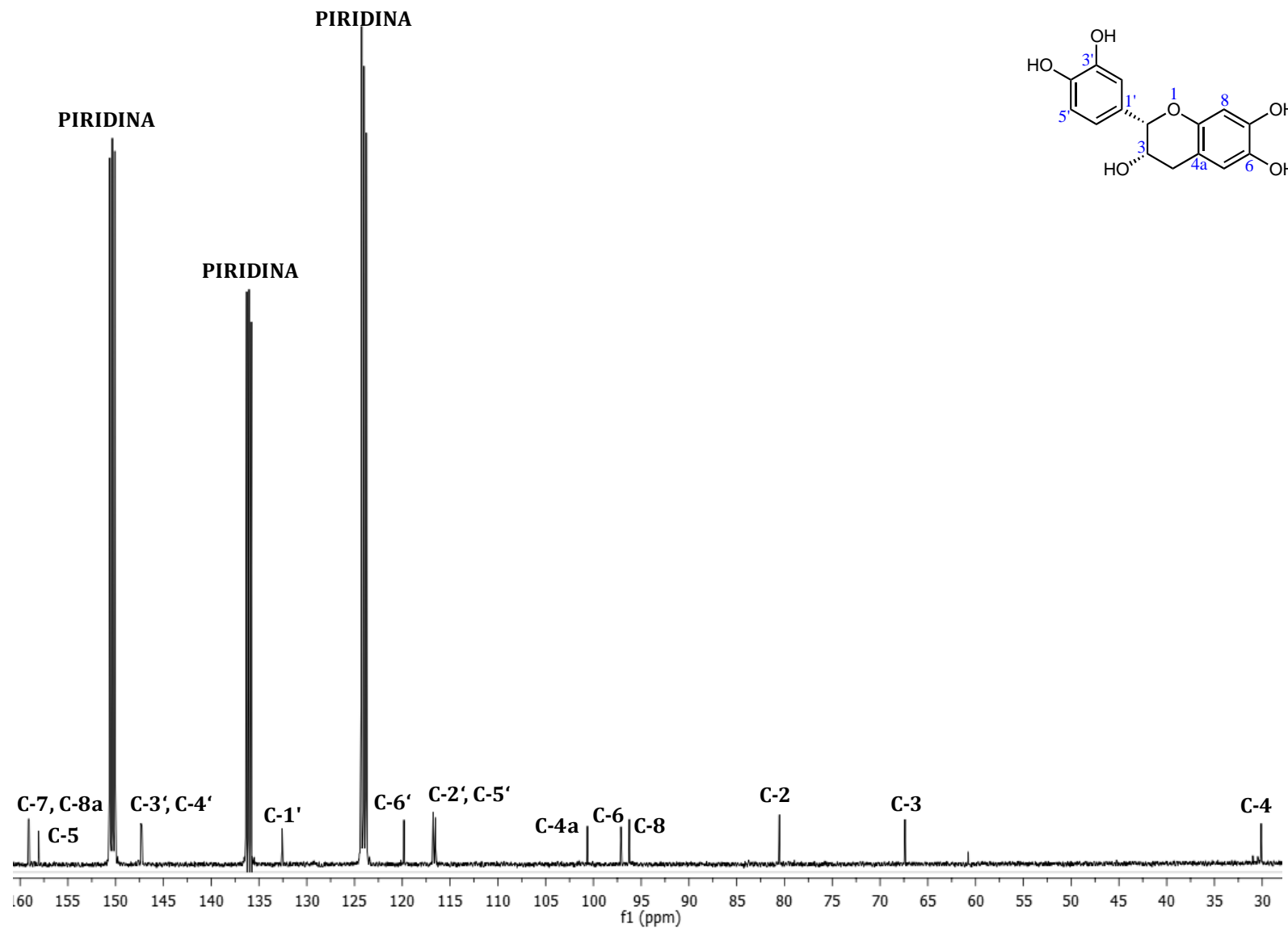
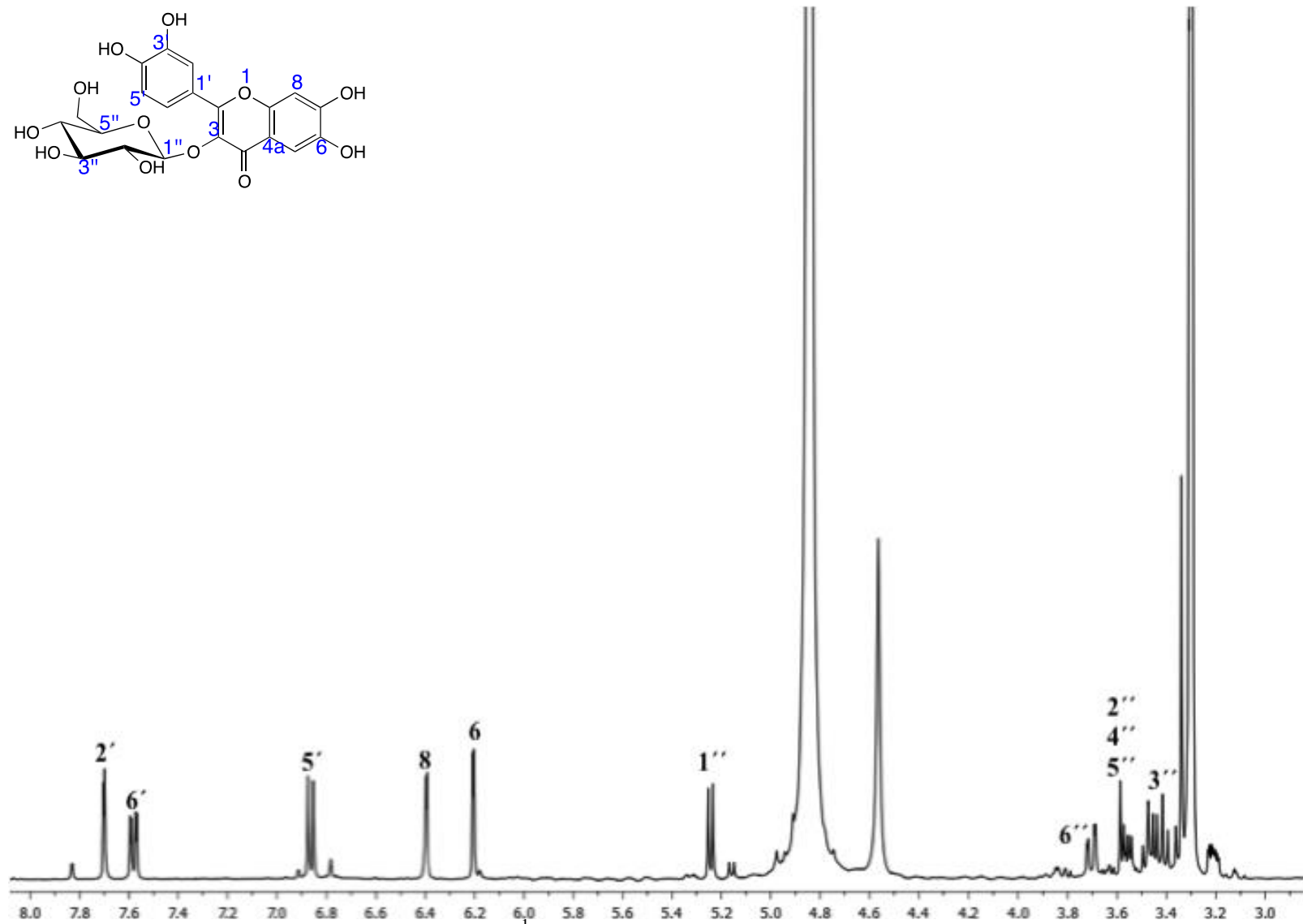


Figura A34. Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de (-)-epi-catequina (12).



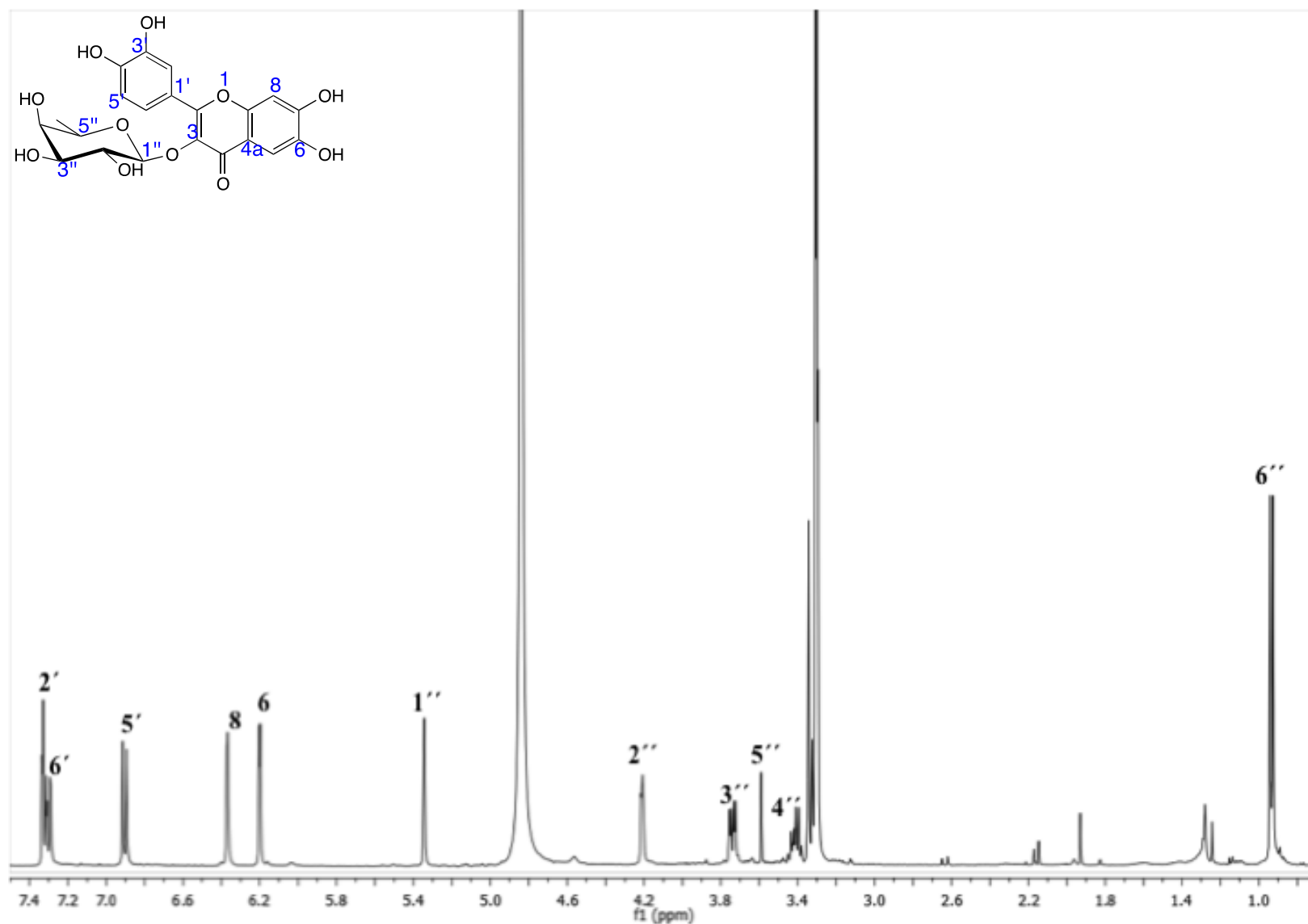


Figura A36. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de quercitrina (22).

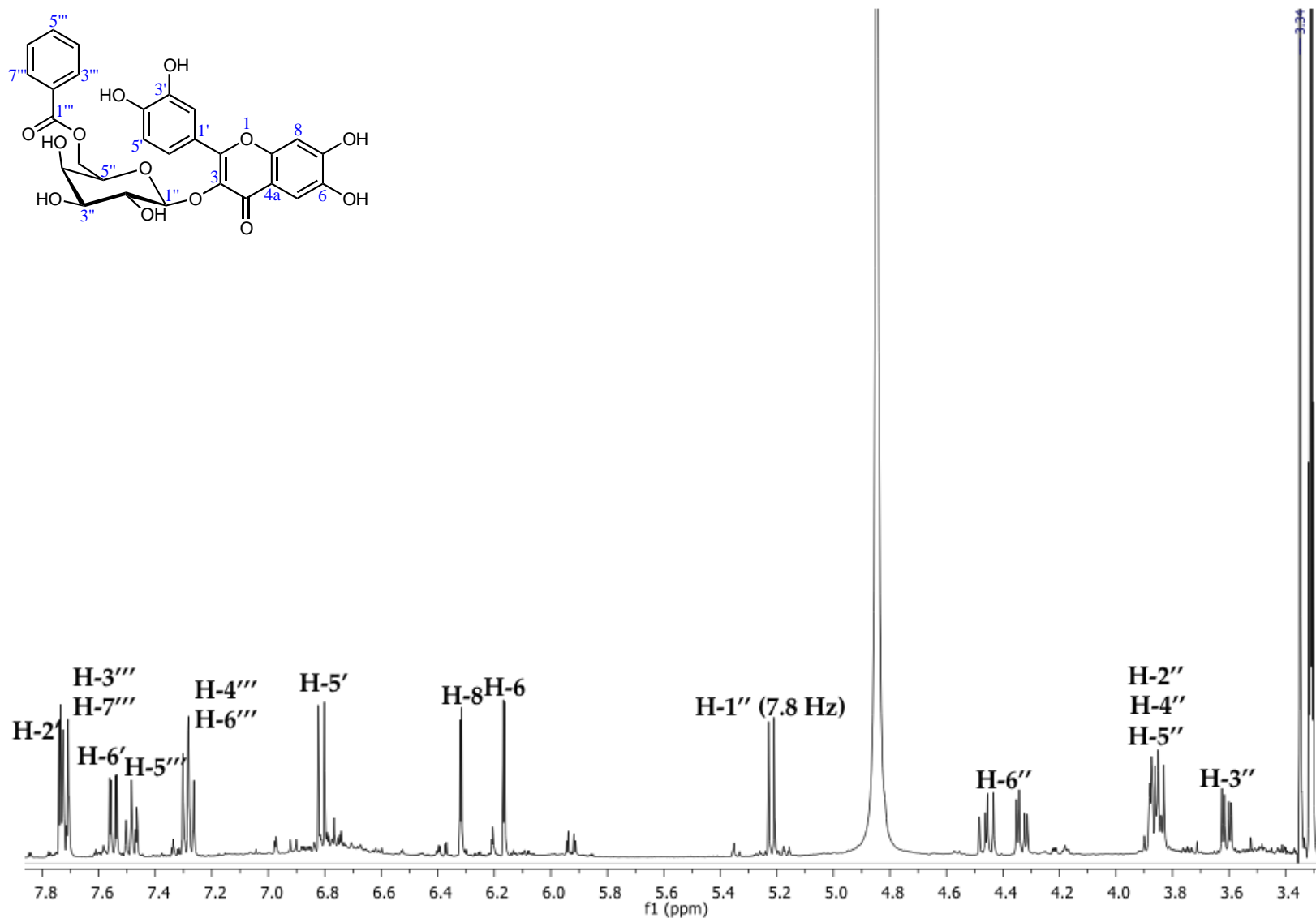


Figura A37. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) del quercetin-3-*O*-(6''-benzoyl)-β-galactósido (23).

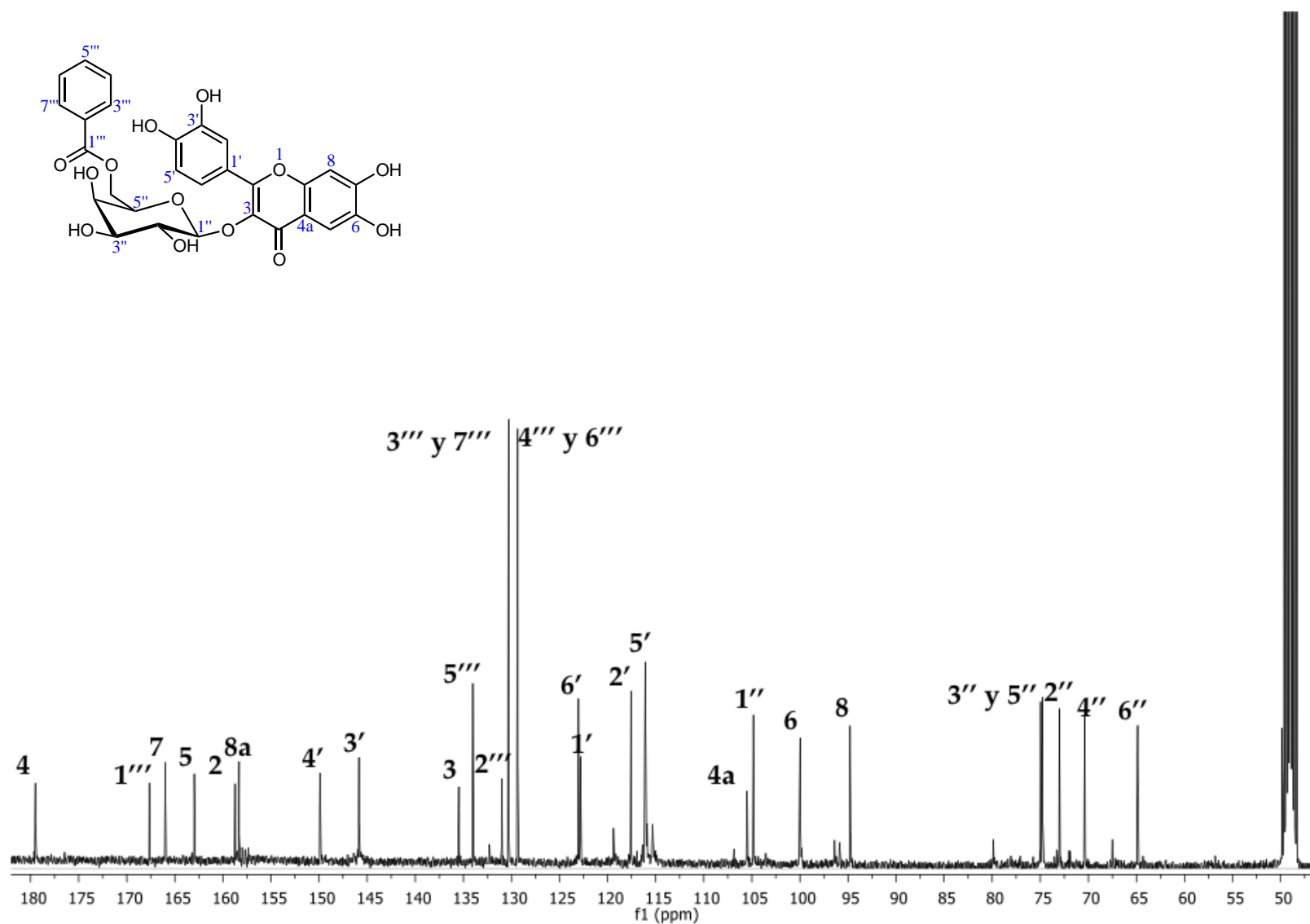


Figura A38. Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) del quercetin-3-*O*-(6''-benzoyl)-β-galactósido (23).

