



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Estudio químico y farmacológico de dos especies del género *Salvia*:
Una contribución para su uso racional

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ERIC DANIEL SALINAS ARELLANO

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Marzo 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Rafael Castillo Bocanegra

VOCAL: Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

VOCAL: Dra. Martha Lydía Macías Rubalcava

VOCAL: Dra. Guadalupe Esther Ángeles López

SECRETARIO: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Lugar donde se desarrolló el proyecto de tesis:

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Publicaciones:

Salinas-Arellano, E.; Pérez-Vásquez, A.; Rivero-Cruz, I.; Torres-Colin, R.; González-Andrade, M.; Rangel-Grimaldo, M.; Mata, R. (2020). Flavonoids and terpenoids with PTP-1B inhibitory properties from the infusion of *Salvia amarissima* Ortega. *Molecules*, 25, 1-18. Doi: 10.3390/molecules25153530

M. en C. Eric Daniel Salinas Arellano
Sustentante

Dra. Rachel Mata Essayag
Tutora

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México que, a través de su Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas en la Facultad de Química, me proporcionó los recursos para concluir mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (Becario/CVU: 289212/514284) y, de igual manera, por el financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACyT CB A1-S-11226 y DGAPA-UNAM IN 217320, indispensables para la realización del presente proyecto.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por sus valiosas enseñanzas, su paciencia y su confianza otorgados durante el desarrollo de este proyecto de investigación. Muchas gracias.

Al Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas, al Dr. Martín González Andrade y al Dr. José Fausto Rivero Cruz miembros del Comité Tutoral, por sus aportaciones y valiosas observaciones para la realización del presente proyecto.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz, por su asesoría técnica, su supervisión, su amistad y sobre todo por compartir sus conocimientos para realización de este trabajo de investigación. Muchas gracias.

A la Dra. Araceli Pérez Vázquez, por su valioso tiempo, su amistad, su asesoría técnica y su apoyo incondicional que fueron importantes para el desarrollo de este proyecto de investigación. Muchas gracias.

Al Dr. Manuel Eduardo Rangel Grimaldo, por sus asesorías, su apoyo, sus consejos y, sobre todo, su gran amistad. Muchas gracias.

A la Dra. Berenice Ovalle Magallanes, por brindarme sus conocimientos a lo largo del presente trabajo.

Al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar, por todos los consejos académicos y apoyos recibidos durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, por sus consejos y el apoyo recibido a lo largo de este trabajo de investigación.

Al personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química: Q. Georgina Duarte Lisci, por su excelente asesoría y apoyo en los análisis microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, así como el registro de los espectros de masas; a las Maestras Rosa Isela del Villar

Morales y Nayeli López Balbiaux, por la obtención de los espectros de RMN y a la Q. Marisela Gutiérrez Franco por los análisis de IR.

Al M. C. Rafael Torres Colín, del Instituto de Biología, UNAM, por realizar la identificación botánica del material vegetal.

Al Dr. Martín González Andrade de la Facultad de Medicina, por su colaboración en la realización de los estudios de dinámica molecular y por brindarnos la enzima PTP-1B, indispensable para la evaluación de actividad biológica, así también, por todo el apoyo recibido.

A los miembros del jurado, por las revisiones y observaciones realizadas, que permitieron enriquecer el presente trabajo.

A compañeros y amigos del laboratorio 124 y 125. Miriam, Valeria, Oscar, Daniela, Jenifer, Laura, Alejandra, Sergio, Alejandro, Erika, Sofía, Alberto, Miguel, Rocío, Carlos, Enrique y Rodrigo. Por su apoyo, sus consejos y su amistad. Muchas gracias.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a:

Dios por darme salud, sabiduría y fuerzas para poder culminar este proyecto.

Mi esposa Liliana Alcázar y a mi hijo Nicolás por su apoyo incondicional, su confianza, su amor, y sus palabras de aliento de nunca darme por vencido. Gracias por tu comprensión y apoyo a lo largo de mi formación profesional. ¡Muchas gracias por confiar en mí!

Mis padres, María de la Paz Arellano y Roberto Salinas, pilares fundamentales en mi vida, quienes a lo largo de todo este proceso han apoyado y motivado mi formación académica.

Mis hermanas Brizeida, Diana y Lucero por su apoyo y amor infinito.

“El secreto del éxito es la persistencia por la meta”. Benjamín Disraeli.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XIV
1. Antecedentes	1
1.1. Diabetes mellitus (DM).....	1
1.2. Patogenia	2
1.3. Homeostasis de glucosa en el organismo	2
1.4. Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus	6
1.4.1. Fármacos que estimulan la secreción de insulina	7
1.4.2. Sensibilizadores de insulina	10
1.4.3. Glucosúricos	12
1.4.4. Míméticos de amilina	13
1.4.5. Insulina	14
1.4.6. Inhibidores de la α -amilasa.....	16
1.4.7. Inhibidores de las α -glucosidasas	18
1.4.7.1. Estructura y clasificación de las α -glucosidasas	18
1.4.7.2. Mecanismo de hidrólisis de las α -glucosidasas	19
1.4.7.3. Fármacos inhibidores de las α -glucosidasas	21
1.4.7.4. Compuestos con actividad sobre la enzima α -glucosidasa	22
1.4.8. Inhibidores de la enzima PTP-1B	24
1.4.8.1. Estructura y clasificación de la enzima PTP-1B	24
1.4.8.2. Mecanismo de la enzima PTP-1B	27
1.4.8.3. Compuestos con actividad sobre la enzima PTP-1B	28
1.5. Generalidades de nocicepción	30
1.5.1. Fisiopatología del dolor	31
1.5.2. Dolor experimental en animales	33
1.5.3. Plantas medicinales para el alivio del dolor	35
1.5.4. Productos naturales con efecto analgésico	36
1.6. <i>Salvia amarissima</i> Ortega (Syn: <i>S. circinata</i> Cav.)	38
1.6.1. Composición química y propiedades biológicas de <i>S. amarissima</i>	38
1.7. <i>Salvia microphylla</i> Kunth (Syn: <i>S. grahami</i> Benth.)	40
1.7.1. Composición química y propiedades biológicas de <i>S. microphylla</i>	41
1.8. Control de calidad de plantas medicinales	44
2. Justificación	47
3. Hipótesis	48
4. Objetivos	49
4.1. Objetivos generales	49
4.2. Objetivos particulares	49
5. Parte experimental	50
5.1. Procedimientos generales	50
5.1.1. Caracterización de los productos naturales	50
5.1.2. Análisis cromatográficos	50
5.2. Material vegetal	51
5.3. Estudio químico de la especie de <i>S. amarissima</i>	52
5.3.1. Preparación del extracto acuoso.....	52
5.3.2. Obtención de las fracciones orgánicas del extracto acuoso	52
5.3.3. Fraccionamiento de la fracción de AcOEt	52

5.3.4.	Fraccionamiento del extracto acuoso.....	53
5.3.4.1.	Hidrólisis enzimática de la amarisólida G (55a,b).....	55
5.3.5.	Preparación del aceite esencial	55
5.3.6.	Análisis de los componentes volátiles por la técnica de microextracción en fase sólida	55
5.4.	Estudio químico de la especie de <i>S. microphylla</i>	56
5.4.1.	Preparación del extracto acuoso y orgánico	56
5.4.2.	Fraccionamiento del extracto acuoso	56
5.4.3.	Preparación del aceite esencial	57
5.4.4.	Análisis de microextracción en fase sólida	57
5.5.	Ensayos biológicos	57
5.5.1.	Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
5.5.2.	Evaluación de la actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B humana... ..	59
5.5.2.1.	Expresión y purificación de la enzima <i>h</i> PTP-1B	59
5.5.2.2.	Ensayo de inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B	59
5.5.3.	Estudios farmacológicos <i>in vivo</i>	60
5.5.3.1.	Preparación y administración de muestras	60
5.5.3.2.	Evaluación del potencial antinociceptivo mediante el modelo de formalina.....	61
5.5.3.3.	Análisis estadísticos	61
5.6.	Estudios <i>in silico</i>	61
5.6.1.	Cálculos teóricos del diámetro circular	61
5.6.2.	Estudios de acoplamiento molecular	62
5.6.3.	Simulación de la dinámica molecular	63
5.7.	Pruebas de identidad y composición	64
5.7.1.	Desarrollo del método analítico de la fracción AcOEt de <i>S. amarissima</i>	64
5.7.1.1.	Preparación de la matriz de trabajo	64
5.7.1.2.	Validación del método analítico para la cuantificación de amarisólida	65
5.7.1.3.	Linealidad del sistema	65
5.7.1.4.	Exactitud	65
5.7.1.5.	Precisión del sistema	66
5.7.1.6.	Límite de cuantificación y límite de detección	66
5.7.1.7.	Cuantificación de amarisólida (1)	66
5.8.	Predicción de las propiedades moleculares de los productos aislados (predicción de la similitud con fármacos)	66
5.9.	Predicción de la toxicidad <i>in silico</i>	67
5.10.	Tendencias farmacocinéticas de los metabolitos aislados	67
5.11.	Posibles actividades biológicas de los compuestos aislados relacionados en la terapia de la DMT-2 y el dolor	67
5.12.	Simulación de la obtención de un compuesto líder	68
6.	Resultados y discusión	69
6.1.	Estudio químico y farmacológico de la especie <i>S. amarissima</i>	69
6.1.1.	Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios	69
6.1.2.	Pruebas de identidad y composición	73
6.1.2.1.	Desarrollo del perfil cromatográfico de la fracción orgánica de la infusión de <i>S. amarissima</i>	73
6.1.2.2.	Validación del método para cuantificación de amarisólida (1) mediante CLUE-EM	73
6.1.2.2.1.	Linealidad del sistema	74
6.1.2.2.2.	Linealidad del método	74

6.1.2.2.3. Exactitud del método	76
6.1.2.2.4. Precisión del sistema	77
6.1.2.2.5. Límite de detección y límite de cuantificación	78
6.1.2.2.6. Cuantificación de amarisólida (1)	81
6.1.2.3. Composición química del aceite esencial de la planta seca y fresca	82
6.1.2.4. Microextracción en fase sólida de los compuestos volátiles	84
6.1.3. Ensayos biológicos	85
6.1.3.1. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa de levadura	85
6.1.3.2. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima PTP-1B humana	87
6.1.4. Estudio <i>in silico</i>	88
6.1.4.1. Estudios de acoplamiento molecular en la α -glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i> ...	88
6.1.4.2. Estudios de acoplamiento molecular en la enzima PTP-1B de humano	93
6.1.4.2.1. Sitio catalítico	93
6.1.4.2.2. Sitio alostérico	98
6.1.4.3. Estudios de dinámica molecular	103
6.2. Estudio químico y farmacológico de la especie <i>S. microphylla</i>	105
6.2.1. Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios	105
6.2.2. Pruebas de identidad y composición	106
6.2.2.1. Composición química del aceite esencial	106
6.2.2.2. Microextracción en fase sólida de los compuestos volátiles	107
6.2.3. Ensayos biológicos	109
6.2.3.1. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa de levadura	109
6.2.3.2. Ensayo <i>in vitro</i> sobre la actividad de la enzima PTP-1B del extracto acuoso y compuestos puros	110
6.2.3.3. Evaluación del potencial antinociceptivo	111
6.2.4. Estudios de acoplamiento molecular	115
6.2.4.1. Enzima α -glucosidasa de <i>S. cerevisiae</i>	115
6.2.4.2. Enzima PTP-1B	118
6.2.4.2.1. Sitio catalítico	118
6.2.4.2.2. Sitio alostérico	121
6.3. Simulación computacional de propiedades fisicoquímicas y similitud a fármacos	123
6.3.1. Predicción de las propiedades moleculares de los productos aislados de la especie de <i>Salvia</i> (1, 13, 50-57) y compuestos fúngicos (95-97) (Anexo 3)	123
6.3.1.1. Peso molecular	124
6.3.1.2. Lipofilicidad	124
6.3.1.3. Solubilidad	124
6.3.1.4. Área de superficie polar topológica	125
6.3.1.5. Flexibilidad molecular	125
6.3.1.6. Aceptores y donadores de hidrógeno	125
6.3.1.7. Similitud a fármacos	126
6.3.2. Predicción de toxicidad <i>in silico</i>	128
6.3.3. Tendencias farmacocinéticas de los metabolitos	130
6.3.3.1. Absorción GI	130
6.3.3.2. Barrera hematoencefálica	130
6.3.3.3. Glicoproteína-P	131
6.3.3.4. Biodisponibilidad	131

6.3.3.5. Metabolismo	131
6.3.3.6. Unión a proteínas plasmáticas	134
6.3.3.7. Excreción renal	134
6.3.4. Posibles actividades biológicas de los compuestos 1 y 97 relacionados en la terapia de la DMT-2 y el dolor	135
6.3.5. Simulación de obtención de un compuesto líder	137
7. Conclusiones	145
8. Referencias	147
9. Anexos	166
Anexo 1	166
Anexo 2	197
Anexo 3	240
Anexo 4	255

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Transporte de glucosa de la luz intestinal hasta el torrente circulatorio	4
2	Liberación de insulina de células β -pancreáticas	5
3	Transporte del GLUT-4 a la membrana celular mediado por insulina	6
4	Compuestos con actividad hipoglucemiante de acción directa en el páncreas	8
5	Compuestos que inhiben la actividad de la enzima DPP-4	9
6	Ejemplos de compuestos que aumentan la secreción de GLP-1 (1) e incrementan la expresión del receptor GLP-1 (2)	10
7	Agentes terapéuticos agonistas de PPAR γ	11
8	Compuestos que favorecen la captura de glucosa por activación de la vía AMPK	12
9	Compuestos que inhiben a SGLT2	13
10	(A) Movimientos intracelulares de la insulina y sus precursores. (B) Secuencia de aminoácidos y representación bidimensional de la insulina. (C) Estructura 3D de la insulina. La cadena A se representa en color amarillo, la cadena B en color gris y los puentes de disulfuro en color verde (imagen tomada del Menting et al., 2013).	15
11	Compuestos que inhiben la actividad de α -amilasa	17
12	(A) Intestino delgado. (B) Epitelio intestinal. (C) Enterocito. (D) Representación 3D de la isomaltasa. El dominio A se representa en color amarillo, el dominio B en color azul y el dominio C en rojo. Un ion de calcio se muestra como una esfera violeta. El extremo reductor del residuo de glucosa se muestra en verde. Los tres residuos catalíticos se muestran como un modelo de barra (imagen tomada de Yamamoto et al., 2010).	19
13	Mecanismo de hidrólisis de las α -glucosidasas con inversión de la estereoquímica	20
14	Mecanismo de hidrólisis de las α -glucosidasas con retención de la estereoquímica	20
15	Compuestos con actividad sobre las enzimas α -glucosidasas	24
16	Vías de señalización de la insulina y la leptina que involucran a la PTP-1B	25
17	Estructura terciaria de la PTP-1B (PDB: 1SUG). Asas: WPD (amarillo), Q (morado), PY (naranja) y P (azul cielo); la Cys215 (rojo) y la Arg221 (azul marino) esenciales para la actividad catalítica de la enzima.	27
18	Mecanismo de acción del sitio activo de la PTP-1B	28
19	Compuestos de origen natural o semisintético que inhiben a la PTP-1B	30
20	Organización esquemática del mecanismo de percepción del dolor. (Modificado de Mouraux et al., 2018)	33
21	Compuestos aislados de plantas medicinales con actividad analgésica	36
22	Compuestos con actividad analgésica	37
23	<i>Salvia amarissima</i> Ortega. (Lamiaceae).	38

24	Metabolitos aislados de las partes aéreas de <i>S. amarissima</i>	39
25	<i>Salvia microphylla</i> Kunth. (Lamiaceae)	41
26	Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas de <i>S. amarissima</i>	69
27	Espectro de RMN- ¹ H (700 MHz) de la amarisólida G (55ab) en DMSO- <i>d</i> ₆	71
28	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz) de la amarisólida G (55ab) en DMSO- <i>d</i> ₆	71
29	Comparación del espectro de DC de la amarisólida G (55ab)	71
30	Perfil cromatográfico de la fracción de AcOEt representativo de la composición química de las partes aéreas de <i>S. amarissima</i> .	73
31	Curvas de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico. (A) PDA; (B) ESI-negativo.	74
32	Curvas de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico. (A) PDA; (B) ESI-negativo	75
33	Curvas de calibración para la determinación de LD y LC de amarisólida (1). PDA	80
34	Curvas de calibración para la determinación de LD y LC de amarisólida (1). ESI-negativo	81
35	Cromatograma iónico total del aceite esencial de <i>S. amarissima</i> analizado en una columna capilar DB-5. (A) Planta fresca; (B) Planta seca.	83
36	Cromatograma iónico total de los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de <i>S. amarissima</i> analizado en una columna capilar DB-5 por la técnica de MEFS	84
37	Reacción de hidrólisis en la determinación espectrofotométrica de inhibición de las enzimas α-glucosidasas.	85
38	Reacción de hidrólisis en la determinación espectrofotométrica de la inhibición de la enzima PTP-1B	87
39	Posibles sitios de unión para la acarbosa (morado), pedalitina (13 ; amarillo) y 6-hidroxiluteolina (51 ; naranja) con la enzima la α-glucosidasa de levadura (azul; PDB 3A4A)	89
40	Representación en 3D del posible modo de unión de la acarbosa con la enzima α-glucosidasa de levadura.	90
41	Interacciones enzima-ligando en 2D de la acarbosa con la α-glucosidasa de levadura	90
42	Representación en 3D del posible modo de unión de la pedalitina (13) con la enzima α-glucosidasa de levadura.	91
43	Interacciones enzima-ligando en 2D de la pedalitina (13) con la α-glucosidasa de levadura	91
44	Representación en 3D del posible modo de unión de la 6-hidroxiluteolina (51) con la enzima α-glucosidasa de levadura	92
45	Interacciones enzima-ligando en 2D de la 6-hidroxiluteolina (51) con la α-glucosidasa de levadura.	92
46	Posibles sitios de unión para el ácido ursólico (verde), amarisólida (1; morado) y pedalitina (13 ; azul) con el sitio activo de la enzima PTP-1B (azul turquesa; PDB 1G7F)	94

47	Representación en 3D del posible modo de unión del ácido ursólico con la PTP-1B (sitio catalítico)	94
48	Interacciones enzima-ligando en 2D del ácido ursólico con la PTP-1B (sitio catalítico)	95
49	Representación en 3D del posible modo de unión de la amarisólida (1) con la PTP-1B (sitio catalítico)	95
50	Interacciones enzima-ligando en 2D de la amarisólida (1) con la PTP-1B (sitio catalítico)	96
51	Representación en 3D del posible modo de unión de la pedalitina (13) con la PTP-1B (sitio catalítico)	96
52	Interacciones enzima-ligando en 2D de la pedalitina (13) con la PTP-1B (sitio catalítico)	97
53	Posibles sitios de unión para el ácido ursólico (verde), amarisólida (1 ; morado) y pedalitina (13 ; azul) con el sitio alostérico de la enzima PTP-1B (rosa; PDB 1T49)	99
54	Representación en 3D del posible modo de unión del ácido ursólico (1) con la PTP-1B (sitio alostérico)	99
55	Interacciones enzima-ligando en 2D del ácido ursólico con la PTP-1B (sitio alostérico)	100
56	Representación en 3D del posible modo de unión de la amarisólida (1) con la PTP-1B (sitio alostérico)	100
57	Interacciones enzima-ligando en 2D de la amarisólida (1) con la PTP-1B (sitio alostérico)	101
58	Representación en 3D del posible modo de unión de la pedalitina (13) con la PTP-1B (sitio alostérico)	101
59	Interacciones enzima-ligando en 2D de la pedalitina (13) con la PTP-1B (sitio alostérico)	102
60	Análisis de la trayectoria de los estudios de dinámica molecular del sitio catalítico de la PTP-1B para la amarisólida (1). (A) Estructura de los modelos. (B) RMSD en función del tiempo. (C) RMSF desde la trayectoria molecular. AU: Ácido ursólico	104
61	Análisis de la trayectoria de los estudios de dinámica molecular del sitio alostérico de la PTP-1B para la pedalitina (13). (A) Estructura de los modelos. (B) RMSD en función del tiempo. (C) RMSF desde la trayectoria molecular. AU: Ácido ursólico	105
62	Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas de <i>S. microphylla</i>	106
63	Cromatograma iónico total del aceite esencial de <i>S. microphylla</i> analizado en una columna capilar DB-5	107
64	Cromatograma iónico total de los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de <i>S. microphylla</i> analizado en una columna capilar DB-5 por la técnica de MEFS	108
65	Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>S. microphylla</i> en el modelo de la formalina en ratones. SSI: Solución salina (0.9 %). DIC: Diclofenaco (50 mg/kg). Cada medida representa el promedio \pm el EEM con $n=8$. Prueba estadística: ANADEVa de dos vías con una prueba <i>post hoc</i> de Bonferroni	112

66	El efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>S. microphylla</i> en el modelo de la formalina en ratones. SSI: Solución salina (0.9 %). DIC: Diclofenaco (50 mg/kg). (A) ABC total (0–30 min) del tiempo de lamida. (B) ABC de la fase 1. (C) ABC de la fase 2. Cada barra representa el promedio \pm EEM con $n=8$. * = $p < 0.05$ %, prueba estadística: ANADEV A de una vía con una prueba <i>post hoc</i> de Dunnett	112
67	Curso temporal del efecto antinociceptivo del aceite esencial de <i>S. microphylla</i> en el modelo de la formalina en ratones. SSI: Solución salina (0.9 %). DIC: Diclofenaco (50 mg/kg). Cada medida representa el promedio \pm EEM con $n=8$. Prueba estadística: ANADEV A de dos vías con una prueba <i>post hoc</i> de Bonferroni	113
68	El efecto antinociceptivo del aceite esencial (A. E.) de <i>S. microphylla</i> en el modelo de la formalina en ratones. SSI: Solución salina (0.9%). DIC: Diclofenaco (50 mg/kg). A. Gráfico de ABC total (0-30 min) del tiempo de lamida. B. Gráfico de ABC de la fase 1. C. Gráfico del ABC de la fase 2. Cada barra representa el promedio \pm EEM con $n=8$. * = $p < 0.05$ %, prueba estadística: ANADEV A de una vía con una prueba <i>post hoc</i> de Dunnett.	114
69	Posibles sitios de unión para la acarbosa (morado) y el ziziflavosido B (56 ; amarillo) con la enzima α -glucosidasa <i>S. cerevisiae</i> (azul; PDB 3A4A)	115
70	Representación de la superficie de la enzima α -glucosidasa que interacciona con el ziziflavosido B (56 ; amarillo)	116
71	Representación en 3D del posible modo de unión del ziziflavosido B (56) con la enzima α -glucosidasa de levadura	116
72	Interacciones enzima-ligando en 2D del ziziflavosido B (56) con la α -glucosidasa de levadura	117
73	Posibles sitios de unión para el ácido ursólico (morado) y la orientina (57 ; naranja) con la PTP-1B (azul; PDB 1G7F)	118
74	Representación de la superficie de la enzima PTP-1B (sitio catalítico) que interacciona con la orientina (57 ; naranja)	119
75	Representación en 3D del posible modo de unión de la orientina (57) con la enzima PTP-1B (sitio catalítico)	119
76	Interacciones enzima-ligando en 2D de la orientina (57) con la PTP-1B (sitio catalítico)	120
77	Posibles sitios de unión para el ácido ursólico (morado) y la orientina (57 ; naranja) con la PTP-1B (rosa; PDB 1T49)	121
78	Representación de la superficie de la enzima PTP-1B (sitio alostérico) que interacciona con la orientina (57 ; naranja)	121
79	Representación en 3D del posible modo de unión de la orientina (57) con la enzima PTP-1B (sitio alostérico)	122
80	Interacciones enzima-ligando en 2D de la orientina (57) con la PTP-1B (sitio alostérico)	122
81	Regiones de las moléculas 1 y 97 con posible interacción con el ADN y proteínas	129

82	(A) Posibles reacciones metabólicas de fase I de la terezina D (97). (B) Posibles reacciones metabólicas de fase I y fase II de la amarisólida (1). UDPGT: UDP-glucuroniltransferasa	133
83	Diseño de compuestos líderes	138
84	Modelo estructural en 3D y aminoácidos involucrados en la unión entre la PTP-1B en el sitio catalítico 2D (1G7F). (A) El compuesto (104) (rosa) y (B) el compuesto (105) (azul)	142
85	Modelo estructural en 3D y aminoácidos involucrados en la unión entre la α -glucosidasa de levadura en el sitio catalítico 2D (3A4A) con el compuesto (106) (azul).	144

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Datos de RMN- ¹ H y ¹³ C de las amarisólidas D 55c (500/125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) y G 55a,b (700/175 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	72
2	Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema	74
3	Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método	75
4	Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de la amarisólida (1) con el detector PDA	76
5	Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de la amarisólida (1) con el detector de masas	77
6	Repetibilidad del sistema para la cuantificación de la amarisólida (1) con el detector PDA	78
7	Repetibilidad del sistema para la cuantificación de la amarisólida (1) con el detector ESI-negativo	78
8	Resultados para LD y LC de la amarisólida (1) con el detector PDA	79
9	Resultados para LD y LC de la amarisólida (1) con el detector ESI-negativo	80
10	Cuantificación de amarisólida (1) en la fracción de AcOEt de <i>S. amarissima</i> con el detector PDA.	81
11	Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de <i>S. amarissima</i> en fresco y seco	83
12	Compuestos volátiles de las partes aéreas de <i>S. amarissima</i> obtenidos por MEFS	85
13	Actividad del extracto acuoso, los aceites esenciales y los compuestos (1 , 13 , 50-55a,b) de <i>S. amarissima</i> en la enzima α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
14	Actividad del extracto acuoso, los aceites esenciales y los compuestos (1 , 13 , 50-55a,b) de <i>S. amarissima</i> en la enzima PTP-1B	88
15	Principales interacciones entre los compuestos (13 y 51) y la enzima α -glucosidasa de levadura	93
16	Principales interacciones entre los compuestos (1 y 13) y la enzima PTP-1B en el sitio catalítico	98
17	Principales interacciones entre los compuestos (1 y 13) y la enzima PTP-1B en el sitio alostérico	102
18	Cálculo de los componentes teóricos de la energía a partir de las trayectorias de DM	105
19	Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de <i>S. microphylla</i> en planta seca	106
20	Componentes volátiles de las partes aéreas de <i>S. microphylla</i> obtenidos por MEFS	108
21	Actividad del extracto acuoso, aceite esencial y los compuestos (56 y 57) de <i>S. microphylla</i> en la enzima α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	109
22	Actividad del extracto acuoso y los compuestos 56 y 57 de <i>S. microphylla</i> en la enzima PTP-1B	110
23	Principales interacciones entre el ziziflavosido B (56), la acarbosa y la enzima α -glucosidasa de levadura	117
24	Principales interacciones entre la orientina (57) y la enzima PTP-1B en el sitio catalítico	120
25	Principales interacciones entre la orientina (57) y la enzima PTP-1B en el sitio alostérico	123

26	Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de los compuestos (1 , 13 , 50–57 , 95–97) basado en SwissADME, Molinspiration, Osiris Property Explorer y OSIRIS DataWarrior	127
27	Predicción de la toxicidad de los compuestos (1 , 13 , 50-51 y 97) basado en SwissADME, admetSAR, preADMET y OSIRIS DataWarrior	128
28	Predicción absorción, metabólica, distribución y excreción de los compuestos (1 y 97) basado en SwissADME, admetSAR, preADMET, GLORYx, Way2Drug y Renal-ex Predictor	135
29	Relación estructura-actividad de los compuestos 1 y 97 basado en Molinspiration, Swiss TargetPrediction y PASS online	137
30	Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de los compuestos 104–106 basado en SwissADME, Molinspiration, Osiris Property Explorer y OSIRIS DataWarrior	138
31	Predicción absorción, metabólica, distribución y excreción de los compuestos 104–106 basado en SwissADME, admetSAR, preADMET, GLORYx, Way2Drug y Renal-ex Predictor	139
32	Relación estructura-actividad de los compuestos (104-106) basado en Molinspiration, Swiss TargetPrediction y PASS online	140
33	Principales interacciones entre las moléculas (1 , 104-105) y la enzima PTP-1B en el sitio catalítico	142
34	Principales interacciones entre las moléculas (97 y 106) y la enzima α -glucosidasa de levadura	144

TABLA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
GLUT	Transportador de glucosa
SGLT	Receptor cotransportador de sodio-glucosa
ATP	Adenosina trifosfato
AMP	Adenosina monofosfato
GLP-1	Péptido similar al glucagón-1
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
MAP	Cinasa activada por mitógeno
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
IRS	Sustrato receptor de insulina
IR	Receptor de insulina
PPAR	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
PTP-1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
DPP-4	Dipeptidil-peptidasa 4
SUR1	Receptor de sulfonilurea 1
Kir6.2	Canal de potasio de rectificación interna
TZD	Tiazolidindiona
AMPK	Proteína cinasa activada por adenosina 5-monofosfato
PMAT	Transportador de monoaminas de la membrana plasmática
OCT1	Transportador de iones orgánicos 1
S1	Segmento 1
IAPP	Polipéptido amiloide del islote
<i>p</i> -NPG	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucopiranosido
S _N 2	Sustitución nucleofílica bimolecular
α -GI	Inhibidores de α glucosidasas
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
PTK	Proteína tirosina cinasa
PTB	Proteína de unión a fosfotirosina
JAK2	Cinasa janus 2
STAT3	Transductor de señales y activador de la transcripción 3
OMS	Organización mundial de la salud
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CG	Cromatografía de gases
DC	Dicroísmo circular
DCE	Dicroísmo circular electrónico
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CCA	Cromatografía en columna abierta
AcOEt	Acetato de etilo
EA	Extracto acuoso
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
MEFS	Microextracción en fase sólida
CD ₃ OD	Metanol deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
MeOH	Metanol
PTPN1	Proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 1

IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
<i>p.o.</i>	Administración oral
<i>s.c.</i>	Administración subcutánea
DIC	Diclofenaco
ABC	Área bajo la curva
EEM	Error estándar de la media
ANADEVA	Análisis de varianza
PDB	Protein data bank
RMSD	Desplazamiento cuadrático medio de la raíz ponderada
RMSF	Fluctuaciones cuadráticas medias
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
gp-P	Glicoproteína-P
Å	Angström
K	Kelvin
atm	Atmósfera
DE	Desviación estándar
μ L	Microlitro
CV	Coefficiente de variación
μ m	Micrometro
μ M	Micromolar
δ	Desplazamiento químico
<i>m/z</i>	Relación masa carga
t_R	Tiempo de retención
UV	Espectroscopía en el ultravioleta
IR	Espectroscopía de infrarrojo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
COSY	Correlación homonuclear
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Hz	Hertz
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
TOCSY	Correlación total
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ESI	Ionización por electrospray
SSI	Solución salina isotónica
GI	Gastrointestinal
CYP-450	Enzima citocromo P-450
BHE	Barrera hematoencefálica
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
Pa	Probabilidad de actividad
ERK2	Cinasa 2 regulada por señales extracelulares
Fsp ³	Fracción de átomos de carbono con hibridación sp ³
TPSA	Área de superficie polar topológica
Δ G	Energía libre de unión
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenol fosfato
msnm	Metros sobre el nivel del mar
ppm	Partes por millón
AU	Ácido ursólico

RESUMEN

En el presente trabajo se describe el estudio químico y farmacológico de las especies vegetales *Salvia amarissima* y *S. microphylla* (Lamiaceae), las cuales se consumen en México como auxiliares en el tratamiento de la diabetes mellitus y el dolor, respectivamente. Con este trabajo se generó la información científica que sustenta la eficacia preclínica de ambas especies, y su uso tradicional. Además, se obtuvo información útil para el control de calidad de ambas especies.

Mediante el estudio químico de la infusión de *S. amarissima* permitió el aislamiento de la amarisólida (**1**) y la amarisólida G (mezcla epimérica) (**55a,b**), los cuales son glucósidos de diterpenoides de tipo *neo-clerodano*, además del ácido rosmarínico (**54**) y las flavonas nuchensin (**50**), 6-hidroxiluteolina (**51**), rutina (**52**), isoquercitrina (**53**) y pedalitina (**13**). Los productos **1**, **13** y **50–54** se caracterizaron por comparación de sus datos espectroscópicos (RMN) y espectrométricos (ESI-EM), con los reportados en la literatura especializada, mientras que la amarisólida G (**55a,b**) es una nueva entidad química y los productos **50–53** y el ácido rosmarínico (**54**) se describen por primera vez en la especie.

Con la finalidad de identificar los metabolitos activos del extracto acuoso se evaluó el efecto inhibitorio de todos los productos aislados **1**, **13** y **50–55a,b** contra las enzimas α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae* y PTP-1B humana. Los resultados revelaron que los metabolitos de naturaleza flavonoide poseen efecto inhibitorio contra la enzima α -glucosidasa, siendo los más activos **13** y **51** ($72 \pm 6 \mu\text{M}$ y $49 \pm 1 \mu\text{M}$, respectivamente). Además, la amarisólida (**1**; $280 \pm 26 \mu\text{M}$) y la pedalitina (**13**; $62 \pm 4 \mu\text{M}$) inhiben de manera significativa a la PTP-1B.

Con el objetivo de complementar los estudios de inhibición de los compuestos **13** y **51**, se realizaron análisis de acoplamiento molecular. Los resultados de este procedimiento sugieren que ambos productos podrían unirse al sitio catalítico de la enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae* (3A4A) mediante la formación de puentes de hidrógeno, fuerzas Van der Waals e interacciones de tipo π -alquilo.

Para complementar la actividad biológica observada en la enzima PTP-1B, se realizaron estudios de acoplamiento y dinámica molecular de los metabolitos bioactivos **1** y **13**. Los resultados de estos experimentos proponen que el producto **1** presenta mayor afinidad por el sitio catalítico de la enzima (1G7F) y la pedalitina (**13**) por el sitio alostérico (1T49). Ambos compuestos forman complejos estables mediante puentes de hidrógeno y fuerzas Van der Waals, principalmente.

Adicionalmente, la identificación de los componentes volátiles presentes en la droga cruda y en el aceite esencial de *S. amarissima*, se realizó mediante los análisis de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) y Microextracción en Fase Sólida (MEFS). Así, el análisis del aceite esencial por CG-EM reveló un elevado porcentaje del β -selineno (**64**) y el germacreno D (**63**), mientras que el análisis de la droga cruda por MEFS permitió identificar al 2-hexenal (**66**) como el componente más abundante.

Se validó un método analítico por CLUE-EM para la cuantificación de amarisólida (**1**) en el preparado tradicional. El método propuesto fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de las concentraciones evaluadas.

Por otra parte, el estudio químico del extracto acuoso de la especie de *S. microphylla* condujo al aislamiento de los flavonoides ziziflavosido B (**56**) y la orientina (**57**). La elucidación estructural de estos productos se realizó por comparación de sus datos espectroscópicos con los previamente reportados en la literatura. Es importante mencionar que estos productos son entidades químicas conocidas que se describen por primera vez para la especie en el presente trabajo.

Se realizó la evaluación enzimática *in vitro* de los productos **56** y **57** sobre las enzimas α -glucosidasa de *S. cerevisiae* y la PTP-1B humana. En el caso de la enzima α -glucosidasa, los resultados mostraron que la actividad de los metabolitos **56** y **57** es mayor que la del control positivo (acarbosa). Además, los productos **56** y **57** inhibieron la actividad de la enzima PTP-1B, mostrando una actividad menor que la del ácido ursólico.

Adicionalmente, se realizaron cálculos de acoplamiento molecular del producto **56** con la enzima α -glucosidasa de levadura (3A4A). El resultado sugiere que el compuesto **56** se une a un sitio diferente al catalítico mediante la formación de puentes de hidrógeno, fuerzas Van der Waals e interacciones de tipo π -amida. Para complementar la actividad biológica de la orientina (**57**), se realizaron estudios de acoplamiento molecular con la enzima PTP-1B humana [sitio catalítico (1G7F) y sitio alostérico (1T49)]. Se encontró que el metabolito **57** se une con mayor afinidad al sitio alostérico en comparación con el ácido ursólico.

La identificación de los componentes volátiles presentes en la droga cruda y en el aceite esencial de *S. microphylla*, se realizó mediante los análisis de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) y Microextracción en Fase Sólida (MEFS). Así, el análisis por CG-EM reveló la presencia de terpenos como el germacreno B, el epóxido de italiceno, el viridiflorol, el carotol y el

agarospirol (**73–77**), como compuestos mayoritarios de la esencia. Mediante la técnica de MEFS se identificaron al éter de cadineno (**85**) y la bourbonanona (**86**), entre los principales componentes de la composición total de volátiles.

Por otra parte, el aceite esencial y el extracto acuoso (infusión) de *S. microphylla* demostraron un efecto antinociceptivo durante la prueba de la formalina en ratones. Los resultados de esta evaluación indicaron que el extracto acuoso presenta su efecto por medio de mecanismos acción diferentes: fue activo contra el dolor del tipo neurogénico y contra el dolor inflamatorio. En cambio, el aceite esencial fue más activo contra el dolor de tipo neurogénico e inflamatorio.

Mediante la aplicación de diversas técnicas cromatográficas, fue posible aislar de los organismos fúngicos con claves CC6:6 y CC4:9, los compuestos conocidos como alternariol (**95**) y ácido kójico (**96**), respectivamente. A partir de la especie *Malbranchea fulva*, se aisló el producto natural llamado terezina D (**97**). La caracterización química de estos compuestos se realizó por comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura.

Los compuestos aislados a partir de estos organismos se evaluaron *in vitro* contra la enzima α -glucosidasa de levadura. Los resultados indican que únicamente la terezina D (**97**) inhibe de forma moderada a la enzima. Para complementar la actividad biológica del producto **97**, se realizaron estudios de acoplamiento molecular. Los resultados de dichos experimentos revelaron una posible unión de este producto en el sitio catalítico de la enzima (3A4A); el análisis predijo la estabilidad del complejo mediante puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas de Van der Waals e interacciones de tipo π .

A partir de las plataformas computacionales SwissADME, Molinspiration, Osiris Property Explorer y OSIRIS DataWarrior, se determinó que los compuestos **1** y **97** reúnen un mayor número de requisitos que les permitiría convertirse en fármacos. Además, se establecieron las posibles propiedades toxicológicas y farmacocinéticas de ambos productos. Los compuestos **104** y **105**, diseñados a partir de la amarisólida (**1**), mostraron una mayor probabilidad de ser fármacos, ya que se mejoraron sus propiedades farmacocinéticas (absorción y metabólicas) y presentaron una ligera afinidad por el sitio catalítico de la enzima PTP-1B, en comparación con su precursor **1**.

Finalmente, el compuesto **106** presentó un perfil farmacocinético similar a su precursor **97**. El estudio del modelado del sitio de unión del derivado **106** reveló que se une al sitio catalítico de la enzima α -glucosidasa con una energía de unión superior a la calculada para la terezina D (**97**).

En resumen, la información generada en el presente trabajo describe la composición química y las propiedades farmacológicas de las especies de *S. amarissima* y *S. microphylla*. Así mismo, esta información establece las pautas para sustentar su uso racional en la medicina popular mexicana para el tratamiento de la diabetes y el dolor. Finalmente, con base en los análisis *in silico*, se demostró que la amarisólida (**1**) y la terezina D (**97**) son buenos candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos.

ABSTRACT

The present work describes the chemical and pharmacological study of the plant species *Salvia amarissima* and *S. microphylla* (Lamiaceae), which are consumed in Mexico as auxiliaries for treating diabetes mellitus and pain, respectively. The results generated partially support the preclinical efficacy of both species. In addition, useful information for quality control of both species were obtained.

Chemical analysis of the infusion of *S. amarissima* led to the isolation of amarisolide (**1**) and amarisolide G (**55a,b**), which are *neo*-clerodane diterpenes glycosides, in addition to rosmarinic acid (**54**) and the flavones nuchensin (**50**), 6-hydroxyluteolin (**51**), rutin (**52**), isoquercitrin (**53**) and pedalitin (**13**). The known compounds **1**, **13**, **50-54** were characterized by comparing their spectroscopic (NMR) and spectrometric (ESI-MS) data with those reported in the specialized literature, while amarisolide G (**55a,b**) is a new chemical entity, while products **50-53** and rosmarinic acid (**54**) are described for the first time in the species.

In order to identify the active metabolites of the aqueous extract, the inhibitory effect of all the isolated products **1**, **13**, and **50-55a,b** against the α -glucosidase enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* and human PTP-1B was evaluated. The results revealed that the flavonoids inhibited the activity of yeast α -glucosidase enzyme, being **13** y **51** the most active ($72 \pm 6 \mu\text{M}$ y $49 \pm 1 \mu\text{M}$, respectively). In addition, amarisolide (**1**; $280 \pm 26 \mu\text{M}$) and pedalitin (**13**; 62 ± 4) significantly inhibit PTP-1B.

To complement the inhibition studies of compounds **13** and **51**, molecular coupling analyzes were performed. The results of this procedure suggest that both products could bind to the catalytic site of the *S. cerevisiae* alpha glucosidase enzyme (3A4A) through hydrogen bonding, Van der Waals forces and π -alkyl interactions.

To complement the biological activity observed in the PTP-1B enzyme, molecular dynamics and docking studies of **1** and **13** with PTP-1B. The results of these experiments propose that **1** has greater affinity for the catalytic site of the enzyme (1G7F), and pedalitin (**13**) to the allosteric site (1T49). Both compounds form stable complexes through the formation of hydrogen bonds and Van der Waals forces.

Additionally, the identification of the volatile components presents in the crude drug and in the essential oil of *S. amarissima*, was carried out by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and Solid Phase Microextraction (SMPE) analyzes. Thus, the essential oil by GC-MS

revealed a high percentage of β -selinene (**64**) and germacrene D (**63**), while the analysis of the crude drug by SPME allowed to identify 2-hexenal (**66**) as the most abundant component.

A suitable UHPLC-MS analytical method was validated for the quantification of amarisolide (**1**) in the traditional preparation. The proposed method was selective, linear, exact, and precise in the range of concentrations evaluated.

Regarding, the chemical study of the aqueous extract of *S. microphylla* led to the isolation of the flavonoids zizyflavoside B (**56**) and orientin (**57**). The structural elucidation of these products was carried out by comparing their spectroscopic data with those previously reported. It is important to mention that these products are known chemical entities that are described for the first time for the species in the present work.

In vitro enzymatic evaluation of the products **56** and **57** was performed on the alpha glucosidase enzymes of *S. cerevisiae* and human PTP-1B. In the case of the α -glucosidase enzyme, the results showed that the activity of metabolites **56** and **57** is greater than that of the positive control (acarbose). Furthermore, products **56** and **57** inhibited the activity of the PTP-1B enzyme, showing less activity than that of ursolic acid.

Additionally, docking analysis of **56** with yeast alpha glucosidase (3A4A) suggested that it allosterically attached to the enzyme through hydrogen bonding, Van der Waals forces, and π -amide interactions. To complement the biological activity of orientin (**57**), molecular coupling studies were carried out with the human PTP-1B enzyme [catalytic site (1G7F) and allosteric site (1T49)]. Metabolite **57** was found to bind with higher affinity to the allosteric as ursolic acid.

The volatile components present in *S. microphylla* were also identified. Thus, GC-MS of the essence revealed the presence of terpenes such as germacrene B, italicene epoxide, viridiflorol, carotol and agarospirol (**73–77**), as major compounds of the *S. microphylla* essence. Using SPME, cadinene ether (**85**) and bourbonanone (**86**) were identified as the main volatile components.

The essential oil and the aqueous extract (infusion) of *S. microphylla* demonstrated antinociceptive effect during the formalin test in mice. The results of the evaluations indicated that the aqueous extract was effective against neurogenic and inflammatory pain. In contrast, the essential oil was more active against neurogenic and inflammatory pain.

Through the application of various chromatographic techniques, it was possible to isolate from fungal organisms with codes CC6:6 and CC4:9, alternariol (**95**) and kojic acid (**96**), respectively. From the

Malbranchea fulva terezine D (**97**) was isolated. The chemical characterization of these compounds was carried out by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature.

The compounds isolated from the fungal organisms were evaluated against the yeast α -glucosidase. The results indicated that only terezine D (**97**) was active. According to docking analysis it binds to the catalytic site of the enzyme (3A4A) via hydrogen bonding, Van der Waals electrostatic interactions, and π -type interactions.

From computational platforms such as SwissADME, Molinspiration, Osiris Property Explorer and OSIRIS DataWarrior, it was determined that compounds **1** and **97** have the potential to become drugs. In addition, their possible toxicological and pharmacokinetic properties were established. Compounds **104** and **105** designed from amarisolide (**1**) have a higher probability of being drugs, with improved pharmacokinetic properties (absorption and metabolic) and affinity for the catalytic site of the PTP-1B enzyme, in comparison to its precursor **1**.

Finally, compound **106** presented a similar pharmacokinetic profile to its precursor **97**. Docking analysis predicted that it binds to the catalytic site of the α -glucosidase enzyme (3A4A) with higher energy binding than terezine D (**97**).

In summary, the information generated in the present work describes to the chemical composition and pharmacological properties of the species of *S. amarissima* and *S. microphylla*. Likewise, this information is valuable to establish the guidelines for the rational use of both species in Mexican folk medicine for treating diabetes and painful illness. Finally, according to *in silico* analyses amarisolide (**1**) and terezine D (**97**) are good lead for the development of new drugs.

1. Antecedentes

1.1. Diabetes mellitus (DM)

Existen evidencias de que la diabetes mellitus (DM) era conocida antes de la era cristiana. En el manuscrito descubierto por Ebers en Egipto, en el siglo XV a. C., se describen síntomas que corresponden a los de la DM. Areteo de Capadocia (médico griego), fue quien le dio el nombre de “diabetes” que en griego significa “sifón”, refiriéndose al síntoma de la poliuria. En 1675 Thomas Willis agregó la palabra “mellitus” debido al sabor dulce de la orina (Lakhtakia, 2013; Alam et al., 2017; Blaslov et al., 2018). Desde entonces, la comprensión de las causas y la búsqueda de tratamientos para esta enfermedad han sido constantes en el quehacer médico.

La DM es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. El principal síntoma de la diabetes es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre) crónica (OMS, 2020).

Los tipos más importantes de DM son la de tipo 1 (DMT-1), de tipo 2 (DMT-2) y la gestacional (DMG). La DMT-1 (diabetes insulino dependiente o juvenil) es autoinmune (el sistema inmune del cuerpo ataca a las células β -pancreáticas) y se caracteriza por la ausencia de síntesis de insulina. La DMT-2 (diabetes no insulino dependiente o del adulto) se debe a la falta de sensibilidad de los órganos blanco a la acción de la hormona; más del 90 % de los casos de DM corresponden a este tipo, y es más frecuente en personas obesas y mayores de 40 años, aunque en las últimas décadas se ha visto en niños y jóvenes debido a malos hábitos alimenticios, la alta incidencia de obesidad infantil y la falta de actividad física. La DMG corresponde a una hiperglucemia que se detecta por primera vez durante el embarazo y puede ocurrir en cualquiera de sus etapas. Las mujeres con diabetes gestacional corren mayor riesgo de sufrir complicaciones durante el embarazo y el parto. Además, tanto ellas como sus hijos, corren mayor riesgo de padecer DMT-2 en el futuro (OMS, 2020; FID, 2019).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Federación Internacional de la Diabetes (FID), el diagnóstico de diabetes se basa en los valores de glucemia en ayuno y postprandial. Los pacientes que presentan niveles de glucosa en ayuno entre 110 y 125 mg/dL (6.1–6.9 mmol/L) o entre 140 y 200 mg/dL (7.8–11.1 mmol/L) 2 h después de la administración de una carga definida de glucosa son diagnosticados como diabéticos. Una prueba útil para el seguimiento de los pacientes diabéticos es la cuantificación de la hemoglobina glucosilada, principalmente la fracción A1c, que constituye un buen indicador del control de la glucemia a largo plazo y predice el riesgo de complicaciones microvasculares. Los niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c) superiores a 48 mmol/mol (6.5 %) (OMS, 2020; FID, 2019).

1.2. Patogenia

La hiperglucemia crónica provoca diuresis osmótica, induciendo la pérdida de electrolitos por la orina. Cuando los niveles de glucosa en sangre sobrepasan los 10 mmol/L se comienzan a excretar grandes cantidades de glucosa por la orina (glucosuria). La glucosa en la orina se comporta como un diurético osmótico que arrastra agua, lo que incrementa la cantidad de orina excretada provocando poliuria. El incremento en la excreción de agua por la orina puede provocar deshidratación y acompañar a la cetoacidosis. La poliuria estimula el mecanismo de la sed y los pacientes comienzan a tomar mayores volúmenes de agua (polidipsia). La pérdida de peso del diabético involucra varios mecanismos como el incremento de la degradación de los triglicéridos del tejido adiposo o lipólisis y el catabolismo de las proteínas tisulares.

En la diabetes se produce la secreción de hormonas contrarreguladoras como la epinefrina, norepinefrina, hormona del crecimiento y el cortisol (Gerich, 2000). La patogénesis de las complicaciones implica a la hiperinsulinemia, la cual favorece los factores aterogénicos como la hipertensión arterial, la hiperlipidemia y la enfermedad macrovascular. Los productos finales de la glicación avanzada (gran cantidad de carbohidratos unidos a diferentes compuestos como las proteínas) originan la microangiopatía o enfermedad microvascular y se asocian a un riesgo mayor de sufrir infecciones y con la disminución en la velocidad de cicatrización de las heridas y se relacionan con trastornos de la función leucocitaria y la enfermedad vascular (Davis et al., 2009).

1.3. Homeostasis de glucosa en el organismo

Tradicionalmente, el término homeostasis ha aludido al conjunto de mecanismos que pretenden mantener la estabilidad en las propiedades del medio interno y, por lo tanto, la composición bioquímica de los líquidos y tejidos celulares con el único propósito de preservar la vida. Ahora bien, muchas patologías cursan con alteraciones de este vital mecanismo, de aquí la importancia de conocer la fisiopatología de la DM, ya que esta compromete en forma significativa la homeostasis de la glucosa en el organismo del individuo que la padece.

Los principales alimentos que sostienen la vida del organismo se clasifican, con excepción de los micronutrientes como las vitaminas y los minerales, en hidratos de carbono, grasas y proteínas. En general, la mucosa gastrointestinal no puede absorber ninguno de ellos en forma natural, por lo que, sin un proceso de digestión preliminar, no servirían como elementos nutritivos.

Casi todos los hidratos de carbono de los alimentos son polisacáridos o disacáridos formados, a su vez, por combinaciones de monosacáridos unidos entre sí. Las tres fuentes más importantes de hidratos de carbono son: la sacarosa, la lactosa y el almidón. Otros hidratos de carbono que se ingieren

en pequeñas cantidades son la amilosa, glucógeno, alcohol, ácido láctico, ácido pirúvico, pectinas y dextrinas. Cuando se mastican, los alimentos se mezclan con la saliva, que contiene la enzima ptialina (α -amilasa). Esta enzima hidroliza el almidón, al que convierte en un disacárido, la maltosa, y en otros pequeños polímeros de glucosa formados por tres a nueve moléculas de ésta. Sin embargo, los alimentos permanecen en la boca poco tiempo y es probable que, en el momento de su deglución, no más del 5% de todos los almidones ingeridos se encuentran hidrolizados. La digestión del almidón continúa en el fondo y el cuerpo gástrico, donde los alimentos se mezclan con las secreciones gástricas, las cuales hidrolizan entre el 30 y 40 % del almidón, sobre todo a maltosa. La secreción pancreática contiene, como la saliva, grandes cantidades de α -amilasa, cuya función es casi idéntica a la saliva, pero más potente. Así, entre 15 y 30 min después del vaciamiento del quimo desde estómago al duodeno y de su mezcla con el jugo pancreático, prácticamente la totalidad de los hidratos de carbono se han digerido.

Los enterocitos que revisten las vellosidades del intestino delgado contienen cuatro enzimas, lactasa, sacarasa, maltasa y α -dextrinasa, que hidrolizan los disacáridos lactosa, sacarosa y maltosa, así como otros carbohidratos pequeños. La lactosa se fracciona en una molécula de galactosa y glucosa. La sacarosa se divide en una molécula de fructosa y glucosa. La maltosa y los demás polímeros pequeños de glucosa se fraccionan en múltiples moléculas de glucosa. De esta forma, los productos finales de la digestión de los hidratos de carbono son todos monosacáridos hidrosolubles, que se absorben de inmediato y pasan a la sangre portal.

La glucosa y otros monosacáridos no se pueden difundir directamente al interior de las células; por lo cual, se utilizan dos mecanismos de transporte: un sistema de transporte por difusión facilitada, independiente de Na^+ y un sistema cotransportador de Na^+ -monosacáridos (Fig. 1). El sistema de transporte por difusión facilitada está mediado por una familia de 14 transportadores de glucosa en las membranas celulares. En la difusión facilitada, el movimiento de la glucosa sigue un gradiente de concentración, se denominan GLUT-1 a GLUT-14. Por ejemplo, el GLUT-1, GLUT-3 y GLUT-4 intervienen en la captación de glucosa desde la sangre. Por el contrario, el GLUT-2, se encuentra en el hígado, riñón y páncreas, puede transportar glucosa al interior de estas células cuando los niveles de glucosa son altos o transportar glucosa desde las células hacia la sangre cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos (durante el ayuno). El GLUT-5 es inusual en el sentido de que es el transportador principal para la fructosa en el intestino delgado y en los testículos.

El sistema cotransportador de Na^+ -monosacáridos o SGLT, es un proceso de transporte galactosa-glucosa “en contra” de un gradiente de concentración, en el que el movimiento del monosacárido está acoplado al gradiente de concentración de Na^+ , que se transporta al mismo tiempo al interior de la célula. Este tipo de transporte se produce en las células epiteliales del intestino, los túbulos renales y plexo coroideo (Pollard y Earnshaw, 2008; Guyton y Hall, 2016).

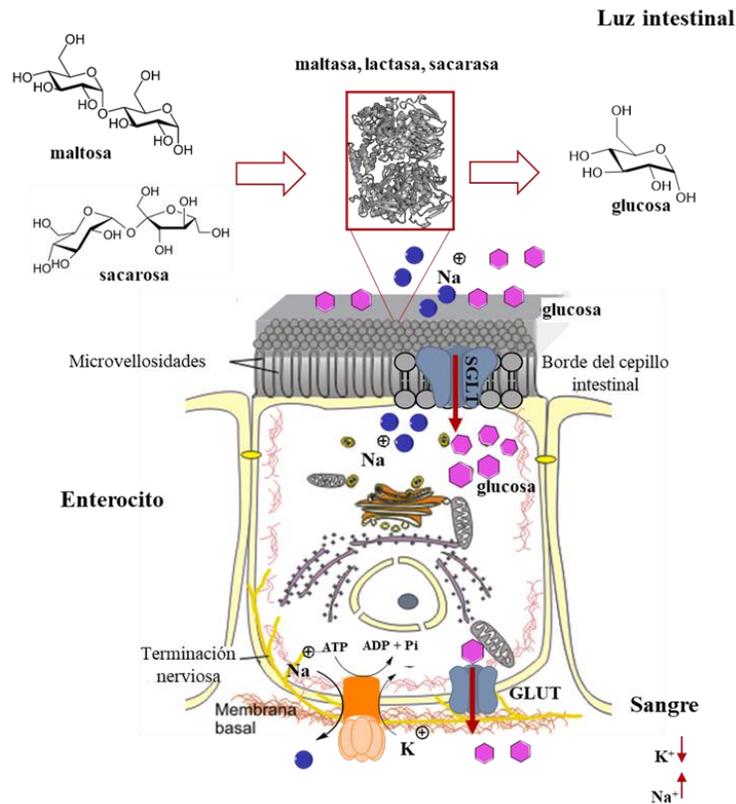


Fig. 1. Transporte de glucosa de la luz intestinal hasta el torrente circulatorio.

La insulina es una hormona reguladora de glucosa que secretan las células β -pancreáticas de los islotes de Langerhans del páncreas en respuesta a la glucosa (y otros glúcidos). El principal estímulo para la secreción de insulina es la glucosa. La liberación de insulina a la sangre dependiente de glucosa está mediada por un aumento de la concentración de calcio en las células β . La glucosa captada por las células β , es fosforilada y metabolizada, con la producción consecutiva de trifosfato de adenosina (ATP). El aumento de ATP provoca el cierre de los canales de potasio sensibles al ATP, causando despolarización de la membrana plasmática, activación de los canales de calcio activados por voltaje, el flujo de entrada de calcio al interior de la célula y, finalmente, se favorece la liberación de insulina a través de la exocitosis de las vesículas que la contienen (Fig. 2) (Viselli y Chandar, 2010; Ferrier et al., 2007; Pollard y Earnshaw, 2008; Guyton y Hall, 2016; Röder et al., 2016).

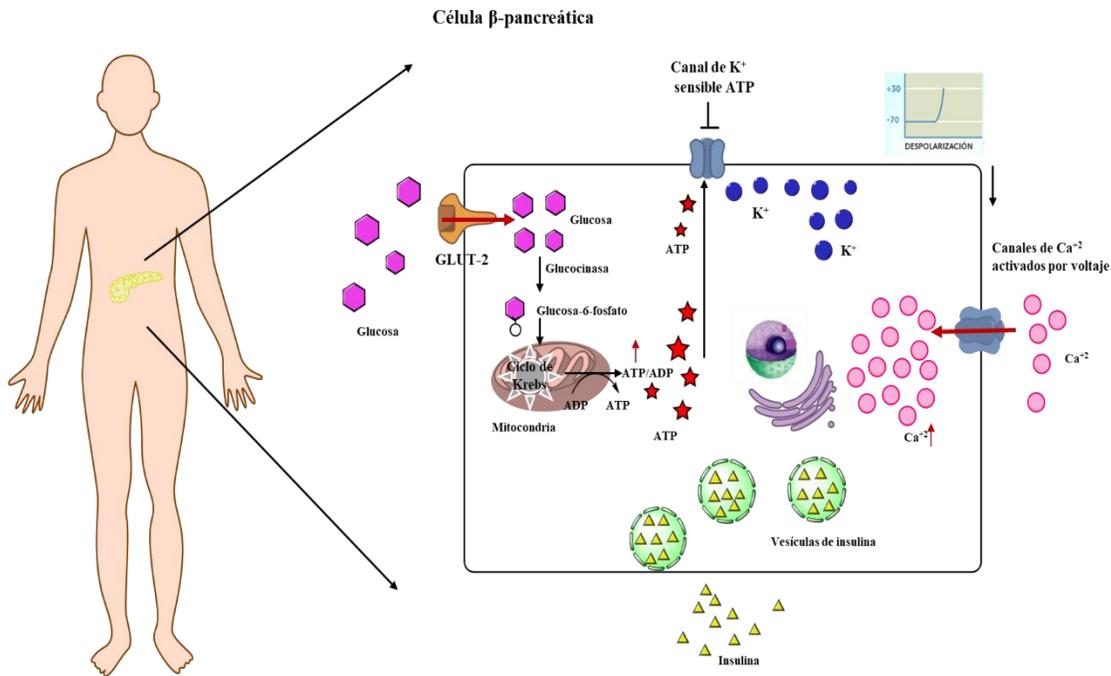


Fig. 2. Liberación de insulina de células β -pancreáticas.

Cabe resaltar que la insulina también se secreta con la ingestión de proteínas, lo que provoca un aumento transitorio de los niveles plasmáticos de aminoácidos. El aumento plasmático de arginina es un estímulo para la síntesis y secreción de insulina. Las hormonas gastrointestinales (incretinas) favorecen la liberación de insulina, como son el péptido similar al glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). Estos péptidos se producen desde el intestino delgado tras la ingesta de alimento y aumentan la secreción de insulina por una acción directa sobre las células β -pancreáticas. Esto puede explicar el hecho que la misma cantidad de glucosa administrada por vía oral induzca una secreción mucho mayor de insulina que si se administra por vía intravenosa (Viselli y Chandar, 2010; Ferrier et al., 2007; Röder et al., 2016).

En el músculo esquelético y adipocitos, los transportadores GLUT-4 se encuentran en el interior de vesículas intracelulares, inactivas y unidas al aparato de Golgi. La expresión de GLUT-4 sobre la superficie de la membrana constituye la velocidad limitante para la utilización de la glucosa, en las que el transporte de glucosa se estimula a través de una serie de etapas. La insulina circula por la sangre y se une a sus receptores. El receptor de la insulina es un polipéptido glucosilado dividido en cuatro subunidades, dos α y dos β , que se ensamblan en un tetrámero unido mediante puentes de disulfuro. La subunidad α extracelular contiene el sitio de unión de la insulina. El dominio hidrófobo de cada subunidad β atraviesa toda la membrana plasmática, mientras el dominio citosólico corresponde a una tirosina cinasa que es activada por la insulina. La unión de la insulina a las subunidades α del receptor de insulina induce una autofosforilación rápida de un residuo de tirosina

específico de cada subunidad β . La autofosforilación inicia una cascada de señalización de la célula, entre ellas la fosforilación de una familia de proteínas denominadas sustrato receptor de la insulina (IRS). Las proteínas IRS fosforiladas interactúan con otras proteínas para iniciar así una cascada de señalización que impulsa dos vías: la de cinasa activada por mitógeno (MAP) y la regulada por la activación de fosfoinositol 3-cinasa (PI3K). La activación de ambas vías aumenta la expresión génica de proteínas involucradas en el metabolismo de la glucosa (glucocinasa, piruvato cinasa y fosfofructocinasa) y el reclutamiento de transportadores de glucosa sensibles a la insulina GLUT-4 (Fig. 3) (Viselli y Chandar, 2010; Ferrier et al., 2007; Pollard y Earnshaw, 2008; Röder et al., 2016; Rachdaoui, 2020).

