



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto antihiper glucémico de *Bauhinia divaricata* L. (Leguminosae)

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
ALEJANDRA PEDRO ANGELES



Ciudad de México

2019



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 M. en C. Marlene Osiris Carreón Aguilar

VOCAL Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SECRETARIO Dra. Berenice Ovalle Magallanes

1er SUPLENTE M. en C. Itzel Susana de la Rosa Lara

2do. SUPLENTE M. en C. Ariana Elizabeth Vargas Castillo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO DE TESIS

Laboratorio 124, Edificio E, Departamento de Farmacia

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

TUTORA

Dra. Berenice Ovalle Magallanes

SUPERVISOR TÉCNICO

SUSTENTANTE

Alejandra Pedro Angeles

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por proporcionarme todos los recursos para continuar y enriquecer mi formación académica y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento provisto al Proyecto A1_S_11226 y a la Universidad Nacional Autónoma de México con el proyecto PAIP 5000-9140.

Al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) por ser becaria-ayudante de investigador nivel III durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por brindarme la oportunidad y confianza de formar parte de su equipo de trabajo y por proporcionarme todas las herramientas para emprender este proyecto.

A la Dra. Berenice Ovalle Magallanes por guiarme durante el desarrollo de este proyecto. Agradezco su confianza, dedicación, compromiso y paciencia.

Al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar y a la M. en C. Marlene Osiris Carreón Aguilar, que dedicaron tiempo en leer, revisar y mejorar la versión final de esta tesis.

Al M. en C. Rafael Torres Colín, del Instituto de Biología de la UNAM por la identificación botánica del material vegetal empleado en esta investigación.

Al M. en C. Manuel Rangel Grimaldo por su colaboración en los ensayos enzimáticos.

A la MVZ Lucía Macías Rosales y al M. en C. Héctor Ariel Rico Morales, técnicos de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) Facultad de Química, UNAM, así como a todo el personal que en esta labora, por el apoyo técnico y las facilidades otorgadas para la realización de las evaluaciones farmacológicas.

Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, por el registro de los espectros de CG-EM, IR y RMN.

A mis compañeros del Laboratorio 124 de la Facultad de Química por sus consejos y hacer los días amenos.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	8
Lista de Figuras	6
Lista de Tablas	7
Resumen	9
1. Antecedentes	11
1.1 Diabetes mellitus: una enfermedad global	11
1.2 Generalidades sobre diabetes mellitus	12
1.3 Complicaciones de la diabetes mellitus	14
1.4 Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus	14
1.5 Uso de plantas medicinales para tratar la diabetes mellitus	17
1.6 Generalidades del género <i>Bauhinia</i>	18
1.7 Generalidades sobre <i>Bauhinia divaricata</i>	18
1.7.1 Taxonomía y distribución geográfica	18
1.7.2 Antecedentes etnobotánicos y etnofarmacológicos	20
2. Planteamiento del problema	21
3. Hipótesis	22
4. Objetivos	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos particulares	22
5. Parte experimental	23
5.1 Material vegetal	23
5.2 Preparación de los extractos de <i>B. divaricata</i>	23
5.3 Evaluación farmacológica preclínica	23
5.4 Preparación y administración de los tratamientos	24
5.5 Evaluación de la toxicidad aguda	24
5.6 Evaluación del potencial antihiper glucémico	25
5.6.1 Obtención de muestras sanguíneas y determinación de glucemia	25
5.6.2 Prueba de tolerancia a la glucosa oral	25
5.6.3 Prueba de tolerancia a la sacarosa oral	25
5.6.4 Prueba de tolerancia al almidón oral	26

5.7 Evaluación <i>in vitro</i> sobre las enzimas α -glucosidasas.....	26
5.8 Pruebas de identidad química.....	27
5.8.1 Métodos espectroscópicos.....	27
5.8.2 Perfiles cromatográficos.....	27
5.8.2.1 Análisis por cromatografía de capa fina.....	27
5.8.2.2 Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.....	27
5.8.2.3 Análisis <i>por</i> cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	28
5.8.2.4 Análisis de los compuestos volátiles por la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME).....	28
6. Resultados y discusión.....	30
6.1 Evaluación farmacológica preclínica.....	30
6.1.1 Seguridad: Toxicidad aguda en ratones.....	30
6.2 Evaluación del potencial antihiper glucémico en ratones.....	31
6.3 Ensayos <i>in vitro</i> de las fracciones orgánicas de la infusión de <i>B. divaricata</i>	34
6.4 Ensayos de identidad.....	35
6.4.1 Perfiles cromatográficos de las fracciones orgánicas de la IBD por CCF.....	36
6.4.2 Establecimiento de los perfiles cromatográficos mediante CLAE.....	37
6.4.3 Espectros de IR y RMN ^1H de las fracciones orgánicas de la IBD.....	39
6.4.4 Análisis de los compuestos volátiles del aceite esencial por CG-EM.....	45
6.4.5 Perfil cromatográfico de los compuesto volátiles presentes en las hojas de <i>B. divaricata</i> la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME).....	49
7. Conclusiones.....	53
8. Perspectivas.....	54
9. Referencias.....	55

Lista de Figuras

Figura 1. Prevalencia mundial de diabetes mellitus (2017) y proyecciones de crecimiento de la enfermedad (2045)..	12
Figura 2. Muestra de herbario de <i>Bauhinia divaricata</i> L. (Leguminosae)	19
Figura 3. Distribución geográfica de <i>B. divaricata</i>	20
Figura 4. Tolerancia a la glucosa oral de la infusión de <i>B. divaricata</i> en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos	31
Figura 5. Tolerancia a la sacarosa oral de la infusión de <i>B. divaricata</i> en ratones normoglucémicos	33
Figura 6. Prueba de tolerancia al almidón de la infusión <i>B. divaricata</i> en ratones normoglucémicos	33
Figura 7. Perfil cromatografico por CCF	36
Figura 8. Perfil cromatografico por CCF	37
Figura 9. Perfil cromatográfico por CLAE de la fracción de AcOEt de la infusión de <i>B. divaricata</i>	38
Figura 10. Espectros en el ultravioleta.	39
Figura 11. Espectro IR de la fracción de AcOEt de la infusión de <i>B. divaricata</i>	41
Figura 12. Espectro IR de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de la infusión de <i>B. divaricata</i> .	43
Figura 13. Espectro RMN ¹ H (<i>metanol-d₄</i>) de la fracción de AcOEt de la infusión de <i>B. divaricata</i> .	43
Figura 14. Espectro RMN ¹ H (<i>metanol-d₄</i>) de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de la infusión de <i>B. divaricata</i>	44
Figura 15. Cromatograma del aceite esencial de <i>B. divaricata</i> .	45
Figura 16. Cromatograma de compuesto volátiles de <i>B. divaricata</i> .	49

Lista de Tablas

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de diabetes de acuerdo a la NOM-015-SSA2-2010.....	13
Tabla 2. Fármacos más utilizados en tratamiento de diabetes mellitus tipo 2.....	15
Tabla 3. Gradiente de elución utilizado en el análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia de <i>B. divaricata</i>	28
Tabla 4. Toxicidad aguda de la infusión de <i>B. divaricata</i> en el método de Lorke.....	30
Tabla 5. Resultados de la inhibición enzimática de α GHY <i>in vitro</i>	35
Tabla 6. Componentes del aceite esencial de la droga cruda de <i>B. divaricata</i>	46
Tabla 7. Compuestos volátiles identificados en la droga cruda de <i>B. divaricata</i>	50

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ACA	Acarbosa
AcOEt	Acetato de etilo
CCF	Cromatografía de capa fina
CICUAL	Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
DM	Diabetes mellitus
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EEM	Error estándar de la media
HS-SPME	Head space-solid phase microextraction
IBD	Infusión de las hojas de <i>Bauhinia divaricata</i>
IDF	International Diabetes Federation
INEGI	Instituto Nacional de Geografía y Estadística
MeOH	Metanol
MTF	Metformina
MEXU	Herbario Nacional del Instituto de Biología
NIST	National Institute of Standards and Technology
PTAO	Prueba de tolerancia al almidón oral
PTGO	Prueba de tolerancia oral a la glucosa
PTSO	Prueba de tolerancia a la sacarosa oral
tR	Tiempo de retención
VEH	Vehículo (NaCl 0.9%)
WHO	World Health Organization

Resumen

El presente trabajo describe el estudio farmacológico realizado sobre la infusión de *Bauhinia divaricata* L. (Leguminosae) llamada comúnmente pata de vaca, una especie empleada tradicionalmente en la medicina popular de México para el tratamiento de la diabetes. Estos estudios permitieron establecer su inocuidad y eficacia como agente antihiper glucémico. También se realizaron análisis cromatográficos y espectroscópicos para comenzar con el establecimiento de los parámetros de identidad química de la especie.

Las evaluaciones preclínicas de inocuidad de la infusión de *B. divaricata* se realizaron en ratones empleando el método de Lorke. El estudio toxicológico mostró que la dosis letal media (DL₅₀) para la infusión es mayor a 5 g/kg, por lo que se consideró inocua en el modelo evaluado. La eficacia antihiper glucémica se evaluó en ratones normoglu cémicos o hiper glucémicos (nicotinamida-estreptozotocina, 50-130 mg/kg) y se observó que la infusión (100 y 316 mg/kg) tiene un efecto significativo en ratones hiper glucémicos durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral. Los resultados generados en las pruebas de tolerancia a la sacarosa y al almidón orales en ratones normoglu cémicos mostraron que las dosis evaluadas (31.6-316 mg/kg) inhibieron la glucemia postprandial ocasionada por los carbohidratos, por lo que estos resultados sugieren que el mecanismo antihiper glucémico de la especie es a través de la inhibición de las enzimas α -glucosidasas intestinales.

Con la finalidad de profundizar en el mecanismo de acción de *B. divaricata*, se realizó una evaluación de la actividad inhibitoria de las fracciones de AcOEt y de CH₂Cl₂ de la infusión de *B. divaricata* sobre la enzima α -glucosidasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La fracción de AcOEt inhibió la actividad enzimática alrededor de 93% y la fracción CH₂Cl₂ inhibió aproximadamente 40%. Estos resultados sustentan los obtenidos en las pruebas de tolerancia a sacarosa y al almidón, por lo que es altamente probable que la eficacia antihiper glucémica *in vivo* de la infusión de *B. divaricata* se deba a la capacidad inhibitoria de sus metabolitos sobre las enzimas α -glucosidasas intestinales.

Como parte del desarrollo de las pruebas de identidad química de *B. divaricata* se obtuvieron los perfiles cromatográficos de las fracciones de AcOEt y CH₂Cl₂ de la infusión mediante cromatografía de capa fina (CCF). Además, de la fracción activa de AcOEt se generó un perfil cromatográfico empleando cromatografía de líquidos de alta eficiencia

(CLAE). Por otra parte, los espectros de UV, IR y RMN de la fracción activa de AcOEt permitieron establecer de manera preliminar la presencia de compuestos de tipo flavonoide.

Finalmente, los perfiles cromatográficos de gases acoplados a espectrometría de masas permitieron identificar al monoterpeno β -cariofileno y a los sesquiterpenos trans- α -bergamoteno y δ -cadineno como los productos mayoritarios de la esencia y de los volátiles por la técnica de microextracción en fase sólida, respectivamente. Estos perfiles cromatográficos servirán para el control de calidad de la especie *B. divaricata*.

En suma, los resultados obtenidos en esta investigación muestran la eficacia antihiper glucémica del preparado tradicional de *B. divaricata*, la cual está relacionada con la inhibición de enzimas α -glucosidasas intestinales, y posicionan a la especie como una alternativa para el descubrimiento de moléculas con este mecanismo de acción, además de racionalizar su consumo como *agua de uso* junto con los alimentos para prevenir y tratar la diabetes mellitus.

1. Antecedentes

1.1 Diabetes mellitus: una enfermedad global

La diabetes mellitus (DM) es un padecimiento metabólico que actualmente representa un problema de salud mundial. La rápida urbanización, las dietas poco saludables y los estilos de vida cada vez más sedentarios han dado lugar a índices de obesidad y diabetes inauditos. La diabetes mata y discapacita, afecta principalmente a las personas en su edad más productiva, empobreciendo a las familias o reduciendo la esperanza de vida de las personas adultas mayores (IDF, 2017).

Esta enfermedad es una de las mayores emergencias sanitarias cosmopolitas del siglo XXI y está entre las 10 principales causas de muerte a nivel mundial. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés) se calcula que alrededor de 425 millones de personas (20-79 años) en todo el mundo padecían algún tipo de DM en 2017. Si esta tendencia continua, para el año 2045, 629 millones de personas serán diabéticas. En la **Figura 1** se muestra la prevalencia (2017) y las tendencias previstas del número de diabéticos (2045) en el mundo.

México ocupa el quinto lugar entre los diez países con mayor incidencia de esta enfermedad en el mundo con 12 millones de personas (20 a 79 años) diagnosticadas en 2017; se estima que en el año 2045 el país pasará al cuarto lugar con 21.8 millones de personas diabéticas (IDF, 2017). De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI) en 2017 la DM fue la segunda causa de muerte en México con 106,525 defunciones (INEGI, 2018). Además de la muerte prematura, la baja calidad de vida y las múltiples complicaciones relacionadas con la DM, la enfermedad tiene un impacto económico negativo tanto para las personas con diabetes y sus familias, como para los sistemas sanitarios de los países con altas tasas de prevalencia.

Por tanto, resulta indispensable que se produzcan cambios en el estilo de vida de toda la población y que se fomenten la detección, el diagnóstico y el tratamiento farmacológico temprano, que sea eficaz y económicamente asequible (IDF, 2017).

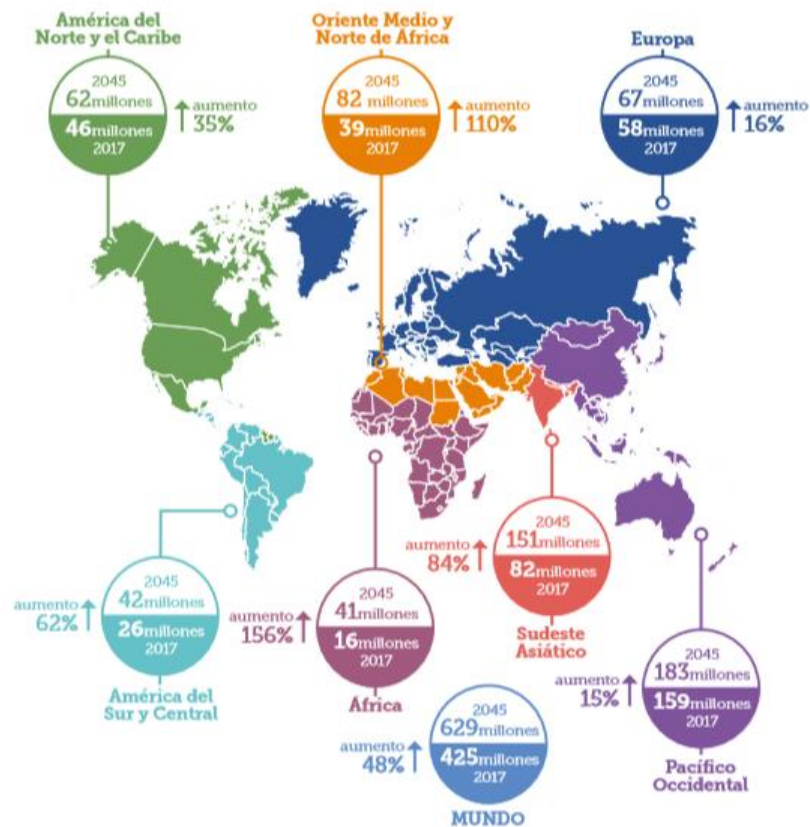


Figura 1. Prevalencia mundial de diabetes mellitus (2017) y proyecciones de crecimiento de la enfermedad (2045). Tomado del Atlas de Diabetes, Federación Internacional de Diabetes, 2017.