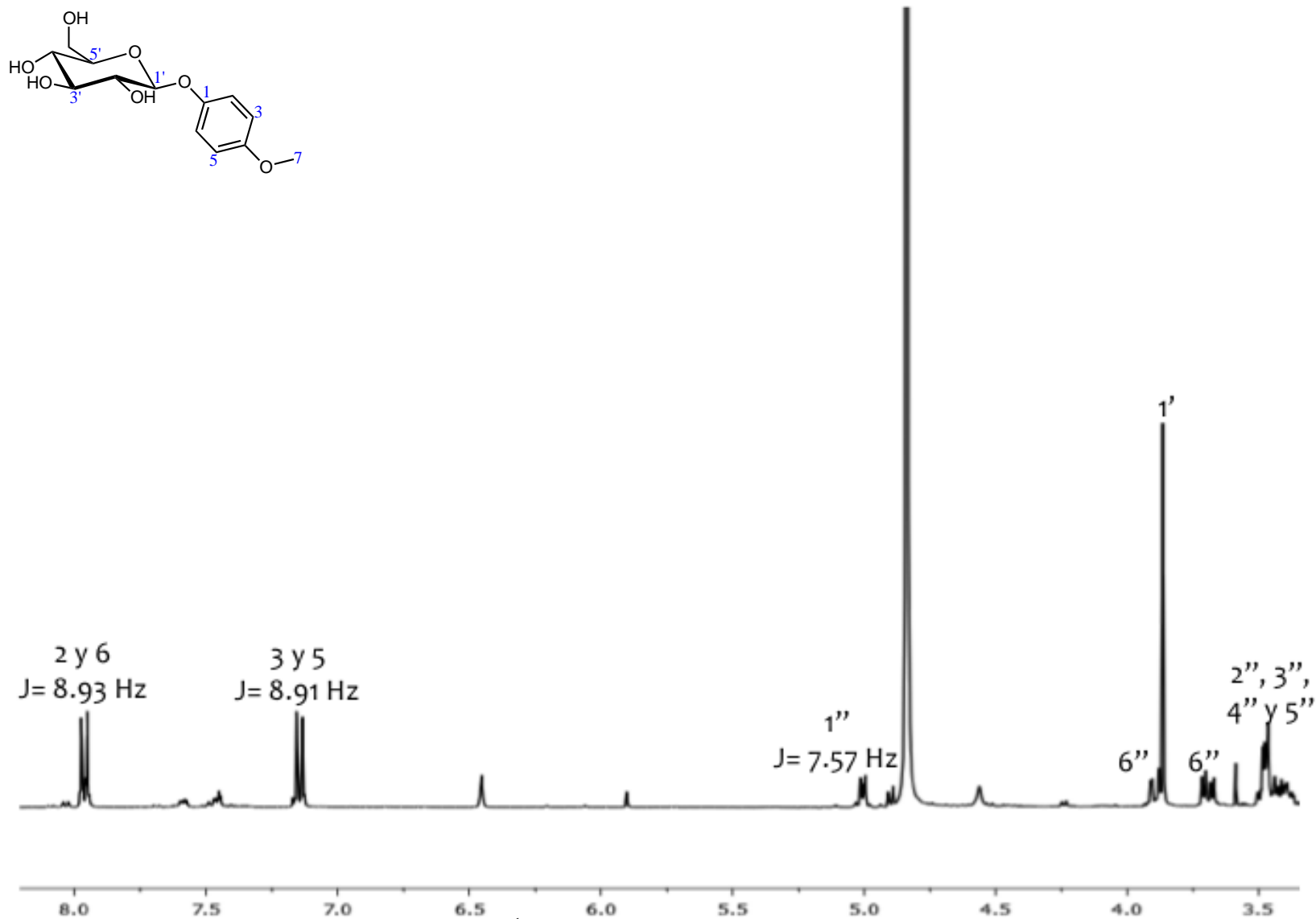


Figura A39. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) de metilarbutina (24).

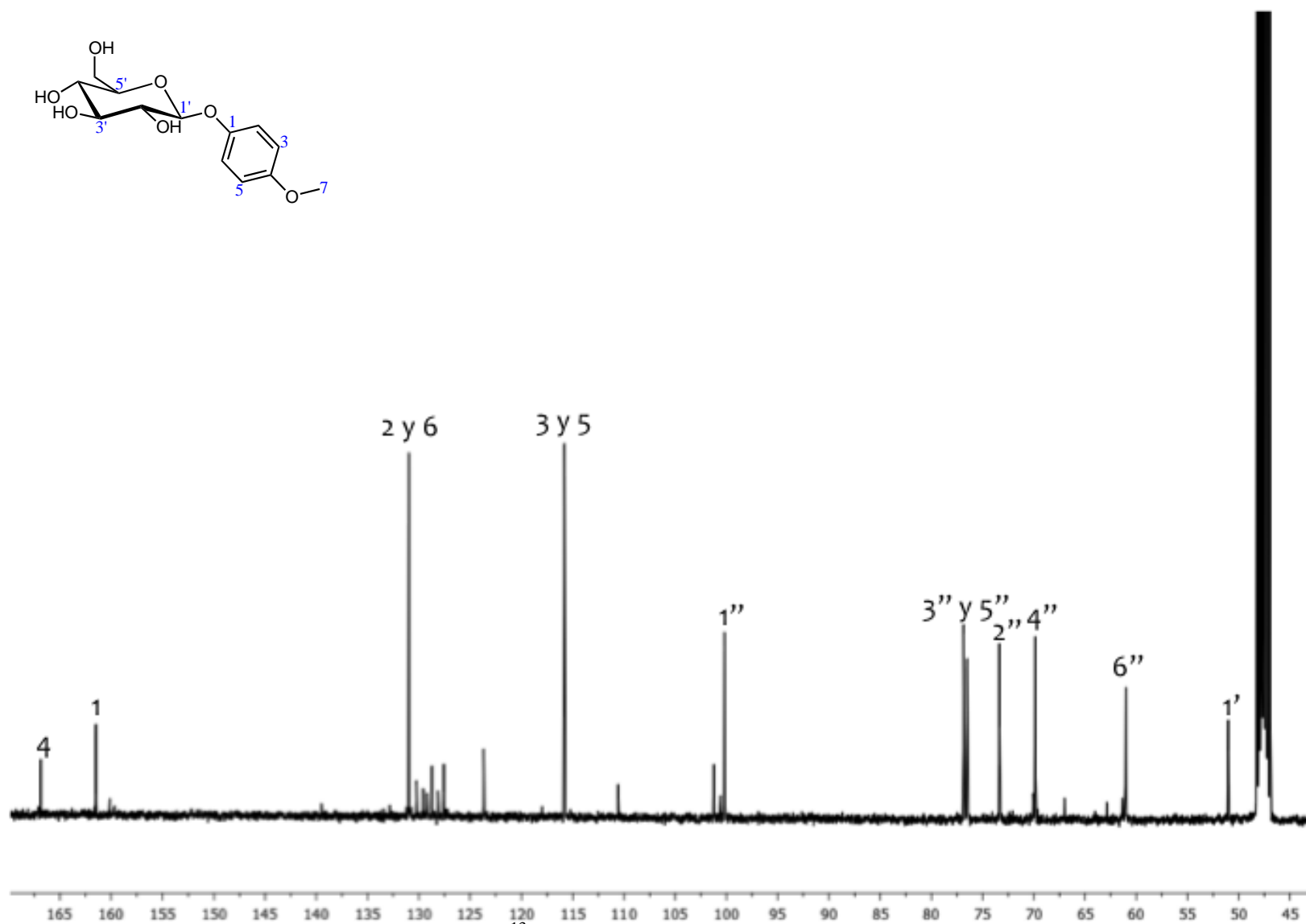


Figura A40. Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD) de metilarbutina (24).

Potencial antidiabético de la perfoliatina A, metabolito secundario de la especie vegetal *Melampodium perfoliatum* Cavanilles (Asteraceae).

Introducción

El género *Melampodium* (Asteraceae) fue descrito por Carlos Lineo en el año 1753; y comprende aproximadamente 40 especies. Son plantas herbáceas perennes o anuales nativas de las regiones tropicales y subtropicales del norte y sur del continente Americano, y sobre todo se distribuyen en México, Colombia y Brasil.^{1,2} La composición química de este género esta representada por lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, monoterpénicos derivados de timol, y diterpenoides. Las lactonas sesquiterpénicas son los productos más característicos del género y estas pertenecen principalmente a los tipos germacranólidas y melampólidas.³⁻⁵

En el presente apartado se describe de manera somera un estudio de la especie *Melampodium perfoliatum* Cavanilles (Asteraceae), planta Mexicana que carece de usos medicinales pero que biosintetiza una gran variedad de melampolidas.³ En estudios previos en nuestro grupo de trabajo.⁶⁻⁹ se demostró que este tipo compuestos inhiben las enzimas α -glucosidasas. Así con base en un criterio netamente quimiotaxonomico se decidió evaluar el efecto potencial de la lactona mayoritaria de la especie contra las enzimas α -glucosidasas *in vitro* y en una prueba de tolerancia a la sacarosa *in vivo*.

Desarrollo experimental.

Métodos generales. El análisis de muestras por cromatografía en capa delgada (CCD) se realizó utilizando placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas con gel de sílice 60 F₂₄₅ (Merck, NJ, E.U.A.) empleando distintos sistemas de elución. Para la visualización de las placas, se utilizó una lámpara en el UV (a las longitudes de onda de 254 y 365 nm), y como agente revelador una solución de sulfato cérico amoniacal al 10% en ácido sulfúrico [12 g de Ce₂(SO₄)₃ en 22.5 mL de H₂SO₄ y 350 g de hielo]; para desarrollar el color las placas se calentaron a 110°C

aproximadamente por un minuto. Los análisis por cromatografía en columna abierta (CCA) se llevaron a cabo en columnas de vidrio de distintas dimensiones empacadas con Sephadex® (LH-20; Sigma-Aldrich-Fluka, MO, E.U.A.) o con gel de sílice 60 (0.063-0.200; Merck, NJ, E.U.A.), empleando diversos sistemas de elución y aplicando las técnicas convencionales.

Material vegetal. Las hojas y flores de la especie *Melampodium perfoliatum* fueron colectadas en Cuernavaca, Morelos en Agosto del 2015. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario Nacional (MEXU). El material vegetal se dejó secar al aire libre y para la preparación de los extractos se utilizó sin moler.

Estudio químico: Preparación y fraccionamiento preliminar del extracto acuoso de *M. perfoliatum*. El extracto acuoso se preparo a partir de las hojas y flores secas de *M. perfoliatum*, para ello 9 g del material vegetal se pusieron en contacto con 250 ml de agua a ebullición durante 20 min. Al cabo de este tiempo, la infusión se filtró y se concentró a sequedad, de este proceso se obtuvieron 140 mg del extracto acuoso utilizados para ensayos biológicos. Posteriormente, a partir de 1 kg de planta se prepararon 2.8 l de infusión siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, esta vez la infusión resultante se sometió a un fraccionamiento preliminar por reparto usando CH₂Cl₂ (3 × 2.8 l), ambas fracciones, acuosa y orgánica, se reunieron y se concentraron a sequedad para obtener 2.8 g de la primera 3.3 g de la segunda.

Purificación y caracterización del producto mayoritario de la infusión de *M. perfoliatum*. La fracción orgánica de la infusión de *M. perfoliatum* (3.0 g) se resolvió utilizando la técnica de CCA en Sephadex® (300 ml) utilizando como disolvente CH₃OH. De este procedimiento se logró el aislamiento de 220.0 mg del metabolito mayoritario presente en el extracto, éste producto se caracterizo como perfoliatina A (**25**), el metabolito mayoritario de la especie.³

Perfoliatina A (25): Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 6.92 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-1), 6.27 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, H-8), 6.23 (1H, d, *J* = 3.2 Hz, H-13a), 6.13 (1H, dd, *J* = 7.2, 1.2 Hz, H-3'), 5.66 (1H, d, *J* = 3.2 Hz, H-13b), 5.32 (1H, dq, *J* = 10.0, 1.6 Hz, H-5),

5.21 (1H, t, $J = 10.0$ Hz, H-6), 4.04 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-9), 3.63 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-3), 3.62 (1H, dd, $J = 3.6, 2.4$ Hz, H-2), 2.59 (1H, dd, $J = 10.0, 1.6$ Hz, H-7), 2.09 (3H, d, $J = 1.6$ Hz, H-15), 1.99 (3H, dq, $J = 7.2, 1.2$ Hz, H-4'), 1.91 (3H, q, $J = 1.2$ Hz, H-5'); ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) δ_c (ppm): 169.0 (C-12), 167.7 (C-14), 167.4 (C-1'), 140.4 (C-3'), 134.8 (C-1), 134.5 (C-10), 134.4 (C-11), 131.1 (C-4), 126.6 (C-2'), 122.9 (C-5), 120.9 (C-13), 75.7 (C-6), 72.0 (C-9), 70.8 (C-8), 60.3 (C-3), 56.3 (C-2), 50.7 (C-7), 20.5 (C-5'), 17.2 (C-15), 15.9 (C-4').

Evaluación de la actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas. Para la evaluación del efecto inhibitorio se utilizaron las enzimas α -glucosidasas de rata y de *R. obeum*. El extracto acuoso total, el producto **25** y el control positivo se disolvieron en buffer de fosfatos (100 mM, pH =7) o en una mezcla de DMSO-Buffer (20:80), hasta obtener una concentración de 10,000 ppm para el extracto y de 30 mM para el compuesto puro. El procedimiento experimental y al análisis de resultados se realizó tal cual se describe en el inciso 4.5.1.1 de esta tesis.

Determinación de los parámetros cinéticos de la inhibición. Para el estudio de cinética enzimática se utilizó la enzima de *R. obeum* y diferentes concentraciones de la perfoliatina A (**25**). Se construyeron curvas de saturación por sustrato en un intervalo de concentraciones de 0-12 mM de *p*NPG. Los resultados obtenidos se analizaron siguiendo lo anteriormente descrito en el inciso 4.5.1.2.

Estudios farmacológicos *in vivo*. Para la realización de los estudios farmacológicos *in vivo* se utilizaron ratones macho de la cepa ICR, con edad entre 3-4 semanas y peso corporal entre 25-30 g, adquiridos a través de Envigo México RMS (Ciudad de México, México). Los animales de experimentación se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, en ambiente controlado a una temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo de luz y oscuridad de 12/12h, con acceso libre al agua y alimento estándar. Todos los protocolos experimentales se realizaron en conformidad con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Salud Animal (NOM-062-ZOO-1999) y con los lineamientos internacionales para el uso y cuidado de animales de experimentación. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional

para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, y FQ/CICUAL/132/16 (Ensayos del efecto hipoglucemiante agudo y antihiperoglucemiante).

Toma de muestras de sangre. La toma de muestras se realizó mediante una incisión en la cola de los ratones para recolectar la sangre de la vena caudal. La concentración de la glucosa sanguínea (mg/dl) se determinó por el método de la glucosa-oxidasa en un glucómetro comercial (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, E.U.A.). El cálculo de el % de variación de glucosa se realizó mediante la fórmula que se indica en el inciso 4.5.2.3.1.

Inducción experimental de hiperglucemia. Para la inducción de diabetes experimental se utilizó el modelo de nicotinamida-estreptozotocina, siguiendo el procedimiento descrito en el inciso 4.5.2.3.2.

Evaluación del efecto antihiperoglucémico durante una curva de tolerancia a la sacarosa (CTS). Mediante la CTS se determinó el efecto antihiperoglucémico de la perfoliatina A (**25**), administrando por vía *o.p.* dosis fijas de 3.16, 10.0 y 31.6 mg/kg de **25**. La evaluación se realizó en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos siguiendo las mismas condiciones experimentales descritas en el inciso 4.5.2.3.5 del presente trabajo.

Análisis estadísticos. Los datos se expresan como el promedio \pm la desviación estándar. La estimación de la diferencia estadística significativa se calculó mediante un análisis de varianza (ANADEVA) de dos vías seguido de un análisis *post-hoc* de Bonferroni. Para los cálculos se utilizó el programa GraphPad Prism (version 5.0, GraphPad Inc., La Jolla, CA, E.U.A)

Resultados y discusión

Este anexo de la tesis se realizó con el propósito de analizar si las melampolidas melampólicas presentes en *M. perfoliatum* también son activas contra las α -glucosidasas.⁶⁻⁹ Así entonces, en primer lugar se evaluó *in vitro* el extracto acuoso de la especie utilizando las

enzimas α -glucosidasas de raspado intestinal de ratas. Los resultados de esta evaluación (Figura A41) muestran que el extracto tiene la capacidad de inhibir la actividad enzimática de manera dependiente de la concentración con un valor de CI_{50} de $958.2 \pm 31.07 \mu\text{g/ml}$. Este resultado positivo permite inferir que efectivamente las lactonas sesquiterpénicas presentes en la especie podrían tener un efecto potencial como agentes antihiper glucémicos.

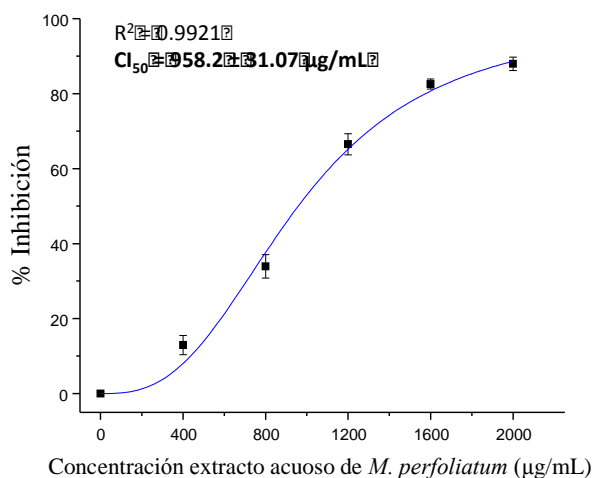


Figura A41. Curva de inhibición del extracto acuoso de *M. perfoliatum* sobre las enzimas α -glucosidasas de rata.

Posteriormente, se realizó el estudio químico del extracto acuoso de las partes aéreas de la especie, la separación del extracto se realizó utilizando CCA. De este procedimiento se logró aislar el compuesto mayoritario presente en la infusión, el cual se caracterizó como perfoliatina A (**25**) (Figura A42), una melampólida reportada previamente en la especie. La elucidación estructural de este producto se realizó comparando sus datos de RMN con los previamente reportados.³

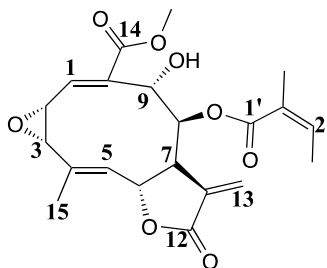


Figura A42. Perfoliatina A (**25**) compuesto mayoritario de la infusión de *M. perfoliatum*.