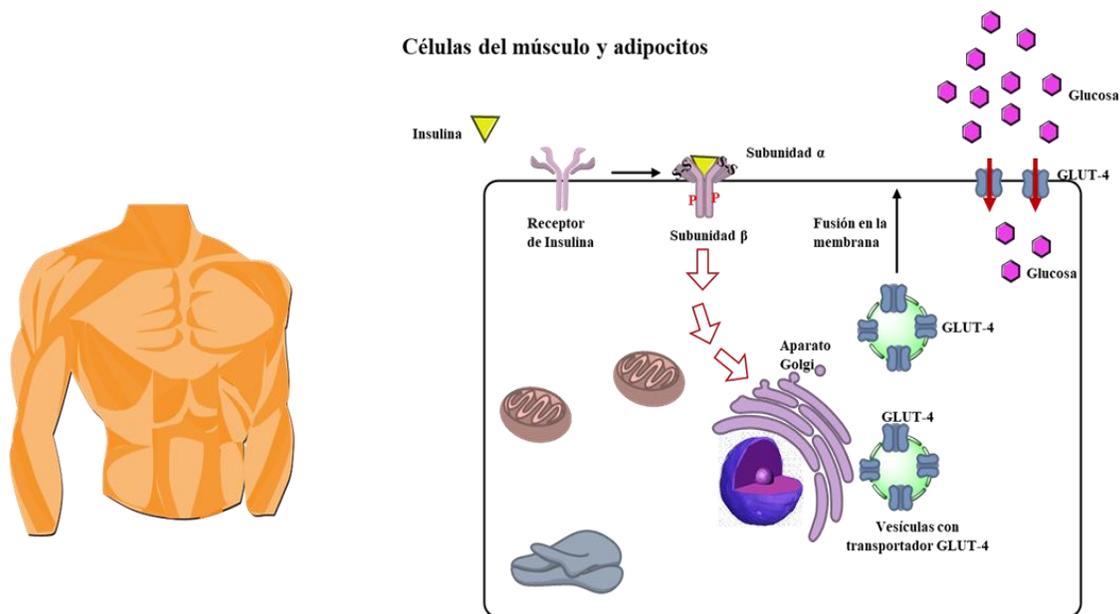


Fig. 3. Transporte del GLUT-4 a la membrana celular mediado por insulina.

1.4. Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus

La terapia inicial de elección no es farmacológica, sino que se centra en la dieta y en la realización de ejercicio para establecer y mantener un estilo de vida saludable. La dieta se debe de ajustar a las características de los pacientes para controlar las fluctuaciones de la glucemia, en este caso, debe ser baja en grasas saturadas y colesterol, con cantidades moderadas de carbohidratos, preferentemente el cereal integral que aporta grandes cantidades de micronutrientes y fibra dietética. Algunos expertos recomiendan limitar el consumo de proteínas en la dieta a menos de 0.8 g por kilogramo de peso por día para evitar la nefropatía diabética. La actividad física incrementa el gasto de energía y la captación de glucosa en el músculo y adipocitos, disminuyendo el peso en diabéticos obesos e incrementando la sensibilidad a la insulina. Cuando no se alcanzan los objetivos deseados (control de glucosa en sangre) mediante las acciones mencionadas anteriormente, se requiere el uso de agentes

farmacológicos. Las principales terapias farmacológicas que actualmente se conocen para controlar el tratamiento de la hiperglucemia son: inhibidores de α -glucosidasas y α -amilasas, la insulina, secretagogos que actúan sobre canales de K^+_{ATP} (sulfonilureas y glinidas), inhibidores de la DPP-4 y miméticos de incretinas (receptor de GLP-1), sensibilizadores de insulina (tiazolidindionas y biguanidas como la metformina) que son ligandos del receptor activado por proliferadores de peroxisomas ($PPAR_\gamma$), inhibidores del cotransportador de Na^+ -glucosa SGLT2 (gliflocinas), miméticos de amilina.

A pesar de la gran variedad de terapias existentes para el tratamiento de la DMT-2, la comunidad científica continúa buscando nuevos blancos terapéuticos; un blanco prometedor es la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B). En los siguientes capítulos se presentan ejemplos de metabolitos secundarios y productos de síntesis o semisíntesis que actúan sobre los blancos terapéuticos mencionados anteriormente. Los inhibidores de las α -glucosidasas y PTP-1B se abordarán más adelante por su relevancia en el presente trabajo (Turner et al., 2016; Kerru et al., 2018; FID, 2019; Davis et al., 2009; Röder et al., 2016; Kalaitzoglou et al., 2019; Marín-Peñalver et al., 2016).

1.4.1. Fármacos que estimulan la secreción de insulina

Para estimular la secreción de insulina actualmente existen tres grupos de fármacos, aquellos que actúan sobre los canales de K^+_{ATP} en la célula β -pancreática, los inhibidores de la DPP-4 y los miméticos de incretinas.

Los canales de K^+_{ATP} que se encuentran en las células β -pancreáticas están conformados por las subunidades Kir6.2 y SUR1; los cuales, son activados por ATP y ADP, se inhiben con altas concentraciones de ATP, mientras que los complejos Mg^{2+} -ATP y Mg^{2+} -ADP estimulan su actividad. Las sulfonilureas (glibenclamida) y las glinidas (repaglinida y nateglinida) actúan por unión directa en la subunidad SUR1 (en diferentes sitios de unión). Estos productos son de gran uso en la terapéutica de la DMT-2. Las sulfonilureas estimulan la secreción de insulina de forma independiente a la concentración de glucosa en sangre, por lo cual, puede provocar hipoglucemia en los pacientes. Por el contrario, las glinidas presentan un menor riesgo de hipoglucemia al actuar en la fase inicial de la secreción de insulina y lo hacen de manera dependiente a los niveles glucosa en sangre (Guardado-Mendoza et al., 2013; Kalaitzoglou et al., 2019; Proks et al., 2013; Martín et al., 2017). Por otro lado, es importante mencionar el uso de productos naturales con actividad hipoglucemiantes con acción directa en el páncreas. En la Figura 4 se ilustran ejemplos selectos de productos que promueven la secreción de insulina por acción directa sobre las células β -pancreáticas (Salehi et al., 2019; Ríos et al., 2016). En el caso de productos naturales se indica también la fuente.

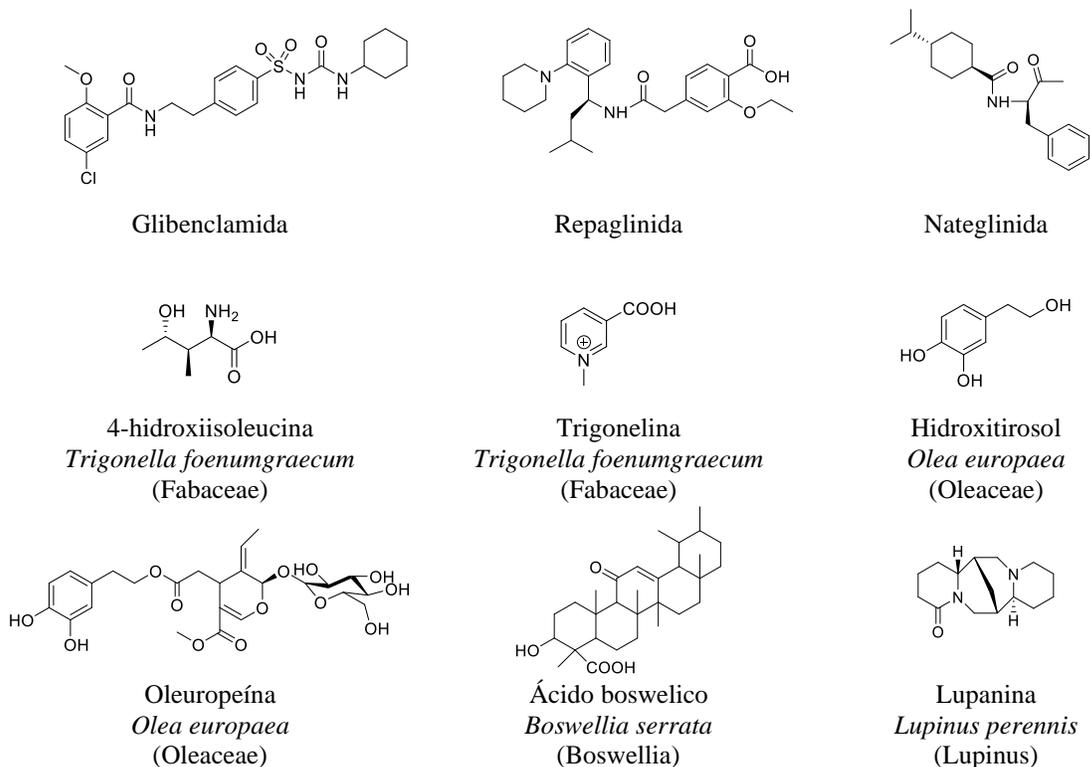


Fig. 4. Compuestos con actividad hipoglucemiante de acción directa en el páncreas.

La enzima dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV) es una proteasa que elimina dos residuos (His-Ala) del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1). Los inhibidores de la DPP-4 incrementan los niveles plasmáticos de GLP-1 endógeno de 2 a 3 veces, tanto en situación basal como postprandial y, aumenta la secreción de insulina dependiente de glucosa e inhibe la secreción de glucagón. Entre los inhibidores de la DPP-4, actualmente se usan la sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina y la linagliptina. Todos ellos son fármacos orales, capaces de inhibir más del 80 % la actividad de la enzima DPP-4 hasta por 16 horas. Aunque presentan diferencias en su estructura química, la selectividad *in vitro* por la enzima y la potencia farmacológica es muy similar. La mayor ventaja de los inhibidores de la DPP-4 es que no inducen hipoglucemia; además son eficaces en monoterapia o en combinación con metformina y sulfonilureas. Estudios *in vitro* han permitido comprobar que algunas plantas usadas en el tratamiento de la DM contienen inhibidores de la DPP-4. En la Figura 5 se muestran algunos ejemplos de metabolito que inhiben la DPP-4 (Kato et al., 2017; kim et al., 2018; Kalaitzoglou et al., 2019; Abbas et al., 2019; Ampudia-Blasco y Camacho, 2016).

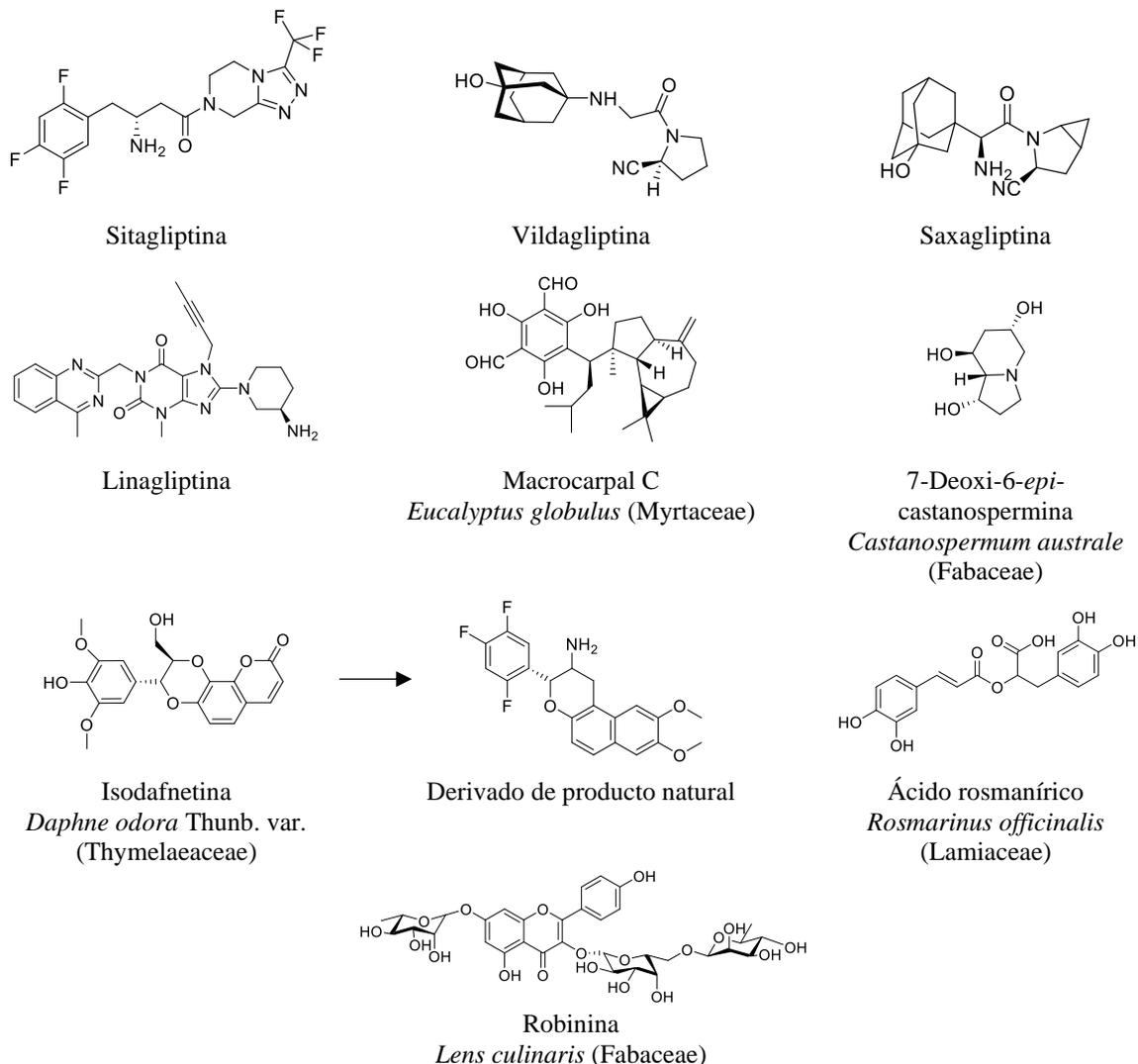


Fig. 5. Compuestos que inhiben la actividad de la enzima DPP-4.

Otro grupo de fármacos que aumentan la secreción de insulina por vía extrapancreática son los que actúan como miméticos de GLP-1. El GLP-1 es una hormona incretina que estimula la secreción de insulina e inhibe la liberación de glucagón de forma glucosa-dependiente. Sin embargo, el GLP-1 endógeno tiene una vida media muy corta de 1.5 a 2.1 minutos, debido a la rápida degradación que sufre por la enzima DPP-4. Esto ha impulsado el desarrollo de agonistas del receptor de GLP-1 resistentes a la enzima DPP-4. Actualmente, se comercializan la exenatida [un derivado sintético de la hormona exenidina-4 que se descubrió en la saliva de monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*)], liraglutida, lixisenatida, albiglutida, dulaglutida y semaglutida. La exenatida exhibe una vida media más larga ($t_{1/2} = 2.4$ h) que el GLP-1, y su homología a este último es del 53 %. En la exenatida, el segundo residuo del amino terminal corresponde a una glicina en lugar de la alanina presente en el GLP-1, que es donde actúa la DPP-4. La exenatida reduce la glucemia en ayunas y postprandial, es

eficaz en monoterapia y en combinación con sulfonilureas y metformina. Algunos productos naturales inducen la secreción de GLP-1 o la expresión del receptor de GLP-1 (Fig. 6) (Kalaitzoglou et al., 2019; Ampudia-Blasco y Camacho, 2016; Ríos et al., 2019).

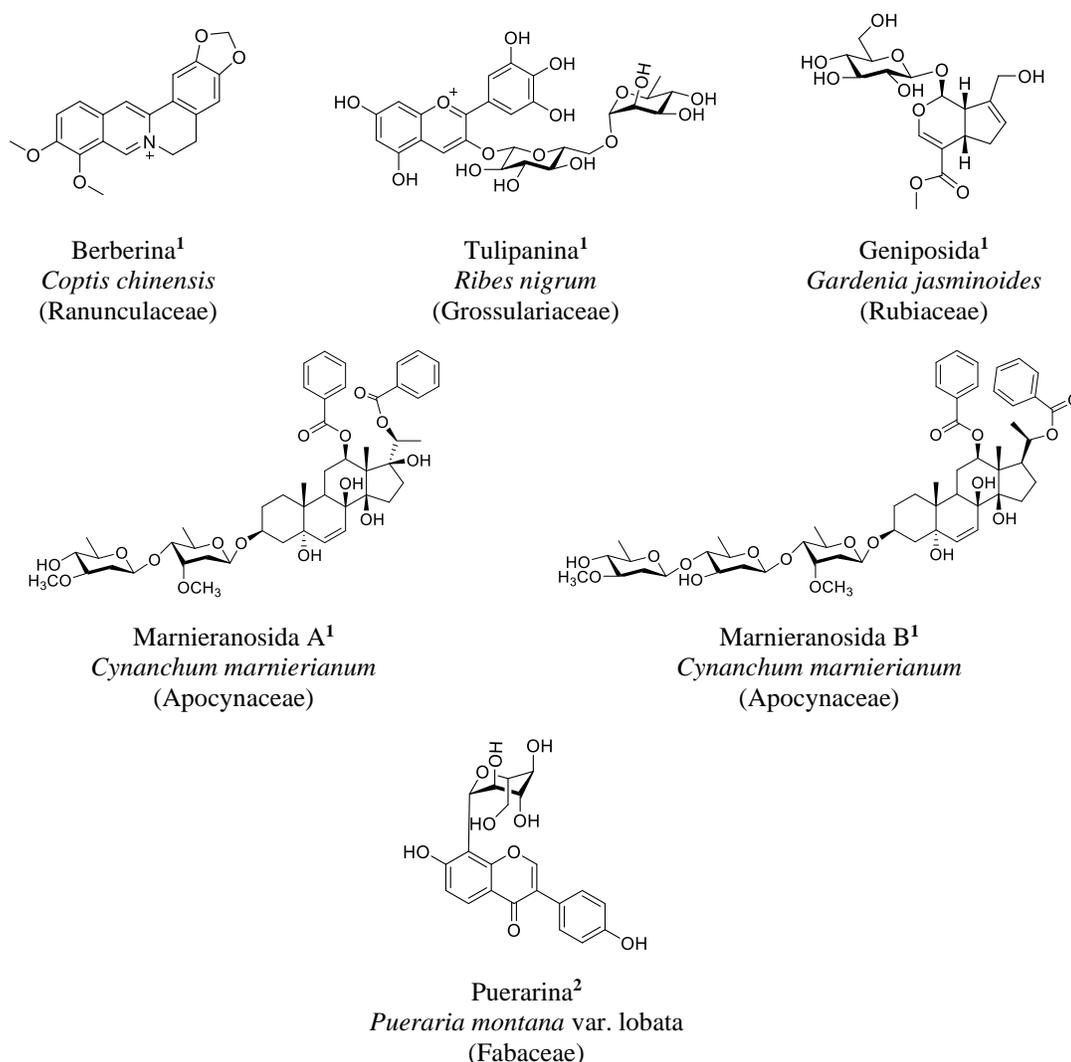


Fig. 6. Ejemplos de compuestos que aumentan la secreción de GLP-1 (1) e incrementan la expresión del receptor GLP-1 (2).

1.4.2. Sensibilizadores de insulina

Los sensibilizadores de insulina son agonistas de los receptores nucleares PPAR (Receptor Activado por Proliferadores Peroxisomales, por sus siglas en inglés). Los PPARs (α - γ) son receptores nucleares que se unen con el receptor del ácido 9-*cis*-retinoico [Receptor X Retinoide (RXR)] y cofactores específicos, formando heterodímeros que determinarán las secuencias nucleotídicas específicas de ciertos cromosomas, para activar o reprimir ciertos genes con diferentes funciones en el organismo. Las tiazolidindionas (TZDs) de uso terapéutico, entre ellas, la rosiglitazona y pioglitazona se unen a los PPAR γ modulando la transcripción de varios genes involucrados en el metabolismo de la glucosa

y lípidos (lipoproteína lipasa, glucocinasa, GLUT-4). Las TZDs incrementan la sensibilidad a insulina a nivel del hígado, músculo y tejido adiposo. Tienen una eficacia comparable a la metformina y a las sulfonilureas, y no inducen hipoglucemia. El estudio farmacológico de diversas especies vegetales ha permitido descubrir productos naturales con acción antihiper glucemiante que involucra a los receptores PPAR γ ; en la Figura 7 se muestran algunos ejemplos de productos que afectan a los PPAR γ (Kalaitzoglou et al., 2019; Ampudia-Blasco y Camacho, 2016; Xi et al., 2020; Wang et al., 2014).

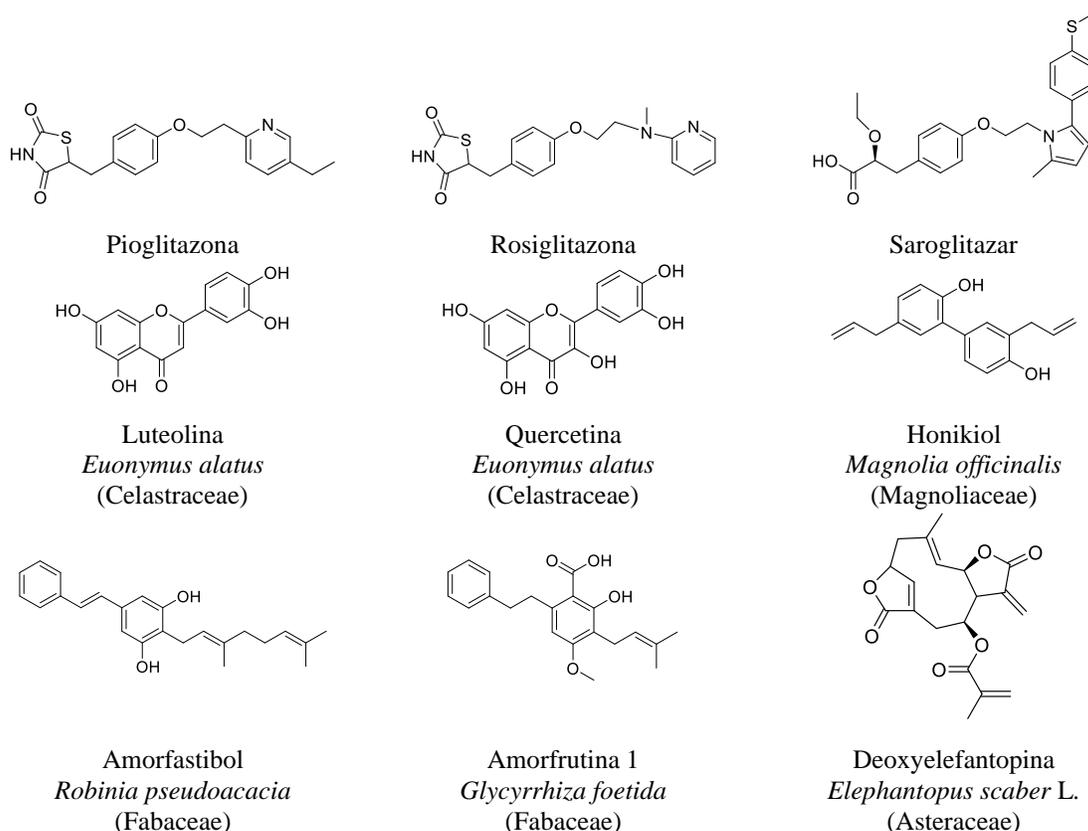


Fig. 7. Agentes terapéuticos agonistas de PPAR γ .

Las biguanidas son derivados de guanidina que disminuyen la resistencia a la insulina. La metformina (un análogo sintético de la galegina, producto natural de la planta *Galega officinalis*) es el fármaco de primera elección en la monoterapia para pacientes con DMT-2 en adultos y en niños mayores de 10 años. Si bien, no se ha elucidado su mecanismo de acción, su efecto hipoglucemiante se atribuye a la disminución de la gluconeogénesis hepática, al aumento de la translocación de transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4 (aumenta la captación de glucosa en el músculo esquelético) y al incremento en la sensibilidad a insulina en tejidos periféricos. La metformina activa la vía AMPK (Proteína Cinasa Activada por Adenosina 5-Monofosfato) al aumentar la concentración de AMP citosólico (Adenosina monofosfato) e inhibe la respiración mitocondrial. AMPK es una enzima heterotrimérica formada por las subunidades α , β y γ ; cada una de estas subunidades juega un papel específico tanto en la estabilidad como en la actividad de la AMPK. La activación de la AMPK es

clave en la regulación de procesos catabólicos (producción de energía), incluyendo la captación de glucosa. Después de su administración oral, la metformina es absorbida en el intestino por el Transportador de Monoaminas de la Membrana Plasmática (PMAT), y llega por la vena portal hepática al hígado acarreada por el Transportador de Iones Orgánicos 1 (OCT1); su eliminación es vía renal y esta mediada por OCT2 y se excreta sin ser metabolizada. Cabe mencionar que un gran número de productos naturales favorecen la captura de glucosa y podrían activar la vía AMPK (Fig. 8) (Kalaitzoglou et al., 2019; Ampudia-Blasco y Camacho, 2016; Joshi et al., 2019; Rena et al., 2017).

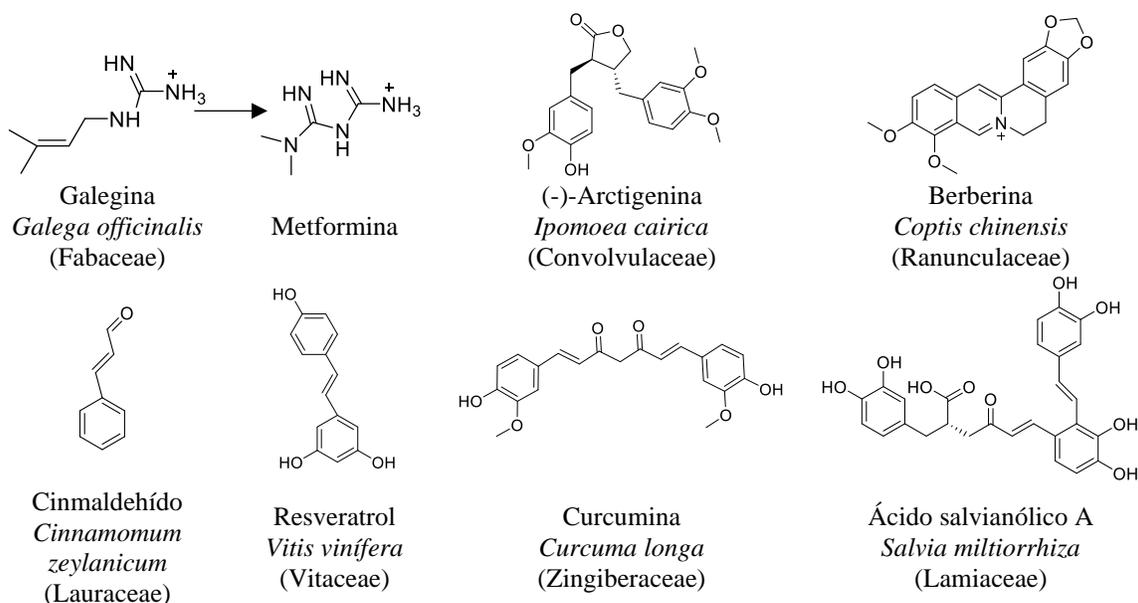


Fig. 8. Compuestos que favorecen la captura de glucosa por activación de la vía AMPK.

1.4.3. Glucosúricos

Los inhibidores selectivos del cotransportador de sodio y glucosa tipo 2 [(SGLT2), gliflocinas], son agentes farmacológicos que actúan sobre el riñón, inhibiendo la reabsorción de glucosa y disminuyendo la concentración de glucosa en sangre por un mecanismo independiente de insulina. La reabsorción de glucosa se realiza a través de los Receptores Cotransportadores de Sodio y Glucosa (SGLT), SGLT1 y SGLT2. El SGLT2 es una proteína de 672 aminoácidos (aas) con 59 % de homología con el SGLT1. Presenta una *K_m* para la glucosa de 1.6 mM. Transporta una molécula de sodio por una de glucosa; está localizado en el Segmento 1 (S1) del túbulo contorneado proximal de la nefrona, y es responsable de reabsorber el 90 % de la glucosa filtrada por el riñón.

Los fármacos dapagliflocina, empagliflocina y canagliflocina, son eficaces en monoterapia en caso de intolerancia a metformina. También se suelen combinar con metformina, sulfonilureas o pioglitazona e insulina. La floricina (dihidrochalcona) se aisló por primera vez del manzano (*Malus domestica*), este flavonoide inhibe de forma competitiva a los cotransportadores SGLT1 y SGLT2. Además, las gliflocinas con C-glucósidos muestran ligeramente más potencia para inhibir al SGLT2

que los *O*-glucósidos. En la Figura 9 se presentan algunos compuestos de origen natural o sintético que son inhibidores selectivos del SGLT2 (Ampudia-Blasco y Camacho, 2016; Abbas et al., 2019; Kalaitzoglou et al., 2019).

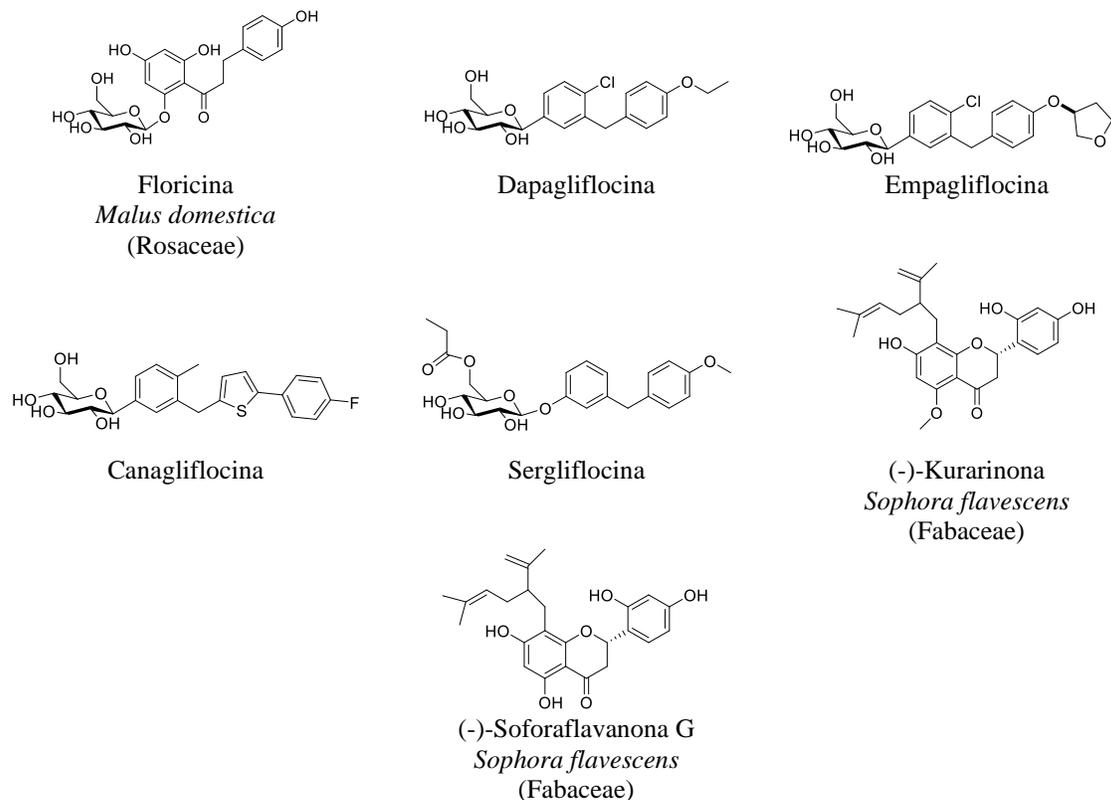


Fig. 9. Compuestos que inhiben a SGLT2.

1.4.4. Miméticos de amilina

La amilina es un Polipéptido Amiloide del Islote (IAPP), está compuesto por 37 residuos de aminoácidos y contiene un puente de disulfuro entre los residuos dos y siete. Se almacena y se secreta junto con la insulina en las células β -pancreáticas y su receptor pertenece a la familia del receptor de calcitonina y adrenomodulina. La amilina juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa al suprimir la liberación de glucagón de las células α -pancreáticas y, por lo tanto, evita la gluconeogénesis, disminuye el vaciado gástrico y estimula la saciedad en el cerebro.

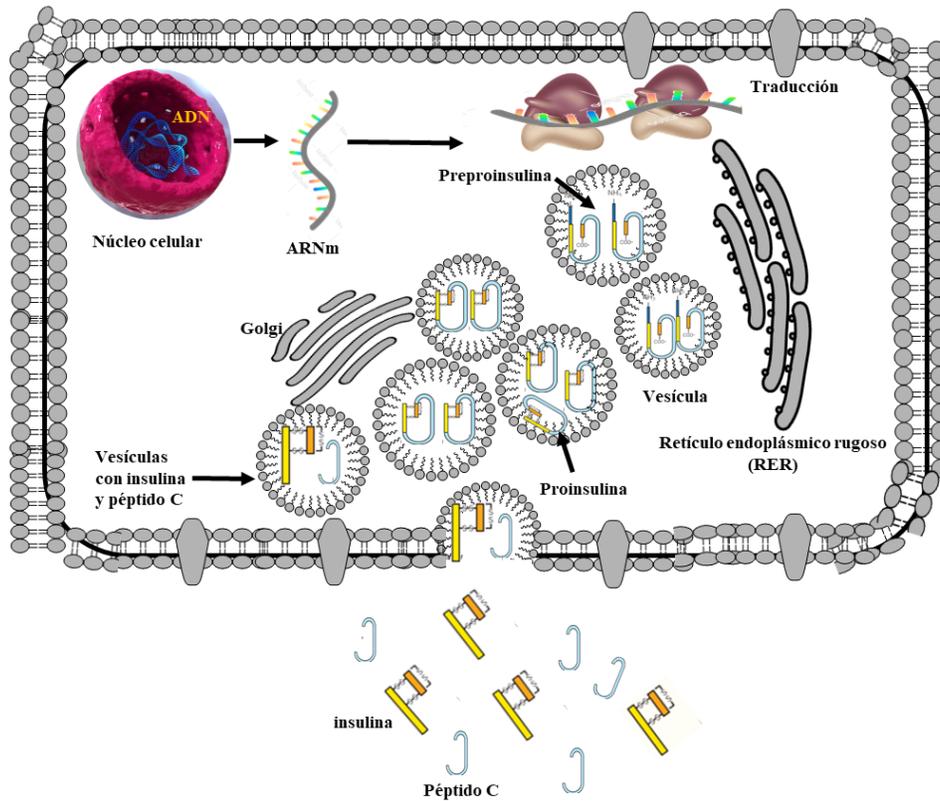
La pramlintida es el primer análogo sintético de la amilina desarrollado para impedir la tendencia que tiene la amilina de agregarse, controla los niveles de glucosa, no provoca aumento de peso ni tampoco hipoglucemia. Se administra junto con insulina o en combinación con otros antidiabéticos orales (metformina o sulfonilureas). (Hay et al., 2015; Pillay y Govender, 2013; Kanatsuka et al., 2018; Kalaitzoglou et al., 2019; Marín-Peñalver et al., 2016).

1.4.5. Insulina

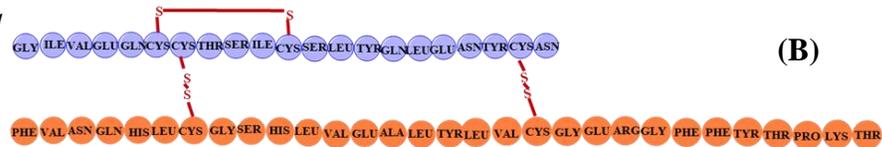
La insulina es una hormona peptídica (~75 kDa) de 51 aminoácidos formada por dos cadenas (la cadena A de 21 aminoácidos y la cadena B de 30 aminoácidos) unidas entre sí de manera covalente a través de dos puentes disulfuro ubicados entre los aminoácidos A-7/B-7, y A-20/B-19. Además, la cadena A, tiene también un puente interno de disulfuro entre los aminoácidos A-6/A-11 (Fig. 10B). La biosíntesis implica dos precursores inactivos, la preproinsulina y la proinsulina. La proinsulina se transporta al aparato de Golgi, donde se convierte a insulina por la acción de convertasas y la carboxipeptidasa H (Fig. 10A). La escisión de la proinsulina origina insulina y el péptido C. El péptido C (33 aminoácidos, que conecta las cadenas A y B) es esencial para el plegamiento adecuado de la insulina. La estructura secundaria de la insulina consiste en tres hélices α unidas por puentes de disulfuro, las cuales se pliegan tridimensionalmente para formar la estructura terciaria (Fig. 10C). El residuo A21 y los que se encuentran en la región comprendida entre B23 y B25 aumentan la afinidad por el receptor de insulina (IR). Por otro lado, las personas con diabetes pueden presentar mutaciones en esta región y reducir la afinidad de la insulina por el IR (Phe B25/Leu y Phe B24/Ser). Además, el IR (presente en la mayoría de las células) es un heterotetrámero, formado por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembranales. La señalización mediada por insulina puede ocurrir a través de la fosforilación del sustrato receptor de insulina IRS-1 e IRS-2 y la posterior activación de la vía PI3K o la vía MAP/ERK, por lo cual, se pueden mediar varios eventos celulares, incluida la absorción de glucosa. La insulina ($t_{1/2}$ = 6 min) es degradada por la enzima insulinasa, que está presente en el hígado y riñón.

Célula β -pancreática

(A)



(B)



(C)

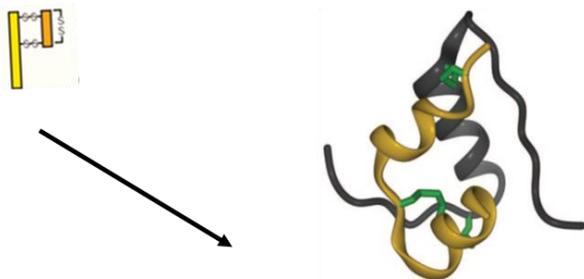


Fig. 10. (A) Movimientos intracelulares de la insulina y sus precursores. (B) Secuencia de aminoácidos y representación bidimensional de la insulina. (C) Estructura 3D de la insulina. La cadena A se representa en color amarillo, la cadena B en color gris y los puentes de disulfuro en color verde (imagen tomada del Menting et al., 2013).

La insulina en todas sus presentaciones comerciales es el medicamento más destacado para el manejo de la DMT-1 y DMT-2. Sus acciones superan en conjunto a cualquier otro fármaco antidiabético, ya que resuelve el déficit insulínico encontrado en la DMT-1 y la insuficiencia relativa de la secreción

de insulina en la DMT-2. Existen varios sistemas para administrar insulina, entre los que se encuentran: los inyectores, infusores, bombas de infusión continua subcutánea de insulina, los estilógrafos y las jeringas de insulina. Una alternativa para administrar insulina de manera no invasiva es por vía pulmonar a través de la inhalación, cuando la insulina alcanza el espacio alveolar, atraviesa los neumocitos por transcitosis y llegar a la circulación (De Meyts, 2004; Kalaitzoglou et al., 2019; Rachdaoui, 2020; Ferrier et al., 2007; Menting et al., 2013; Marín-Peñalver et al., 2016; Shahani y Shahani, 2015).

1.4.6. Inhibidores de la α -amilasa

La α -amilasa (α -D-1,4-glucano-glucanohidrolasa) es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces α -glucosídicos (α -1,4-glucano) del almidón, maltodextrinas y malto-oligosacáridos. Esta enzima se encuentra en animales, plantas, bacterias y hongos. La α -amilasa salival presente en la cavidad oral (saliva) inicia la digestión de carbohidratos complejos y el proceso es finalizado por la α -amilasa pancreática. En humanos, existen cinco isoenzimas de α -amilasa, tres isoformas de α -amilasa salival y dos de α -amilasa pancreática. Ambas enzimas están relacionadas estructuralmente. La α -amilasa (salival o pancreática) es un dímero [tres dominios estructurales (A, B y C)], el dominio A (residuos 1–99 y 169–404) constituido por un barril (8 láminas β paralelas distribuidas circularmente formando un barril al que se unen las hélices α) y contiene la triada catalítica Asp197, Glu233 y Asp300. Los aminoácidos Arg195, Asn298 y Arg337 interaccionan con el ion cloruro, que es esencial en la catálisis. El dominio B (100–168) está formado por láminas β antiparalelas, con funciones de unión y reconocimiento (se une al dominio A por un puente de disulfuro); y un ion de calcio que estabiliza la estructura (dominio A y dominio B). El dominio C (405–496) con función desconocida, posee una cadena β antiparalela que se une al dominio A. Los inhibidores de estas enzimas ayudan a la prevención y al tratamiento médico de problemas metabólicos como DMT-2 y obesidad, controlando el aumento de los niveles de glucosa postprandial en sangre, así como disminuyendo y bloqueando la digestión de carbohidratos. Estudios *in vitro* o *in vivo* han permitido comprobar que algunos compuestos de origen natural inhiben a la enzima α -amilasa (salival o pancreática). En la Figura 11 se muestran algunos ejemplos (Tundis et al., 2010; Kato et al., 2017; Mahmood, 2016; Alagesan et al., 2012; Verma et al., 2018).

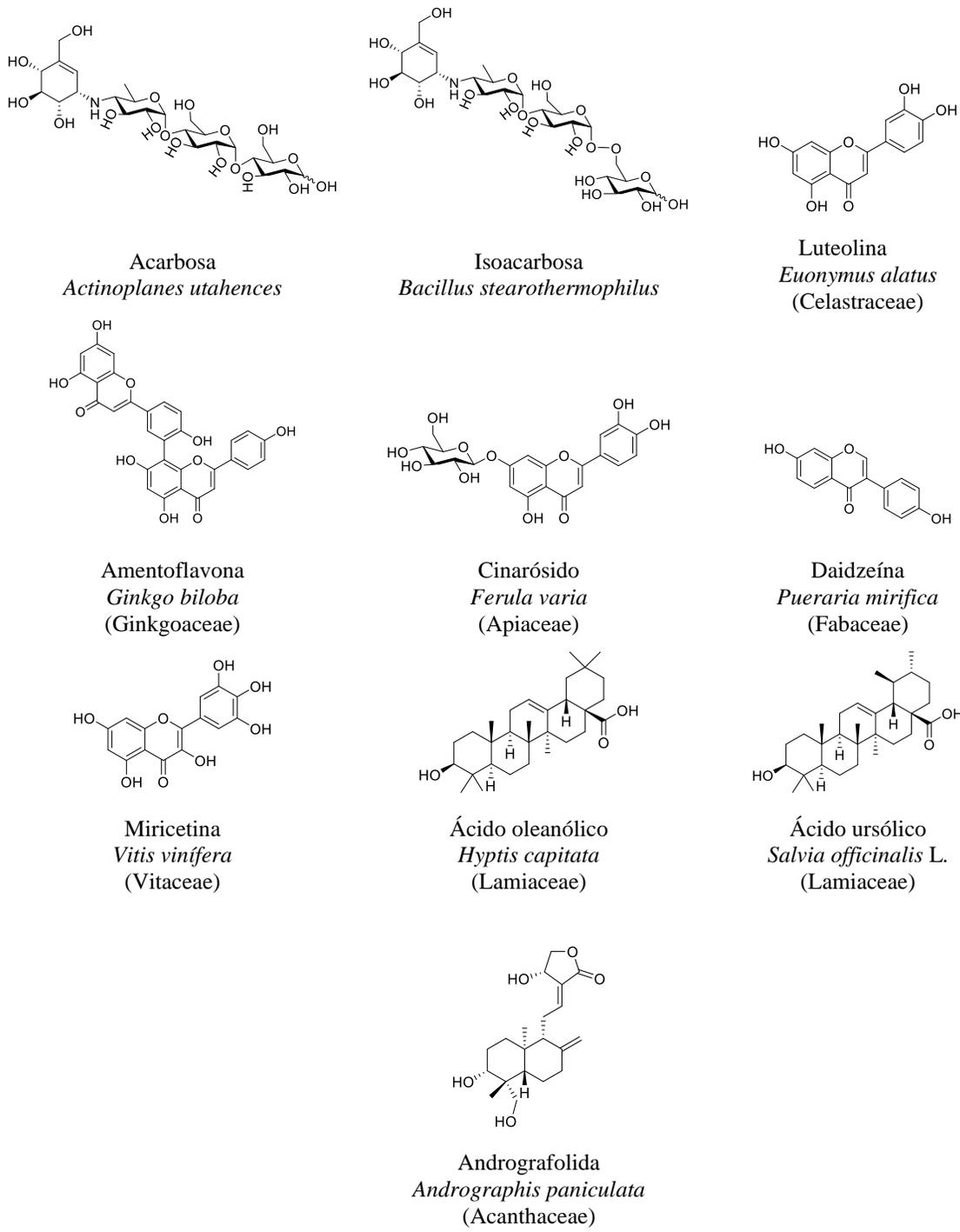


Fig. 11. Compuestos que inhiben la actividad de α -amilasa.

1.4.7. Inhibidores de las α -glucosidasas

1.4.7.1. Estructura y clasificación de las α -glucosidasas

Las α -glucosidasas (maltasa, glucoinvertasa, maltasa-glucoamilasa, sacarasa-isomaltasa, α -glucósido hidrolasa, α -1,4-glucosidasa) se encuentran en la luz del intestino delgado sobre la membrana de los enterocitos, lugar donde se realiza el último paso de la digestión de los carbohidratos (Fig. 12A-C). Las enzimas α -glucosidasas presentan diferencias en el reconocimiento de sustrato. Las enzimas de tipo I (familia GH13) se encuentran en insectos, bacterias y levaduras; se caracterizan por hidrolizar sustratos heterogéneos como la sacarosa y α -D-glucopiranosido del *p*-nitrofenol- (*p*-NPG) y muestran baja o nula actividad hacia el almidón y el glucógeno. Las enzimas tipo II (familia GH31) se encuentran en organismos fúngicos; hidrolizan sustratos homogéneos y tienen alta afinidad por la estructura de la maltosa. Finalmente, las de tipo III (familia GH31) se encuentran en plantas y animales, muestran una elevada actividad por sustratos poliméricos y homogéneos y casi no muestran actividad frente a sustratos heterogéneos (Yamamoto et al., 2010; Nakai et al., 2005; Chiba, 1997; Kerru et al., 2018; Tundis et al., 2010).

La estructura de las α -glucosidasas (*Saccharomyces cerevisiae*, GH13), está compuesta de tres dominios, A, B y C. El dominio A (residuos 1-113 y 190-512) es el dominio catalítico que contiene una estructura de tipo barril (β/α)₈. El dominio B (residuos 114-189) se encuentra entre la tercera hoja β y la hélice del barril (β/α)₈ del dominio A. El dominio C (residuos 513-589) comprende ocho hojas β -antiparalelas en un doble motivo estructural de clave-griega. El Asp215 (región II) y Glu277 (región III) localizados en el C-terminal de la cadena β -4 y la cadena β -5 actúan como nucleófilo catalítico y como ácido/base en la catálisis, respectivamente. El tercer residuo conservado, Asp352 (región IV), localizado entre hebra β -7 y la hélice-7, puede estabilizar el sustrato durante la catálisis y acelerar la reacción de hidrólisis ácido-base. Otros residuos de importancia son la Tyr158, His280 y el Asa 310-315, los cuales se encuentran a la entrada del sitio catalítico y ayudan en la estabilización y reconocimiento de los sustratos. Un ion de calcio está unido en un bucle localizado antes de la hélice-1 del dominio A, es esencial para la estabilidad y actividad de la enzima (Fig. 12D) (Yamamoto et al., 2010; Nakai et al., 2005; Chiba, 1997; Kerru et al., 2018; Tundis et al., 2010).

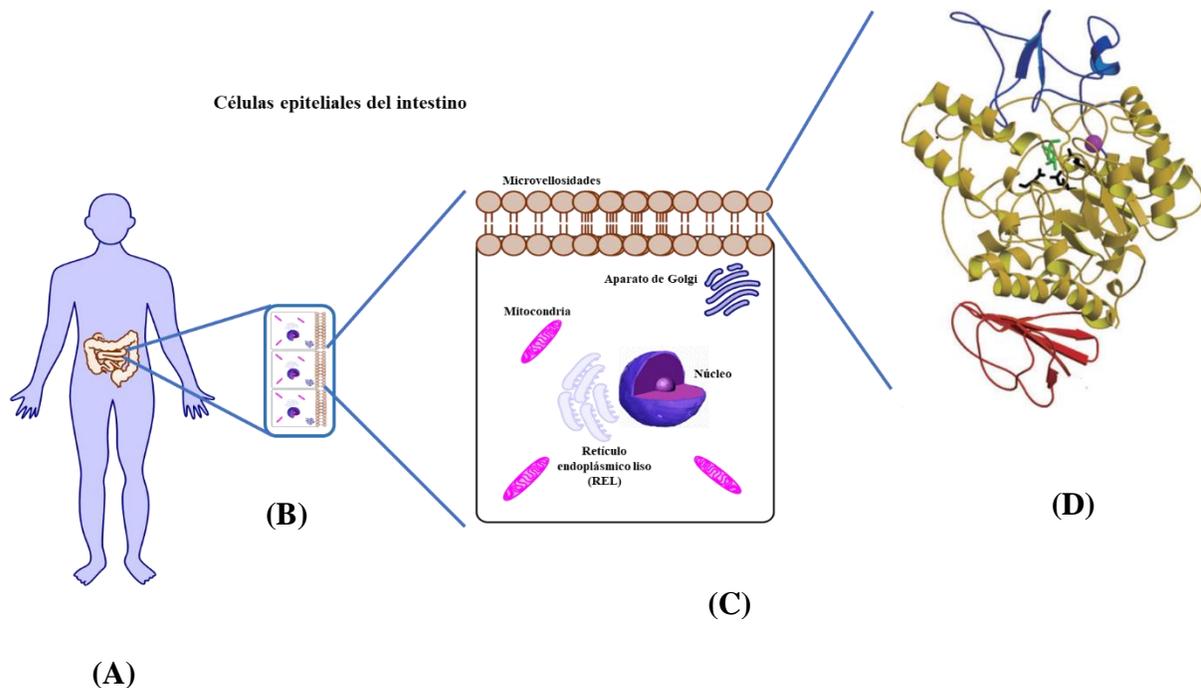


Fig. 12. (A) Intestino delgado. (B) Epitelio intestinal. (C) Enterocito. (D) Representación 3D de la isomaltasa. El dominio A se representa en color amarillo, el dominio B en color azul y el dominio C en rojo. Un ion de calcio se muestra como una esfera violeta. El extremo reductor del residuo de glucosa se muestra en verde. Los tres residuos catalíticos se muestran como un modelo de barra (imagen tomada de Yamamoto et al., 2010).

1.4.7.2. Mecanismo de hidrólisis de las α -glucosidasas

Las glucosidasas son enzimas que se encuentran en el borde del cepillo intestinal que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos de polisacáridos, oligosacáridos, trisacáridos y disacáridos en glucosa y otros monosacáridos. Estas enzimas son específicas para la ruptura de los enlaces glucosídicos dependiendo del número, posición o configuración de los grupos hidroxilo en la molécula. Este tipo de enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces *O*-, *N*- y *S*-glucosídicos para liberar el carbohidrato correspondiente. La hidrólisis enzimática del enlace glucosídico libera un azúcar hemiacetal con la misma configuración que el sustrato o inversión de la configuración anomérica (Chiba, 1997; Kerru et al., 2018; Ernawati et al., 2018).

La inversión de la estereoquímica sucede mediante una reacción S_N2 , que permite al sustrato y a una molécula de agua unirse simultáneamente al sitio catalítico. En este proceso uno de los residuos catalíticos de la enzima actúa como ácido y el otro como base. El residuo que actúa como ácido

protona el oxígeno glucosídico y la base desprotona una molécula de agua produciéndose el ataque nucleofílico de ésta en el carbono anomérico y la eliminación del grupo saliente con la consecuente inversión de la estereoquímica (Fig. 13) (Chiba, 1997; Gloster y Davies, 2010).

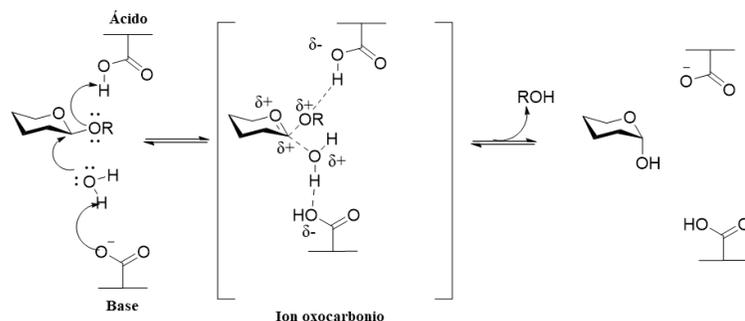


Fig. 13. Mecanismo de hidrólisis de las α-glucosidasas con inversión de la estereoquímica.

La retención de la estereoquímica es un mecanismo de doble desplazamiento que consiste en dos pasos de inversión. En este proceso intervienen dos residuos ácidos de la enzima, uno de los cuales actúa como ácido/base y el otro como especie nucleofílica. Durante el primer paso de la reacción (glucosilación), el residuo ácido/base actúa como ácido y protona el oxígeno glucosídico, al mismo tiempo se produce el ataque nucleofílico del otro residuo en el carbono anomérico, que conduce a la formación del intermediario covalente glucósido-enzima con configuración anomérica invertida. Se trata de un intermediario del tipo ion oxocarbonio que estabiliza el estado de transición. En el segundo paso, el residuo ácido/base actúa como base y desprotona una molécula de agua, lo que facilita el ataque en el carbono anomérico y el desplazando a la enzima del glucósido y liberando α-D-glucosa (Fig. 14) (Chiba, 1997; Gloster y Davies, 2010).

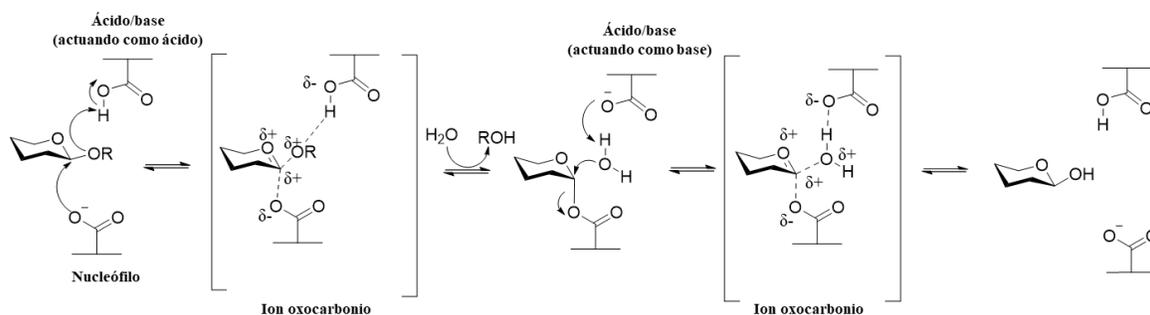


Fig. 14. Mecanismo de hidrólisis de las α-glucosidasas con retención de la estereoquímica.

1.4.7.3. Fármacos inhibidores de las α -glucosidasas

Los inhibidores de α -glucosidasas (α -GI) son inhibidores reversibles y competitivos, los cuales se empezaron a fabricar a inicios de la década de 1990 como fármacos antidiabéticos. Dentro de estos fármacos se incluyen la acarbosa (Precose[®]), el miglitol (Glyset[®]) y la voglibosa (Basen[®]), que bloquean la degradación enzimática de los carbohidratos en el intestino delgado, lo que disminuye la glucosa postprandial y mejora el control glucémico sin aumento de peso o hipoglucemia; a la vez, disminuyen la secreción de polipéptidos inhibitorios gástricos y aumentan la secreción del péptido parecido a glucagón 1 (GLP-1) (Dhameja y Gupta, 2019; Kalaitzoglou et al., 2019; Ampudia-Blasco y Camacho, 2016).

La acarbosa (aminociclitol) es el fármaco más utilizado de esta familia para el tratamiento de la DMT-2. Es un pseudotetrasacárido con un nitrógeno unido entre el ciclitol y la unidad de ramnosa y se obtiene a partir de la especie *Actinoplanes utahensis*. La acarbosa presenta mayor actividad contra la glucoamilasa, sacarasa, maltasa y dextrinasa. Además, se ha comprobado que en los pacientes disminuye el riesgo de complicaciones cardiovasculares y la inflamación (Derosa y Maffioli, 2012; Borges de Melo et al., 2006; Ampudia-Blasco y Camacho, 2016; Eguchi et al., 2018).

El pseudomonosacárido miglitol, es un α -GI de segunda generación, derivado de la 1-desoxinojirimicina (aislado del árbol *Morus alba*). A diferencia de la acarbosa, el miglitol se absorbe casi por completo en el intestino delgado y es rápidamente excretado por vía renal. Mejora el control glucémico, que se refleja en los niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c). A diferencia de las sulfonilureas, no se asocia con aumento de peso corporal o hipoglucemia cuando se administra en monoterapia (Scott y Spencer, 2000; Borges de Melo et al., 2006; Sels et al., 1999), y podría ser efectivo como agente protector del sistema cardiovascular en pacientes con DMT-2 (Eguchi et al., 2018). Estudios recientes, han indicado que el miglitol puede formar parte de una estrategia terapéutica para el tratamiento del COVID-19 (emergencia de salud pública), ocasionada por el virus SARS-CoV-2 (William y Goddard-Borger, 2020).

La voglibosa es un hexociclitol derivado del producto natural valiolamina (aminociclitol aislado de *Streptomyces higrscopicus* var *limoneus*). Presenta mayor actividad sobre la sacarasa y la maltasa. La voglibosa es más potente que la acarbosa y el miglitol y presenta menos efectos adversos (flatulencias y la distensión abdominal). El tratamiento con voglibosa (monoterapia) ha resultado en una mayor liberación de la hormona GLP-1 y en combinación con las sulfonilureas resulta efectiva para controlar los niveles de glucosa plasmática en pacientes con DMT-2, y podría retrasar la aparición de complicaciones vasculares (Dabhi et al., 2013; Kameda et al., 1984; Borges de Melo et al., 2006).

En general, los α -GI se usan en monoterapia o en combinación; sin embargo, inducen una disminución significativa de los niveles de glucosa postprandial sin causar incremento en la insulina circulante y sin riesgo de hipoglucemias. Además, los medicamentos α -GI reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares en combinación con otros fármacos. Por último, los fármacos α -GI podrían ser útiles para el tratamiento del COVID-19. Actualmente, estos múltiples beneficios han propiciado una búsqueda persistente de nuevos inhibidores de α -glucosidasas (Ampudia-Blasco y Camacho, 2016; Marín-Peñalver et al., 2016; Van de Laar et al., 2005; Chen et al., 2015; Dhameja y Gupta, 2019; Eguchi et al., 2018; William y Goddard-Borger, 2020; Zhang et al., 2020).

1.4.7.4. Compuestos con actividad sobre la enzima α -glucosidasa

El estudio *in vitro* o *in vivo* de productos naturales de origen vegetal y de microorganismos, así como derivados de éstos, han conducido al hallazgo de una gran variedad de moléculas con propiedades antihiperoglucemiantes. Los productos naturales (PN) han sido esenciales para la identificación farmacóforos y compuestos novedosos útiles para el entendimiento, prevención temprana y tratamiento de la DMT-2. En la Figura 15 se mencionan algunos ejemplos selectos de productos naturales o semisintéticos con actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas (Dhameja y Gupta, 2019; Chen et al., 2015; Abbas et al., 2019; Kerru et al., 2018; Wang et al., 2017; Rangel-Grimaldo et al., 2020; Rangel-Grimaldo et al., 2017; Gajbhiye et al., 2018; Jenis et al., 2019; Zhao et al., 2019; Bisio et al., 2017; Etsassala et al., 2019).

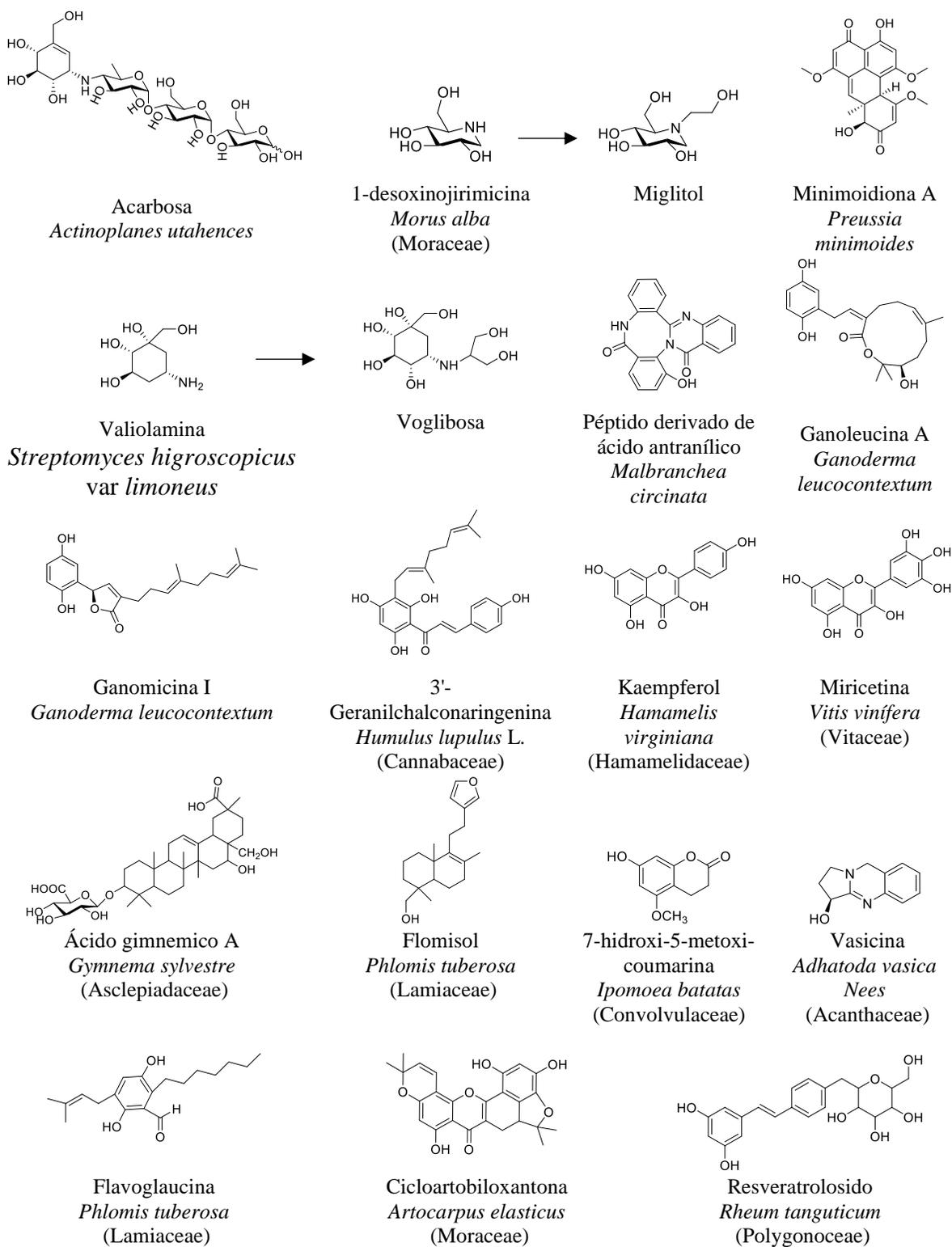


Fig. 15. Compuestos con actividad sobre las enzimas α -glucosidasas (*continuación*).