1.2 Generalidades sobre diabetes mellitus

La DM es una enfermedad que ha sido descrita y documentada por los médicos en el transcurso de la historia. La primera referencia se encuentra en el papiro de Ebers, uno de los tratados médicos más antiguos redactado cerca del año 1500 a. C., el cual describe síntomas que parecen corresponder a la diabetes. El médico y cirujano indio Súsruta documentó en el siglo V d.C. que la orina de los diabéticos era pegajosa, con sabor a miel y que atraía fuertemente a las hormigas. Fue el médico griego Areteo de Capadocia (siglo II d.C.) quien le dio a esta afección el nombre de diabetes, que en griego significa *sifón*, refiriéndose a la poliuria característica de la enfermedad (Lakhtakia, 2013). En nuestro país, la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010 define a la DM como “la enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, y que se

caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas”.

Este padecimiento se clasifica en tres tipos: tipo 1 (DMT1), tipo 2 (DMT2) y gestacional (DMG). La DMT1 es causada por reacciones autoinmunes que desencadenan procesos apoptóticos selectivos de las células beta pancreáticas, encargadas de producir a la hormona insulina (Holt et al., 2010). Como resultado, el organismo produce poca o ninguna insulina, provocando una deficiencia relativa o absoluta de dicha hormona. Por otra parte, la DMT2 es la forma más frecuente ya que el 90% de los pacientes la padecen. En este tipo de diabetes, la hiperglucemia es el resultado de una producción inadecuada de insulina y la incapacidad del organismo para responder plenamente a dicha hormona, estado que se define como resistencia a la insulina. Finalmente, la hiperglucemia que se detecta por primera vez durante el embarazo se clasifica como DMG y suele aparecer durante el segundo y tercer trimestre del embarazo, aunque puede darse en cualquier momento (IDF, 2017).

En nuestro país, los criterios para el diagnóstico de la DM están descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, la cual considera parámetros estandarizados a nivel internacional para prevenir y tratar adecuadamente a los pacientes diabéticos. La **Tabla 1** resume dichos criterios.

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de diabetes de acuerdo a la NOM-015-SSA2-2010

	DM	Pre-DM
Síntomas clásicos	Poliuria, polifagia o polidipsia	No hay criterio
Glucosa plasmática en ayunas	≥ 126 mg/dL	>100 mg/dL ≤ 125 mg/dL
Prueba de tolerancia oral a la glucosa (TGO); carga de 75 g	Glucemia >200 mg/dL a las 2 h postcarga	Intolerancia a la glucosa: glucemia ≥140 mg/dL y ≤ de 199 mg/dL a las 2 h postcarga
Prueba aleatoria (o casual) de glucosa plasmática	> 200 mg/dL o la hemoglobina glucosilada (HbA1c) equivalente a 6.5%	No hay criterio

1.3. Complicaciones de la diabetes mellitus

Puesto que la DM es una enfermedad crónica degenerativa, ocasiona complicaciones tanto agudas como crónicas que deterioran la calidad de vida de quienes la padecen. Las complicaciones agudas incluyen cetoacidosis diabética, estado hiperosmolar hiperglucémico, coma diabético hiperglucémico, convulsiones, desmayos e infecciones. Entre las complicaciones crónicas microvasculares destacan las neuropatías, nefropatías y retinopatías, que pueden deteriorarse hasta generar dolor neuropático, insuficiencia renal, y ceguera, respectivamente. Por otra parte, las complicaciones macrovasculares son las causales de la enfermedad coronaria, de la enfermedad arterial periférica, de la encefalopatía diabética y del pie diabético, que culminan en infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares, y amputaciones, respectivamente (IDF, 2017; WHO, 2018).

1.4 Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus

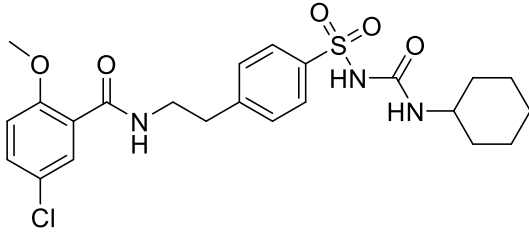
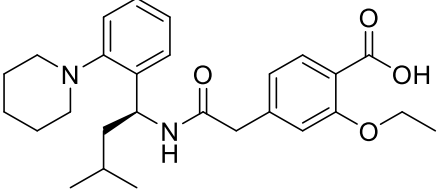
Existen diferentes terapias farmacológicas y no farmacológicas a seguir que dependen del tipo de diabetes que se padezca. El objetivo de la terapéutica de la DM es aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por esta enfermedad o por sus complicaciones.

Las personas con DMT1 son tratadas con inyecciones diarias de insulina debido a la deficiencia de esta hormona. La piedra angular en el tratamiento de la DMT2 es una vida saludable, lo cual incluye la adopción de una dieta sana, el aumento de la actividad física, y mantener un peso corporal saludable. Sin embargo, la DMT2 es un trastorno progresivo y complejo que es difícil de tratar de manera efectiva a largo plazo. Debido a que la mayoría de los pacientes tienen sobrepeso u obesidad en el momento del diagnóstico, difícilmente mantienen la normoglucemia sin los agentes antidiabéticos orales (IDF, 2017; Krentz y Bailey, 2005).

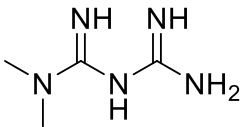
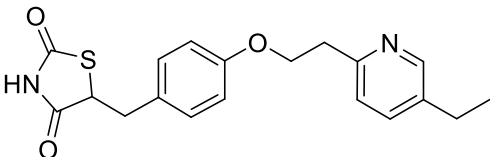
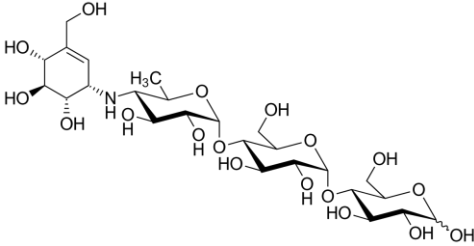
Actualmente existe una amplia gama de medicamentos antidiabéticos orales para el tratamiento de DMT2. Las principales clases de medicamentos son heterogéneas en sus modos de acción, perfiles de seguridad y tolerancia. Éstas incluyen agentes que estimulan la secreción de insulina (sulfonilureas y glitinidas), aquéllos que reducen la producción de glucosa hepática o mejoran la acción de la insulina (biguanidas y tiazolidinedionas), y los que retrasan la digestión y la absorción de carbohidratos intestinales (inhibidores de las enzimas

α -glucosidasas), además de los fármacos más recientes como lo son análogos de incretinas, que son péptidos que mejoran la secreción endógena de insulina, los inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa-4, que degrada a las incretinas endógenas (DPP-4), o los inhibidores del transportador sodio-glucosa-2 (SGLT-2) que reducen la reabsorción renal de glucosa (Krentz y Bailey, 2005; Upadhyay et al., 2018). En la **Tabla 2** se muestran en resumen los principales agentes terapéuticos usados en la DMT2

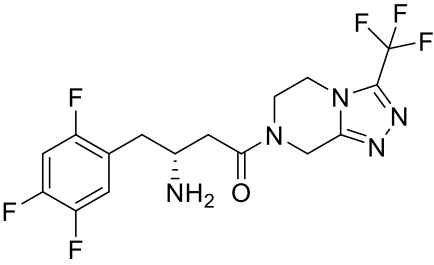
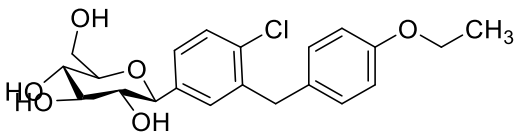
Tabla 2. Fármacos más utilizados en tratamiento de diabetes mellitus tipo 2

Tipo de fármaco		Ejemplo	Mecanismo de acción y efectos farmacológicos
Secretagogos de insulina	Sulfonilureas	<p>Glibenclamida</p>  <p>The chemical structure of Glibenclamida consists of a 4-chloro-3-methoxyphenyl ring connected via an amide bond to a propyl chain, which is further connected to a benzene ring. This benzene ring has a sulfonamide group (-SO₂NH-) attached to it, which is linked to another amide group (-NH-CO-) that is attached to a cyclohexane ring.</p>	<p>Unión a la subunidad SUR1 en los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) de las membranas de las células β-pancreáticas. Bloqueo del canal K_{ATP} que conduce a la despolarización de la membrana celular, la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje y la fusión de los gránulos de insulina con la membrana celular, liberando así insulina a la sangre (Upadhyay et al., 2018).</p>
Secretagogos de insulina	Glitinidas	<p>Repaglinidina</p>  <p>The chemical structure of Repaglinidina features a piperidine ring attached to a benzene ring. This benzene ring is connected to a chiral center (a carbon atom bonded to a hydrogen atom and an isopropyl group). This chiral center is also bonded to an amide group (-NH-CO-), which is further connected to a benzene ring. This second benzene ring has a carboxylic acid group (-COOH) and an ethoxy group (-OCH₂CH₃) attached to it.</p>	<p>Secreción de insulina debido al bloqueo en un sitio no sulfonilurea del canal K_{ATP} de las membranas de las células β-pancreáticas (Upadhyay et al., 2018).</p>

Continuación de la **Tabla 2**. Fármacos más utilizados en tratamiento de diabetes mellitus tipo 2

Tipo de fármaco		Ejemplo	Mecanismo de acción y efectos farmacológicos
Sensibilizador de insulina	Biguanidas	<p>Metformina</p> 	<p>Inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y activación de la AMPK, la cual induce la traslocación del transportador de glucosa (GLUT-4) a las membranas celulares de tejido adiposo y músculo esquelético. Reducción de la producción hepática de glucosa al inhibir la gluconeogénesis (Hardie et al., 2012).</p>
Sensibilizador de insulina	Tiazolidinedionas	<p>Pioglitazona</p> 	<p>Activación del factor de transcripción nuclear PPAR-γ, que promueve la traslocación de GLUT-4, disminuyendo la resistencia a la insulina en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado (Davis et al., 2010).</p>
Inhibidores de las enzimas α-glucosidasas		<p>Acarbosa</p> 	<p>Inhibición competitiva y reversible de las enzimas α-glucosidasas enterales (Bischoff, 1995). Retardo en la digestión de los carbohidratos complejos, retrasando así la absorción de monosacáridos y reduciendo los niveles de glucosa postprandial (Upadhyay et al., 2018).</p>
Agonistas del receptor GLP-1		<p>Exenatida</p> <p>H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂</p>	<p>Aumento de la síntesis y secreción de insulina por las células β- pancreáticas. Disminución de la secreción de glucagón y retraso del vaciamiento gástrico (Davis et al., 2010).</p>

Continuación de la **Tabla 2**. Fármacos más utilizados en tratamiento de diabetes mellitus tipo 2

Tipo de fármaco	Ejemplo	Mecanismo de acción y efectos farmacológicos
Inhibidores de DPP-4	<p style="text-align: center;">Sitagliptina</p>  <p>The chemical structure of Sitagliptina consists of a 2,4,6-trifluorophenyl group attached to a propyl chain. The second carbon of the propyl chain has a primary amide group (-NH₂) pointing downwards. The third carbon is attached to a 1,2,4-triazole ring, which has a trifluoromethyl group (-CF₃) at the 5-position.</p>	<p>Inhibición competitiva reversible de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4). Aumento de la concentración de las incretinas endógenas GIP y GLP-1 (Davis et al., 2010)</p>
Bloqueadores de SGLT-2	<p style="text-align: center;">Dapagliflozina</p>  <p>The chemical structure of Dapagliflozina features a central benzene ring with a chlorine atom at the 2-position and a propyl chain at the 4-position. The propyl chain is further substituted with a 4-ethoxyphenyl group at its end. The first carbon of the propyl chain is attached to a glucose molecule in its chair conformation, with hydroxyl groups at the 2, 3, and 6 positions.</p>	<p>Inhibición de la reabsorción de glucosa a nivel renal (Davis et al., 2010).</p>

1.5 Uso de plantas medicinales para tratar la diabetes mellitus

En México el uso de plantas medicinales para tratar padecimientos crónicos y agudos es milenario. Uno de los primeros los registros que describen las propiedades curativas de las plantas americanas empleadas por los mexicas es el *Libellus de medicinalibus indorum herbis* (*Libro sobre las hierbas medicinales de los pueblos indígenas*), también conocido como *Códice de la Cruz-Badiano*. Durante el Porfiriato, el Instituto Médico Nacional publicó sus *Anales* y la *Materia Médica Mexicana*, documentos donde se recopilaron las investigaciones químicas, las pruebas biológicas y las pruebas en humanos realizadas a las plantas medicinales más usadas en el territorio nacional (López, 2017).

Las investigaciones más recientes reportan que en nuestro país se consumen cerca de 380 especies vegetales para tratar la DM, entre las que destacan miembros de las familias Asteraceae, Agavaceae, Cucurbitaceae, Cactaceae, entre otras. La eficacia de algunas especies ha sido comprobada en modelos animales y se han determinado los constituyentes químicos responsables de las actividades hipoglucemiantes, pero son pocas las plantas medicinales que cuentan con estudios exhaustivos sobre sus mecanismos de acción antidiabéticos (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Nuestro grupo de trabajo ha determinado que varias plantas medicinales usadas para tratar la diabetes poseen compuestos que inhiben a las enzimas α -glucosidasas enterales, entre ellas el copalchi

(*Hintonia latiflora*, Rubiaceae), la raíz de cochino (*Ligusticum porteri*, Apiaceae), el zacatechichi (*Calea ternifolia*, Astereaceae), el estafiate (*Artemisia ludoviciana*, Asteraceae), y el mirto (*Salvia circinata* Cav., Lamiaceae) (Flores-Bocanegra et al., 2017; Mata et al., 2013).

1.6 Generalidades del género *Bauhinia*

El género *Bauhinia* (Fabaceae o Leguminosae) consta de aproximadamente 300 especies, que se conocen comúnmente como "pata de vaca" o "pezuña de vaca" debido a la forma de sus hojas. En México y Centroamérica existen cerca de 50 especies, varias de ellas endémicas (Barragán et al., 2010). Las hojas y tallos de las especies de este género se utilizan con frecuencia en la medicina tradicional de África, Asia, América Central y del Sur como agentes antidiabéticos o antioxidantes (Dantas Fernandes et al., 2012).

1.7 Generalidades sobre *Bauhinia divaricata*

1.7.1 Taxonomía y distribución geográfica

Bauhinia divaricata L (Leguminosae) es un arbusto o árbol pequeño de 1 a 8 m de altura, las hojas son más anchas que largas y a veces partidas en dos, parecidas a una pata de cabra, de color verde pálido. Las flores son blancas con unos hilos largos, con el tiempo se tornan color rosa, pueden ser pocas o numerosas. Los frutos son vainas de 5 a 12 cm de largo, con 5 a 10 semillas (**Figura 2**) (Torres-Colín et al., 2009).

Algunos sinónimos taxonómicos con los que se conoce esta especie son *B. adansoniana* Guill. & Perr., *B. amblyophylla* Harms, *B. americana* Launay, *B. aurita* Aiton, *B. caribaea* Jennings, *B. confusa* Rose, *B. furcata* Pierre ex Gagnep., *B. goldmanii* Rose, *B. mexicana* Vogel, *B. latifolia* Cav. y *B. lamarckiana* DC. Los nombres comunes usados en español son pata de cabra, pata de res, pata de vaca, pata de venado y pie de cabra, casco de chivo, calzoncillo y pie de venado (Rojas Chávez y Vibrans, 2010; TROPICOS, 2019).