Con la finalidad de establecer el potencial antihiper glucémico de la perfoliatina A (**25**), se evaluó su efecto durante una CTS en ratones. Los resultados muestran que la administración oral de **25** en ratones normoglucémicos (Figura A43A) produce una reducción significativa el pico posprandial a las dosis de 3.2 y 10 mg/kg ($***p < 0.001$), mientras que a la dosis de 31.6 mg/kg se abate por completo la elevación de la glucosa posprandial. Por otro lado, en ratones hiper glucémicos (Figura A43B) se observa que el producto **25** disminuye la elevación del pico posprandial de manera similar que la acarbosa a las dosis de 3.2 y 10 mg/kg ($*p < 0.05$), y en la dosis de 31.6 mg/kg el efecto es mejor al del control positivo.

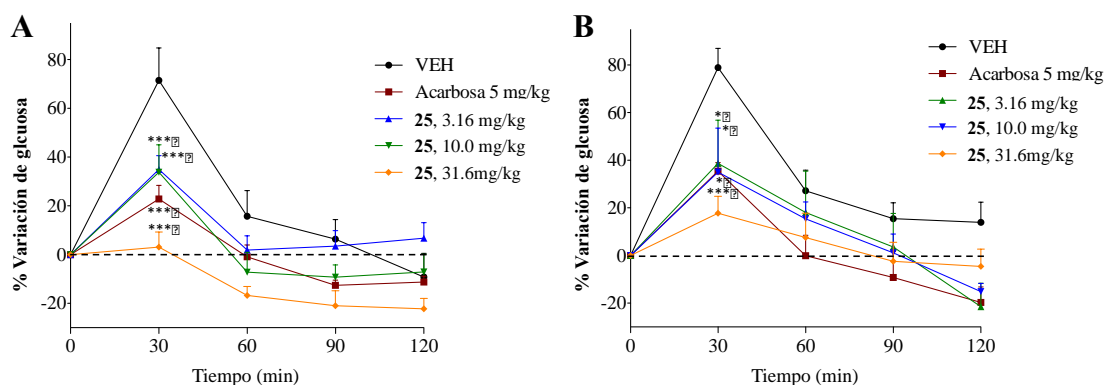


Figura A43. Curva de tolerancia a la sacarosa de la perfoliatina A (**25**) en ratones (A) normoglucémicos e (B) hiper glucémicos. VEH: vehículo; ACA: acarbosa. Cada punto representa el promedio \pm error estándar de la media para cada grupo (n = 6). ANADEVIA de dos vías, *post hoc* Bonferroni ($*p < 0.05$ y $***p < 0.001$).

Con el objetivo de demostrar la actividad inhibitoria del producto **25** se realizó la evaluación *in vitro* usando las enzimas del raspado intestinal de rata y la de *R. obeum*; para el ensayo se utilizó como control positivo acarbosa. Los resultados de la evaluación (Tabla A8) muestran que la perfoliatina A (**25**) tiene efecto inhibitorio contra ambos tipos de enzimas de manera dependiente de la concentración. Los valores de CI_{50} y del porcentaje de inhibición se observan en la Tabla A1, y tal como puede observarse el producto **25** muestra un mejor efecto contra la enzima de *R. obeum*. Con estos resultados se demuestra que la perfoliatina A (**25**), melampólida mayoritaria del extracto acuoso de la especie *M. perfoliatum*, efectivamente tiene la

propiedad de inhibir la actividad de las enzimas α -glucosidasas, y con ello ayuda a la regulación de la glucosa en sangre posprandial.

Tabla A8. Efecto inhibitorio de la perfoliatina A (**25**) sobre la actividad enzimática de las α -glucosidasas de rata y de *R. obeum*.

Muestras	α -glucosidasas de rata		α -glucosidasa de <i>R. obeum</i>	
	CI ₅₀ (mM) ^a	% de Inhibición ^c	CI ₅₀ (mM) ^a	% de Inhibición ^d
Acarbosa ^b	0.15 ± 0.07	88.7	1.05 ± 0.02	80.0
25	6.50 ± 0.63	63.5	0.47 ± 0.01	90.0

^aResultado del promedio ± la desviación estándar (n = 3); ^bControl positivos; ^c% de inhibición a una concentración máxima de 10.0 mM de inhibidor.

Adicionalmente, se realizó un estudio de cinética enzimática para establecer que tipo de inhibidor es el producto **25**, para ello se construyeron curvas de saturación por sustrato y se utilizó a la enzima pura de *R. obeum*. Los resultados se muestran en la gráfica de Lineweaver-Burk (Figura A44), la cual esta formada por rectas con diferentes pendientes que se interceptan en el eje y, lo cual concuerda con una inhibición de tipo no competitiva. Esto concuerda con el análisis de los datos, ya que estos se ajustan mejor a un modelo de tipo no competitivo con un valor de k_i de 0.68 ± 0.034 mM ($R^2 = 0.9931$).

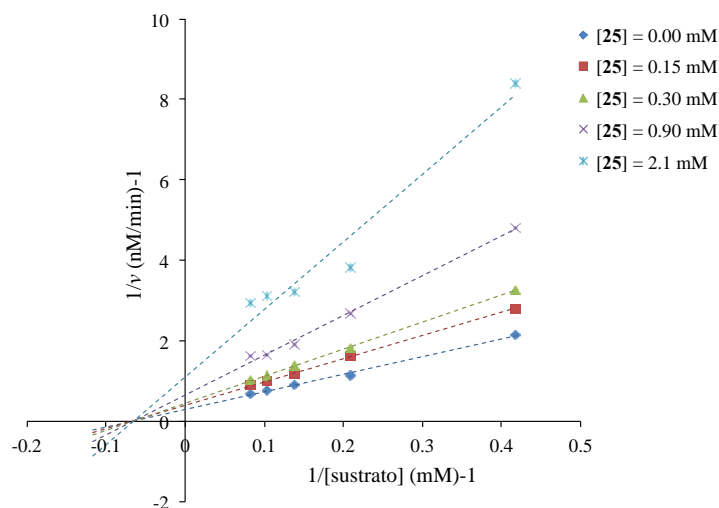


Figura A44. Gráfico de Lineweaver-Burk para el compuesto **25** sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa de *R. obeum*.

Referencias

1. Calderón, R. G., Rzedowski, J. (2010) *Flora fanerogámica del Valle de México*. Ed. Instituto de Ecología. México.
2. Turner, B. L., King, R. M. (1962) A Cytotaxonomis Survey of *Melampodium* (Compositae-Helianteae). *American Journal of Botany*, 49 (3), 263-269. 15.
3. Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A.-L., Nieto-Camacho, A., Villaseñor, J. L., Romo de Vivar, A. (2016) Terpenoids from *Melampodium perfoliatum*. *Journal of Natural Products*, 79, 2780-2787.
4. Robles, A. J., Peng, J., Hartley, R. M., Lee, B., Mooberry, S. L. (2015) *Melampodium leucanthum*, a Source of Cytotoxic Sesquiterpenes with Antimitotic Activities. *Journal of Natural Products*, 78(3), 388-395.
5. Seaman, F. C., Fischer, N. H., Stuessy, T. F. (1980) Systematic Implications of Sesquiterpene Lactones in the Subtribe Melampodiinae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 8, 263-271.
6. 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.
7. Gao, C., Han, L., Zheng, D., Jin, H., Gai, C., Wang, J., Zhang, H., Zhang, L., Fu, H. (2015) Dimeric Abietane Diterpenoids and Sesquiterpenoid Lactones from *Teucrium viscidum*. *Journal of Natural Products*, 78, 630-638.
8. Harinantenaina, L., Asakawa, Y., Clercq, E. D. (2007) Cinnamacrins A–C, Cinnafagin D, and Cytostatic Metabolites with α -Glucosidase Inhibitory Activity from *Cinnamosma macrocarpa*. *Journal of Natural Products*, 70, 277–282.
9. Ying, Y.-M., Fang, C.-A., Yao, F.-Q., Yu, Y., Shen, Y., Hou, Z.-N., Wang, Z., Zhang, W., Shan, W.-G., Zhan, Z.-J. (2017) Bergamotane Sesquiterpenes with Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity from the Plant Pathogenic Fungus *Penicillium expansum*. *Chemistry & Biodiversity*, 14, 1-5.

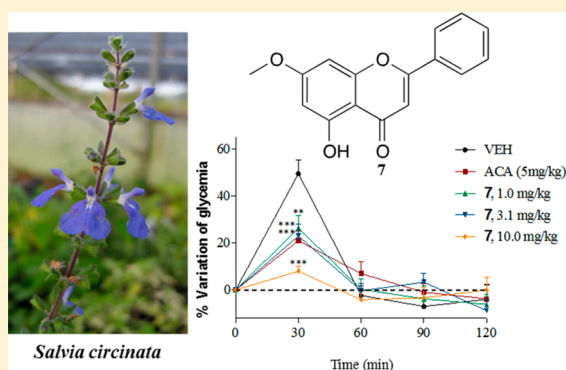
α -Glucosidase Inhibitors from *Salvia circinata*

Laura Flores-Bocanegra,[†] Martín González-Andrade,[‡] Robert Bye,[§] Edelmira Linares,[§] and Rachel Mata^{*,†,§}

[†]Facultad de Química, [‡]Facultad de Medicina, and [§]Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

S Supporting Information

ABSTRACT: A dried infusion prepared from the aerial parts of *Salvia circinata* did not provoke acute toxicity in mice ($LD_{50} > 5$ g/kg). This infusion showed poor hypoglycemic and antihyperglycemic effects (100–570 mg/kg) when tested in normal and hyperglycemic mice using acute and oral glucose tolerance tests, respectively. However, this infusion possessed antihyperglycemic action in vivo during an oral sucrose tolerance test (31.6–316 mg/kg), suggesting the presence of α -glucosidase inhibitors in *S. circinata*. Fractionation of a nonpolar extract of the aerial parts of the plant yielded a new biflavone (1) and four new neoclerodane diterpenoid glucosides (2–5) along with the known compounds amarisolide (6), pedalitin (7), apigenin-7-*O*- β -D-glucoside (8), and the flavone 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,6-dihydroxy-7-methoxy-4*H*-chromen-4-one (9). Compounds 1 and 6–9 were active against mammalian α -glucosidases; 6 and 7 were also active against a recombinant α -glucosidase from *Ruminococcus obeum* and reduced significantly the postprandial peak during an oral sucrose tolerance test in healthy mice, consistent with their α -glucosidase inhibitory activity. Molecular docking and dynamic studies revealed that compounds 6 and 7 might bind to α -glucosidases at the catalytic center of the enzyme.



According to the International Diabetes Federation, in 2015 around 415 million people worldwide were suffering from type II diabetes mellitus (T2DM).¹ The high prevalence of this disease and its negative economic impact on global national health systems have triggered the search for new therapeutic alternatives. In particular, in middle- and low-income countries, diabetic patients require more economic and efficient treatments to ameliorate their impaired glycaemic conditions. To assist with this problem, plants used in traditional medicine have proven to be valuable sources of phytotherapeutic preparations and chemical templates for the development of new antidiabetic drugs.² Thus, as part of our efforts to establish the efficacy of selected Mexican plants for treating diabetes and to discover new α -glucosidase inhibitors,^{3–5} useful for the development of new antidiabetic therapies, reported herein is the investigation of *Salvia circinata* Cav. (Lamiaceae). Previous studies on other species of this genus, including *S. miltiorrhiza* Bunge,⁶ *S. splendens* Sellow ex Schult.,⁷ *S. hypoleuca* Benth.,⁸ *S. fruticosa* Mill.,⁹ *S. syriaca* L.,¹⁰ *S. santolinifolia* Boiss.,¹¹ *S. moorcraftiana* Wall.,¹² *S. limbata* C.A. Mey.,¹⁰ *S. atropatana* Bunge,¹⁰ *S. nemorosa* L.,¹⁰ and *S. multicaulis* Vahl,¹⁰ have revealed its potential as sources of hypoglycemic and α -glucosidase inhibitory agents. In most cases, the active ingredients have been flavonoids and other phenolic compounds such as salvianolic acids A and B, which ameliorated hyperglycemia and dyslipidemia in db/db mice through the AMPK pathway.⁶ More recently, some clerodane diterpenoids from *S. chamaedryoides* Cav. were found to be active as α -

glucosidase inhibitors in vitro against α -amylase from hog pancreas and α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*.¹³

S. circinata (syn. *Salvia amarissima* Ortega) is a perennial herb widely distributed in Mexico, mainly in the Central Mexican Valley, Oaxaca, and San Luis Potosí.¹⁴ This species is used in folk medicine for treating ulcers, helminthiases, and diabetes.¹⁵ Previous phytochemical studies led to the isolation of some clerodane diterpenoids such as amarisolide (6),^{16,17} several *seco*-clerodane diterpenoids,¹⁰ and the flavone pedalitin (7).¹⁶ Some of the compounds obtained were cytotoxic against human cancer cell lines and had modulatory activity in a breast cancer cell line resistant to vinblastine.^{17,18}

RESULTS AND DISCUSSION

Acute toxicity analysis in animals is the first step during the assessment of the efficacy of phytopreparations. The information obtained from an acute toxicity test is useful for choosing appropriate doses for pharmacological studies and providing preliminary identification of target organ toxicity. In this investigation, acute toxicity was studied in mice following the Lorke protocol,¹⁹ which gives reproducible results using a minimum number of animals. Acute administration of a dried infusion prepared from the aerial parts of *S. circinata* did not provoke behavior alterations, macroscopic tissue injury, or

Received: February 21, 2017

Published: April 19, 2017

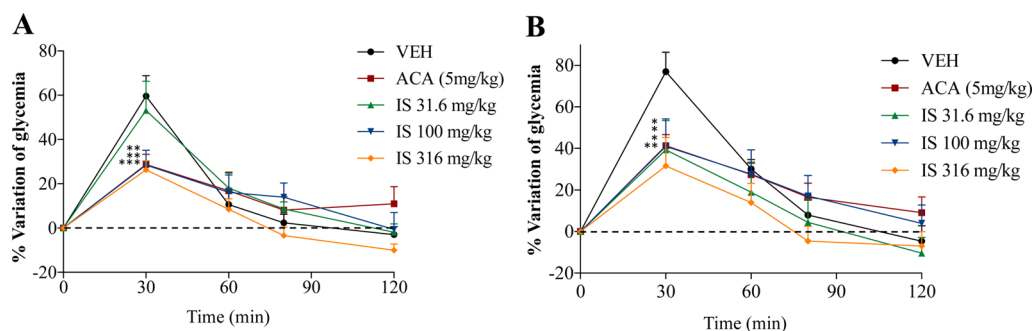
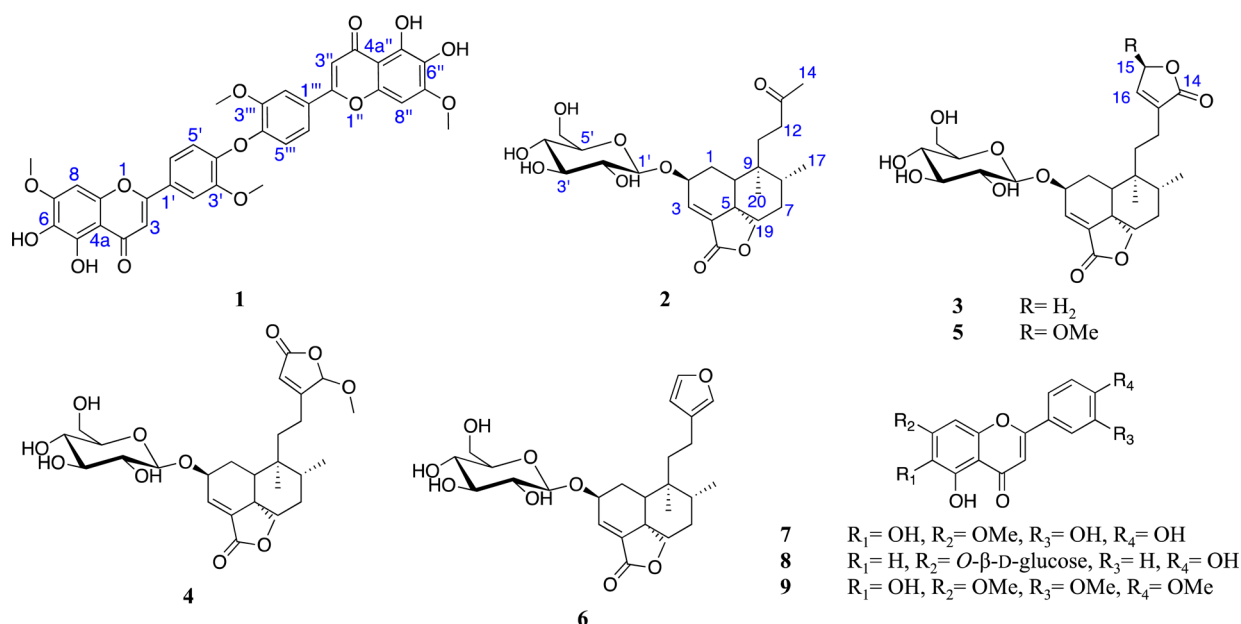


Figure 1. Antihyperglycemic action of the infusion (IS) from *S. circinata* (31.6–316 mg/kg, po) in normoglycemic (A) and NA-STZ (50/130 mg/kg, ip)-hyperglycemic mice (B) during an oral glucose tolerance test. VEH: vehicle; ACA: acarbose. Each point represents the mean \pm SEM for 6 mice in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ represent significantly different two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparison with respect to vehicle control at the same time.

Chart 1



weight loss during a 14-day observation period, and the estimated LD_{50} was higher than 5 g/kg. Therefore, according to the Lorke criteria, the traditional preparation of *S. circinata* proved to be devoid of acute toxic effects for mice (Table S1, Supporting Information).

Next, the hypoglycemic potential of the *S. circinata* infusion was assessed in both normal and nicotinamide–streptozotocin (NA 50 mg/kg–STZ 130 mg/kg)-treated mice using half-log interval doses (100–570 mg/kg), chosen according to a standard protocol of allometric scaling.²⁰ The NA-STZ model is used for evaluating potential antidiabetic drugs since it portrays a similar biochemical blood profile and pathogenesis to T2DM in humans.²¹ Oral administration of the infusion to normal and NA-STZ mice showed a moderate decrease of blood glucose level at the doses tested (Figure S1, Supporting Information). This effect was less than that produced by glibenclamide (GLI), an antidiabetic drug.