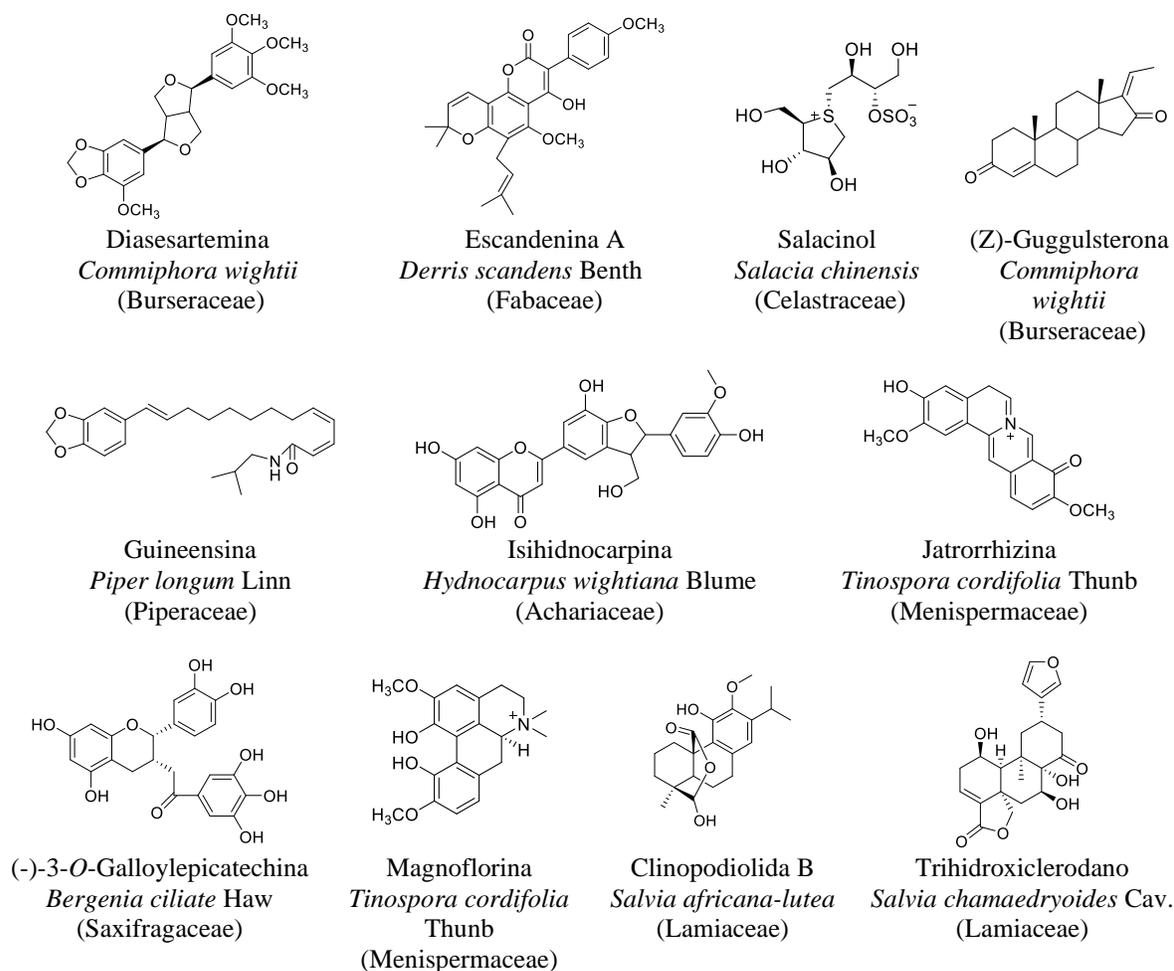


Fig. 15. Compuestos con actividad sobre las enzimas α -glucosidasas.

1.4.8. Inhibidores de la enzima PTP-1B

1.4.8.1. Estructura y clasificación de la enzima PTP-1B

La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es una de las modificaciones postraduccionales más importantes que las células utilizan para regular las respuestas celulares. La regulación del estado de fosforilación en las proteínas es importante para procesos biológicos como la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular. Dicho proceso también representa un punto de control para la integración de señales extracelulares y su posterior conversión en respuestas celulares (Barr et al., 2009; Tonks, 2003; Alonso et al., 2004).

Los niveles de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina se encuentran controlados por la acción coordinada de dos tipos de enzimas llamadas: proteínas tirosina cinasas (PTK) y las proteínas tirosina fosfatasa (PTP). Las PTKs son las enzimas encargadas de añadir un grupo fosfato sobre residuos de tirosina de proteínas, dicho proceso produce un cambio estructural y promueve la interacción entre proteínas de las diferentes cascadas de señalización celular. La fosforilación en la tirosina de una proteína modifica su actividad y su interacción con otras proteínas a través de dominios

de unión a tirosinas, por ejemplo, dominios SH2 y PTB (Proteína de unión a fosfotirosina). A su vez, la acción de las PTKs es regulada por la acción de las PTPs, proteínas que se encargan de quitar un grupo fosfato de un residuo de tirosina de una proteína. Cuando se produce una alteración entre el balance normal de la actividad de las PTKs y PTPs, se provoca una fosforilación anormal de los residuos de tirosina, lo cual ha sido relacionado con la etiología de varias enfermedades, como el cáncer, desórdenes metabólicos y procesos inflamatorios (Fig. 16) (Alonso et al., 2004; Barford et al., 1994; Li et al., 2005; Pollard y Earnshaw, 2008).

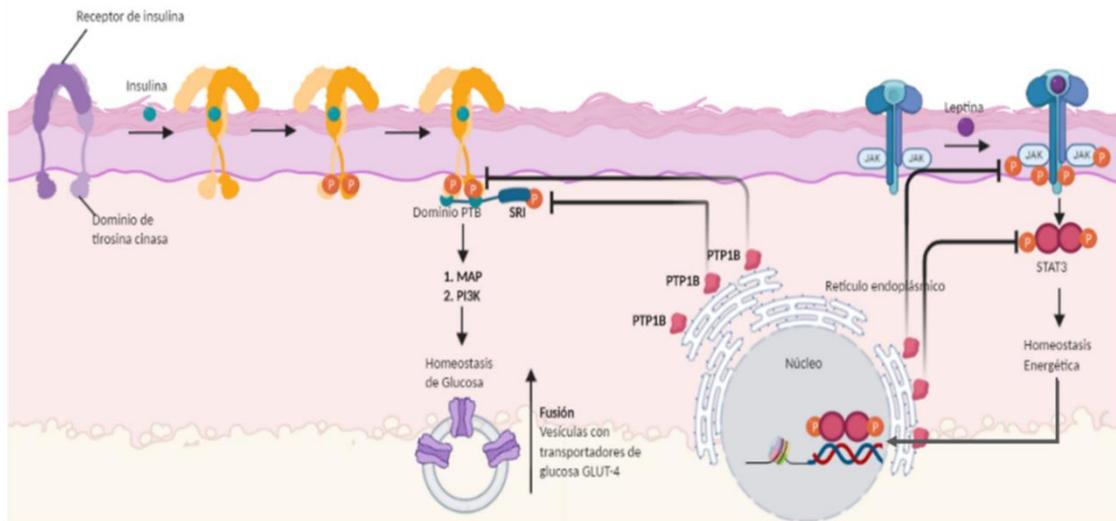


Fig. 16. Vías de señalización de la insulina y la leptina que involucran a la PTP-1B.

Las PTPs pertenecen a la superfamilia de las fosfatasa (107 PTPs), siendo estructuralmente diversa. Las fosfatasa de tirosina se agrupan en cuatro clases según su secuencia de aminoácidos y topología de sus dominios catalíticos. En las fosfatasa de la Clase I, II y III, el aminoácido esencial para la catálisis es una cisteína del centro catalítico, mientras que en las fosfatasa de la Clase IV el residuo catalítico es el ácido aspártico (Alonso et al., 2004; Barr et al., 2009; Pollard y Earnshaw, 2008).

La Clase I está formado por dos subgrupos que han evolucionado de un ancestro común. El primer subgrupo de 38 proteínas es conocido como fosfatasa de tirosina clásicas. Las PTPs clásicas a su vez se dividen en fosfatasa de tipo receptor y en fosfatasa citosólicas. El segundo subgrupo dentro de las PTPs de Clase I está formado por 61 proteínas; estas son fosfatasa que poseen una gran diversidad de sustratos. La Clase II está formada solo por una proteína de bajo peso molecular, más ancestral que las fosfatasa de clase I, ya que se encuentran homólogos en todos los *phyla*, incluyendo plantas, numerosas procariontas y el subreino *Archaea*. Las fosfatasa de tirosina de la Clase III tienen especificidad por proteínas fosforiladas en tirosina y treonina y está formada por tres proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular (Ciclo de División Celular, CDC A, B y C). Pese a las similitudes en el mecanismo catalítico y en la secuencia del sitio activo, las fosfatasa de las clases I,

II y III han evolucionado de forma independiente. Sin embargo, una comparación estructural indica que pueden haber evolucionado a partir de un ancestro común (Alonso et al., 2004; Cho, 2013). La Clase IV usa un mecanismo catalítico diferente, en el cual un ácido aspártico actúa como nucleófilo para desfosforilar los sustratos, tanto en tirosinas como en serinas mediante una reacción metal-dependiente (Alonso et al., 2004).

PTP-1B es una proteína que fue purificada inicialmente de la placenta humana, los genes que codifican para su traducción se encuentran localizados en el cromosoma 20. Esta enzima está formada por 435 aminoácidos con un peso de 50 kDa, contiene un dominio catalítico de 37 kDa hacia su extremo *N*-terminal, que está flanqueado por dos dominios ricos en prolina y un dominio *C*-terminal que le permite el anclaje de la enzima a la cara citoplasmática del retículo endoplásmico (Fig. 16) (Barford et al., 1994; Tonks, 2003; Cho, 2013). La enzima presenta un dominio con ocho hélices α y 12 cadenas β , mezcladas con diez hojas β que adoptan una conformación retorcida. El sitio de reconocimiento del grupo fosfato está formado por cuatro motivos: (i) El asa P, altamente conservada, es el asa de unión a fosfato, se compone de los residuos 214–221 (His-Cys-Ser-Ala-Gly-Ile-Gly-Arg), donde la Cys215 y Arg221 son esenciales para la actividad catalítica de la enzima. (ii) El asa WPD [(Trp-Pro-Asp) residuos 79–187] contiene el residuo Asp181 que participa en la catálisis. (iii) El asa Q contiene al residuo Gln262, que media la hidrólisis del intermediario catalítico cisteinil-fosfato. (iv) El asa PY contiene el residuo Tyr46, el cual define la profundidad del sitio activo y contribuye en la especificidad de la enzima para los sustratos que contienen fosfotirosina, ya que los residuos de fosfoserina y fosfotreonina no logran alcanzar la cisteína catalítica. Otros residuos que contribuyen al reconocimiento del sustrato son: Phe182, Lys120, Val49 y Arg47 y lo hacen mediante una combinación de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de enlaces de hidrógeno (Fig. 17) (Tonks, 2003; Jiang et al., 2012; Choy et al., 2017).

La actividad catalítica de esta enzima está controlada por su localización en la superficie del retículo endoplásmico, ya que esto restringe su acceso a ciertos sustratos. También existen otros mecanismos que regulan la actividad de PTP-1B, como son: oxidación, fosforilación y proteólisis (Tonks, 2003; Cho, 2013).

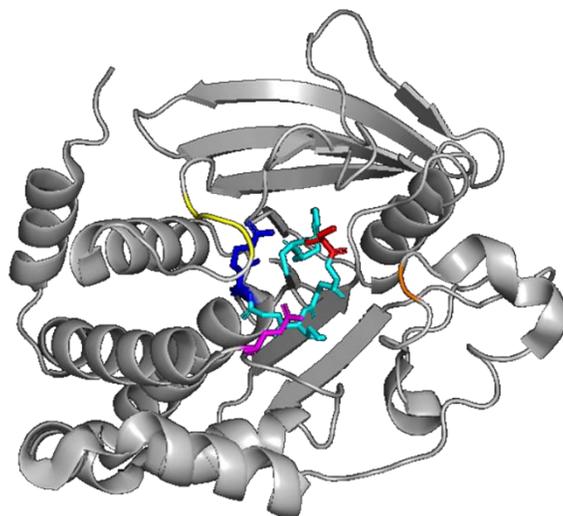


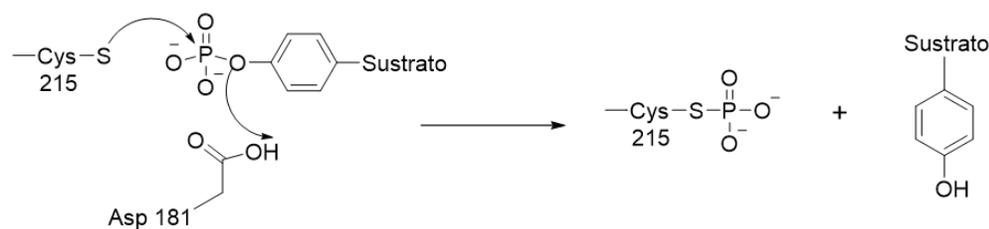
Fig. 17. Estructura terciaria de la PTP-1B (PDB: 1SUG). Asas: WPD (amarillo), Q (morado), PY (naranja), P (azul cielo); la Cys215 (rojo) y la Arg221 (azul marino) esenciales para la actividad catalítica de la enzima.

1.4.8.2. Mecanismo de la enzima PTP-1B

Una gran variedad de estudios estructurales e *in vitro* (cinéticos-enzimáticos) con la PTP-1B han proporcionado información importante sobre el mecanismo del reconocimiento de sustrato y catálisis. La catálisis mediada por PTP-1B procede a través de dos pasos. En el primer paso, el grupo tiol de la Cys215 realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo fosfato del sustrato, mientras que la Arg221 estabiliza el intermediario cisteinil-fosfato. El asa WPD cambia la conformación encerrando o atrapando la fosfotirosina del sustrato en el bolsillo catalítico. En el segundo paso, el sustrato desfosforilado sale, mediado por la Gln262 (asa Q), que coordina la molécula de agua, y el Asp181 (asa WPD) que actúa como donador de protones, facilitando la salida del sustrato. Después, el mismo Asp181 actúa como aceptor de protones de una molécula de agua, recuperando su estado inicial y permitiendo que dicha molécula de agua ataque al grupo fosforilo unido a la Cys215. Finalmente, la Cys215 se reduce de nuevo liberando la molécula de fosfato inorgánico (Fig. 18) (Tonks, 2003; Cho, 2013).

La PTP-1B es un importante regulador de la homeostasis de la glucosa y el metabolismo energético. Es un blanco terapéutico potencial relevante para el tratamiento de la DMT-2, obesidad y otros desórdenes metabólicos asociados, debido a su capacidad para modular negativamente las vías de señalización de la insulina y leptina (Fig. 16) (Tonks, 2003; Cho, 2013; Krishnan et al., 2018).

Paso 1



Paso 2

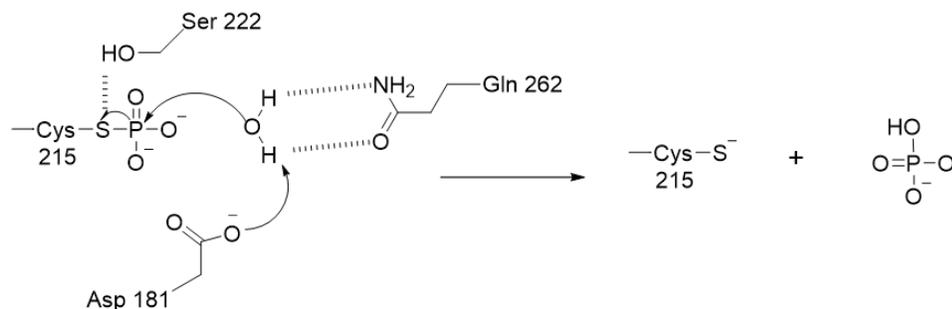


Fig. 18. Mecanismo de acción del sitio activo de la PTP-1B.

1.4.8.3. Compuestos con actividad sobre la enzima PTP-1B

En virtud del potencial de la PTP-1B como blanco terapéutico para el tratamiento de la obesidad y la DMT-2, muchos estudios se han enfocado a la búsqueda de inhibidores de esta enzima. Los inhibidores de la PTP-1B amplifican la señalización mediada por la fosforilación del receptor de insulina (IR) y los sustratos del receptor de insulina (IRS), por lo que se mantiene la captación de glucosa en las células sensibles a la insulina. Mientras que, en la cascada de señalización de la leptina, se mantiene activado el mecanismo por JAK2 y STAT3 (Kerru et al., 2018; Cho, 2013). Algunos inhibidores (naturales o semisintéticos) de la PTP-1B se resumen en la Figura 19 (Kerru et al., 2018; Yamazaki et al., 2017; Liu et al., 2011; Li et al., 2019; Tang et al., 2018; Lantz et al., 2010; Kyriakou et al., 2018; Verma et al., 2017; Ceron-Romero et al., 2016; Rangel-Grimaldo et al., 2020; Kim et al., 2017; Rivera-Chávez et al., 2020).

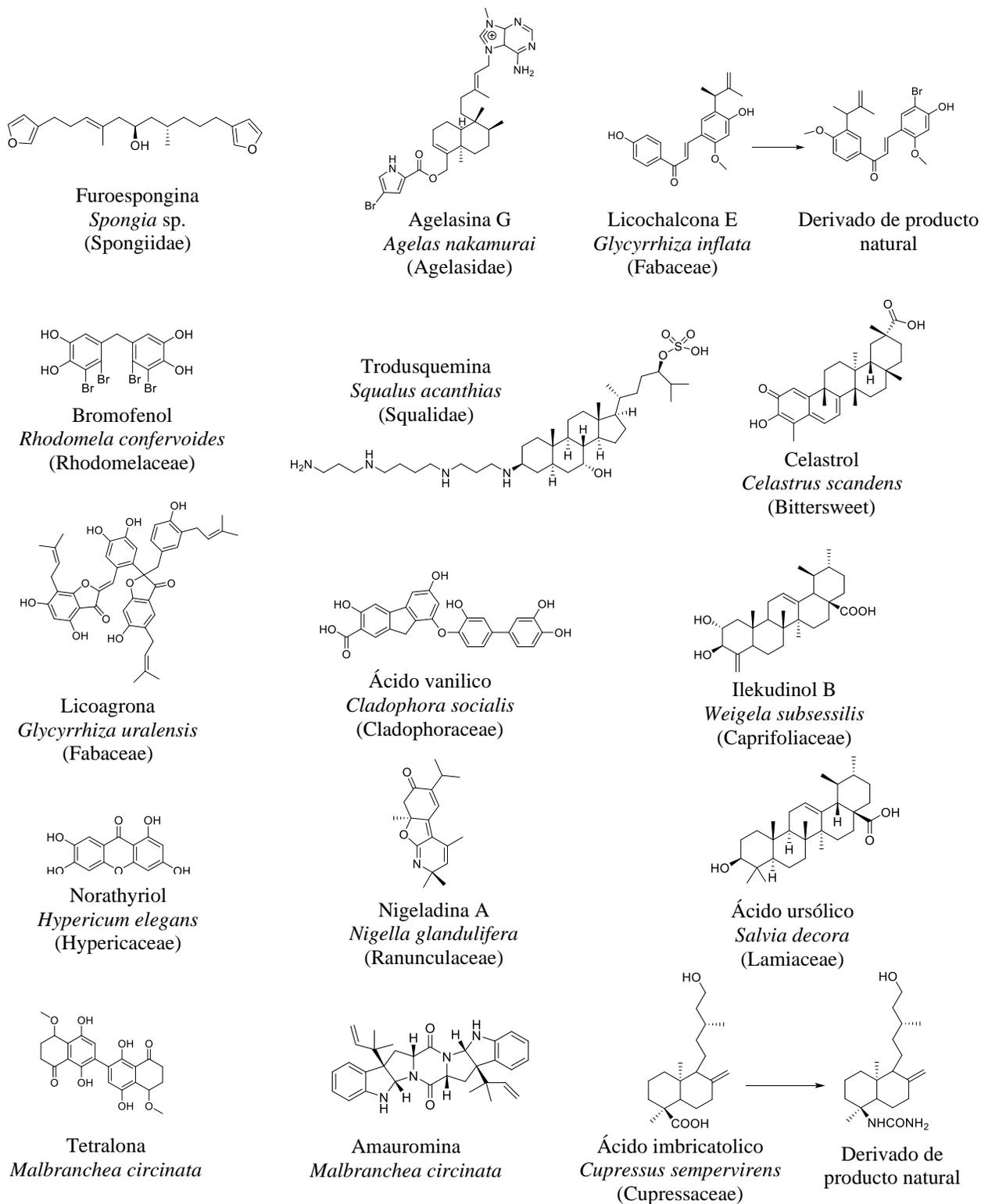


Fig. 19. Compuestos de origen natural o semisintético que inhiben a la PTP-1B (continuación).

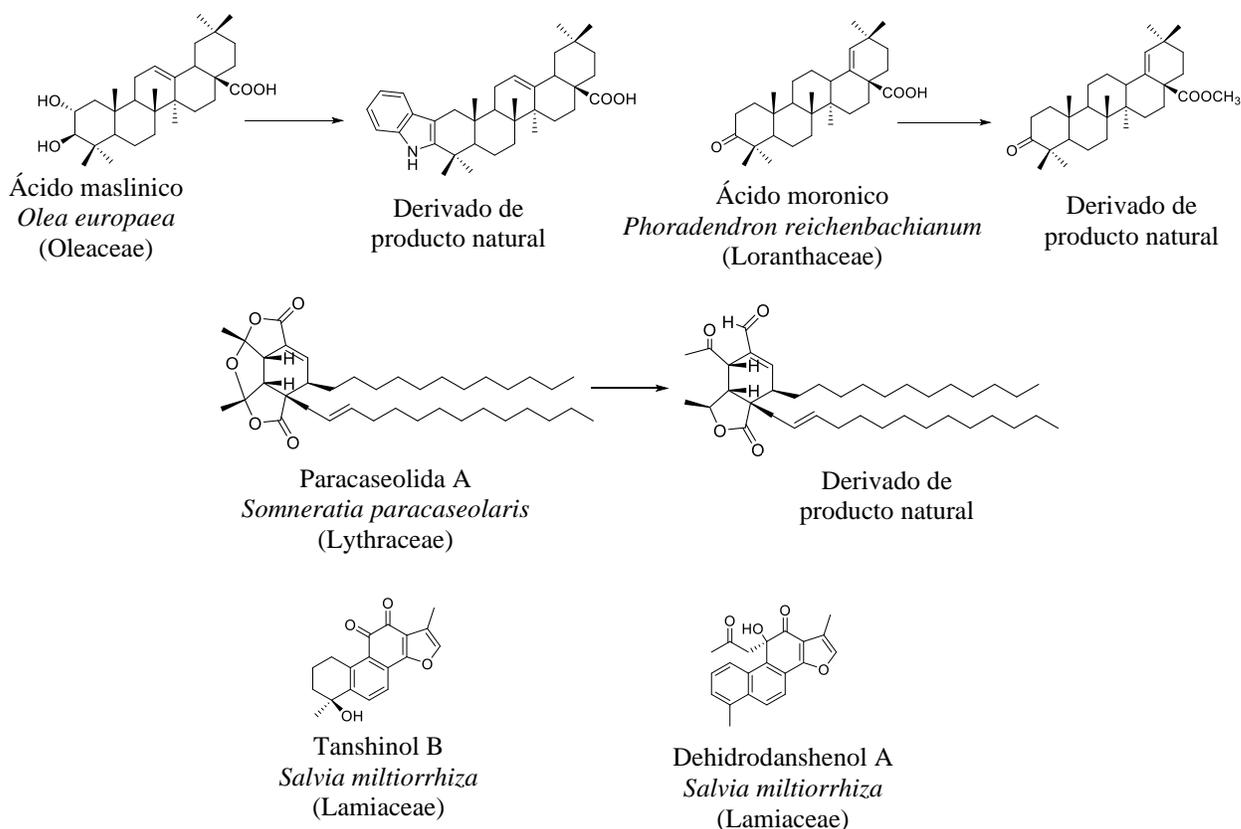


Fig. 19. Compuestos de origen natural o semisintético que inhiben a la PTP-1B.

1.5. Generalidades de nocicepción

El dolor se definió una vez en relación con el placer, definiendo emociones opuestas. Fue Sherrington quien introdujo el término y desarrolló el concepto de nocicepción, del latín *nocere*: dañar. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define el dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular (destrucción celular con liberación de sustancias bioquímicas) real o potencial, descrita en términos de tal daño”, mientras que la nocicepción es definida como “el proceso neuronal de codificación de estímulos nocivos”. Por lo tanto, la nocicepción incluye mecanismos por los cuales los estímulos nocivos son detectados por el Sistema Nervioso Periférico (SNP), codificados, transferidos y tratados inconscientemente en el Sistema Nervioso (SN). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el dolor es, en principio, un mecanismo de defensa, cuya función es detectar y localizar los procesos que dañan las estructuras corporales (Barrot, 2012; Le Bars et al., 2018).

La clasificación del dolor puede hacerse en función de diversos criterios, según su origen, el dolor se clasifica como dolor nociceptivo (fisiológico), inflamatorio (lesión de tejidos), neuropático (lesión de nervios) y funcional (no hay lesión de tejidos ni nervios). El dolor nociceptivo es el causado por la activación de los receptores del dolor (nociceptores) en respuesta a un estímulo. En contraste, el dolor

neuropático se origina por un estímulo directo del Sistema Nervioso Central (SNC) o una lesión de los nervios periféricos; se considera un dolor patológico, ya que no tiene una utilidad como mecanismo de defensa o alerta (dolor nociceptivo e inflamatorio). Otra clasificación es de acuerdo con su duración; el dolor puede ser agudo (fenómeno de corta duración que se asocia a un daño tisular y desaparece al controlar la causa) o crónico (tiene una duración de más de tres meses, se prolonga más allá de la curación de la lesión que lo originó o se asocia a una afección crónica). Este último puede ser de origen inflamatorio (artritis reumatoide), neuropático (lesión de un nervio) o funcional (migraña). Con respecto a la localización, el dolor se clasifica en somático y visceral, el dolor somático se caracteriza por estar bien localizado y punzante, se produce cuando se estimulan los receptores de la piel, sistema musculoesquelético o vascular. El dolor visceral, se debe a lesiones o disfunciones de los órganos interno, es continuo e irradia a zonas alejadas del punto de origen (Del arco, 2015; Méndez, 2020).

1.5.1.Fisiopatología del dolor

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada o similar a un daño tisular real o potencial (Raja et al., 2020). Además, el dolor es una señal de un estado de necesidad corporal (como sed, hambre), una emoción primordial y homeostática, que prepara para evitar la causa y organizar la reparación y recuperación de una posible lesión (Le Bars et al., 2018).

La información del sistema sensitivo general se inicia en piel, músculo, articulaciones y vísceras, donde es captada y convertida a potenciales de acción por diversos receptores o transductores que se clasifican en mecano-receptores, termo-receptores y nociceptores. Los mecano-nociceptores son las fibras A δ y A β , que se activan por estímulos mecánicos de alta o baja intensidad, respectivamente. Los termo-nociceptores corresponden a fibras A δ y son activados por temperaturas superiores a 45 °C o inferiores a 5 °C. Los nociceptores son sensibles a estímulos que amenazan producir daño tisular o que lo producen; se conocen como terminaciones libres (no tienen cápsulas o corpúsculos); se activan a un alto umbral y transmiten por fibras delgadas A δ , A β y C (Fig. 20). Cuando se produce una lesión superficial en la piel, se perciben dos clases de dolor: uno inicial, rápido, de corta duración, localizado, debido a la actividad de las fibras A δ (mielinizadas, dolor primario) y otro de aparición más tardía, lento, persistente y difuso, debido a la actividad de las fibras C (no tienen mielina, dolor secundario). Cuando se produce una lesión tisular, se desencadena una cascada de liberación de sustancias inflamatorias sensibilizantes (sopa inflamatoria) o excitadoras de los nociceptores. Entre ellas se encuentran iones potasio e hidrogeniones, serotonina, bradiquinina, histamina, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y sustancia P. Esta última es liberada por un reflejo axonal e induce vasodilatación y desgranulación de mastocitos (Le Bars et al., 2018; Del arco, 2015; Pabón-Henao et al., 2015).

El dolor es transmitido (fibras A δ y C) desde la periferia hasta corteza somato-sensorial por tres neuronas. La primera, inicia en el receptor (piel, músculo, articulaciones, huesos o vísceras) y tiene el cuerpo celular en el ganglio de la raíz dorsal y llega hasta la médula espinal. En el asta dorsal de la médula espinal hay diferentes láminas, como las fibras del dolor, tales como la lámina I donde se proyectan las fibras A δ y C, la lámina II de donde se proyectan las fibras C que hacen sinapsis con las interneuronas intralaminares (pre y postsinápticas) y las neuronas interlaminares (excitación postsináptica). Por otra parte, las fibras A δ envían ramas colaterales a hacer sinapsis con las neuronas nociceptivas tipo 2 en las láminas IV y VI. En el asta dorsal la primera neurona hace sinapsis con la segunda neurona, la cual cruza al lado contrario y llega hasta el tálamo, por el tracto espino-talámico. En el tálamo se inicia el análisis del dolor, y de aquí parte la tercera neurona, que llega a la corteza somato-sensorial, donde se realiza la percepción sensorial mediante conexión con neuronas de cuarto orden y con otras partes del cerebro (Fig. 20) (Pabón-Henao et al., 2015; Mouraux et al., 2018).

La modulación se produce en el asta dorsal de la medula y se divide en sensibilización e inhibición. Un dolor intenso y continuo produce sensibilización a nivel central, porque a nivel medular promueve neuroquímicos excitatorios como la sustancia P, el aspartato-glutamato, prostaglandinas y calcitonina, que facilita la excitación de circuitos nerviosos. En contraste, a nivel espinal puede haber sistemas de inhibición; así, por ejemplo, el sistema inhibitorio opioide utiliza encefalinas, β -endorfinas y dinorfinas. La inhibición no opioide comprende neuromoduladores como noradrenalina, serotonina y agonistas de receptores α -2. Por último, la inhibición segmentaria (teoría de la compuerta), en donde las fibras gruesas que informan sobre tacto, presión y propiocepción, inhiben a las vías delgadas de dolor que entran en el mismo segmento medular, mediante neurotransmisores inhibitorios (Pabón-Henao et al., 2015; Mouraux et al., 2018).

Para finalizar, la integración es el reconocimiento e interpretación del potencial de acción por parte de los centros superiores en las diferentes porciones del SN. El componente afectivo del dolor deriva de circuitos cerebrales entre corteza, sistema límbico y lóbulo frontal (Fig. 20) (Pabón-Henao et al., 2015).

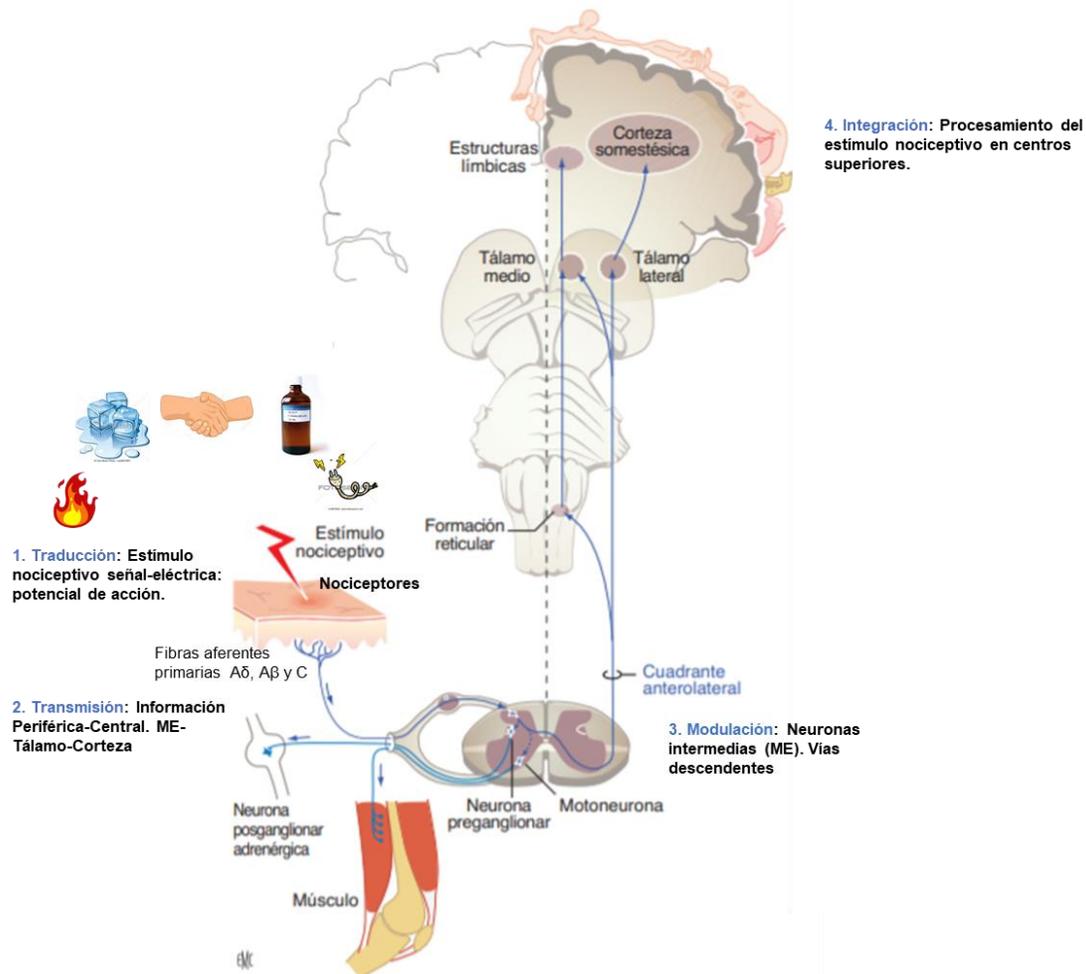


Fig. 20. Organización esquemática del mecanismo de percepción del dolor. (Modificado de Mouraux et al., 2018).

1.5.2. Dolor experimental en animales

Cualquiera que sea la forma de evaluarlo, el dolor no es una variable observable perteneciente a la semiología (un signo o una medida, clínico o paraclínico), sino una variable latente (un síntoma, informado por el paciente), aunque la persona puede expresar su dolor con la palabra y comunicarlo. Por esta razón, la metodología para evaluar el dolor (escalas, cuestionarios) sigue siendo objeto de una intensa investigación (Méndez, 2020; Le Bars et al., 2018).

Se admite fácilmente que un animal siente un dolor agudo cuando se exterioriza por manifestaciones conductuales, por ejemplo, gemidos o gritos. En mamíferos, las reacciones a un estímulo nociceptivo se pueden dividir en dos tipos:

- ❖ Los centros inferiores en la jerarquía del SNC;
- ❖ los más complejos; que involucran centros superiores.

Entre las respuestas más complejas que implican niveles jerárquicamente más altos, hay respuestas motoras condicionadas que son el resultado de un aprendizaje a veces muy rápido. Las reacciones

conductuales complementarias (huida, desconfianza de los objetos responsables de la experiencia dolorosa, reacción de evitación) o cambios de comportamiento (social, nutricional, sexual, ciclo de sueño-vigilia). Los dolores agudos y breves producen respuestas motoras fásicas (retirada, sobresalto). Sin embargo, ninguno de los signos descritos anteriormente tiene un valor unívoco. Cada especie animal expresa la presunta sensación de dolor a través de su propio “repertorio” conductual.

Se han desarrollado modelos animales de patologías humanas en las que el dolor es el síntoma principal. Cabe señalar que las pruebas utilizadas son idénticas a los modelos de dolor de estudio, ya sean agudos o crónicos. En un “modelo de dolor” se aplica una “prueba de nocicepción” (Le Bars et al., 2018).

Las pruebas de nocicepción se pueden dividir en dos categorías según su propósito: medir un umbral o una respuesta supraliminar. Se basan en la medición de tres tipos de variables dependientes:

- ❖ Medida del tiempo necesario para una reacción de escape (tiempo de reacción: aleteo de la cola, extracción de la pata);
- ❖ la medición del umbral de activación de dicha reacción (prueba Randall-Selitto, filamentos de Von Frey, medidores de deformación);
- ❖ la amplitud de una variable que caracteriza esta respuesta (estiramiento abdominal, formalina) (Le Bars et al., 2018; Barrot, 2012).

La prueba de formalina utiliza estímulos químicos inflamatorios o irritantes, que inducen un estado de dolor tónico que se puede evaluar mediante una puntuación conductual. En ella se pueden utilizar diferentes agentes químicos irritantes como estímulos nociceptivos para evaluar el dolor y evaluar preclínicamente extractos, fracciones o compuestos puros como analgésicos. La formalina actúa a través del receptor transitorio ankyrin 1 (familia del receptor transitorio de canales iónicos). El agente químico (formalina) se puede inyectar por vía intradérmica en la superficie dorsal o plantar de una pata delantera o posterior, lo que da como resultado retirada de la pata, lamer, morder o sacudir, que son cuantificables. En los roedores, la inyección de formalina produce una reacción conductual bifásica, con una fase inicial dentro de los primeros minutos posteriores a la inyección (0–10 min), seguida de un período de reposo de 10 min y una segunda fase de conductas nociceptivas que duran 20–40 min. La primera fase está relacionada a la estimulación directa de los nociceptores y es sensible a los anestésicos locales, mientras que la segunda fase involucra mecanismos inflamatorios y sensibilización central del asta dorsal. La segunda fase responde a varios fármacos de acción analgésica clínica establecida, como opiáceos, los analgésicos antiinflamatorios esteroideos o no esteroideos, los antagonistas de *N*-metil-D-aspartato o la gabapentina (Barrot, 2012).

1.5.3. Plantas medicinales para el alivio del dolor

El dolor acompaña al hombre desde los tiempos más remotos; así, por ejemplo, los primeros humanos [neandertales (Sidrón 1)] trataban su dolor de muelas masticando álamo (*Populus trichocarpa*), una planta que contiene ácido salicílico, un precursor del ácido acetilsalicílico (aspirina). Desde el año 3000 a. C., los médico-sacerdotes de Mesopotamia usaban el cannabis (*Cannabis sativa*) por su efecto analgésico. Los incas utilizaban hojas de coca (*Erythroxylum coca*) para mitigar el dolor y el hambre según revelan sacos con hojas de coca de una antigüedad de 2500 años encontrados en cuevas peruanas. Según el Papiro de Ebers, 1550 a. C., el opio (*Papaver somniferum* L.) se utilizaba contra cefaleas del dios Ra. En las prácticas comunes de la civilización grecorromana se utilizaba las hojas de mandrágora (*Mandragora autumnalis*), para mitigar el dolor (Bonet, 2004; Weyrich et al., 2017).

En el caso particular de México, la herbolaria representa una práctica médica alternativa arraigada por razones culturales y aspectos socioeconómicos, ya que su uso cotidiano es fundamental para resolver problemas de salud, principalmente en comunidades indígenas o con bajos recursos económicos. Es por ello importante evidenciar los efectos analgésicos y antiinflamatorios de las plantas con uso tradicional para el tratamiento del dolor, así como sus posibles efectos no deseados, con la finalidad de garantizar la seguridad de su uso. El uso de las plantas medicinales en México para tratar el dolor es milenario, de tal forma que en el Códice de la Cruz-Badiano (pequeño libro de hierbas medicinales indias) está indicado el uso de las hojas de toloache (*Datura innoxia*) en forma de cataplasma para reducir el dolor y la hinchazón. Actualmente es utilizado en el norte de México, y en los estados de Sonora, Oaxaca y Quintana Roo, para tratar el dolor reumático. En los estados de Puebla y Michoacán se emplean las hojas, tallos y ramas de hierba de golpe (*Oenothera rosea*) en forma de cataplasma o infusión para el alivio del dolor muscular y la inflamación (Martínez, 2015). Otra especie ampliamente utilizada en México es *Heterotheca inuloides*, también llamada árnica, útil para curar el dolor y la inflamación. Estudios preclínicos con modelos experimentales de dolor e inflamación en ratas han demostrado que el sesquiterpeno 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina aislado del extracto hexánico de las inflorescencias de la planta, es uno de los principios activos (Fig. 21). Dicho estudio refuerza el uso como analgésico de las inflorescencias de esta planta en la medicina tradicional (Rocha-González et al., 2010). En las cuevas de Tehuacán (Puebla y Veracruz), la presencia de flor de mayo (*Plumeria rubra* var *acutifolia*) y las semillas de venenillo (*Thevetia peruviana*) se usaron con fines medicinales para curar el dolor de oído, dolor de muelas, inflamación de la piel y las heridas, uso que se les da en la actualidad. En Chihuahua, otros remedios a partir del toronjil (*Agastache* spp.) y el orégano (*Monarda austromontana*), sirven para curar el espanto, los nervios y el dolor de estómago (Bye y Linares, 1999).

La comunidad científica ha descubierto compuestos (origen natural) con actividad analgésica, o bien, han desarrollado fármacos efectivos para el alivio del dolor a partir de la modificación estructural de compuestos naturales. Principalmente, la morfina (analgésico) del opio ha servido como modelo para el diseño de fármacos eficaces para tratar el dolor (Fig. 21). El ácido acetilsalicílico (analgésico antiinflamatorio) se obtuvo por la modificación química de la salicina aislada de *Salix alba* L. (Fig. 21). Cabe mencionar que estos fármacos son prototipos de las familias de analgésicos más utilizadas actualmente para el alivio del dolor (Moreno-Pérez et al., 2020; Rauf et al., 2017).

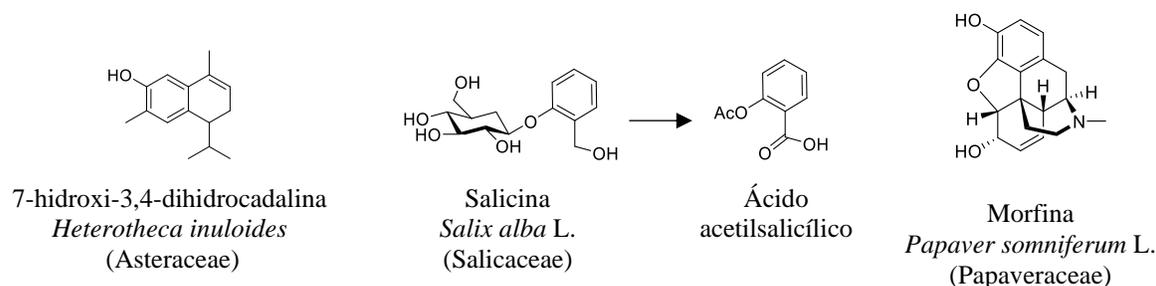
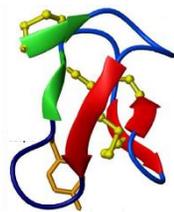
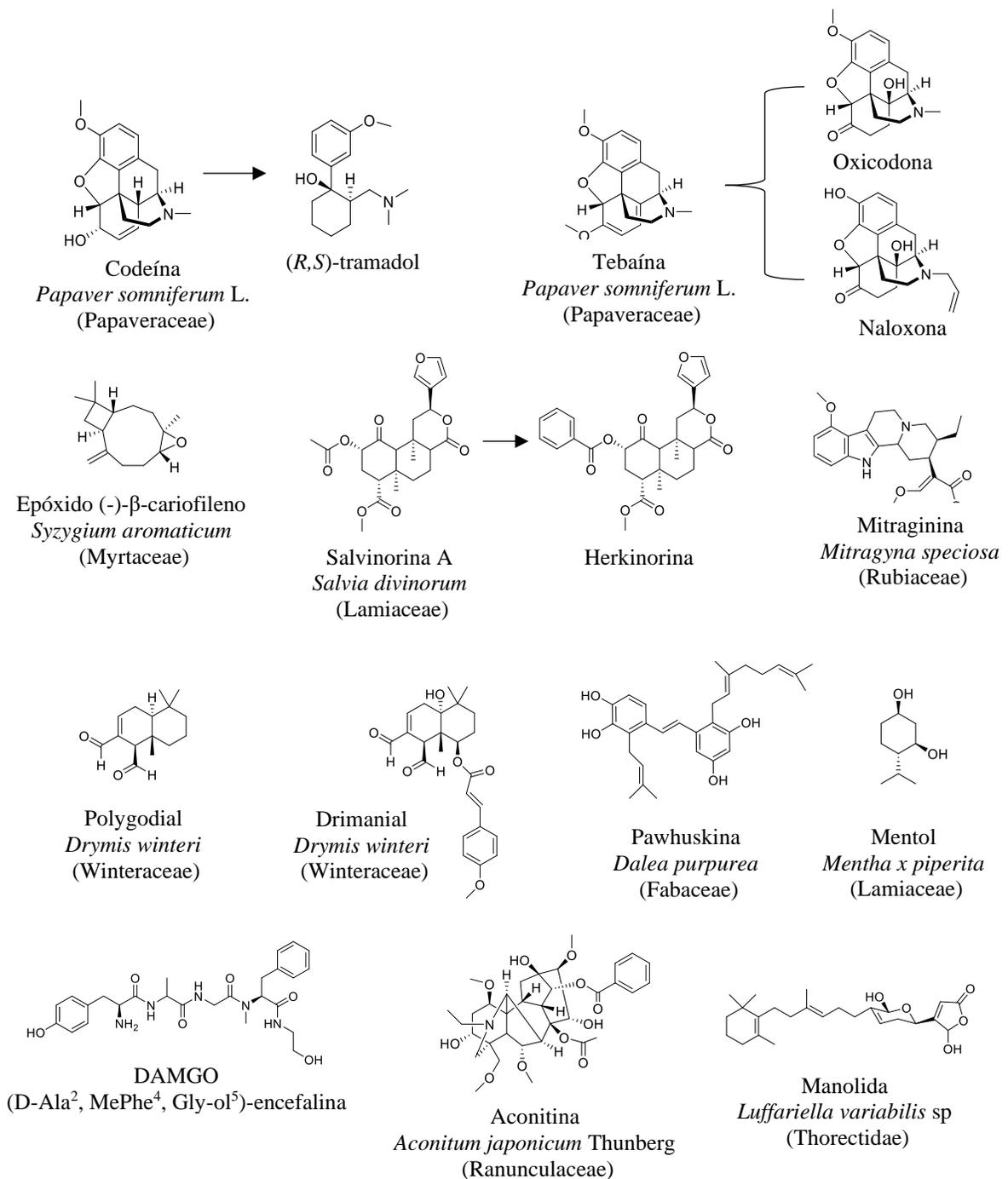


Fig. 21. Compuestos aislados de plantas medicinales con actividad analgésica.

1.5.4. Productos naturales con efecto analgésico

Actualmente existen diferentes estrategias terapéuticas para eliminar el dolor, entre ellas se encuentran los analgésicos del grupo de los antiinflamatorios no esteroideos, estos son de primera elección en el dolor nociceptivo cuando existe un componente inflamatorio. Los analgésicos opioides que son muy eficaces en dolores nociceptivos (agudos y crónicos) y pueden ser útiles en el tratamiento del dolor neuropático. Algunos otros fármacos antidepresivos y anticonvulsivos se administran para combatir el dolor causado por alguna lesión en el SNC (neuralgia y neuropatías) (Martínez, 2015; Del arco, 2015; OMS, 2020).

Por otra parte, los PN son una fuente valiosa de nuevos compuestos que podrían ofrecer valiosos efectos terapéuticos con mecanismos de acción novedosos para el tratamiento de patologías asociadas con el dolor. En la Figura 22 se muestran las estructuras de PN, análogos a partir de fuentes naturales y compuestos sintéticos (basados en farmacóforos naturales) con propiedades analgésicas (Ramírez et al., 2017; Schroeder y Lewis, 2006; Abdel-Rahman, 2017; Anjum et al., 2016; Martínez-Mayorga et al., 2017; Rocha-González et al., 2010; Rauf et al., 2017).



Se pueden observar tres puentes de disulfuro (amarillo), región del puente β (flechas verdes), región de lámina β (flechas rojas) y Tyr13 (naranja).

Estructura 3D Zinocotida (MVIIA)
Conus geographus (Conidae)
(Imagen tomada de Schroeder y Lewis, 2006).

Fig. 22. Compuestos con actividad analgésica.

1.6. *Salvia amarissima* Ortega (Syn: *S. circinata* Cav.)

Salvia amarissima Ortega es una planta herbácea perenne endémica de México. Crece hasta 1.5 m de altura, los tallos son hispídeos con pelos retrorsos a lo largo de los surcos, las hojas ovaladas de color verde blanquecino ásperas o arrugadas y generalmente suaves. Las flores, generalmente de color azul pálido, presentan corolas tubulares de dos labios y crece entre los pastizales y matorrales (áreas perturbadas) (Fig. 23) (Calderón y Rzedowski, 2010; Mata et al., 2019). Se encuentra ampliamente distribuida en los estados de Ciudad de México, Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Martínez-Gordillo et al., 2017). *Salvia amarissima* fue incluida como planta medicinal en el Catálogo del Herbario de la Real Expedición Botánica a Nueva España (1787–1803) (Mata et al., 2019). En Capulalpam de Méndez, Oaxaca, una región en México donde el uso de plantas en la medicina tradicional es muy común, esta planta es conocida como “bretónica” y según los habitantes, un té elaborado a partir de las partes aéreas de la planta se utiliza para el tratamiento de úlceras, para curar enfermedades gastrointestinales (diarrea y dolor de estómago), helmintiasis, antibacterial, reumatismo, cáncer y diabetes (Mata et al., 2019; Moreno-Pérez et al., 2019; Flores-Bocanegra et al., 2017; Fragoso-Serrano et al., 2019; Clínica de Salud Intercultural, 2018).



Fig. 23. *Salvia amarissima* Ortega. (Lamiaceae).

1.6.1. Composición química y propiedades biológicas de *S. amarissima*

Los estudios fitoquímicos de *Salvia amarissima* permitieron la identificación de diterpenoides glicosilados como las amarisólidas A–E (**1–5**), un *neo*-clerodano acilado glicosilado [amarisólida F (**6**)] (Maldonado et al., 1996; Flores-Bocanegra et al., 2017; Fragoso-Serrano et al., 2019), otros diterpenoides como teotihuacanina (**7**), amarisinas A–E (**8–12**) (Bautista et al., 2015; Bautista et al., 2016; Ortega et al., 2017; Fragoso-Serrano et al., 2019) y flavonoides como pedalitina (**13**) y una nueva biflavona (**14**) (Fig. 24) (Maldonado et al., 1996; Flores-Bocanegra et al., 2017).

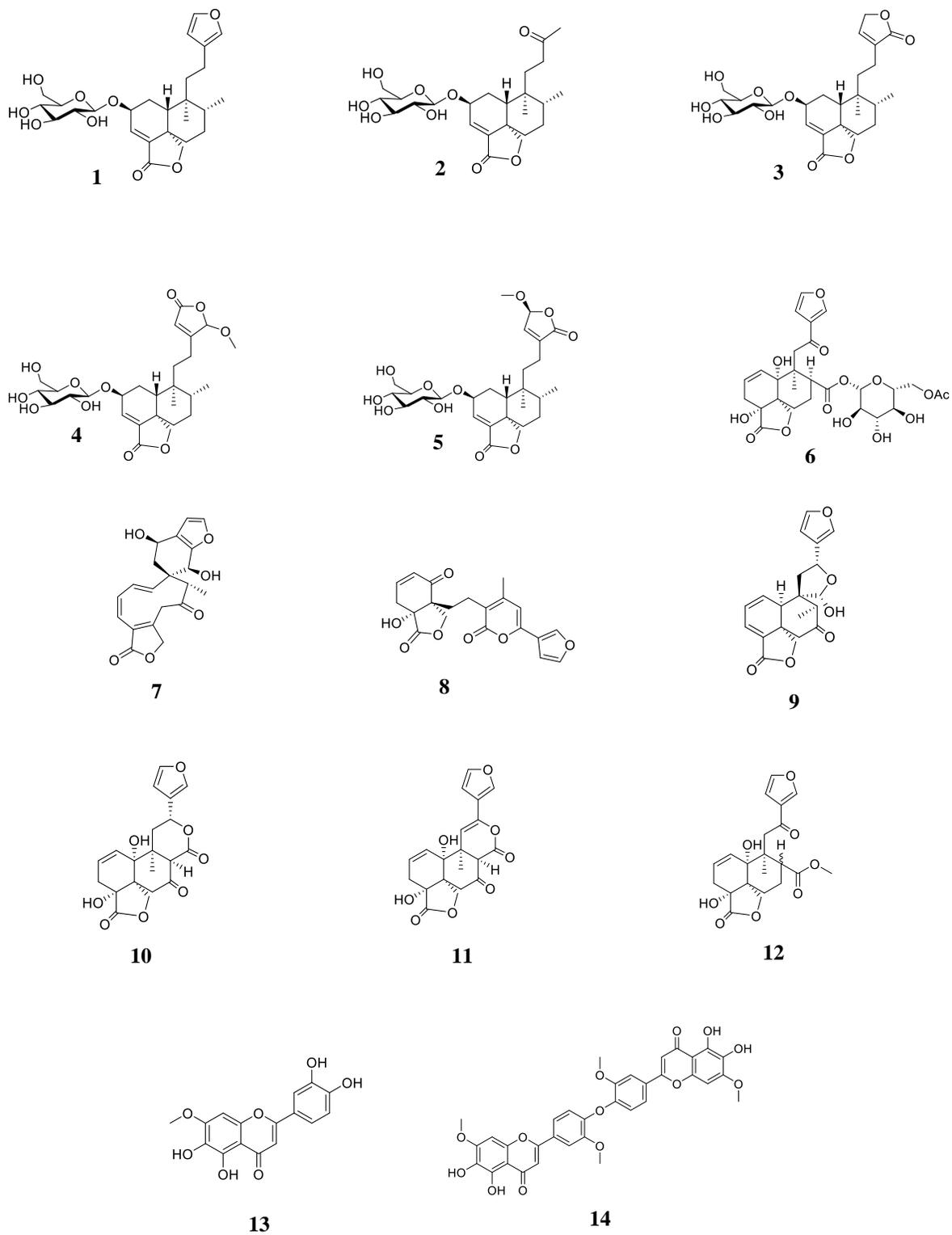


Fig. 24. Metabolitos aislados de las partes aéreas de *S. amarissima*.

Los estudios farmacológicos de los diterpenoides (**6–10**) revelaron actividad antiprotozoaria; además, un moderado efecto citotóxico contra líneas celulares de cáncer humano y actividad moduladora en la línea celular de cáncer MCF-7 resistente a vinblastina (Bautista et al., 2015; Bautista et al., 2016; Fragoso-Serrano et al., 2019; Calzada et al., 2020).

Estudios previos del preparado tradicional de *Salvia amarissima* (recolectada en Puebla, México), determinaron que los productos aislados amarisólida (**1**) y pedalitina (**13**) disminuyeron significativamente el pico postprandial de una manera dosis-dependiente durante una prueba de tolerancia oral a la sacarosa en ratones sanos. Además, se evaluó el efecto inhibitorio sobre las enzimas α -glucosidasas de rata (*in vitro*) de los compuestos **1–5**, **13** y **14**. Los productos de tipo flavonoide (**13** y **14**) fueron los más activos. La pedalitina ($CI_{50}= 81 \mu M$) (**13**) y el biflavonoide ($CI_{50}= 40 \mu M$) (**14**) presentaron una actividad 1.25 y 2.5 veces mejor que la del control positivo acarbosa ($CI_{50}= 100 \mu M$), respectivamente. Respecto a los diterpenoides, el compuesto más activo fue **1** con una CI_{50} de $500 \mu M$. Los metabolitos **1** y **13** se evaluaron *in vitro* contra la enzima α -glucosidasa obtenida del microorganismo *Ruminococcus obeum*. Esta bacteria forma parte la flora intestinal en los humanos y participa en el metabolismo de los carbohidratos. Los resultados de los ensayos mostraron que **1** y **13** inhibieron la actividad de la enzima con un valor de $CI_{50}= 400 \mu M$ y $60 \mu M$, respectivamente (acarbosa $CI_{50}= 1030 \mu M$) (Flores-Bocanegra et al., 2017; Mata et al., 2019).

Por último, estudios recientes demostraron las propiedades antinociceptivas del extracto acuoso de *Salvia amarissima* (recolectada en Oaxaca, México), de la amarisólida (**1**) y de la pedalitina (**13**), justificando así su uso en la medicina tradicional mexicana para el alivio del dolor abdominal (Moreno-Pérez et al., 2019).

1.7. *Salvia microphylla* Kunth (Syn: *S. grahami* Benth.)

La especie *Salvia microphylla* está agrupada en la sección *Fulgentes* y consta de tres variedades: *Salvia microphylla* Kunt, *Salvia microphylla* var. *neurepia* Epl. y *Salvia microphylla* var. *wizlizeni* Gray (Bautista et al. 2013; Bautista et al. 2014). *Salvia microphylla* Kunth es una hierba o arbusto bajo, de 1 a 1.5 m de altura, ramosa con los tallos cuadrados y con pelos. Tiene racimos con dos a seis flores en la parte terminal de la planta, corola bilabiada que van del color rojo a rosa oscuro y es una planta muy aromática (Fig. 25). Es originaria de México y habita en sitios con climas semiseco y templado, crece a una altura que va desde los 420 hasta los 3900 msnm. Crece entre bosques tropicales perennifolios, pastizales y bosques de encino (Jenks y Kim, 2013). En México, *Salvia microphylla* Kunt y otras especies de *Salvias* constituyen un complejo de plantas medicinales conocidas como “mirto” (Jenks y Kim, 2013; Bautista et al. 2014). Se encuentra ampliamente distribuida en los estados de Aguascalientes, Ciudad de México, Chihuahua, Chiapas, Coahuila,

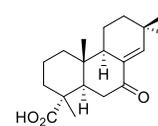
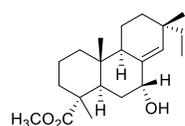
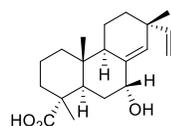
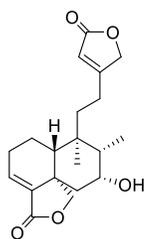
Colima, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Martínez-Gordillo et al., 2017). Un preparado de las hojas y flores (infusión) es ampliamente usado en los rituales curativos para el tratamiento de enfermedades populares como el susto, espanto, mal de aire, nervios, mal de ojo, empacho y aire de viento (Jenks y Kim, 2013). El uso más frecuente de *Salvia microphylla* es para el tratamiento de trastornos digestivos (indigestión, disentería, diarrea y vómito), inflamación abdominal, trastornos de sueño, dolor (cabeza y de oído), cólicos menstruales, reumatismo y calambres (Jenks y Kim, 2013; Reimers et al., 2018; Manzanero-Medina et al., 2018; Pérez-Nicolás et al., 2018).



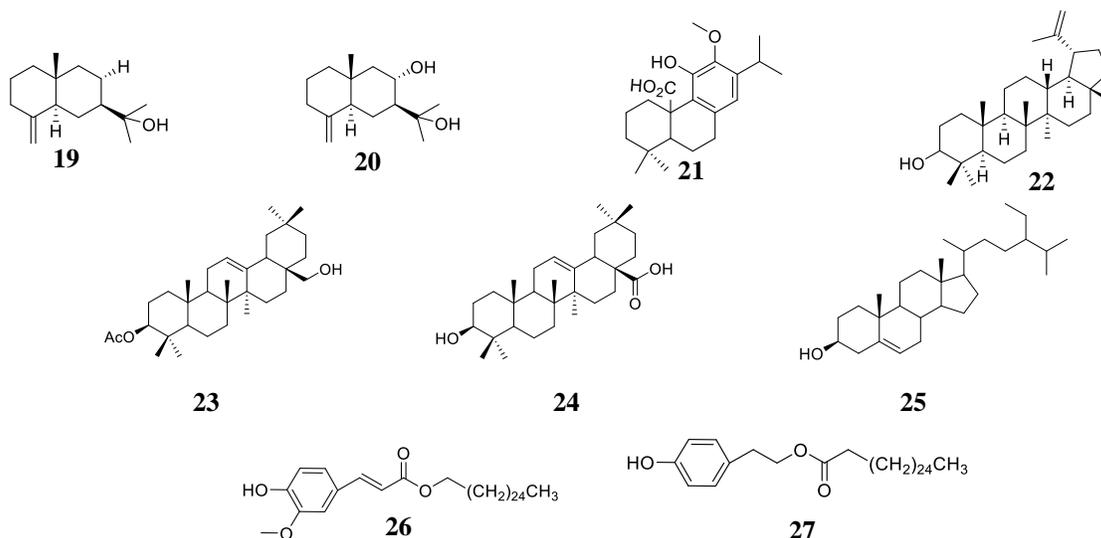
Fig. 25. *Salvia microphylla* Kunth. (Lamiaceae).

1.7.1. Composición química y propiedades biológicas de *S. microphylla*.

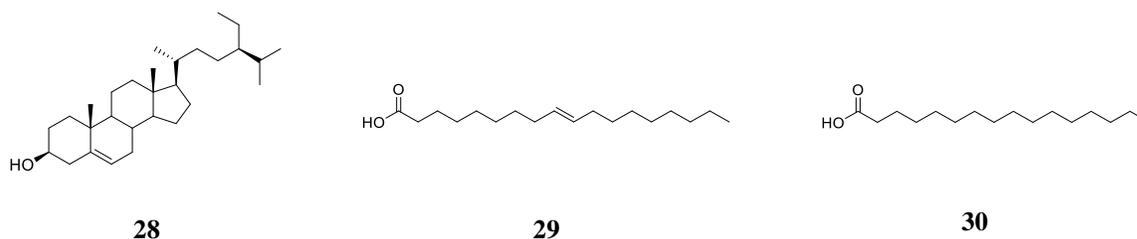
Un estudio químico de las partes aéreas de *S. microphylla*, permitió aislar diterpenoides del tipo clerodano [7 α -hidroxi-neoclerodano (**15**)] y tres pimaranos [ácido 7 α -hidroxisadaracopimárico (**16**), éster metílico del ácido 7 α -hidroxisadaracopimárico (**17**) y ácido 7-oxosandaracopimárico (**18**)] (Esquivel et al., 1987).