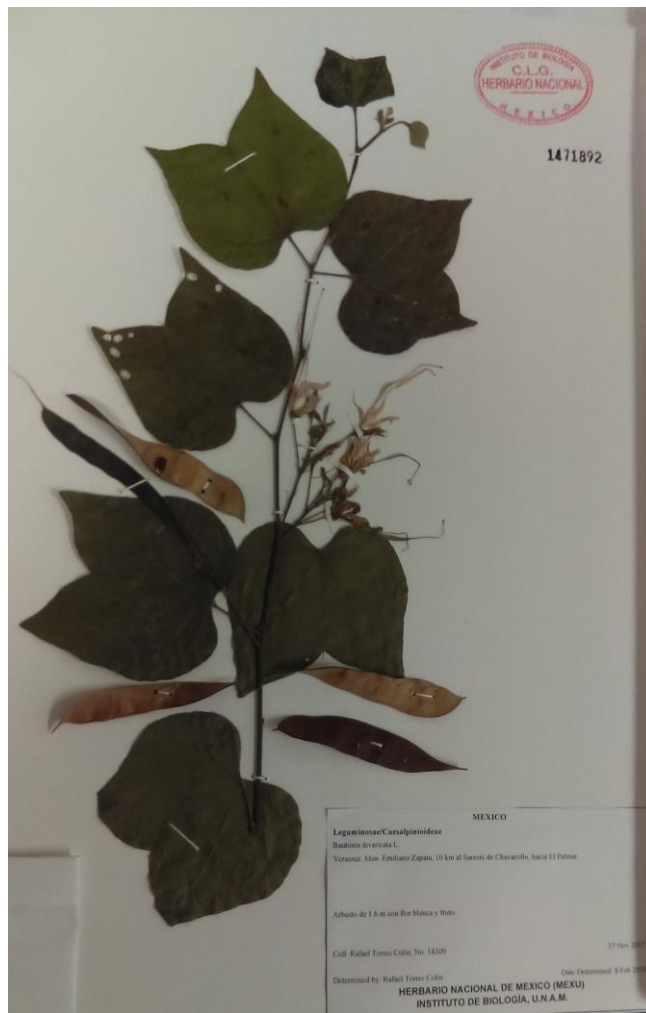


Figura 2. Muestra de herbario de *B. divaricata* L. (Leguminosae)
(Herbario Nacional de México, MEXU)

Es una especie originaria de América y habita en clima cálido desde los 4 hasta los 900 msnm. Crece a orillas de caminos y asociada a los bosques tropical caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, de encino. En México se distribuye en la vertiente del golfo del Pacífico y en la península de Yucatán, además, en Belice, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y en las Antillas (**Figura 3**) (Torres-Colín et al., 2009).



Figura 3. Distribución geográfica de *B. divaricata*
(Tomado de Global Biodiversity Information Facility)

1.7.2 Antecedentes etnobotánicos y etnofarmacológicos

La corteza interior de *B. divaricata* se usa en Yucatán para fabricar lazos toscos y para la construcción rural y de cercas. Las partes aéreas se usan como forraje y para la fabricación de trampas para animales (Rojas Chávez y Vibrans, 2010). Se ha descrito que *B. divaricata* se emplea en Puebla, Quintana Roo y Yucatán para curar la disentería y la diarrea; además se utiliza para tratar la bronquitis, el asma, la colitis y las mordeduras de víbora. También hay antecedentes de su consumo para tratar la diabetes en forma de “agua de uso”, un término popular que se refiere a que las infusiones o decocciones de la planta se ingieren junto con los alimentos y de forma cotidiana (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). El género *Bauhinia* se usa en Brasil como antidiabético; existen evidencias etnobotánicas para las especies *B. forficata* L., *B. microstachya* (Raddi) J.F. Macbr. y *B. variegata* L. (Santos et al., 2012; Trojan-Rodrigues et al., 2012). En Argentina, la especie *B. argentinensis* Burkart se emplea para tratar la diabetes y contra dolencias hepáticas y renales (Scarpa, 2004), y en Chile, *B. candicans* es utilizada para el control de la diabetes. A este respecto, Fuentes y Alarcón (2006) evaluaron el extracto de hojas secas de esta especie en ratas; los resultados indicaron que favorece la relajación dependiente de endotelio en anillos de aorta de ratas diabéticas inducidas con aloxán, por lo que estos resultados sugieren que la planta puede ser útil en la prevención de complicaciones vasculares asociadas a la diabetes (Fuentes y Alarcón, 2006).

2. Planteamiento del problema

La prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en adultos se ha duplicado de 1980 al 2014 (WHO, 2019). Además, esta enfermedad es un importante problema de salud pública en México, no sólo porque en el 2017 fue la segunda causa de muerte en el país, sino por las complicaciones cardiovasculares, retinopatía diabética, amputaciones de extremidades, e insuficiencia renal asociadas a ella. Aunque existen medicamentos hipoglucemiantes que mantienen los niveles de glucosa en límites dentro de la norma, hay muchos sectores poblacionales que usan plantas medicinales en combinación o en sustitución a la terapia alopática. Este fenómeno se asocia al arraigo cultural, a los costos y accesibilidad de algunas plantas y a la creencia de que su uso es seguro. No obstante, sólo un tercio de las más de 300 especies reportadas en nuestro país como antidiabéticas poseen algún estudio que sustente de forma científica su seguridad y eficacia.

Bauhinia divaricata, llamada popularmente pata de vaca es una especie que se usa en México para tratar la diabetes y para la cual no existen antecedentes farmacológicos o fitoquímicos reportados en la literatura. En este contexto, el presente trabajo se diseñó para establecer la inocuidad y eficacia preclínicas de un extracto acuoso de las hojas de *B. divaricata* en ratones, y para desarrollar los perfiles cromatográficos que sirvan como parámetros de identidad química de la especie, con miras a contribuir al uso racional de este recurso natural para tratar la condición prediabética y la diabetes mellitus.

3. Hipótesis

La infusión de *Bauhinia divaricata* L. reducirá la glucemia postprandial en las pruebas de tolerancia a carbohidratos en ratones normoglucémicos. El efecto antihiperoglucémico en las pruebas de tolerancia a la sacarosa y al almidón se deberá a mecanismos relacionados con la inhibición de enzimas α -glucosidasas intestinales.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer la seguridad y la eficacia antihiperoglucémica preclínicas de *B. divaricata* en los modelos experimentales adecuados así como los parámetros de identidad química de la especie, para generar la información científica que contribuya al uso racional de esta especie para tratar la prediabetes y/o la diabetes mellitus.

4.2 Objetivos particulares

- Establecer la inocuidad del extracto acuoso de *B. divaricata* mediante la evaluación de la toxicidad aguda por el método de Lorke (1983).
- Evaluar el potencial antihiperoglucémico del extracto acuoso de la especie en los ensayos de tolerancia a carbohidratos (glucosa, sacarosa y almidón), empleando como modelo ratones macho de la cepa ICR.
- Determinar el efecto de las fracciones orgánicas del extracto acuoso sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas en un ensayo enzimático *in vitro*.
- Generar los perfiles cromatográficos de los distintos extractos de la especie mediante cromatografía en capa fina (CCF), de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

5. Parte experimental

5.1 Material vegetal

Las hojas de *B. divaricata* fueron colectadas en el municipio de Emiliano Zapata, Veracruz, México (10 km al sureste de Chavarillo, hacia el Palmar) en febrero del 2017. El material fue identificado por el M. en C. Rafael Torres Colín del Instituto de Biología de la UNAM. Un ejemplar de referencia se encuentra depositado en el Herbario Nacional de México (MEXU 1471892). Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente y fragmentadas en un molino de cuchillas Wiley Model 4 (Thomas Scientific, EE. UU.).

5.2 Preparación de los extractos de *B. divaricata*

Para las pruebas en ratones se preparó el extracto acuoso mediante el método de infusión empleando 30 g de las hojas secas y molidas, a los cuales se adicionaron 600 mL de agua destilada a 78 °C durante 30 min. La infusión se filtró por gravedad y la fase acuosa se concentró en un rotaevaporador acoplado a una bomba de vacío hasta obtener un extracto viscoso color café (18.5 g). Por otra parte, se prepararon dos extractos acuosos por separado siguiendo esta misma metodología y se sometieron a un proceso de reparto con AcOEt (3 × 200 mL) o con CH₂Cl₂ (3 × 200 mL). Las fases orgánicas resultantes se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron hasta sequedad en un rotaevaporador. Este proceso se repitió cuantas veces fue necesario hasta obtener 551 mg del extracto de AcOEt (color café) y 2.1 mg del extracto de CH₂Cl₂ (color verde).

El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación simple a partir de 300 g de la droga cruda contenida en un matraz bola al cual se adicionaron 1.5 L de agua destilada. La temperatura de calentamiento fue de 60 °C y el proceso de hidrodestilación se mantuvo durante 3 horas. Posteriormente, el hidrodestilado obtenido se sometió a un reparto con CH₂Cl₂ (3 × 300 mL) y la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío para obtener el aceite esencial. El aceite esencial se almacenó en un vial ámbar y se mantuvo en refrigeración (4 °C) hasta su análisis.

5.3 Evaluación farmacológica preclínica

En los ensayos biológicos se utilizaron ratones ICR macho de entre 25 y 30 g adquiridos en el Centro UNAM-Envigo (Envigo RMS S.A. de C.V). Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h a temperatura controlada (22 ± 1°C) y se

les administró *ad libitum* una dieta estándar de pellets y agua purificada hasta el comienzo de cada experimento. Los protocolos de experimentación con animales siguieron las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y se ajustaron a las pautas éticas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio. El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-FQ) de la Facultad de Química, UNAM, aprobó los protocolos experimentales (FQ/CICUAL/291/18 y FQ/CICUAL/292/18). Al término de cada experimento, se indujo eutanasia a todos los animales por dislocación cervical o por hipoxia en una cámara de CO₂.

5.4 Preparación y administración de los tratamientos

En todas las evaluaciones biológicas se empleó solución salina isotónica (NaCl 0.9%)-Tween 0.05% como vehículo (VEH). El extracto acuoso (infusión) de las hojas de *B. divaricata* (IBD) y los fármacos controles positivos se disolvieron en el vehículo. Todos los tratamientos se administraron por vía intragástrica (*p.o.*) usando sondas de acero inoxidable (3.0 × 0.3") a razón de 0.2 mL/10 g de peso.

5.5 Evaluación de la toxicidad aguda

Se estableció la toxicidad aguda de la infusión de *B. divaricata* aplicando el procedimiento descrito por Lorke (Lorke, 1983). Brevemente, doce ratones se repartieron en cuatro grupos experimentales (n = 3) que recibieron el VEH o dosis únicas de la IBD *p.o.* en dos fases independientes. En la primera fase, las dosis de la IBD administradas fueron 10, 100 y 1000 mg/kg; en la segunda, las dosis fueron 1600, 2900 y 5000 mg/kg. En ambas fases se monitoreó el desarrollo de efectos tóxicos agudos (convulsiones, diarrea, hipotermia o piloerección), cambios en el patrón de comportamiento (letargia o acicalado) o mortalidad. El peso de los ratones se registró diariamente durante 14 días. Al final de los experimentos, todos los animales fueron sometidos a eutanasia por dislocación cervical para obtener corazón, pulmones, estómago, hígado y riñones. Estos órganos se observaron minuciosamente para detectar cambios en el tamaño o en la morfología, así como la presencia de lesiones macroscópicas.

5.6 Evaluación del potencial antihiper glucémico

Para establecer la eficacia preclínica de la IBD como agente antihiper glucémico en ratones se realizaron las pruebas de tolerancia a carbohidratos (glucosa, sacarosa, almidón) descritas en la literatura (Ovalle-Magallanes et al., 2015). Previo a los experimentos, los ratones se mantuvieron en ayuno durante 4 horas con acceso libre a agua. Transcurrido este tiempo, se formaron los grupos experimentales independientes (n = 7).

5.6.1 Obtención de muestras sanguíneas y determinación de glucemia

Para la recolección de muestras sanguíneas se empleó la técnica de punción de la vena safena con una aguja de 25 G (0.6 mm) se realizaron 6 muestreos. Los valores de glucemia (mg/dL) se obtuvieron empleando tiras reactivas y un glucómetro comercial (One Touch Ultra 2, Jhonson & Jhonson, EE.UU.).

5.6.2 Prueba de tolerancia a la glucosa oral

Tras el periodo de ayuno, se midió la glucemia basal de todos los ratones. La IBD se administró a tres grupos en las siguientes dosis *p.o.*: 31.6, 100 y 316 mg/kg. Se utilizó metformina (MTF, 200 mg/kg; Sigma-Aldrich EE.UU.) como control positivo. Media hora después de administrar cada tratamiento, todos los animales recibieron una carga de glucosa (1 g/kg *p.o.*; Sigma-Aldrich EE.UU.). La glucemia se determinó a los 15, 30, 60, 90 y 120 min después de la carga del carbohidrato. El porcentaje de variación de la glucemia de cada ratón se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de variación de glucemia} = \frac{G_t - G_i}{G_i} \times 100$$

donde, G_i es el valor de la glucemia basal y G_t es el valor de la glucemia a los tiempos 15, 30, 60, 90 y 120 min posteriores a la administración de la carga de glucosa. Esta prueba se desarrolló también en ratones con hiperglucemia inducida químicamente con nicotinamida-estreptozotocina (50-130 mg/kg *i.p.*) (Ovalle-Magallanes et al., 2015).

5.6.3 Prueba de tolerancia a la sacarosa oral

Se evaluó la IBD en un ensayo independiente (31.6, 100 y 316 mg/kg, *p.o.*) en una prueba de tolerancia a sacarosa en ratones normoglucémicos. La metodología fue idéntica a la descrita en el inciso anterior, pero usando como control positivo acarbosa (ACA, 5 mg/kg *p.o.*, Sigma-Aldrich EE. UU) y a la sacarosa como carbohidrato de prueba (2 g/kg *p.o.*,

Sigma-Aldrich EE.UU.). El porcentaje de variación de glucemia se calculó con la misma fórmula del inciso **5.6.2**.

5.6.4 Prueba de tolerancia al almidón oral

En esta prueba desarrollada bajo el mismo esquema de las anteriores, se utilizaron tres dosis de la IBD (31.6, 100 y 316 mg/kg, *p.o.*), empleando como carbohidrato de prueba una suspensión de almidón (1.5 g/kg *p.o.*, Sigma-Aldrich EE.UU.) y como control positivo acarbosa (ACA, 5 mg/kg *p.o.*). El porcentaje de variación de glucemia se calculó igual que el inciso **5.6.2**.

5.7 Evaluación *in vitro* sobre las enzimas α -glucosidasas

La evaluación de la actividad de las fracciones orgánicas de AcOEt y CH₂Cl₂ de la IBD sobre la enzima α -glucosidasa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (α -GHY; Sigma-Aldrich, EE. UU.) se realizó utilizando la metodología descrita en la literatura (Rangel-Grimaldo et al., 2017), en placas de 96 pozos y con un equipo iMark (BioRad) a una longitud de onda de 415 nm y una temperatura de 37 °C. Para el manejo de los datos se usó el programa Microplate Manager 6.

Para este experimento se preparó una solución de 1 U/mL de la α -GHY y se incubó durante 30 min a 30 °C en una solución amortiguadora de fosfatos (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 100 mM, pH 7). Luego, las fracciones orgánicas se disolvieron en MeOH (100%) y se diluyeron en buffer de fosfatos (PBS, pH 7, 100 mM) hasta obtener las concentraciones finales de 1.6 y 8 ppm (AcOEt) y 200 y 1000 ppm (CH₂Cl₂). Como control positivo se utilizó acarbosa (30 mM).