The antihyperglycemic effect of the *S. circinata* infusion was initially established throughout an oral glucose tolerance test (Figure S2, Supporting Information). In this, the infusion did not induce a significant drop in the postprandial peak after glucose challenge in normal and hyperglycemic mice (100–570 mg/kg). Finally, during an oral sucrose tolerance test (Figure

1), the infusion (31.6, 100, and 316 mg/kg) significantly reduced blood glucose when compared with a vehicle-treated group, with the effect observed comparable to that of acarbose, a commercially available drug used as positive control. The good activity observed during the oral sucrose tolerance test and the poor effect during the oral glucose tolerance test strongly suggested that the antihyperglycemic effect of the *S. circinata* infusion could be due to the presence of α -glucosidase inhibitors, which may be able to prevent postprandial hypersecretion of insulin and reactive hypoglycemia.²²

In order to isolate the active principles, a nonpolar extract from the aerial parts of *S. circinata* was prepared. Extensive chromatography of this extract yielded new compounds 1–5, along with the known substances 6,¹⁶ 7,¹⁶ 8,²³ and 9,²⁴ which were identified by comparison with physical and spectroscopic data previously reported.

Compound 1 was isolated as a yellow, amorphous powder. Its molecular formula, $C_{34}H_{26}O_{13}$, was calculated from the HRESIMS. The IR spectrum displayed characteristic signals for hydroxy and carbonyl groups (3252 and 1663 cm^{-1} , respectively). The chemical shifts of the paired signals in the NMR spectrum (Table 1, Figures S3 and S4, Supporting

Table 1. ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR Spectroscopic Data for Compound 1 in CD_3OD

position	δ_{C}	type	δ_{H} , multiplicity (J in Hz)
2	166.7,	C	
3	104.3,	CH	6.53, s
4	184.1,	C	
4a	107.0,	C	
5	147.6,	C	
6	156.2,	C	
7	131.8,	C	
8	92.4,	CH	6.71, s
8a	152.3,	C	
1'	131.9,	C	
2'	111.0,	CH	7.39, d (2.0)
3'	149.9,	C	
4'	152.5,	C	
5'	117.2,	CH	6.86, d (8.3)
6'	122.2,	CH	7.42, dd (8.4, 2.1)
2''	165.5,	C	
3''	104.5,	CH	6.49, s
4''	184.2,	C	
4a''	107.1,	C	
5''	147.6,	C	
6''	156.3,	C	
7''	131.9,	C	
8''	92.3,	CH	6.67, s
8a''	152.4,	C	
1'''	125.5,	C	
2'''	114.4,	CH	7.30, d 2.2
3'''	153.0,	C	
4'''	148.7,	C	
5'''	113.0,	CH	6.96, d (8.6)
6'''	120.5,	CH	7.38, dd (7.3, 2.1)
OCH ₃ -7	57.4,	CH ₃	3.92, s
OCH ₃ -3'	57.0,	CH ₃	3.90, s
OCH ₃ -7''	57.4,	CH ₃	3.92, s
OCH ₃ -3'''	56.9,	CH ₃	3.89, s

Information) were consistent with a biflavone-type dimeric flavonoid, with a C-4' \rightarrow C-4'' interflavanoid ether linkage.^{25,26} The ^1H NMR spectrum (Table 1 and Figure S3, Supporting Information) showed two ABX systems attributable to the protons of ring C of the two flavonoid moieties, which were then trisubstituted. Four singlets assigned to H-8 (δ_{H} 6.75), H-8'' (δ_{H} 6.69), H-3 (δ_{H} 6.58), and H-3'' (δ_{H} 6.55) were also observed; thus, rings A of both monomers were pentasubstituted. Finally, signals for four methoxy groups between δ_{H} 3.8 and 3.9 were detected. The cross-peaks observed for H-8 and H-8'' with the methoxy group signals in the NOESY spectrum indicated that two of the methoxy groups were at C-7 and C-7''. On the other hand, the NOESY correlations from H-2' (δ_{H} 7.43) \rightarrow OCH₃-3' (δ_{H} 3.96) and H-2''' (δ_{H} 7.33) \rightarrow OCH₃-3''' (δ_{H} 3.94) were used to locate the other two methoxy groups at C-3' and C-3''' (Figure S10, Supporting Information). The long-range HMBC correlations from H-5' (δ_{H} 6.90) \rightarrow C-1' (δ_{C} 131.9) and C-3' (δ_{C} 149.9) and H-5''' (δ_{H} 7.03) \rightarrow C-1''' (δ_{C} 125.5) and C-3''' (δ_{C} 153.0) as well as those for H-2' (δ_{H} 7.39) and H-6' (δ_{H} 7.42) \rightarrow C-4' (δ_{C} 152.5), and H-2''' (δ_{H} 7.30) and H-6''' (δ_{H} 7.38) \rightarrow C-4''' (δ_{C} 148.7), corroborated these assignments and established the interlinkage bond as C-4'-O-C-4'''. The ^{13}C NMR spectrum was fully assigned by means of the HSQC and HMBC experiments. On the basis of

this evidence, compound 1 was characterized as 6,6'',3'''-trihydroxy-7,3',7''-O-trimethylflavone.^{25,26}

Compounds 2–5 were isolated as optically active, colorless, glassy solids. Their molecular formulas were deduced by HRESIMS as $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_9$, $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_{10}$, $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_{11}$, and $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_{11}$, respectively. The IR spectra of all compounds included bands in the range 3396 to 3385 and from 1763 to 1749 cm^{-1} , consistent with the presence of hydroxy and α,β -unsaturated- γ -lactone groups in the molecules. The IR spectrum of 2 showed also a band at 1705 cm^{-1} attributable to a carbonyl group. The NMR spectra of 2–5 (Tables 2 and 3, Figures S12–S39, Supporting Information) showed strong similarities to those of amarisolide (6), a *neo*-clerodane type of diterpenoid possessing a tricyclic skeleton with the six-membered rings *trans*-fused and an ethylfuran moiety. Also in common, clerodanes 2–6 exhibited signals for a β -glucopyranosyloxy moiety at C-2 and an α,β -unsaturated- γ -lactone at C-4/C-5. In order to demonstrate the D configuration of the β -glucopyranosyloxy moiety, compounds 2–6 were hydrolyzed with β -glucosidase; in all cases, the aqueous-soluble fraction showed identical optical rotation ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} +30$) and R_f (co-TLC) to those of an authentic sample of β -D-glucose. Comparison of the NMR data of 2–5 with 6 (Tables 2 and 3) revealed that the β -substituted furan ring in 6 was replaced by a methyl ketone group in 2, an α,β -unsaturated- γ -lactone in 3, and a five-membered ketolactol methyl ether in 4 and 5. Assignments of the ^1H and ^{13}C NMR data of 2–5 (Tables 2 and 3) were supported by 2D NMR (^1H - ^1H COSY, HSQC, and HMBC) experiments. The ^{13}C NMR chemical shifts observed in the spectra of compounds 4 and 5 for C-13 (4/5 δ_{C} 170.0/137.9), C-14 (4/5 δ_{C} 104.7/171.2), C-15 (4/5 δ_{C} 171.0/102.5), and C-16 (4/5 δ_{C} 117.2/143.0) revealed that the ethyl fragment [C-11 (4/5 δ_{C} 27.6/34.7) and C-12 (4/5 δ_{C} 33.9/17.7)] is linked to the five-membered ketolactol methyl ether moiety at the β -^{27,28} or α -^{29,30} carbon to the carbonyl group, respectively. The HMBC correlations for H-12 and H-14 in 4 supported this assignment [H-12a (δ_{H} 1.56) \rightarrow C-14 (δ_{C} 104.7); H-12b (δ_{H} 2.09) \rightarrow C-14 (δ_{C} 104.7); and H-14 (δ_{H} 5.91) \rightarrow C-12 (δ_{C} 33.9)]. Likewise, the HMBC correlations for H-12 and H-15 in 5 [H-12a (δ_{H} 2.33) \rightarrow C-16 (δ_{C} 143.0); H-12b (δ_{H} 2.09) \rightarrow C-16 (δ_{C} 143); and H-15 (δ_{H} 5.92) \rightarrow C-13 (δ_{C} 137.9) and C-14 (δ_{C} 171.2)] reinforced the structural assignment made.

The NOESY interactions (Figure 2) observed in the spectra of 2–5 revealed that the relative configuration at the stereogenic centers of all clerodanes were identical to that of 6. Thereafter, the electronic circular dichroism (ECD) spectra of 2–6 were simulated. The experimental and calculated ECD spectra (Figures 3 and S40, Supporting Information) were similar in all cases, indicating that the absolute configuration at the stereogenic centers C-2, C-5, C-8, C-9, and C-10 was S, S, R, R, and R, respectively, in 2–6. All spectra showed negative Cotton effects at ~ 208 and ~ 250 nm due to the electronic transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$, respectively, of the α,β -unsaturated- γ -lactone. It is important to point out that the absolute configuration of 6 was unequivocally determined by X-ray analysis;³¹ since the optical rotation of 6 isolated in this work was identical to that previously reported,^{16,31} the strategy employed to establish the configuration at the stereogenic centers at the tricyclic skeleton with the six-membered rings *trans*-fused of all diterpenes appears to be sound. In the case of compounds 4 and 5, the ECD were calculated for the two possible epimers at C-14 or C-15, respectively. The results

Table 2. ¹H (500 MHz) NMR Spectroscopic Data for Compounds 2–5 in DMSO-*d*₆

position	δ , multiplicity (J, Hz)							
	2		3		4		5	
1	1.76,	ddd (13.8, 12.0, 12.0)	1.80,	ddd (13.8, 12.0, 12.0)	1.76,	ddd (13.8, 12.0, 12.0)	1.81,	ddd (13.8, 12.0, 12.0)
	1.28,	m ^a	1.34,	m ^a	1.34,	m ^a	1.34,	m ^a
2	4.43,	m ^a	4.47,	m ^a	4.47,	m ^a	4.46,	m ^a
3	6.63,	d (6.4)	6.63,	d (6.4)	6.67,	d (6.3)	6.66,	d (6.3)
6	1.69,	m	1.72,	m	1.67,	m	1.71,	m
	1.18,	m	1.25,	m	1.25,	m	1.25,	m
7	1.52,	m	1.24,	m	1.54,	m	1.60,	m
8	1.53,	m	1.71,	m	1.67,	m	1.54,	m
10	2.12,	d (12.9)	2.27,	d (12.6)	2.25,	d (12.9)	2.24,	d (12.9)
11	1.44,	m	1.54,	m	1.54,	m	1.53,	m
			1.43,	m			1.44,	m
12	2.61,	m	2.37,	m	1.56,	m	2.33,	m
	2.32,	m	2.06,	m	2.09,	m	2.09,	m
14	2.05,	s			5.91,	d (0.8)		
15			4.79,	m			5.92,	brs
16			7.45,	t (1.6)	6.04,	t (0.7)	7.13,	brs
17	0.74,	d (6.6)	0.80,	d (6.6)	0.80,	d (6.4)	0.79,	d (6.5)
19	3.97,	d (8.1)	4.00,	d (8.3)	4.02,	d (8.3)	4.02,	d (8.3)
	4.53,	d (8.1)	4.38,	d (8.2)	4.38,	d (8.2)	4.39,	d (8.2)
20	0.51,	s	0.54,	s	0.56,	s	0.56,	s
1'	4.29,	d (7.7)	4.31,	d (7.7)	4.30,	d (7.7)	4.30,	d (7.7)
2'	2.94,	dd (8.0)	2.94,	dd (8.0)	2.97,	dd (8.0)	2.93,	dd (8.0)
3'	3.10,	dd (8.0)	3.11,	dd (8.0)	3.11,	dd (8.0)	3.10,	dd (8.0)
4'	2.96,	dd (8.0)	2.97,	dd (8.0)	2.98,	dd (8.0)	2.95,	dd (8.0)
5'	3.10,	m	3.11,	m	3.11,	m	3.10,	m
6'	3.65,	dd (11.3, 2.5)	3.60,	dd (11.0, 2.5)	3.67,	dd (11.6, 2.5)	3.64,	dd (11.6, 2.0)
	3.34,	m ^a	3.44,	m ^a	3.34,	m ^a	3.33,	m ^a
OCH ₃					3.45,	s		
OCH ₃							3.45,	s

^aSignal overlapped.

revealed that the ECD calculated for the β -epimer at C-15 of **5** was identical to the experimental spectrum; thus, the absolute configuration at the chiral center C-15 in **5** was established as *S*. In the case of compound **4** the configuration at C-14 could not be established, since the calculated ECD spectra for the two epimers at C-14 did not match exactly with the experimental spectrum. On the basis of this evidence, compounds **2–5** were characterized as (2*S*,5*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-2-(*O*- β -D-glucopyranosyl)neocleroda-3-en-9-oxobutyl-18,19-olide (**2**), (2*S*,5*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-2-(*O*- β -D-glucopyranosyl)neocleroda-3,13-diene-14,15;18,19-diolide (**3**), (2*S*,5*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-2-(*O*- β -D-glucopyranosyl)neocleroda-14-methoxy-3,13-diene-15,14;18,19-diolide (**4**), and (2*S*,5*S*,8*R*,9*R*,10*R*,15*S*)-2-(*O*- β -D-glucopyranosyl)neocleroda-15-methoxy-3,13-diene-14,15;18,19-diolide (**5**), which were given the trivial names amarisolides B–E (**2–5**).

Compounds **1–9** were tested in vitro against mammalian α -glucosidase. The more active compounds were the flavonoids, and, in particular, compound **1** showed an IC₅₀ value of 39 \pm 0.06 μ M, which was 2.5 times more active than acarbose (IC₅₀ = 100 \pm 0.3 μ M), used as positive control. Flavonoids **7–9** exhibited IC₅₀ values of 810 \pm 39, 200 \pm 12, and 1800 \pm 140 μ M, respectively. Regarding the diterpenoids, only compound **6** was active, with an IC₅₀ value of 500 \pm 32.3 μ M. In the case of compounds **2–5**, the IC₅₀ values were higher than 10 000 μ M (Table S2, Supporting Information). The major compounds of the plant, **6** and **7**, and acarbose were also tested against a recombinant α -glucosidase with maltase-glucoamylase activity

from *Ruminococcus obeum*, a bacterium found in the human intestine that is involved in carbohydrate metabolism.³² This protein is a structural homologue to human intestinal *N*-maltase-glucoamylase (2QMJ.pdb, 85% coverage) with a highly conserved catalytic domain (Figures S41 and S42, Supporting Information). This enzyme is phylogenetically closer to human *N*-maltase-glucoamylase than those of rat small intestinal enzymes; therefore, it is possible to make better inferences regarding the potential in vivo effects in humans of any compound assayed with this enzyme. The maltase-glucoamylase enzyme from *R. obeum* shows substrate preference for $\alpha(1\rightarrow6)$ over $\alpha(1\rightarrow4)$ glycosidic linkages and produces glucose from isomaltose as well as maltose.³² The results of the assays showed that **6**, **7**, and acarbose inhibited the activity of the pure enzyme with IC₅₀ values of 400 \pm 19.0, 60 \pm 3.0, and 1030 \pm 14.0 μ M, respectively.

Compounds **6** and **7** were also evaluated in vivo in an oral sucrose tolerant test in healthy mice (Figure 4); acarbose was the positive control. As expected, oral administration of **6** and **7** reduced significantly the postprandial peak in a dose-dependent manner. In both cases, the effect was comparable to that of the positive control, thus revealing their antihyperglycemic potential. These results were consistent with the α -glucosidase inhibition activity demonstrated in vitro for these compounds.

In order to complete the inhibition studies, docking and molecular dynamics studies of the *R. obeum* α -glucosidase complexes were performed with acarbose, **6**, and **7** (Figures 5 and 6). According to the results obtained, the three products

Table 3. ^{13}C (125 MHz) NMR Spectroscopic Data for Compounds 2–5 in $\text{DMSO-}d_6$

position	δ , type							
	2		3		4		5	
1	25.7,	CH ₂	25.7,	CH ₂	26.8,	CH ₂	25.7,	CH ₂
2	69.2,	CH	69.0,	CH	69.1,	CH	69.2,	CH
3	130.6,	CH	130.7,	CH	131.0,	CH	130.8,	CH
4	142.8,	C	142.6,	C	143.2,	C	142.6,	C
5	45.1,	C	45.1,	C	45.6,	C	45.1,	C
6	33.6,	CH ₂	33.3,	CH ₂	33.7,	CH ₂	33.3,	CH ₂
7	27.2,	CH ₂	27.2,	CH ₂	26.2,	CH ₂	27.2,	CH ₂
8	35.8,	CH	35.8,	CH	35.9,	CH	35.7,	CH
9	36.8,	C	37.4,	C	37.7,	C	37.4,	C
10	39.3,	CH	39.2,	CH	39.5,	CH	39.2,	CH
11	30.3,	CH ₂	34.9,	CH ₂	27.6,	CH ₂	34.7,	CH ₂
12	36.0,	CH ₂	17.8,	CH ₂	33.9,	CH ₂	17.7,	CH ₂
13	208.7,	C	132.8,	C	170.0,	C	137.9,	C
14	30.0,	CH ₃	174.2,	C	104.7,	CH	171.2,	C
15			70.4,	CH	171.0,	C	102.5,	CH
16			146.4,	CH	117.2,	CH	143.0,	CH
17	15.5,	CH ₃	15.4,	CH ₃	15.9,	CH ₃	15.5,	CH ₃
18	168.7,	C	168.8,	C	169.2,	C	168.8,	C
19	70.5,	CH ₂	70.6,	CH ₂	70.9,	CH ₂	70.6,	CH ₂
20	17.3,	CH ₃	17.2,	CH ₃	17.6,	CH ₃	17.3,	CH ₃
1'	101.9,	CH	101.9,	CH	102.0,	CH	102.8,	CH
2'	73.9,	CH	73.6,	CH	74.0,	CH	73.5,	CH
3'	76.8,	CH	76.7,	CH	77.2,	CH	76.7,	CH
4'	70.3,	CH	70.0,	CH	70.7,	CH	70.8,	CH
5'	77.0,	CH	76.9,	CH	77.4,	CH	77.0,	CH
6'	61.2,	CH ₂	61.1,	CH ₂	61.8,	CH ₂	61.2,	CH ₂
OCH ₃					56.5,	OCH ₃		
OCH ₃							56.1,	OCH ₃

bind to the catalytic site of the enzyme. On the other hand, the molecular dynamics studies (Figure 6) indicated that the total energy of the complexes remained stable throughout the analysis, revealing that the binding of the compounds was stable. The study was conducted for 20 ns considering that the system was stable during this period of time (Figure S44, Supporting Information). The most stable complex was compound 7 since the calculated ΔG was -31.26 ± 2.9 , while the ΔG values for acarbose and 6 were -23.12 ± 4.6 and -20.03 ± 3.4 , respectively. These results are in agreement with the inhibition data (IC_{50}) obtained experimentally. Animated images of the trajectories of molecular dynamics may be found in the Supporting Information (Figure S43).