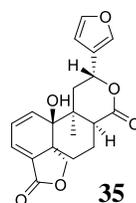
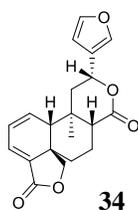
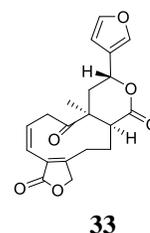
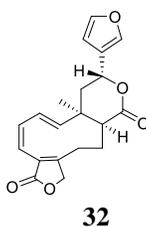
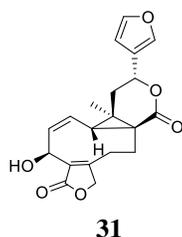
Posteriormente, a partir de un extracto de acetona de *S. microphylla* cultivada en Turquía, se lograron aislar dos sesquiterpenos de tipo eudesmano [β -eudesmol (**19**), 8α -hidroxieudesmol (**20**)], un diterpenoide de tipo abietano [éster metílico del ácido carnósico (**21**)], cuatro triterpenoides [lupeol (**22**), 3-acetato de eritrodiool (**23**), ácido oleanólico (**24**) y β -sitosterol (**25**)] y dos ésteres fenólicos [hexacoilferulato (**26**) y *p*-(hidroxifenil)-etil éster del ácido eicosanoico (**27**)]. En ese mismo trabajo, se describe la actividad antibacteriana del extracto orgánico y los compuestos aislados (**19–27**), pero solamente el diterpeno (**21**) presentó actividad moderada contra *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, se ha comprobado la actividad antifúngica del sesquiterpeno (**19**) contra hongos del género *Alternaria*. También, el ácido oleanólico (**24**) ha sido reportado con actividad antimicrobiana y anti-inflamatoria (Topcu, 2006; Aydogmus et al., 2006).



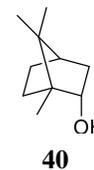
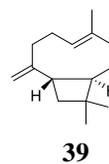
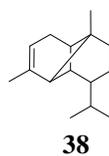
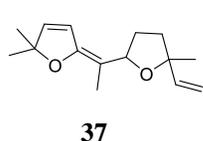
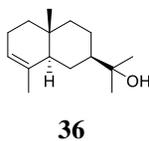
Romo-Asunción y col. (2016) publicaron el estudio químico y biológico del extracto hexánico de las partes aéreas de *S. microphylla*; en ese estudio describieron la presencia de triterpenoides [γ -sitosterol (**28**)] y ácidos grasos [ácido oleico (**29**) y ácido palmítico (**30**)]. En ese mismo trabajo, se describe la actividad insecticida del extracto sobre la larva *Spodoptera frugiperda*.



De manera adicional, del estudio fitoquímico de la especie *S. microphylla* (recolectada en la Ciudad de México) se reporta el aislamiento de algunos diterpenoides (clerodanos), los cuales incluyen a la microfilandiolida (**31**) y las salvimicrofilinas A–D (**32–35**) (Bautista et al., 2013; Bautista et al., 2014). Estudios farmacológicos recientes han demostrado la actividad antiprotozoaria del extracto orgánico de *S. microphylla*, de la microfilandiolida (**31**) y la salvimicrofilina B (**33**), lo cual confirma su uso en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diarrea (Calzada y Bautista, 2020).

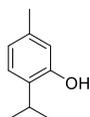


Estudios sobre el aceite esencial de *S. microphylla* recolectada en otras regiones, lograron identificar sesquiterpenos oxigenados [β -eudesmol (**19**), α -eudesmol (**36**), éter de davana (**37**)], sesquiterpenos hidrocarbonados [α -capaeno (**38**), β -cariofileno (**39**)], monoterpenos oxigenados [borneol (**40**), acetato de bornilo (**41**), timol (**42**), carvacrol (**43**)] y monoterpenos hidrocarbonados [α -pineno (**44**), β -pineno (**45**) y canfeno (**46**)]. El limoneno (**47**), al acetato de isobornilo (**48**) y al guaiol (**49**) son los componentes volátiles mayoritarios detectados. La esencia demostró actividades bactericida y antioxidante (Lima et al., 2012; Marchioni et al., 2020).

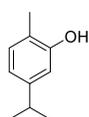




41



42



43



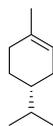
44



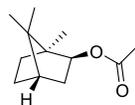
45



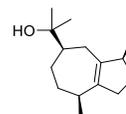
46



47



48



49

1.8. Control de calidad de plantas medicinales

La OMS destaca que existen al menos 119 fármacos derivados de plantas, de éstos, alrededor de 74 % se usa en la medicina moderna. Lo anterior se correlaciona directamente con los usos tradicionales que las culturas nativas les daban como hierbas medicinales. De hecho, el uso de la herbolaria desde tiempos remotos se reconoce como la más antigua forma para curar o aliviar diferentes enfermedades, debido a las propiedades de diversas sustancias. En la actualidad, muchas personas recurren a las plantas medicinales para tratar diferentes enfermedades porque creen que las plantas, por ser de origen natural, carecen de toxicidad. Esta postura puede ser algo peligrosa, ya que existen evidencias contundentes de la toxicidad producida por algunas plantas y por la interacción entre plantas medicinales y la medicina alópata, por lo que no se debe tomar a la ligera su uso sin hacer hincapié en la posibilidad de generar efectos no deseados. Para sustentar la eficacia de los productos herbolarios, es necesario generar la información farmacológica mediante la aplicación de ensayos experimentales preclínicos y clínicos (Moreno-Pérez et al., 2020; Martínez, 2015; Efferth y Greten, 2012; Bandaranayake, 2006).

En México, el número de pacientes que recurre a la medicina alternativa se encuentra entre el 15 y 20 % del total de la población. Por tanto, el uso de plantas medicinales es considerado una de las alternativas terapéuticas más importante. En general, la tradición y costumbre de utilizar plantas medicinales para el alivio de diversas enfermedades se encuentra muy arraigada en nuestra cultura, principalmente en las comunidades rurales. En las zonas urbanas, si bien es un recurso natural que se emplea actualmente, es claro que existen limitaciones para su aplicación en el área médica. Para poder utilizar las plantas medicinales con fines terapéuticos se requiere de diversos estudios que incluyen la estandarización de las dosis, la homogeneización de los productos herbolarios, el conocimiento de la concentración de los compuestos activos, la identificación de los efectos adversos o tóxicos, así como parámetros farmacocinéticos, entre otros (Martínez, 2015; Moreno-Pérez et al., 2020).

La OMS reconoce la importancia de la medicina tradicional y ha propuesto en múltiples ocasiones mejorar los aspectos regulatorios de las plantas medicinales. Sin embargo, hasta 2007 únicamente 25 países tenían legislaciones específicas para el uso de plantas medicinales. Por lo cual, la OMS ha indicado que es indispensable la investigación científica que informe acerca de la eficacia y seguridad de la herbolaria para garantizar las condiciones de su uso sin riesgo (Moreno-Pérez et al., 2020).

Dentro de las primeras soluciones propuestas por la OMS para asegurar la calidad de drogas crudas y preparados herbolarios, fue una publicación en 1988 del documento “Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials” en el cual se establecen las recomendaciones y procedimientos para el aseguramiento de calidad, en el 2011 se publicó la actualización de este. La OMS, actualizó los objetivos del programa de medicina tradicional en su documento “Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014–2023” publicado en 2013. Este documento se plantean dos objetivos principales: (i) Brindar apoyo a los países miembros para que aprovechen la medicina tradicional para lograr su bienestar y atención primaria a sus problemas de salud; (ii) promover la utilización segura y eficaz de la medicina tradicional mediante la reglamentación de productos, prácticas y profesionales. Una de las metas más importantes de este documento consiste en el fortalecimiento de la seguridad, la calidad y la eficacia de los productos elaborados a base plantas mediante su reglamentación (OMS, 2013).

Entonces, la calidad se convierte en un requisito básico de los medicamentos herbolarios, no solo por su importancia intrínseca, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros de seguridad y eficacia. El control de calidad de las drogas vegetales y derivados pretende garantizar su identidad, pureza y contenido en principios activos y/o marcadores (Kunle et al., 2012, Efferth y Greten, 2012; Liang et al., 2004; Bandaranayake, 2006).

El propósito de los ensayos de identidad de las drogas crudas permite su identificación a través de una serie de pruebas botánicas, químicas y genéticas. Es necesario establecer estos parámetros de identidad para garantizar la eficacia y seguridad de las drogas evitando adulteraciones o sustituciones que afecten la salud de los consumidores. Las pruebas de identidad botánica se realizan a nivel macroscópico (un comparativo confiable suele hacerse con las muestras de referencias depositados en los herbarios) y microscópico. Estos ensayos nos aseguran que se utilice la droga cruda correcta. En los ensayos de identidad química se incluyen reacciones características de los extractos de la especie vegetal y técnicas cromatográficas. La evaluación de la identidad química está enfocada principalmente a la detección de compuestos marcadores y obtención de perfiles cromatográficos que sirven como “huella dactilar” que hacen una representación integral de los compuestos químicos presentes en las plantas medicinales.

Los compuestos marcadores se definen como constituyentes químicamente definidos, útiles para fines analíticos, independientemente de que presenten actividad o no. Por otro lado, para la generación de los perfiles cromatográficos, se hace uso de diversas técnicas cromatográficas, incluyendo Cromatografía en Capa Fina (CCF), la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) y Cromatografía de Gases (CG) (Efferth y Greten, 2012).

En los últimos años las pruebas de identidad genética han complementado las estrategias clásicas para la identificación de las drogas crudas. Esta prueba consiste en el análisis de marcadores moleculares, los cuales, son estables y específicos para cada especie vegetal y no están influenciados por factores endógenos o exógenos (Bandaranayake, 2006; Liang et al., 2004; Kunle et al., 2012; Efferth y Greten, 2012; Sahoo et al., 2010).

Las pruebas de pureza buscan garantizar que la droga se encuentre libre de contaminantes como son los metales pesados, aflatoxinas, radiactividad, pesticidas, material vegetal extraño, mohos, insectos y otros residuos químicos (Kunle et al., 2012; Bandaranayake, 2006; Sahoo et al., 2010).

Por último, la prueba de composición consiste en la aplicación de métodos analíticos validados para cuantificar los principios activos (si estos son conocidos) o de los marcadores de las drogas crudas y/o preparados herbolarios con la finalidad de garantizar la obtención de extractos estandarizados y cuantificados (Kunle et al., 2012; Sahoo et al., 2010).

2. Justificación

Este trabajo obedece fundamentalmente a lineamientos de la OMS en cuanto al uso de las plantas medicinales, lo que justifica *per se* su realización ya que los resultados que deriven de su ejecución contribuirán al uso racional de *Salvia amarissima* y *Salvia microphylla* (Lamiaceae) en las prácticas médicas populares de México. El uso racional de la herbolaria es una meta fundamental para la OMS y sus países miembros. Este uso racional implica conocer su eficacia y seguridad, así como establecer sus parámetros de calidad. En este caso se pretende establecer la eficacia y pruebas de calidad de dos especies de *Salvia* de amplio uso medicinal a lo largo y ancho del país.

Así mismo, debido al incremento en la incidencia a nivel mundial de casos de diabetes y que esta enfermedad representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel internacional, existe una creciente necesidad de obtener nuevos fármacos útiles en el tratamiento de esta patología, por lo que la búsqueda de inhibidores de las α -glucosidasas (α -GI) se encuentra justificado, ya que estos fármacos (administrados en monoterapia o en terapia combinada) tienen un papel importante en la terapéutica de la diabetes. Estos agentes disminuyen los niveles plasmáticos de glucosa tras la ingesta de alimentos al reducir su absorción a nivel intestinal (Eguchi et al., 2018). En países de alto consumo de carbohidratos, como México, se recomienda el empleo de α -GI, ya que estos reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares en combinación con otros fármacos (Eguchi et al., 2018). Además, se ha demostrado clínicamente que la combinación de estos inhibidores con fármacos de primera línea disminuye el riesgo de complicaciones cardiovasculares. Cabe señalar que los fármacos α -GI, como el miglitol y la acarbosa, podrían ser utilizados en la terapia para el tratamiento del COVID-19 causada por el SARS-CoV-2 (William y Goddard-Borger, 2020).

La búsqueda continua de nuevos fármacos como blancos de acción novedosos y específicos para el tratamiento de la DMT-2 es un reto continuo. En este sentido, la enzima PTP-1B es una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de esta enfermedad y la obesidad, debido a su capacidad para modular negativamente la vías de señalización de la insulina y la leptina, respectivamente (Krishnan et al., 2018).

3. Hipótesis

El uso popular de las especies de *Salvia amarissima* y *Salvia microphylla* (Lamiaceae), así como consideraciones de tipo quimiotaxonómico, sugieren que los preparados medicinales tradicionales y aceites esenciales de estas especies poseen propiedades antidiabéticas y antinociceptivas debido a su contenido de principios activos que podrían ser de utilidad para el desarrollo de nuevos fármacos.

4. Objetivos

4.1. Objetivos generales

- Establecer la eficacia preclínica de los preparados tradicionales y aceites esenciales de las especies de *Salvia amarissima* y *Salvia microphylla* como agentes antidiabéticos y antinociceptivos, respectivamente.
- Determinar los principios activos de preparados tradicionales y aceites esenciales de las especies de *Salvia amarissima* y *Salvia microphylla*, y así contribuir, no solo al conocimiento de la eficacia de las plantas, sino también al desarrollo de nuevos fármacos potenciales. El análisis de los aceites se plantea considerando que estos preparados son fuentes valiosas de moléculas adecuadas para el desarrollo de fármacos, y además muy a menudo éstos confieren sus propiedades medicinales a los preparados tradicionales.
- Establecer los parámetros de identidad y composición de ambas especies.

Todo ello permitirá contribuir a la utilización racional de los recursos medicinales de México.

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

4.2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto inhibitorio mediante un ensayo enzimático *in vitro* de los aceites esenciales y preparados tradicionales de ambas especies de *Salvia* sobre las enzimas α -glucosidasas y la PTP-1B para definir su potencial antidiabético.
- Establecer el potencial antinociceptivo del preparado tradicional y el aceite esencial utilizando el modelo de formalina en ratones, para así contribuir al establecimiento de la eficacia preclínica de *Salvia microphylla*.
- Obtener los perfiles cromatográficos de la infusión y el aceite esencial de las plantas mediante la aplicación de las técnicas cromatográficas incluyendo la CCF, CLAR y CG-EM. Esta información permitirá establecer parte importante de las pruebas de identidad de ambas plantas.
- Identificar los principios activos de la infusión de *Salvia microphylla* y *Salvia amarissima* mediante procedimientos fitoquímicos convencionales y las evaluaciones indicadas anteriormente en los incisos 1 y 2.
- Predecir las propiedades farmacocinéticas de similitud a fármacos de los compuestos más prometedores obtenidos en el presente estudio.

5. Parte Experimental

5.1. Procedimientos generales

5.1.1. Caracterización de los productos naturales

La caracterización de los productos naturales aislados se realizó mediante técnicas espectroscópicas (IR, UV, RMN) y de espectrometría de masas. Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 400 por la técnica de reflectancia. Los análisis de rotación óptica (RO) se realizaron en un polarímetro Perkin-Elmer 343 a 20 °C en metanol a la longitud de onda de la línea D-sodio ($\lambda=589$ nm). Los espectros de dicroísmo circular (DC) fueron registrados en un polarímetro JASCO® modelo J720 en metanol. Los análisis por espectrometría de masas de baja resolución se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de ultra alta eficiencia Acquity UPLC-H Class® acoplado a un detector de masas SQD2. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H, 400 MHz o 700 MHz) y de carbono (RMN-¹³C, 100 o 175 MHz) se registraron en un equipo Bruker AVANCE III HD, equipado con una criosonda TCI de 5 mm o en un equipo Varian Unity 400. Para el registro de los espectros se utilizaron CDCl₃, metanol-*d*₄ y DMSO-*d*₆ como disolventes y tetrametilsilano como estándar interno. Estos experimentos se efectuaron en el Instituto de Química de la UNAM.

5.1.2. Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos convencionales en capa fina (CCF) fueron realizados utilizando placas de aluminio de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄, malla 3–5 mm, ASTM) de distintas dimensiones, empleando diferentes sistemas de elución. Como agente cromógeno se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal en H₂SO₄ (12 g de sulfato cérico amoniacal en 22.5 mL de H₂SO₄ y 350 g de hielo), para desarrollar el color de las placas se calentaron a 110 °C aproximadamente por un minuto. La CCF de tipo preparativo fase normal y/o reversa, se efectuaron en placas de vidrio de 20 × 20 cm de 1 mm de grosor recubiertas con gel de sílice o dimetiloctadecilsilil (C₁₈), respectivamente. La Cromatografía en Columna Abierta (CCA) se llevó a cabo en columnas de vidrio de distintas dimensiones empacadas con Sephadex® (LH-20; Sigma-Aldrich-Fluka, MO, EUA.) o con gel de sílice (Kieselgel 60, tamaño de partícula 0.63–0.200; malla 70-230 mm ASTM, Merk, NJ, EUA.), empleando diversos gradientes de elución. La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV (λ 254 y 356 nm). Los análisis por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLUE-EM) se realizaron en un cromatógrafo Waters equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático, un detector de UV de arreglo de fotodiodos y otro de masas de cuadrupolo simple SQD2, este último con un modo de ionización por la técnica de electrospray. El control del equipo, la adquisición de datos, el

procesamiento y manipulación de información se realizaron utilizando el programa MassLynk® versión 4.0 (Waters). Los análisis se realizaron en una columna Acquity BEH Shield C₁₈ [1.7 µm; 2.1 × 100 mm, 0.3 mL/min] con un gradiente de elución de CH₃CN y H₂O acidificada (0.1 % ácido fórmico). Todos los análisis se realizaron a 40 °C. La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Waters, equipado con una bomba cuaternaria, un detector de arreglo de fotodiodos (PDA), un detector de dispersión de luz evaporativo (ELSD), un inyector automático y un recolector de fracciones. El control del equipo, la adquisición y el procesamiento de datos se realizó utilizando el programa Empower® versión 3.0 (Waters). Los análisis se realizaron en columnas analíticas y/o preparativas Phenomenex® Gemini C₁₈ (5 µm, 4.6 × 250 mm o 21.24 × 250 mm). Como sistema de elución se utilizó una mezcla binaria entre CH₃CN-H₂O acidificada (0.1 % ácido fórmico). Las condiciones de análisis del detector ELSD fueron las siguientes: ganancia 100; gas N₂ 40 psi; temperatura del nebulizador 50 °C y temperatura de tubo 70 °C.

Los análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un detector de masas de tiempo de vuelo LECO (EM-TOF, Agilent Technology) con un voltaje de ionización de 70 eV en una columna capilar DB-5 (0.18 µm; 0.18 mm × 20 m). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: inyector en modo split (20:1) y con un gradiente de temperatura (40 a 260 °C a una velocidad de calentamiento de 4 °C/min, dejándose constante durante 20 min a 260 °C, y finalmente se realizó un incremento hasta 340 °C, durante 20 min). Como gas acarreador se utilizó helio, con un flujo de 1 mL/min. Los compuestos separados se identificaron mediante el análisis comparativo de los espectros de masas registrados con aquellos reportados en la Biblioteca de espectros de masas NIST 98 y la biblioteca del equipo, así como la comparación de los valores de los índices de retención calculados en relación con una serie homóloga de *n*-alcanos C₈-C₂₀ con aquellos reportados en la literatura (Van Den Dool y Kratz, 1963; Adams, 2007).

5.2. Material vegetal

Las partes aéreas de *Salvia amarissima* Ortega (Lamiaceae) se recolectaron en el mes de Enero del 2019, en el municipio de Capulalpam de Méndez, Oaxaca, México. Por otra parte, las partes aéreas de *Salvia microphylla* Kunth se recolectaron en el mes de febrero del 2019, en el municipio de Santiago Suchilquitongo, Etlá, Oaxaca, México. Las muestras de referencia de cada especie [No. de voucher 1502277 (*S. amarissima*) y 1512111 (*S. microphylla*)] fueron depositadas en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM. Al recibir las muestras vegetales se dejaron secar a temperatura ambiente y al aire libre durante de 15 días y al cabo de este tiempo, las plantas se trituraron en un molino de cuchillas Thomas Wiley Modelo 4.

5.3. Estudio químico de la especie de *S. amarissima*

5.3.1. Preparación del extracto acuoso

El extracto acuoso se preparó mediante la técnica de la infusión utilizando 5 g de material vegetal (partes aéreas secas y molidas) y 100 mL de agua destilada en ebullición durante 30 min. Al cabo de este tiempo, el extracto se filtró y se concentró a sequedad utilizando un rotaevaporador (BUCHI R-II-HB) adaptado a una bomba de vacío (BUCHI-V-710). El rendimiento del extracto acuoso total fue de 4.7 % (234 mg de extracto seco). Este proceso se repitió cuantas veces fue necesario para obtener la cantidad adecuada para su posterior purificación y para la realización de los ensayos *in vitro*.

5.3.2. Obtención de las fracciones orgánicas del extracto acuoso

El fraccionamiento del extracto acuoso se llevó a cabo mediante el método de reparto. Por lo cual, se realizó la infusión como se describe en la sección 5.3.1. Inmediatamente después de filtrar la infusión, ésta se colocó en un embudo de separación de 500 mL y se agregaron 50 mL de CH₂Cl₂. El embudo se agitó vigorosamente para mezclarlos y posteriormente se dejó reposar hasta la separación de las dos fases. La fracción orgánica se recuperó en un matraz. Este proceso se realizó en tres ocasiones. Las fracciones orgánicas se combinaron, se filtraron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron al vacío en un rotaevaporador. Posteriormente, la fase acuosa restante se fraccionó mediante reparto utilizando AcOEt (3 × 50 mL), utilizando el método anteriormente descrito.

5.3.3. Fraccionamiento de la fracción de AcOEt

La fracción de AcOEt (100 mg) se sometió a un fraccionamiento primario utilizando una CCA sobre Sephadex LH-20 (400 g) y como fase móvil MeOH. Este proceso generó 20 fracciones primarias (F₁–F₂₀). A partir, de la fracción F₁₆ (73 mg) cristalizaron de manera espontánea 60 mg de un producto identificado como amarisólida (**1**) (Maldonado et al., 1996; Flores-Bocanegra et al., 2017). La fracción F₂₀ (10 mg) se sometió a un fraccionamiento mediante CCF preparativa utilizando MeOH, este proceso permitió el aislamiento y la purificación de 1.2 mg de nuchensin (**50**) (Voirin et al., 1985) y 4.2 mg de 6-hidroxluteolina (**51**) (Feng-Peng et al., 2003).

Amarisólida (**1**). Sólido blanco; pf 205–207 °C; RMN-¹H (400 MHz, CD₃OD) δ_H (ppm): 7.35 (1H, dd, *J*=1.7 Hz, H-15), 7.28 (1H, dd, *J*=1.3 Hz, H-16), 6.76 (1H, d, *J*= 6.3 Hz, H-3), 6.33 (1H, dd, *J*= 1.8, 0.9 Hz, H-14), 4.62 (1H, dt, *J*= 6.4, 2.2 Hz, H-2), 4.46 (1H, d, *J*=7.7 Hz, H-1'), 4.41 (1H, d, *J*= 8.2 Hz, H-19a), 4.02 (1H, dd, *J*= 8.2, 2.0 Hz, H-19b), 3.83 (1H, dd, *J*=11.8, 2.3 Hz, H-6'a), 3.51 (1H, dd, *J*=11.8, 6.6 Hz, H-6'b), 3.33 (1H, d, *J*= 9.0 Hz, H-3'), 3.27 (1H, m, H-5'), 3.14 (2H, m, H-2', H-4'), 2.64 (1H, td, *J*= 13.6, 4.4 Hz, H-12a), 2.47 (1H, d, *J*= 13.4 Hz, H-10), 2.33 (1H, td, *J*= 13.5, 5.0 Hz,

H-12b), 1.86 (1H, m, H-6a), 1.79 (1H, ddd, $J=12.2, 8.9, 4.8$ Hz, H-1a), 1.63 (2H, m, H-7), 1.61 (1H, m, H-8), 1.41 (2H, m, H-11), 1.37 (1H, m, H-1b), 1.30 (1H, m, H-6b), 0.88 (3H, d, $J=6.7$ Hz, H-17), 0.61 (3H, s, H-20); RMN- ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ_{C} (ppm): 170.2 (C-18), 143.3 (C-4), 142.4 (C-15), 138.3 (C-16), 130.3 (C-3), 125.7 (C-13), 110.8 (C-14), 101.9 (C-1'), 76.9 (C-5'), 76.7 (C-3'), 74.1 (C-2'), 71.2 (C-19), 70.5 (C-4'), 69.7 (C-2), 61.6 (C-6'), 45.7 (C-5), 39.6 (C-10), 37.8 (C-8, C-9), 33.5 (C-6), 27.4 (C-7), 26.1 (C-1), 26.0 (C-11), 17.0 (C-12), 16.6 (C-20), 14.5 (C-17); EM-ESI (modo negativo) m/z : 491.23 $[\text{M-H}]^-$.

Nuchensin (**50**). Polvo amorfo amarillo; pf 268–270 °C; RMN- ^1H (700 MHz, CD_3OD) δ_{H} (ppm): 7.59 (1H, dd, $J=8.3, 2.2$ Hz, H-6'), 7.57 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 6.98 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5'), 6.91 (1H, s, H-8), 6.71 (1H, s, H-3), 4.04 (3H, s, 7-OCH₃), 4.02 (3H, s, 3'-OCH₃); RMN- ^{13}C (175 MHz, CD_3OD) δ_{C} (ppm): 182.9 (C-4), 165.1 (C-2), 154.5 (C-7), 150.7 (C-9), 150.6 (C-4'), 148.1 (C-5), 145.8 (C-5'), 130.1 (C-6), 122.4 (C-1'), 120.4 (C-2'), 115.4 (C-3'), 112.6 (C-6'), 105.2 (C-10), 102.5 (C-3), 90.6 (C-8), 55.5 (7-OCH₃), 55.3 (3'-OCH₃); EM-ESI (modo negativo) m/z : 329.43 $[\text{M-H}]^-$.

6-hidroxiluteolina (**51**). Polvo amorfo amarillo; pf 283–285 °C; RMN- ^1H (700 MHz, CD_3OD) δ_{H} (ppm): 7.42 (1H, dd, $J=8.4, 2.3$ Hz, H-6'), 7.40 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.83 (1H, s, H-3), 6.58 (1H, s, H-8); RMN- ^{13}C (175 MHz, CD_3OD) δ_{C} (ppm): 183.9 (C-4), 166.8 (C-2), 155.3 (C-9), 151.5 (C-7, C-4'), 147.7 (C-5), 146.9 (C-3'), 131.2 (C-6), 121.6 (C-1'), 120.1 (C-6'), 116.6 (C-5'), 113.0 (C-2'), 106.1 (C-10), 102.6 (C-3), 91.5 (C-8).

5.3.4. Fraccionamiento del extracto acuoso

El extracto acuoso (EA, 4.3 g) se sometió a un fraccionamiento primario, se aplicó sobre una CCA [Sephadex LH-20; gradiente de elución MeOH-H₂O (6:4→1:0)]; este proceso permitió obtener doce conjuntos de fracciones primarias (EA₁–EA₁₂). De la fracción EA₉ (35 mg) cristalizaron de manera espontánea 30 mg de un sólido amarillo identificado como rutina (**52**; pf 241–242 °C) (Georgeta et al., 2016). De la fracción EA₁₁ (15 mg) mediante lavados sucesivos con CH₂Cl₂ y MeOH se logró el aislamiento y purificación de la isoquercitrina (**53**; 5 mg) (Dereli et al., 2020; Lim et al., 2004). La resolución de la fracción primaria EA₆ (220 mg), se realizó mediante un análisis cromatográfico por CCA de Sephadex LH-20 (MeOH), este proceso permitió la obtención de 16 mg del ácido rosmarínico (**54**) (Ly et al., 2006). La separación de los constituyentes presentes en la fracción primaria EA₅ por CCF preparativa [acetato de etilo-metanol (85:15)], permitió la purificación de 1 mg de pedaltina (**13**) (Maldonado et al., 1996; Flores Bocanegra et al., 2017). Finalmente, a partir de la fracción EA₆ (10 mg) mediante CCF preparativa (MeOH), permitió el aislamiento de 4 mg de una mezcla epimerica de la amarisolida G (**55a,b**).

Rutina (**52**). Sólido amarillo; pf 241–242 °C; RMN-¹H (400 MHz, CD₃OD) δ_{H} (ppm): 7.65 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 7.62 (1H, dd, $J=8.4, 2.2$ Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.38 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 6.19 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 5.08 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 4.50 (1H, d, $J=1.7$ Hz, H-1'''), 3.79 (1H, dd, $J=11.0, 1.5$ Hz, H-5''), 3.61 (1H, dd, $J=3.5, 1.7$ Hz, 5'''), 3.35-3.54 (8H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-6'', H-2''', H-3''', H-4'''), 1.11 (3-H, d, $J=6.2$ Hz, 6'''); EM-ESI (modo negativo) m/z : 609.54 [M – H][–].

Isoquercitrina (**53**). Polvo amorfo amarillo; pf 240–242 °C; RMN-¹H (700 MHz, CD₃OD) δ_{H} (ppm): 7.73 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 7.60 (1H, dd, $J=8.4, 2.1$ Hz, H-6'), 6.88 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.35 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.17 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 5.21 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-1''), 3.70 (1H, dd, $J=11.9, 2.4$ Hz, H-6a''), 3.60 (1H, dd, $J=11.8, 5.2$ Hz, H-6b''), 3.50 (1H, dd, $J=9.2, 7.8$ Hz, H-3''), 3.44 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-5''), 3.24 (2H, m, H-2'', H-4''); RMN-¹³C (175 MHz, CD₃OD) δ_{C} (ppm): 177.7 (C-4), 167.4 (C-7), 161.5 (C-5), 157.3 (C-2), 157.3 (C-9), 148.6 (C-4'), 144.6 (C-3'), 134.1 (C-3), 121.7 (C-6'), 121.7 (C-1'), 116.1 (C-2'), 114.6 (C-5'), 103.5 (C-1''), 103.2 (C-10), 99.4 (C-6), 94.0 (C-8), 77.0 (C-5''), 76.8 (C-2''), 74.3 (C-3''), 69.8 (C-4''), 61.1 (C-6''); EM-ESI (modo negativo) m/z : 463.46 [M-H][–].

Ácido rosmarínico (**54**). Sólido amarillo; pf 169–171 °C; IR (FTIR) ν_{max} 3156, 1684, 1580, 1519 cm^{–1}; RMN-¹H (700 MHz, CD₃OD) δ_{H} (ppm): 7.53 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7), 7.05 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, $J=8.2, 2.1$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5), 6.78 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 6.70 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), 6.65 (1H, dd, $J=8.1, 2.0$ Hz, H-6'), 6.29 (1H, d, $J=15.8$ Hz, H-8), 5.10 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-8'), 3.10 (1H, dd, $J=14.3, 3.2$ Hz, H-7a'), 2.95 (1H, dd, $J=14.3, 9.5$ Hz, H-7b'); RMN-¹³C (175 MHz, CD₃OD) δ_{C} (ppm): 177.0 (C-9'), 169.0 (C-9), 149.3 (C-4), 146.6 (C-7), 146.6 (C-3), 145.8 (C-3'), 144.7 (C-4'), 130.8 (C-1'), 127.8 (C-1), 122.8 (C-6), 121.6 (C-6'), 117.4 (C-2'), 116.3 (C-5'), 116.1 (C-5), 115.4 (C-2), 115.0 (C-8), 77.4 (C-8'), 38.5 (C-7'); ESI-MS m/z 359.23 [M-H][–].

Pedalitina (**13**). Polvo amarillo; pf 300–301 °C; t_{R} 2.82 min; ESI-MS m/z 315.48 [M-H][–]. El producto fue identificado por coelución cromatográfica con una muestra de referencia.

Amarisólida G (**55a,b**). Sólido blanco; pf 133–135 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -149 (*c* 1 mg/mL, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 206 (0.612) nm; ECD (MeOH *c* 0.2 mM, 0.1 cm); $\Delta\epsilon$ -5.21 (212 nm), -4.65 (250 nm); IR (FTIR) ν_{max} 3365, 1749 cm^{–1}; RMN-¹H (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} (ppm): 7.75 (1H, brs, 14-OH), 6.66 (1H, d, $J=6.4$ Hz, H-3), 6.05 (1H, brs, H-14a), 5.96 (1H, brs, H-16), 5.90 (1H, brs, H-14b), 4.46 (1H, m, H-2), 4.39 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-19a), 4.31 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-1'), 4.02 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-19b),

3.67 (1H, d, $J=12.4$ Hz, H-6'a), 3.42 (1H, m, H-6'b), 3.13 (2H, m, H-3', H-5'), 2.97 (1H, m, H-4'), 2.96 (1H, m, H-2'), 2.21 (1H, d, $J=15.1$ Hz, H-10), 1.81 (1H, brd, $J=13.7$ Hz, H-1a), 1.72 (1H, td, $J=12.7, 3.3$ Hz, H-6a, H-12a), 1.67 (1H, m, H-8), 1.60 (2H, m, H-11), 1.56 (1H, m, H-12b), 1.54 (2H, m, H-7), 1.35 (1H, dd, 13.6, 3.2 Hz, H-1b), 1.23 (1H, m, H-6b), 0.80 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-17), 0.57 (3H, s, H-20); RMN- ^{13}C (175 MHz, DMSO- d_6) δ_c (ppm): 171.9 (C-15), 171.4 (C-13), 169.2 (C-18), 143.0 (C-4), 131.1 (C-3), 116.1 (C-16), 102.8 (C-1'), 99.9, 99.4 (C-14), 77.4 (C-5'), 77.2 (C-3'), 74.1 (C-2'), 70.9 (C-19), 70.7 (C-4'), 70.0 (C-2), 61.6 (C-6'), 45.4 (C-5), 40.5 (C-10), 37.8 (C-9), 36.2 (C-8), 33.8 (C-12, C-6), 27.6 (C-7, C-11), 26.3 (C-1), 17.7 (C-20), 15.9 (C-17); EM-AR m/z 525.2317 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculada para $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_{11}$, $[\text{M} + \text{H}]^+ = 525.2330$).

5.3.4.1. Hidrólisis enzimática de la amarisólida G (55a,b)

A una solución de 2.0 mg del compuesto **55a,b** en 5 mL de buffer de fosfatos (100 mM, pH 7) se adicionaron 10 mg de la enzima β -glucosidasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). La mezcla resultante se dejó en incubación a una temperatura de 37 °C durante 15 días. Al cabo de este periodo, la mezcla de reacción se sometió a un proceso de reparto con CHCl_3 (3×5 mL), las fracciones acuosas y orgánicas resultantes se concentraron a sequedad y se analizaron por separado mediante un análisis cromatográfico por CCF. Para caracterizar la naturaleza del carbohidrato obtenido se llevó a cabo la determinación del valor de rotación óptica.

5.3.5. Preparación del aceite esencial

La preparación del aceite esencial de la planta (*Salvia amarissima*) se realizó utilizando las partes aéreas fragmentadas fresca y/o seca (200 g) mediante la técnica de la hidrodestilación utilizando 2.0 L de agua destilada durante 3 h. El aceite esencial obtenido se separó del hidrodestilado mediante un proceso de reparto con diclorometano (CH_2Cl_2 ; 3×2 L). Las fracciones orgánicas resultantes se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron *in vacuo*, obteniéndose 0.063 g de un residuo oleoso amarillo a partir del material seco (0.03 %) y 0.040 g a partir del material fresco (0.02 %), que se almacenaron en viales ámbar a -4 °C hasta su análisis por CG-EM.

5.3.6. Análisis de los componentes volátiles por la técnica de microextracción en fase sólida

Para identificar los compuestos volátiles presentes en la droga cruda, se utilizó la técnica de Microextracción en Fase Sólida (MEFS) (Pawliszyn, 1997). Los análisis se realizaron utilizando fibras recubiertas con carboxeno (CAR)/divinilbenceno (DVB)/polidimetilsiloxano (PDMS) de un centímetro de longitud. Brevemente, las fibras se acondicionaron en el puerto de inyección del

cromatógrafo de gases a 250 °C por 2 h, antes de su uso. La extracción se realizó siguiendo la metodología descrita por Ovalle-Magallanes y colaboradores (2014), de la siguiente manera: se introdujeron en un vial con agitación constante la droga cruda (300 mg), cloruro de sodio (7.5 mg), agua destilada (15 mL) y las fibras previamente acondicionadas, durante 15 min a una temperatura de 60 °C. Después de la toma de muestra, la desorción de los analitos se hizo térmicamente en el cromatógrafo de gases utilizando las condiciones de análisis descritas en el inciso 5.1.2 de esta sección experimental. Todos los análisis se realizaron por triplicado y se utilizaron las partes aéreas secas.

5.4. Estudio químico de la especie de *S. microphylla*

5.4.1. Preparación del extracto acuoso y orgánico

La preparación de extracto acuoso de la planta se realizó siguiendo la misma estrategia experimental descrita en el inciso 5.3.1, obteniéndose 195 mg de extracto seco (3.9 %). Este proceso se repitió cuantas veces fue necesario para obtener la cantidad adecuada para su posterior estudio químico y ensayos farmacológicos. Por otra parte, el extracto orgánico se preparó mediante un proceso de reparto utilizando AcOEt de la misma manera como se describe en el inciso 5.3.2 de esta sección experimental.

5.4.2. Fraccionamiento del extracto acuoso

El extracto acuoso (EA, 9.7 g) se sometió a un fraccionamiento primario, mediante una CCA de Sephadex LH-20 utilizando un gradiente de elución con una mezcla MeOH-H₂O (1:1→1:0). Este proceso generó 14 conjuntos de fracciones primarias (F₁–F₁₄). La resolución de la fracción primaria F₁ (43 mg), mediante una CCA de Sephadex LH-20 (MeOH) permitió la obtención de 7 fracciones secundarias (FS₁–FS₇). La fracción FS₇ (10 mg) se fraccionó mediante una CCF preparativa [AcOEt: MeOH (9:1)] permitiendo el aislamiento de 5.5 mg de un sólido amarillo identificado como ziziflavosido B (**56**) (Mostafa et al., 2010).

Ziziflavosido B (56). Sólido amarillo; p.f. 205–206°C; IR (FTIR) ν_{\max} 3268, 2922, 1598, 1444, 1357, 1197, 1063 cm⁻¹; RMN-¹H (700 MHz, CD₃OD) δ_{H} (ppm): 7.86 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'''), 7.74 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2''), 7.60 (2H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6', H-6'''), 6.88 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5', H-5'''), 6.29 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8, H-8''), 6.13 (2H, d, $J = 1.2$ Hz, H-6, H-6''), 5.16 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'''), 5.08 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''''), 3.87 (1H, dd, $J = 3.4, 1.1$ Hz, H-4''''), 3.85 (1H, dd, $J = 9.7, 7.8$ Hz, H-4''''), 3.73 (2H, dd, $J = 11.9, 2.4$ Hz, H-6a''', H-6a''''), 3.66 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, 6b''''), 3.62 (1H, d, $J = 6.1$ Hz, 6b'''), 3.58-3.56 (1H, m, H-5'''), 3.49-3.53 (1H, m, H-5''''), 3.44 (2H, t, $J = 9.0$ Hz, H-3''', H-3''''), 3.24 (2H, m, H-2''', H-2''''); RMN-¹³C (175 MHz, CD₃OD) δ_{C} (ppm): 178.7 (C-4,

C-4"), 170.2 (C-7, C-7"), 162.6 (C-5, C-5"), 158.8 (C-2, C-2"), 158.2 (C-9), 158.0 (C-9"), 150.1 (C-4'), 150.0 (C-4"), 145.9 (C-3'), 145.8 (C-3"), 135.5 (C-3), 135.4 (C-3"), 123.0 (C-6'), 122.9 (C-1'), 122.8 (C-1"), 122.7 (C-6"), 117.5 (C-2"), 117.3 (C-2), 116.0 (C-5'), 115.9 (C-5"), 105.9 (C-1""), 104.8 (C-1""), 104.0 (C-10), 103.9 (C-10"), 101.6 (C-6, C-6"), 95.9 (C-8), 78.2 (C-3""), 78.1 (C-3""), 78.1 (C-2""), 77.0 (C-2""), 75.6 (C-5""), 75.1 (C-5""), 73.1 (C-4""), 69.9 (C-4""), 62.5 (C-6""), 61.8 (C-6"").

Para la resolución de la fracción primaria F₈ (83 mg), se utilizó CCA en Sephadex LH-20 (MeOH). Este proceso permitió la obtención de cinco fracciones secundarias. La fracción FS₁ se purificó por CCA, utilizando una fase normal de gel de sílice (malla 70-230) y utilizando un gradiente de elución de AcOEt-MeOH con incrementos graduales de polaridad. Este proceso permitió el aislamiento de 4 mg de un sólido amarillo identificado como orientina (**57**) (Cuong et al., 2015).

Orientina (57). Sólido amarillo; p.f. 263–265°C; RMN-¹H (700 MHz, CD₃OD) δ_H (ppm): 7.51 (1H, sa, H-2'), 7.47 (1H, sa, H-6'), 6.89 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5'), 6.45 (1H, s, H-3), 6.16 (1H, s, H-6), 5.06 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-1"), 4.19 (1H, sa, 2"), 3.85 (1H, dd, *J* = 12.1, 5.5 Hz, H-6a"), 3.71 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-6b"), 3.70-3.67 (1H, m, H-4"), 3.56 (1H, dd, *J* = 9.0, 3.8 Hz, H-3"), 3.54-3.51 (1H, m, H-5"); RMN-¹³C (175 MHz, CD₃OD) δ_C (ppm): 182.9 (C-4), 165.8 (C-2), 162.0 (C-7, C-5), 158.2 (C-9), 147.3 (C-4', C-3'), 120.4 (C-3), 123.0 (C-1'), 120.4 (C-6'), 116.5 (C-5'), 113.9 (C-2'), 102.6 (C-8, C-10), 102.5 (C-3), 100.5 (C-6), 82.4 (C-5"), 80.3 (C-3"), 75.3 (C-1"), 73.2 (C-4"), 72.6 (C-2"), 61.9 (C-6").

5.4.3. Preparación del aceite esencial

La preparación del aceite esencial de la planta se realizó utilizando las partes aéreas secas y fragmentadas (200 g) mediante la técnica de hidrodestilación como se describe a detalle en el inciso **5.3.5**, obteniéndose 1.46 g de un residuo oleoso amarillo del material seco (0.73 %).

5.4.4. Análisis de microextracción en fase sólida

Los compuestos volátiles presentes en la droga cruda de *S. microphylla* se analizaron utilizando la técnica de MEFS siguiendo la misma metodología descrita en la sección **5.3.6**.

5.5. Ensayos biológicos

5.5.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima α-glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

La evaluación de la actividad inhibitoria sobre la enzima α-glucosidasa de tipo I aislada de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich) se realizó a través de la cuantificación de la cantidad de

p-nitrofenol producido como resultado de la reacción de hidrólisis del sustrato *p*-nitrofenil-β-D-glucósido (*p*-NPG), de acuerdo con la metodología que se resume a continuación:

En una placa de ELISA con 96 pozos (con una capacidad de 250 μL por pozo) se adicionaron entre 0–10 μL de la muestra a evaluar [disuelta en MeOH o en solución amortiguadora de fosfatos] a las concentraciones iniciales de 10,000 ppm (extractos y/o fracciones y/o aceite esencial) y 30 mM (compuestos puros). Posteriormente se adicionaron 20 μL de una disolución que contiene 0.4 U/mL de la enzima en una solución amortiguadora de fosfatos (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 100 mM, pH 7), y cuanto baste para (cbp) de solución amortiguadora de fosfatos para obtener un volumen final de 90 μL por pozo. La placa se incubó a una temperatura de 37 °C durante 10 min, transcurrido este tiempo, se adicionó a cada pozo 10 μL de sustrato (*p*-NPG) e inmediatamente se registró la absorbancia de las muestras a tiempo cero (T₀) utilizando un lector de placas marca BioRad® modelo iMark a 415 nm utilizando el software Microplate Manager® 6; enseguida la placa se incubó por segunda vez a 37 °C durante 20 min. Al concluir el periodo de incubación, finalmente se registró la absorbancia de las muestras al tiempo final (T₂₀). Como control positivo se utilizó a la acarbosa. El cálculo de los porcentajes de inhibición se realizó por comparación con un blanco (ausencia de inhibidor) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \alpha \text{Glucosidasa} = \left(1 - \frac{A_{415t}}{A_{415c}} \right) \times 100$$

En donde %αGlucosidasa es el porcentaje de inhibición de la enzima, A_{415t} es la absorbancia corregida de la muestra evaluada (A_{415t_{final}} – A_{415t_{inicial}}) y A_{415c} es la absorbancia corregida del blanco (A_{415c_{final}} – A_{415c_{inicial}}).

La concentración de inhibidor requerida para inhibir el 50 % de la actividad enzimática (CI₅₀) se calculó mediante un ajuste de regresión no lineal, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{I}{CI_{50}} \right)^s}$$

En donde A₁₀₀ es el porcentaje máximo de inhibición enzimática, *I* es la concentración de inhibidor y *s* es el grado de cooperatividad. El cálculo se llevó a cabo en el software OriginPro® 8.0 (versión 8.0724, Norhampton, MA, EUA).

5.5.2. Evaluación de la actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B humana

5.5.2.1. Expresión y purificación de la enzima hPTP-1B

La enzima recombinante hPTP-1B fue expresada a partir del gen PTPN1 (proteína tirosina fosfatasa no-receptor tipo 1 de *Homo sapiens*, gene ID:5770). El gen fue optimizado para la sobreexpresión en *E. coli* y fue subclonado en el vector pET28 para obtener el sistema pET28-PTPN1 de GenScript (Piscataway, NJ, EUA). El sistema de sobreexpresión fue transformado en células de *E. coli* BL21 (DE3) con resistencia al antibiótico kanamicina y se indujo la expresión con 1 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 8 h. Posteriormente, se purificó la enzima utilizando cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados en una columna HisTrap[®] Excel (GE Health Care, Chicago, IL, EUA), obteniendo un rendimiento de 90 mg de enzima por litro con pureza del 98% (Puius et al., 1997). Esta actividad la realizó el Dr. Martín González Andrade de la Facultad de Medicina de la UNAM.

5.5.2.2. Ensayo de inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B

La evaluación de la actividad inhibitoria del preparado tradicional, aceite esencial, fracciones y los compuestos puros aislados se llevaron a cabo sobre la enzima recombinante PTP-1B. Las muestras se disolvieron en MeOH, DMSO o en una solución amortiguadora de Tris (Tris, 20 mM, pH 6.7). Como control positivo se utilizó al triterpeno ácido ursólico utilizando una solución de trabajo de 1 mM, disuelta en una mezcla de solución amortiguadora de Tris y DMSO. Se utilizó *p*-nitrofenolfosfato (*p*-NPP; 5 mM) disuelto en Tris como sustrato. Todas las evaluaciones se llevaron a cabo en placas de 96 pozos y se realizaron por triplicado. Las lecturas se llevaron a cabo a 415 nm en un espectrofotómetro BioRad[®] modelo iMark utilizando el software Microplate Manager[®] 6. Se vierten 20 μ L de la solución de trabajo de la enzima en Tris (22 nM), el volumen (0-10 μ L) de inhibidor correspondiente a la concentración a evaluar y se completa el volumen a 90 μ L con solución amortiguadora de Tris y se incubó durante 5 min a 25 °C. Al término de este periodo de incubación, se adicionaron a cada pozo 10 μ L del sustrato *p*-NPP, enseguida se determinaron las absorbancias de las muestras a tiempo cero (T_0). Inmediatamente, se incubó por segunda vez la placa a 25 °C durante 15 min para obtener el T_{15} . El ensayo se basa en la cuantificación de la cantidad de *p*-nitrofenol liberado al medio, el cual es directamente proporcional a la cantidad de sustrato hidrolizado por la enzima.

Después del periodo de incubación, se leyeron las absorbancias, el cálculo de los porcentajes de inhibición se obtuvo por comparación con un blanco (ausencia de inhibidor) de acuerdo con la ecuación:

$$\%PTP1B = \left(1 - \frac{A_{415t}}{A_{415c}}\right) \times 100$$

En donde %PTP1B es el porcentaje de inhibición, A_{415t} es la absorbancia corregida del preparado tradicional, aceite esencial, fracciones y compuestos ($A_{415t_{final}} - A_{415t_{inicial}}$) y A_{415c} es la absorbancia del blanco corregida ($A_{415c_{blanco\ final}} - A_{415c_{blanco\ inicial}}$).

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

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{I}{CI_{50}}\right)^s}$$

En donde A_{100} es el porcentaje máximo de inhibición enzimática, I es la concentración de inhibidor y s es el grado de cooperatividad. Los valores de CI_{50} se calcularon a partir del ajuste de las curvas obtenidas al graficar el porcentaje de inhibición contra la concentración, utilizando un análisis de regresión no lineal con la ecuación de Hill en el programa OriginPro® 8.0 (versión 8.0724, Norhampton, MA, EUA).

5.5.3. Estudios farmacológicos *in vivo*

Para la experimentación en animales se utilizaron ratones macho de la cepa CD1, con edad de 3 a 4 semanas (28–36 g). Los animales de experimentación se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, con temperatura controlada (22 ± 1 °C), ciclo de luz y oscuridad de 12/12 h, con acceso a alimento estándar y agua simple *ad libitum*, con humedad relativa (70–80%). Todos los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manipulación de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), con los lineamientos internacionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

5.5.3.1. Preparación y administración de muestras

Todas las muestras se prepararon en suspensión utilizando como vehículo una solución salina isotónica (NaCl 0.9 %, SSI) con Tween 80 (0.05 %). La administración de todos los tratamientos se realizó vía oral (*p.o.*) mediante sondas intragástricas (0.2 mL/10 g de peso de animal). En la evaluación del potencial antinociceptivo, la solución de formalina (2 %) se administró vía subcutánea (*s.c.*) en el dorso de la extremidad posterior derecha del animal (30 µL por pata).

5.5.3.2. Evaluación del potencial antinociceptivo mediante el modelo de formalina

Los animales de experimentación previo a la realización del experimento fueron acondicionados colocándolos individualmente dentro de cilindros de acrílico (20 cm de diámetro × 40 cm de altura), a temperatura constante de 25 °C, durante 30 min. Enseguida los animales de experimentación fueron divididos en cinco grupos ($n = 8$); tres de ellos fueron administrados por vía oral (*p.o.*) con los diferentes tratamientos a las dosis de 31.6, 100 y 316.2 mg/kg, en un volumen de 0.2 mL/10 g de peso corporal; uno más fue administrado con el vehículo [SSI y Tween 80 (0.05 %)]; y el último con el control positivo diclofenaco (DIC) a la dosis de 50 mg/kg y como agente nociceptivo se empleó una solución de formalina al 2 %. Posteriormente, a los 30 min de la administración de todos los tratamientos se administraron 30 μ L *s.c.* de la solución del agente algésico en el dorso de la extremidad posterior derecha de todos los animales tratados. La respuesta bifásica inducida por la formalina (lamer la pata administrada), se cuantificó en intervalos de 5 min durante 30 min (Tjolsen et al., 1992; Yang et al., 2012; Barrot, 2012), utilizando espejos de 40 × 40 cm por detrás de los cilindros de acrílico para facilitar la observación. Al término del experimento, todos los animales se sacrificaron y se calculó el área bajo la curva (ABC) del curso temporal para la fase 1 y 2, así como el ABC total.

5.5.3.3. Análisis estadísticos

Todos los datos están expresados como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM). La estimación de la diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos se calculó mediante un análisis de varianza (ANADEVA) de dos vías seguido de un análisis *post hoc* de Bonferroni; o alternativamente mediante una ANADEVA de una vía seguido de un análisis *post hoc* de Dunnett comparando con el grupo vehículo. El porcentaje de efecto antinociceptivo fue calculado a partir de los diferentes tratamientos en relación ABC del vehículo. Para realizar estos cálculos se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 6.0, GraphPad Inc., EUA).

5.6. Estudios *in silico*

5.6.1. Cálculos teóricos de dicroísmo circular

Para establecer la configuración absoluta de los centros estereogénicos presentes en el diterpeno **55a,b**, se realizó un análisis comparativo de los espectros de dicroísmo circular experimental y teórico. Para llevar a cabo el cálculo del espectro teórico, se consideró la configuración relativa previamente establecida mediante RMN, utilizando las estructuras propuestas para los dos posibles enantiómeros, el *neo*- y *ent*-neoclerodano.

Las estructuras de las moléculas propuestas fueron construidas y minimizadas utilizando el programa Spartan'02 (Wavefunction Inc., Irvine, CA, EUA). La búsqueda conformacional se llevó a cabo utilizando el método Monte Carlo con el campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94 (Merck Molecular Force Field 94) y las estructuras de mínima energía obtenidas se revisaron cuidadosamente para eliminar los duplicados (Morris et al., 2009). Posteriormente, los conformeros obtenidos se optimizaron geoméricamente utilizando la interface GaussView 5.0 y el programa Gaussian 09 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA), utilizando la teoría de funcionales de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés Density Functional Theory) empleando el nivel de teoría B3LYP/6-311G+(2d,p). Los conformeros con valores de energía en el intervalo 0–5 kcalmol⁻¹ se utilizaron para el cálculo del espectro de dicroísmo. La población conformacional se expresa en términos de fracción molar. La predicción de los espectros se realizó utilizando la teoría de los funcionales de la densidad tiempo-dependiente (TD-DFT) con un nivel de teoría de B3LYP/6-31G+(d) y CPCM (Conductor-Like Continuum Solvent Model) como modelo de solvatación. Posteriormente, los espectros de dicroísmo circular se calcularon a partir de las fuerzas de rotación dipolares (R_{velocity}) y de las energías de excitación (nm) de los conformeros seleccionados. Una vez obtenidos los espectros teóricos, se compararon con los espectros experimentales. El grado de concordancia entre los resultados obtenidos se realizó mediante la inspección visual para establecer la similitud entre los espectros.

5.6.2. Estudios de acoplamiento molecular

Las estructuras de la α -glucosidasa de *S. cerevisiae* y de la PTP-1B humana (sitio activo y alostérico) fueron obtenidas del “Protein Data Bank” con los códigos 3A4A (1.6 Å de resolución), 1G7F (con resolución de 1.8 Å) y 1T49 (1.9 Å), respectivamente. Las estructuras cristalográficas de las enzimas utilizadas se seleccionaron considerando la resolución y la presencia de ligandos cocrystalizados en los sitios de interés. Las estructuras de los compuestos fueron construidas y minimizadas utilizando el programa Spartan'10 (Wavefunction Inc., Irvine, CA, EUA). La búsqueda conformacional se llevó a cabo utilizando un protocolo Monte Carlo con el campo de fuerza molecular de Merck (MMFF94, por sus siglas en inglés Merck Molecular Force Field 94). Las proteínas y los ligandos para los estudios de acoplamiento fueron preparados utilizando el programa AutoDock Tools package v1.5.4 (ADT, <http://mgltools.scripps.edu/>). A las proteínas se agregaron los hidrógenos polares y las cargas de Kollman, se eliminaron las moléculas de agua y los parámetros de solvatación fueron los predeterminados. Posteriormente, los ligandos se prepararon mediante la adición de cargas atómicas de Gasteiger-Marsilli y de los hidrógenos polares mediante el programa AutoDock 4.2 (AutoDockTool 1.4.5). Primero se realizó un estudio de acoplamiento ciego para establecer el sitio probable de interacción de los metabolitos con las enzimas de estudio, utilizando el programa

AutoDock Vina versión 2.0 (Trott y Olson, 2010). El espacio de búsqueda para este estudio preliminar se definió con un tamaño de caja de $100 \times 120 \times 110 \text{ \AA}$, $55 \times 50 \times 50 \text{ \AA}$ y $70 \times 50 \times 50 \text{ \AA}$ en las dimensiones x , y y z , centrada en las macromoléculas 3A4A, 1G7F y 1T49, respectivamente. El estudio se llevó a cabo utilizando los parámetros preestablecidos en el programa. Posteriormente, se seleccionó la conformación de menor energía y a partir de ella se realizó un nuevo estudio de acoplamiento molecular ahora con una caja más pequeña $30 \times 25 \times 25 \text{ \AA}$ en los ejes x , y y z (3A4A), $25 \times 20 \times 20 \text{ \AA}$ (1G7F) y $20 \times 20 \times 20 \text{ \AA}$ (1T49) y centrada en el ligando. Se validaron los resultados obtenidos mediante el cálculo del RMSD (Desviación de la raíz cuadrática media, por sus siglas en inglés) entre moléculas cocrystalizadas de la α -glucosidasa (sitio catalítico) y la PTP-1B (sitio catalítico y alostérico), respectivamente, con los resultados obtenidos del acoplamiento molecular para dichas moléculas. Un valor de $\text{RMSD} < 2 \text{ \AA}$ indica que el modelo propuesto es acertado. Los resultados de las interacciones en los sitios predichos de unión se representaron en 2D y 3D utilizando los programas Biovia Discovery Studio Visualizer (Disponible en: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) y PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System v1.7.4, Schrödinger, New York, NY, EUA) (DeLano, 2004; Seeliger y De Groot, 2010).

5.6.3. Simulación de la dinámica molecular

Los estudios de dinámica molecular (DM) se realizaron utilizando el programa AMBER, un software que permite que todos los átomos de un sistema vibren y se trasladen por un periodo de tiempo, integrando las ecuaciones de movimiento de Newton, bajo un campo potencial empírico que aproxima las energías de los sistemas moleculares representando los átomos como esferas cargadas y los enlaces como resortes con propiedades especiales. Los sistemas se parametrizaron para predecir propiedades energéticas y estadísticas de los mismos, a la vez que aportan información sobre la conformación y estabilidad de estos en solución; en nuestro caso, de la interacción PTP-1B-ligando.

A partir de los resultados del estudio de acoplamiento molecular, se seleccionaron los complejos enzima-ligando de menor energía y se procesaron en la plataforma Antechamber para generar las topologías adecuadas para el módulo Leap de AMBER. Cada estructura y complejo se sometió al siguiente protocolo: se adicionaron todos los hidrógenos de los aminoácidos y otros átomos faltantes usando el módulo LeAP con el parámetro `leaprc.protein.ff19SB`, se neutralizó el sistema con Na^+ o Cl^- , posteriormente el complejo se solató en una caja octaédrica de moléculas de agua con el modelo explícito TIP3P localizada a 12 \AA a partir de la superficie de la proteína.

Las simulaciones se realizaron a 1 atm, 315 K mantenidos con el método de termostato y baróstato de Berendsen, utilizando condiciones de contorno periódicas y sumas de Ewald de malla de partículas (espaciado de grid de 1 Å) para tratar interacciones electrostáticas de largo alcance con un límite de 10 Å y calcular interacciones directas. El algoritmo SHAKE se utilizó para satisfacer las restricciones de enlace, lo que permite el empleo de un paso de tiempo de dos fs para la integración de las ecuaciones de Newton como se recomienda en el programa AMBER (Case et al., 2016; Walker et al., 2007). La simulación de DM consistió en una etapa de minimización de la estructura inicial, seguido de 50 ps para equilibrar la temperatura y la presión a 315 K y 1 atm, respectivamente. Finalmente, el sistema se equilibra con 500 ps antes de comenzar la producción de la DM. La producción de la DM consistió en 100 ns por cada complejo. Los fotogramas se guardaron a intervalos de diez ps para análisis posteriores. Todos los análisis se realizaron utilizando CPPTRA (Roe y Cheatham, 2013) parte de AMBER. Se monitoreó la energía total del sistema durante la simulación, se calculó el desplazamiento cuadrático medio de la raíz ponderada (RMSD) y las fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) de la masa de los átomos del sistema y se calcularon las energías libres de unión mediante mecánica molecular. Los resultados fueron analizados con VMD y PyMOL (DeLano, 2004).

5.7. Pruebas de identidad y composición

5.7.1. Desarrollo del método analítico de la fracción AcOEt de *S. amarissima*

Los análisis cromatográficos cuantitativos de la fracción de AcOEt de la infusión de *S. amarissima* se realizaron mediante la técnica de CLUE-EM en una columna Acquity BEH Shield C₁₈ (1.7 µm, 2.1 × 100 mm, 0.3 mL/min) a una temperatura de 40 °C. La elución se realizó con CH₃CN-H₂O, ambas fases acidificadas con ácido fórmico (0.1 %) en un gradiente de elución, comenzando con una proporción 5:95 e incrementando gradualmente la polaridad hasta llegar a 100 % de CH₃CN en 12 minutos. La longitud de onda (λ) utilizada para la detección fue 270 nm. El detector de masas tipo cuadropolo simple SQD2 fue ajustado para el registro de datos de 100 hasta 1000 *m/z*. El voltaje de ionización en los modos positivo y negativo fue de 3.0 y 2.5 kV, respectivamente. El metabolito mayoritario de la fracción de AcOEt, la amarisólida (**1**), en estas condiciones de análisis se observó en un tiempo de retención (*t_R*) de 4.89 minutos.

5.7.1.1. Preparación de la matriz de trabajo

La matriz de trabajo (50 mg/mL) se disolvió en una mezcla dioxano-MeOH (*v/v*, 1:1). Antes de inyectar la solución resultante en el cromatógrafo se filtró a través de membranas de nylon Acrodisc® 0.20 µm.

5.7.1.2. Validación del método analítico para la cuantificación de amarisólida (1)

La validación del método analítico descrito anteriormente se realizó de acuerdo con los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos de la International Conference on Harmonisation [ICH; Q2 (R1) 2005].

5.7.1.3. Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó construyendo tres diferentes curvas de calibración (concentración vs absorbancia) de acuerdo con el siguiente procedimiento: 10.0 mg de la referencia [amarisólida (1)] se disolvieron en 10 mL de dioxano-MeOH (1:1) (1.0 mg/mL). A partir de la solución anterior, se prepararon las diluciones necesarias para que 1 mL de esta contengan entre 5-100 µg de la referencia 1. El área bajo la curva (ABC) correspondiente al pico de la referencia a cuantificar, se graficó con respecto a la concentración de la referencia (1) en cada solución. El cálculo de la ordenada al origen (β_0), pendiente de la recta (β_1), coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de correlación (R), se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios: $\beta_0 = 0$; $\beta_1 \neq 0$; $R \geq 0.99$; $R^2 \geq 0.98$. Las muestras se analizaron por triplicado.

$$LD = \frac{(3.3) (S_{y/x})}{b_1} \quad LC = \frac{(10) (S_{y/x})}{b_1}$$

5.7.1.4. Exactitud

La evaluación de la exactitud del método se realizó mediante la adición de tres diferentes concentraciones del compuesto 1 (10, 50, 75 µg/mL) a la matriz de trabajo. Se evaluaron tres réplicas por concentración para así obtener los valores correspondientes del ABC.

Finalmente, se calculó para cada nivel el promedio aritmético (\bar{x}) y el coeficiente de variación (CV). El método analítico es exacto si los porcentajes de recobro se encuentran en un rango entre 98-102% y el coeficiente de variación no es mayor del 2% [ICH; Q2 (R1) 2005].