Posteriormente se transfirieron por triplicado 10 μ L de las diluciones de prueba a los pozos de las placas, 20 μ L de la solución de la enzima preincubada y 60 μ L de amortiguador de fosfatos (PBS, pH 7, 100 mM) y la placa se incubó durante 10 min a 37 °C. Al término de este periodo, se adicionaron a cada pozo 10 μ L de una solución del sustrato *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG, 5 mM) y se registró inmediatamente la absorbancia de las muestras a 415 nm (tiempo 0 min). Luego la placa se incubó a 37 °C durante 20 min más. Transcurrido este tiempo, se determinó nuevamente la absorbancia de cada pozo de reacción. La actividad inhibitoria (%) de los extractos se estableció en comparación con un blanco de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%inhibición = \left[1 - \frac{(A_{It20} - A_{It0})}{(A_{Ct20} - A_{Ct0})} \right] \times 100$$

donde A_{It20} corresponde al valor de absorbancia final, A_{It0} al valor de absorbancia al tiempo cero de cada muestra y A_{Ct20} y A_{Ct0} son las absorbancias correspondientes a un blanco al tiempo de 20 minutos y tiempo cero. Este experimento se realizó por duplicado, usando tres réplicas en cada uno. Los resultados se presentan como el promedio del porcentaje de inhibición \pm desviación estándar.

5.8 Pruebas de identidad química

5.8.1 Métodos espectroscópicos

El registro de los espectros de infrarrojo (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN) de las fracciones de AcOEt y CH_2Cl_2 de la IBD estuvo a cargo de personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Los espectros de IR se obtuvieron con un equipo Perkin-Elmer 1605 (4000 a 400 cm^{-1}) y los de RMN de protón ^1H se registraron en metanol deuterado (CD_3OD), en un espectrómetro Varian Unity Plus 400 a 400 MHz , usando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

5.8.2 Perfiles cromatográficos

5.8.2.1 Análisis por cromatografía de capa fina

Los perfiles cromatográficos por CCF de las fracciones orgánicas de la IBD se obtuvieron sobre cromatoplasmas de gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck (0.25 mm de espesor como soporte, y como fases móviles, mezclas ternarias de AcOEt-MeOH- H_2O (8.5:1.2:0.3). Las placas se revelaron bajo una lámpara de UV a 254 y 365 nm , y se emplearon como agentes reveladores soluciones de anisaldehído, sulfato cérico amoniacal y/o el reactivo de Dragendorff.

5.8.2.2 Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia

Los perfiles cromatográficos por CLAE de fase reversa, se obtuvieron en un cromatógrafo marca Waters (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA Waters 996), una bomba cuaternaria y un inyector manual. El software Empower 2 (Waters) se utilizó para el manejo de datos y el control de equipo. Todos

los análisis se realizaron en una columna Symmetry Shield RP-8 (150 mm × 4.6 mm, d.i., 5 µm; Waters) y un sistema de elución en gradiente ternario compuesto por mezclas entre CH₃CN, CH₃OH y H₂O a un flujo de 0.5 mL min⁻¹ (**Tabla 3**). La detección se realizó desde 210 hasta 350 nm y las muestras se disolvieron en 1 mL de una mezcla 20:80 de CH₃CN-H₂O grado HPLC y se filtraron a través de una membrana Acrodisc® de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de espesor antes de ser inyectadas al cromatógrafo.

Tabla 3. Gradiente de elución utilizado en el análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia de *B. divaricata*

Tiempo (min)	CH ₃ CN	CH ₃ OH	H ₂ O
0	15	2	83
20	55	2	43
30	55	2	43
40	15	2	83

5.8.2.3 Análisis *por* cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Los compuestos presentes en el aceite esencial se identificaron empleando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas LECO de tiempo de vuelo (EM-TOF; Agilent Technology, EE.UU.). La columna utilizada fue de tipo capilar DB-5 de 10 m de longitud y 0.18 mm de diámetro. La temperatura de la columna se estableció en rampa de 40 a 260 °C con una velocidad de calentamiento de 4 °C/min. Se utilizó helio como gas acarreador a una velocidad de 1 ml/min. La identificación de los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial se realizó mediante el cálculo de sus índices de retención usando el programa ChromaTOF®, utilizando los valores de retención de la coelución de una serie homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₂₀). Se compararon los espectros de masas obtenidos con los reportados en la literatura y en la biblioteca del National Institute of Standards and Technology (NIST). En todos los casos, el porcentaje de correlación fue mayor al 85%.

5.8.2.4 Análisis de los compuestos volátiles por la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME)

Los compuestos volátiles de *B. divaricata* fueron determinados mediante la técnica de microextracción fase sólida (HS-SPME; *head space-solid phase microextraction*). Para esto se

empleó una fibra de polidimetilsiloxano (PDMS 100 μm ; Sigma Aldrich, EE. UU.), de un centímetro de longitud. La fibra se acondicionó durante 2 horas antes de iniciar el experimento en un inyector de CG a 250 °C (Álvarez-Ospina et al., 2013).

La microextracción se realizó colocando 118 mg de las hojas secas y fragmentadas en un vial que contenía 9 ml de agua grado HPLC saturada con 75 mg de NaCl. Se colocó una barra de agitación al vial y se montó sobre una parrilla de calentamiento a 45°C y 550 rpm. La fibra se introdujo a través del septum del vial y se expuso a la fase de vapor (head-space) durante 10 minutos. Una vez que transcurrió el tiempo, la fibra se retiró y se colocó en el inyector del cromatógrafo de gases. La desorción térmica de los componentes permitió su detección e identificación cómo se describió para el aceite esencial.

6. Resultados y discusión

El presente proyecto forma parte de los trabajos de investigación encaminados al estudio de algunas especies de plantas medicinales usadas en México para el tratamiento de la DMT2. La especie *B. divaricata* fue seleccionada para establecer su eficacia e inocuidad preclínicas, y para desarrollar algunos ensayos de identidad para la especie, teniendo en consideración sus antecedentes etnofarmacológicos y que no existen trabajos fitoquímicos previos. Los resultados y discusión de éstos se presentan en dos secciones: en la primera se describen los hallazgos obtenidos de las evaluaciones preclínicas de la infusión, y en la segunda, los resultados de los ensayos de identidad química.

6.1 Evaluación farmacológica preclínica

6.1.1 Seguridad: toxicidad aguda en ratones

Se estableció la dosis letal media (DL₅₀) de la infusión de *B. divaricata* empleando el protocolo descrito por Lorke (1983). Se utilizó este modelo debido al uso de dosis logarítmicas de las muestras de prueba, el corto periodo de experimentación y a la reducción en el número de animales usados. Los ratones recibieron dosis únicas (10–5000 mg/kg) de la IBD en dos etapas independientes. En ambas, los ratones fueron observados la primera hora tras la administración y durante 14 días. En estas fases, no hubo cambios en el comportamiento, peso corporal, o muerte de ratones, y tampoco se detectaron signos de daño macroscópico en corazón, hígado, riñones, tracto gastrointestinal, o pulmones. Los resultados obtenidos en el ensayo se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Toxicidad aguda de la infusión de *B. divaricata* en el método de Lorke

Infusión de <i>B. divaricata</i>			
Etapa 1		Etapa 2	
Dosis mg/kg	Mortalidad	Dosis mg/kg	Mortalidad
10	0/3	1500	0/3
100	0/3	2600	0/3
1000	0/3	5000	0/3

Estos resultados permitieron estimar que la DL₅₀ para la IBD es mayor a 5 g/kg, la cual se considera inocua en las dosis y el modelo utilizado.

6.2 Evaluación del potencial antihiper glucémico en ratones

Las pruebas de tolerancia a la glucosa (PTGO), sacarosa (PTSO) y al almidón orales (PTAO) permitieron evaluar el potencial antihiper glucémico de la infusión de *B. divaricata* (IBD) en ratones, para lo cual se seleccionaron tres dosis logarítmicas de este extracto: 31.6, 100 y 316 mg/kg. Los cursos temporales construidos para estos modelos representan las variaciones de glucemia de cada grupo experimental en el transcurso de los experimentos.

La **Figura 4** muestra los resultados obtenidos en la PTGO, la cual se realizó tanto en ratones normoglucémicos (panel A) como en hiperglucémicos (panel B). Se observa que en el primer caso, la infusión no redujo el pico postprandial inducido por la glucosa, es decir, este extracto no parece actuar como la metformina, un fármaco antihiper glucémico que sensibiliza a los órganos periféricos a la acción de la insulina (Hardie et al., 2012).

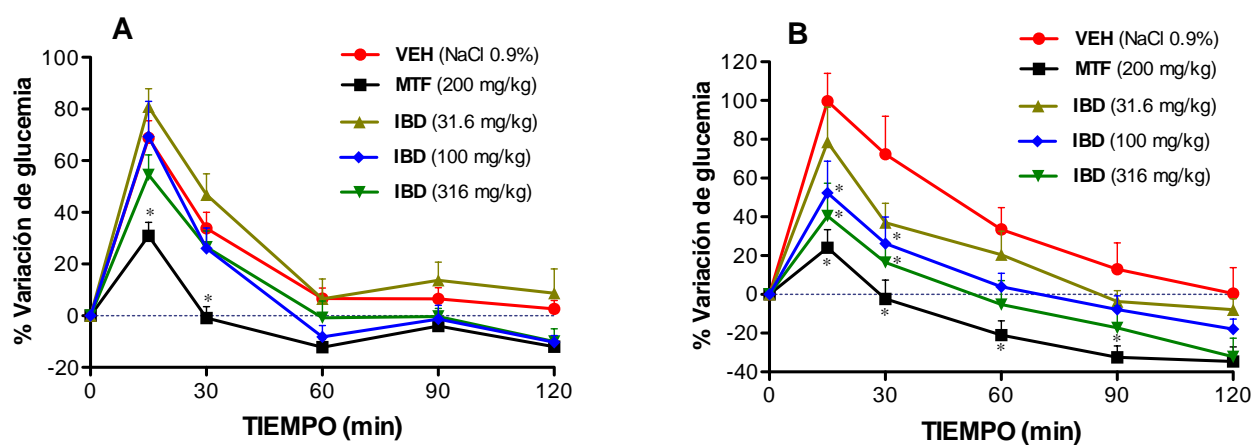


Figura 4. Tolerancia a la glucosa oral de la IBD en ratones normoglucémicos (panel A) e hiperglucémicos (panel B) machos Hsd:ICR. VEH, vehículo (NaCl 0.9%), MTF, metformina (200 mg/kg). Cada punto es el promedio \pm EEM de los ratones de cada grupo ($n = 7$). $*p < 0.05$ ANADEVIA de dos vías, *post hoc* Bonferroni.

Sin embargo, la IBD fue activa en ratones hiperglucémicos a las dosis de 100 y 316 mg/kg, reduciendo significativamente la magnitud del pico postprandial a los 15 y 30 min posteriores a la carga de glucosa. A este respecto, hay efectos disímiles descritos en la literatura para *B. forficata*. Por ejemplo, se ha evidenciado que la decocción de las hojas de la especie (150 g/L) fue activa sólo en ratas Wistar macho con hiperglucemia inducida por estreptozotocina y no en animales normoglucémicos (Pepato et al., 2002); en contraste, este

preparado (500-1000 mg/kg) no tuvo efecto en ratas Wistar hembra preñadas y con hiperglucemia inducida por estreptozotocina (Damasceno et al., 2004; Volpato et al., 1999). El extracto butanólico de las hojas de esta planta (400-800 mg/kg) sólo fue activo en ratas Wistar macho normoglucémicos, pero no en hiperglucémicos inducidas con aloxán (Silva et al., 2002). Los extractos acuosos, hexánicos y etanólicos de esta especie (200 y 400 mg/kg) fueron hipoglucemiantes a hipolipemiantes en ratas Wistar macho con hiperglucemia inducida por aloxán (Lino et al., 2004). Algunos extractos secos de la especie preparados de acuerdo a la farmacopea brasileña también fueron activos en ratas Wistar macho con hiperglucemia inducida por estreptozotocina (Da Cunha et al., 2010).

Por otra parte, el extracto metanólico de las hojas de la especie *B. cheilandra* redujo el pico postprandial causado por glucosa sólo en ratas Wistar normoglucémicas (Almeida et al., 2006) y el extracto acuoso (250-1000 mg/kg) de *B. variegata* fue hipoglucemiante, antihiperglucémico e hipolipemiante en modelos de diabetes tipo 1 y 2 en ratas Sprague Dawley (Kulkarni y Garud, 2016).

Ahora, en el siguiente experimento se cambió el carbohidrato de prueba al disacárido sacarosa. Como se muestra en la **Figura 5**, los resultados de la PTSO revelaron que todas las dosis evaluadas de la IBD poseen acción antihiperglucémica significativa en ratones normoglucémicos, ya que inhibieron el pico postprandial provocado por la carga de sacarosa tal como lo hace el control positivo acarbosa.

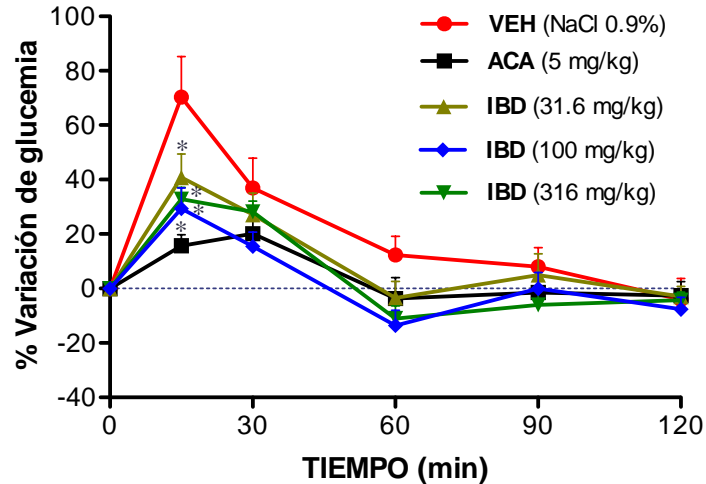


Figura 5. Tolerancia a la sacarosa oral de la IBD en ratones normoglucémicos machos Hsd:ICR. VEH, vehículo (NaCl 0.9%), ACA, acarbosa (5 mg/kg). Cada punto es el promedio \pm EEM de los ratones de cada grupo (n = 7). * $p < 0.05$ ANADEVIA de dos vías, *post hoc* Bonferroni.

Posteriormente cuando se usó el polisacárido almidón como carbohidrato de prueba, la IBD (100 y 316 mg/kg) también disminuyó el pico postprandial de modo similar a la acarbosa (**Figura 6**).

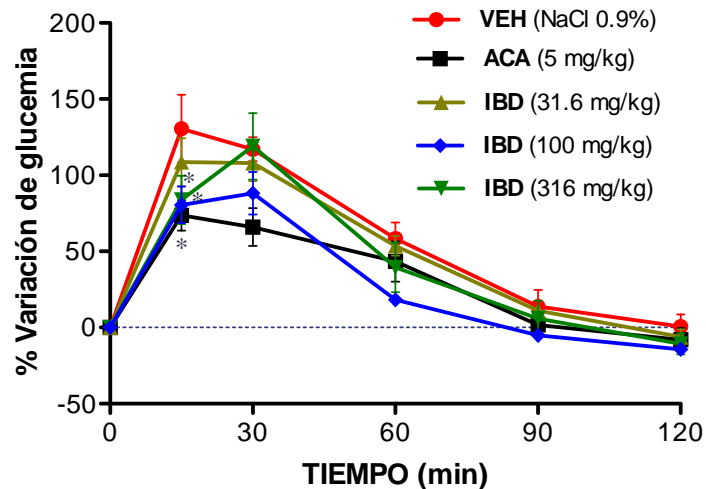


Figura 6. Prueba de tolerancia al almidón de la IBD en ratones normoglucémicos machos Hsd:ICR. VEH, vehículo (NaCl 0.9%), ACA, acarbosa (5 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo (n = 7). * $p < 0.05$ ANADEVIA de dos vías, *post hoc* Bonferroni.