In summary, the aerial parts of *S. circinata* possess an antihyperglycemic action in vivo in an oral sucrose tolerance test, supporting the medicinal use of *S. circinata* for treating diabetes in Mexican folk medicine. This plant produces several flavonoid and clerodane diterpene glycoside constituents with α -glucosidase inhibitory effects in vitro, and this target seems to be involved in their in vivo antihyperglycemic action. The maltase-glucoamylase enzyme from *R. obeum* demonstrated to be a good tool to assess α -glucosidase inhibitory activity in vitro. Molecular docking and dynamic studies revealed that compounds 6 and 7 might bind to α -glucosidase at the catalytic center of the enzyme. As hypothesized by Bisio et al.,¹³ the enzymatic inhibitory capacity of species of *Salvia* is due not only to their content of phenolic compounds but also of other secondary metabolites such as the clerodane-type diterpenes, which are characteristic metabolites of this genus. To our knowledge, this is the first report of the in vivo action of a *neo*-

clerodane diterpenoid against α -glucosidase and of the occurrence of biflavones in the genus *Salvia*.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR, UV, and ECD spectra were recorded using a PerkinElmer 400 FT-IR, a Shimadzu U160, and a JASCO J720 instrument, respectively. Optical rotations were recorded at the sodium D-line wavelength using a PerkinElmer model 343 polarimeter at 20 °C. 1D and 2D NMR spectra were recorded in CD_3OD or $\text{DMSO-}d_6$ solution on a Bruker Avance III HD spectrometer at either 500 MHz (^1H) or 125 MHz (^{13}C) or a Varian VNRMS at 400 MHz (^1H) or 100 MHz (^{13}C), using tetramethylsilane as an internal standard. HRESIMS were obtained using a Thermo LTQ Orbitrap XL mass spectrometer. Preparative HPLC was carried out with a Waters instrument (Milford, MA, USA) equipped with a 2535 pump and a 2998 photodiode array detector, using an XBridge C_{18} packed column (21.1 × 250 mm) and different gradient systems of MeCN and 0.1% aqueous formic acid, at a flow rate of 17.0 mL/min. Control of equipment, data acquisition and processing, and management of chromatographic information were performed by the Empower 3 software package (Waters). Column chromatography (CC) was carried out on Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and/or silica gel 60 (0.063–0.200). Each Sephadex LH-20 column was 60 cm long with 4 cm internal diameter. Thin-layer chromatographic analyses were performed on silica gel 60 F_{254} plates (Merck, Kenilworth, NJ, USA), and visualization of the plates was carried out using a $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ (10%) solution in H_2SO_4 .

Plant Material. The aerial parts of *S. circinata* were collected in June 2014 in Huauchinango Puebla, Mexico. The plant was identified by authors R.B. and E.L. A voucher specimen (R. Bye and E. Linares

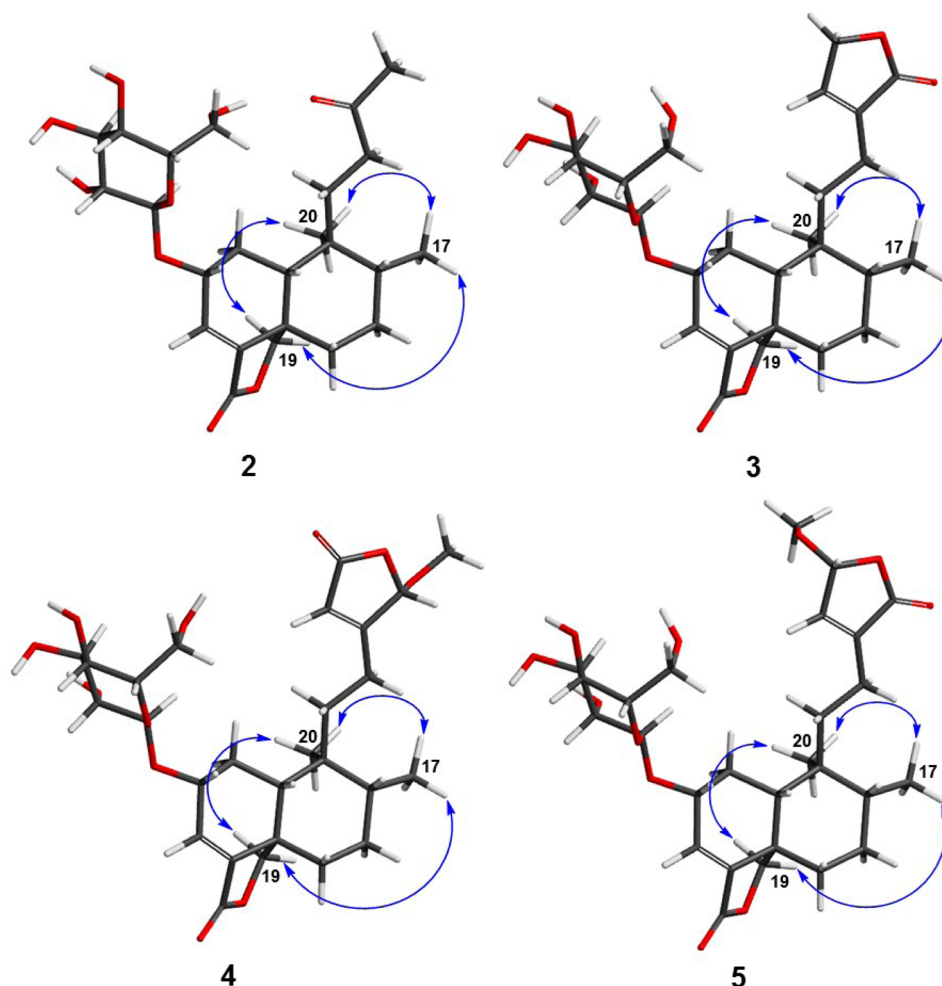


Figure 2. Key NOESY correlations of compounds 2–5.

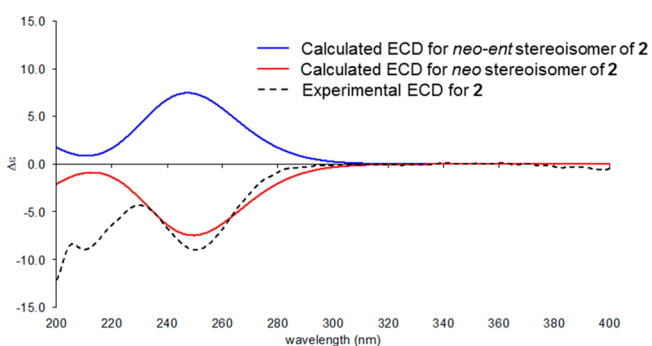


Figure 3. Comparison of theoretical and experimental ECD spectra of 2.

37855) has been deposited at the National Herbarium (MEXU), UNAM, Mexico City.

Extraction and Isolation. Two hundred grams of dried and ground plant material was extracted with 5.5 L of boiling water for 20 min and was filtered and dried in vacuo to yield 19 g of aqueous extract. A nonpolar extract was prepared from 820 g of plant material by exhaustive maceration (8 days, three times) with 8 L of a solvent mixture of CH_2Cl_2 – CH_3OH (1:1). Thereafter, the extract was filtered and dried in vacuo to yield 200 g of extract. A 150 g quantity of this extract was subjected to CC on silica gel (5000 g), eluting with hexane–EtAcO (100:0 → 0:100) and then with EtAcO– CH_3OH (100:0 → 80:20). This procedure yielded eight primary fractions (OE1–OE8). From fraction OE6, eluted with hexane–AcOEt

(10:90), precipitated 3.87 g of 6 as a white solid, mp 206–208 °C. Fraction OE5 (6.3 g), eluted with hexane–AcOEt (40:60), was subjected to CC on Sephadex LH-20 eluting with CH_3OH to afford six secondary fractions (OE₅1–OE₅6). From fraction OE₅6 (423.5 mg) precipitated 7 (368.0 mg) as a yellow solid, mp 300–302 °C. Fraction OE₅3 (91.0 mg) was also subjected to CC on Sephadex LH-20 eluting with CH_3OH –acetone (1:1) to afford 1 (10.3 mg), mp 223–225 °C, and 9 (30.6 mg), mp 212–214 °C, both as yellow solids. Fraction OE6 (20 mg) was purified on a Sephadex LH-20 column (CH_3OH) to yield 8 (15.5 mg), mp 230–232 °C. Fraction OE7 (25 g) was separated on a silica gel column eluting with hexane–EtAcO (20:80 → 0:100) and then with EtAcO– CH_3OH (100:0 → 80:20) to afford four secondary fractions (OE₇1–OE₇4). Fractions OE₇1 (53.0 mg) and OE₇2 (75.3 mg) were purified by reversed-phase HPLC (XBridge C₁₈, 21.1 × 250 mm, 5 μm) using as mobile phase 30:70 MeCN– H_2O (acidified with 0.1% formic acid) and increasing linearly to 50% over 15 min at a flow rate of 17.0 mL/min. These processes yielded 25.0 mg of 3 (t_R 14.3 min) and 12.5 mg of 5 (t_R 17.0 min) from fraction OE₇1 and 21.0 mg of 4 (t_R 16.2 min) and 17.0 mg of 2 (t_R 11.8 min) from fraction OE₇2.

Compound 1: yellow powder; mp 223–225 °C; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 271 (3.8), 330 (3.2) nm; IR (FTIR) ν_{max} 3252, 2925, 1663 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR in Table 1; HRESIMS m/z 643.1430 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ (calcd for C₃₄H₂₆O₁₃ [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 643.1452).

Compound 2: glassy solid; [α]_D²⁰ +54.73 (1 mg/mL, CH_3OH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 206 (0.412); ECD (CH_3OH , c 0.1 mM, 0.1 cm); $\Delta\epsilon$ –8.94 (210 nm), –8.98 (250 nm); IR (FTIR) ν_{max} 3378, 1763, 1705 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR in Table 2 and Table 3; HRESIMS m/z 469.2403 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ (calcd for C₂₄H₃₆O₉ [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 469.2438).

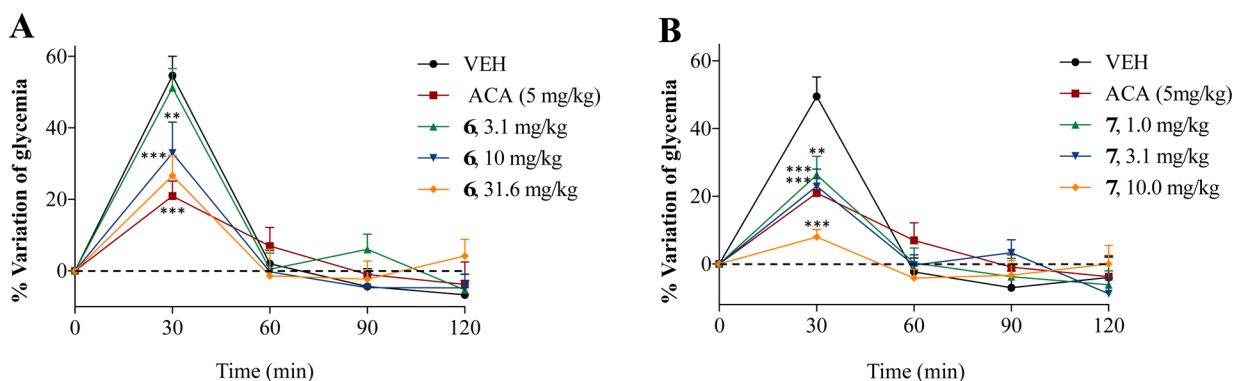


Figure 4. Antihyperglycemic action of **6** (A, 3.1–31.6 mg/kg, po) and **7** (B, 1.0–10.0 mg/kg, po) in normoglycemic mice during an OSTT. VEH: vehicle; ACA: acarbose. Each point represents the mean \pm SEM for 6 mice in each group. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ represent significantly different two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparison with respect to vehicle control at the same time.

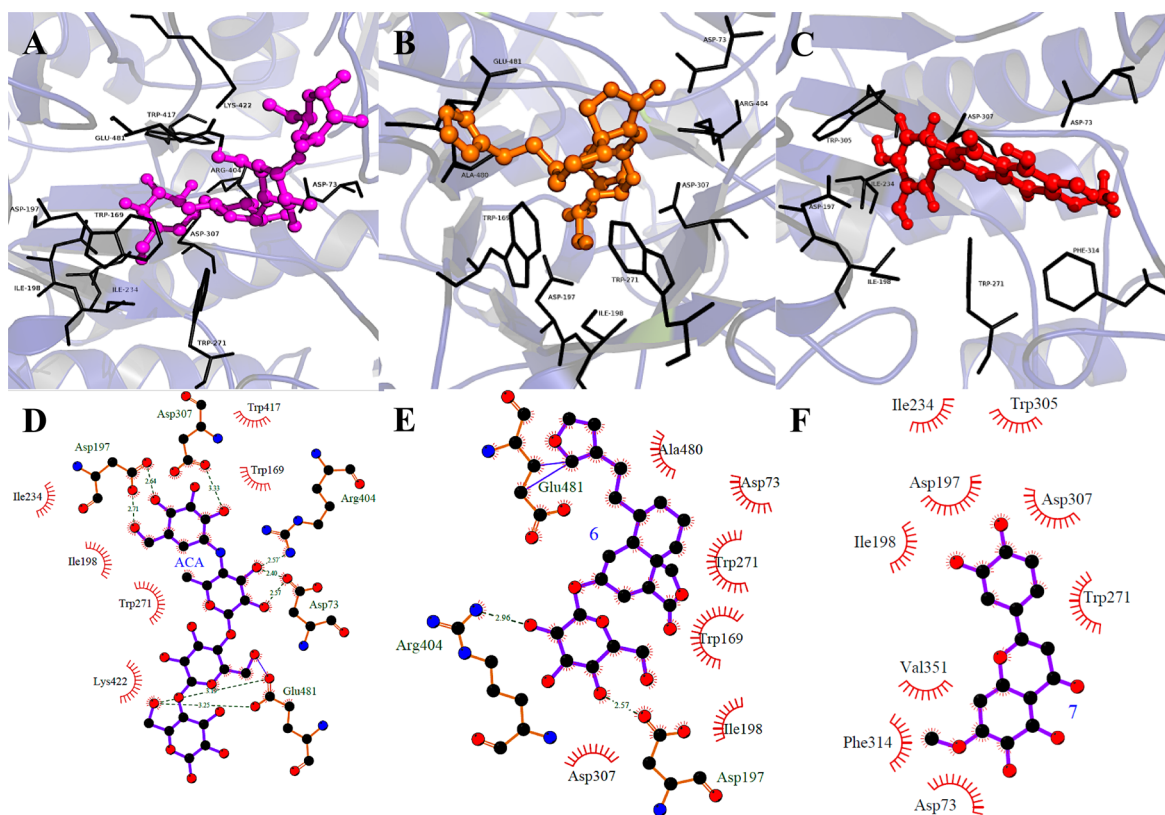


Figure 5. 3D Structural model of complexes of α -glucosidase with acarbose (A), **6** (B), and **7** (C). Binding sites and amino acid involved in the binding of acarbose (D), **6** (E), and **7** (F).

Compound 3: glassy solid; $[\alpha]_D^{20} +43.05$ (1 mg/mL, CH₃OH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 207 (0.514); ECD (CH₃OH, c 0.1 mM, 0.1 cm); $\Delta\epsilon$ -6.92 (208 nm), -7.29 (250 nm); IR (FTIR) ν_{max} at 3385, 1749 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR in Table 2 and Table 3; HRESIMS m/z 509.2352 [M + H]⁺ (calcd for C₂₆H₃₆O₁₀ [M + H]⁺, 509.2387).

Compound 4: glassy solid; $[\alpha]_D^{20} +67.90$ (1 mg/mL, CH₃OH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 207 (0.631); ECD (CH₃OH, c 0.4 mM, 0.1 cm); $\Delta\epsilon$ -16.4 (208 nm), -16.5 (250 nm); IR (FTIR) ν_{max} at 3396, 1754 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR in Table 2 and Table 3; HRESIMS m/z 539.2452 [M + H]⁺ (calcd for C₂₇H₃₈O₁₁ [M + H]⁺, 539.2492).

Compound 5: glassy solid; $[\alpha]_D^{20} +59.21$ (1 mg/mL, CH₃OH); ECD (CH₃OH, c 0.9 mM, 0.1 cm); $\Delta\epsilon$ -15.92 (208 nm), -12.91 (251 nm); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 207 (0.614); IR (FTIR) ν_{max} at 3396, 1750 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR in Table 2 and Table 3; HRESIMS m/z 539.2455 [M + H]⁺ (calcd for C₂₇H₃₈O₁₁ [M + H]⁺, 539.2492).

Enzymatic Hydrolysis. Compounds 2–6 (5 mg each) were dissolved in phosphate buffer solution (5 mL, 100 mM at pH 7), and enzyme β -glucosidase (10 g, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the solution and kept at 40 °C for 15 days, in each case. The reaction mixtures were extracted with CHCl₃, and the aqueous phases were compared directly with an authentic D-glucose sample by co-TLC and optical rotation.

Electronic Circular Dichroism Spectra. Minimum energy structures for the stereoisomers *neo*- and *ent*- of 2–6 were built with Spartan'10 software (Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA). Conformational analysis was performed with the Monte Carlo search protocol as implemented in the same software under the MMFF94 molecular mechanics force field. The resulting conformers were minimized using the DFT method at the B3LYP/6-311G+(2d,p) level of theory. The time-dependent DFT (TDDFT) method at the B3LYP/6-31G+(d) level of theory was employed for ECD calculations using the same

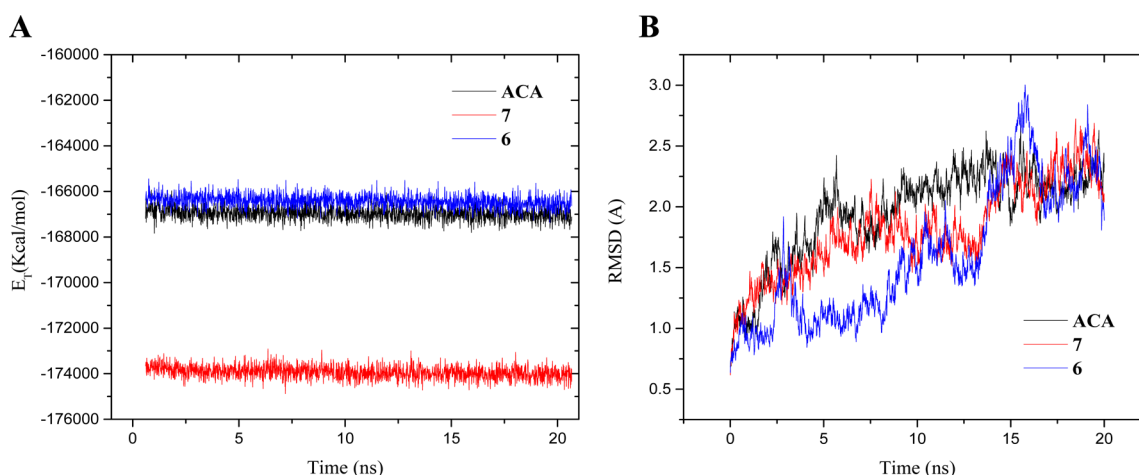


Figure 6. Molecular dynamics trajectory analysis. (A) Total energy of the system as a function of the time of 6, 7, and acarbose (ACA). (B) RMSD as a function of time.