Por otro lado, para establecer la exactitud del método se calculó el porcentaje de recobro para cada muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$\%Recobro = \frac{Cantidad\ recuperada}{Cantidad\ adicionada} \times 100$$

5.7.1.5. Precisión del sistema

La precisión del sistema (repetibilidad) se estableció mediante el análisis de seis réplicas de una solución de referencia del compuesto **1**. Por otra parte, la precisión del método (precisión intermedia) se evaluó mediante el análisis de seis réplicas de la amarisólida (**1**) a la concentración de 50 µg/mL. El análisis se efectuó en dos días diferentes por dos analistas distintos. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se realizaron mediante un ANADEVa utilizando el estadístico de Fischer (F) y se expresan en términos del CV. El criterio de aceptación establece que para que un método sea preciso el CV no debe ser mayor al 2.0% [ICH; Q2 (R1) 2005].

5.7.1.6. Límite de cuantificación y límite de detección

La evaluación de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se realizó mediante la construcción de una curva de calibración con una serie de diluciones a partir de una solución estándar con una concentración de 0.01 mg/mL del compuesto **1**. Se evaluaron tres réplicas por concentración y el área bajo la curva del pico (ABC) correspondiente al pico de la referencia de cada réplica se graficó con respecto a la concentración de la referencia de cada solución. Para el cálculo β_0 , β_1 , R^2 y R, se realizó un análisis de regresión lineal simple. Así, los LD y LC fueron determinados de acuerdo con las expresiones matemáticas que se indican a continuación.

5.7.1.7. Cuantificación de amarisólida (1)

Diez miligramos de la muestra a analizar disueltos en 10 mL de la mezcla dioxano-MeOH (1:1) se filtraron a través de membranas de nylon Acrodisc® de 0.20 µm. La amarisólida (**1**) presente en cada muestra se cuantificó registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones analíticas indicadas en el inciso **5.7.1**.

5.8. Predicción de las propiedades moleculares de los productos aislados (predicción de la similitud con fármacos)

A los compuestos (**1**, **13**, **50-57**, **95-97** y **104-106**) se calcularon los parámetros fisicoquímicos y biofarmacéuticos a partir de plataformas computacionales como SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>), Osiris Property Explorer (http://www.cheminfo.org/Chemistry/Cheminformatics/Property_explorer/index.html) y el programa OSIRIS Data Warrior disponible gratuitamente en <http://www.openmolecules.org/>; los cuales, nos permiten estimar la similitud de una molécula a un fármaco (Daina et al., 2017; Rashid, 2020).

5.9. Predicción de la toxicidad *in silico*

El proceso de predicción se basa en el cálculo de un conjunto de fragmentos estructurales que dan lugar a alertas de toxicidad en la molécula. Con los servidores SwissADME, admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/predict/>), preADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/adme-prediction/>), OSIRIS DataWarrior y XenoSite (<http://swami.wustl.edu/xenosite>); se procedió a determinar los posibles riesgos de toxicidad (órganos, genómica y riesgos ecológicos) de los compuestos (**1**, **13**, **50-51** y **97**) con mayor puntuación de ser un fármaco (Sander et al., 2015; Cheng et al., 2012; Daina et al., 2017; Kovacevic et al., 2014; Matlock et al., 2015).

5.10. Tendencias farmacocinéticas de los metabolitos aislados

Los productos (**1** y **97**) con mayor probabilidad de ser un fármaco y no tener propiedades toxicológicas, se determinó la absorción GI, la habilidad de penetrar la BHE, la probabilidad de ser sustrato de la glicoproteína-P (gp-P), la biodisponibilidad, la capacidad de ser sustrato o de inhibir una de las cinco isoformas principales del CYP450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4), la predicción de unión a proteínas plasmáticas y la fracción de fármaco excretada sin cambios en la orina (f_e). Fueron obtenidos usando las plataformas SwissADME, admetSAR, preADMET, GLORYx (<https://nerdd.zbh.uni-hamburg.de/gloryx/>), Way2Drug (<https://way2drug.com/SOMP/>), XenoSite, SMARTCyp (https://smarcyp.sund.ku.dk/mol_to_som) y Renal-ex Predictor (https://adme.nibiohn.go.jp/renal_ex) (Cheng et al., 2012; Daina et al., 2017; Kovacevic et al., 2014; Rydberg et al., 2010; Watanabe et al., 2019; Matlock et al., 2015).

5.11. Posibles actividades biológicas de los compuestos aislados relacionados en la terapia de la DMT-2 y el dolor

Se verificó la bioactividad de los compuestos (**1** y **97**) mediante el cálculo de la actividad en diferentes blancos terapéuticos, como ligando de receptor acoplado a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés), modulador de canal iónico, inhibidor de cinasa, ligando de receptor nuclear, inhibidor de proteasa e inhibidor enzimático y, se calculó con la ayuda de las bases de datos Molinspiration y Swiss TargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>). Además, con la plataforma Swiss TargetPrediction se puede estimar la probabilidad de interacción de una molécula pequeña con un blanco macromolecular en particular. En la base de datos Molinspiration, una molécula que tiene una puntuación de bioactividad superior a 0.00 tiene más probabilidades de exhibir actividades biológicas considerables. Cuando los valores se encuentran entre -0.50 a 0.00 son moderadamente activos y si la puntuación es inferior a -0.50, la molécula no presenta actividad biológica. Con la plataforma Swiss TargetPrediction el valor de probabilidad indica la posibilidad que tiene una molécula para que sea

bioactiva en una proteína en particular, siendo 1.0 el valor de 100 % de probabilidad (Rashid, 2020; Gfeller et al., 2013; Daina et al., 2019). Con la ayuda del servidor PASS online (www.way2drug.com/PASSOnline/predict.php) se evaluó el potencial biológico de las moléculas orgánicas similares a un fármaco. Nos indica la probabilidad de actividad (Pa) de un compuesto estudiado (Eleftheriou et al., 2012).

5.12.Simulación de la obtención de un compuesto líder

Con la ayuda del servidor SwissADME se diseñaron compuestos líderes, a partir de los productos **1** y **97**, realizando modificaciones en el peso molecular y en la lipofilidad de la molécula. Por último, se efectuaron estudios de acoplamiento molecular de las moléculas diseñadas, sobre el sitio catalítico de la proteína de interés (Daina et al., 2017; Rishton, 2003; Rishton, 2008; Mignani et al., 2018; Leeson y Springthorpe, 2007; Nadin et al., 2012).

6. Resultados y discusión

Los resultados del presente trabajo se discutirán en dos secciones principales. En la primera, se presentan los resultados del estudio químico y evaluaciones biológicas *in vitro* de la especie *Salvia amarissima* y, en la segunda, los concernientes a la investigación química, evaluaciones *in vitro* y farmacológicos de *Salvia microphylla*.

6.1. Estudio químico y farmacológico de la especie *S. amarissima*

6.1.1. Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios

La infusión de las partes aéreas de *Salvia amarissima* se emplea como agua de uso en la medicina tradicional para el alivio de la diabetes, entre otros padecimientos. Con la finalidad de establecer la composición química e identificar los metabolitos activos, se realizó el estudio químico del preparado tradicional. Mediante la aplicación de diversas técnicas cromatográficas fue posible aislar la amarisólida (**1**) y la amarisólida G (mezcla epimérica) (**55a,b**), los cuales son glucósidos de diterpenoides de tipo *neo*-clerodano, el ácido rosmarínico (**54**) y las flavonas nuchensin (**50**), 6-hidroxiluteolina (**51**), rutina (**52**), isoquercitrina (**53**) y pedalitina (**13**); las estructuras de estos metabolitos se ilustran en la Figura 26.

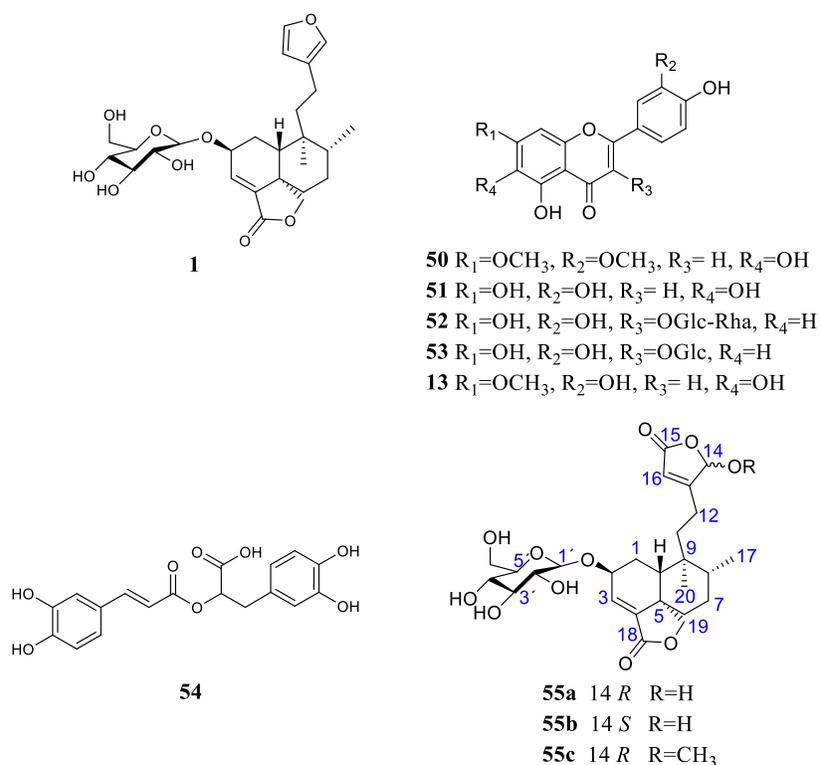


Fig 26. Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas de *S. amarissima*.

Los productos previamente descritos en la literatura (**1**, **13**, **50–54**), se caracterizaron por comparación de sus datos espectroscópicos (RMN) y espectrométricos (ESI-EM), con los reportados en la literatura especializada. Es importante mencionar que las flavonas **50–53** y el ácido rosmarínico (**54**) se describen por primera vez en la especie *Salvia amarissima*. El compuesto **55a,b** es una entidad química nueva. A continuación, se describe su elucidación estructural.

El producto **55a,b** se obtuvo como sólido blanco ópticamente activo. Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas mediante ionización por electroespray de alta resolución como $C_{26}H_{36}O_{11}$. En los espectros de IR y UV se observó una banda atribuible a grupos hidroxilo (3365 cm^{-1}) y a una γ -lactona- α,β -insaturada (IR 1749 cm^{-1} ; UV λ_{max} 206 nm) (Wu et al., 2014; Flores-Bocanegra et al., 2017). El espectro de RMN del compuesto **55a,b** fue muy similar al de la amarisólida D (**55c**), un diterpenoide de tipo *neo*-clerodano con una γ -lactona- α,β -insaturada en C-4/C-5, un éter metílico de un γ -lactol y una unidad de β -D-glucopiranososa unida al C-2 (Flores-Bocanegra et al., 2017). Así, en el compuesto **55a,b** las señales para el anillo del éter metílico del lactol fueron remplazadas por las del lactol. En consecuencia, el espectro de RMN mostró señales en $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5.90, 6.05 (brs) (H-14)/99.4, 99.9 (C-14), 5.96 (brs) (H-16)/116.1 (C-16) y, en δ_{C} 171.4 (C-13) y 171.9 (C-15) (Tabla 1). La señal para H-14 aparece duplicada en el espectro de ^1H -RMN indicando que **55a,b** es una mezcla de epímeros (Fig. 27). La señal del C-14 aparece también duplicada en el espectro de ^{13}C -RMN (Tabla 1) (Fig. 28). El punto de unión del fragmento etilo (C-11-C-12) al lactol en el compuesto **55a,b** se estableció con base en los desplazamientos químicos observados en el espectro de ^{13}C -RMN para los carbonos del anillo, y los desplazamientos de C-11 (δ_{C} 27.6), C-12 (δ_{C} 33.8), C-13 (δ_{C} 171.4), C-14 (δ_{C} 99.4, 99.9), C-15 (δ_{C} 171.9) y C-16 (δ_{C} 116.1). Las correlaciones observadas en el espectro HMBC para H-12a (δ_{H} 1.72) \rightarrow C-14 (99.4 y 99.9); H-12b (δ_{H} 1.56) \rightarrow C-14 (δ_{C} 99.4 y 99.9); y H-14 (δ_{H} 5.90, 6.05) \rightarrow C-12 (δ_{C} 33.8) son congruentes con el punto de unión que se indica en la estructura correspondiente. La configuración relativa de los centros estereogénicos C-2, C-5, C-8, C-9 y C-10, para el compuesto **55a,b**; se estableció mediante el análisis del espectro de NOESY. Las interacciones más importantes demostraron que la configuración de los centros estereogénicos en el producto natural **55a,b** es la misma que la descrita para las amarisólidas (A–D) (Flores-Bocanegra et al., 2017). Además, el espectro de dicroísmo circular electrónico (DCE) de **55a,b** fue similar al de todas las amarisólidas (Fig. 29). Esto permite proponer que la configuración absoluta en los centros estereogénicos C-2, C-5, C-8, C-9 y C-10 como *2S,5S,8R,9R,10R*.

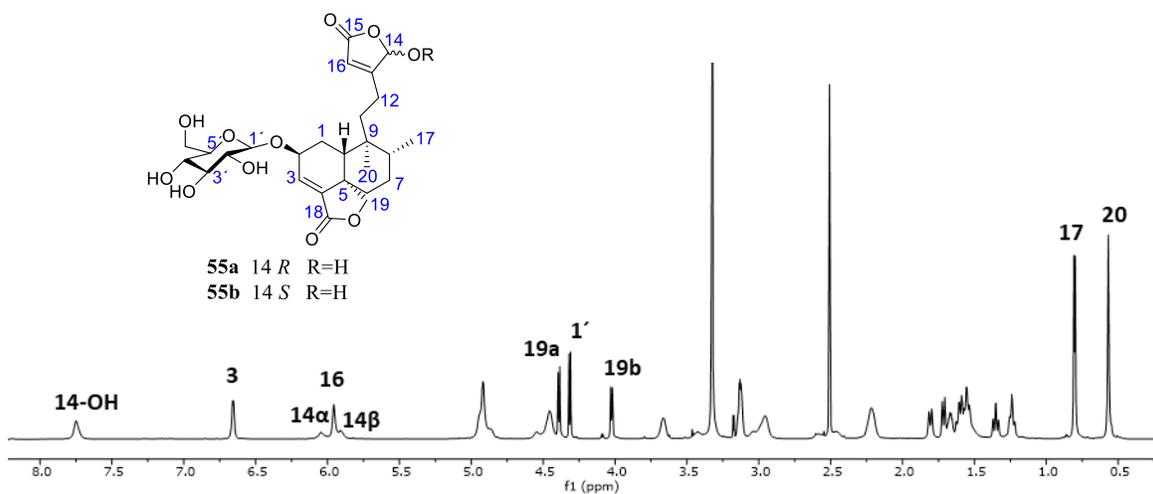


Fig. 27. Espectro de RMN- ^1H (700 MHz) de la amarisolida G (**55a,b**) en DMSO- d_6 .

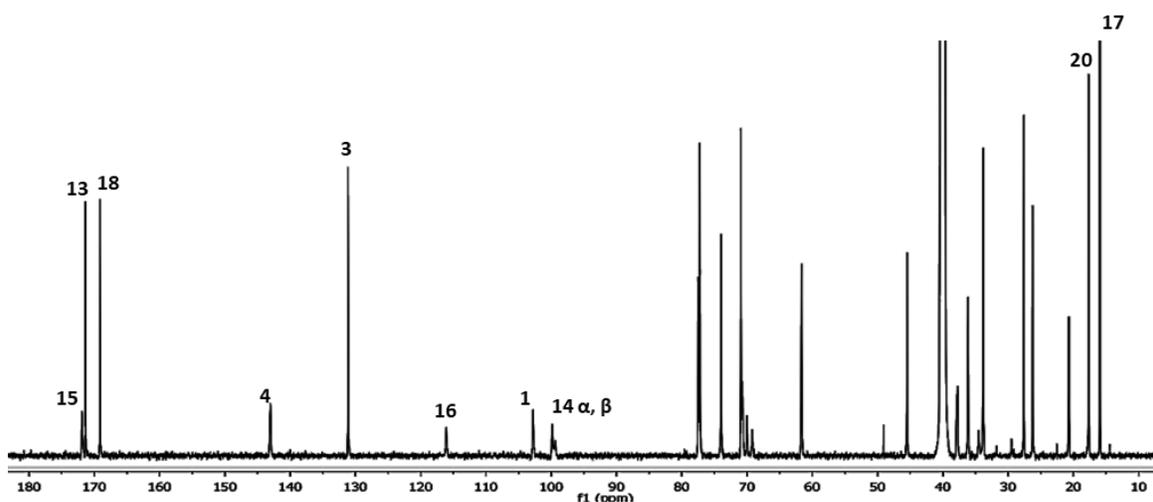


Fig. 28. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz) de la amarisolida G (**55a,b**) en DMSO- d_6 .

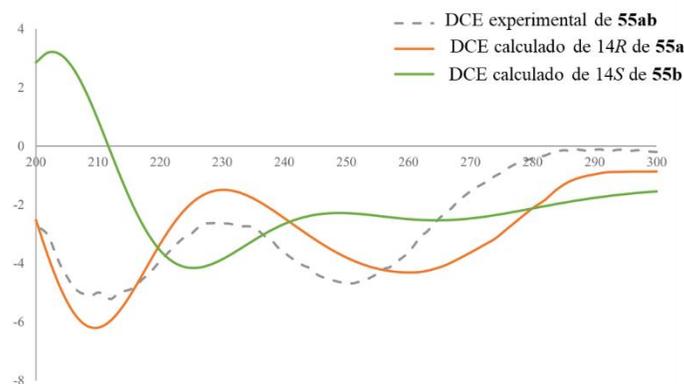


Fig. 29. Comparación del espectro de DC de la amarisolida G (**55a,b**).

Tabla 1. Datos de RMN-¹H y ¹³C de las amarisólidas D **55c** (500/125 MHz, DMSO-*d*₆) y G **55a,b** (700/175 MHz, DMSO-*d*₆).

No.	Amarisólida D		Amarisólida G	
	^a δ _H (J in Hz)	^a δ _C	^a δ _H (J in Hz)	^a δ _C
1a	1.76 (ddd,13.8, 12.0, 12.0)	26.8	1.81 (brd,13.7)	26.3
1b	1.34 (m)		1.35 (dd,13.6, 3.2)	
2	4.47 (m)	69.1	4.46 (m)	70.0
3	6.67 (d, 6.3)	131.0	6.66 (d,6.4)	131.1
4		143.2		143.0
5		45.6		45.4
6a	1.67 (m)	33.7	1.72 (td,12.7,3.3)	33.8
6b	1.25 (m)		1.23 (m)	
7	1.54 (m)	26.2	1.54 (m)	27.6
8	1.67 (m)	35.9	1.67 (m)	36.2
9		37.7		37.8
10	2.25 (d,12.9)	39.5	2.21 (d,15.1)	40.5
11	1.54 (m)	27.6	1.60 (m)	27.6
12a	2.09 (m)	33.9	1.72 (td,12.7,3.3)	33.8
12b	1.56 (m)		1.56 (m)	
13		170.0		171.4
14	5.91 (d,0.8)	104.7	5.90 (brs, α-isómero) 6.05 (brs, β-isómero)	99.4 99.9
15		171.0		171.9
16	6.04 (t,0.7)	117.2	5.96 (brs)	116.1
17	0.80 (d, 6.4)	15.9	0.80 (d,6.5)	15.9
18		169.2		169.2
19a	4.38 (d, 8.3)	70.9	4.39 (d,8.2)	70.9
19b	4.02 (d, 8.2)		4.02 (d,8.2)	
20	0.56 (s)	17.6	0.57 (s)	17.7
1'	4.30 (d,7.7)	102.0	4.31 (d,7.7)	102.8
2'	2.97 (dd,8.0)	74.0	2.96 (m)	74.1
3'	3.11 (dd, 8.0)	77.2	3.13 (m)	77.2
4'	2.98 (dd,8.0)	70.7	2.97 (m)	70.7
5'	3.11 (m)	77.4	3.13 (m)	77.4
6'a	3.67 (dd,11.6, 2.5)	61.8	3.67 (d,12.4)	61.6
6'b	3.34 (m)		3.42 (m)	
OCH ₃	3.45 (s)	56.5		
14-OH			7.75(brs)	
2'-OH			4.92(brs)	
3'-OH			4.92(brs)	
4'-OH			4.92(brs)	
6'-OH			3.33(s)	

Las asignaciones de RMN-¹H y ¹³C fueron soportados por experimentos 2D RMN (¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC y TOCSY). ^aDesplazamiento químico (δ) en ppm.

6.1.2. Pruebas de identidad y composición

6.1.2.1. Desarrollo del perfil cromatográfico de la fracción orgánica de la infusión de *S. amarissima*

La complejidad química relativa de las muestras derivadas del extracto acuoso se evaluó inicialmente mediante comparaciones visuales de sus perfiles cromatográficos. El mejor perfil fue logrado con la fracción de AcOEt del extracto acuoso (Fig. 30). Los análisis cromatográficos se realizaron mediante la técnica de CLUE-EM en una columna BEH Shield C₁₈ (1.7 μm, 2.1 × 100 mm) aplicando un gradiente de elución binario de agua (0.1 % de ácido fórmico) y CH₃CN. El tiempo total de la corrida fue de 12 min. Los compuestos **1**, **13**, **50**, **52–54** fueron identificados en el cromatograma por sus tiempos de retención y los valores *m/z* de los iones correspondientes [M-H]⁻. Sus iones moleculares fueron observados en *m/z* 609.54 [M-H]⁻ (**52**; t_R 1.36 min), 463.46 [M-H]⁻ (**53**; t_R 1.60 min), 359.23 [M-H]⁻ (**54**; t_R 2.46 min), 315.48 [M-H]⁻ (**13**; t_R 2.82 min), 329.43 [M-H]⁻ (**50**; t_R 3.65 min) y 491.23 [M-H]⁻ (**1**; t_R 4.89 min).

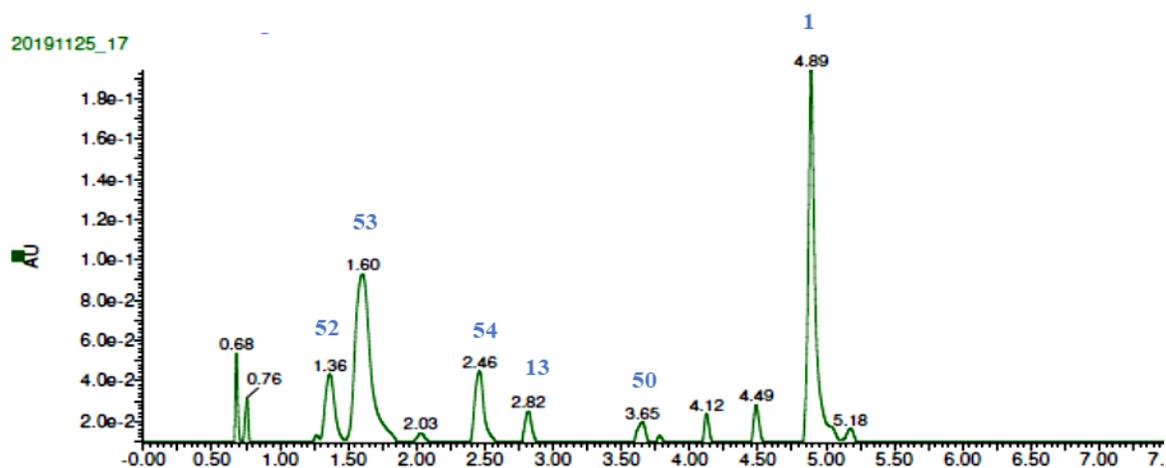


Fig 30. Perfil cromatográfico de la fracción de AcOEt representativo de la composición química de las partes aéreas de *S. amarissima*.

6.1.2.2. Validación del método para cuantificación de amarisólida (**1**) mediante CLUE-EM

La validación es el proceso de comprobar que un método analítico es aceptable para un propósito específico. De esta manera, el proceso de validar consiste en generar información que demuestre desde el punto de vista analítico, que dicho método es adecuado para el propósito deseado. El principal componente de la fracción de acetato de etilo fue la amarisólida (**1**), la cual, fue seleccionada como marcador para la validación. La amarisólida (**1**) solo ha sido aislado de esta especie; por lo tanto, lo convierte en un excelente compuesto marcador para el control de calidad.

6.1.2.2.1. Linealidad del sistema

La linealidad del sistema es la capacidad de un método para obtener respuestas analíticas directamente proporcionales a la concentración de un analito en la muestra en un intervalo de concentraciones determinadas [ICH; Q2 (R1) 2005]. Para el sistema desarrollado en este estudio, la linealidad se estableció con una curva de calibración a base de cinco concentraciones de amarisólida (**1**) (5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL). La respuesta analítica se determinó con el detector de PDA y ESI-Negativo considerando el área bajo la curva del pico de interés y fue evaluada mediante un análisis de regresión lineal simple (Tabla 2) (Fig. 31).

Tabla 2. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema.

Amarisólida (1)		
	PDA	ESI-Negativo
β_0	-4337.5 ± 28.552	64102 ± 208.3
β_1	5636.3 ± 4957.8	5252.8 ± 3618.5
R	0.9999	0.9960
R ²	0.9999	0.9921

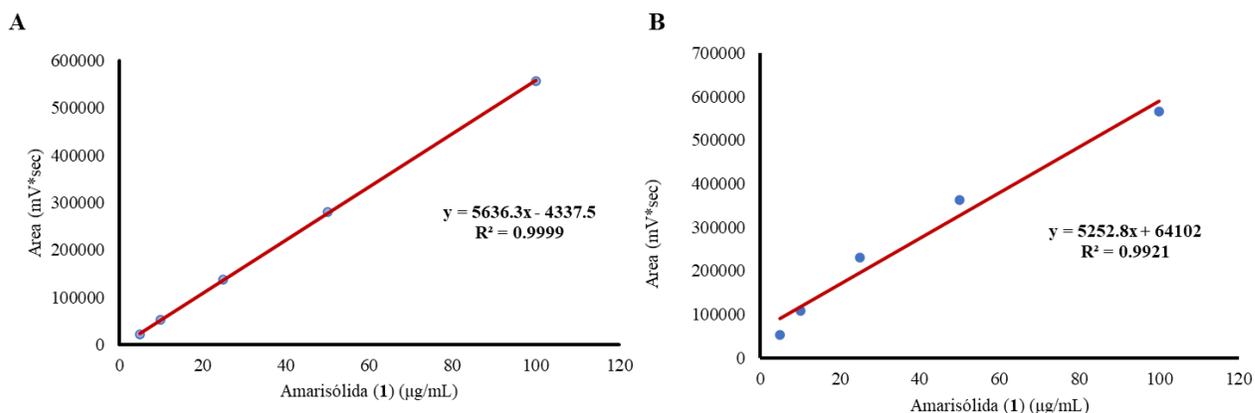


Fig. 31. Curvas de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico. (A) PDA; (B) ESI-negativo.

Los valores de β_0 , β_1 , R y R² obtenidos de la curva de calibración de la amarisólida (**1**) con ambos detectores se encuentran dentro de los límites establecidos por la ICH, por lo que se concluye que la linealidad del sistema cromatográfico es adecuada para el compuesto **1** en el intervalo de las concentraciones analizadas.

6.1.2.2.2. Linealidad del método

Para evaluar la linealidad del método se realizó una curva de calibración con las concentraciones del estándar **1** recuperado a partir del análisis con la matriz. Se adicionaron 10, 50 y 75 µg/mL del

compuesto **1** a la matriz de trabajo. Finalmente, la respuesta de la cantidad recuperada del estándar se realizó considerando el valor de la respuesta de la matriz sin adicionar y el marcador analítico. En la Figura 32 se muestra la gráfica correspondiente a la linealidad del método.

El método se considera lineal si el coeficiente de determinación (R^2) tiene un valor mayor de 0.98 y el de correlación es mayor a 0.99, así mismo si $\beta_0 \neq 0$ y $\beta_1 = 1$ [ICH; Q2 (R1) 2005]. Así los parámetros estadísticos obtenidos (Tabla 3) de este análisis demuestran que el método es lineal cuando se utiliza el detector PDA, sin embargo, los resultados obtenidos con el detector de masas presentan un R^2 menor debido a la complejidad de la matriz de trabajo y a la alta sensibilidad del detector.

Tabla 3. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método.

	Amarisólida (1)	
	PDA	ESI-Negativo
β_0	-0.0897 ± 0.387	1.71 ± 2.350
β_1	1.0157 ± 0.007	0.851 ± 0.045
R	0.9999	0.9866
R^2	0.9999	0.9734

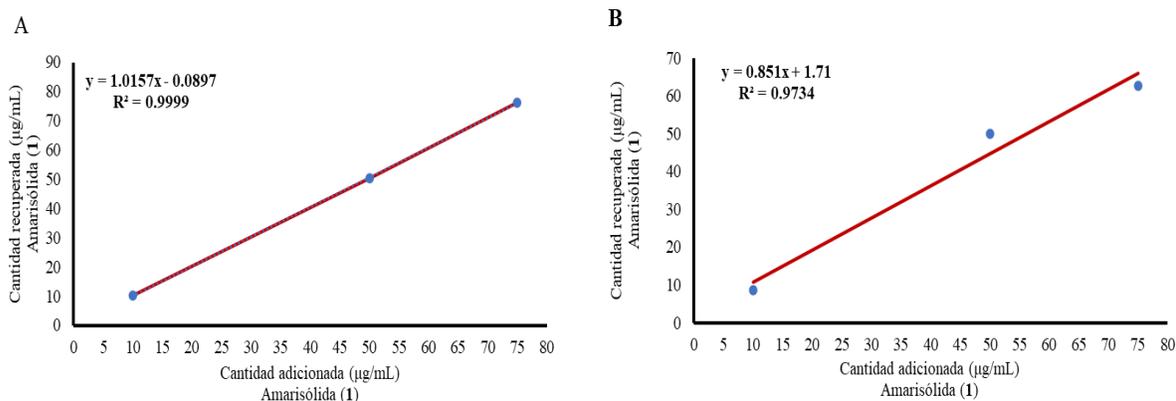


Fig. 32. Curvas de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico. (A) PDA; (B) ESI-negativo.

6.1.2.2.3. Exactitud del método

La exactitud del método analítico expresa la concordancia entre el valor de la concentración del estándar en la matriz enriquecida y el valor de referencia. En este estudio se evaluó este parámetro de desempeño mediante el análisis de los porcentajes de recobro; la guía de la ICH para métodos cromatográficos indica que el método analítico es exacto si los porcentajes de recobro se encuentran entre 98–102 % y el coeficiente de variación no es mayor del 2 % [ICH; Q2 (R1) 2005]. Así, los resultados obtenidos (Tablas 4 y 5) muestran que el recobro del estándar **1** usando los datos UV cumple con las especificaciones anteriores; sin embargo, los porcentajes de recobro para las determinaciones realizadas por ESI-Negativo no entran dentro de los límites establecidos.

Tabla 4. Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de la amarisólida (**1**) con el detector PDA.

Concentración de amarisólida (1) adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Recobro (%)	PDA		
		\bar{x}	DE	CV (%)
10 × 6	103.1			
	101.3			
	102.7			
	101.6			
	100.0			
	102.7	101.9	1.17	0.011
50 × 6	103.1			
	98.9			
	101.1			
	99.9			
	100.1			
	100.8	100.7	1.4	0.014
75 × 6	99.2			
	102.7			
	100.2			
	103.4			
	102.7			
	102.3	101.7	1.64	0.016

Tabla 5. Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de la amarisólida (**1**) con el detector de masas.

Concentración de amarisólida (1) adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	ESI-Negativo			
	Recobro (%)	\bar{x}	DE	CV (%)
10 \times 6	90.3			
	75.4			
	99.2			
	110.1			
	63.6			
	80.7	86.6	16.83	0.194
50 \times 6	84.5			
	110.9			
	110.5			
	99.3			
	84.4			
	84.9	95.7	12.88	0.133
75 \times 6	82.1			
	80.9			
	90.9			
	82.3			
	78.8			
	87.0	83.7	4.45	0.053

6.1.2.2.4. Precisión del sistema

La precisión del sistema es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales entre una serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo repetido de una muestra homogénea del producto o de una muestra de referencia; expresado como la desviación estándar y el coeficiente de variación [ICH; Q2 (R1) 2005]. En este trabajo se evaluó la precisión del sistema en términos de repetibilidad mediante el análisis de la respuesta analítica obtenida de seis réplicas del estándar (**1**) a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$. Este parámetro fue evaluado por un analista distinto, durante el mismo día. Finalmente, el CV obtenido (Tabla 6 y 7) no fue mayor al 2.0 %, con lo que se demuestra que el sistema es preciso utilizando los datos de UV y ESI-Negativo.

Tabla 6. Repetibilidad del sistema para la cuantificación de la amarisólida (**1**) con el detector PDA.

No. de réplica	Concentración de amarisólida (1) adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	PDA
		Área bajo la curva
6	50 \times 6	280029
		279834
		280254
		280595
		274671
		275538
	\bar{x}	278487
	DE	2646.4
	CV (%)	0.0095

Tabla 7. Repetibilidad del sistema para la cuantificación de la amarisólida (**1**) con el detector ESI-negativo.

No. de réplica	Concentración de amarisólida (1) adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	ESI-Negativo
		Área bajo la curva
6	50 \times 6	403771
		326220
		400568
		407116
		321831
		344970
	\bar{x}	367413
	DE	40684
	CV (%)	0.11

6.1.2.2.5. Límite de detección y límite de cuantificación

Para establecer ambos límites se realizaron curvas de calibración del estándar **1** utilizando el detector de PDA y el de masas en un intervalo de concentraciones de 0.01 a 10 $\mu\text{g/mL}$ por triplicado; en las Tablas 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos del análisis de regresión lineal (Fig. 33 y 34).

Tabla 8. Resultados para LD y LC de la amarisólida (**1**) con el detector PDA.

Concentración de amarisólida (1) ($\mu\text{g/mL}$)	PDA
	Área bajo la curva
0.01×3	2
	3
	8
0.1×3	2
	11
	14
1×3	3639
	3541
	3508
5×3	21185
	23130
	26443
10×3	52045
	53065
	56757
β_0	-1154.8
β_1	5393.6
R	0.9960
R^2	0.9921
$S_{y/x}$	1993.7
LD ($\mu\text{g/mL}$)	1.22
LC ($\mu\text{g/mL}$)	3.69

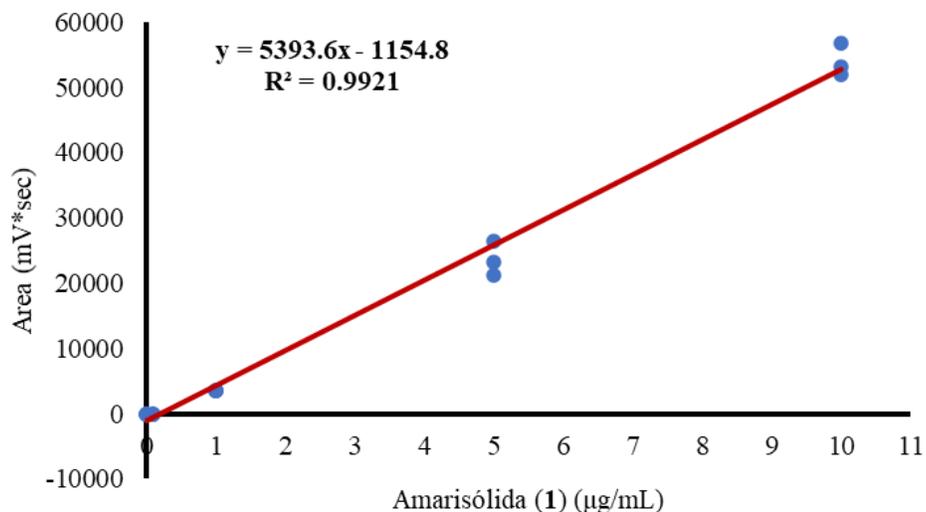


Fig. 33. Curvas de calibración para la determinación de LD y LC de amarisolida (1). PDA.

Tabla 9. Resultados para LD y LC de la amarisolida (1) con el detector ESI-negativo.

Concentración de amarisolida (1) (µg/mL)	ESI-Negativo	
	Área bajo la curva	
0.01 × 3	1413	
	1018	
	1151	
0.1 × 3	2007	
	2458	
	1077	
1 × 3	10938	
	11977	
	9586	
5 × 3	52974	
	57156	
	58226	
10 × 3	115642	
	120766	
	117545	
β_0	-49.139	
β_1	11648	
R	0.9989	
R ²	0.9980	
S _{y/x}	2122.95	
LD (µg/mL)	0.60	
LC (µg/mL)	1.82	

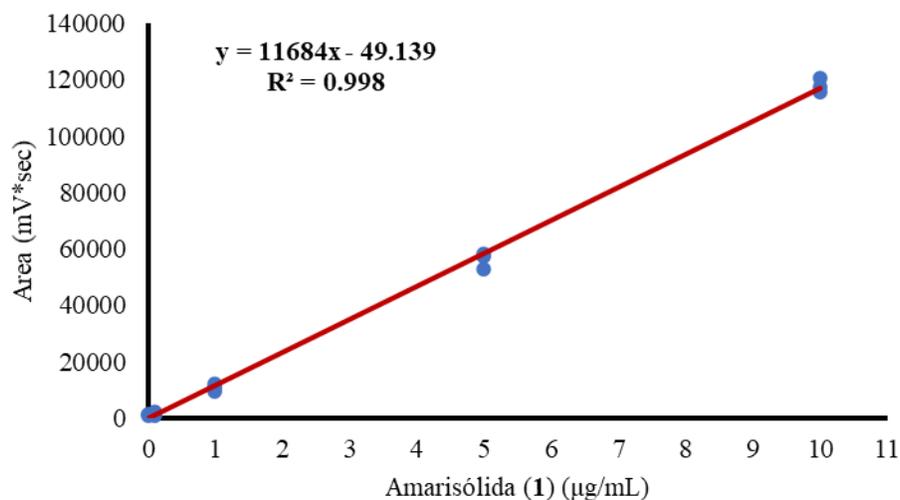


Fig. 34. Curvas de calibración para la determinación de LD y LC de amarisólida (1). ESI-negativo

6.1.2.2.6. Cuantificación de amarisólida (1)

Finalmente, utilizando el método analítico validado, se cuantificó el contenido de amarisólida (1) en los repartos de AcOEt obtenidos de la infusión del lote de enero 2019. Las muestras se analizaron a una concentración de 500 µg/mL disueltas en una mezcla de dioxano-MeOH (v/v 1:1). Este análisis se llevó a cabo utilizando la ecuación de la recta descrita para la linealidad del sistema $y = 5636.3x - 4337.5$. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Cuantificación de amarisólida (1) en la fracción de AcOEt de *S. amarissima* con el detector PDA.

Lote	No. replica	Concentración de la matriz (µg/mL)	Área bajo la curva	Cantidad de amarisólida (1) (µg/mL)	% de amarisólida (1)
Enero 2019	1	500	650800	116.23	23.24
	2	500	652742	116.57	23.31
	3	500	646259	115.42	23.08

La amarisólida (1) se cuantificó con los datos obtenidos por UV, debido a que el método utilizando ESI-EM requiere un mayor refinamiento en cuanto a la linealidad y exactitud del método, lo cual se podría lograr ajustando la concentración de la matriz adicionada.

6.1.2.3. Composición química del aceite esencial de la planta seca y fresca

La identificación de los componentes del aceite esencial obtenido por hidrodestilación (lote seco y fresco) se llevó a cabo por Cromatografía de Gases (CG) acoplada a Espectrometría de Masas (EM). La CG-EM es un método ampliamente aceptado para el análisis de aceites esenciales, debido a la volatilidad de los constituyentes, a la sensibilidad, estabilidad y alta eficiencia del método (Kumari y Kotecha, 2016). El análisis de aceites esenciales por CG-EM tiene una serie de ventajas, principalmente, que el cromatograma de la esencia proporciona una “huella dactilar” que puede utilizarse para identificar a la planta. La composición y la concentración relativa de los compuestos orgánicos presentes en el aceite esencial son característicos de la planta cuando éstas se recolectan en un mismo lugar y una misma época. De manera adicional, la extracción del aceite esencial es relativamente sencilla y de fácil estandarización, y sus componentes pueden ser fácilmente identificados mediante el análisis de CG-EM (Liang et al., 2004).

Los resultados se presentan en la Tabla 11. Los rendimientos de los aceites esenciales obtenidos de *Salvia amarissima* fueron 0.02 % y 0.03 % (w/w) para material fresco y seco, respectivamente. Los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus datos espectrales de masas con los de la Biblioteca de espectros de masas NIST 98 y la biblioteca del equipo, así como mediante la comparación de sus índices de retención en relación con una serie homóloga de *n*-alcanos C₈–C₂₀ calculados de acuerdo con Van Den Dool y Kratz (1963) y con los valores de la literatura (Adams, 2007). De manera simultánea se obtuvieron los espectros de masas de los componentes de las esencias por impacto electrónico (Anexo 1). Estos espectros de masas fueron comparados con los de la base de datos del equipo y con los reportados en la literatura.

El análisis cromatográfico reveló la presencia de germacreno D (**63**) y β -selineno (**64**) como compuestos principales de la esencia de *S. amarissima* del lote seco y fresco (Fig.35). Como se observa en la Tabla 11, se identificaron ocho componentes, que representan el 99.97 % de la composición del aceite de *S. amarissima* cuando está fresca. El δ -elemeno (**60**) es exclusivo de este lote. En cuanto al lote que corresponde a la planta seca, se identificaron de igual manera ocho compuestos mayoritarios, que representan el 99.96 % de la composición del aceite esencial de la planta. El 3-metoxi-*p*-cimeno (**58**) es exclusivo de este lote. Los resultados obtenidos sobre la composición del aceite esencial de *Salvia amarissima* coincide con algunas especies del género *Salvia*. Se ha reportado previamente la composición del aceite esencial de las especies *S. ceratophylla*, *S. aethiopsis*, *S. palaestina*, *S. nemorosa* y *S. syriaca*, los cuales, contienen al germacreno D (**63**),

espatulenol (**65**), β -cariofileno (**39**) y óxido de cariofileno como componentes mayoritarios de la mezcla volátil (Bagci y Kocak, 2008; Bahadori et al., 2017; Bahadori et al., 2017).

Tabla 11. Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de *S. amarissima* en fresco y seco.

Compuesto	IR ^a	Composición (%)	
		Fresco	Seco
3-Metoxi-<i>p</i>-cimeno (58)	1219		4.40
(<i>E</i>)-Acetato de Pinocarvilo (59)	1313	5.98	2.10
δ-Elemeno (60)	1329	1.99	
α -Bourboneno (61)	1378	4.24	4.11
β -Cariofileno (39)	1413	15.05	21.27
α -Cariofileno (62)	1447	7.68	4.21
Germacreno D (63)	1476	25.09	24.26
β -Selineno (64)	1491	28.35	30.16
Espatulenol (65)	1576	11.59	9.45
Total		99.97	99.96

^aÍndice de retención relativa a series de *n*-alcanos (C₈-C₂₀) sobre una columna DB-5.

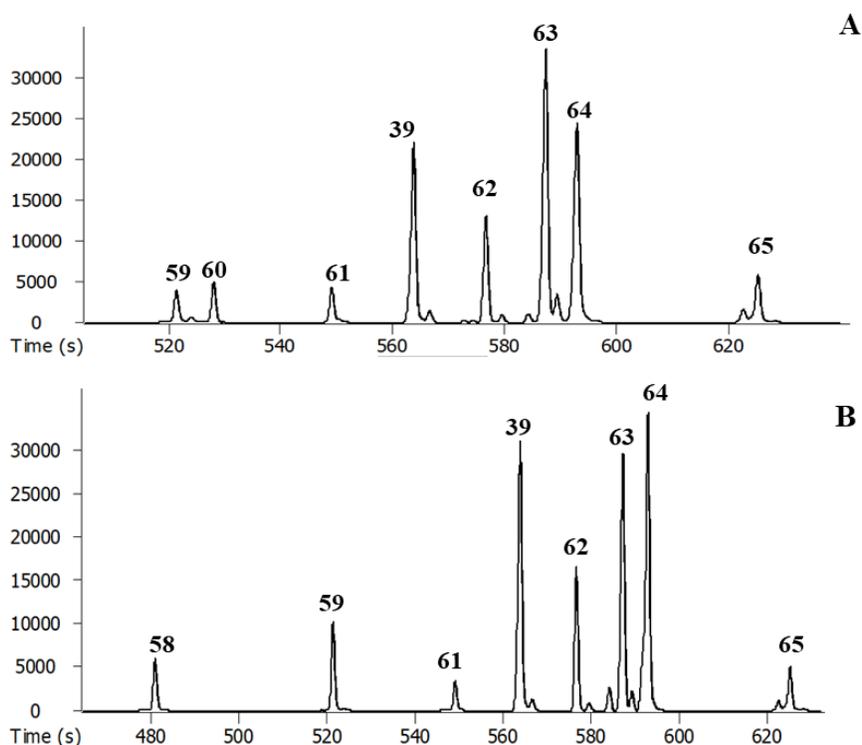


Fig. 35. Cromatograma iónico total del aceite esencial de *S. amarissima* analizado en una columna capilar DB-5. (A) Planta fresca; (B) Planta seca.

6.1.2.4. Microextracción en fase sólida de los compuestos volátiles

Con la finalidad de establecer el contenido de los componentes volátiles con mayor detalle, se realizó un análisis de microextracción en fase sólida (MEFS). La MEFS es un método de preparación de muestra y muestreo, desarrollado inicialmente para la determinación de compuestos orgánicos volátiles presentes en el ambiente (Zabaras y Wyllie, 2005). La técnica consiste en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente polimérico seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico. Cuando la MEFS se acopla a la CG, la desorción se realiza térmicamente y al aumentar la temperatura, la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye, y los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo del gas acarreador (He). Generalmente, la naturaleza del analito a ensayar determina el tipo de fibra a utilizar, empleándose recubrimientos polares como PA o carbowax (CW) y recubrimientos como PDMS para aquellos menos polares. En este caso, se utilizó una fibra con recubrimiento de divinil benceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) que permite la extracción de terpenoides de mediana a baja polaridad como los detectados en el aceite esencial (Santana et al., 2017).

Los resultados obtenidos a partir de estos análisis nos permitieron identificar un total de dos constituyentes que representan el 100 % de la composición total de volátiles detectados con la fibra (DVB/CAR/PDMS). A diferencia de la esencia, el 2-hexenal (**66**) es el componente más abundante, presente en un 75.09 % (Tabla 12 y Fig. 36), seguido por el benzaldehído (**67**) con un 24.90 %.

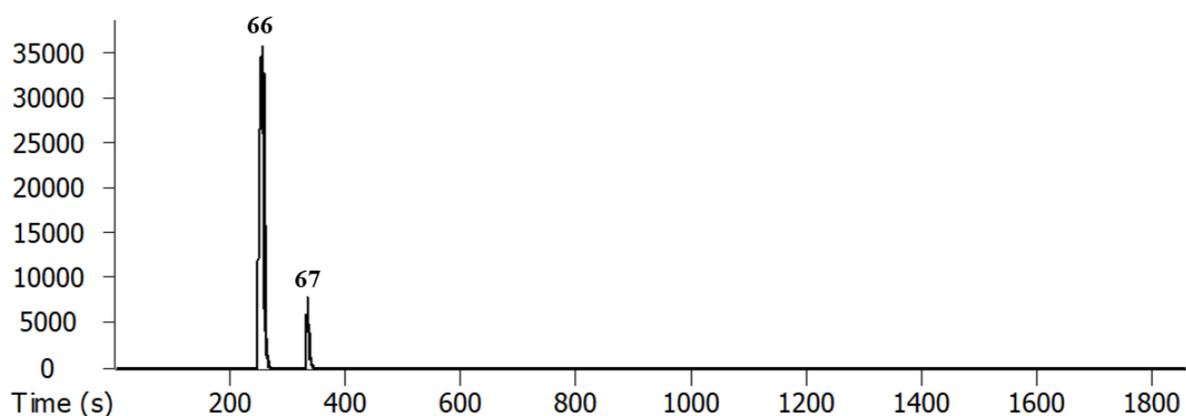


Fig 36. Cromatograma iónico total de los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de *S. amarissima* analizado en una columna capilar DB-5 por la técnica de MEFS.

Tabla 12. Compuestos volátiles de las partes aéreas de *S. amarissima* obtenidos por MEFS.

Compuesto	Composición (%)	
	IR ^a	Seco
2-Hexenal (66)	851	75.09
Benzaldehído (67)	952	24.90
Total		100

^aÍndice de retención relativa a series de *n*-alcanos (C₈–C₂₀) sobre una columna DB-5.

En este caso, la MEFS nos permitió identificar dos compuestos volátiles **66** y **67**, los cuales han sido reportados con propiedades antifúngicas y antibacterianas (Verma et al., 2017; Gardini et al., 2001), lo cual coincide con el uso tradicional de la planta. Cabe mencionar que los resultados obtenidos del análisis por CG de las esencias y los de la MEFS no son comparables, debido a que los principios fisicoquímicos que fundamentan ambas técnicas analíticas son muy distintos.

6.1.3. Ensayos biológicos

6.1.3.1. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa de levadura

Con la finalidad de establecer el potencial antihiper glucémico del extracto acuoso, el aceite esencial y los productos aislados de *S. amarissima* (**1**, **13**, **50–55a,b**), se llevó a cabo la determinación de su efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa de levadura. Este procedimiento se basa en la cuantificación espectrofotométrica del producto de hidrólisis del *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido en presencia de un inhibidor (Fig. 37); de este modo, la cantidad de *p*-nitrofenol liberado de la hidrólisis es inversamente proporcional a la inhibición de la enzima (Oki et al., 1999).

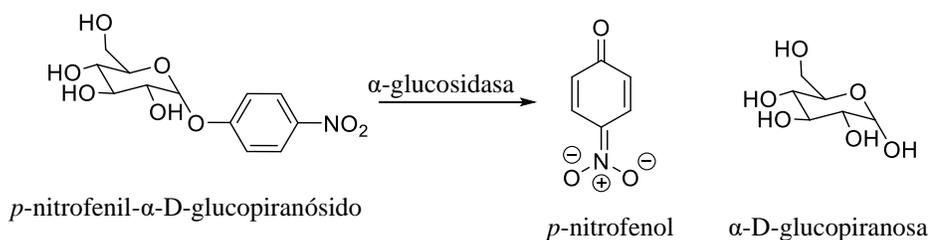


Fig. 37. Reacción de hidrólisis en la determinación espectrofotométrica de inhibición de las enzimas α -glucosidasas.

Según los datos obtenidos (Tabla 13), el extracto acuoso inhibió al 15 % la actividad de la enzima a una concentración de 1000 ppm. Los aceites esenciales obtenidos de la planta (seca y fresca) fueron evaluados y no mostraron actividad. Los aceites esenciales de plantas del género *Salvia* han sido reportados con actividad frente a la enzima α -glucosidasa cuando éstos contienen al óxido de

cariofileno y espatulenol (**65**) como componentes mayoritarios (Bahadori et al., 2017; Bahadori et al., 2017).

En el caso de los compuestos puros **1**, **52** y **55ab** mostraron una CI_{50} superior a 2000 μM . Trabajos previos han reportado la actividad del compuesto **52** sobre la enzima α -glucosidasa y coincide con el valor reportado en este trabajo (Zhao et al., 2016). Los flavonoides **51**, **53** y **13** presentaron mayor actividad en comparación con la acarbosa que mostró una CI_{50} de $590 \pm 2 \mu M$. Los compuestos **13**, **53** y **54** han sido reportados como inhibidores de la enzima α -glucosidasa y correlaciona con nuestro trabajo de investigación (Flores-Bocanegra et al., 2017; Mata et al., 2019; Xu et al., 2018; Lin et al., 2011). Esto demuestra que la amarisólida (**1**) presenta mejor efecto sobre la enzima α -glucosidasa de mamífero y de *R. obeum* (Flores-Bocanegra et al., 2017; Mata et al., 2019). Sería pertinente demostrar el efecto de los compuestos (**1**, **13**, **50–55a,b**) sobre la enzima α -glucosidasa de mamífero, ya que los productos naturales presentan un efecto diferencial sobre los diferentes tipos de α -glucosidasas (Flores-Bocanegra et al., 2014). Además, en el estudio previo de Flores-Bocanegra y colaboradores (2017), productos similares fueron efectivos contra la enzima de mamíferos.

Tabla 13. Actividad del extracto acuoso, los aceites esenciales y los compuestos (**1**, **13**, **50–55a,b**) de *S. amarissima* en la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Muestra	α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Actividad Inhibitoria $CI_{50} \pm DE$ (μM)
Extracto acuoso ^a	15 %
Aceite esencial (planta fresca)	Nula
Aceite esencial (planta seca)	Nula
1	> 2000
13	72 ± 6
50	1193 ± 40
51	49 ± 1
52	> 2000
53	318 ± 22
54	1050 ± 7
55ab	> 2000
Acarbosa ^b	590 ± 2

^a Porcentaje de inhibición a 1000 ppm.

^b Control positivo

6.1.3.2. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima PTP-1B humana

Con la finalidad de establecer la actividad sobre la enzima PTP-1B de los productos aislados (**1**, **13**, **50–55a,b**), el extracto acuoso y el aceite esencial de *S. amarissima*, se evaluó su efecto inhibitorio sobre la enzima PTP-1B de humano. Este procedimiento se basa en la cuantificación espectrofotométrica del producto de hidrólisis del fosfato *p*-nitrofenol en presencia de un inhibidor (Fig. 38); de este modo, la cantidad de *p*-nitrofenol liberado es inversamente proporcional a la inhibición de la enzima (Salinas-Arellano et al., 2020).

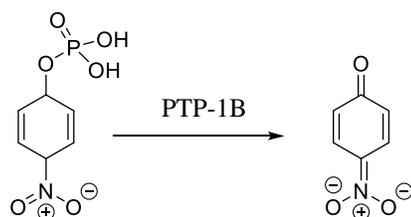


Fig. 38. Reacción de hidrólisis en la determinación espectrofotométrica de la inhibición de la enzima PTP-1B.

Según los datos obtenidos (Tabla 14), el extracto acuoso inhibió la actividad de la enzima PTP-1B con una CI_{50} de 89 ± 5 $\mu\text{g/mL}$. Los aceites esenciales obtenidos de la planta fresca y seca también fueron activos con valores de CI_{50} de 36 ± 1 y 30 ± 1 , respectivamente. Estudios previos han reportado que el germacreno D (**63**) (un componente mayoritario del aceite esencial de *S. amarissima*) mostró una potente actividad inhibitoria sobre la actividad de la PTP-1B con una CI_{50} de 10.2 μM (Liang et al., 2018). Por lo tanto, el germacreno D (**63**), podría ser responsable de la actividad del aceite esencial de *Salvia amarissima* frente a la enzima PTP-1B, ya que se encuentra como componente mayoritario en ambos aceites esenciales.

Los productos naturales **1**, **13**, **50–55a,b** mostraron actividad inhibitoria contra la enzima PTP-1B cuando se comparó con el control positivo, el ácido ursólico ($CI_{50} = 28 \pm 1$ μM). Entre los flavonoides, la pedalitina (**13**) fue el compuesto más activo con una CI_{50} de 62 ± 4 μM ; de los diterpenoides la amarisólida (**1**) fue la más activa (CI_{50} de 280 ± 26 μM). Estudios previos han confirmado que diterpenoides (clerodano y abietano) inhiben la actividad de la enzima PTP-1B (humano recombinante) (Kim et al., 2017; Rivera-Chávez et al., 2020).

La actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B de los compuestos **52–53** fue reportada previamente (Zhao et al., 2016; Xu et al., 2018); los resultados previos concuerdan los obtenidos en el presente

trabajo. Por otra parte, el ácido rosmarínico (**54**) es un compuesto mayoritario del extracto de *Rosmarinus officinalis*, el cual presentó actividad contra la enzima PTP-1B (Ngo et al., 2018). Sin embargo, en este estudio se reporta por primera vez el efecto del compuesto puro frente a la enzima PTP-1B.

Tabla 14. Actividad del extracto acuoso, los aceites esenciales y los compuestos (**1**, **13**, **50-55a,b**) de *S. amarissima* en la enzima PTP-1B.

Muestra	PTP-1B Actividad Inhibitoria CI ₅₀ ± DE (µM)
Extracto acuoso ^a	89 ± 5
Aceite Esencial (material fresco) ^a	36 ± 1
Aceite Esencial (material seco) ^a	30 ± 1
1	280 ± 26
13	62 ± 4
50	189 ± 7
51	80 ± 2
52	323 ± 17
53	260 ± 32
54	137 ± 19
55a,b	514 ± 7
Ácido ursólico ^b	28 ± 1

^a IC₅₀ µg/mL

^b Control positivo

6.1.4. Estudios *in silico*

6.1.4.1. Estudios de acoplamiento molecular en la α -glucosidasa de *S. cerevisiae*

Con el objetivo de complementar los estudios del efecto inhibitorio de los productos **13** y **51** se realizaron estudios de acoplamiento molecular (AM), empleando la estructura obtenida por rayos X de la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (código PDB 3A4A). Las estructuras de los compuestos **13** y **51** se optimizaron geoméricamente utilizando el programa Spartan¹⁰; posteriormente se encontraron los posibles sitios de interacción de acuerdo con diferentes factores energéticos, empleando el programa AutoDock Tools. El protocolo utilizado en los estudios de acoplamiento molecular se validó al modelar el modo de unión de la glucosa en el sitio catalítico (RMSD = 0.811 Å). Además, se modeló el modo de unión del control positivo, la acarbosa (Fig. 39–41). El análisis de la pedalitina (**13**) y 6-hidroxituteolina (**51**), se realizó utilizando el protocolo validado para los estudios de acoplamiento con la enzima α -glucosidasa de levadura.

Con base en los resultados de los estudios de acoplamiento molecular de la acarbosa, **13** y **51** con la enzima α -glucosidasa de levadura se logró establecer que las tres moléculas pueden interactuar con el sitio catalítico de la enzima, y que algunos de los aminoácidos que intervienen en las interacciones son iguales en los tres casos. La estructura de estos complejos se muestra en las Figuras 39–45.

Para el compuesto **13** se observan la formación de puentes de hidrógeno con los aminoácidos Pro312, Glu277, Arg442 e His280 con los grupos hidroxilo en C-6, C-3' y C-4' y el grupo carbonilo C-4. Además, se aprecian interacciones de tipo π -alquilo y de Van der Waals. Por otro lado, en **51** las principales interacciones se dan con los residuos His280, Tyr158, Arg315, Phe314, Arg442, Asp352 y Glu277, aminoácidos implicados en la estabilidad y actividad de la enzima (Tabla 15). Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado experimentalmente en las evaluaciones con la enzima α -glucosidasa de levadura.

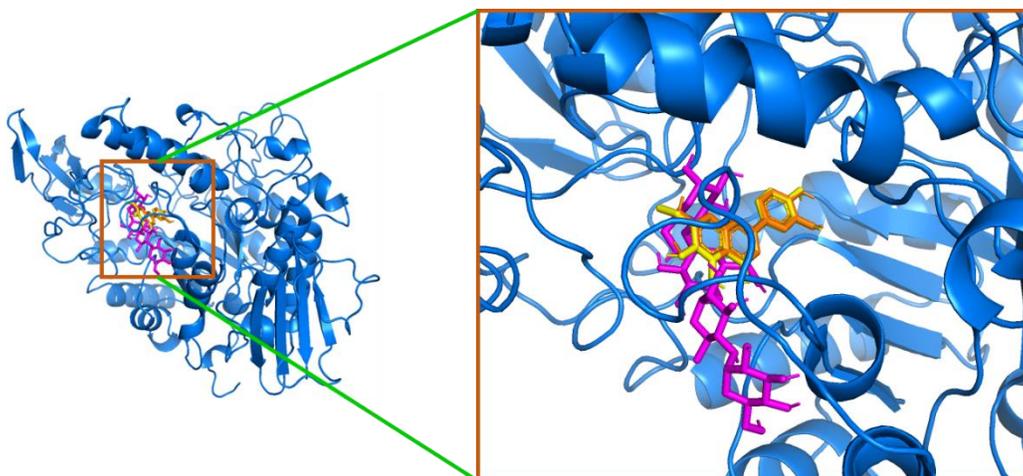


Fig. 39. Posibles sitios de unión para la acarbosa (morado), pedaltina (**13**; amarillo) y 6-hidroxiuteolina (**51**; naranja) con la enzima la α -glucosidasa de levadura (azul; PDB 3A4A).

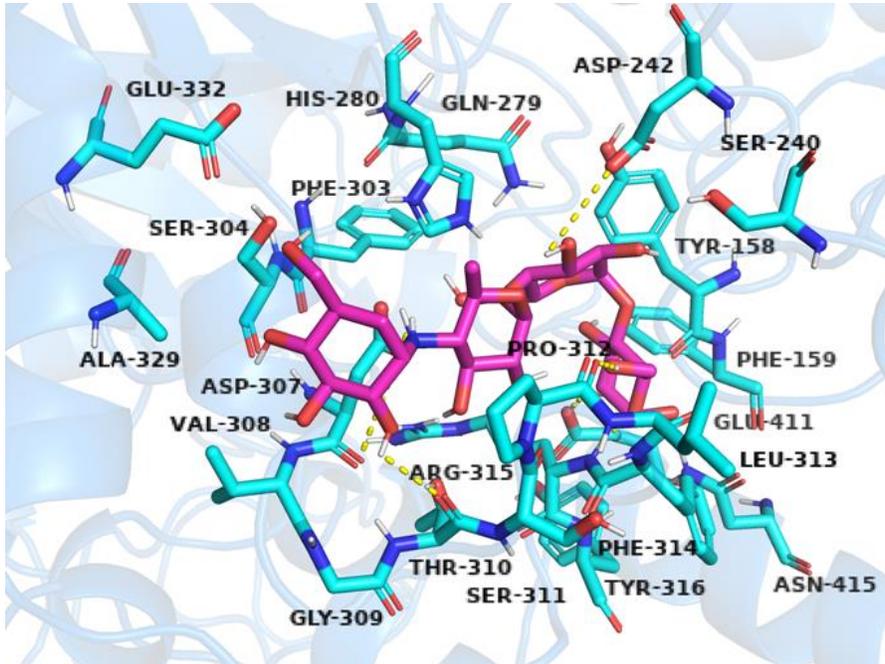


Fig. 40. Representación en 3D del posible modo de unión de la acarbosa con la enzima α -glucosidasa de levadura.