Los resultados obtenidos de estas dos pruebas sugieren que la IBD posee compuestos que podrían tener el mismo mecanismo de acción que la acarbosa, es decir, que son inhibidores de las enzimas α -glucosidasas intestinales. Estas enzimas pertenecientes a la familia GH31 (glucósido hidrolasas) hidrolizan carbohidratos complejos a sus monómeros constitutivos y están localizadas en las vellosidades del intestino delgado. Su inhibición farmacológica retrasa el catabolismo intestinal de los carbohidratos de la dieta, retardando a su vez la absorción de la glucosa y disminuyendo en consecuencia el pico postprandial (Upadhyay et al., 2018). Debido a que los fármacos con este mecanismo de acción (acarbosa, voglibosa y miglitol) se prescriben en combinación con la insulina para el tratamiento de DM2 y como terapia a pacientes prediabéticos para prevenir el desarrollo de DM, resulta de suma importancia determinar que la eficacia hipoglucemiante de las plantas medicinales que se usan para tratar la diabetes se deba a compuestos con este mismo mecanismo de acción, además de contribuir al descubrimiento de nuevas entidades químicas para el desarrollo de nuevos fármacos (Mata et al., 2013). Como paso siguiente en la investigación se analizó si el efecto antihiper glucémico *in vivo* de la IBD estaba relacionado con la inhibición de las enzimas α -glucosidasas en un modelo *in vitro*.

6.3 Ensayos *in vitro* de las fracciones orgánicas de la infusión de *B. divaricata*

La actividad inhibitoria de las fracciones de AcOEt y de CH₂Cl₂ de la IBD se evaluó sobre la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae* (α -GHY) en un ensayo espectrofotométrico de todo o nada. Este método se basa en la cuantificación de *p*-nitrofenol generado por la hidrólisis enzimática del *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, de modo que la actividad de la enzima α -glucosidasa es directamente proporcional a la cantidad del fenol libre generado durante y los compuestos de prueba (Oki et al., 1999). Los resultados de la **Tabla 5** muestran que los extractos provenientes de la infusión tienen capacidad inhibitoria de esta enzima: a 8 ppm, la fracción de AcOEt inhibe la actividad enzimática alrededor de 93%, y a 1000 ppm, la fracción CH₂Cl₂ inhibe aproximadamente 40%.

Tabla 5. Resultados de la inhibición enzimática de α -GHY *in vitro*.

Extracto	[ppm]	% Actividad inhibitoria ($\bar{x} \pm$ desviación estándar)
AcOEt	1.6	15.52 \pm 0.20
		23.95 \pm 2.62
	8	92.19 \pm 1.97
		93.5 \pm 1.78
CH ₂ Cl ₂	200	14.96 \pm 4.35
		14.23 \pm 1.06
	1000	44.42 \pm 4.41
		40.79 \pm 3.72

Estos resultados indican que los metabolitos más activos para inhibir la α -GHY se encuentran en la fracción más polar de la infusión, y sustentan los obtenidos en las pruebas de tolerancia a sacarosa y almidón. Es altamente probable que la eficacia antihiper glucémica de la IBD en las PTSO y PTAO se deba a la capacidad inhibitoria de sus metabolitos sobre las enzimas α -glucosidasas intestinales.

En un estudio reciente se reportó que varias especies del género *Bauhinia* y relacionadas inhibían a la enzima α -GHY. Las concentraciones inhibitorias medias descritas fueron (en $\mu\text{g/mL}$): *B. forficata* (823 ± 111), *B. variegata* (211 ± 71), *B. variegata* var. *candida* (173 ± 17) y *B. galpinii* (15 ± 2.8). Esta actividad se relacionó con el alto contenido de derivados de canferol, quercetina e isoramnetina presentes en todas las especies (Frag et al., 2015).

6.4 Ensayos de identidad

La identidad botánica del material vegetal usado en esta investigación fue establecida en el Instituto de Biología de la UNAM (MEXU 1471892). La identidad química de las fracciones orgánicas de AcOEt y CH₂Cl₂ de la infusión se realizó empleando distintas técnicas cromatográficas para determinar la naturaleza de los compuestos presentes. En primera instancia se usó la CCF y varios agentes reveladores, y luego se generaron los perfiles cromatográficos por CLAE de la fracción activa de AcOEt. A la par se obtuvieron los espectros de IR y RMN ¹H de las fracciones orgánicas. Finalmente, se analizaron los compuestos

volátiles presentes en un aceite esencial preparado por hidrodestilación y en la droga cruda, empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y la técnica de microextracción en fase sólida (HS-SPME), respectivamente.

6.4.1 Perfiles cromatográficos de las fracciones orgánicas de la IBD por CCF

En la figura se muestran los cromatogramas obtenidos para las fracciones de AcOEt y CH₂Cl₂ de la infusión, usando el sistema de elución AcOEt:MeOH:H₂O (8.5:1.2:0.3). Las cromatoplasacas se revisaron bajo una lámpara de UV a 254 y 365 nm y se observó que ambas fracciones resultaron ser muy complejas.

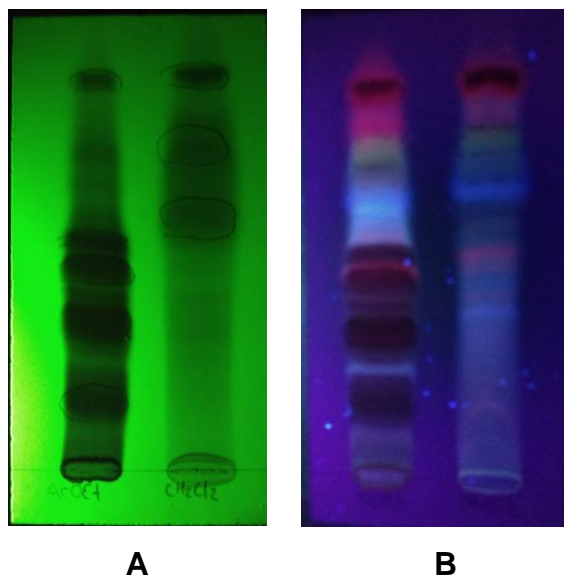


Figura 7. Perfil cromatográfico por CCF. Carril 1, fracción de AcOEt; carril 2 fracción CH₂Cl₂. Fase móvil AcOEt:MeOH:H₂O (8.5: 1.2: 0.3). Fase estacionaria: sílice F₂₅₄ Merck (tamaño de partícula: 5-20 μ m). **A** observada a $\lambda = 254$ nm y **B** a $\lambda = 365$ nm.

En la literatura está reportado que las especies de la familia Leguminosae son ricas en flavonoides, alcaloides, saponinas y triterpenoides (Yong y Ntie-Kang, 2015), por lo cual las cromatoplasacas se revelaron con sulfato cérico amoniacal, anisaldehído y reactivo de Dragendorff. Como se muestra en la **Figura 8A**, el revelado con anisaldehído mostró coloraciones amarillas típicas de flavonoides; el revelado con sulfato cérico amoniacal (**Figura 8B**) con coloraciones marrón o café, evidenciando también la presencia de flavonoides; no se observó ninguna reacción positiva frente al reactivo de Dragendorff (**8C**).

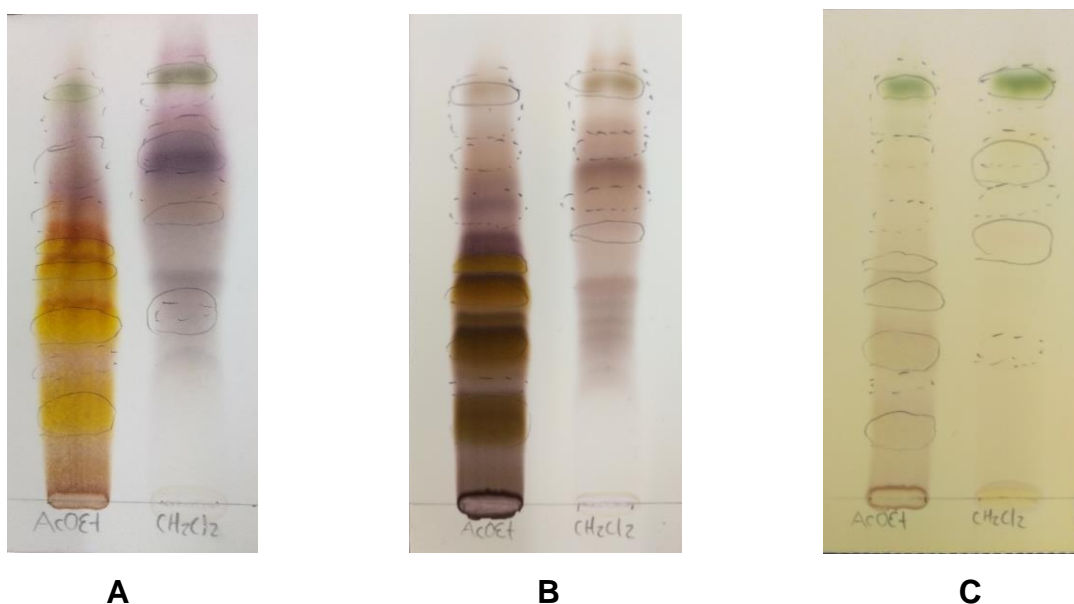


Figura 8. Perfil cromatográfico por CCF. Carril 1, fracción de AcOEt; carril 2 fracción CH₂Cl₂. Fase móvil AcOEt:MeOH:H₂O (8.5:1.2:0.3). Fase estacionaria: sílice F₂₅₄ Merck (tamaño de partícula: 5-20 µm). Solución reveladora; **A** anisaldehído, **B** solución de sulfato cérico amoniacal y **C** reactivo de Dragendorff.

6.4 2 Establecimiento de los perfiles cromatográficos mediante CLAE

La CLAE es el método de elección para la separación de mezclas complejas que contienen compuestos no volátiles, entre ellos los flavonoides. En la literatura está reportado el uso de fases estacionarias, como las columnas C8 y C18, para la separación de flavonoides en una amplia gama de polaridades. Las fases móviles empleadas en las eluciones en CLAE de fase reversa incluyen mezclas de CH₃OH-H₂O, CH₃CN-H₂O y sistemas ternarios en modo gradiente. Por otra parte, los sistemas de CLAE están generalmente acoplados a detectores de índices de refracción, de masas o de UV. A este último respecto, los detectores de matriz de fotodiodos (PDA) son los más convenientes para su uso debido a que los espectros UV generados brindan valiosa información para la identificación de algunos compuestos como los flavonoides (Stefova et al., 2003). Conforme a lo descrito en la bibliografía se ensayaron los sistemas de elución compuestos por CH₃OH-H₂O y CH₃CN-H₂O neutros en varias proporciones, y acidificados con ácido trifluoroacético, fórmico y acético. El mejor sistema resultó ser un gradiente lineal ternario neutro. La velocidad de flujo se estableció 0.5 mL min⁻¹ y la detección se realizó desde 210 hasta 350 nm. El perfil cromatográfico resultante para la fracción de AcOEt de la IBD se muestra en la **Figura 9**.

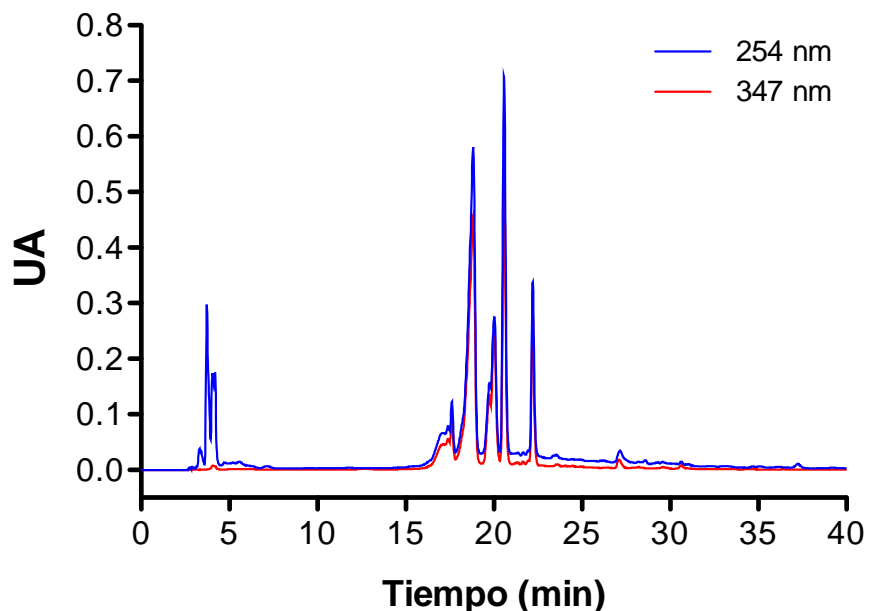


Figura 9. Perfil cromatográfico por CLAE de la fracción de AcOEt de la IBD. Columna Symmetry Shield RP-8 (150 mm × 4.6 mm, d.i., 5 μ m; Waters). Fase móvil ternaria (ver Tabla 3). Tipo de elución gradiente lineal. Velocidad de flujo 0.5 mL min⁻¹. Volumen de inyección 20 μ L.

Los espectros UV de los picos mayoritarios se muestran en la **Figura 10**. De acuerdo a la revisión efectuada en la literatura, las absorciones observadas podrían corresponder a compuestos de tipo ácidos benzoicos (λ_{max} =269 nm) y flavonoles, como agliconas y derivados glicosilados de canferol (λ_{max} =264, 292, 318 y 363 nm) y quercetina (λ_{max} =255, 265, 294 y 352 nm) (Farag et al., 2015; Sakakibara et al., 2003).

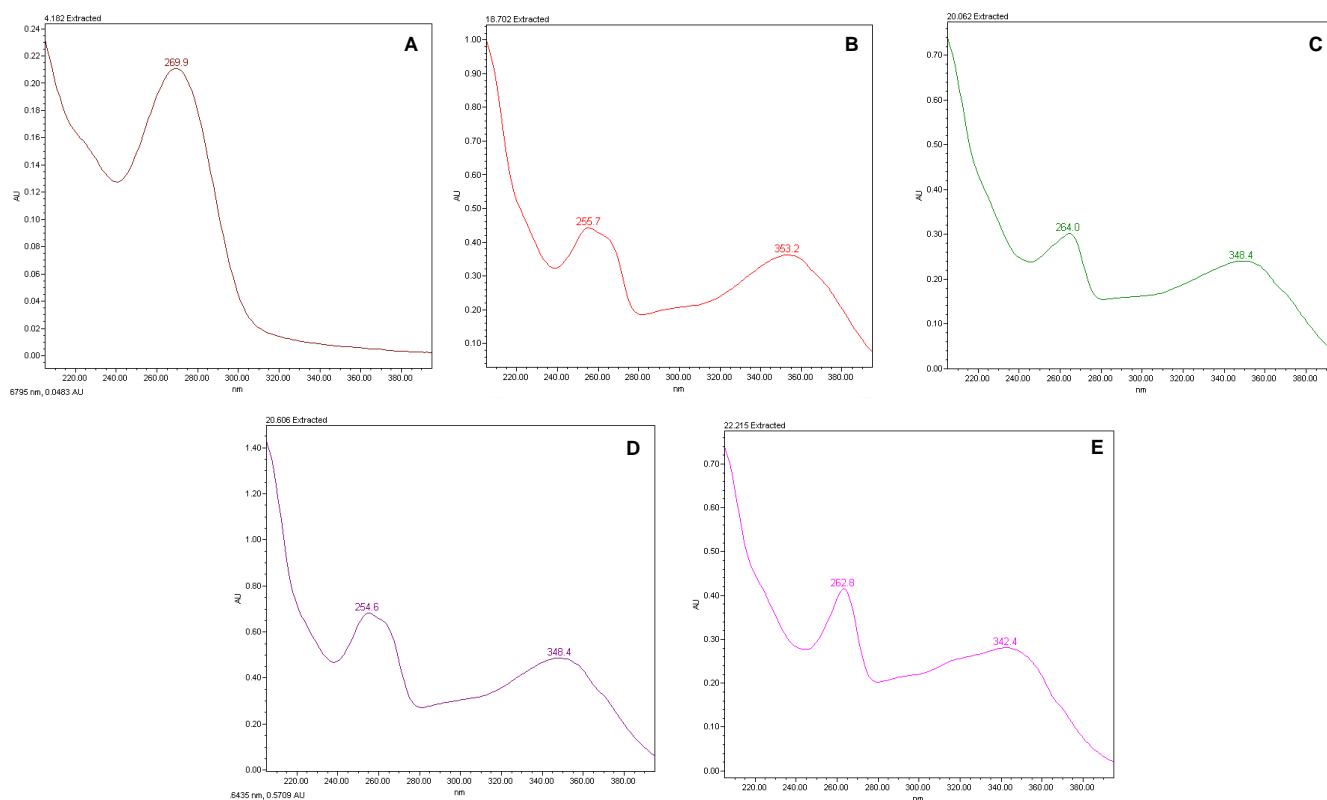


Figura 10. Espectros de ultravioleta de los picos en $t_R=4.18$ min (A), $t_R=18.70$ min (B), $t_R=20.06$ min (C), $t_R=20.60$ min (D) y $t_R=22.21$ min (E).