DFT-minimized conformers. The self-consistent reaction field with a conductor-like continuum solvent model was used to perform the ECD calculations of the major conformers in MeOH. The calculated excitation energy (nm) and rotatory strength (R) in dipole velocity (Rvel) and dipole length (Rlen) forms were simulated into an ECD curve. All calculations were performed employing the Gaussian'09 program package (Gaussian Inc.).

α -Glucosidase Genetic Optimization, Cloning, Expression, and Purification. The α -glucosidase gene from *Ruminococcus obeum* ATCC 29174 was optimized (Figure S41, Supporting Information) for expression in *Escherichia coli* BL21(DE3), using the software OptimumGene from GenScript (Piscataway, NJ, USA). The optimized gene was cloned into the *pUCS7* vector and subsequently subcloned into the expression vector *pET-12b* Novagen (EMD Chemicals, Darmstadt, Germany) using the restriction enzyme sites *Sall* and *BamHI* for their correct orientation. *E. coli* BL21-DE3/*pET12b* was grown in 500 mL of LB medium at 37 °C; the expression was induced by the addition of IPTG (0.5 mM). After 8 h, the cells were harvested by centrifugation (10 min, 4000g), suspended in 50 mM bis-TRIS propane at pH 8.0, and lysed by sonication with pulses of 5 min at an amplitude of 35% three times; cellular debris was removed by centrifugation (15 min \times 15000g). The protein was identified by activity tests and gel electrophoresis.³²

In Vitro Assay for α -Glucosidase Inhibitors. Acarbose, used as positive control, was dissolved in phosphate buffer solution (PBS, 100 mM, pH 7), and compounds 1–10 were dissolved in PBS or MeOH–PBS (1:1). The substrate used was *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (20 mM in PBS; Sigma-Aldrich). The mammalian enzyme solution was prepared with 40 mg of rat intestinal acetone powder in 1 mL of PBS following the manufacturer's (Sigma-Aldrich) protocol. The *R. obeum* enzyme solution was used at a concentration of 5.2 mg/mL in bis-TRIS propane. Aliquots of 0–10 μ L of compounds 1–9 and acarbose were incubated with 20 μ L of enzyme solution in the case of the mammalian enzyme; in addition, compounds 6, 7, and acarbose were incubated with 5 μ L of the enzyme solution of *R. obeum*; in both cases the incubation period was 10 min at 37 °C. After incubation, the substrate was added to each preparation (5 μ L for mammalian and 10 μ L for *R. obeum*), which were incubated for 30 min and 3 h more at 37 °C, respectively. Absorbances were determined in a Bio-Rad 680 microplate reader (Hercules, CA, USA) at 405 nm. The inhibitory activity expressed as IC_{50} was determined as previously described.^{25,33}

Docking Protocol. Docking was conducted using the PDB X-ray structure of α -glucosidase from *R. obeum* (3N04.pdb); the structures of acarbose, 6, and 7 were constructed using HyperChem 8 software and subsequently minimized using Gaussian 09, revision A.02 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA).^{34,35} Electrostatic grid maps, docking, and docking analyses were performed with AutoDockTools, AutoDock, and PyMOL softwares.³⁶

Molecular Dynamics Simulation. The coordinates of the ligands, resulting from the docking study, were processed with an antechamber to generate suitable topologies for the LEaP module from AMBER 12.^{37,38} Each structure and complex was subjected to the following protocol: Hydrogens were added using the LEaP module with the parm99 parameter set, Na^+ counterions were added to neutralize the system, and the structures were then solvated in an octahedral box of explicit TIP3P model water molecules, localizing the box limits at 12 Å from the protein surface.^{39,40} MD simulations were performed. Frames were saved at 100 ps intervals for subsequent analysis. The analyses were conducted with *cpptraj*⁴¹ on the trajectory time intervals where the convergence criteria were met. Binding free energies were calculated by molecular mechanics/Poisson–Boltzmann surface area.^{42,43}

Experimental Animals. ICR male mice, aged between 3 and 4 weeks (25–30 g body weight), were obtained from Envigo Mexico RMS (CDMX). Animals were kept in an environmentally controlled room maintained at 22 ± 1 °C with an alternating 12 h light/dark natural cycle, with free access to standard rodent pellet diet (Teklad 2018S, Envigo) and water ad libitum until the beginning of each experiment. All animal experimental protocols were in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and the International Ethical Guidelines for the care and use of laboratory animals. The Ethical Committee for the Use of Animals in Pharmacological and Toxicological Testing, Facultad de Química-UNAM approved the protocols in March 2016: FQ/CICUAL/134/16 (Lorke assay) and FQ/CICUAL/132/16 (hypoglycemic and antihyperglycemic tests).

Acute Oral Toxicity in Mice of the Initial Infusion of *S. circinata*. The acute oral toxicity of the initial aqueous infusion of *S. circinata* was assessed and analyzed according to the Lorke method.¹⁹ The dose schemes are provided in the Supporting Information.

Nicotinamide–Streptozotocin (NA-STZ)-Induced Experimental Hyperglycemia in Mice. Experimental hyperglycemia in mice was induced as described earlier,^{4,21} using a single dose of NA (50 mg/kg) and STZ (130 mg/kg). One week later mice having blood glucose ≥ 200 mg/dL were considered hyperglycemic and selected for the study.

Collection of Blood Samples and Determination of Blood Glucose Levels. Blood samples were collected from the caudal vein, and the glucose levels (mg/dL) determined by the enzymatic glucose oxidase method as previously described.⁴ The percentage variations of blood glucose levels were calculated following a standard protocol.⁴

Acute Hypoglycemic Assay. The hypoglycemic action of the dried plant initial infusion (100, 316, and 517 mg/kg) in normal and NA-STZ mice was performed following the procedures previously reported.⁴ The percentage variation of glycemia was calculated as

previously stated. Areas under the curve were calculated with the trapezoidal method.⁴

Oral Glucose Tolerance Test (OGTT). The antihyperglycemic action in an OGTT of the dried plant initial infusion (100, 316, and 517 mg/kg) in normal and NA-STZ mice was assayed following the methodology previously reported by our research group.⁴

Oral Sucrose Tolerance Test (OSTT). The antihyperglycemic action in an OSTT of the dried plant initial infusion (31.6, 100, and 316 mg/kg), 6 (3.1, 10, and 31.6 mg/kg), and 7 (1.0, 3.1, and 10 mg/kg) in normal and NA-STZ mice were assayed following the standard methodology reported elsewhere.⁴

Statistical Analysis. Data were expressed as means \pm standard error. Statistical significance differences were ascertained by means of two-way ANOVA followed by Bonferroni's test for comparison with respect to vehicle control at the same time or ANOVA followed by Dunnett's test for comparison with respect to vehicle control. GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA) was used for statistical analysis.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00155.

Acute hypoglycemic action of an infusion from *S. ciccinata* in normoglycemic and NA-STZ-hyperglycemic mice; antihyperglycemic action of an infusion from *S. ciccinata* in normoglycemic and NA-STZ-hyperglycemic mice during an oral glucose tolerant test; one- and two-dimensional NMR spectra of compounds 1–5; HRESIMS of 1–5; alignment of the synthetic gene ATCC29174 after optimization; animated images of the trajectories of molecular dynamics of complexes acarbose- α -glucosidase, 6- α -glucosidase, and 7- α -glucosidase; molecular dynamics process; potential acute toxicity of an infusion from *S. ciccinata* in mice assessed by the Lorke method; and inhibition of mammal α -glucosidases of compounds 2–5 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +52-555-622-5289. E-mail: rachel@unam.mx.

ORCID

Rachel Mata: 0000-0002-2861-2768

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CONACyT 219765, DGAPA IN217516 and IA 204116, and PAIP-UNAM 5000-9140. We thank R. del Carmen, I. Rivero-Cruz, M. Gutiérrez, A. Pérez-Vásquez, M. I. Velásquez López, and R. I. del Villar for their valuable technical assistance. We are indebted to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for the resources to carry out computational calculations through the Miztli supercomputing system. L. F.-B. acknowledges CONACyT for a fellowship to pursue graduate studies.

■ REFERENCES

(1) *IDF Diabetes Atlas*, 7th ed.; International Diabetes Federation. Available at <http://www.diabetesatlas.org> (accessed January 10, 2017).

(2) Hung, H.; Quian, K.; Morris-Natschke, S.; Hsu, C.; Lee, K.-H. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 580–606.

(3) Anaya-Eugenio, G.; Rivero-Cruz, I.; Rivera-Chávez, J.; Mata, R. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *155*, 416–425.

(4) Ovalle-Magallanes, B.; Medina-Campos, O. N.; Pedraza-Chaverri, J.; Mata, R. *Phytochemistry* **2014**, *110*, 111–119.

(5) Martínez, A. L.; Madariaga-Mazón, A.; Rivero-Cruz, I.; Bye, R.; Mata, R. *Planta Med.* **2017**, *83*, 534.

(6) Huang, M.-Q.; Zhou, C.-J.; Zhang, Y.-P.; Zhang, X.-Q.; Xu, W.; Lin, J.; Wang, P.-J.; Ahmed Hamed, G. *Cell. Physiol. Biochem.* **2016**, *40*, 933–943.

(7) Fatma Abd-Elkader, M.; Mohamed-Soubhi, M.; Siham Mustafa, E.-S.; Wafaa Mostafa, E. K. *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *64*, 1678–1687.

(8) Estakhr, J.; Javdan, N. *Pharmacologyonline* **2011**, *3*, 354–360.

(9) Perfumi, M.; Arnold, N.; Tacconi, R. *J. Ethnopharmacol.* **1991**, *34*, 135–40.

(10) Eskandani, M.; Bahadori, M. B.; Zengin, G.; Dinparast, L.; Bahadori, S. *Curr. Bioact. Compd.* **2016**, *12*, 34–38.

(11) Bahadori, M. B.; Valizadeh, H.; Asghari, B.; Dinparast, L.; Bahadori, S.; Farimani, M. M. *Curr. Bioact. Compd.* **2016**, *12*, 297–305.

(12) Khan, T.; Zahid, M.; Asim, M.; Shahzad, u.-H.; Iqbal, Z.; Choudhary, M. I.; Ahmad, V. U. *Phytomedicine* **2002**, *9*, 749–752.

(13) Bisio, A.; De Mieri, M.; Milella, L.; Schito, A. M.; Parricchi, A.; Russo, D.; Alfei, S.; Lapillo, M.; Tuccinardi, T.; Hamburger, M.; De Tommasi, N. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 503.

(14) Calderón, G.; Rzedowski, J. *INECOL* **2005**, *135*, 1–163.

(15) López, F. C.; Sánchez, D. M. G.; Arrieta, D.; Román, G. *J. Ciencia y Tecnología* **2010**, *9*, 67–76.

(16) Maldonado, E.; Cárdenas, J.; Bojórquez, H.; Escamilla, E. M.; Ortega, A. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1105–1108.

(17) Bautista, E.; Fragoso-Serrano, M.; Ortiz-Pastrana, N.; Toscano, R. A.; Ortega, A. *Fitoterapia* **2016**, *114*, 1–6.

(18) Bautista, E.; Fragoso-Serrano, M.; Toscano, R. A.; García-Peña, M. R.; Ortega, A. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3280–3282.

(19) Lorke, D. *Arch. Toxicol.* **1983**, *54*, 275–287.

(20) Wojcikowski, K.; Gobe, G. *Phytother. Res.* **2014**, *28*, 22–27.

(21) Ghosh, S.; Rangan, L. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *175*, 1477–1489.

(22) Suzuki, K.; Katsura, D.; Sagara, M.; Aoki, C.; Nishida, M.; Aso, Y. *Intern. Med.* **2016**, *55*, 949–953.

(23) Švehlíková, V.; Bennett, R.; Mellon, F. A.; Needs, P. W.; Piacente, S.; Kroon, P. A.; Bao, Y. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2323–2332.

(24) Bhardwaj, D. K.; Gupta, A. K.; Jain, A.; Shrawat, V. K. *Indian J. Chem.* **1988**, *27B*, 261–263.

(25) Oliveira, M. C. C.; Carvalho, M. G.; Silva, J. C.; Werle, A. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 119–123.

(26) Kumar, N.; Singh, B.; Bhandari, P.; Gupta, A. P.; Sanjay, K.; Vijay, K. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2740–2711.

(27) Du, K.; De Mieri, M.; Neugurger, M.; Zietsman, C. P.; Marston, A.; van Vuuren, S. F.; Ferreira, D.; Hamburger, M.; van der Westhuizen, J. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2494–2504.

(28) Wu, T. H.; Cheng, Y. Y.; Liou, J. R.; Way, T. D.; Chen, C. J.; Kuo, S. C.; El-Shazly, M.; Chang, F. R.; Wu, Y. H.; Liaw, C. C. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 23707–23712.

(29) Omosa, L. K.; Midiwo, J. O.; Derese, S.; Yenesew, A.; Peter, M. G.; Heydenreich, M. *Phytochem. Lett.* **2010**, *3*, 217–220.

(30) Omosa, L. K.; Amugune, B.; Ndunda, B.; Milugo, T. K.; Heydenreich, M.; Yenesew, A.; Midiwo, J. O. *S. Afr. J. Bot.* **2014**, *91*, 58–62.

(31) Toscano, A. R.; Maldonado, A.; Ortega, A.; Cárdenas, J. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **2001**, *C57*, 846–847.

(32) Tan, K.; Tesar, C.; Wilton, R.; Keigher, L.; Badnigg, G.; Joachimiak, A. *FASEB J.* **2010**, *24*, 3939–3949.

(33) Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2000; p 416.

(34) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.

(35) Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 1145–1152.

(36) DeLano, W. L. *The PyMOL molecular graphics system*; DeLano Scientific: San Carlos, USA, 2004 <http://pymol.sourceforge.net/> (accessed January 27, 2017).

(37) Case, T. A. D. A.; Cheatham, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Swails, J.; Goetz, A. W.; Kolossvai, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R. M.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M. J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Salomon-Ferrer, R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. *AMBER 12*; University of California: San Francisco, CA, 2012.

(38) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A., Jr.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688.

(39) Walker, R. C.; Crowley, M. F.; Case, D. A. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1019–1031.

(40) Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Palmo, K.; Maragakis, P.; Klepeis, J. L.; Dror, R. O.; Shaw, D. E. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2010**, *78*, 1950–1958.

(41) Roe, D. R.; Cheatham, T. E. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084–3095.

(42) Treesuwan, W.; Hannongbua, S. *J. Mol. Graphics Modell.* **2009**, *27*, 921–929.

(43) Zhou, Z.; Madura, J. D. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2004**, *57*, 493–503.

Article

α -Glucosidase Inhibitors from *Vauquelinia corymbosa*

Laura Flores-Bocanegra ¹, Araceli Pérez-Vásquez ¹, Mariana Torres-Piedra ¹, Robert Bye ², Edelmira Linares ² and Rachel Mata ^{1,*}

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; E-Mails: cecilau.gem@gmail.com (L.F.-B.); peva01@yahoo.com.mx (A.P.-V.); torrespiedra@gmail.com (M.T.-P.)

² Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; E-Mails: rbyeunam@ib.unam.mx (R.B.); mazari@ib.unam.mx (E.L.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: rachel@unam.mx; Tel.: +52-55-5622-5289.

Academic Editor: Isabel C. F. R. Ferreira

Received: 4 July 2015 / Accepted: 18 August 2015 / Published: 21 August 2015

Abstract: The α -glucosidase inhibitory activity of an aqueous extract and compounds from the aerial parts of *V. corymbosa* was demonstrated with yeast and rat small intestinal α -glucosidases. The aqueous extract inhibited yeast α -glucosidase with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 28.6 μ g/mL. Bioassay-guided fractionation of the extract led to the isolation of several compounds, including one cyanogenic glycoside [prunasin (**1**)], five flavonoids [(–)-epi-catechin (**2**), hyperoside (**3**), isoquercetin (**4**), quercitrin (**5**) and quercetin-3-*O*-(6''-benzoyl)- β -galactoside (**6**)] and two simple aromatic compounds [picein (**7**) and methylarbutin (**8**)]. The most active compound was **6** with IC₅₀ values of 30 μ M in the case of yeast α -glucosidase, and 437 μ M in the case of the mammalian enzyme. According to the kinetic analyses performed with rat and yeast enzymes, this compound behaved as mixed-type inhibitor; the calculated inhibition constants (K_i) were 212 and 50 μ M, respectively. Molecular docking analyses with yeast and mammalian α -glucosidases revealed that compound **6** bind differently to these enzymes. Altogether, the results of this work suggest that preparations of *V. corymbosa* might delay glucose absorption *in vivo*.

Keywords: diabetes; yeast and rat α -glucosidases; *Vauquelinia corymbosa*

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disorder whose prevalence has been increasing steadily all over the world [1]. In 2014, around 348 million people worldwide had T2DM, 77% of which lived in low- and middle-income countries [2,3]. Furthermore, the prevalence of T2DM in the next two decades will increment by 53% due to increase in ageing population [2,3]. The disease results from defects in insulin secretion, insulin action, or both, and it is characterized by a chronic hyperglycemia state [1].

The best treatment for T2DM is based on an adequate control of the hyperglycemia condition, which is possible to achieve with a healthy lifestyle and appropriate pharmacological therapies [4]. These treatments include drugs that promote insulin secretion (sulfonylureas) or utilization (biguanides and thiazolidinediones) and, drugs that reduce the rate of carbohydrate absorption from the gastrointestinal tract and decrease postprandial glucose peak [4]. The latter group includes α -glucosidase inhibitors, of which acarbose and miglitol are the most widely used [5,6]. In recent years substantial efforts have been made to discover new natural effective α -glucosidase inhibitors useful for the development of new remedies; in this regard medicinal plants have shown to be valuable sources of these inhibitors [7].

In contemporary Mexico, an infusion of *Vauquelinia corymbosa* Bonlp (Rosaceae) is regarded as useful for the treatment of diabetes [8,9]. Therefore, this species was considered as potential source of α -glucosidase inhibitors suitable for the development of new antidiabetic drugs. Previous phytochemical studies of the aerial parts of *V. corymbosa* resulted in the isolation and characterization of three triterpenoids, namely ursolic and betulinic acids as well as uvaol [10].

2. Results and Discussion

2.1. Isolation of α -Glucosidase Inhibitors from *V. corymbosa*

An aqueous extract (AE) of *V. corymbosa* inhibited in a concentration-dependent manner ($IC_{50} = 28.5 \mu\text{g/mL}$) the enzymatic activity of yeast α -glucosidase when tested by a well-known spectrophotometric assay [11]. This result suggested the presence in AE of active compounds with potential antihyperglycemic properties. Fractionation of the active extract led to the isolation of one cyanogenic glycoside [prunasin (**1**) [12,13]], several flavonoids [*(-)*-*epi*-catechin (**2**) [14], hyperoside (**3**) [15], isoquercetin (**4**) [16,17], quercitrin (**5**) [18], and quercetin-3-*O*-(6''-benzoyl)- β -galactoside (**6**) [19]] and two simple aromatic compounds [picein (**7**) [20] and methylarbutin (**8**) [21]]. Compounds **1–8** (Figure 1) were identified by comparison of their spectroscopic and spectrometric data with those previously described. Compound **6** belongs to a rare group of flavonoid glycosides benzoylated at some point of the sugar moiety; this is the second report of its detection in nature.