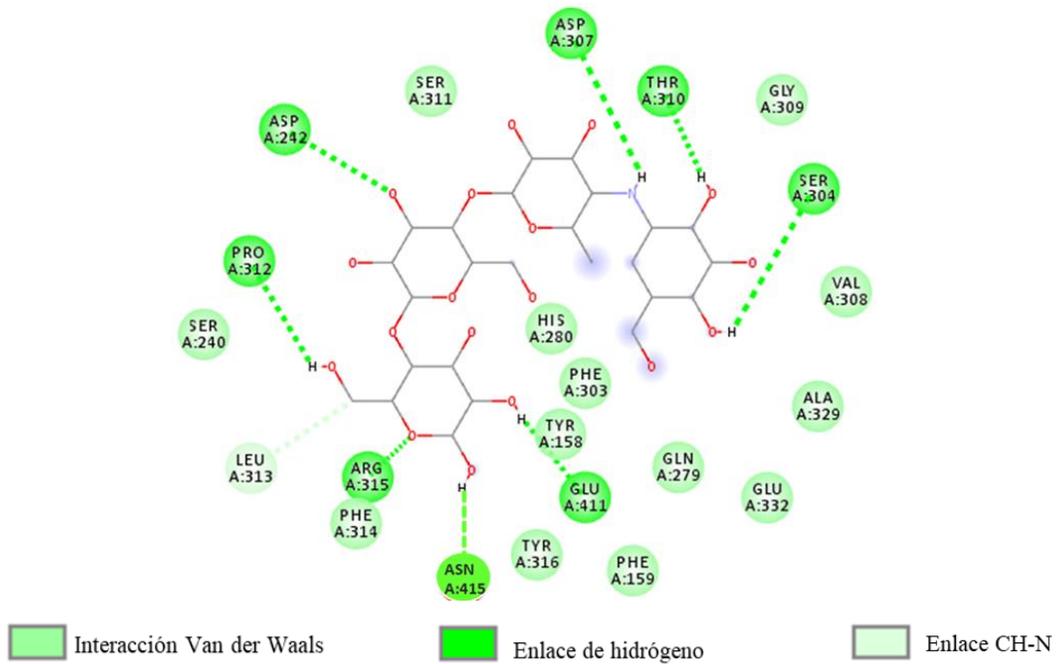


Fig. 41. Interacciones enzima-ligando en 2D de la acarbosa con la α -glucosidasa de levadura.

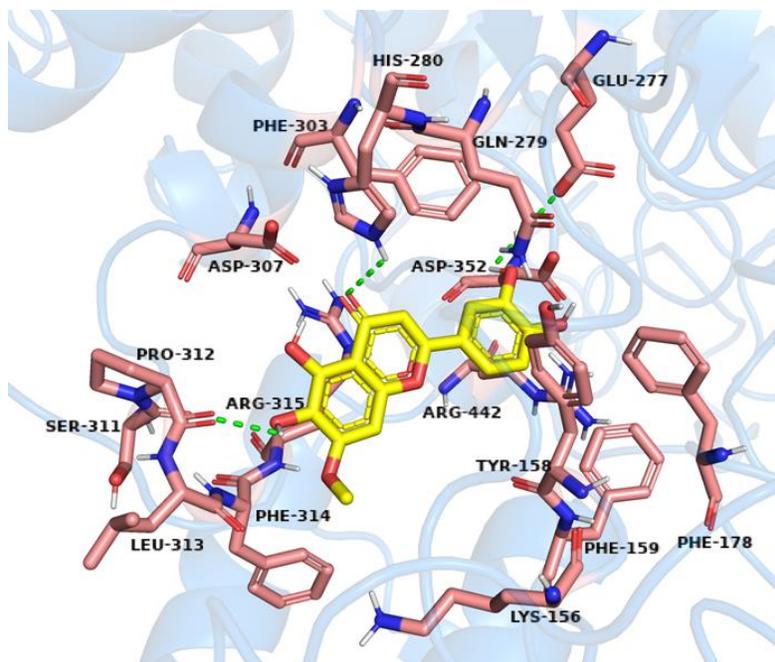


Fig. 42. Representación en 3D del posible modo de unión de la peditina (**13**) con la enzima α -glucosidasa de levadura.

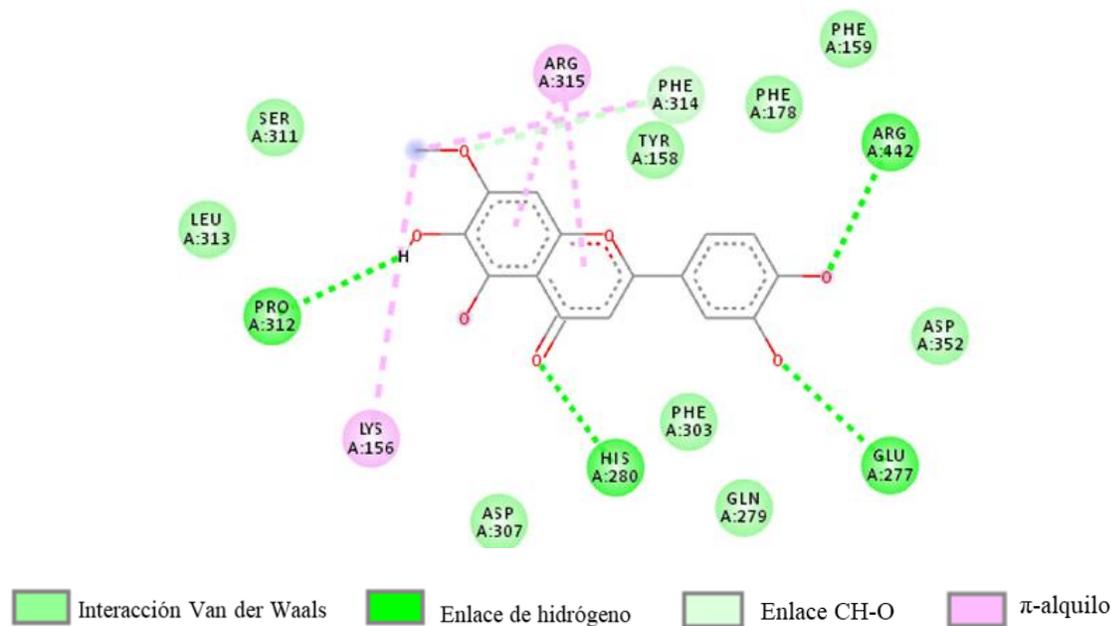


Fig. 43. Interacciones enzima-ligando en 2D de la peditina (**13**) con la α -glucosidasa de levadura.

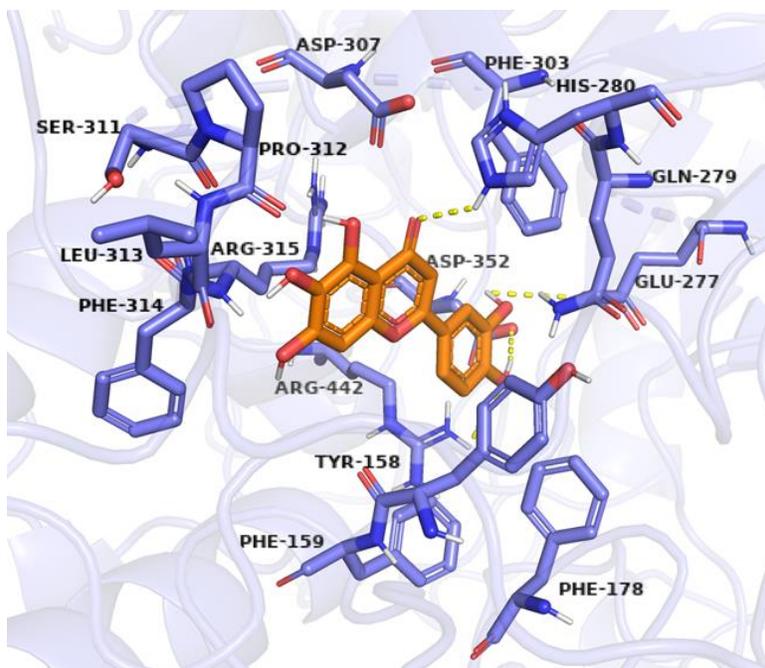


Fig. 44. Representación en 3D del posible modo de unión de la 6-hidroxiluteolina (**51**) con la enzima α -glucosidasa de levadura.

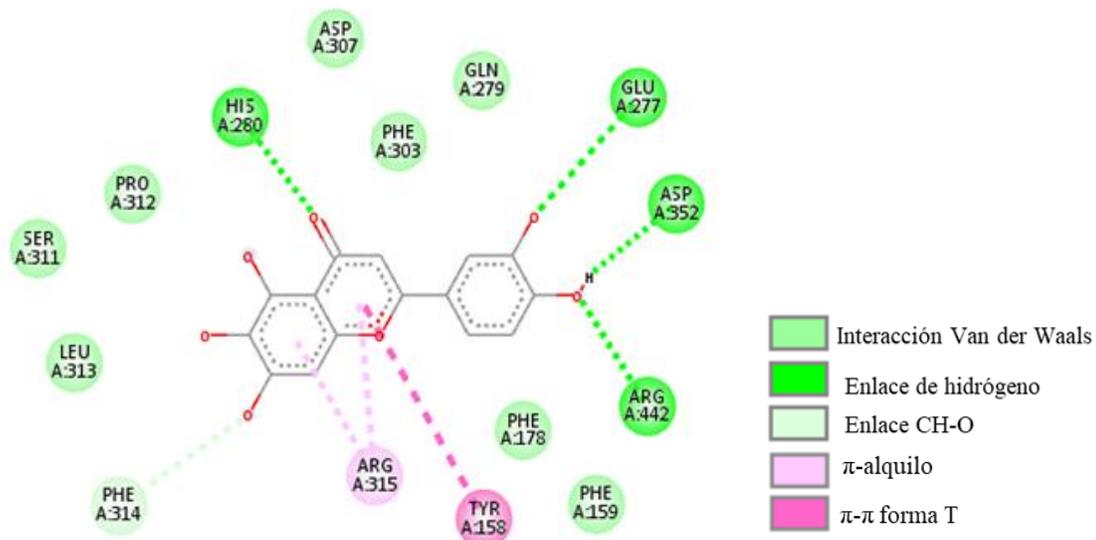


Fig. 45. Interacciones enzima-ligando en 2D de la 6-hidroxiluteolina (**51**) con la α -glucosidasa de levadura.

Tabla 15. Principales interacciones entre los compuestos (**13** y **51**) y la enzima α -glucosidasa de levadura.

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones			
		Enlace de hidrógeno	Van der Waals	CH-O	π - π forma T/ π -alquilo
Pedalitina (13)	-9.2	Pro312, His280, Glu277, Arg442	Ser311, Leu313, Asp307, Phe303, Gln279, Asp352, Phe159, Phe178, Tyr158	Phe314	Arg315, Lys156, Phe314
6-hidroxiluteolina (51)	-9.1	His280, Glu277, Asp352, Arg442	Pro312, Ser311, Leu313, Phe178, Phe159, Gln279, Phe303, Asp307	Phe314	Tyr158/ Arg315
Acarbosa	-9.0	Ser304, Thr310, Asp307, Asp242, Pro312, Arg315, Asn415, Glu411	Gly309, Val308, Ala329, Glu332, Gln279, Phe303, His280, Tyr158, Phe159, Tyr316, Phe314, Ser240, Ser311	Leu313	

6.1.4.2. Estudios de acoplamiento molecular en la enzima PTP-1B de humano

6.1.4.2.1. Sitio catalítico

Para determinar el posible modo de unión de la amarisólida (**1**) y la pedalitina (**13**) en la parte más conservada de la enzima, se realizaron estudios de acoplamiento molecular empleando la estructura obtenida por rayos X de la PTP-1B humana (código PDB 1G7F). La estructura de los compuestos **1** y **13** se optimizó geométricamente utilizando el programa Spartan¹⁰; posteriormente, se encontraron los posibles sitios de interacción empleando el programa de AutoDock Tools. El protocolo se validó al modelar el modo de unión del ácido {4-[(2S)-2-({[(1S)-1-carboxi-2-feniletíl] carbamoil} amino)-3-oxo-3-(pentilamino)propil]fenoxi}malónico (1.686 Å). A partir del análisis del modo de unión del ácido ursólico (control positivo) se observaron enlaces de hidrógeno con los residuos Glu115, Arg221 y Ser216. Adicionalmente, se observaron interacciones con los aminoácidos Thr263, Gln262, Gln366, Gly220, Ile219, Cys215, Lys120 y Phe182 de tipo Van der Waals (Fig. 46–48).

El modelado del sitio de unión de la amarisólida (**1**) predijo que el compuesto **1** se une en la parte externa del sitio catalítico con una energía de unión de -7.8 kcal/mol, lo cual es menor a la mostrada por el ácido ursólico (-8.5 kcal/mol) y ligeramente superior a la pedalitina (**13**) (-7.6 kcal/mol). El

compuesto **1** mostró interacciones con los residuos catalíticos Cys215 y Arg221 y formó enlaces de hidrógeno con residuos del asa WPD y Q que median la hidrólisis del intermediario catalítico cisteinil-fosfato (Tonks, 2003; Jiang et al., 2012; Choy et al., 2017). Por otro lado, **13** mostró que sus principales interacciones se dan con los residuos Gly220, Gln266, Arg221, Ala217 y Tyr46, aminoácidos implicados en la especificidad y actividad catalítica de la enzima (Tabla 16) (Fig. 49–52).

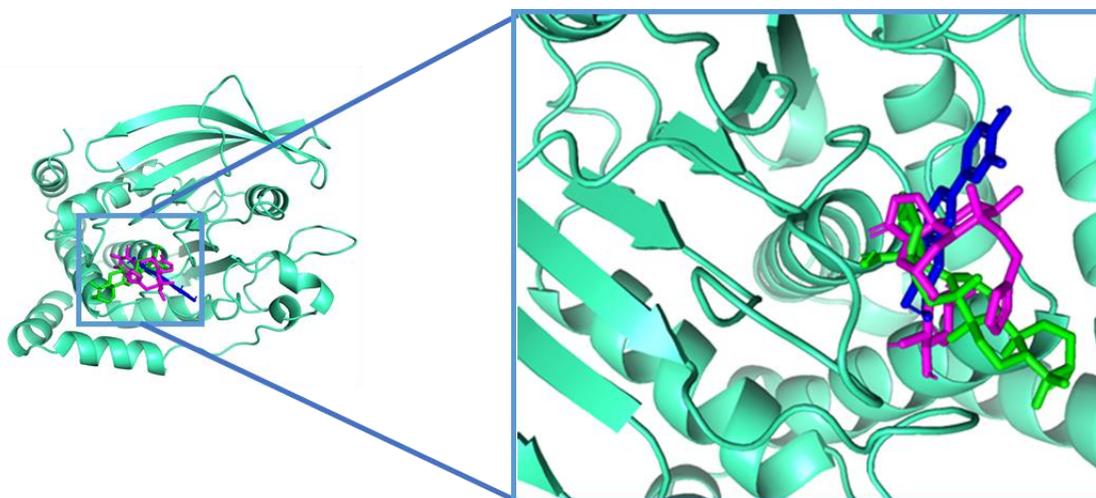


Fig. 46. Posibles sitios de unión para el ácido ursólico (verde), amarisólida (**1**; morado) y pedalitina (**13**; azul) con el sitio activo de la enzima PTP-1B (azul turquesa; PDB 1G7F).

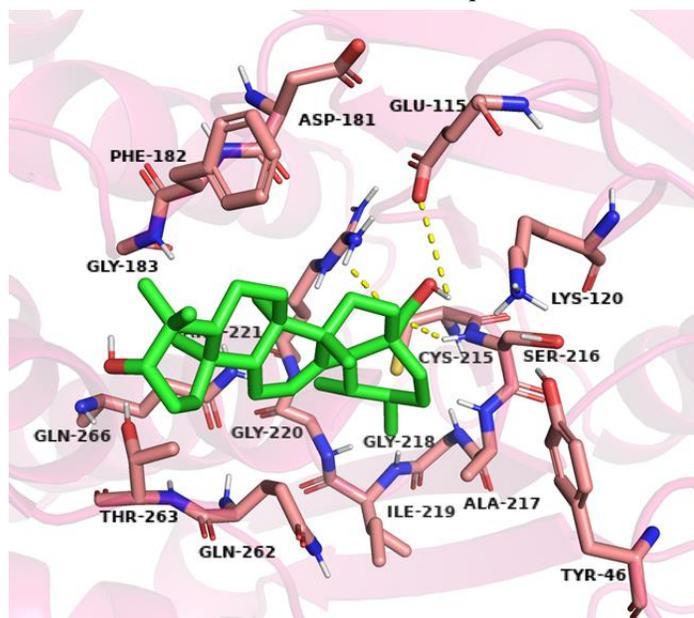


Fig. 47. Representación en 3D del posible modo de unión del ácido ursólico con la PTP-1B (sitio catalítico).

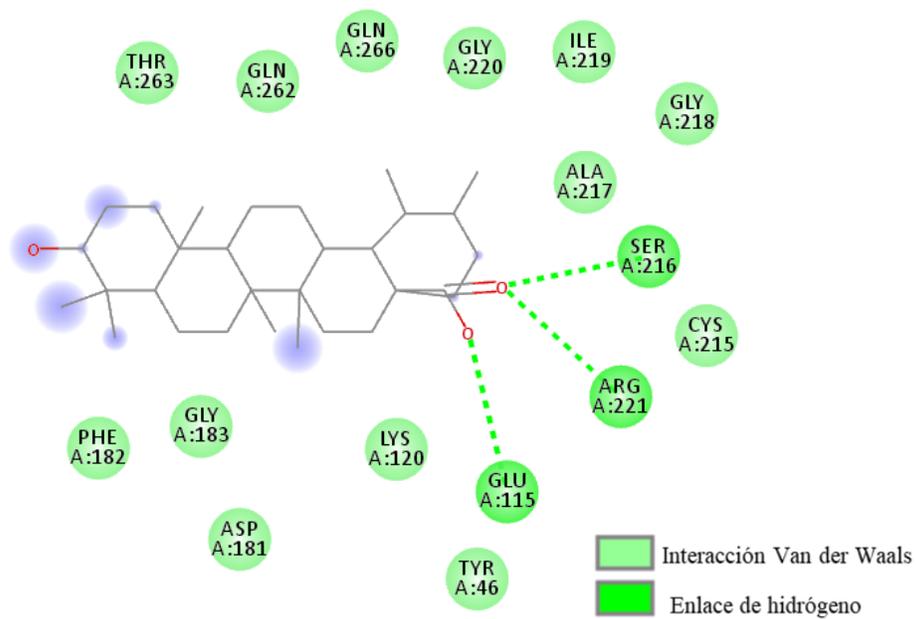


Fig. 48. Interacciones enzima-ligando en 2D del ácido ursólico con la PTP-1B (sitio catalítico).

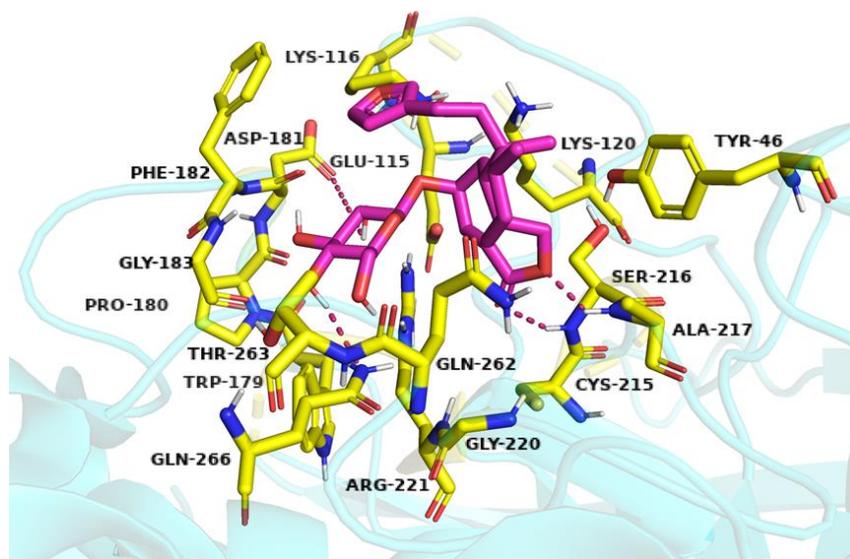


Fig. 49. Representación en 3D del posible modo de unión de la amarisolida (1) con la PTP-1B (sitio catalítico).

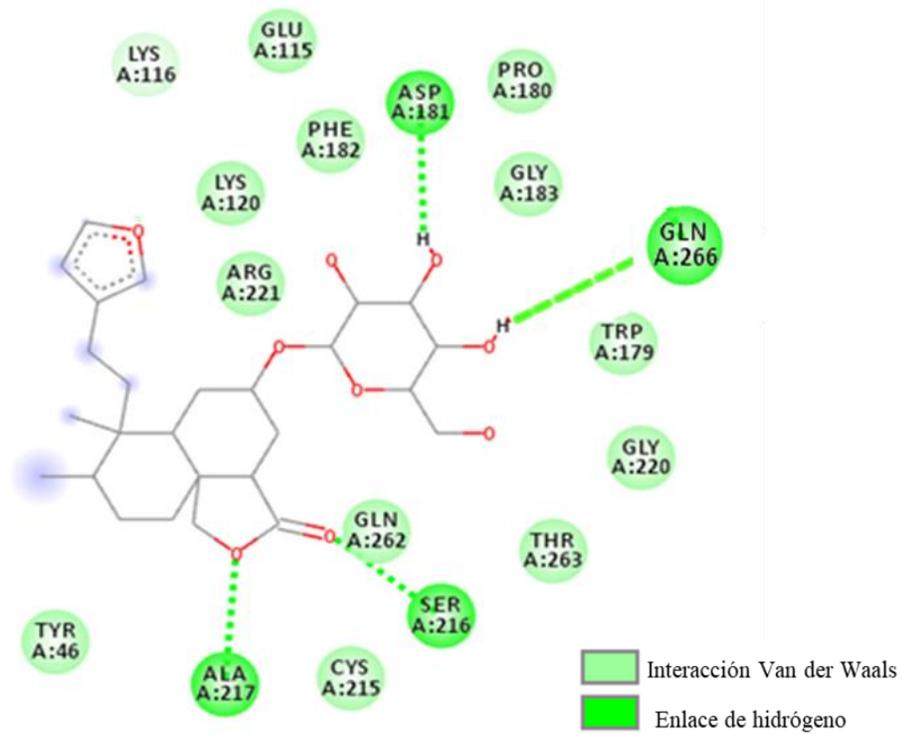


Fig. 50. Interacciones enzima-ligando en 2D de la amarisolida (**1**) con la PTP-1B (sitio catalítico).

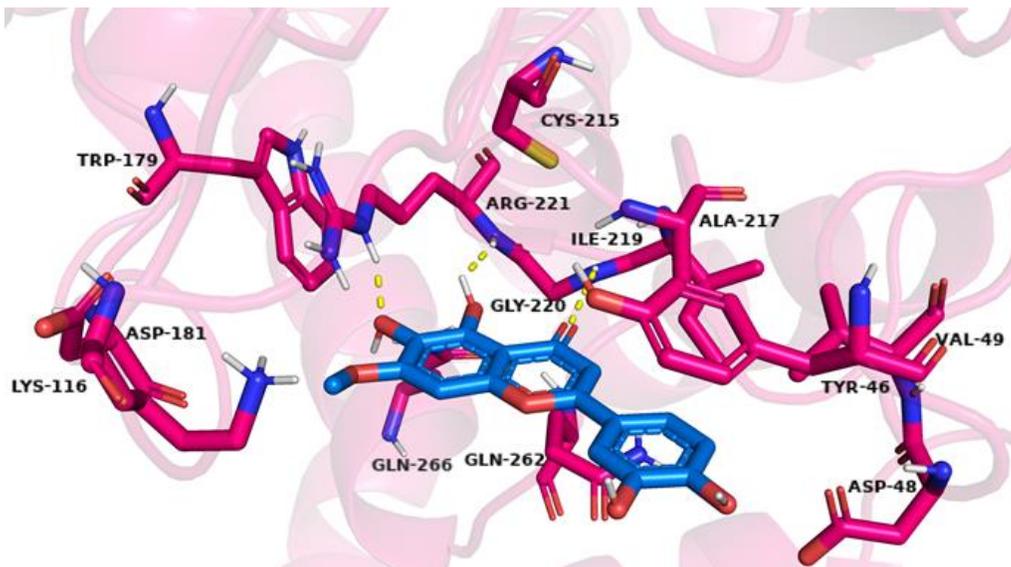


Fig. 51. Representación en 3D del posible modo de unión de la pedalitina (**13**) con la PTP-1B (sitio catalítico).

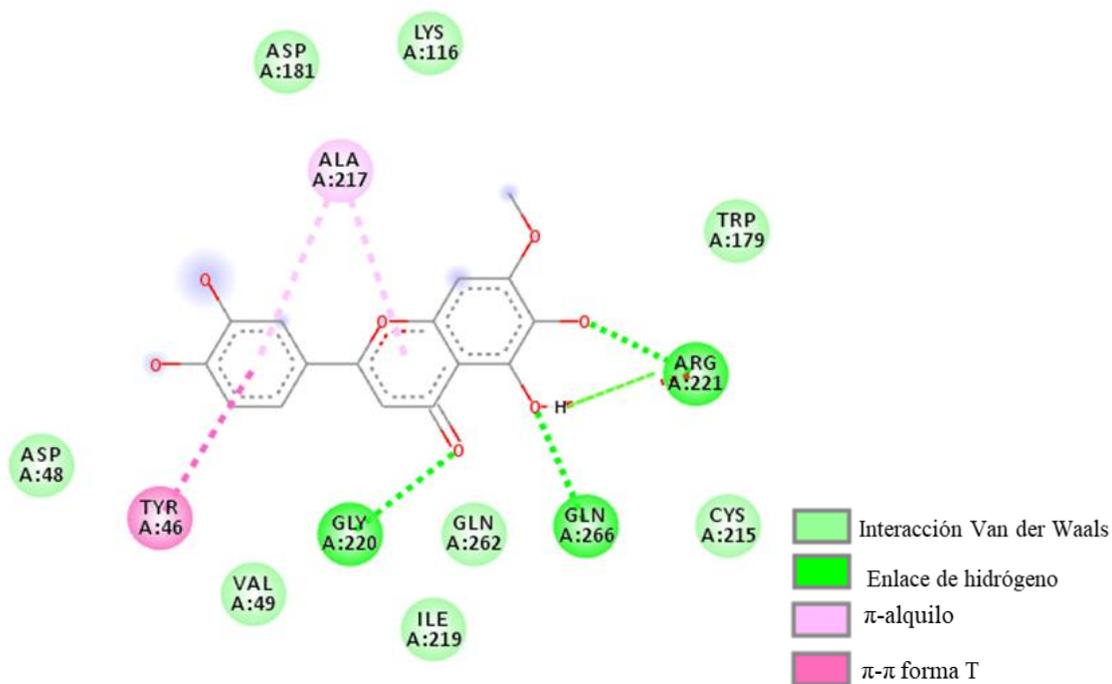


Fig. 52. Interacciones enzima-ligando en 2D de la pedalitina (**13**) con la PTP-1B (sitio catalítico).

Tabla 16. Principales interacciones entre los compuestos (**1** y **13**) y la enzima PTP-1B en el sitio catalítico

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones			
		Enlace de hidrógeno	Van der Waals	π -alquilo	π - π forma T
Amarisólida (1)	-7.8	Asp181, Gln266, Ser216, Ala217	Tyr46, Cys215, Gln262, Thr263, Gly220, Trp179, Gly183, Pro180, Phe182, Lys120, Arg221, Lys116, Glu115		
Pedalitina (13)	-7.6	Gly220, Gln266, Arg221	Asp48, Val49, Ile219, Gln262, Cys215, Trp179, Lys116, Asp181	Ala217	Tyr46
Ácido ursólico	-8.5	Glu115, Arg221, Ser216	Phe182, Gly183, Asp181, Lys120, Tyr46, Cys215, Ala217, Gly218, Ile219, Gly220, Gln266, Gln262, Thr263		

6.1.4.2.2. Sitio alostérico

Con el mismo propósito de predecir el posible sitio de unión de los compuestos inhibidores de la PTP-1B, se llevó a cabo el análisis de acoplamiento molecular para los compuestos **1** y **13**, en este caso se utilizó la estructura del sitio alostérico de la PTP-1B humana, el cual es menos conservado y más hidrofóbico. Ésta fue obtenida por difracción de rayos X (PDB 1T49). Para validar el modelo, se emuló la interacción del ácido 3-(3,5-dibromo-4-hidroxibenzoil)-2-etilbenzofuran-6-sulfónico (4-sulfamoilfenil)-amida con la PTP-1B (RMSD = 1.693 Å). Posteriormente, se modelaron los compuestos que presentaron la mejor actividad. El análisis del sitio de unión de la pedalitina (**13**) y del ácido ursólico nos indica que ambos compuestos presentan mayor afinidad por el sitio alostérico de la enzima PTP-1B (Fig. 53–55).

El compuesto **13** tiene interacciones como apilamiento de anillos (π - π), de tipo Van der Waals y enlaces de hidrógeno, siendo éstas las predominantes; entre las interacciones π - π resaltan las formadas con los residuos Leu192, Phe280 y Phe196. Finalmente, la amarisólida (**1**) mostró interacciones con los aminoácidos Asn193, Lys197, Glu200, Ile281 y Gly277. Además, se observó la formación de enlaces de hidrógeno con Asp236 y Arg199 y se identificó un apilamiento π - π entre el anillo del furano de la amarisólida (**1**) y los residuos Phe280 y Phe196. Las interacciones observadas entre los compuestos evaluados y la enzima PTP-1B (sitio alostérico) se muestran en detalle en la Tabla 17 y Figuras 56–59.

La búsqueda de nuevos inhibidores de la PTP-1B con alta afinidad en sitios de unión alostéricos, nos proporcionan mayor especificidad y menor posibilidad de generar efectos no deseados, por lo que la presencia de compuestos como las flavonas, representan una estrategia novedosa para el desarrollo de nuevos inhibidores alostéricos de la PTP-1B.

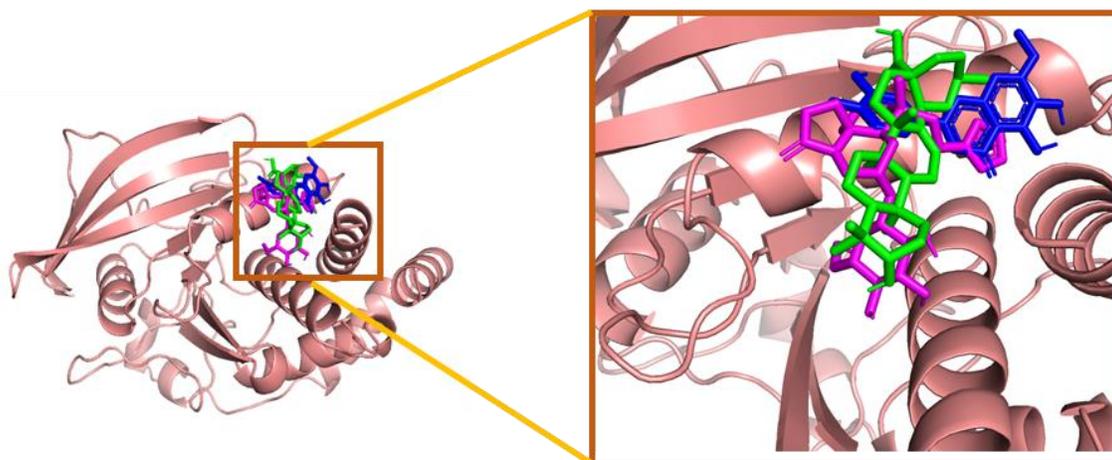


Fig. 53. Posibles sitios de unión para el ácido ursólico (verde), amarisólida (**1**; morado) y pedalitina (**13**; azul) con el sitio alostérico de la enzima PTP-1B (rosa; PDB 1T49).

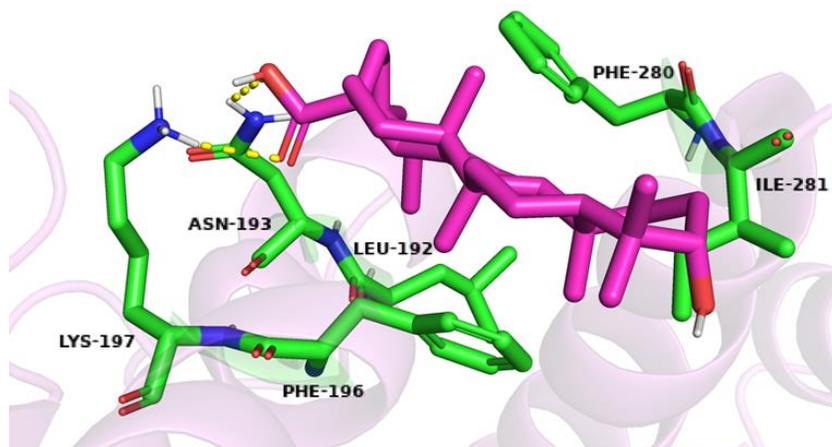


Fig. 54. Representación en 3D del posible modo de unión del ácido ursólico (**1**) con la PTP-1B (sitio alostérico).

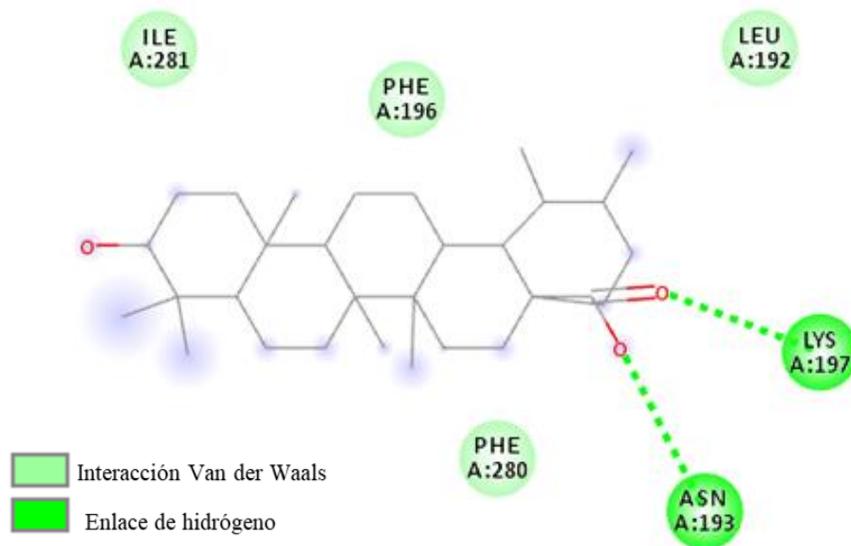


Fig. 55. Interacciones enzima-ligando en 2D del ácido ursólico con la PTP-1B (sitio alostérico).

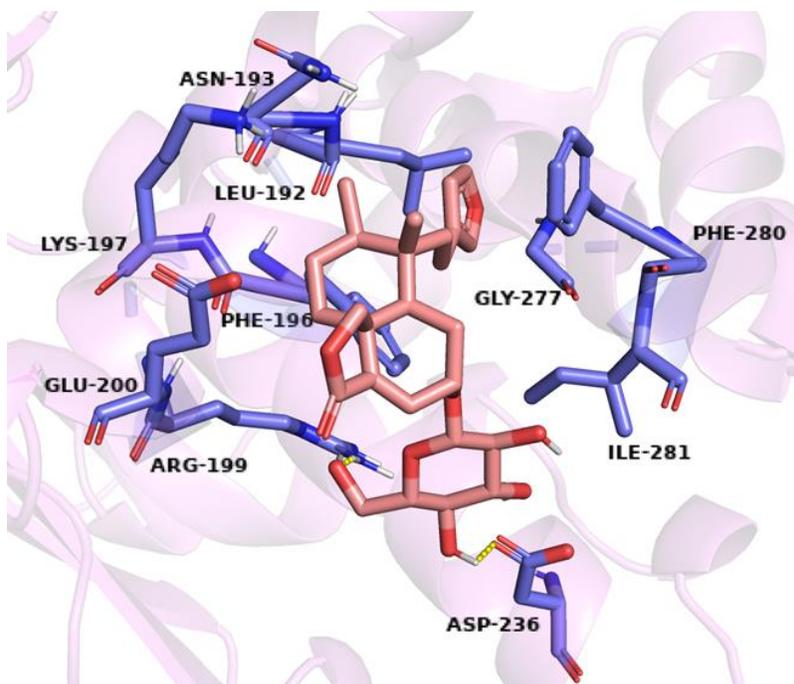


Fig. 56. Representación en 3D del posible modo de unión de la amarísólida (1) con la PTP-1B (sitio alostérico)

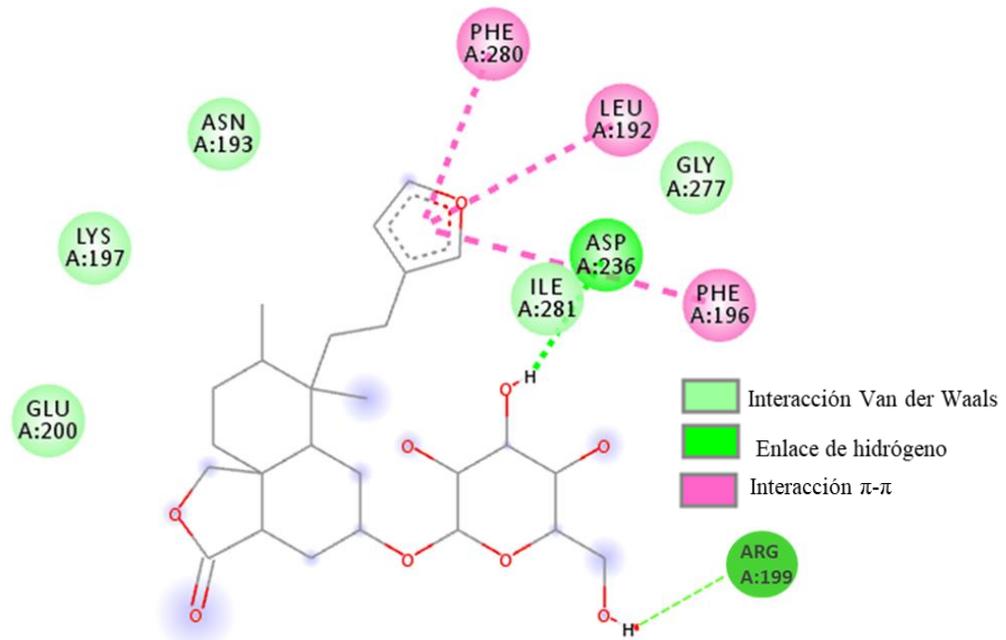


Fig. 57. Interacciones enzima-ligando en 2D de la amarisolida (**1**) con la PTP-1B (sitio alostérico).

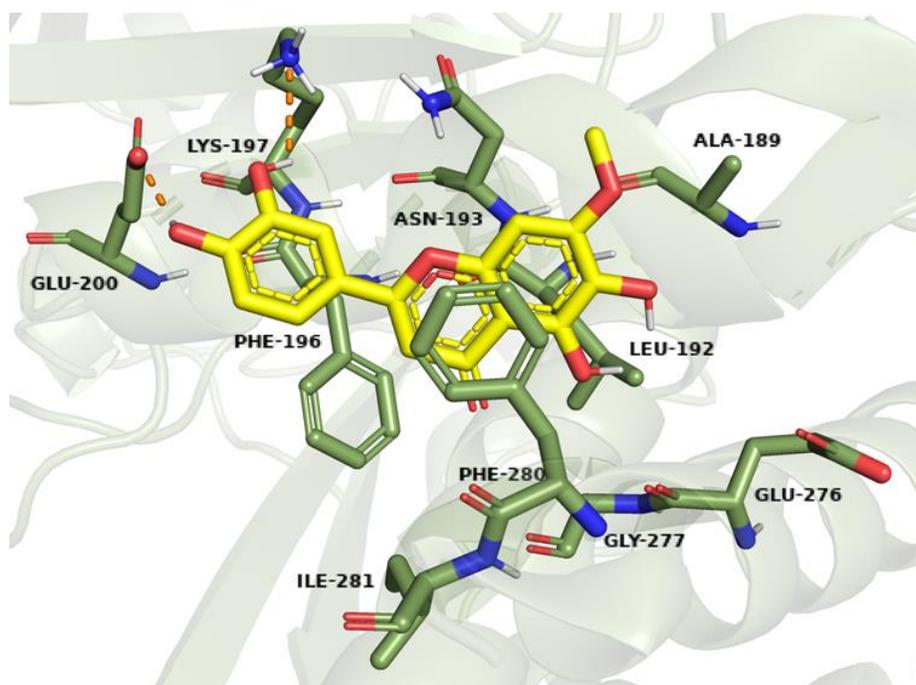


Fig. 58. Representación en 3D del posible modo de unión de la pedalitina (**13**) con la PTP-1B (sitio alostérico).

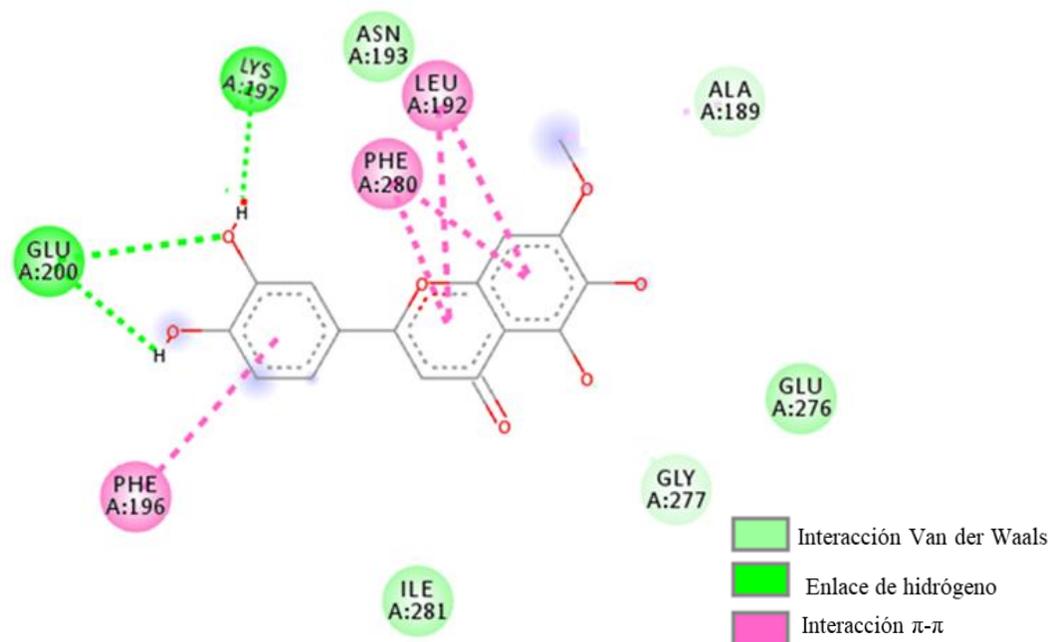


Fig. 59. Interacciones enzima-ligando en 2D de la pedalitina (**13**) con la PTP-1B (sitio alostérico).

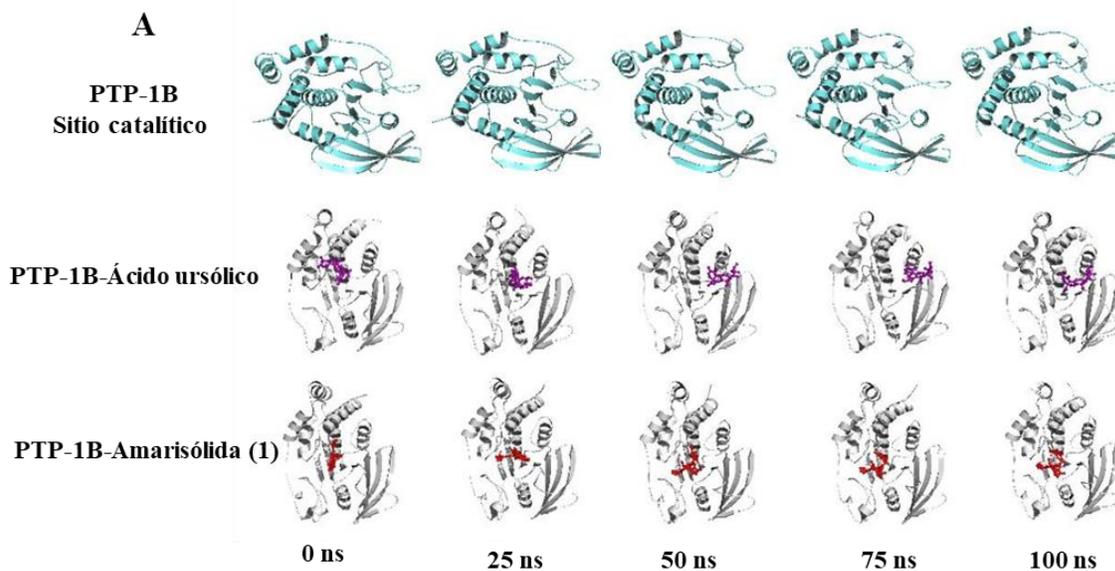
Tabla 17. Principales interacciones entre los compuestos (**1** y **13**) y la enzima PTP-1B en el sitio alostérico.

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones		
		Enlace de hidrógeno	Van der Waals	π - π
Amarisólida (1)	-7.0	Asp236, Arg199	Asn193, Lys197, Glu200, Ile281, Gly277	Phe280, Leu192, Phe196
Pedalitina (13)	-7.5	Lys197, Glu200	Asn193, Ile281, Glu276, Gly277, Ala189	Phe196, Phe280, Leu192
Ácido ursólico	-7.3	Asn193, Lys197	Phe196, Ile281, Leu192, Phe280	

6.1.4.3. Estudios de dinámica molecular

Los estudios de dinámica molecular (DM) nos permiten describir el tipo de unión y las fuerzas de interacción entre moléculas y sus blancos moleculares bajo condiciones específicas. Este método nos permite identificar los cambios conformacionales de la proteína a través del tiempo. Además, los estudios de DM pueden simular sistemas complejos en los que se describe el disolvente, la presencia de iones (Na^+ , Cl^-) la temperatura, la presión, así como la adición de cofactores (Mg^{2+} , Fe^{2+}); así, el sistema adquiere similitud con sistemas biológicos reales generando resultados más confiables (Philips et al., 2005).

Se llevaron a cabo los estudios de DM de los complejos PTP-1B (sitio catalítico)-amarisólida (**1**), PTP-1B (sitio alostérico)-pedalitina (**13**) y PTP-1B (ambos sitios)-ácido ursólico (Fig. 60A y 61A). Todos los complejos PTP-1B-compuestos tienen un valor de ΔG negativo, el cual es coherente con su estabilidad. Según las energías calculadas para los sistemas, el complejo más estable se forma entre la enzima y la pedalitina (**13**) con un valor de ΔG de -31.16 ± 0.46 ; mientras que la estabilidad de los complejos formados con el ácido ursólico y la amarisólida (**1**) son similares entre sí, pues los valores de ΔG son del mismo orden de magnitud (-16.51 ± 0.36 , -17.92 ± 0.61 , respectivamente) (Tabla 18). Los análisis de RMSD de los complejos [enzima-compuesto (**1** y **13**)] es bajo con respecto a la enzima PTP-1B (sitio alostérico y catalítico), que indica la estabilidad conformacional de los complejos (Fig. Fig. 60B y 61B). Con respecto, al análisis de RMSF, se observa un área entre los residuos 27-50 de la enzima PTP-1B, que se estabiliza con los compuestos **1** y **13** (Fig. 60C y 61C). Es importante mencionar que estos resultados correlacionan con las actividades *in vitro* de los productos, pues el complejo más estable se forma con el producto que mostró la mejor actividad.



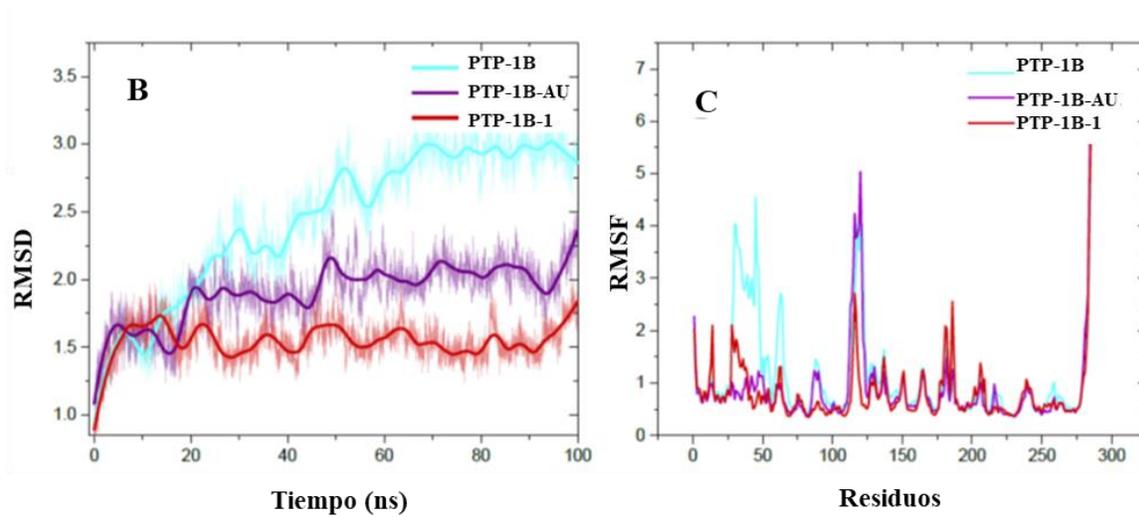
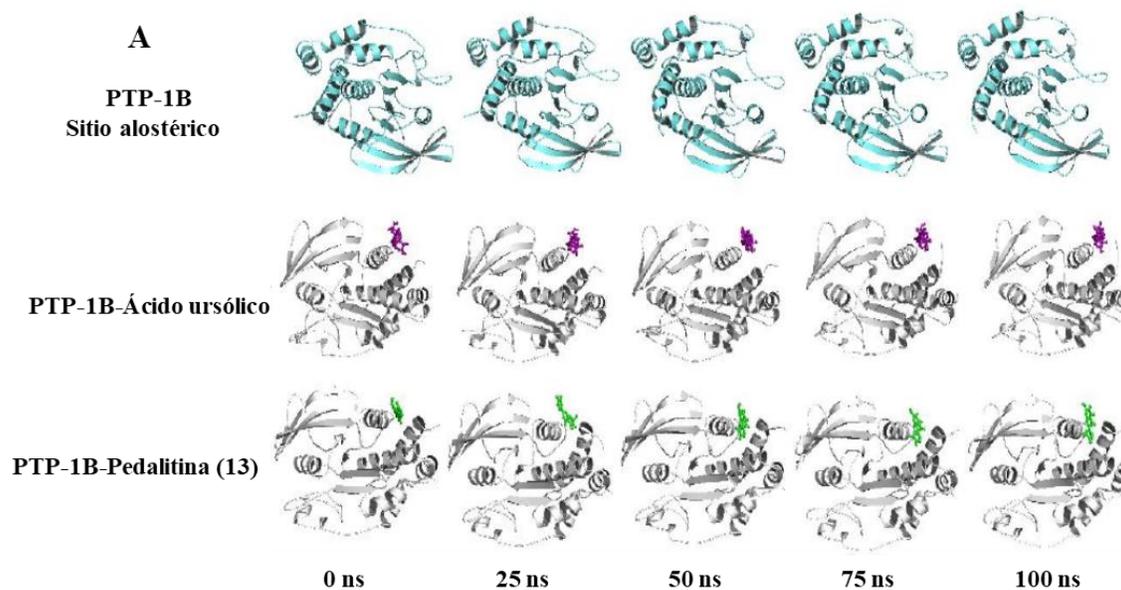


Fig. 60. Análisis de la trayectoria de los estudios de dinámica molecular del sitio catalítico de la PTP-1B para la amarisólida (**1**). (A) Estructura de los modelos. (B) RMSD en función del tiempo.

(C) RMSF desde la trayectoria molecular. AU: Ácido ursólico



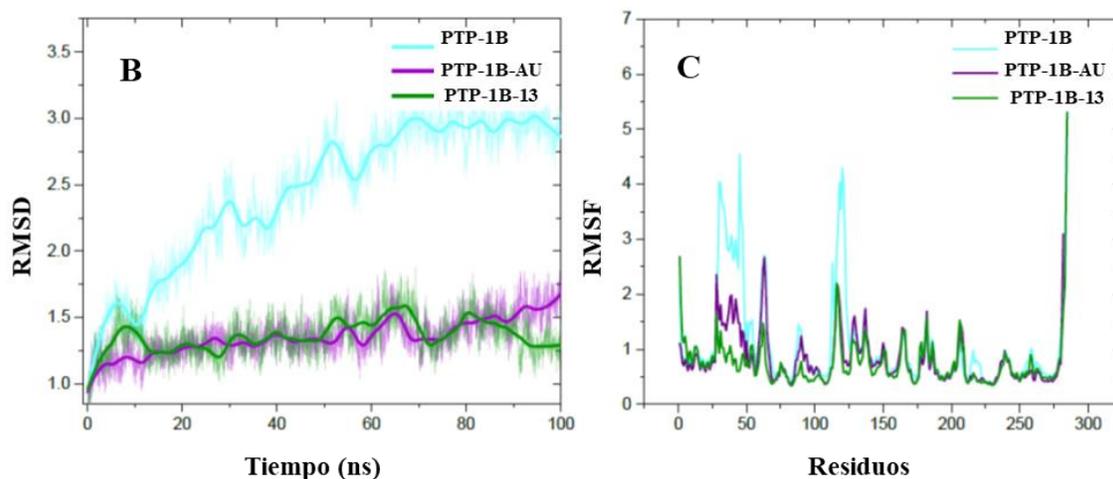


Fig. 61. Análisis de la trayectoria de los estudios de dinámica molecular del sitio alostérico de la PTP-1B para la pedalitina (**13**). (A) Estructura de los modelos. (B) RMSD en función del tiempo. (C) RMSF desde la trayectoria molecular. AU: Ácido ursólico.

Tabla 18. Cálculo de los componentes teóricos de la energía a partir de las trayectorias de DM

Complejo	ΔE_{vdw}	ΔE_{ele}	ΔG_{GB}	ΔG_{NP}	ΔG_{solv}	$\Delta G_{unión}$
PTP-1B-AU ¹	-21.88 ± 0.44	-20.02 ± 1.08	27.60 ± 1.63	-41.91 ± 1.26	25.39 ± 1.04	-16.51 ± 0.36
PTP-1B-AU ²	-28.67 ± 0.23	-1.21 ± 0.46	10.89 ± 0.42	-27.78 ± 0.48	7.73 ± 4.21	-20.05 ± 0.21
PTP-1B-1	-36.22 ± 0.47	-18.53 ± 0.77	41.62 ± 0.55	-54.76 ± 1.00	36.84 ± 0.53	-17.92 ± 0.61
PTP-1B-13	-35.95 ± 0.45	-4.27 ± 0.31	12.90 ± 0.33	-40.22 ± 0.55	9.06 ± 0.33	-31.16 ± 0.46

¹Sitio catalítico; ²Sitio alostérico; ΔE_{vdw} , contribuciones por interacciones de Van der Waals; ΔE_{ele} , energía electrostática; ΔG_{GB} , energía de solvatación polar; ΔG_{NP} , energía de solvatación no polar; ΔG_{solv} , energía libre de desolvatación ($\Delta G_{solv} = \Delta G_{GB} + \Delta G_{NP}$); $\Delta G_{unión}$, afinidad de unión.

6.2. Estudio químico y farmacológico de la especie *S. microphylla*

6.2.1. Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios

Con la finalidad de caracterizar los principios activos presentes en la especie, se realizó el estudio fitoquímico del extracto acuoso obtenido por infusión de las partes aéreas de *S. microphylla*. La selección de este extracto se realizó con base en su efecto inhibitorio de la actividad de la enzima PTP-1B ($CI_{80} = 100 \mu\text{g/mL}$) y su efecto antinociceptivo. El extracto se sometió a varios procesos de fraccionamiento usando técnicas cromatográficas, logrando el aislamiento de los flavonoides ziziflavosido B (**56**) y orientina (**57**) (Fig. 62). La caracterización química de estos productos se realizó con base en el análisis de sus espectros de resonancia magnética y por comparación con los datos previamente reportados en la literatura. Es importante mencionar que estos productos se describen por primera vez para la especie en el presente trabajo.

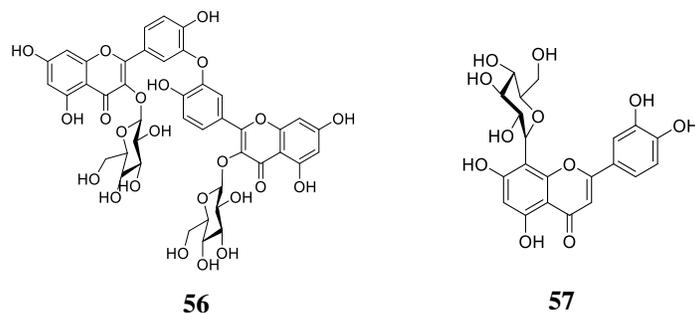


Fig. 62. Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas de *S. microphylla*.

6.2.2. Pruebas de identidad y composición

6.2.2.1. Composición química del aceite esencial

La identificación de los componentes del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de la planta *S. microphylla* (seca) se llevó a cabo por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM). El rendimiento (%) del aceite esencial obtenido de *Salvia microphylla* fue de 0.73 % (w/w). Así, el análisis cromatográfico reveló la presencia de terpenos como el germacreno B, el epóxido de italiceno, el viridiflorol, el carotol y el agarospirol (**73–77**), como compuestos mayoritarios de la esencia de *S. microphylla* (Fig 63). Como se observa en la Tabla 19, se identificaron quince constituyentes, mismos que representan el 99.99 % de la composición del aceite de *S. microphylla*.

Tabla 19. Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de *S. microphylla* en planta seca.

Compuesto	Composición (%)	
	IR ^a Experimental	Seco
α -Pinenol (44)	923	3.14
β -Pinenol (45)	965	2.44
Eucaliptol (68)	1019	5.22
Alcanfor (69)	1135	2.44
β -Cariofileno (39)	1412	5.42
β -Cubebeno (70)	1436	4.74
α -Cariofileno (62)	1446	1.26
(-)- <i>cis</i> -Cadina-1(6),4-dieno (71)	1455	0.81
Germacreno D (63)	1486	2.41
(-)-Calameneno (72)	1512	3.87
Germacreno B (73)	1538	9.80
Epóxido de italiceno (74)	1547	13.17
Viridiflorol (75)	1589	26.46
Carotol (76)	1598	9.75
Agarospirol (77)	1646	9.00
Total		99.99

^aÍndice de retención relativa a series de *n*-alcanos (C₈–C₂₀) sobre una columna DB-5.

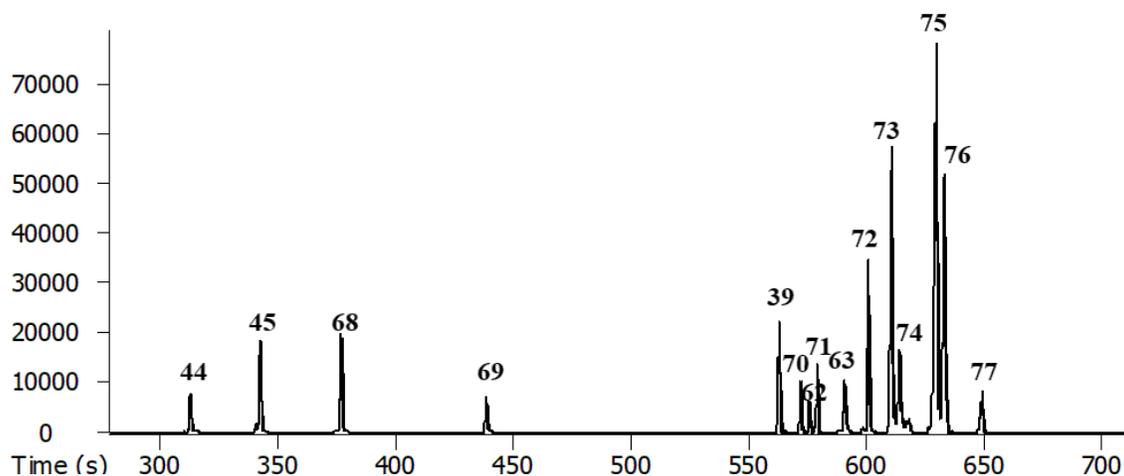


Fig. 63. Cromatograma iónico total del aceite esencial de *S. microphylla* analizado en una columna capilar DB-5.

Estudios previos del análisis químico de aceites esenciales de *Salvia microphylla* recolectada en otras regiones han podido identificar al α -pineno (**44**), el β -pineno (**45**), el β -cariofileno (**39**), el α -cariofileno (**62**), el alcanfor (**69**) y el viridiflorol (**75**). Además, éstos compuestos han sido identificados en el aceite esencial de nuestra planta (Marchioni et al., 2020; Aydogmus et al., 2006; Lima et al., 2012; Koutsaviti et al., 2018). En el presente estudio, la composición química del aceite esencial presenta similitudes a los previamente reportados.

6.2.2.2. Microextracción en fase sólida de los compuestos volátiles

En el presente estudio se utilizó una fibra con recubrimiento de divinil benceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) que permite la extracción de terpenoides de mediana polaridad que se encuentran en la mezcla volátil de la planta. El resultado obtenido a partir de este análisis permitió identificar 25 de 30 constituyentes, mismos que representan el 93.23 % de la composición total de volátiles, siendo el éter de cadineno (**85**) y la bourbonanona (**86**) entre los principales componentes (Tabla 20 y Fig. 64). La composición química identificada para *S. microphylla* recolectada en México muestra similitud con la reportada para la especie italiana por Ilaria Marchioni y colaboradores (2020). De tal forma que los componentes volátiles contienen el eucaliptol (**68**), el acetato de isobornilo (**48**), el δ -cadineno (**84**), el α -eudesmol (**36**), el β -eudesmol (**19**), el 10-epi- γ -eudesmol (**91**) y la (+)-valeranona (**94**). Aunque, no son los compuestos mayoritarios de la mezcla volátil, uno de ellos, se puede seleccionar como marcador de la composición volátil de la planta.

Los componentes minoritarios volátiles de *S. microphylla* que coinciden con los componentes de la esencia son el eucaliptol (**68**), el β -cubebeno (**70**), el germacreno B (**73**) y el viridiflorol (**75**) (Tabla

19 y Tabla 20). En este caso, los resultados cualitativos obtenidos en cada caso están en armonía, de tal manera que la MEFS puede ser utilizada como una técnica complementaria, rápida y eficiente para la detección de compuestos volátiles.