6.4.3 Espectros de IR y RMN ^1H de las fracciones orgánicas de la IBD

En el espectro de IR de la fracción de AcOEt de la IBD (**Figura 11**) se observan bandas intensas de absorción en ν_{max} 3345, 2917, 1605 y 1243 cm^{-1} , características de la presencia de grupos hidroxilo, fenoles, y alquenos. En el de la fracción de CH_2Cl_2 (**Figura 12**), se aprecian bandas en ν_{max} 2918 y 1727 cm^{-1} indicativas de la presencia de ácidos carboxílicos y cetonas. Los espectros de RMN ^1H (**Figuras 13 y 14**) de ambas fracciones permitieron identificar la presencia de compuestos con funcionalidades de tipo C-H sp^3 (alifáticos), bases oxigenadas (protones anoméricos) O-C-H sp^3 , vinílicas C-H sp^2 y aromáticas C-H sp^2 , probablemente de tipo flavonoide o flavonoides glicosilados.

De otras especies de *Bauhinia* se han aislado múltiples compuestos de tipo flavonoide: de *B. forficata*, el 3,7-O- α -diramnósido de canferol, el 7-O- α -ramnósido de canferol (Silva et al., 2002), el 3-O-(2-ramnosil)-rutinósido de canferol, el 3-O-rutinósido-7-O-ramnósido de quercetina (Ferrerres et al., 2012), el 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosido de quercetina y la

campferitina (Da Cunha et al., 2010); de *B. acuruana*, el (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-dihidroxifenil)-5-metoxi-6-metilcroman-3,7-diol y el 3-*O*-rámnosido de quercetina (Góis et al., 2017); de *B. racemosa* las catequinas (-)-epiafzelequina, (-)-epicatequina y (-)-catequina (Sashidhara et al., 2012). Además se han aislado los compuestos quercetina, arabinofuranósido de quercetina y quercitrina de *B. purpurea*, *B. reticulata*, *B. splendens*, *B. tomentosa*, *B. uruguayensis* y *B. vahlii* (Neto et al., 2008). De *B. unguolata* L. se han aislado quercetina, guayaverina y quercitrina (Farag et al., 2015) y de *B. variegata* se han identificado la naringenina, el 3-metil éter de quercetina, la luetolina, la rutina y la isoquercitrina (Kulkarni y Garud, 2016).

Así, considerando un criterio quimiotaxonómico, *B. divaricata* podría biosintetizar compuestos similares a los anteriormente descritos; el análisis de los perfiles por CCF y CLAE y la comparación con lo descrito en la literatura (espectros de UV, IR y de RMN) de la fracción activa de AcOEt proveniente de la IBD sustentan esta propuesta.

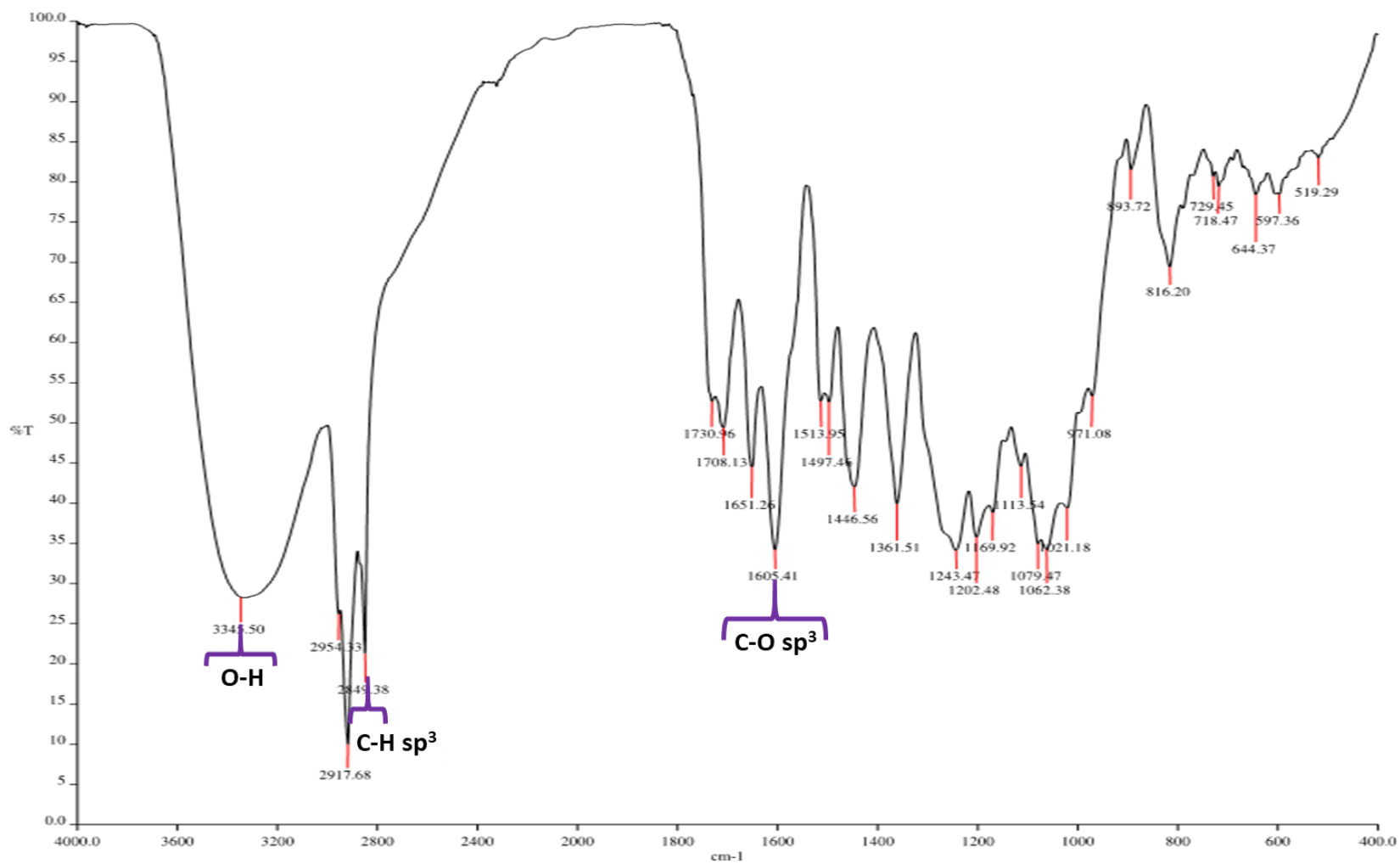


Figura 11. Espectro IR de la fracción de AcOEt de la IBD.

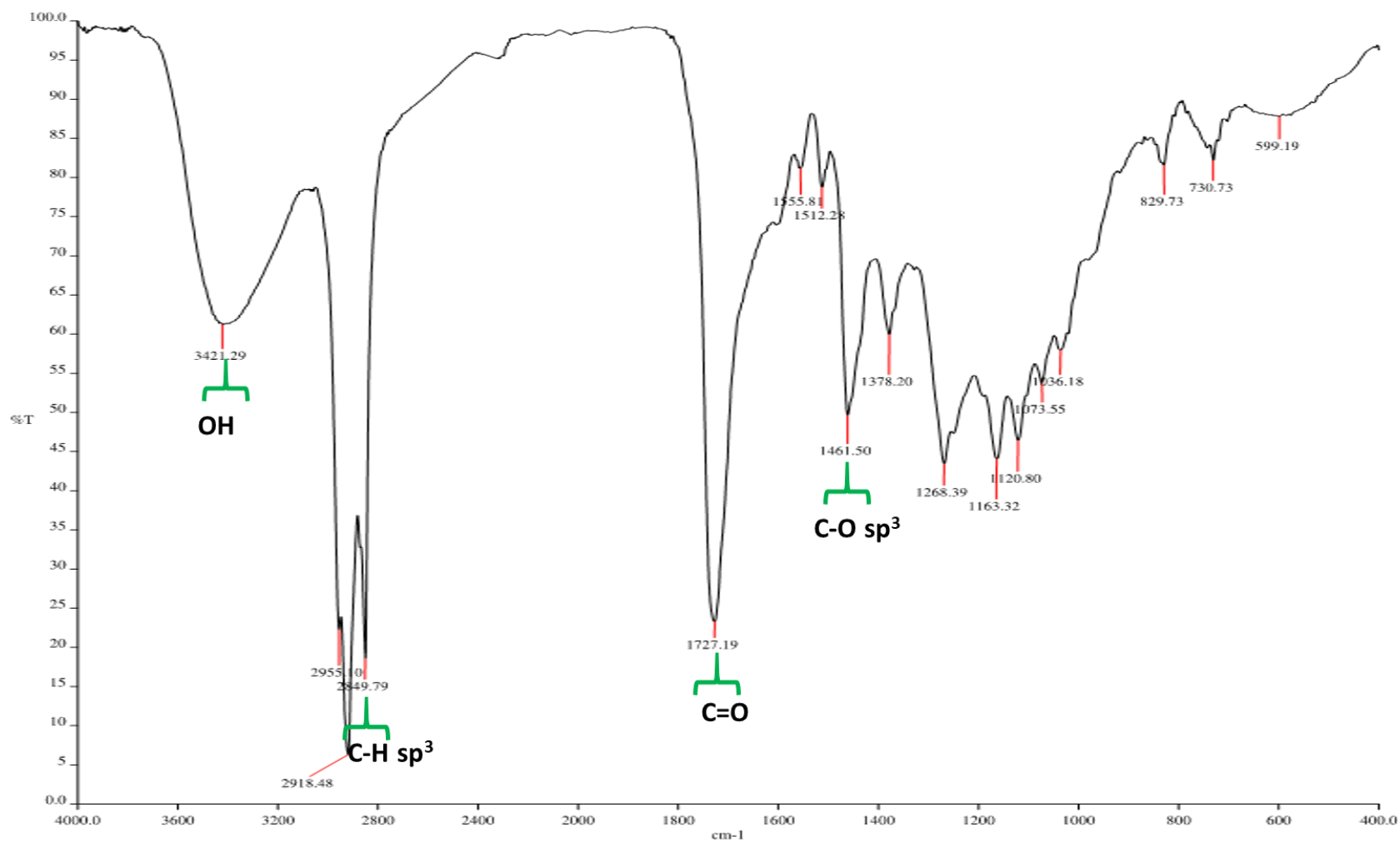


Figura 12. Espectro IR de la fracción de CH₂Cl₂ de la IBD.

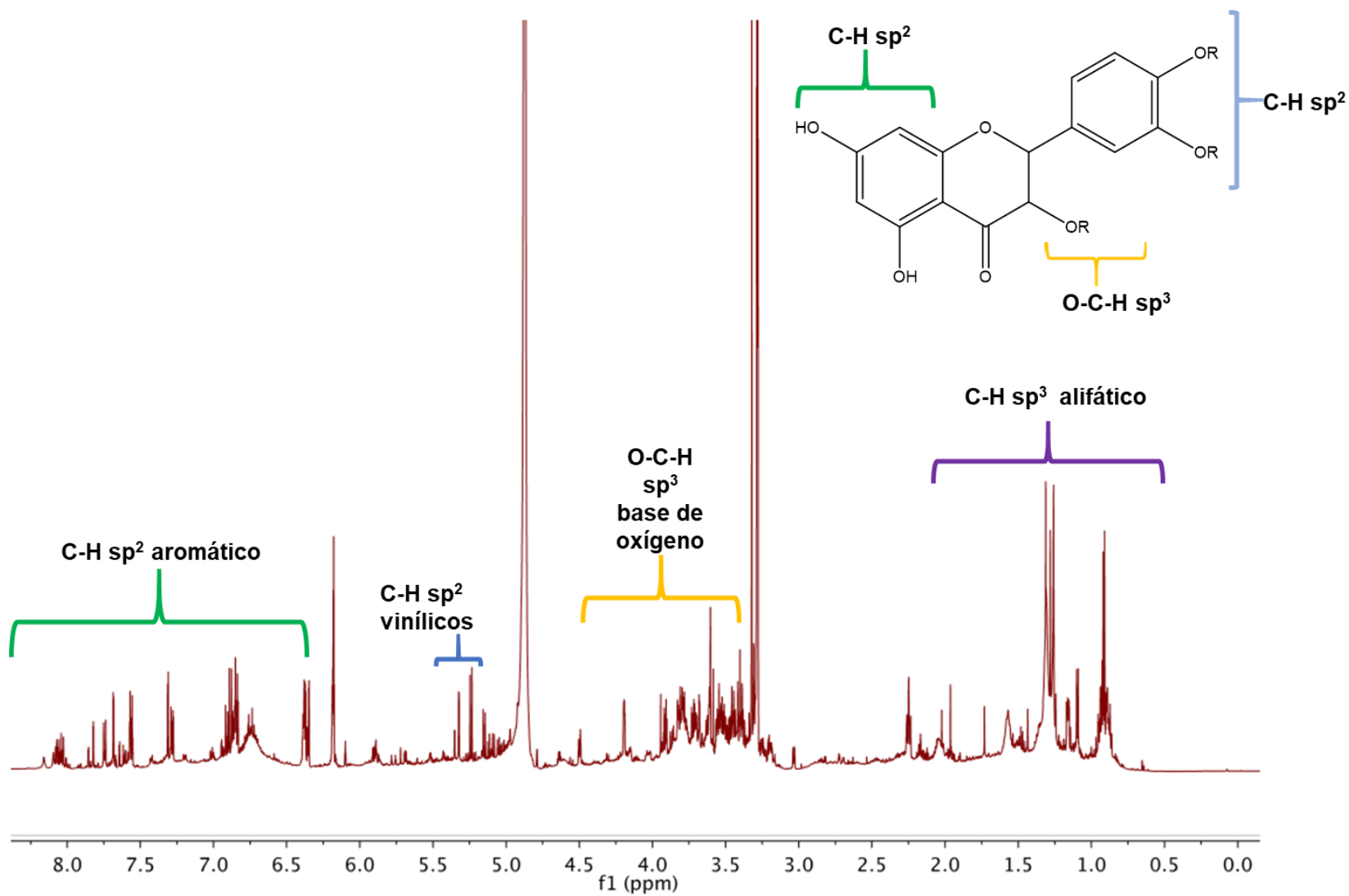


Figura 13. Espectro RMN ^1H (metanol- d_4) de la fracción de AcOEt de la IBD.