All isolates were tested against yeast and mammalian α -glucosidases; acarbose and compounds **2–4**, which are well-characterized α -glucosidase inhibitors [22–24], were used as positive control. The most effective compounds against both enzymes were **4** and **6** (Table 1). The better activity of compound **6** in comparison with **3** suggested that benzoylation at C-6'' of the sugar moiety increased notably the inhibitory activity against both enzymes. On the other hand, the nature of the sugar seems to have an impact on the inhibitory action *in vitro* since the glucoside **4** was more active than the galactoside **3** and rhamnoside **5**. Although flavonoids are well known α -glucosidase inhibitors, this is the first report regarding the α -glucosidase inhibitory properties of a cyanogenic glucoside, which as catechin (**2**) was

more active against the yeast enzyme. On the contrary, picein (**7**) was more active against the rat mixture of enzymes. In any case, the active extract of *V. corymbosa* contains compounds capable of inhibiting yeast, and mammalian α -glucosidases. The effect on the latter enzyme correlated well with the potential antihyperglycemic action of this species.

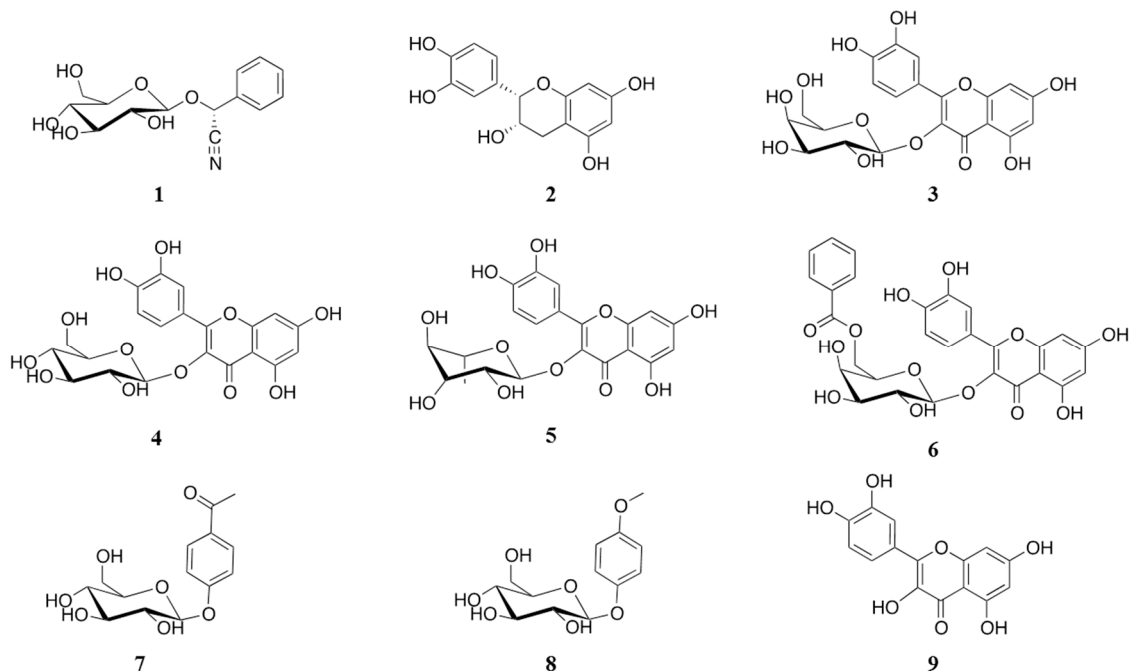


Figure 1. Structure of compounds **1–8** isolated from *V. corymbosa* and quercetin (**9**).

Table 1. Effect of compounds **1–9** on the enzymatic activity of yeast and rat small intestinal α -glucosidases.

Sample	Yeast		Rat Small Intestinal	
	IC ₅₀ (mM) ^a	Maximum Inhibition (%)	IC ₅₀ (mM) ^a	Maximum Inhibition (%)
Acarbose ^b	0.50 ± 0.23	89.7	0.10 ± 0.003	80.2
1	1.60 ± 0.07	95.2	ND	44.5 ^d
2 ^b	0.30 ± 0.02	99.6	ND	15.2 ^d
3 ^b	0.40 ± 0.02	67.8	1.98 ± 0.15	65.1
4 ^b	0.06 ± 0.005	99.0	1.63 ± 0.11	71.0
5	ND ^c	45.0	3.34 ± 0.38	59.7
6	0.03 ± 0.006	95.6	0.43 ± 0.03	75.8
7	Inactive	-	10.68 ± 0.96	52.6
8	Inactive	-	ND	39.3 ^d
9	0.03 ^e	ND	0.216 ^e	ND

^a Values present mean ± SD of triplicate experiments; ^b Positive controls; ^c Non-determined; ^d % Inhibition obtained with 10.0 mM of inhibitor; ^e values taken from reference [22].

It is interesting to point out, that infusions or decoctions from other plants containing cyanogenic glycosides such as *Eriobotrya japonica* and *Prunus amygdalus* are used also as antidiabetic agents in several Eastern countries [25,26]. However, animal studies conducted with amygdalin and other cyanogenic did not revealed hypoglycemic action [25]. Therefore, it is highly probable that amygdalin

and congeners also inhibit the activity of α -glucosidases. The presence in *V. corymbosa* of compounds 3–5 could have important implications on the *in vivo* activity of the plant, since upon consumption of its phytopreparations quercetin could be readily generated to exert its well-known hypoglycemic and α -glucosidase inhibitory activities [27,28].

2.2. Mode of Inhibition of Yeast and Mammalian α -Glucosidases and Molecular Docking for Compound 6

Kinetic analysis of 6 revealed that it behaved as a mixed type inhibitor, which is common among natural products [29,30]. Figures 2 and 3 show its Lineweaver-Burk plots; the calculated K_i values were 0.05 ± 0.02 mM ($R^2 = 0.9925$) for yeast α -glucosidase and 0.212 ± 0.031 mM ($R^2 = 0.9944$) for the mammalian enzyme. Thus, compound 6 can bind both the free enzymes and the enzyme-substrate complexes.

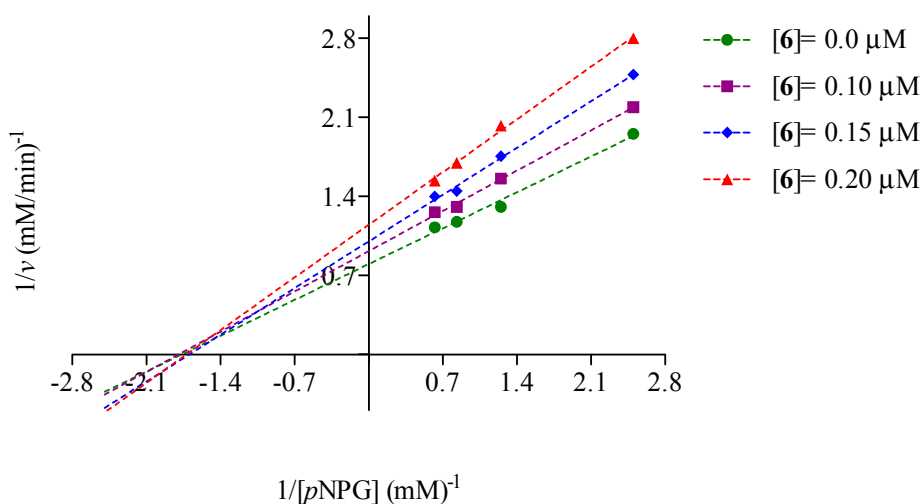


Figure 2. Lineweaver-Burk plot of yeast α -glucosidase inhibition of 6.

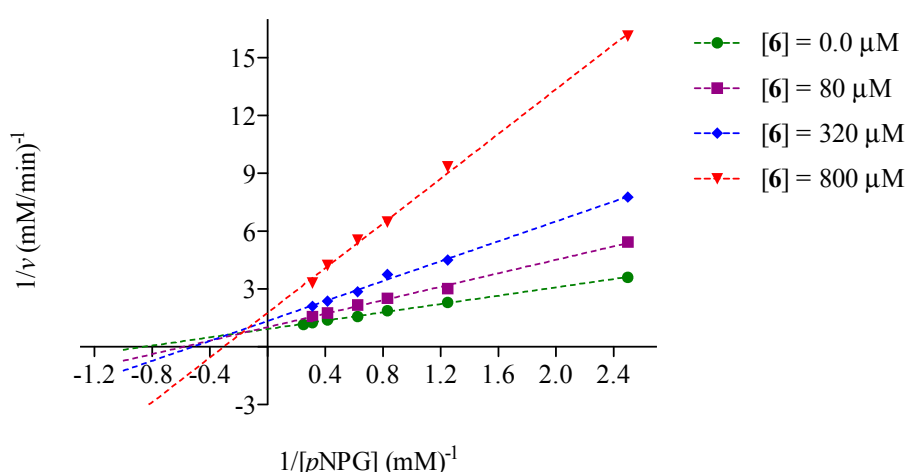


Figure 3. Lineweaver-Burk plot of small intestinal rat α -glucosidase inhibition of 6.

In order to predict the binding mode of compound 6 to yeast and mammalian α -glucosidases, docking analyses with yeast isomaltase, human N-terminal sucrase isomaltase (3LPP), human N-terminal maltase glucoamylase (2QMJ) and human C-terminal maltase glucoamylase (3TOP) were performed. The

human enzymes were selected because its similarity to the rat small intestinal enzymes. In general, the ligands were docked into the entire enzyme, and the best conformations observed in this preliminary study were docked into a smaller area, in order to refine the results (Figures 4 and 5).

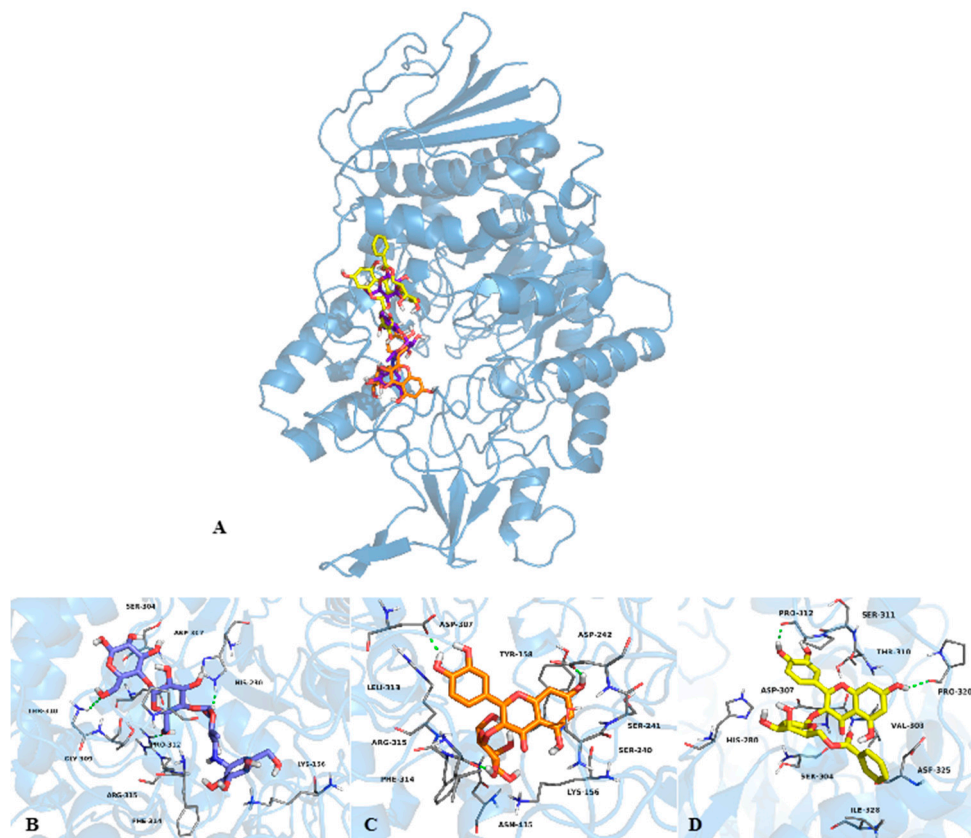


Figure 4. (A) Structural model of the complex acarbose (purple sticks), **4** (orange sticks) and **6** (yellow sticks) with yeast α -glucosidase; 3D representation of the interaction between acarbose (B); **4** (C) and **6** (D) with the enzyme in the predicted binding site.

The docking study with compound **6** predicted that it binds to yeast isomaltase near to the catalytic site, forming two hydrogen bonds with Pro312 and Pro320 through the hydroxyl groups at C-2' and C-7 respectively; other interactions involved Van der Waals forces with His280, Ser311, Thr310, Val308, Ser304, Asp325, Ile328 and Asp307 (Figure 4D). On the other hand, compound **3**, which was included for comparative purpose, bind at the catalytic site, forming hydrogen bonds between Asp307, Leu313 and Asp242 and the hydroxyl groups at C-4', C-2'' and C-7, respectively; Van der Waals forces interactions were observed throughout Phe314, Asn415, Lys156, Ser240, Tyr158, Ser241 and Arg315 (Figure 4C). Compounds **3** and **6** bind to yeast isomaltase similarly to other flavonoids, with their B rings embedded deep inside the binding cavity and, rings A and C flanking out (Supplementary Data Figures S15 and S16) [31]. The analysis with 3TOP predicted that **6** posed in the same site of acarbose forming four hydrogen bonds between the hydroxyl groups at C-3', C3'' and C-2'', and the aminoacids Trp1369, Arg1510 and Asp1157; Van der Waals interactions between **6** and the aminoacids Asp1526, Phe1560, Phe1559, Met1421, Trp1355, Asp1420, Try1251, Thr1586, Ile1315, Ile1280 and Asp 1279 were also observed (Figure 5, panels B and E). With 2QMJ (Figure 5, panels C and F), compound **6** bind in a site far away from that of acarbose, and formed four hydrogen bonds between the hydroxyl groups at C-5, C-7, C4' and C-4'',

and the aminoacids Lys534, Arg520, Thr778 and Ala780; Van der Waals interactions were established with Lys513, Phe535, Asn518, Lys776, Asp777, Leu286, Ala285, Val779 and His645. Finally, flavonol **6** interacted with 3LPP (Figure 5, panels A and D) in a place close to the catalytic site. The compound formed also four hydrogen bonds between the hydroxyl groups at C-5, C-2'', C3'' and the oxygen of the γ -pyran moiety, and the aminoacids Ile808, Arg563, Leu311 and Lys805; Van der Waals interactions were established with Glu538, His569, Lys805, Met314, Arg549, His674, Gln809, Val675, Asp806 and 563.

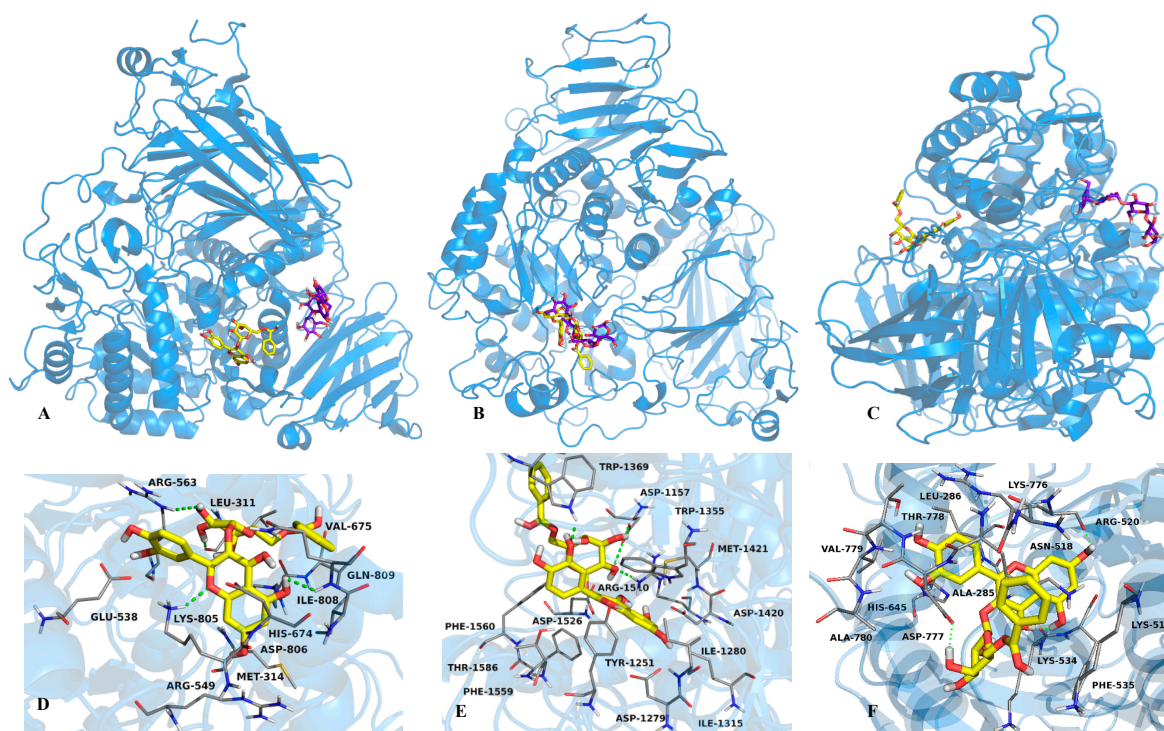


Figure 5. Structural models of the complexes acarbose (purple sticks) and **6** (yellow sticks) with 3LPP (A), 3TOP (B) and 2QMJ (C) enzymes; 3D representation of the interactions between **6** and the enzymes 3LPP (D); 3TOP (E) and 2QMJ (F), in the predicted binding sites.

The molecular docking analyses with yeast and mammalian α -glucosidases revealed that compound **6** bind differently to these enzymes. The calculated binding constants (K_i) revealed also different affinities. Thus, compound **6** showed the smallest inhibition constant for the N-terminal maltase glucoamylase ($K_i = 70.6$ nM), followed for the C-terminal maltase glucoamylase ($K_i = 133.1$ μ M), the N-terminal sucrase isomaltase ($K_i = 2.3$ mM), and finally for the yeast isomaltase ($K_i = 42.6$ mM). These results contrasted with the experimental results since compound **6** was more active against the yeast isomaltase than against the mixture of rat intestinal enzymes. Kinetic analysis with purified individual proteins will provide conclusive idea about compound **6**'s α -glucosidase binding preference.