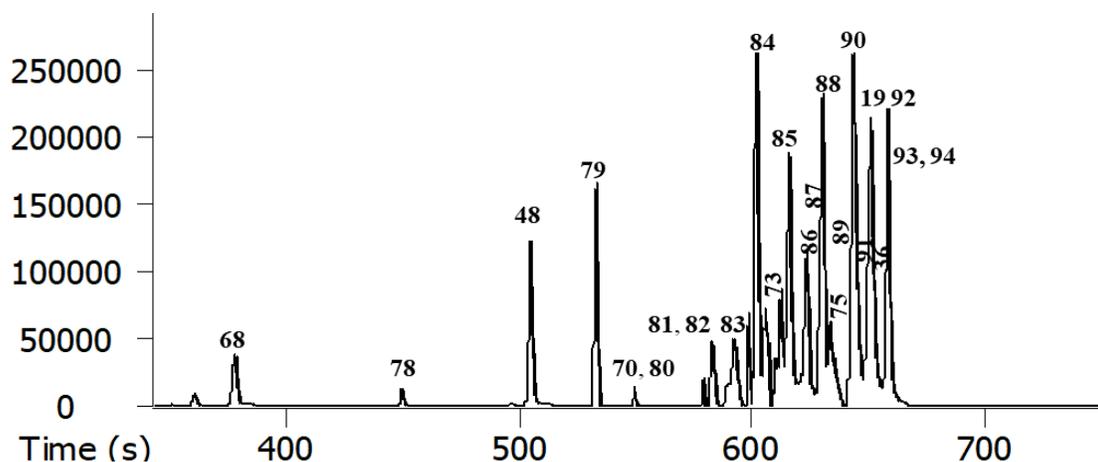


Fig. 64. Cromatograma iónico total de los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de *S. microphylla* analizado en una columna capilar DB-5 por la técnica de MEFS.

Tabla 20. Componentes volátiles de las partes aéreas de *S. microphylla* obtenidos por MEFS. (continuación).

Compuesto	Composición (%)	
	IR ^a Experimental	Seco
ND ^b	638	0.49
ND ^b	991	0.17
Eucaliptol (68)	1021	0.98
Isoborneol (78)	1156	0.74
Acetato de isobornilo (48)	1274	2.81
α -Cubebeno (79)	1340	1.90
β -Cubebeno (70)	1378	0.83
Sativeno (80)	1385	0.93
ND ^b	1477	0.21
α -Amorfeno (81)	1487	2.73
γ -Gurjuneno (82)	1488	2.69
ND	1489	2.69
α -Vetispirano (83)	1491	2.69
ND ^b	1513	3.21
δ -Cadineno (84)	1514	3.13
Germacreno B (73)	1542	2.21

Tabla 20. Componentes volátiles de las partes aéreas de *S. microphylla* obtenidos por MEFS.

Compuesto	Composición (%)	
	IR ^a Experimental	Seco
Éter de cadineno (85)	1551	8.26
Bourbonanona (86)	1560	8.26
ND ^b	1569	2.65
Cariofilenol (87)	1571	2.65
β -Vatireno (88)	1585	3.39
Viridiflorol (75)	1589	3.39
Hinesol (89)	1627	6.27
Muurola-4,10 (14)-dieno-1 β -ol (90)	1628	6.33
10-epi- γ -eudesmol (91)	1631	6.35
β -Eudesmol (19)	1648	5.05
α -Eudesmol (36)	1650	5.05
Khusilol (92)	1652	5.05
Valerianol (93)	1654	5.05
(+)-Valeranona (94)	1672	3.69
Total		99.99

^aÍndice de retención relativa a series de *n*-alcanos (C₈-C₂₀) sobre una columna DB-5.

^bNo determinado.

6.2.3. Ensayos biológicos

6.2.3.1. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la enzima α -glucosidasa de levadura

La infusión de *S. microphylla* y los compuestos aislados se evaluaron frente a la α -glucosidasa de levadura. Esta actividad no contemplada inicialmente, se realizó con base en consideraciones quimiotaxonómicas y considerando que los compuestos aislados son de naturaleza flavonoide. Los resultados de estas determinaciones indicaron que los productos **56** y **57** inhiben la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura de manera dependiente de la concentración. Los valores de las CI₅₀ y de los % de inhibición se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Actividad del extracto acuoso, aceite esencial y los compuestos (**56** y **57**) de *S. microphylla* en la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Muestra	α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Actividad Inhibitoria CI ₅₀ \pm DE (μ M)
Extracto acuoso ^a	2 %
Aceite esencial (planta seca) ^b	386 \pm 1
56	195 \pm 2
57	280 \pm 11
Acarbosa ^c	590 \pm 2

^aPorcentaje de inhibición a 1000 ppm; ^bIC₅₀ μ g/mL; ^cControl positivo

La actividad de los metabolitos **56** y **57** resultó mejor que la del control positivo (acarbosa). Aunque el efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de las α -glucosidasas de flavonoides es bien conocida, el efecto del glucósido **56** se describe por primera vez. Estudios recientes han demostrado que compuestos de naturaleza biflavonoide y flavonoide C-glucósido poseen actividad sobre las enzimas α -glucosidasas (Mata et al., 2019; Xiao et al., 2013). El extracto acuoso, sin embargo, no presenta actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa. Por lo tanto, se podría inferir que los metabolitos **56** y **57** presentes en el extracto acuoso coexisten con productos con un efecto contrario, y a priori se puede inferir que el extracto no sería útil como inhbidor de α -glucosidasas. El aceite esencial mostró una moderada actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa con una CI_{50} de 386 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A pesar de que estudios recientes han demostrado que el viridiflorol (**75**; componente mayoritario del aceite esencial de *Salvia microphylla*) no posee actividad sobre la enzima α -glucosidasa de levadura (Rehman et al., 2020). Esta información permite especular que los otros componentes del aceite esencial de *Salvia microphylla* son los responsables del efecto moderado sobre la enzima α -glucosidasa. De nueva cuenta queda como perspectiva la evaluación de los compuestos de *Salvia microphylla* sobre las α -glucosidasas de mamíferos.

6.2.3.2. Ensayo *in vitro* sobre la actividad de la enzima PTP-1B del extracto acuoso y compuestos puros

Siguiendo el mismo razonamiento señalado en el inciso anterior, el extracto acuoso y los compuestos **56** y **57** se evaluaron contra la PTP-1B. Los resultados indicaron que el extracto acuoso inhibió la actividad de la enzima PTP-1B con una la CI_{80} de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 22). Esta información podría proporcionar evidencia para el uso del preparado tradicional como agente hipoglucemiante. Los productos naturales **56** y **57** mostraron actividad inhibitoria contra la enzima PTP-1B cuando se compararon con el control positivo, el ácido ursólico ($CI_{50} = 28 \pm 1 \mu\text{M}$). Los metabolitos **56** y **57** inhiben la actividad de la enzima PTP-1B de manera dependiente de la concentración. Las CI_{50} y los % de inhibición se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Actividad del extracto acuoso y los compuestos **56** y **57** de *S. microphylla* en la enzima PTP-1B.

Muestra	PTP-1B Actividad inhibitoria $CI_{50} \pm \text{DE}$ (μM)
Extracto acuoso ^a	83 %
56	108 \pm 4
57	94 \pm 3
Ácido ursólico ^b	28 \pm 1

^aPorcentaje de inhibición a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ^bControl positivo

La actividad de los metabolitos **56** y **57** fue menor que la del control positivo (ácido ursólico). Es importante mencionar que el extracto acuoso de *S. microphylla* puede ser una fuente natural, para la obtención de nuevos inhibidores de la enzima PTP-1B y así obtener nuevos fármacos para el tratamiento de la DMT-2.

6.2.3.3. Evaluación del potencial antinociceptivo

La evaluación del potencial antinociceptivo se realizó mediante la aplicación de la prueba de la formalina. La inyección de formalina en la pata del ratón produce una respuesta dolorosa bifásica (lamida o mordisqueo), la primera fase, de corta duración, se debe a la activación de los nociceptores de la pata; y la segunda (10–50 minutos después de la inyección) se debe a una respuesta inflamatoria con sensibilización de las neuronas nociceptoras de la médula espinal (Lee et al., 2011). Como control positivo se utilizó el DIC.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la infusión de *S. microphylla* mediante el ensayo de formalina indican su actividad antinociceptiva; el tiempo de lamida (s) de los ratones administrados con la dosis de 31.6 y 316 mg/kg del preparado se redujo significativamente como se puede observar en las gráficas del curso temporal (Fig. 65) y del área bajo la curva (ABC, Fig. 66A). El efecto antinociceptivo del extracto acuoso se mantuvo en las dos fases. En la fase 1 (Fig. 66B) el mejor efecto se observó en las dosis de 31.6 y 316 mg/kg, en tanto que en la fase 2 se mantuvo la dosis de 316 mg/kg (Fig. 66C).

Estos resultados sugieren que el extracto acuoso presenta un efecto antinociceptivo por medio de mecanismos acción diferentes; fue activo contra el dolor del tipo neurogénico, el cual se relaciona a la estimulación de nociceptores, y contra el dolor inflamatorio mediado por mecanismos inflamatorios y de sensibilización central del asta dorsal.

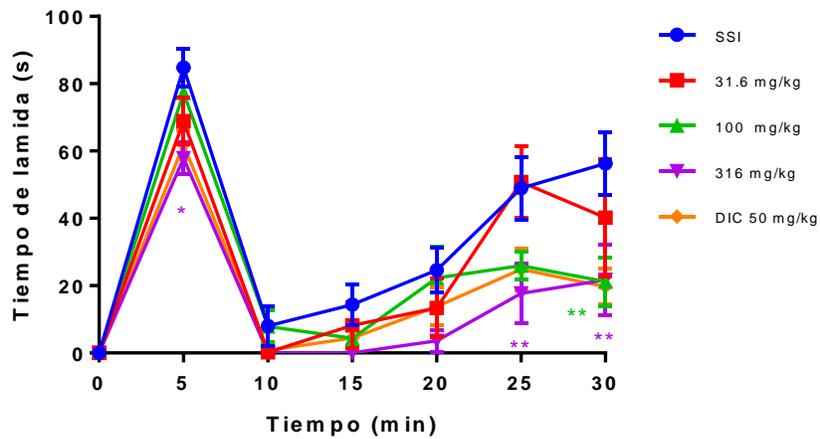


Fig. 65. Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *S. microphylla* en el modelo de la formalina en ratones. SSI: Solución salina (0.9 %). DIC: Diclofenaco (50 mg/kg). Cada medida representa el promedio \pm el EEM con $n=8$. Prueba estadística: ANADEVa de dos vías con una prueba *post hoc* de Bonferroni.

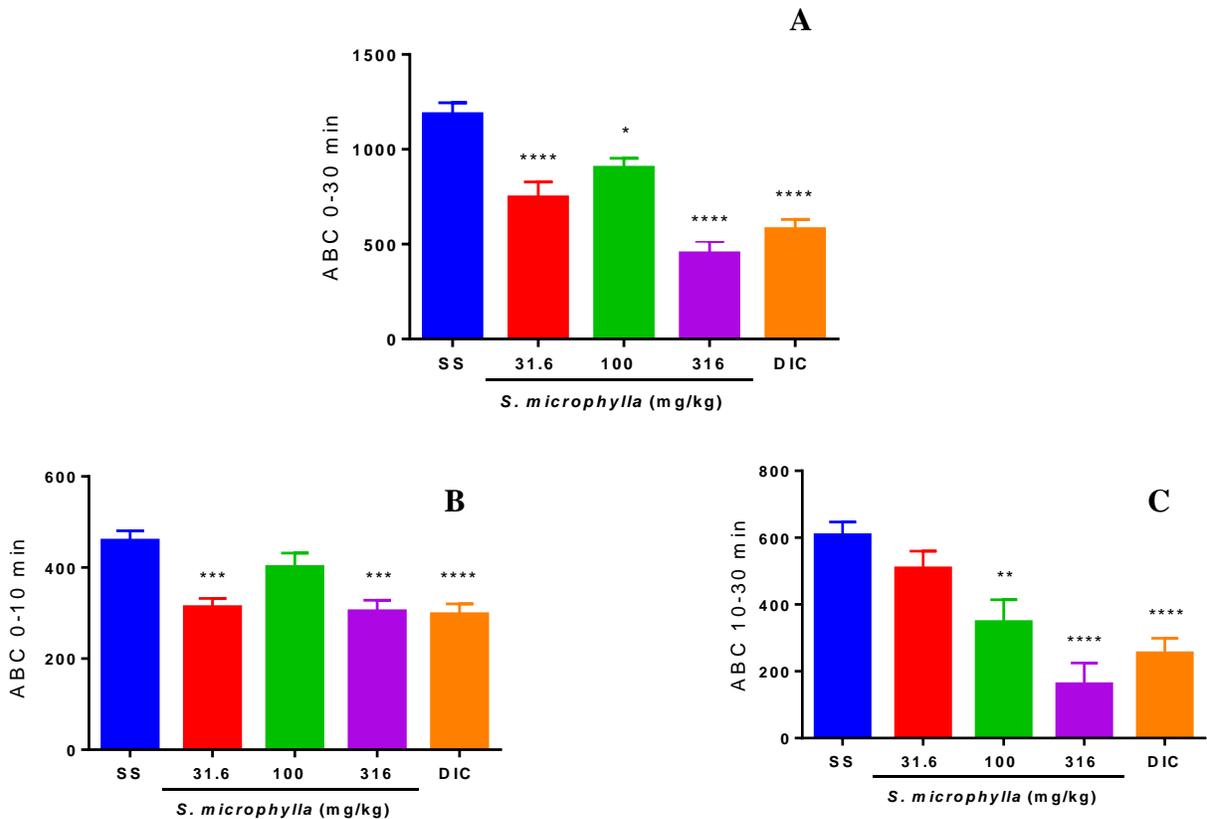


Fig. 66. El efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *S. microphylla* en el modelo de la formalina en ratones. SSI: Solución salina (0.9 %). DIC: Diclofenaco (50 mg/kg). (A) ABC total (0–30 min) del tiempo de lamida. (B) ABC de la fase 1. (C) ABC de la fase 2. Cada barra representa el promedio \pm EEM con $n=8$. * = $p < 0.05$ %, prueba estadística: ANADEVa de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett.

Por otra parte, el aceite esencial de *S. microphylla* mediante el ensayo de formalina indican su actividad antinociceptiva, el tiempo de lamida (s) de los ratones administrados con la dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg del aceite esencial se redujo significativamente como se puede observar en las gráficas del curso temporal (Fig. 67) y del área bajo la curva (ABC, Fig. 68A). El efecto antinociceptivo del aceite esencial se mantuvo en las dos fases. En la fase 1 (Fig. 68B) el mejor efecto se observó a las dosis de 31.6 y 316 mg/kg, en tanto que en la fase 2 se mantuvo la dosis de 31.6 mg/kg con mayor efecto (Fig. 68C).

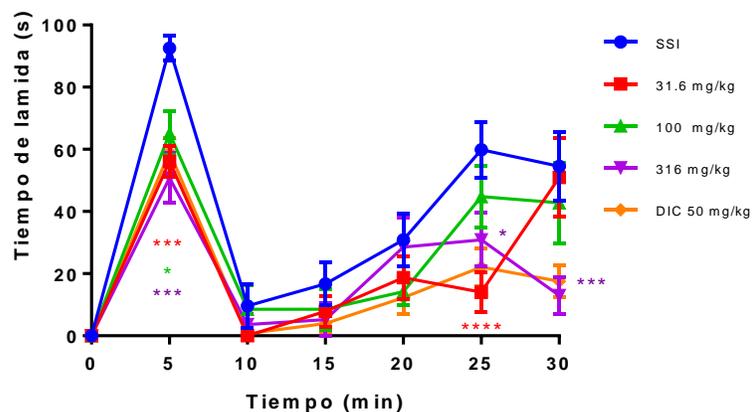


Fig. 67. Curso temporal del efecto antinociceptivo del aceite esencial de *S. microphylla* en el modelo de la formalina en ratones. SSI: Solución salina (0.9 %). DIC: Diclofenaco (50 mg/kg). Cada medida representa el promedio \pm EEM con $n=8$. Prueba estadística: ANADEVa de dos vías con una prueba *post hoc* de Bonferroni.

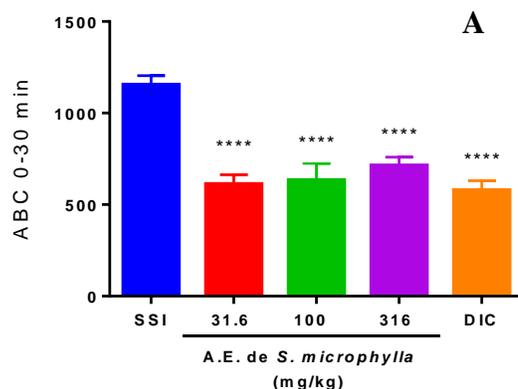


Fig. 68. El efecto antinociceptivo del aceite esencial (A. E.) de *S. microphylla* en el modelo de la formalina en ratones. SSI: Solución salina (0.9%). DIC: Diclofenaco (50 mg/kg). A. Gráfico de ABC total (0-30 min) del tiempo de lamida. B. Gráfico de ABC de la fase 1. C. Gráfico del ABC de la fase 2. Cada barra representa el promedio \pm EEM con $n=8$. * = $p < 0.05$ %, prueba estadística: ANADEVa de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett (*continuación*).

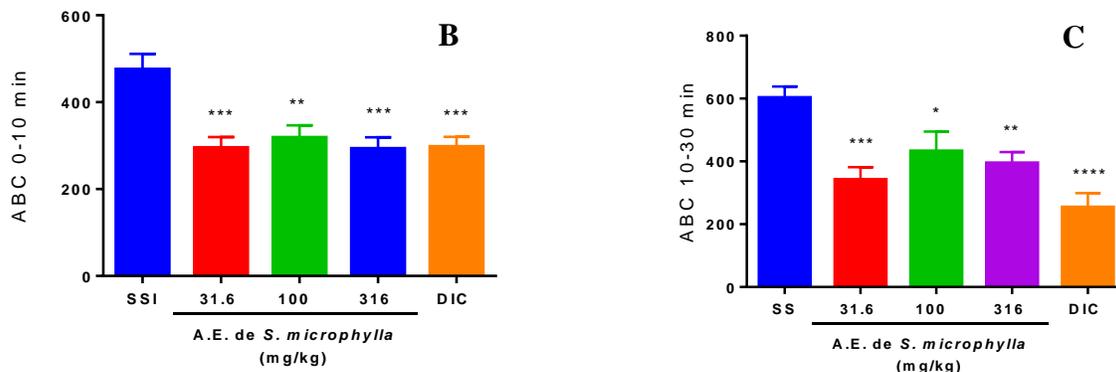


Fig. 68. El efecto antinociceptivo del aceite esencial (A. E.) de *S. microphylla* en el modelo de la formalina en ratones. SSI: Solución salina (0.9%). DIC: Diclofenaco (50 mg/kg). A. Gráfico de ABC total (0-30 min) del tiempo de lamida. B. Gráfico de ABC de la fase 1. C. Gráfico del ABC de la fase 2. Cada barra representa el promedio \pm EEM con $n=8$. * = $p < 0.05$ %, prueba estadística: ANADEVIA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett.

En conjunto estos resultados indican que el aceite esencial de *S. microphylla* ejerce un efecto antinociceptivo por mecanismos de acción diferentes. El aceite esencial en la dosis de 31.6 mg/kg tuvo un efecto mayor contra el dolor de tipo neurogénico e inflamatorio. Cabe mencionar, que es altamente probable que el sesquiterpeno viridiflorol (**75**) contribuya al efecto antiinflamatorio (segunda fase en el modelo de formalina) del aceite esencial de la planta; en estudios previos se encontró que la administración oral del compuesto **75** (3 y 30 mg/kg) disminuye de manera significativa el edema inducido por carragenina en ratones de tipo Swiss. En ese mismo modelo se encontró que el viridiflorol (**75**) disminuye la migración de leucocitos (células inflamatorias) (Trevizan et al., 2016).

Por último, la actividad antinociceptiva de preparados y aceites esenciales de algunas plantas del género *Salvia* ha sido comprobada, como *Salvia plebeia* R. Br., *Salvia wiedemannii* Boiss., *Salvia semiatrata* Zucc. (Ortiz-Mendoza et al., 2020), *Salvia officinalis* L. (Ghorbani y Esmailizadeh, 2017), *Salvia miltiorrhiza* (Bisio et al., 2019), *Salvia divinorum* (Martínez-Mayorga et al., 2017; Crowley et al., 2020; Tlacomulco-Flores et al., 2019) y *Salvia amarissima* (Moreno-Pérez et al., 2019). En la mayoría de los casos la actividad se atribuye a la presencia de flavonoides, sesquiterpenos, diterpenos (clerodano y labdano) y triterpenos.

6.2.4. Estudios de acoplamiento molecular

6.2.4.1. Enzima α -glucosidasa de *S. cerevisiae*.

Con la finalidad de predecir el sitio de unión del ziziflavosido B (**56**) frente a la α -glucosidasa de levadura, se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular utilizando la estructura obtenida por difracción de rayos X de la α -glucosidasa de levadura (código PDB 3A4A), ya que esta fue la enzima utilizada en la evaluación biológica. El protocolo utilizado se validó reproduciendo el modo de unión de la glucosa en el sitio catalítico (RMSD = 0.811 Å), para posteriormente modelar al compuesto **56**. Adicionalmente, se modeló el modo de unión del control positivo, la acarbosa (Fig. 39-41). El análisis predijo que el compuesto **56** se une a un sitio diferente al catalítico ($\Delta G = -9.2$ kcal/mol) (Fig. 69 y 70). Las principales interacciones consistieron en enlaces de hidrógeno con residuos del dominio A (Asp362, Asp363, Lys400, Glu435, Leu323 y Gly361), de tipo π -amida con Ala438 y diversas interacciones de Van der Waals, entre las más importantes (Fig. 71 y 72) (Tabla 23). El resultado obtenido concuerda con lo observado experimentalmente en la evaluación con la enzima α -glucosidasa de levadura.

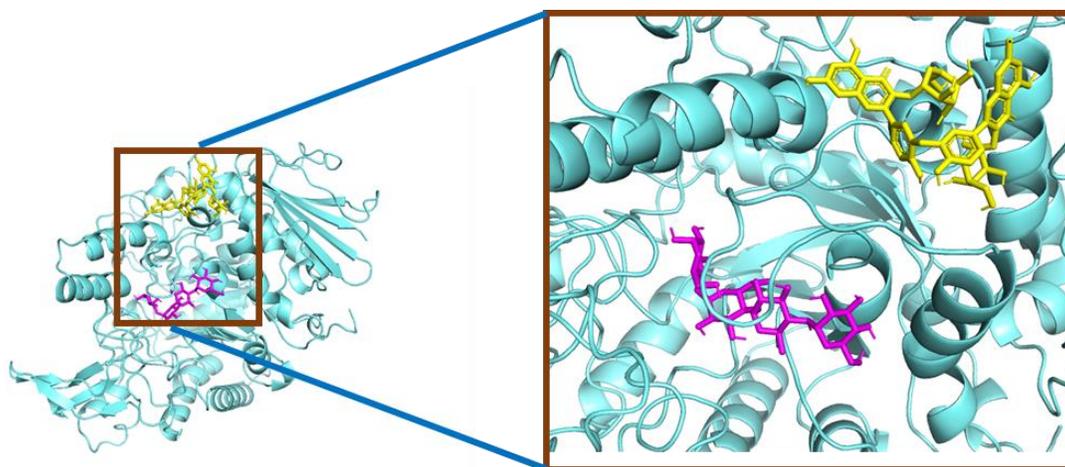


Fig. 69. Posibles sitios de unión para la acarbosa (morado) y el ziziflavosido B (**56**; amarillo) con la enzima α -glucosidasa *S. cerevisiae* (azul; PDB 3A4A).

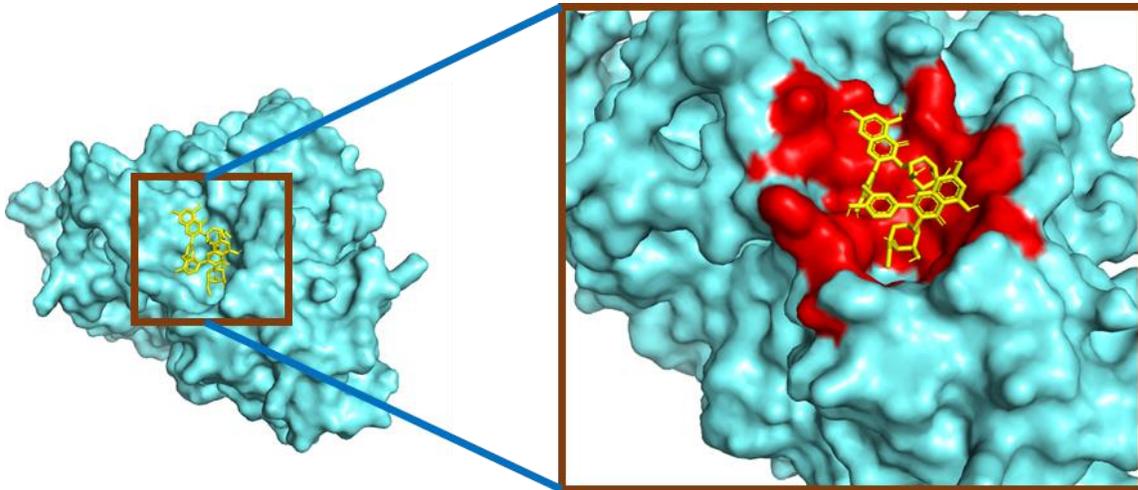


Fig. 70. Representación de la superficie de la enzima α -glucosidasa que interacciona con el ziziflavosido B (**56**; amarillo).

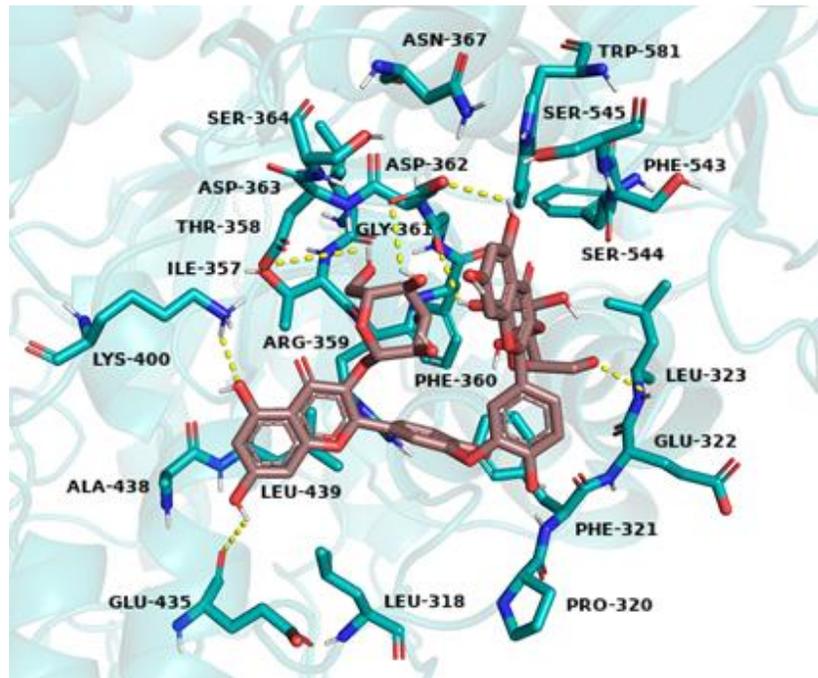


Fig. 71. Representación en 3D del posible modo de unión del ziziflavosido B (**56**) con la enzima α -glucosidasa de levadura.

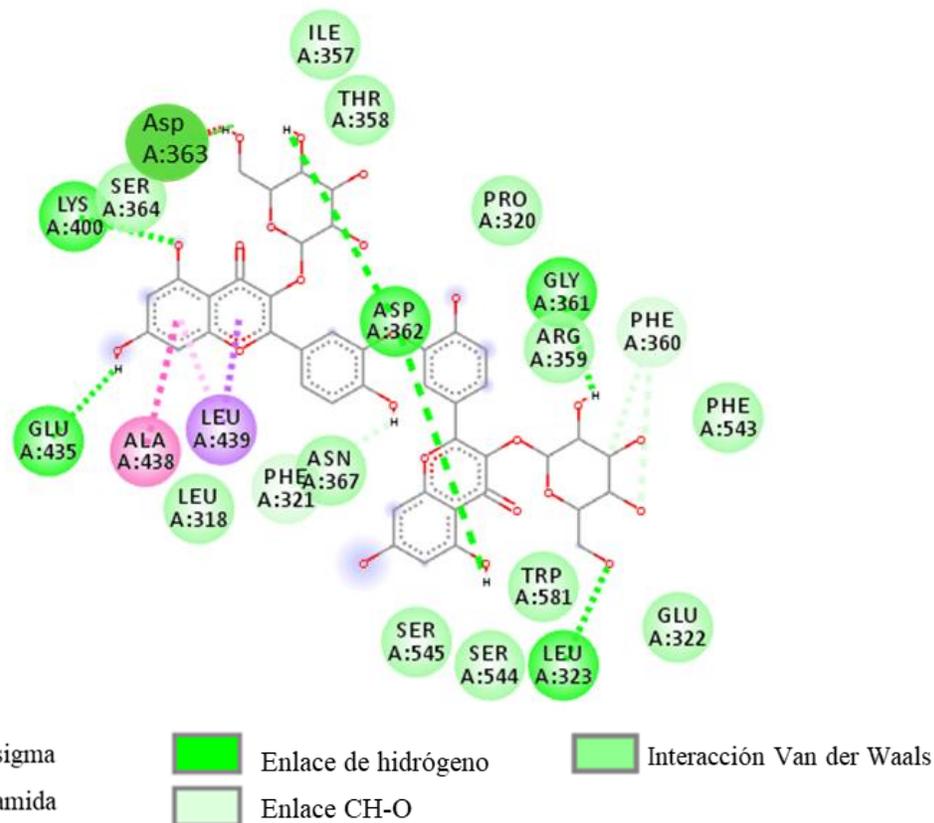


Fig. 72. Interacciones enzima-ligando en 2D del ziziflavosido B (**56**) con la α -glucosidasa de levadura.

Tabla 23. Principales interacciones entre el ziziflavosido B (**56**), la acarbosa y la enzima α -glucosidasa de levadura.

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones			
		Enlace de hidrógeno	Van der Waals	Enlace CH-O	π -sigma/ π -amida
Ziziflavosido B (56)	-9.2	Asp363,Lys400, Glu435,Asp362, Leu323, Gly361	Asn367, Leu318, Ser364, Ile357, Thr358, Pro320, Phe543,Arg359, Glu322, Trp581, Ser544, Ser545	Phe360, Phe321	Leu439, Ala438
Acarbosa	-9.0	Ser304, Thr310, Asp307,Asp242, Pro312, Arg315, Asn415, Glu411	Gly309, Val308, Ala329, Glu332, Gln279, Phe303, His280, Tyr158, Phe159, Tyr316, Phe314, Ser240, Ser311	Leu313	

6.2.4.2. Enzima PTP-1B

6.2.4.2.1. Sitio catalítico

Con el mismo propósito de predecir el posible sitio de unión del compuesto **57**, inhibidor de la PTP-1B, se llevó a cabo el análisis de acoplamiento molecular. En este caso se utilizó la estructura de la PTP-1B obtenida por difracción de rayos X (PDB 1G7F). Para validar el método, se emuló la interacción del ácido {4-[(2*S*)-2-([(1*S*)-1-carboxi-2-feniletil]carbamoil)amino]-3-oxo-3-(pentilamino)propil]fenoxi}malónico con la PTP-1B (RMSD = 1.686 Å). Los resultados indicaron que la orientina (**57**) se une en el sitio catalítico con una energía de unión de -7.9 kcal/mol, la cual es ligeramente inferior a la mostrada por el ácido ursólico -8.5 kcal/mol (Tabla 24) (Fig. 73 y 74). El compuesto **57** mostró interacciones con los residuos catalíticos Asp181, Arg221 y Tyr46. Además, formó enlaces de hidrógeno con los aminoácidos Gln262, Gly220, Cys215, Glu115 y Gly183 (Tabla 24) (Fig. 75 y 76).

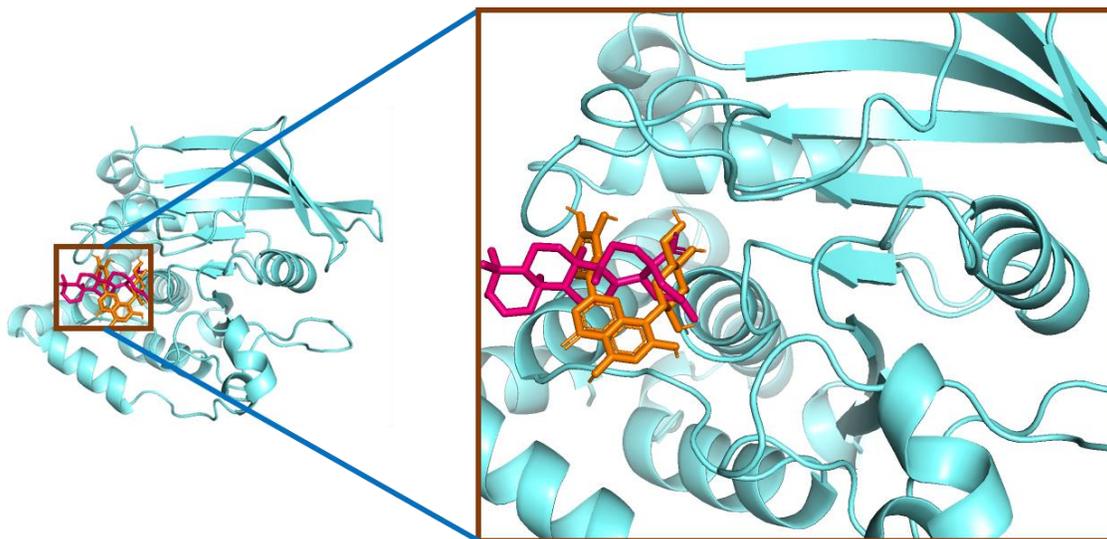


Fig. 73. Posibles sitios de unión para el ácido ursólico (morado) y la orientina (**57**; naranja) con la PTP-1B (azul; PDB 1G7F).

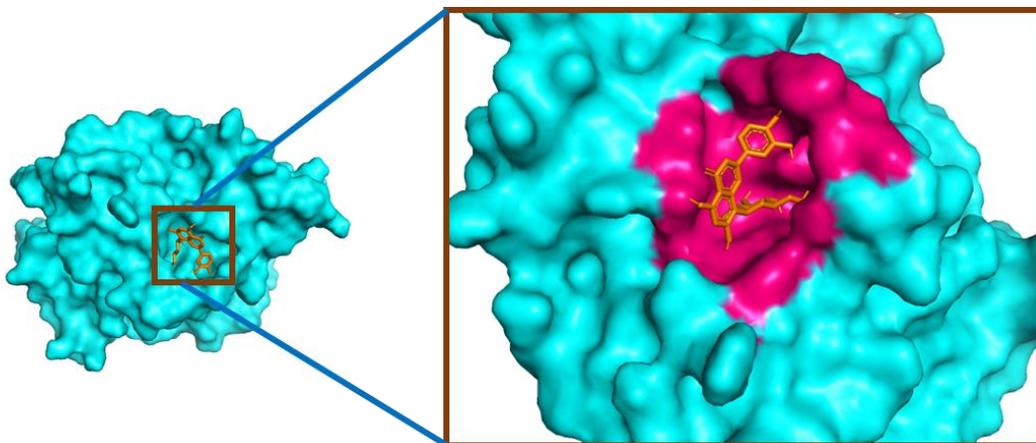


Fig. 74. Representación de la superficie de la enzima PTP-1B (sitio catalítico) que interacciona con la orientina (**57**; naranja).

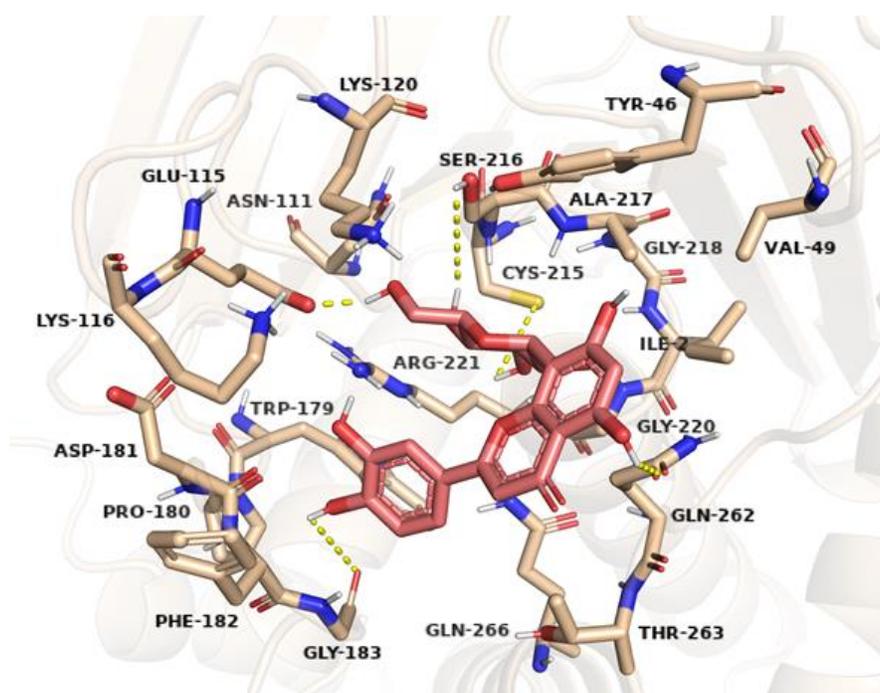
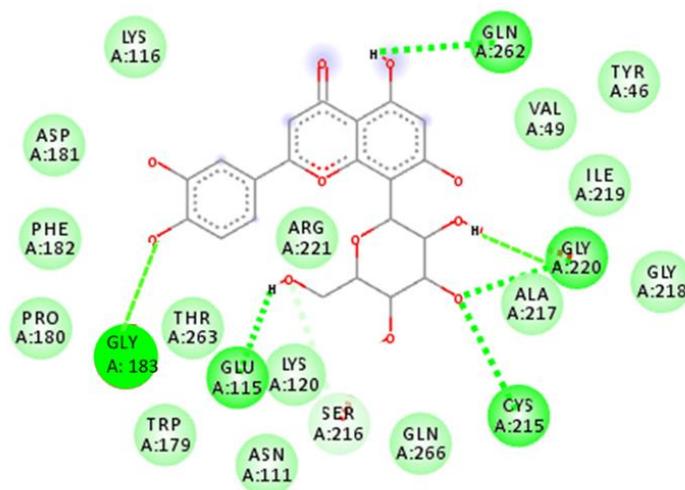


Fig. 75. Representación en 3D del posible modo de unión de la orientina (**57**) con la enzima PTP-1B (sitio catalítico).



Enlace de hidrógeno
 Enlace CH-O
 Interacción Van der Waals

Fig. 76. Interacciones enzima-ligando en 2D de la orientina (**57**) con la PTP-1B (sitio catalítico).

Tabla 24. Principales interacciones entre la orientina (**57**) y la enzima PTP-1B en el sitio catalítico.

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones		
		Enlace de hidrógeno	Van der Waals	Enlace CH-O
Orientina (57)	-7.9	Gln262, Gly220, Cys215, Glu115, Gly183	Lys116, Asp181, Phe182, Pro180, Thr263, Trp179, Asn111, Arg221, Gln266, Ala217, Gly218, Ile219, Val49, Tyr46, Lys120	Ser216
Ácido ursólico	-8.5	Glu115, Arg221, Ser216	Phe182, Gly183, Asp181, Lys120, Tyr46, Cys215, Ala217, Gly218, Ile219, Gly220, Gln266, Gln262, Thr263	

6.2.4.2.2. Sitio alostérico

Con el objetivo de predecir el posible sitio y el modo de unión de la orientina (**57**) en el sitio alostérico de la PTP-1B, se realizaron estudios de acoplamiento molecular utilizando la estructura cristalizada PDB 1T49 (Fig. 77 y 78). El análisis predice la formación de tres puentes de hidrógeno con los aminoácidos Asn193, Lys197 y Glu276. También parecen intervenir interacciones electrostáticas de Van der Waals con los aminoácidos Ser190 y Glu200. Finalmente, se observan interacciones π - π formadas con los residuos Phe196, Phe280, Leu192 y Ala189. Las interacciones observadas entre el compuesto **57** y la enzima PTP-1B (sitio alostérico) se muestran a detalle en la Tabla 25 y Figuras 79 y 80.

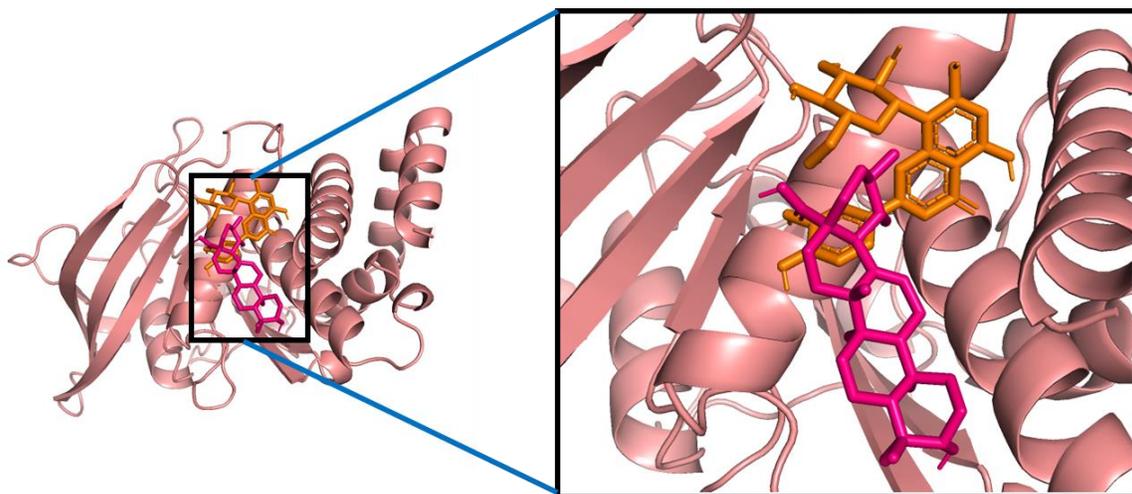


Fig. 77. Posibles sitios de unión para el ácido ursólico (morado) y la orientina (**57**; naranja) con la PTP-1B (rosa; PDB 1T49).

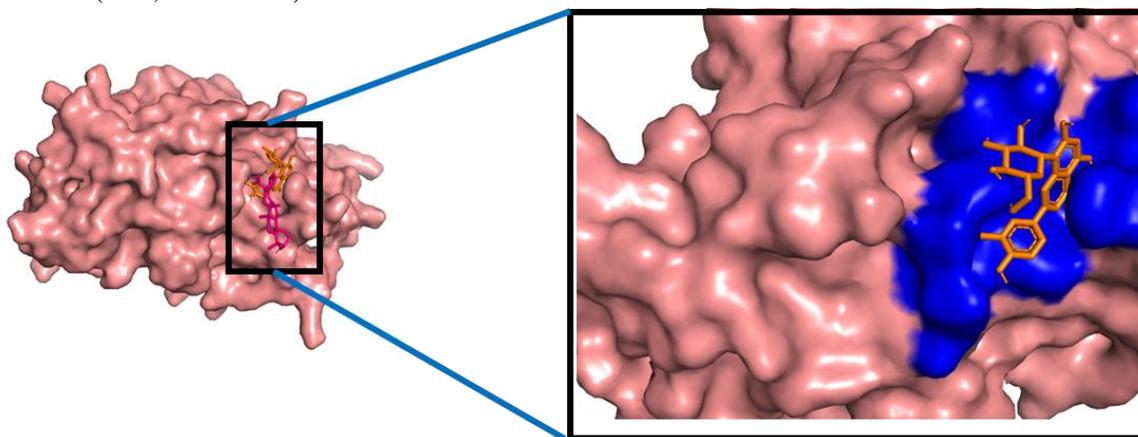


Fig. 78. Representación de la superficie de la enzima PTP-1B (sitio alostérico) que interacciona con la orientina (**57**; naranja).

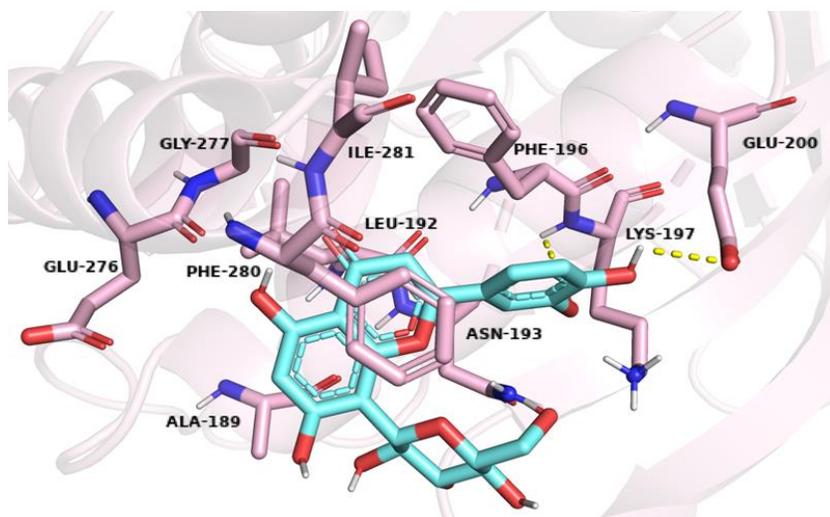


Fig. 79. Representación en 3D del posible modo de unión de la orientina (**57**) con la enzima PTP-1B (sitio alostérico).

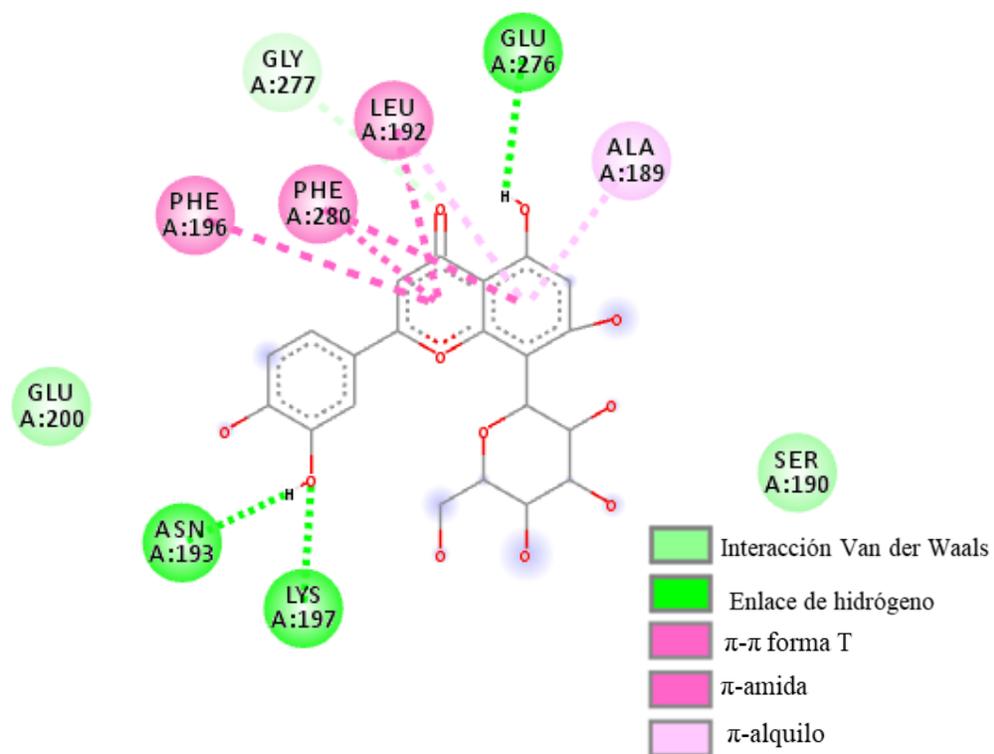


Fig. 80. Interacciones enzima-ligando en 2D de la orientina (**57**) con la PTP-1B (sitio alostérico).

Tabla 25. Principales interacciones entre la orientina (57) y la enzima PTP-1B en el sitio alostérico.

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones		
		Enlace de hidrógeno	Van der Waals	π - π forma T/ π -amida/ π -alquilo
Orientina (57)	-7.5	Asn193, Lys197, Glu276	Ser190, Glu200, Gly277	Phe280, Phe196/ Leu192/ Ala189
Ácido ursólico	-7.3	Asn193, Lys197	Phe196, Ile281, Leu192, Phe280	

6.3. Simulación computacional de propiedades fisicoquímicas y similitud a fármacos

6.3.1. Predicción de las propiedades moleculares de los productos aislados de la especie de *Salvia* (1, 13, 50-57) y compuestos fúngicos (95-97)

(Anexo 3)

Los compuestos similares a fármacos son aquellos que poseen propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas adecuadas para convertirse en fármacos. Para establecer dichas propiedades, se utilizan descriptores moleculares (obtenidos de una librería de fármacos), que proporcionan una expresión numérica de las propiedades físicas, químicas y biofarmacéuticas de los compuestos, lo cual permite establecer un perfil químico con las características más relevantes de un fármaco (Loureiro et al., 2019; Daina et al., 2017). Los parámetros fisicoquímicos y biofarmacéuticos proporcionados por plataformas computacionales como SwissADME, Molinspiration, Osiris Property Explorer, así como el programa OSIRIS DataWarrior; nos permiten estimar la similitud de un compuesto (origen natural o sintético) a un fármaco. Los productos obtenidos en el presente trabajo fueron analizados con estas bases de datos y los resultados se resumen en la Tabla 26.

Además, la regla de los cinco (regla de Lipinski) junto con las reglas de Weber, describen las propiedades moleculares que son específicas para las propiedades farmacocinéticas de un compuesto (ADME; absorción, distribución, metabolismo y excreción). Ambas reglas predicen las características necesarias para una buena permeabilidad celular y, por lo tanto, una absorción adecuada, ya que los compuestos mantienen propiedades estructurales similares a fármacos. Para la regla de Lipinski y Weber, la molécula no debe presentar más de dos violaciones a los siguientes criterios, ya que podrían

presentar problemas de absorción, permeabilidad y/o biodisponibilidad. La regla de Lipinski establece que la mayoría de las moléculas similares a los fármacos tienen $\log P \leq 5$, peso molecular ≤ 500 g/mol, un número de aceptores y donadores de hidrógeno ≤ 10 y ≤ 5 , respectivamente (Lipinski et al., 2001).

La regla de Weber relaciona la biodisponibilidad oral de un fármaco con el número de enlaces rotables (ER, flexibilidad molecular) con el área de superficie polar topológica (TPSA, por sus siglas en inglés). Los compuestos similares a los fármacos deben tener un valor de $ER < 10$ y un $TPSA \leq 140$ Å² (Veber et al., 2002).

6.3.1.1. Peso molecular

Para el diseño de nuevas entidades químicas, el peso molecular es un parámetro fisicoquímico importante para que un compuesto se pueda absorber por difusión pasiva y tenga buena permeabilidad intestinal. La búsqueda de compuestos con una elevada actividad en un blanco terapéutico está relacionada al peso molecular. Sin embargo, es menos probable que los compuestos con mayor peso molecular sean absorbidos y, por lo tanto, no llegar al sitio de acción (Rashid, 2020; Daina et al., 2017).

Considerando las reglas de Lipinski, el límite de peso molecular es de 500 g/mol, por lo que es evidente que la rutina (**52**), la amarisólida G (**55ab**) y el ziziflavosido B (**56**), no cumplen con esta regla (Tabla 26).

6.3.1.2. Lipofilicidad

El log P es un descriptor de la lipofilicidad que se define como el logaritmo del coeficiente de partición entre *n*-octanol y agua. La permeabilidad intestinal depende de este parámetro debido a que el intestino posee una capa mucosa rica en lípidos, por lo que el fármaco en solución debe tener la capacidad de atravesarla. Un compuesto con baja hidrofiliicidad posee altos valores de log P y, por lo tanto, tiene una pobre absorción gastrointestinal (GI). Se ha demostrado que los fármacos que se absorben por vía GI deben tener un valor de log P inferior a cinco (Rashid, 2020; Daina et al., 2017; Loureiro et al., 2019; Lipinski et al., 2001). Los compuestos obtenidos en este trabajo de investigación cumplen con este parámetro.

6.3.1.3. Solubilidad

La solubilidad es otro factor muy importante que determina la velocidad y el grado de absorción de fármacos a nivel GI después de su administración por vía oral. El estudio y optimización de la solubilidad es fundamental en la etapa de descubrimiento y desarrollo de medicamentos. Normalmente, una baja solubilidad va acompañada de una mala absorción, por lo cual, es importante

evitar compuestos poco solubles. Más del 80 % de medicamentos que se encuentran en el mercado tienen un valor de log S entre menos cuatro y seis (Rashid, 2020; Daina et al., 2017; Loureiro et al., 2019). El producto **56** puede presentar una mala absorción a nivel GI, debido a que el valor de log S no entra en los rangos recomendados.

6.3.1.4. Área de superficie polar topológica

El TPSA se define como la suma total de todas las regiones polares de la superficie de una molécula. Este parámetro se correlaciona con la biodisponibilidad, la absorción GI y la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Las moléculas que presentan un valor de TPSA inferior a 140 \AA^2 , es muy factible que atraviesen barreras biológicas, y puedan ser absorbidos a nivel GI. Sin embargo, para poder acceder a BHE se necesita un valor de TPSA menor a 90 \AA^2 (Rishton, 2003; Rashid, 2020; Daina et al., 2017; Veber et al., 2002). Siguiendo en este contexto, la amarisólida G (**55ab**), los flavonoides glicosilados (**52**, **53**, **56**, **57**) y el ácido rosmarínico (**54**) es muy poco probable que puedan llegar a torrente sanguíneo y puedan penetrar la barrera hematoencefálica (Tabla 26).

6.3.1.5. Flexibilidad molecular

El número de enlaces rotables y la F_{sp^3} son medidas que indican la flexibilidad molecular y el grado de saturación del compuesto, respectivamente. Se ha demostrado que estos descriptores están relacionados con la biodisponibilidad oral de los fármacos. Sin embargo, cabe destacar que la mayoría de los fármacos que se administran por vía oral presentan menos de diez enlaces rotables y una F_{sp^3} mayor de 0.25 (Daina et al., 2017; Lovering et al., 2009; Veber et al., 2002). Entre los flavonoides, el ziziflavosido B (**56**) presenta un alto número de enlaces que giran libremente debido a la presencia de dos moléculas de glucosa, por lo cual no cumple con la flexibilidad molecular recomendada, a pesar de que cumple con la fracción de carbonos con hibridación sp^3 . El alternariol (**95**) es una molécula rígida que no posee enlaces rotables y la F_{sp^3} es menor a 0.25, lo que puede perjudicar su biodisponibilidad. Los flavonoides **50**, **51** y **13**, el ácido rosmarínico (**54**) y el ácido kójico (**96**) no cumplen con el grado de saturación que necesitan los compuestos para ser absorbidos (Tabla 26).

6.3.1.6. Aceptores y donadores de hidrógeno

El número de aceptores y donadores de hidrógeno es un parámetro que indica la habilidad de una molécula de interactuar en mayor o menor grado con una macromolécula; de igual manera proporciona una idea acerca de la solubilidad de los compuestos. (Lipinski et al., 2001; Loureiro et al., 2019). Los derivados glicosilados **52**, **53**, **55–57** obtenidos en este trabajo son moléculas con más

aceptores y donadores de hidrógeno de los permitidos debido a la presencia de residuos de glucosa (Tabla 26).

6.3.1.7. Similitud a fármacos

La similitud de un compuesto a un fármaco puede ser definido como un equilibrio de varias propiedades moleculares y características estructurales que determinan si la molécula es similar a los fármacos conocidos. Las propiedades hidrofóbicas, distribución electrónica, características de donadores y aceptores de hidrógeno, peso molecular, flexibilidad de la molécula y la presencia de características farmacofóricas influyen en el comportamiento de la molécula en un organismo vivo, incluida la biodisponibilidad, las propiedades de transporte, permeabilidad, afinidad por macromoléculas biológicas, la reactividad, la toxicidad, estabilidad metabólica y muchos otros. Un valor positivo indica que una molécula contiene fragmentos que están presentes en medicamentos comerciales (Rashid, 2020; Daina et al., 2017; Sander et al., 2015). Los terpenoides glicosilados (**1**, **55ab**), el ácido rosmarínico (**54**), el ziziflavosido B (**56**), la orientina (**57**), la isoquercitrina (**53**) y el alternariol (**95**) son moléculas que no poseen fragmentos que están presentes en fármacos (Tabla 26).

Tabla 26. Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de los compuestos (**1, 13, 50–57, 95–97**) basado en SwissADME, Molinspiration, Osiris Property Explorer y OSIRIS DataWarrior.

Compuestos/Propiedades	1	50	51	52	54	53	13	55ab	56	57	95	96	97
Lipofilicidad (Log P)	1.01	2.2	1.64	-1.26	1.45	-0.35	1.92	-0.30	-0.27	-0.42	2.30	-1.11	2.46
Solubilidad (Log S)	-3.48	-2.89	-2.26	-2.4	-2.23	-2.19	-2.58	-2.65	-5.65	-1.97	-3.54	-1.04	-3.42
Peso molecular	492.56	330.29	302.24	610.52	360.32	464.38	316.26	524.56	910.74	448.38	258.23	142.11	325.41
TPSA ^a	138.82	105.45	127.45	265.52	144.52	206.60	116.45	172.21	381.97	197.37	91.00	70.67	73.99
Similitud a fármaco	-2.96	1.24	1.70	3.31	-2.07	-2.17	1.8	-5.1	-3.81	-0.71	-1.26	0.36	4.33
Aceptor de H	9	7	7	16	8	12	7	11	23	11	5	4	5
Donador de H	4	3	5	10	5	8	4	5	14	8	3	2	3
Número de enlaces rotables	6	3	1	6	7	4	2	6	10	3	0	1	4
^b F _{sp³}	0.73	0.12	0	0.44	0.11	0.29	0.06	0.77	0.33	0.29	0.07	0.17	0.37
Cumple: Lipinski/Weber	Si/Si	Si/Si	Si/Si	No/No	Si/No	No/No	Si/Si	No/No	No/No	No/No	Si/Si	Si/Si	Si/Si
Puntaje de fármaco	0.40	0.49	0.52	0.59	0.50	0.44	0.52	0.36	0.26	0.33	0.35	0.28	0.90

^aÁrea de superficie polar topológica; ^bFracción de átomos de carbonos con hibridación sp³.

Por otra parte, la puntuación de fármaco toma en cuenta la similitud de un compuesto a un medicamento, el log P, log S, el peso molecular y los riesgos de toxicidad en un valor útil que puede usarse para juzgar el potencial de un compuesto para ser un medicamento (Rashid, 2020).

Luego de la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas en las plataformas SwissADME, Molinspiration, Osiris Property Explorer y OSIRIS DataWarrior, la amarisólida (**1**) y la terezina D (**97**) poseen la mayor probabilidad de ser fármacos al presentar valores de 0.40 y 0.90, respectivamente (Tabla 26).

6.3.2. Predicción de toxicidad *in silico*

La predicción de la toxicidad *in silico* es de gran relevancia en el descubrimiento de compuestos con actividad biológica, ya que el 30 % de las moléculas candidatas a fármacos fracasan por posibles riesgos de toxicidad en órganos, genómica y ecológicos (Rashid, 2020). Los compuestos (**1**, **13**, **50-51** y **97**) poseen propiedades estructurales similares a fármacos, ya que cumplen con las reglas de Lipinski/Weber y tienen una alta probabilidad de ser fármacos (> 0.40) (Tabla 26). A partir de estas moléculas se procedió a identificar fragmentos estructurales que dan lugar a alertas de toxicidad con los servidores SwissADME, admetSAR, preADMET, OSIRIS DataWarrior y XenoSite (Tabla 27).

Tabla 27. Predicción de la toxicidad de los compuestos (**1**, **13**, **50-51** y **97**) basado en SwissADME, admetSAR, preADMET y OSIRIS DataWarrior.

Compuestos/ Propiedades toxicológicas	1	13	50	51	97
Mutagénico	No	Si	Si	Si	No
Tumorigénico	No	No	No	No	No
Efecto Reproductivo	No	No	No	No	No
Irritante	No	No	No	No	No
Carcinogénico	No	Si	Si	Si	No
Cardiotóxico	Bajo	Medio	Medio	Medio	Bajo
Toxicidad peces	0.2	0.02	0.02	0.02	0.009
Toxicidad algas	0.01	0.03	0.02	0.03	0.02
Toxicidad aguda humano (^a DL ₅₀)	< 5000 mg/kg	< 5000 mg/kg	< 5000 mg/kg	< 500 mg/kg	< 5000 mg/kg

^aDosis letal 50

Estudios recientes han demostrado que compuestos de naturaleza flavonoide son tóxicos en dosis muy altas (Tabla 27), ya que los productos del metabolismo de este tipo de moléculas (catecoles) pueden unirse a cofactores (Fe^{2+}). Además, los catecoles exhiben su toxicidad por daños a nivel del ADN y proteínas (mutagénicos y carcinogénicos). De acuerdo con las plataformas admetSAR y preADMET, los productos **13**, **50** y **51** tienen una de probabilidad del 50 % de interactuar con los canales de potasio (hERG) y poder causar arritmia cardíaca e incluso provocar la muerte (Prieto-Martínez et al, 2019; Schweigert et al., 2001; Jing et al., 2015; Birt y Jeffery, 2013).

Es importante destacar que los agentes carcinógenos y mutágenos actúan a nivel del ADN e inducen mutaciones genéticas que contribuyen a enfermedades como el cáncer. A partir del servidor XenoSite, fue posible determinar que fragmentos de las estructuras **1** y **97** pueden interactuar con las proteínas y el ADN. En la Figura 81 se puede observar que la amarisólida (**1**) y la terezina D (**97**) tienen una probabilidad menor al 20 % para formar aductos con las biomoléculas. Por lo cual, es muy poco probable que estas moléculas tengan propiedades carcinogénicas o mutagénicas. Este resultado coincide con los obtenidos en las plataformas admetSAR, preADMET y OSIRIS DataWarrior.