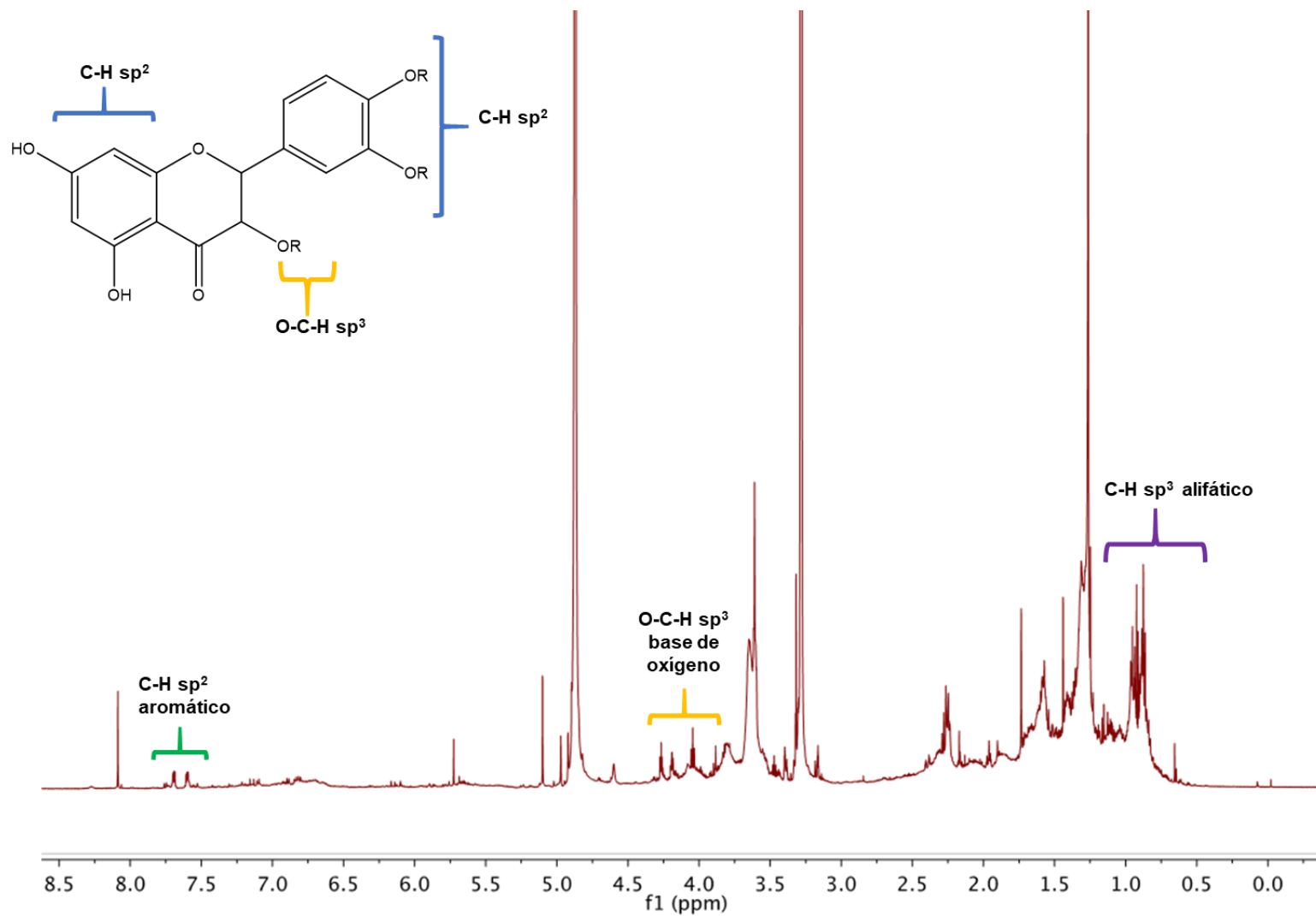


Figura 14. Espectro RMN ^1H (metanol- d_4) de la fracción de CH_2Cl_2 de la IBD

6.4.4 Análisis de los compuestos volátiles del aceite esencial por CG-EM

El rendimiento del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de las hojas secas de *B. divaricata* fue del 0.17%. Para la identificación de los compuestos detectados en los cromatogramas se consideraron los índices de retención de Kovats y los espectros de masas, los cuales se compararon con los de las bases de datos de referencia y los descritos en la literatura especializada. El análisis realizado por CG-EM permitió establecer que los compuestos mayoritarios del aceite esencial fueron el 2-hexenal (8.63%), etilbenceno (1.66%), *m*-xileno (4.84%), 1,3-dimetilbenceno (1.79%), decano (1.90%), undecano (6.24%), 2,6,10,14-tetrametil-heptadecano (1.81%), *trans*- α -bergamoteno (33.5%), cariofileno (2.24%), aromadendreno (3.15%), germacreno D (6.27%), β -bisaboleno (6.70%), β -cadineno (18.49%), β -vatiireno (9.91%), globulol (5.22%), τ -cadinol (11.15%), y el palmitato de *t*-butilo (2.97%). En la **Figura 15** se presenta el cromatograma del aceite esencial con los compuestos mayoritarios identificados y en la **Tabla 6** se muestran las estructuras de los compuestos.

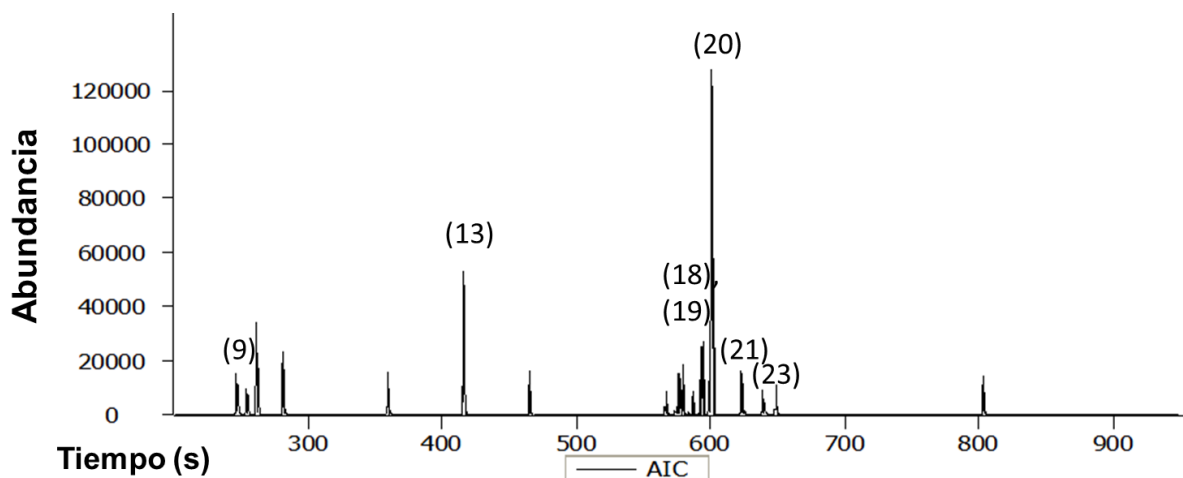
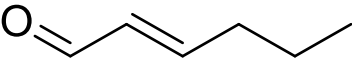
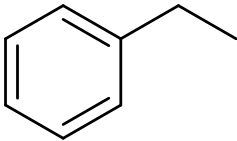
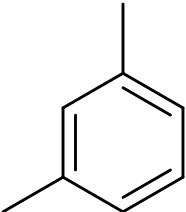

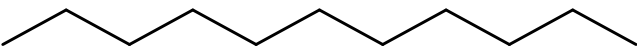
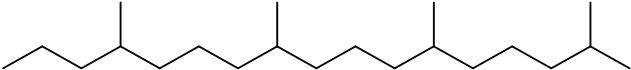
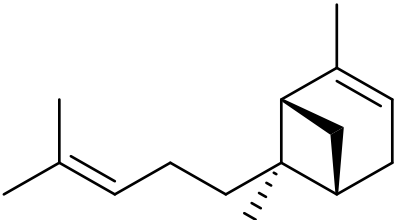
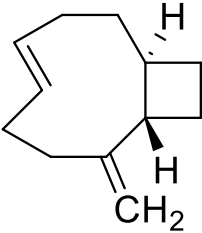
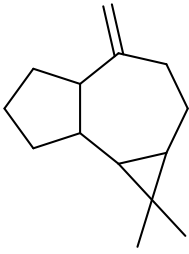
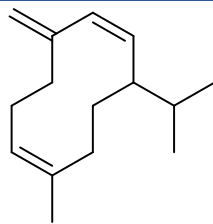
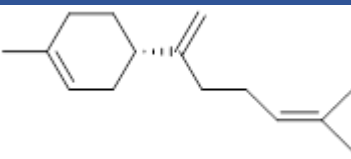
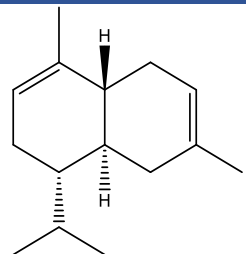
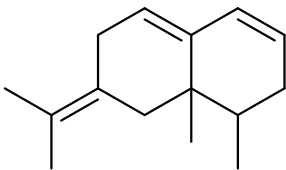
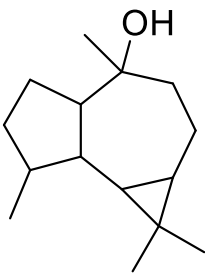


Figura 15. Cromatograma del aceite esencial de *B. divaricata*. Compuestos mayoritarios identificados: 2-hexenal (9), undecano (13), germacreno D (18), β -bisaboleno (19), β -cadineno (20), β -vatiireno (21) y τ -cadinol (23).

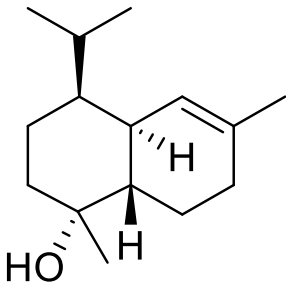
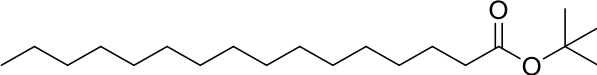
Tabla 6. Componentes del aceite esencial de la droga cruda de *B. divaricata*

Compuesto	tR (s)	Area %	Estructura
2-Hexenal (9)	246.3	8.63	
Etilbenceno (10)	253.8	1.66	
<i>m</i> -Xileno (11)	261.1	4.84	
Decano (12)	359.2	1.90	
Undecano (13)	415.7	6.24	
2,6,10,14-Tetrametilheptadecano (14)	464.5	1.81	
<i>trans</i> - α -Bergamoteno (15)	566.6	3.35	
β -Cariofileno (16)	576.2	2.24	

Continuación **Tabla 6.** Componentes del aceite esencial de la droga cruda de *B. divaricata*

Compuesto	tR (s)	Área %	Estructura
Aromadendreno (17)	579.2	3.15	
Germacreno D (18)	586.5	6.27	
β -Bisaboleno (19)	593.9	6.70	
β -Cadineno (20)	601.0	18.49	
β -Vatireneno (21)	622.6	9.91	
Globulol (22)	638.7	5.22	

Continuación **Tabla 6.** Componentes del aceite esencial de la droga cruda de *B. divaricata*

Compuesto	tR (s)	Área %	Estructura
τ -Cadinol (23)	648.5	11.15	
<i>t</i> -Butil-palmitato (24)	802.9	2.97	

Se ha reportado la composición química de los aceites esenciales de diversas especies del género *Bauhinia*. A diferencia de la esencia de *B. divaricata*, cuyo componente mayoritario es el sesquiterpeno *trans*- α -bergamoteno, el aceite de *B. pulchella* tuvo sólo 0.2% de éste, y los aceites esenciales de las hojas de *B. aculeata* y *B. petandra* presentaron trazas. El monoterpeno β -cariofileno resultó ser muy común en las esencias de *Bauhinia* que se revisaron en la literatura, además de ser el componente mayoritario en *B. petandra* (46.6%) y presente en menor proporción en *B. longifolia* (17.4%), en *B. forficata* (18.5%), en *B. tomentosa* (14.24%), en *B. acuminata* (13.87%) y en *B. variegata* (2.4%). El sesquiterpeno aromadendreno fue detectado en *B. variegata* (7.4%), *B. brevipes* (2.7%) y *B. rufa* (1.2%), y el sesquiterpeno germacreno D fue el componente principal de la esencia de *B. variegata* (24.7%), y que se detectó en menor cantidad en *B. pentandra* (8.4%). Por su parte, sólo en el aceite esencial de *B. rufa* se observó la presencia del sesquiterpeno oxigenado globulol (De Almeida et al., 2015; De Sousa et al., 2016; Duarte-Almeida et al., 2004; Vasudevan et al., 2014, 2013).

6.4.5 Perfil cromatográfico de los compuesto volátiles presentes en las hojas de *B. divaricata* la técnica de HS-SPME

Para identificar a los compuestos volátiles presentes en *B. divaricata* se empleó la técnica de HS-SPME y la identificación de los compuestos se realizó de la misma forma que en los análisis por CG-EM. En la **Figura 16** se muestra el cromatograma obtenido de los compuestos mayoritarios identificados y en la **Tabla 7** se muestran las estructuras de estos compuestos.

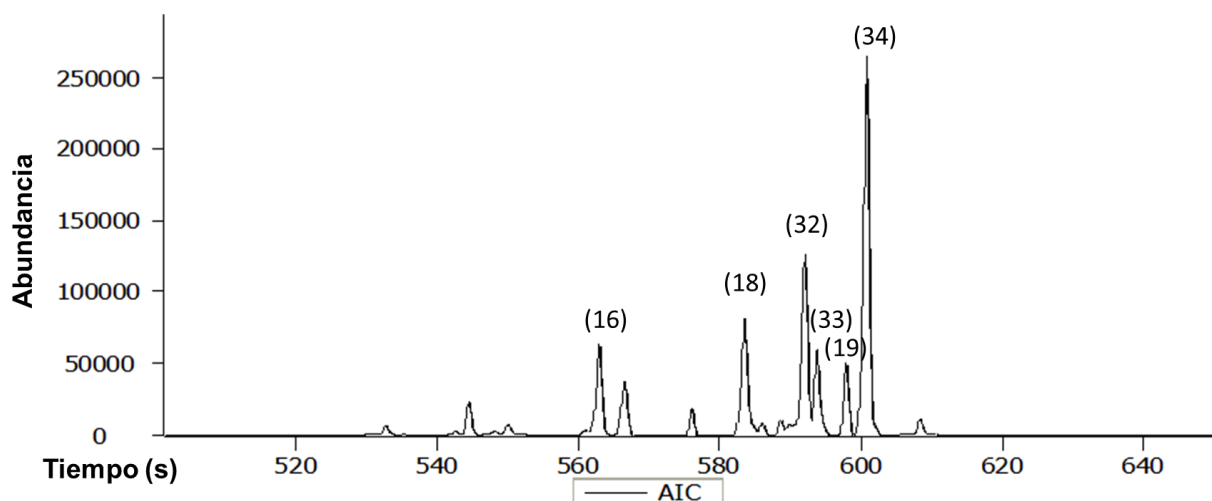
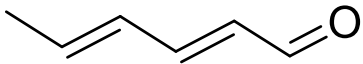
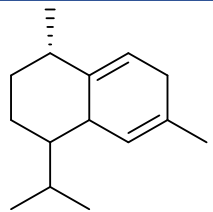
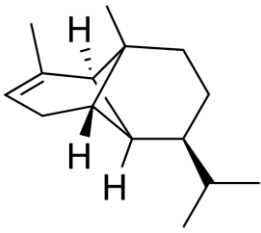
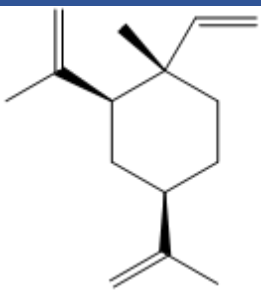
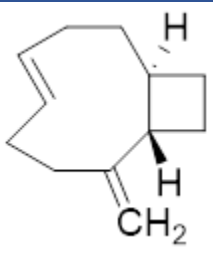
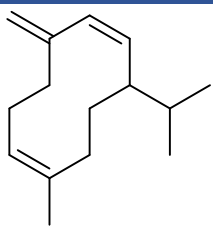
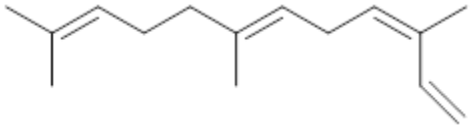


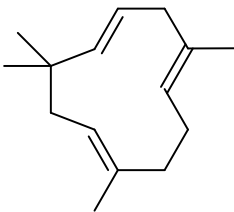
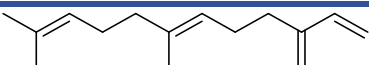
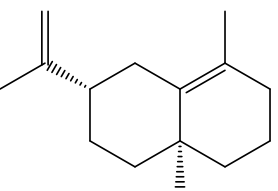
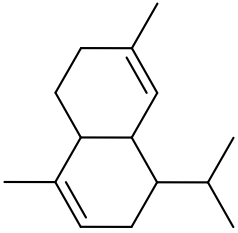
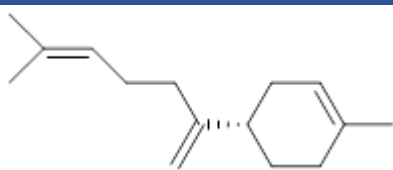
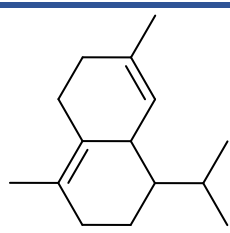
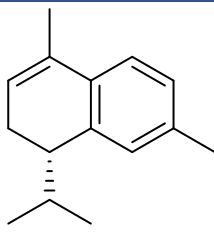
Figura 16. Cromatograma de compuesto volátiles de *B. divaricata*. Compuestos mayoritarios identificados: β -cariofileno (16), germacreno D (18), 4,11-selinadieno (32), α -amorfeno (33), β -bisaboleno (19) y δ -cadineno (34).