2.3. Determination of Acute Toxicity Studies of Some Extracts of *V. corymbosa*

The presence of prunasin, a cyanogenetic glycoside and the fact that this species is consumed in folk medicine practices prompted us to assess the potential toxic effects of AE and an organic extract (OE) from *V. corymbosa*. For this endeavor the Lorke method was employed [32]. In the case of AE, no animal

death was recorded during the two phases of the test, and no damage of internal organs was recorded on macroscopic inspection. The median lethal dose (LD₅₀) for AE was estimated to be higher than 5 g/kg. However, OE caused the typical signs of cyanosis since purple coloration was observed in upper and lower limbs, ears and nose; however, no appreciable damage of internal tissues or main organs was detected; the calculated LD₅₀ was 2.6 g/kg. These results suggested a higher content of prunasin in OE (0.23% in OE vs. 0.05% in AE). In this regard, it is well known that enzymatic hydrolysis of cyanogenic glycosides is enhanced by several factors, including temperature; thus, during preparation of the infusion with boiling water prunasin could have been hydrolyzed to benzaldehyde and the highly toxic hydrogen cyanide (HCN), which volatilized [33,34]. Accordingly, HPLC analysis of the infusion (Supplementary Data Figure S1) showed that **1** was one of the minor compounds detectable in this preparation. The remaining isolated compounds were also identified in the resulting representative chromatogram of the infusion (Supplementary Data Figure S1). Although AE did not produce significant acute toxic effects in mice, it is important to alert consumers about the risk of the long-term use of this medicinal plant.

3. Experimental Section

3.1. General Procedures

NMR spectra [400 MHz (¹H-NMR) or 100 (¹³C-NMR)] including COSY, HMBC and HSQC experiments were recorded in CH₃OH-*d*₄ or DMSO-*d*₆ solution on a Unity Inova 400 spectrophotometer (Varian, Palo Alto, CA, USA) using tetramethylsilane (TMS) as internal standard. HPLC analyses were carried out in a Waters HPLC instrument equipped with a Waters 996 UV photodiode array detector (900) set at 205–400 nm (Waters, Milford, MA, USA). Control of equipment, data acquisition processing and management of chromatographic information were performed by the Empower 2 software package (Waters). TLC analyses were performed on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck, Kenilworth, NJ, USA), and visualization of plates was carried out using a Ce₂(SO₄)₃ (10%) solution in H₂SO₄. For open column chromatography (OCC), Silica gel 60 (0.063–0.200 mm), 70–230 mesh (Merck), or Sephadex[®] LH-20 (Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA) was employed.

3.2. Plant Material

Branches and leaves of *V. corymbosa* were collected on 26 February 2012, in San Borja Chihuahua, Mexico. The plant was identified by R. Bye and E. Linares. A voucher specimen (R. Bye and E. Linares 36951) has been deposited at the National Herbarium (MEXU), UNAM, Mexico City, Mexico.

3.3. Preparations of Extracts

Dried and ground aerial parts (500 g) were extracted with 14 L of boiling water during 30 min, then filtered and dried to yield an aqueous extract (AE, 14.0 g). The infusion was extracted with ethyl acetate (EtOAc, 3 × 14 L) to produce two fractions, namely EtOAc-soluble (ESF, 5.5 g) and H₂O-soluble fractions (WSF, 8.5 g). ESF and WSF were tested in the enzymatic assay; ESF was the most effective, inhibiting the activity of the yeast enzyme by 92% at the concentration of 100 µg/mL and that of the rat small intestine by 50% at the same concentration. The organic extract (OE) was prepared by macerating

dried and ground aerial parts (50 g) with a solvent mixture of CH₂Cl₂/CH₃OH (1:1) during 15 days; after filtering, the extract was dried *in vacuo* to yield a brown residue (OE, 10.7 g).

3.4. Isolation of the Active Compounds from the Active EtOAc-Soluble Fraction

ESF (5.5 g) was dissolved in CH₃OH and then separated by Sephadex chromatography to give ten secondary fractions (ESF1–ESF10) of which ESF3 and ESF6 were active. These two fractions, along inactive fractions ESF2, ESF4 and ESF7 were next chemically investigated. ESF3 (363 mg) was dissolved in CH₃OH; after two h, 250 mg of **1** (0.05% of dry wt of plant material) spontaneously crystallized. ESF6 (85.0 mg) was separated by HPLC (SymmetryPrep RP-C8, CH₃CN/H₂O 20:80, 2.6 mL/min) to give 15 mg of **3**, 5 mg of **4**, 8 mg of **5** and 50 mg of **6** (*R*_t = 5.0, 5.5, 6.6 and 16.4 min, respectively). ESF2 (639 mg) was dissolved in CH₂Cl₂/CH₃OH (1:1), from this solution crystallized 560 mg of **7**. ESF4 (119 mg) was further chromatographed on a silica gel (100 g) column, eluting with hexane with increasing amounts of EtOAc (50:50→0:100), and then with a mixture of increasing the polarity of EtOAc/CH₃OH (0:100→80:20); altogether, this process yielded four secondary fractions (EFS4-1 EFS4-4); from fraction EFS4-3, eluted with hexane/EtOAc (8:2), 5 mg of compound **8** were obtained. EFS7 (580 mg) was dissolved in CH₃OH and column chromatographed on Sephadex to yield 210 mg of compound **2**.

3.5. α -Glucosidase Inhibitory Assays

AE, ESF, WSF, acarbose and compounds (**1–8**) were dissolved in CH₃OH or phosphate buffer solution (PBS, 100 mM, pH = 7). Aliquots of 0–10 μ L of testing materials (triplicated) were incubated for 10 min with 20 μ L of an enzyme solution of yeast α -glucosidase (Sigma-Aldrich, 0.4 units/mL in PBS) or mammalian α -glucosidase (Sigma-Aldrich, 40 mg). The mammalian enzyme was separated from rat intestinal acetone powder, which was hand homogenized using 1 mL of ice-cold PBS. After sonicating during ten min, the content was centrifuged at 6400 rpm for 10 min (Microfuge Qualitron, Inc., Albany, NY, USA). The supernatant was recovered and used for the *in vitro* assay.

After incubation with the enzymes 10 μ L of *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (*p*NPG 5 mM and 10 mM in PSB, respectively) were added and then incubated for 20 min at 37 °C. Then, absorbances were determined in a BIO-RAD microplate reader model 680 at 405 nm [11].

The concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50% (IC₅₀) was calculated by regression analysis, using the following equation [35]:

$$\%Inhibition = A_{100}/1 + (I/IC_{50})^s \quad (1)$$

where, *A*₁₀₀ is the maximum inhibition, *I* is inhibitor concentration and *s* is the degree of cooperation.

3.6. Kinetic Analyses

Mode of inhibition of compound **6** against yeast/mammalian α -glucosidase activity was measured with increasing concentrations of *p*NPG (0.4, 0.8, 1.2, 1.6 and 2.0 mM/0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4, 3.2, 3.6 and 4.0 mM, respectively) as a substrate, in the absence and presence of **6** at 0.1, 0.15 and 0.2 μ M for yeast enzyme and 80, 320 and 800 μ M for the mammalian enzyme.

The mode of inhibition was determined by the Lineweaver-Burk plots. The inhibition constants were calculated using the following equation [36]:

$$v = V_{\max} \times S / K_m (1 + [I] / K_i) + S (1 + [I] / \alpha K_i) \quad (2)$$

where v is the initial velocity in absence and presence of inhibitor; S and I are concentration of substrate and inhibitor, respectively; V_{\max} is the maximum velocity; K_m is the Michaelis-Menten constant; K_i is the competitive inhibition constant and αK_i is the uncompetitive inhibition constant. The kinetic data was analyzed using a computer program for nonlinear regressions (Graph Pad Prism 5.0, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

3.7. Docking Studies

Yeast isomaltase (PDB:3A4A), N-terminal sucrose isomaltase (PDB:3LPP), N-terminal maltase glucoamylase (PDB:2QMJ) and C-terminal maltase glucoamylase (PDB:3TOP) were used in this study as molecular target and crystallographic structures were downloaded from the Protein Data Bank (PDB). All hydrogen and Kollman charges were assigned to receptors using AutoDockTools 1.4.5 with a semi-empirical mathematical method (PM3). The ligands (**3**, **6** and acarbose) were built using Spartan 2.0 and optimized geometrically with HyperChem 8.0; the ligands were prepared by assigning the atomic charges and nonpolar hydrogens using AutoDockTools 1.5.4 [37]. Docking studies were done with Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) using the program AutoDock4.0 [38]. Grid box for docking was set around central atom of the ligand with dimension of $126 \times 126 \times 126 \text{ \AA}$ in the x , y and z dimensions. The results were analyzed with AutoDockTools 1.5.4 [37] and PyMOL [39].

3.8. Isolation of Compound **1** from OE of *V. corymbosa*

OE (10.7 g) was separated by chromatography on a silica gel column, eluting with hexane with increasing amounts of EtOAc (10:0→7:3); this process yielded three secondary fractions (OE1–OE3); fraction OE2 (250 mg, eluted with hexane/EtOAc (8.5:1.5), afforded 115 mg of compound **1** (0.23% of dry wt of plant material). This activity was performed in order to compare the yields of **1** in aqueous and organic extracts.

3.9. Chromatographic Techniques

The chromatographic profile of AE was obtained by reverse-phase HPLC (Symmetry C18 column, $5 \mu\text{m}$, 4.6 mm internal diameter \times 150 mm) using a as mobile phase $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (acidified with 0.05% of CH_3COOH) 2:8, and increasing linearly to 5:5 over 20 min; the latter conditions were held for 5 min, and then changed to 2:8 for 5 min and holding during 15 min. The flow rate was 0.6 mL/min and the injection volume was 20 μL .

3.10. Determination of Acute Toxicity for AE and OE

Experiments were performed on male mice ICR (body weight, 25–30 g), obtained from Centro UNAM/Harlan (Harlan Mexico, S.A. de C.V., Mexico City, Mexico). All experiments were performed following the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999). Mice were

housed in a climate and light controlled room with a 12 h light/dark cycle. Four h before experiments, food was withheld, but animals had free access to drinking water. The extracts (AE and OE) were suspended in vehicle (saline solution 0.9%). The concentrations were adjusted to orally administrate 0.2 mL/10 g of body weight. Mice were treated in two phases: In the first one, doses of 10, 100 and 1000 mg/kg ($n = 3$ per dose) and, in the second, doses of 1600, 2900 and 5000 mg/kg ($n = 3$ per dose) of extracts were administered. In both stages, mice were observed daily in a period of 14 days for mortality, toxic effects and/or changes in behavioral pattern [32].

4. Conclusions

The information generated in this study indicates that *V. corymbosa* is a source of new α -glucosidase inhibitors. Compound **6** showed good potential for the development of new chemical entities useful for the treatment of diabetes. Further *in vivo* studies are necessary to demonstrate its antihyperglycemic action. On the other hand, the presence in the plant of compounds **3–5** with known antidiabetic properties in animal models [40,41] might explain the reputed antidiabetic activity of *V. corymbosa* in Mexican folk medicine. Health Authorities should inform consumers about the risks of inappropriate usage of this species since it contains large amounts of cyanogenic glucosides.

Supplementary Materials

Supplementary materials can be accessed at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/08/15330/s1>.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from CONACyT (219765) and DGAPA (IN212913) awarded to R. Mata. We thank I. Rivero, A. Madariaga, Ramiro del Carmen, Georgina Duarte-Lisci, Marisela Gutiérrez and Rosa Isela del Villar for their valuable technical assistance. We are indebted to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for providing the resources to carry out computational calculations through the NES system.

Author Contributions

L.F.-B., performed the isolation and structure determination of the compounds, conducted pharmacological studies, and wrote the manuscript since this work was taken in part from her Ph.D. thesis; A.P.-V., and M.T.-P., contributed to the toxicological studies; R.B., and E.L., collected and provided the plant material; and R.M. organized and directed this work and supervise the writing of manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bilous, R.; Donnelly, R. *Handbook of Diabetics*, 4th ed.; Wiley-Blackwell: Solaris South Tower, Singapore, 2010.
2. Scully, T. Diabetes in numbers. *Nature* **2012**, *485*, S2–S3.
3. International Federation of Diabetes. *Diabetes Atlas IFD*, 6th ed.; International Federation of Diabetes: Brussels, Belgium, 2013.
4. Israili, H.Z. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Ther.* **2011**, *18*, 117–152.
5. Moorthy, N.S.; Ramos, M.; Fernandes, P. Studies on α -glucosidase inhibitors development: Magic molecules for the treatment of carbohydrate mediated diseases. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 713–720.
6. Asano, N. Sugar-mimicking glycosidase inhibitors: Bioactivity and application. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1479–1492.
7. Mata, R.; Cristians, S.; Escandón-Rivera, S.; Juárez-Reyes, K.; Rivero-Cruz, I. Mexican antidiabetic herbs: Valuable source of inhibitors of α -glucosidase. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 468–483.
8. Cruz-Angón, A.; Melgarejo, E.D.; Contreras, A.V.; González, M.A. *La Biodiversidad en Guanajuato: Estudios de Estado*; CONABIO: México City, Mexico, 2012.
9. Rzedowski, J.; Calderón, G. *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*; INECOL: Jalapa, Mexico, 2005.
10. Trumbull, E.R.; Bianchi, E.; Eckert, D.S.; Wiedhopf, M.; Cole, J.R. Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae). *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 1407–1408.
11. Oki, T.; Matsui, T.; Osajima, Y. Inhibitory effect of α -glucosidase, inhibitors varies according to its origin. *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, *47*, 550–553.
12. Nicollier, F.G.; Pope, F.D.; Thompson, C.A. Biological activity of dhurrin and other compounds from Johnson grass (*Sorghum halepense*). *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 744–748.
13. Isaza, J.H.; Ito, H.; Yoshida, T. A flavonol glycoside-lignan ester and accompanying acylated glucosides from *Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 321–327.
14. Davis, A.L.; Cai, Y.; Davies, A.P. ^1H - and ^{13}C -NMR Assignments of some green tea polyphenols. *Magn. Reson. Chem.* **1996**, *34*, 887–890.
15. Wei, Y.; Ito, Y. Isolation of hyperoside and luteolin-glucoside from *Agrimonia pilosa* ledeb using stepwise elution by High-Speed Countercurrent Chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2007**, *30*, 1465–1473.
16. Napolitano, J.G.; Lankin, D.C.; Chen, S.; Pauli, F.G. Complete ^1H -NMR spectral analysis of ten chemical markers of *Ginkgo biloba*. *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, 569–575.
17. Bouktaib, M.; Atmani, A.; Ronaldo, C. Regio and stereoselective synthesis of the major metabolite of quercetin, quercetin-3-*O*- β -D-glucuronide. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6263–6266.
18. Hasan, S.; Ahmed, I.; Mondal, S.; Uddin, J.S.; Masud, M.M.; Sadhu, K.S.; Ishibashi, M. Antioxidant, antinociceptive activity and general toxicity study of *Dendrophthoe falcate* and isolation of Quercitrin as the major component. *Orient. Pharm. Exp. Med.* **2006**, *6*, 355–360.
19. Vvedenskaya, I.O.; Rosen, T.R.; Guido, E.J.; Russell, J.O.; Millis, A.K.; Vorsa, N. Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 188–195.

20. Schroeder, C.; Lutterbach, R.; Stöckigt, J. Preparative biosynthesis of natural glucosides and fluorogenic substrates for β -glucosidases followed by *in vivo* ^{13}C -NMR with high density plant cell cultures. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 925–934.
21. Lutterbach, R.; Stockigt, J. Dynamics of the biosynthesis of methylursubin plant cells employing *in vivo* ^{13}C -NMR without labeling. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 801–806.
22. Yin, Z.; Zhang, W.; Feng, F.; Zhang, Y.; Kang, W. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Sci. Hum. Wellness* **2014**, *3*, 136–174.
23. Islam, N.; Jung, A.H.; Sohn, S.H.; Kim, M.H.; Choi, S.J. Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. *Arch. Pharm. Res.* **2013**, *36*, 542–552.
24. Qin, L.Y.; Zhou, C.F.; Gao, F.; Bain, S.J.; Shan, F. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of α -glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11463–11468.
25. Zhou, X.; Liu, B.; Liu, L.; Lou, Y.; Guo, J.; Ye, J. Manufacture of Vinegar Containing *Eriobotrya japonica* Extract. CN 101096629, 2 January 2008.
26. Khayat, E. Pharmaceutical composition for alleviating excess levels of sugar in diabetic patients. U.S. Patent US2006/0257508 A1, 16 November 2006.
27. Kim, S.H.; Jo, S.H.; Kwon, Y.I.; Hwang, J.K. Effects of onion (*Allium cepa* L.) extract administration on intestinal α -glucosidases activities and spikes in postprandial blood glucose levels in SD rats model. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 3757–3769.
28. Khayat, E.; Sinai, Y.M. Pharmaceutical Composition for Alleviating Excess Levels of Sugar in Diabetic Patients. U.S. Patent US2006/025750 A1, 16 February 2006.
29. Xu H. Inhibition kinetics of flavonoids on yeast α -glucosidase merged with docking simulations. *Prot. Pep. Lett.* **2010**, *17*, 1270–1279.
30. Priscilla, D.H.; Roy, D.; Suresh, A.; Kumar, V.; Thirumurugan, K. Naringenin inhibits α -glucosidase activity: A promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *210*, 77–85.
31. Tadera, K.; Minami, Y.; Takamutsu, K.; Matsuoka, T. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2006**, *52*, 149–153.
32. Lorke, D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **1983**, *54*, 275–287.
33. Johansen, H.; Rasmussen, H.L.; Olsen, E.C.; Hansen, B. Rate of hydrolysis and degradation of the cyanogenic glycoside-dhurrin in soil. *Chemosphere* **2007**, *67*, 259–266.
34. Zagrobelny, M.; Bak, S.; Lindberg, M.B. Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1457–1468.
35. Copeland, R.A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed.; Wiley-VCH: New York, NY, USA, 2000.
36. Segel, I.H. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*; John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 1993.
37. Dallakyan, S. MGL Tools. Available online: <http://mgl-tools.scripps.edu> (accessed on 14 March 2015).
38. Morris, G.G.; Goodsell, D.S.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Hart, W.E.; Kurowski, S.; Halliday, S.; Belew, R.; Olson, A.J. AutoDock. Available online: <http://autodock.scripps.edu> (accessed on 14 March 2015).

39. Rivera-Chávez, J.; González-Andrade, M.; Gonzáles, M.C.; Glenn, A.; Mata, R. Thielavins A, J and K: α -Glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* **2013**, *94*, 198–205.
40. Kurakane, S.; Yamada, N.; Sato, H.; Igarashi, K. Anti-diabetic effects of *Actinidia arguta* polyphenols on rats and KK-A y mice. *Food Sci. Technol. Res.* **2011**, *17*, 93–102.
41. Babujanathanam, R.; Kavitha, P.; Mahadeva-Rao, U.S.; Pandian, M.R. Quercitrin a bioflavonoid improves the antioxidant status in streptozotocin: Induced diabetic rat tissues. *Mol. Cell. Biochem.* **2011**, *358*, 121–129.

Sample Availability: Samples of the compounds **1–8** are available from the authors.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).