No se encontraron antecedentes en la literatura de uso de esta técnica para otras especies de *Bauhinia*, pero si se han descrito algunos de los compuestos detectados en *B. divaricata* en las esencias de otras especies del género. Por ejemplo, los sesquiterpenos δ -cadineno (22.4%), también está presente en los aceites esenciales de *B. variegata*, *B. brevipes* y *B. rufa*; el α -amorfeno (12.08%), en los aceites de *B. brevipes* y *B. rufa*, y el α -copaeno (3.86%), en la esencia de *B. forficata*. En los volátiles de las hojas de *B. divaricata* también se detectó al β -cariofileno (6.49%), el cual es común en las esencias de varias especies de *Bauhinia* (Duarte-Almeida et al., 2004).

Tabla 7. Compuestos volátiles identificados en la droga cruda de *B. divaricata*

Compuesto	tR (s)	Área %	Estructura
2,4-hexadienol (25)	300.9	3.60	
1,4-Cadinadieno (26)	532.8	2.34	
α -Copaeno (27)	544.5	3.86	
β -Elemeno (28)	550.0	1.70	
β -Cariofileno (16)	563.0	6.49	
Germacreno D (18)	566.3	4.95	
(<i>Z,E</i>)- α -Farneseno (29)	566.6	4.95	

Continuación **Tabla 7.** Compuestos volátiles identificados en la droga cruda de *B. divaricata*

Compuesto	tR (s)	Área %	Estructura
α -Cariofileno (30)	576.1	3.28	
β -Farneseno (31)	586.1	1.87	
4,11-selinadieno (32)	591.9	12.36	
α -Amorfeno (33)	592.2	12.08	
β -Bisaboleno (19)	593.8	6.08	
δ -Cadineno (34)	600.9	22.24	
α -Calacoreno (36)	608.5	2.20	

7. Conclusiones

- Los estudios *in vivo* desarrollados permitieron establecer la inocuidad y eficacia de la IBD. La DL_{50} de la infusión es mayor a 5 g/kg.
- La infusión es antihiper glucémica en ensayos de tolerancia a la sacarosa y almidón en ratones.
- La inhibición de los picos postprandiales de sacarosa y almidón que provocó la IBD da sustento científico a nivel preclínico a su consumo en las prácticas médicas populares como *agua de uso*, es decir, como un agente capaz de disminuir la glucemia tras la ingesta de carbohidratos complejos, lo cual es muy común en la dieta de nuestro país.
- Las fracciones de AcOEt y de CH_2Cl_2 de la infusión poseen actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa de levadura; la fracción de AcOEt es la más activa.
- Los perfiles cromatográficos por CCF y CLAE, así como el análisis de los espectros de UV, IR y RMN permitieron visualizar que la fracción activa de acetato de etilo de la infusión está constituida por compuestos de tipo flavonoide.
- Los perfiles cromatográficos por CG-EM permitieron identificar al monoterpeno β -cariofileno y a los sesquiterpenos *trans*- α -bergamoteno y δ -cadineno como mayoritarios de la esencia y de los volátiles por HS-SPME.
- Los perfiles cromatográficos generados serán de utilidad para el control de calidad de la especie *B. divaricata*.

8. Perspectivas

- Realizar el estudio químico de la fracción de AcOEt de la infusión de *B. divaricata* para aislar los compuestos responsables de su capacidad inhibitoria de enzimas α -glucosidasas, mediante técnicas fitoquímicas convencionales.
- Evaluar en modelos *in vivo* e *in vitro* los compuestos aislados para establecer el modo de inhibición de las enzimas α -glucosidasas.
- Desarrollar un método analítico por CLAE o por cromatografía de líquidos de ultraeficiencia acoplado a espectrometría de masas para cuantificar los principios activos en la infusión de *B. divaricata*.

9. Referencias

- Almeida, E.R., Guedes, M.C., Albuquerque, J.F.C., Xavier, H., 2006. Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. *Fitoterapia* 77, 276–278. doi:10.1016/j.fitote.2006.03.001
- Álvarez-Ospina, H., Rivero Cruz, I., Duarte, G., Bye, R., Mata, R., 2013. HPLC determination of the major active flavonoids and GC-MS analysis of volatile components of *Dysphania graveolens* (Amaranthaceae). *Phytochem. Anal.* 24, 248–254. doi:10.1002/pca.2405
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99, 325–48. doi:10.1016/j.jep.2005.04.019
- Barragán, H., Murillo Perea, E., Méndez Arteaga, J.J., 2010. Taxonomía y funcionalidad del género *Bauhinia*. *Taxonomy and functionality of gender Bauhinia*. *Tumbaga* 5, 119–134.
- Bischoff, H., 1995. The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clin. Invest. Med.* 18, 303–11.
- Da Cunha, A.M., Menon, S., Menon, R., Couto, A.G., Bürger, C., Biavatti, M.W., 2010. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Phytomedicine* 17, 37–41. doi:10.1016/j.phymed.2009.06.007
- Damasceno, D.C., Volpato, G.T., De Mattos Paranhos Calderon, I., Aguilar, R., Rudge, M.V.C., 2004. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: Maternal repercussions. *Phytomedicine* 11, 196–201. doi:10.1078/0944-7113-00348
- Dantas Fernandes, A.J., Ferreira, M.R., Perrelli Randau, K., Pereira de Souza, T., Lira Soares, L.A., 1, 2012. Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). *Sci. World J.* 2012. doi:10.1100/2012/923462
- Davis, J.A., Singh, S., Sethi, S., Roy, S., Mittra, S., Rayasam, G., Bansal, V., Sattigeri, J., Ray, A., 2010. Nature of action of Sitagliptin, the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor in diabetic animals. *Indian J. Pharmacol.* 42, 229–33. doi:10.4103/0253-7613.68425
- De Almeida, M.C.S., Souza, L.G.S., Ferreira, D.A., Monte, F.J.Q., Braz-Filho, R., De Lemos, T.L.G., 2015. Chemical composition of the essential oil and fixed oil *Bauhinia pentandra* (Bong.) D. Dietr. *Pharmacogn. Mag.* 11, S362–S364. doi:10.4103/0973
- De Sousa, L.M., De Carvalho, J.L., Gois, R.W.S., Da Silva, H.C., Santiago, G.M.P., Lemos, T.L.G., Arriaga, A.M.C., Alves, P.B., De Matos, I.L., Militão, G.C.G., Da Silva, P.B.N., Da Silva, T.G., 2016. Chemical composition, larvicidal and cytotoxic activities of the essential oils from two *Bauhinia* species. *Rec. Nat. Prod.* 10, 341–348.
- Duarte-Almeida, J.M., Negri, G., Salatino, A., 2004. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). *Biochem. Syst. Ecol.* 32, 747–753. doi:10.1016/j.bse.2004.01.003
- Farag, M.A., Sakna, S.T., El-Fiky, N.M., Shabana, M.M., Wessjohann, L.A., 2015. Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC-PDA-qTOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry* 119, 41–50.

doi:10.1016/j.phytochem.2015.09.004

- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Vinholes, J., Silva, S.T., Valentão, P., Andrade, P.B., 2012. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. *Food Chem.* 134, 894–904. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.201
- Flores-Bocanegra, L., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Mata, R., 2017. α -Glucosidase Inhibitors from *Salvia circinata*. *J. Nat. Prod.* 80, 1584–1593. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00155
- Fuentes, O., Alarcón, J., 2006. *Bauhinia candicans* stimulation of glucose uptake in isolated gastric glands of normal and diabetic rabbits. *Fitoterapia* 77, 271–275. doi:10.1016/j.fitote.2006.03.006
- Góis, R.W.S., Sousa, L.M. De, Horlando, C., Francisco, E.F., Pimenta, A.T.A., Lima, M.A.S., Arriaga, A.M.C., Lemos, T.L.G., Braz-filho, R., Militão, G.C.G., Paulo, B.N., Gonc, F.J.T., Santiago, G.M.P., 2017. Chemical constituents from *Bauhinia acuruana* and their cytotoxicity 27, 711–715. doi:10.1016/j.bjp.2017.09.002
- Hardie, D.G., Ross, F.A., Hawley, S.A., 2012. AMP-activated protein kinase: A target for drugs both ancient and modern. *Chem. Biol.* 19, 1222–1236. doi:10.1016/j.chembiol.2012.08.019
- Holt, R.I.G., Cockram, C.S., Flyvbjerg, A., Goldstein, B.J., 2010. Textbook of Diabetes: Fourth Edition, Textbook of Diabetes: Fourth Edition. doi:10.1002/9781444324808
- IDF, 2017. International Diabetes Federation Diabetes Atlas. doi:10.1016/j.diabres.2017.09.002
- INEGI, 2018. COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 525/18. PRINCIPALES CAUSAS DE MUERTE. [WWW Document]. URL http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DE_FUNCIONES2017.pdf (consultado 2.20.19).
- Krentz, A.J., Bailey, C.J., 2005. Oral antidiabetic agents in type 2 diabetes. *Drugs* 65, 385–411. doi:10.2165/00003495-200565030-00005
- Kulkarni, Y.A., Garud, M.S., 2016. *Bauhinia variegata* (Caesalpiniaceae) leaf extract: An effective treatment option in type I and type II diabetes. *Biomed. Pharmacother.* 83, 122–129. doi:10.1016/j.biopha.2016.06.025
- Lakhtakia, R., 2013. The history of diabetes mellitus. *Textb. Diabetes, Fourth Ed.* 13, 368–370. doi:10.1002/9781444324808.ch1
- Lino, C. de S., Diógenes, J.P.L., Pereira, B.A., Faria, R.A.P.G., Andrade Neto, M., Alves, R.S., Queiroz, M.G.R. de, Sousa, F.C.F., Viana, G.S.B., 2004. Antidiabetic Activity of *Bauhinia forficata* Extracts in Alloxan-Diabetic Rats. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 125–127. doi:10.1248/bpb.27.125
- López, C.V., 2017. Pruebas de composición e identidad para el control de calidad de la droga cruda de *Simira mexicana* (Bullock) Steyern (RUBIACEAE). Universidad Nacional Autónoma de México.

- Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 54, 275–287. doi:10.1007/BF01234480
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I., 2013. Mexican antidiabetic herbs: Valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *J. Nat. Prod.* 76, 468–483. doi:10.1021/np300869g
- Neto, M.M., Neto, M.A., Filho, R.B., Lima, M.A.S., Silveira, E.R., 2008. Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. 36, 2007–2009. doi:10.1016/j.bse.2007.08.006
- Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y., 1999. Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin. *J. Agric. Food Chem.* 47, 550–553. doi:10.1021/jf980788t
- 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. doi:10.1016/j.phytochem.2014.11.004
- Pepato, M.T., Keller, E.H., Baviera, A.M., Kettelhut, I.C., Vendramini, R.C., Brunetti, I.L., 2002. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 81, 191–197. doi:10.1016/S0378-8741(02)00075-2
- Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, I., Madariaga-Mazón, A., Figueroa, M., Mata, R., 2017. α -Glucosidase Inhibitors from *Preussia minimoides*. *J. Nat. Prod.* 80, 582–587. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00574
- Rojas Chávez, S., Vibrans, H., 2010. Malezas de México, Ficha - *Bauhinia divaricata* [WWW Document]. URL <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/caesalpinaceae/bauhinia-divaricata/fichas/ficha.htm>
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K., 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.* 51, 571–581. doi:10.1021/jf020926l
- Santos, M.M., Nunes, M.G.S., Martins, R.D., 2012. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. *Rev. Bras. Plantas Med.* 14, 327–334. doi:10.1590/S1516-05722012000200012
- Sashidhara, K. V, Singh, S.P., Misra, S., Gupta, J., Misra-bhattacharya, S., 2012. European Journal of Medicinal Chemistry Galactolipids from *Bauhinia racemosa* as a new class of anti filarial agents against human lymphatic filarial parasite, *Brugia malayi* q. *Eur. J. Med. Chem.* 50, 230–235. doi:10.1016/j.ejmech.2012.01.057
- Scarpa, G.F., 2004. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. *J. Ethnopharmacol.* 91, 115–135. doi:10.1016/j.jep.2003.12.003
- Silva, F.R.M.B., Szpoganicz, B., Pizzolatti, M.G., Willrich, M.A.V., De Sousa, E., 2002. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 83, 33–37. doi:10.1016/S0378-8741(02)00193-9
- Stefova, M., Stafilov, T., Kulevanova, S., 2003. HPLC Analysis of Flavonoids. *Encycl.*

- Torres-Colín, R., Duno de Stefano, R., Can, L.L., 2009. El género *Bauhinia* (Fabaceae , Caesalpinioideae , Cercideae) en la península de Yucatán (México , Belice y Guatemala). *Rev. Mex. Biodivers.* 80, 293–301.
- Trojan-Rodrigues, M., Alves, T.L.S., Soares, G.L.G., Ritter, M.R., 2012. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 139, 155–163. doi:10.1016/j.jep.2011.10.034
- TROPICOS, 2019. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. [WWW Document]. URL <http://www.tropicos.org/Name/13000796?tab=synonyms> (consultado 2.20.19)
- Upadhyay, J., Polyzos, S.A., Perakakis, N., Thakkar, B., Paschou, S.A., Katsiki, N., Underwood, P., Park, K.H., Seufert, J., Kang, E.S., Sternthal, E., Karagiannis, A., Mantzoros, C.S., 2018. Pharmacotherapy of type 2 diabetes: An update. *Metabolism.* 78, 13–42. doi:10.1016/j.metabol.2017.08.010
- Vasudevan, V., Mathew, J., Baby, S., 2014. Chemical Profiles of Essential Oils of *Bauhinia* Species from South India. *Asian J. Chem.* 26, 2204–2206. doi:http://dx.doi.org/10.14233/ajchem.2014.15654
- Vasudevan, V., Mathew, J., Baby, S., 2013. Chemical Composition of Essential Oil of *Bauhinia acuminata* leaves. *Asian J. Chem.* 25, 2329–2330. doi:10.9734/IRJPAC/2015/17199
- Volpato, G.T., Damasceno, D.C., Calderon, I. de M.P., Rudge, M.V.C., 1999. Estudo do extrato de *Bauhinia forficata* L. sobre o diabete em ratas prenhes. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2, 49–55.
- WHO, 2018. Diabetes [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (consultado 2.20.19).
- Yong, J.N., Ntie-Kang, F., 2015. The chemistry and biological activities of natural products from Northern African plant families: From Ebenaceae to Solanaceae. *RSC Adv.* 5, 26580–26593. doi:10.1039/c4ra15377d