Por último, los compuestos **1**, **13**, **50–51** y **97** evaluados en los servidores computacionales poseen muy baja probabilidad de ocasionar un daño al ecosistema.

Cabe resaltar, que los estudios toxicológicos de moléculas candidatas a fármacos deben complementarse con estudios preclínicos y clínicos.

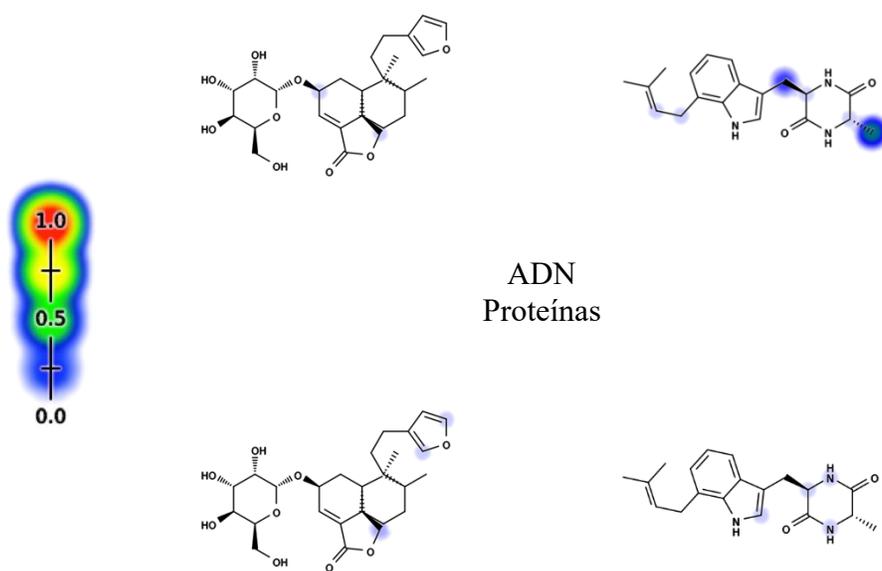


Fig. 81. Regiones de las moléculas **1** y **97** con posible interacción con el ADN y proteínas.

6.3.3. Tendencias farmacocinéticas de los metabolitos

Los compuestos **1** y **97** tienen una mayor probabilidad de ser un fármaco y no poseen propiedades tóxicas, por lo cual, se procedió a determinar la absorción GI, la habilidad de penetrar la BHE, la probabilidad de ser sustrato de la glicoproteína-P (gp-P), la biodisponibilidad, la capacidad de ser sustrato o de inhibir una de las cinco isoformas principales del CYP450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4), la predicción de unión a proteínas plasmáticas y la fracción de fármaco excretada sin cambios en la orina (f_e). Estos resultados fueron obtenidos usando las plataformas SwissADME, admetSAR, preADMET, GLORYx, Way2Drug, XenoSite, SMARTCyp y Renal-ex Predictor (Cheng et al., 2012; Daina et al., 2017; Kovacevic et al., 2014; Watanabe et al., 2019; Kops et al., 2020; Rudik et al., 2015; Rydberg et al., 2010).

6.3.3.1. Absorción GI

El principal mecanismo de transporte de fármacos en el intestino es la difusión pasiva, la cual se lleva a cabo en el lumen y epitelio del tracto GI, este proceso dinámico es descrito por la primera ley de Fick, es decir, es un proceso a favor de un gradiente de concentración, en el cual el fármaco cruzará la barrera intestinal hasta alcanzar la vena porta (Rashid, 2020). El porcentaje de absorción de fármaco puede ser calculado usando la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ AbsF} = 109 - (0.345 \times \text{TPSA})$$

Donde % AbsF es el porcentaje de absorción de fármaco y TPSA el área de superficie polar topológica del compuesto.

Considerando la absorción GI, la amarisólida (**1**) y la terezina D (**97**), tienen altas probabilidades de ser absorbidos (61.10 y 83.47 %, respectivamente) (Tabla 28). Este hecho, se atribuye a su bajo peso molecular y menor polaridad ($\text{TPSA} \leq 140$) (Loureiro et al., 2019; Lipinski et al., 2001; Rishton, 2003).

6.3.3.2. Barrera hematoencefálica

La BHE es fundamental para la distribución de moléculas con mecanismo de acción en el SNC. La BHE puede considerarse un escudo que protege al cerebro mediante una barrera “física” (uniones estrechas en las células endoteliales que evitan la penetración paracelular) y una barrera “bioquímica” que consta de actividades enzimáticas y eflujo activo. Aunque el transporte activo es importante, la difusión pasiva es la ruta principal para que los fármacos accedan al cerebro desde el torrente sanguíneo.

La lipofilicidad [$\log P$ (0.4–6.0)] y la polaridad [TPSA (≤ 90)] son dos descriptores utilizados para predecir si un compuesto puede llegar al SNC (Daina y Zoete, 2016; Daina et al., 2017). En nuestro estudio, la terezina D (**97**) tiene altas probabilidades de ser permeable en la BHE, precisamente por el valor de TPSA ($\leq 90 \text{ \AA}^2$) y $\log P$.

6.3.3.3. Glicoproteína-P

La gp-P (transportador ABC) participa en la biodisponibilidad, distribución y toxicidad de los fármacos. Su expresión en el tracto GI y BHE, así como en órganos metabólicos (hígado y riñón), explica su influencia en las propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicológicas) de medicamentos y compuestos candidatos a fármacos. Los modelos *in silico* que predicen la probabilidad de que un compuesto interactúe con la gp-P son de gran importancia para el desarrollo de fármacos (Montanari y Ecker, 2015; Daina et al., 2017). Los productos **1** y **97** son sustratos de la gp-P, por lo cual, ambos compuestos poseen una limitada distribución, ya que el compuesto **97** no puede llegar al SNC, a pesar, de poder atravesar BHE (propiedades fisicoquímicas).

6.3.3.4. Biodisponibilidad

La puntuación de biodisponibilidad busca predecir la probabilidad de que un compuesto tenga al menos un 10 % de biodisponibilidad oral en ratas o sea permeable en ensayos Caco-2. Esta puntuación es semicuantitativa basada en reglas sobre carga total, TPSA y violación a las reglas de Lipinski. Define cuatro clases de compuestos con probabilidades del 11 %, 17 %, 56 % y 85 % (Daina et al., 2017). Las moléculas **1** y **97** presentaron un alto nivel de absorción GI con probabilidades de 56 % de biodisponibilidad.

6.3.3.5. Metabolismo

Es fundamental el conocimiento sobre la interacción de las moléculas con las isoformas del CYP450, ya que esta superfamilia de isoenzimas juega un papel importante en la eliminación de fármacos a través de la biotransformación metabólica. Se puede estimar que del 50–90 % de las moléculas terapéuticas son sustrato de una de las cinco principales isoformas. La inhibición de estas isoenzimas es una de las causas principales de las interacciones fármaco-fármaco relacionadas con la farmacocinética, provocando efectos adversos no deseados debido a una disminución en el aclaramiento y acumulación del fármaco o sus metabolitos. Por lo tanto, es de gran importancia para el descubrimiento de fármacos predecir si una molécula causará interacciones medicamentosas significativas a través de la inhibición de las isoformas de CYP (Kirchmair et al., 2015; Daina et al., 2017; Cheng et al., 2012).

Para el caso de la terezina D (**97**) se ha identificado como posible inhibidor de las isoformas CYP2C9 y CYP3A4, las cuales; participan en el metabolismo de varios grupos de fármacos, incluyendo inhibidores de la bomba de protones, antiepilépticos, inmunosupresores, sulfonilureas y antiinflamatorios no esteroideos y, puede ocasionar interacciones medicamentosas significativas.

Con la ayuda de los servidores GLORYx, XenoSite, SMARTCyp y Way2Drug fue posible determinar que metabolitos se podrían obtener a partir de los compuestos **1** y **97** durante el proceso del metabolismo.

Con el servidor Way2Drug, XenoSite y SMARTCyp es posible predecir los sitios del metabolismo basado en la fórmula estructural de las moléculas orgánicas. El servidor permite predecir los metabolitos catalizados por las isoformas del CYP450 y de la familia de enzimas UDP-glucuroniltransferasa (UDPGT). La plataforma GLORYx es una herramienta utilizada para predecir los metabolitos que potencialmente se podrían formar mediante el metabolismo de fase I y II (Kops et al., 2020; Rudik et al., 2015; Rydberg et al., 2010; Matlock et al., 2015).

La terezina D (**97**) sufre una hidroxilación alifática en la posición C-21, seguida de una oxidación en la misma posición, para así obtener a los metabolitos **98** y **99**, con una probabilidad del 84 %. Con menor probabilidad (51.6 %) es posible obtener el derivado **100**, por una reacción de epoxidación (Fig. 82A).

En el caso de la amarisólida (**1**) fue posible predecir los metabolitos **102-103** como resultantes de la biotransformación metabólica analizada. El producto **102** es probable obtenerlo en la fase I [CYP2D6 (0.316)] por una hidroxilación aromática en el C-15 del anillo de furano. El metabolito **103** (0.195) se puede obtener en la fase II por la transferencia del ácido glucorónico en el fragmento de glucosa (Fig. 82B).

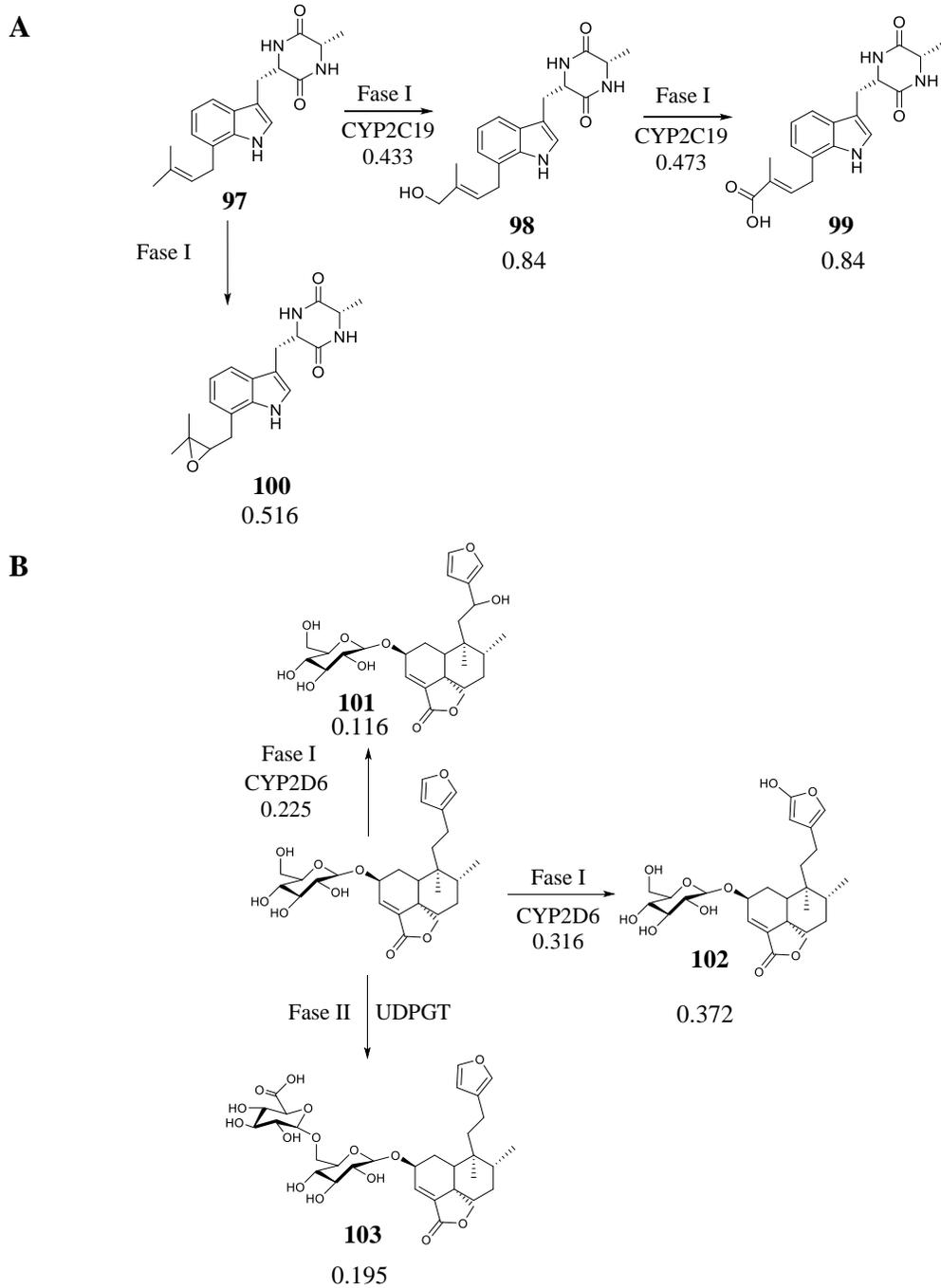


Fig. 82. (A) Posibles reacciones metabólicas de fase I de la terezina D (**97**). (B) Posibles reacciones metabólicas de fase I y fase II de la amarisolida (**1**). UDPGT: UDP-glucuroniltransferasa.

6.3.3.6. Unión a proteínas plasmáticas

Los fármacos no unidos a proteínas plasmáticas están disponibles para su difusión o transporte a través de las membranas celulares para la interacción con un blanco terapéutico. La probabilidad de unión a proteínas plasmáticas de un fármaco influye en su mecanismo de acción, disposición y eficacia (Kovacevic et al., 2014). Tanto la amarisólida (**1**) como la terezina D (**97**), poseen una probabilidad superior al 85 % de unión a proteínas plasmáticas (la albúmina y la α -glicoproteína). Por lo tanto, en caso de que estos dos productos fueran aprobados como fármacos, se necesitaría una dosis más alta para lograr una concentración terapéutica en el tejido diana. Además, la eliminación de la molécula sería más lenta, lo que provoca en muchos casos la toxicidad por interacción fármaco-fármaco.

6.3.3.7. Excreción renal

La predicción de la vía de eliminación de nuevas entidades químicas es esencial en el desarrollo de fármacos. Los modelos de predicción *in silico* nos permite determinar la fracción de fármaco excretada sin cambios en la orina (f_e) y el aclaramiento renal (CL_r , por sus siglas en inglés) (Watanabe et al., 2019; Veber et al., 2002; Cheng et al., 2012). En el caso de nuestro estudio, los productos **1** y **97** tienen una probabilidad < 30 % de ser eliminados por vía urinaria sin cambios en su estructura química. Lo cual sugiere, que estas moléculas tienen un 70 % de probabilidad de sufrir modificaciones químicas durante el metabolismo (Fig. 82). Este resultado coincide en parte con lo obtenido en el metabolismo de los compuestos **1** y **97**. Además, el compuesto **97** tiene una probabilidad del 68 % de ser eliminado por secreción tubular, como es el caso de la creatinina y de fármacos como la penicilina.

En este estudio, se calculó el aclaramiento renal de ambos compuestos con valores probables de 1.11 mL/min/kg para la amarisólida (**1**) y 2.14 mL/min/kg para terezina D (**97**). Estos valores nos indican que los riñones poseen poca capacidad para eliminar estas moléculas (**1** y **97**), de modo que éstas se podrían mantener por más tiempo en el organismo.

Es muy importante señalar que los estudios ADME *in silico* necesitan un soporte experimental, por lo cual, se requieren los experimentos *in vitro* y los estudios exhaustivos de farmacocinética en modelos *in vivo*.

Tabla 28. Predicción absorción, metabólica, distribución y excreción de los compuestos (1 y 97) basado en SwissADME, admetSAR, preADMET, GLORYx, Way2Drug y Renal-ex Predictor.

Compuesto/Perfil farmacocinético	Amarisólida (1)	Terezina D (97)
Absorción		
GI ^a (%)	61.10	83.47
Atraviesa BHE ^b	No	Si
Biodisponibilidad (%)	56	56
Sustrato gp-P ^c (%)	87.82	81.12
Metabolismo		
Inhibidor CYP450 ^d 1A2	No	No
Inhibidor CYP450 ^d 2C19	No	No
Inhibidor CYP450 ^d 2C9	No	Si
Inhibidor CYP450 ^d 2D6	No	No
Inhibidor CYP450 ^d 3A4	No	Si
Sustrato CYP450 ^d 2C9	No	No
Sustrato CYP450 ^d 2D6	Si	No
Sustrato CYP450 ^d 3A4	No	No
Sustrato CYP450 ^d 2C19	No	Si
Distribución		
Unión a proteínas plasmáticas (%)	87.35	85.30
Excreción		
f_e^e	Bajo	Bajo
Tipo de aclaramiento	Intermedio	Secreción
CL_r^f	1.11 mL/min/kg	2.14 mL/min/kg

^aGastrointestinal; ^bBarrera hematoencefálica; ^cGlicoproteína P; ^dEnzima citocromo P-450; ^eFracción de fármaco excretada sin cambios en la orina; ^fAclaramiento renal.

6.3.4. Posibles actividades biológicas de los compuestos 1 y 97 relacionados en la terapia de la DMT-2 y el dolor

Es importante conocer los posibles blancos terapéuticos de los compuestos nuevos (naturales o sintéticos) para predecir y comprender su actividad biológica. En general, esta información se puede utilizar en el desarrollo de fármacos, para predecir reacciones adversas y, por lo tanto, disminuir la tasa de abandono en los ensayos clínicos debido a la toxicidad; para un fármaco aprobado, predecir un nuevo blanco terapéutico y reposicionarlo (Gfeller et al., 2013; Daina et al., 2019).

Se predijo la actividad sobre diferentes blancos terapéuticos de los compuestos **1** y **97**; los blancos fueron receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés), moduladores de canal iónico, inhibidores de cinasas, ligando de receptor nuclear, inhibidores de proteasas e inhibidores enzimáticos.

En la base de datos Molinspiration, si una molécula tiene una puntuación de bioactividad superior a 0.00 tiene más probabilidades de exhibir actividades biológicas considerables. Cuando los valores se encuentran entre -0.50 y 0.00 son moderadamente activos y si la puntuación es inferior a -0.50, la molécula no presenta actividad biológica. Con la plataforma Swiss TargetPrediction el valor de probabilidad indica que posibilidad que tiene una molécula para que sea bioactiva en una proteína en particular, 1.0 el valor de 100 % de probabilidad (Rashid, 2020). Con el software PASS online se calcula la probabilidad de actividad (Pa) de un compuesto estudiado en un blanco terapéutico (Eleftheriou et al., 2012).

Los resultados muestran que las acciones terapéuticas de los productos **1** y **97** pueden involucrar múltiples mecanismos y podrían deberse a las interacciones con GPCR, modulador de canal iónico, ligando de receptor nuclear e inhibidor de proteasa, cinasa y otras enzimas. Los posibles blancos moleculares obtenidos a partir del servidor Swiss TargetPrediction para el compuesto **1** fue el cotransportador SGLT2 y la vía MAP/ERK2 con una probabilidad de interacción del 0.1106 (involucrados en la farmacología de la DMT-2). En el caso del compuesto **97** las posibles dianas fueron receptores acoplados a proteínas G (receptor δ -opioide y receptor μ -opioide) involucrados para el tratamiento del dolor con una probabilidad de 0.1369 (Tabla 29).

La posible actividad biológica relacionada a la DMT-2 para la amarisólida (**1**), obtenida con el programa PASS online, fue como inhibidor de fosfatasa, con una probabilidad de actividad superior al 60 %. Cabe resaltar, que este resultado coincide con los obtenidos en las pruebas *in vitro* e *in silico* de nuestro estudio.

Tabla 29. Relación estructura-actividad de los compuestos **1** y **97** basado en Molinspiration, Swiss TargetPrediction y PASS online.

Blanco terapéutico	Compuesto	
	Amarisólida (1)	Terezina D (97)
Ligando de GPCR ^a	0.49	0.44
		➤ receptor δ -opioide y receptor μ -opioide 0.1369
Modulador de canal iónico	0.36	0.24
Inhibidor de cinasa	-0.08	0.21
	➤ MAP/ERK2 ^c 1106	
Ligando de receptor nuclear	0.48	-0.02
Inhibidor de proteasa	0.28	0.40
Inhibidor enzimático	0.71	0.37
	➤ Inhibidor de fosfatasas 0.641	
	➤ SGLT2 ^b 0.1106	
	 Muy activo	 Moderadamente activo

^aReceptor acoplado a proteína G; ^bReceptores Cotransportadores de Sodio y Glucosa tipo 2; ^cProteína cinasa activada por mitógenos/cinasa 2 regulada por señales extracelulares.

6.3.5. Simulación de obtención de un compuesto líder

El desarrollo de compuestos líderes y la similitud a fármacos es una guía importante para la obtención de nuevos fármacos. Un compuesto líder sirve para identificar compuestos con una interacción estable en sus blancos moleculares en ensayos *in vitro*. Para este caso una molécula líder debe poseer un peso molecular entre 200 y 350 g/mol, tener un log P en el promedio 1 a 3 o menor, no debe contener fragmentos moleculares no deseados que se comporten como “inhibidores promiscuos”, “moléculas que posean actividad en varios ensayos *in vitro*” o “inhibidores suicidas” (Rishton, 2003).

Con la ayuda de la plataforma SwissADME se mejoraron las cualidades potenciales como fármacos de los productos amarisólida (**1**) y terezina D (**97**). En el caso de **1**, se eliminó el fragmento de glucosa para obtener al derivado **104**. El compuesto **105** corresponde al derivado hidroxilado en C-7 del núcleo clerodano de **104** (Fig. 83). Cabe resaltar, que la adición de grupos hidroxilo produce análogos con solubilidad aumentada en agua y baja lipofilidad. También provee de un nuevo centro capaz de formar enlaces de hidrógeno que pueden ser muy importantes en la unión a sitios activos.

En el caso de la terezina D (**97**), se eliminó el doble enlace en el fragmento de isopreno para obtener el análogo **106** (Fig. 83). Es importante señalar que la saturación de dobles enlaces aumenta la flexibilidad de las moléculas, lo que puede facilitar la capacidad del análogo **106** de interactuar con sitios activos de blancos terapéuticos. Se procedió al análisis biofarmacéutico y farmacocinético de cada una de las moléculas (**104–106**) en las mismas plataformas (Tabla 30 y 31).

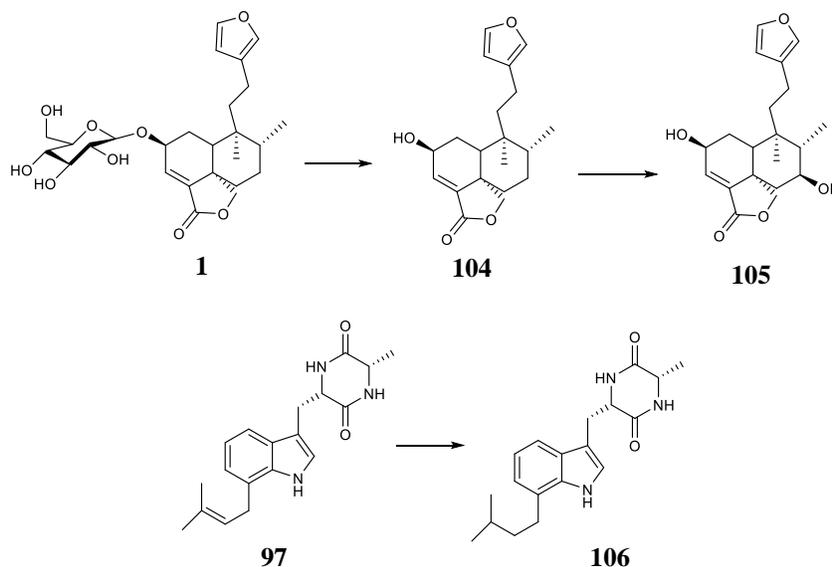


Fig. 83. Diseño de compuestos líderes.

Tabla 30. Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de los compuestos **104–106** basado en SwissADME, Molinspiration, Osiris Property Explorer y OSIRIS DataWarrior.

Compuestos/Propiedades	104	105	106
Lipofilicidad (Log P)	2.85	1.99	2.32
Solubilidad (Log S)	-3.78	-3.38	-3.68
Peso molecular	330.42	346.42	327.43
TPSA ^a	59.67	79.90	73.99
Similitud a fármaco	0.58	1.39	3.51
Aceptor de H	4	5	5
Donador de H	1	2	3
Número de enlaces rotables	3	3	5
^b Fsp ³	0.65	0.65	0.47
Cumple: Lipinski/Weber	Si/Si	Si/Si	Si/Si
Puntaje de fármaco	0.73	0.82	0.90

^aÁrea de superficie polar topológica; ^bFracción de átomos de carbonos con hibridación sp³.

Los compuestos **104** y **105** poseen una mayor probabilidad de ser fármacos que su análogo (**1**), con una puntuación de 0.73 y 0.82, respectivamente. Por otro lado, el derivado **106** mantiene constante la probabilidad de ser un fármaco, igual que su precursor la terezina D (**97**) (Tabla 30).

El perfil farmacocinético mejoró para cada uno de los derivados de la amarisólida (**1**) y terezina D (**34**). Los derivados **104** y **105** poseen una alta probabilidad de absorción a nivel GI y una alta biodisponibilidad, superior a la amarisólida (**1**). Los compuestos **104** y **105** a diferencia de la amarisólida (**1**), pueden atravesar BHE y tienen una probabilidad menor de ser sustrato de la gp-P. Además, la interacción con isoformas del CYP450 mostró diferencias, ahora los productos **104** y **105** son sustratos de la isoforma CYP3A4. Cabe señalar, que la presencia de nuevos grupos hidroxilo abre nuevas rutas metabólicas que pueden colaborar en la eliminación de los fármacos. También, los análogos **104** y **105** tienen mayor probabilidad de unión a proteínas, lo que hace más lento su eliminación en comparación con el compuesto **1** (Tabla 31).

En cambio, la molécula **106** sigue presentando un perfil de absorción, metabólico, distribución y excreción similar a la terezina D (**97**) (Tabla 31). Esto es debido a que los cambios realizados en la molécula **97** no modifican su farmacocinética.

Tabla 31. Predicción absorción, metabólica, distribución y excreción de los compuestos **104–106** basado en SwissADME, admetSAR, preADMET, GLORYx, Way2Drug y Renal-ex Predictor. (continuación).

Compuesto/ Perfil farmacocinético	104	105	106
Absorción			
GI ^a (%)	88.41	81.43	83.47
Atraviesa BHE ^b	Si	Si	Si
Biodisponibilidad (%)	56	56	56
Sustrato gp-P ^c (%)	74.17	81.92	76.36
Metabolismo			
Inhibidor CYP450 ^d 1A2	No	No	No
Inhibidor CYP450 ^d 2C19	No	No	Si
Inhibidor CYP450 ^d 2C9	No	No	No
Inhibidor CYP450 ^d 2D6	No	No	No
Inhibidor CYP450 ^d 3A4	No	No	Si
Sustrato CYP450 ^d 2C9	No	No	No
Sustrato CYP450 ^d 2D6	No	No	No
Sustrato CYP450 ^d 3A4	Si	Si	No
Sustrato CYP450 ^d 2C19	No	No	Si

Tabla 31. Predicción absorción, metabólica, distribución y excreción de los compuestos **104–106** basado en SwissADME, admetSAR, preADMET, GLORYx, Way2Drug y Renal-ex Predictor.

Distribución			
Unión a proteínas plasmáticas (%)	98.00	99.82	86.08
Excreción			
f_e^c	Bajo	Bajo	Bajo
Tipo de aclaramiento	Reabsorción	Reabsorción	Secreción
CL_r^f	0.018 mL/min/kg	0.086 mL/min/kg	2.19 mL/min/kg

^aGastrointestinal; ^bBarrera hematoencefálica; ^cGlicoproteína P; ^dEnzima citocromo P-450; ^eFracción de fármaco excretada sin cambios en la orina; ^fAclaramiento renal.

La bioactividad obtenida de la plataforma Molinspiration, Swiss TargetPrediction y PASS online de los compuestos **104-106**, se mantiene igual que sus análogos amarisólida (**1**) y la terezina D (**97**) (Tabla 32).

Tabla 32. Relación estructura-actividad de los compuestos (**104-106**) basado en Molinspiration, Swiss TargetPrediction y PASS online.

Compuesto	104	105	106
Blanco terapéutico			
Ligando de GPCR ^a	0.62	0.56	0.44
Modulador de canal iónico	0.48	0.36	0.21
Inhibidor de cinasa	-0.19	-0.22	0.11
Ligando de receptor nuclear	0.88	0.81	-0.17
Inhibidor de proteasa	0.38	0.45	0.50
Inhibidor enzimático	0.74	0.71	0.21
	➤ Inhibidor de fosfatasas 0.674	➤ Inhibidor de fosfatasas 0.659	➤ receptor δ -opioide y receptor μ -opioide 0.24

■ Muy activo ■ Moderadamente activo

^aReceptor acoplado a proteína G.

Es importante mencionar que la afinidad de una molécula por una diana terapéutica está relacionada con la energía libre de unión (ΔG) (Marín, 2020). Este parámetro es de gran utilidad para el desarrollo de una molécula líder. Por lo cual, en este trabajo se realizaron estudios de acoplamiento molecular de las moléculas diseñadas (**104** y **105**) a partir de la amarisólida (**1**) sobre el sitio activo de la enzima PTP-1B humana (PDB: 1G7F) y en el caso del análogo de la terezina D (**106**) en el sitio activo de la α -glucosidasa de *S. cerevisiae* (PDB: 3A4A).

Los derivados **104** y **105** presentaron una ligera afinidad por el sitio catalítico de la enzima PTP-1B, que la amarisólida [(**1**), $\Delta G = -7.8$ kcal/mol] con un de $\Delta G = -8.1$ kcal/mol y $\Delta G = -8.3$ kcal/mol, respectivamente. Los compuestos **104** y **105** se unieron de manera similar al sitio catalítico y presentan un mayor número de interacciones totales que la amarisólida (**1**) (Tabla 33, Fig. 84A–B).

Básicamente en los derivados **104** y **105**, a diferencia de la amarisólida (**1**) (Fig. 49-50), el anillo de furano presenta apilamiento π - π paralelo con Tyr46. Esto favorece la formación de enlaces de hidrógeno con los residuos Lys120 y Gln 266 en el caso del derivado **104**. Para el compuesto **105** se forman enlaces de hidrógeno con los aminoácidos Lys120, Gln 266, Ala217 y Arg221.

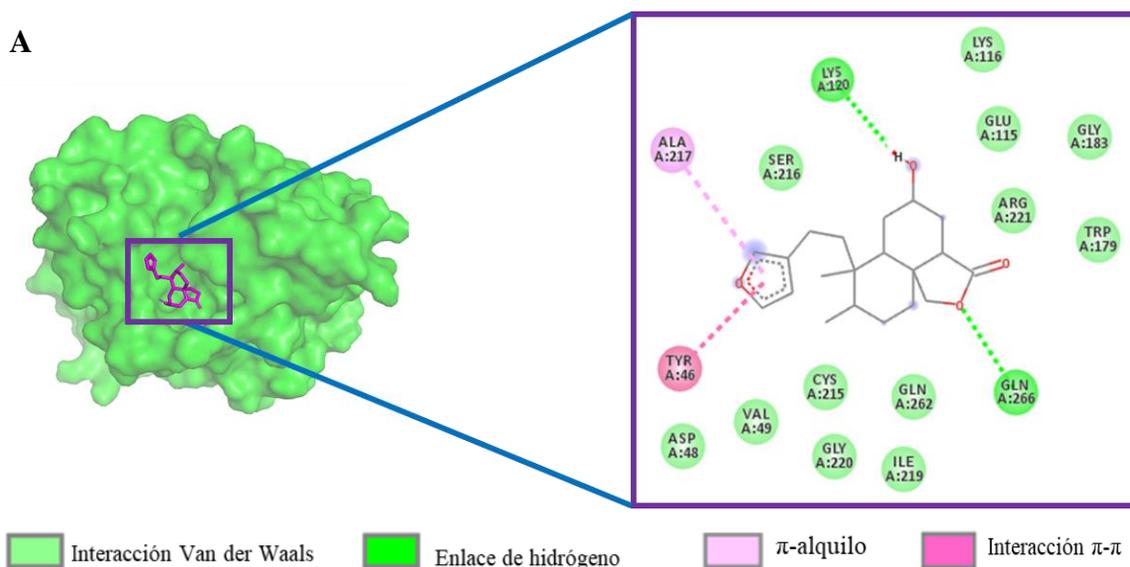


Fig. 84. Modelo estructural en 3D y aminoácidos involucrados en la unión entre la PTP-1B en el sitio catalítico 2D (1G7F). (A) El compuesto (**104**) (rosa) y (B) el compuesto (**105**) (azul) (continuación).

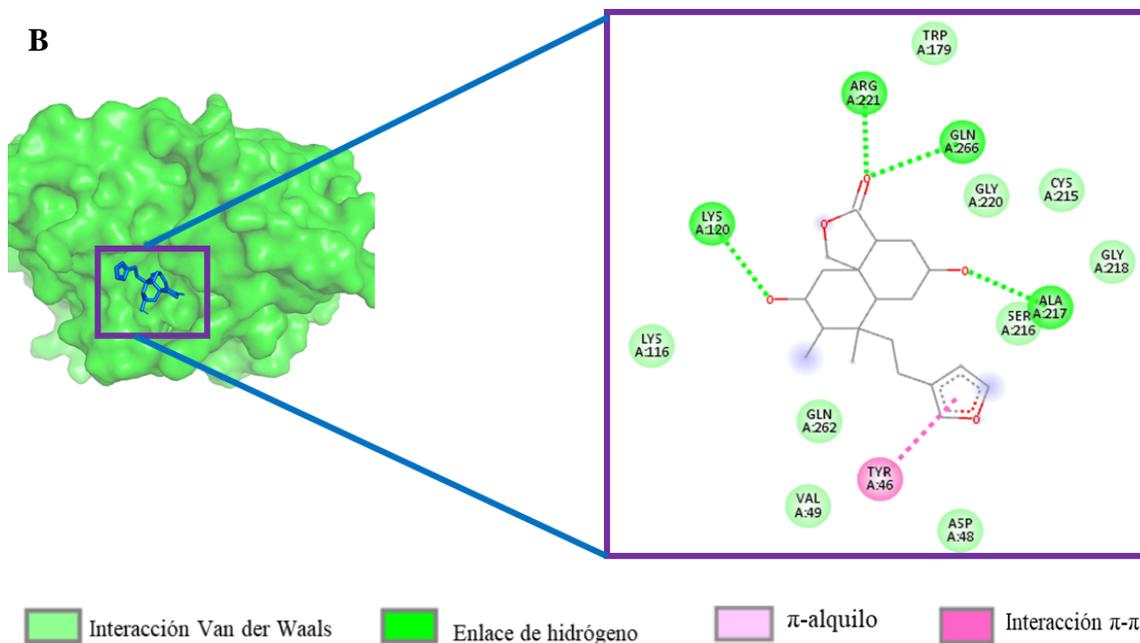


Fig. 84. Modelo estructural en 3D y aminoácidos involucrados en la unión entre la PTP-1B en el sitio catalítico 2D (1G7F). (A) El compuesto (**104**) (rosa) y (B) el compuesto (**105**) (azul).

Tabla 33. Principales interacciones entre las moléculas (**1**, **104-105**) y la enzima PTP-1B sitio catalítico (*continuación*).

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones			
		Enlace de hidrógeno	Van der Waals	π -alquilo	Apilamiento π - π
Amarisólida (1)	-7.8	Asp181, Gln266, Ser216, Ala217	Tyr46, Cys215, Gln262, Thr263, Gly220, Trp179, Gly183, Pro180, Phe182, Lys120, Arg221, Lys116, Glu115		

Tabla 33. Principales interacciones entre las moléculas (**1**, **104-105**) y la enzima PTP-1B en el sitio catalítico.

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones			
		Enlace de hidrógeno	Van der Waals	π -alquilo	Apilamiento π - π
104	-8.1	Lys120, Gln266	Ser216, Lys116, Glu115, Arg221, Gly183, Trp179, Gln262, Ile219, Gly220, Cys215, Val49, Asp48	Ala217	Tyr46
105	-8.3	Lys120, Gln266, Ala217, Arg221	Lys116, Gln266, Val49, Asp48, Ser216, Gly218, Cys215, Gly220, Trp179		Tyr46

El modelado del sitio de unión del compuesto **106** predijo que se une al sitio catalítico con una energía de unión de -8.8 kcal/mol, la cual es ligeramente superior a la calculada por la terezina D (**97**) (-8.5 kcal/mol) (Anexo 3). La flexibilidad en el fragmento de isopreno en el derivado **106** a comparación con la terezina D (**97**), le permite una mayor estabilidad para formar nuevos enlaces de hidrógeno con los residuos Asp307 y Arg315 e interacciones del tipo π -sigma y π -alquilo con los aminoácidos Tyr158, His112, Tyr72 y Phe178 (Tabla 34, Fig. 85).

Es importante señalar que la optimización de compuestos líderes, a través de transformaciones químicas ayudan a mejorar las características similares a las de un fármaco. Del mismo modo, se ha puesto de manifiesto que técnicas computacionales constituye una importante herramienta para el diseño racional de fármacos dirigidos a dianas terapéuticas y que ayudan en la selectividad para progresar en ensayos preclínicos y clínicos.

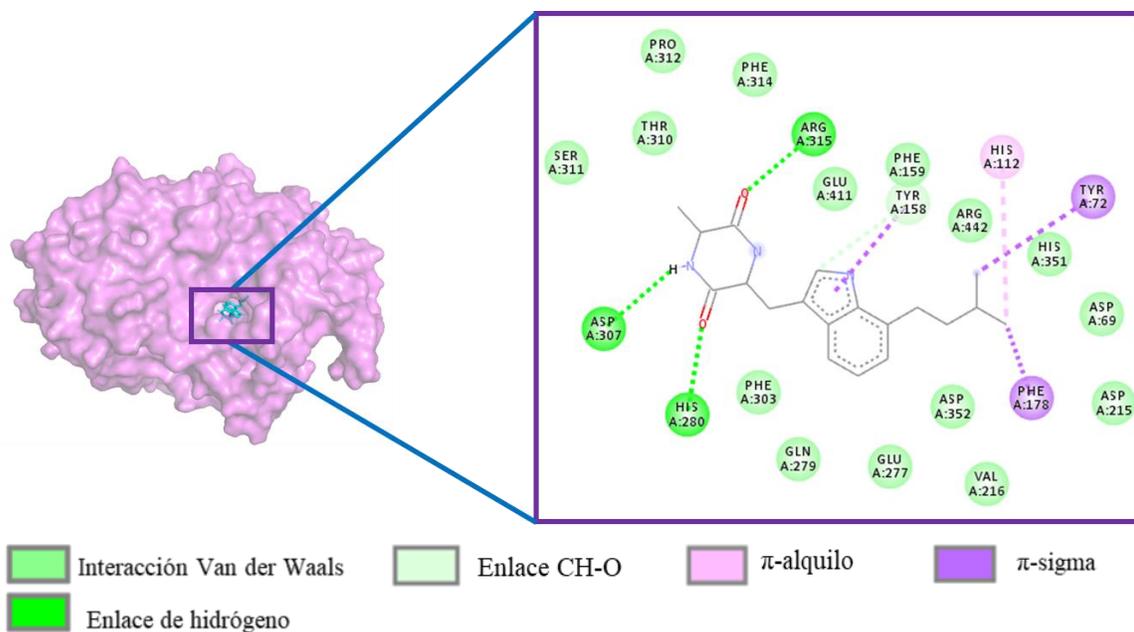


Fig. 85. Modelo estructural en 3D y aminoácidos involucrados en la unión entre la α -glucosidasa de levadura en el sitio catalítico 2D (3A4A) con el compuesto (**106**) (azul).

Tabla 34. Principales interacciones entre las moléculas (**97** y **106**) y la enzima α -glucosidasa de levadura.

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones			
		Enlace de hidrógeno	Van der Waals	Enlace CH-O	π -sigma/ π -alquilo
Terezina D (97)	-8.5	His280, Gln279, Asp352, Glu277	Phe303, His351, Asp69, Asp215, Val216, Arg442, Phe159, Glu411, Tyr158	Arg315	Tyr72/His112, Phe178
Molécula (106)	-8.8	Asp307, Arg315, His280	Phe314, Pro312, Thr310, Ser311, Phe303, Gln279, Glu277, Asp352, Val216, Asp215, Asp69, His351, Arg442, Phe159, Glu411	Tyr158	Tyr72, Tyr158, Phe178/His112

7. Conclusiones

A. La especie *Salvia amarissima* es una fuente de productos diterpenoides de tipo clerodano y flavonoides con actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B y las enzimas α -glucosidasas. Esta información proporciona evidencias que podrían sustentar el uso de esta especie en la medicina popular para el tratamiento de la diabetes.

B. En el presente trabajo se describe, por primera vez, los constituyentes del aceite esencial de *Salvia amarissima* obtenidos a partir de un lote fresco y seco, además el aceite posee actividad *in vitro* contra la enzima PTP-1B. El análisis por CG-EM permitió establecer al germacreno D (**63**) y al β -selineno (**64**) como sus principales componentes de las esencias preparadas en diferentes condiciones.

C. El análisis de los componentes volátiles, obtenidos mediante la técnica de microextracción en fase sólida (MEFS), permitió la identificación del 2-hexenal (**67**) en *Salvia amarissima* como el componente volátil más abundante.

D. Se establecieron pruebas para el control de calidad farmacopeico de la especie de *Salvia amarissima*.

E. Los estudios de acoplamiento y dinámica molecular permiten predecir que los productos **1** y **13** pueden unirse al sitio catalítico y alostérico de la enzima PTP-1B; respectivamente, formando complejos estables mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones de tipo π - π .

F. El preparado tradicional de *Salvia microphylla* posee potente actividad inhibitoria contra la enzima PTP-1B. Los flavonoides de la infusión son responsables, al menos parcialmente, de estos efectos. Sin embargo, los efectos del preparado tradicional sobre la α -glucosidasa de levadura fueron pobres.

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

H. El análisis del aceite esencial por CG-EM, permitió establecer al epóxido de italiceno (**74**) y viridiflorol (**75**) como sus principales componentes. Además, el aceite esencial posee actividad inhibitoria de la actividad de la enzima α -glucosidasa.

I. El análisis de los componentes volátiles de *Salvia microphylla* permitió la identificación del eter de cadineno (**85**) y la bourbonanona (**86**) entre los principales componentes.

J. Los resultados correspondientes a la eficacia del preparado tradicional y aceite esencial corroboraron a nivel preclínico el potencial antinociceptivo de *Salvia microphylla*.

K. La amarisólida (**1**) y la terezina D (**97**) son los compuestos que reúnen un mayor número de requisitos para convertirse en fármacos, esto de acuerdo con las plataformas utilizadas.

L. Se obtuvieron las posibles propiedades farmacocinéticas de los compuestos **1** y **97** utilizando softwares de libre acceso.

M. Los compuestos (**104** y **105**) diseñados a partir de la amarisólida (**1**) poseen una mayor probabilidad de ser fármacos y mejoraron sus propiedades farmacocinéticas (absorción y metabólicas), en comparación con su precursor **1**. Además, los posibles blancos terapéuticos en base a Molinspiration, Swiss TargetPrediction y PASS online, fueron similares a los de **1**. Por último, los derivados **104** y **105** presentaron una mejor afinidad por el sitio catalítico de la enzima PTP-1B, que la amarisólida (**1**).

N. El compuesto **106** presenta un perfil de absorción, metabólico, distribución y excreción similar a la terezina D (**97**). La bioactividad obtenida de la plataforma Molinspiration, Swiss TargetPrediction y PASS online del compuesto **106**, se mantiene similar a la terezina D (**97**). Además, el análisis por docking predijo que **106** se une al sitio catalítico de la enzima α -glucosidasa con una energía de unión superior a la calculada por la terezina D (**97**).

8. Referencias

1. Abbas, G.; Al Harrasi, A.; Hussain, H.; Hamaed, A.; Supuran, C. T. (2019). The management of diabetes mellitus-imperative role of natural products against dipeptidyl peptidase-4, α -glucosidase and sodium-dependent glucose co-transporter 2 (SGLT2). *Bioorg. Chem.*, 86, 305-315.
2. Abdel-Rahman, R. F. (2017). Natural products as a source for novel analgesic compounds. *Pain Reli.-From Analg. to Altern. Ther.*, 37, 277-299.
3. Adams R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Vol. 456. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
4. Alagesan, K.; Raghupathi, P. K.; Sankarnarayanan, S. (2012). Amylase inhibitors: Potential source of anti-diabetic drug discovery from medicinal plants. *Int. J. of Pharm. & Life Sci.*, 3, 1407-1412.
5. Alam, S.; Eqbal, K.; Patel, I.; Mulla, I.; Ansari, S.; Ayesha, B. (2017). The history of diabetes: from olden days to discovering insulin. *Int. J. Unani. Integ. Med.*, 1, 25-28.
6. Alonso, A.; Sasin, J.; Bottini, N.; Friedberg, I.; Friedberg, I.; Osterman, A.; Godzik, A.; Hunter, T.; Dixon, J.; Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117, 699-711.
7. Ampudia-Blasco, F. J. y Camacho, E. P. (2016). Tratamiento de la diabetes mellitus (II). Hipoglucemiantes no insulínicos. *Medicine*, 12, 1013-1025.
8. Anjum, K.; Abbas, S. Q.; Ali Shan, S. A.; Akhter, N.; Batool, S.; Ul Hassan, S. S. (2016). Marine sponges as a drug treasure. *Biomol. Ther.*, 24, 347-362.
9. Aydogmus, Z.; Yesilyurt, V.; Topcu, G. (2006). Constituents of *Salvia microphylla*. *Nat. Prod. Res.*, 20, 775-781.
10. Bagci, E., Kocak, A. (2008). Essential Oil Composition of the Aerial Parts of two *Salvia* L. (*S. multicaulis* Vahl. Enum and *S. tricochlada* Bentham) Species from East Anatolian Region (Turkey). *Int. J. Sci. Tech.*, 3, 13-18.
11. Bahadori, M. B.; Asghari, B.; Dinparast, L.; Zengin, G.; Sarikurkcu, C.; Abbas-Mohammadi, M.; Bahadori, (2017). *S. Salvia nemorosa* L.: A novel source of bioactive agents with functional connections. *LWT-Food Sci. Technol.*, 75, 42-50.
12. Bahadori, M. B.; Dinparast, L.; Zengin G.; Sarikurkcu, C.; Bahadori, S.; Asghari, B.; Movahhedin, N. (2017). Functional components, antidiabetic, anti-Alzheimer's disease, and antioxidant activities of *Salvia syriaca* L. *Int. J. Food Prop.*, 20, 1761-1772.

13. Bandaranayake, W. M. (2006). Quality control, screening, toxicity, and regulation of herbal drugs. Ahmad, I.; Aqil, F.; Owais, M. (Eds.). In modern phytomedicine: Turning medicinal plants into drugs (pp. 25–57). Wiley-VCH, Weinheim.
14. Barford, D.; Flint, A. J.; Tonks, N. K. (1994). Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*, 263, 1397-1404.
15. Barr, A. J.; Ugochukwu, E.; Lee, W. H.; King, O. N. F.; Filippakopoulos, P.; Alfano, I.; Savitsky, P.; Burgess-Brown, N. A.; Müller, S.; Knapp, S. (2009). Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome. *Cell*, 136, 352-363.
16. Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50.
17. Bautista, E.; Toscano, R. A.; Ortega, A. (2013). Microphyllandiolid, a new diterpene with an unprecedented skeleton from *Salvia microphylla*. *Org. Lett.*, 15, 3210-3213.
18. Bautista, E.; Toscano, R. A.; Ortega, A. (2014). 5, 10-*seco-neo*-Clerodanes and *neo*-clerodanes from *Salvia microphylla*. *J. Nat. Prod.*, 77, 1088-1092
19. Bautista, E.; Fragoso-Serrano, M.; Toscano, R. A.; García-Peña, M. R.; Ortega, A. (2015). Teotihuacanin, a diterpene with an unusual spiro-10/6 system from *Salvia amarissima* with potent modulatory activity of multidrug resistance in cancer cells. *Org. Lett.*, 17, 3280-3282.
20. Bautista, E.; Fragoso-Serrano, M.; Ortiz-Pastrana, N.; Toscano, R. A.; Ortega, A. (2016). Structural elucidation, and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A-C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia*, 114, 1-6.
21. Birt, D. F.; Jeffery, E. (2013). Flavonoids. *Adv. Nutr.*, 4, 576-577.
22. Bisio, A.; De Mieri, M.; Milella, L.; Schito, A. M.; Parricchi, A.; Russo, D.; Alfei, S.; Lapillo, M.; Tuccinardi, T.; Hamburger, M.; De Tommasi, N. (2017). Antibacterial and hypoglycemic diterpenoids from *Salvia chamaedryoides*. *J. Nat. Prod.*, 80, 503-514.
23. Bisio, A.; Pedrelli, F.; D'Ambola, M.; Labanca, F.; Schito, A. M.; Govaerts, R.; De Tommasi, N.; Milella, L. (2019). Quinone diterpenes from *Salvia* species: chemistry, botany, and biological activity. *Phytochem. Rev.*, 18, 665-842
24. Blaslov, K.; Naranda, F. S.; Kruljac, I.; Renar, I. P. (2018). Treatment approach to type 2 diabetes: Past, present, and future. *World J. Diabetes*, 9, 209-219.
25. Bonet, R. (2004). Dolor y analgesia tratamiento con analgésicos y antiinflamatorios. *Offarm: farmacia y sociedad*, 23, 70-74.
26. Borges de Melo, E.; Da Silveira Gomes, A.; Carvalho, I. (2006). α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, 62, 10277-10302.

27. Bye, R.; Linares, E. (1999). Plantas medicinales del México prehispánico. *Arqueología Mexicana*, 39, 4-11.
28. Calderón, R G.; Rzedowski, J. (2010). *Flora fanerogámica del valle de México*. Ed. Instituto de Ecología. México.
29. Calzada, F.; Bautista, E. (2020). Plants used for the treatment of diarrhoea from Mexican flora with amoebicidal and giardicidal activity, and their phytochemical constituents. *J. Ethnopharmacol.*, 253, 1-49.
30. Calzada, F.; Bautista, E.; Barbosa, E.; Salazar-Olivo, L. A.; Alvidrez-Armendáriz, E.; Yopez-Mulia, L. (2020). Antiprotozoal activity of secondary metabolites from *Salvia circinata*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 30, 593-596.
31. Case, D. A.; Walker, R. C.; Cheatham, T. E. III; Simmerling, C.; Roitberg, A.; Merz, K. M.; Luo, R.; Darden, T.; Wang, J.; Duke, R. E.; Roe, D. R.; LeGrand, S.; Swails, J.; Cerutti, D.; Monard, G.; Sagui, C.; Kaus, J.; Betz, R.; Madej, B.; Lin, C.; Mermelstein, D.; Li, P.; Onufriev, A.; Izadi, S.; Wolf, R. M.; Wu, X.; Götz, A. W.; Gohlke, H.; Homeyer, N.; Botello-Smith, W. M.; Xiao, L.; Luchko, T.; Giese, T.; Lee, T.; Nguyen, H. T.; Nguyen, H.; Janowski, P.; Omelyan, I.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. (2015). Amber. Universidad de California, San Francisco. Disponible en: <http://ambermd.org/doc12/Amber16.pdf>. [Consulta: 1 de Diciembre del 2020].
32. Cerón-Romero, L.; Paoli, P.; Camici, G.; Flores-Morales, V.; Rios, M. Y.; Ramírez-Espinosa, J. J.; Hidalgo-Figueroa, S.; Navarrete-Vázquez, G.; Estrada-Soto, S. (2016). *In vitro* and *in silico* PTP-1B inhibition and *in vivo* antidiabetic activity of semisynthetic moronic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2, 1-6.
33. Chen, J.; Mangelinckx, S.; Adams, A.; Wang, Z. T.; Li, W.; De Kimpe, N. (2015). Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications. *Nat. Prod. Commun.*, 10, 187-200.
34. Cheng, F.; Li, W.; Zhou, Y.; Shen, J.; Wu, Z.; Liu, G.; Lee, P. W.; Tang, Y. (2012). AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.*, 52, 3099-3105.
35. Chiba, S. (1997). Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1233-1239.
36. Cho, H. (2013). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and obesity. *Vitam. Horm.*, 91, 405-420.

37. Choy, M. S.; Li, Y.; Machado, L. E. S. F.; Lindorff-Larsen, K.; Page, R.; Peti, W. (2017). Conformational rigidity and protein dynamics at distinct timescales regulate PTP1B activity and allostery. *Mol. Cell*, 65, 644-658.
38. Clínica de Salud Intercultural. (2018). Sector Salud del Estado de México. (pp. 1-10).
39. Crowley, R. S.; Riley, A. P.; Alder, A. F.; Anderson III, R. J.; Luo, D.; Kaska, S.; Maynez, P.; Kivell, B. M.; Prisinzano, T. E. (2020). Synthetic studies of neoclerodane diterpenes from *Salvia divinorum*: Design, synthesis, and evaluation of analogues with improved potency and G-protein activation bias at the μ opioid receptor. *ACS Chem. Neurosci.*, 11, 1781-1790.
40. Cuong, L. C. V.; Trang, D. T.; Cuc, N. T.; Nhiem, N. X.; Yen, P. H.; Anh, H. L. T.; Huong, L. M.; Minh, C. V.; Kiem, P. V. (2015). Flavonoid glycosides from *Antidesma ghaesembilla*. *Vietnam J. Chem.*, 53, 94-97.
41. Dabhi, A. S.; Bhatt, N. R.; Shah, M. J. (2013). Voglibose: an alpha glucosidase inhibitor. *J. Clin. Diagn. Res.*, 7, 3023-3027.
42. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.*, 7, 1-13.
43. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. (2019). SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res.*, 47, 357-364.
44. Daina, A.; Zoete, V. (2016). A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *Chem. Med. Chem.*, 11, 1117-1121.
45. Damian-Medina, K., Salinas-Moreno, Y., Milenkovic, D., Figueroa-Yáñez, L., Marino-Marmolejo, E., Higuera-Ciapara, I., Vallejo-Cardona, Lugo-Cervantes, E. (2020). *In silico* analysis of antidiabetic potential of phenolic compounds from blue corn (*Zea mays* L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Heliyon*, 6, 1-13.
46. Davis, N.; Forbes, B.; Wylie-Rosett, J. (2009). Nutritional strategies in type 2 diabetes. *Mt. Sinai. J. Med.*, 76, 257-268.
47. DeLano, W. L. (2004). *The PyMOL molecular graphics system*. San Carlos, CA: DeLano Scientific LLC.
48. Del Arco, J. (2015). Curso básico sobre el dolor. *Farm. Prof.*, 29, 36-43.
49. De Meyts, P. (2004). Insulin and its receptor: structure, function, and evolution. *Bioessays*, 26, 1351-1362.

50. Dereli, F. T. G.; Ilhan, M.; Akkol, E. K. (2020). Identification of the main active antidepressant constituents in a traditional Turkish medicinal plant, *Centaurea kurdica* Reichardt. *J. Ethnopharmacol.*, 249, 1-11.
51. Derosa, G.; Maffioli P. (2012). α -glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Arch. Med. Sci.*, 5, 900-906.
52. Dhameja, M.; Gupta, P. (2019). Synthetic heterocyclic candidates as promising α -glucosidase inhibitors: An overview. *Eur. J. Med. Chem.*, 176, 343-377.
53. Efferth, T.; Greten, H. J. (2012). Quality control for medicinal plants. *Med. Aromat. Plants*, 1, 1-3.
54. Eguchi, K., Komori, T., Saito, T., Hoshide, S., Kario, K. (2018). An α -glucosidase inhibitor could reduce T-wave alternans in type 2 diabetes patients. *J Electrocardiol.*, 51, 21-26.
55. Eleftheriou, P.; Geronikaki, A.; Hadjipavlou-Litina, D.; Vicini, P.; Filz, O.; Filimonov, D.; Poroikov, V.; Chaudhaery, S. S.; Roy, K. K.; Saxena, A. K. (2012). Fragment-based design, docking, synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of 2-benzo/benzisothiazolimino-5-arylidene-4-thiazolidinones as cyclooxygenase/lipoxygenase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 47, 111-114.
56. Ernawati, T.; Mun'im, A.; Hanafi, M.; Yanuar, A. (2018). *In silico* evaluation of molecular interactions between known α -glucosidase inhibitors and homologous α -glucosidase enzymes from *Saccharomyces cerevisiae*, *Rattus norvegicus*, and GANC-human. *Thai J. Pharm. Sci.*, 42, 14-20.
57. Esquivel, B.; Cardenas, J.; Rodríguez-Hahn, L. (1987). The diterpenoid constituents of *Salvia fulgens* and *Salvia microphylla*. *J. Nat. Prod.*, 50, 738-740.
58. Etsassala, N. G. E. R.; Badmus, J. A.; Waryo, T. T.; Marnewick, J. L.; Cupido, C. N.; Hussein, A. A.; Iwuoha, E. I. (2019). Alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory activities of novel abietane diterpenes from *Salvia Africana-lutea*. *Antioxidants*, 8, 1-12.
59. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). (2013).
60. Federación Internacional de Diabetes (FID). (2019). *Atlas de Diabetes*, 9th ed.; disponible en: <http://www.diabetesatlas.org> [Consulta: 15 Junio 2020].
61. Feng-Peng, Z.; Strack, D.; Baumert, A.; Subramaniam, R.; Goh, N. K.; Chia, T. F.; Tan, S. N.; Chia, L. S. (2003). Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*, 62, 219-228.
62. Ferrier, D. R.; Harvey, R. A.; Champe, P. C. (2007). *Bioquímica*. Philadelphia, PA, USA: Lippincott William y Wilkins.

63. 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.
64. Flores-Bocanegra, L.; Pérez-Vásquez, A.; Torres-Piedra, M.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R. (2015). α -Glucosidase inhibitors from *Vauquelinia corymbosa*. *Molecules*, 20, 15330-15342.
65. Fragoso-Serrano, M.; Ortiz-Pastrana, N.; Luna-Cruz, N.; Toscano, R. A.; Alpuche-Solís, A. G.; Ortega, A.; Bautista, E. (2019). Amarisolide F, an acylated diterpenoid glucoside and related terpenoids from *Salvia amarissima*. *J. Nat. Prod.*, 82, 631-635.
66. Frish, M. J.; Trucks, G. W.; Schelgel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Jr. Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. (2013). Gaussian 09, Revision E.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT.
67. Gajbhiye, R. L.; Ganapathy, A.; Jaisankar, P. (2018). A review of α -glucosidase and α -amylase inhibitors for type 2 diabetes isolated from some important Indian medicinal plants. *Ann. Clin. Pharmacol. Ther.*, 1, 1-10.
68. Gardini, F.; Lanciotti, R.; Guerzoni, M. E. (2001). Effect of trans-2-hexenal on the growth of *Aspergillus flavus* in relation to its concentration, temperature, and water activity. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, 50-55.
69. Georgeta, S.; Ana, P. I.; Tünde, H.; Sanda, B. (2016). The isolation and identification of rutin from pharmaceutical products. *Ecotox. Zooteh. Ind. Alim.*, 15, 109-114.
70. Gerich, J. E. (2000). Hypoglycaemia and counterregulation in type 2 diabetes. *Lancet*, 356, 1946-1947.
71. Gfeller, D.; Michielin, O.; Zoete, V. (2013). Shaping the interaction landscape of bioactive molecules. *Bioinformatics*, 29, 3073-3079.
72. Ghorbani, A.; Esmailizadeh, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J. Tradit. Complement. Med.*, 7, 433-440.

73. Gloster, T. M.; Davies, G. J. (2010). Glycosidase inhibition: assessing mimicry of the transition state. *Org. Biomol. Chem.*, 8, 305-320.
74. Guardado-Mendoza, R.; Prioletta, A.; Jiménez-Ceja, L. M.; Sosale, A.; Folli, F. (2013). The role of nateglinide and repaglinide, derivatives of meglitinide, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Arch. Med. Sci.*, 9, 936-943.
75. Guyton, A. C.; Hall, J. E. (2011). *Tratado de fisiología médica*. España: Elsevier Saunders.
76. Hay, D. L.; Chen, S.; Lutz, T. A.; Parkes, D. G.; Roth, J. D. (2015). Amylin: Pharmacology, physiology, and clinical potential. *Pharmacol. Rev.*, 67, 564-600.
77. International Conference on Harmonization (ICH) Q2 (R1): Validation of analytical procedures. Text and methodology. In ICH: International council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use. Geneva, Switzerland, 1 November 2005. Disponible en: [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2\(R1\).pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Q2(R1).pdf) [Consulta: 25 Noviembre del 2020].
78. Jenis, J.; Baiseitova, A.; Yoon, S. H.; Park, C.; Kim, J. Y.; Li, Z. P.; Lee, K. W.; Park, K. H. (2019). Competitive α -glucosidase inhibitors, dihydrobenzoxanthenes, from the barks of *Artocarpus elasticus*. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 34, 1623-1632.
79. Jenks, A. A.; Kim, S. C. (2013). Medicinal plant complexes of *Salvia* subgenus *Calosphace*: An ethnobotanical study of new world sages. *J. Ethnopharmacol.*, 146, 214-224.
80. Jiang, C. S.; Liang, L. F.; Guo, Y. W. (2012). Natural products possessing protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity found in the last decades. *Acta Pharmacol. Sin.*, 33, 1217-1245.
81. Jing, Y.; Easter, A.; Peters, D.; Kim, N.; Enyedy, I. J. (2015). *In silico* prediction of hERG inhibition. *Future Med. Chem.*, 7, 571-586.
82. Joshi, T.; Singh, A. K.; Haratipour, P.; Sah, A. N.; Pandey, A. K.; Naseri, R.; Juyal, V.; Farzaei, M. H. (2019). Targeting AMPK signaling pathway by natural products for treatment of diabetes mellitus and its complications. *J. Cell Physiol.*, 234, 17212-17231.
83. Kalaitzoglou, E.; Fowlkes, J. L.; Popescu, I.; Thrailkill, K. M. (2019). Diabetes pharmacotherapy and effects on the musculoskeletal system. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 35, 1-75.
84. Kameda, Y.; Asano, N.; Yoshikawa, M.; Takeuchi, M.; Yamaguchi, T.; Matsui, K. (1984). Valiolamine, a new α -glucosidase inhibiting aminocyclitol produced by *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Antibiot.*, 37, 1301-1307.
85. Kanatsuka, A.; Kou, S.; Makino, H. (2018). Correction to: IAPP/amylin and β -cell failure: implication of the risk factors of type 2 diabetes. *Diabetol. Int.*, 9, 143-157.

86. Kato, C. G.; De Almeida-Goncalves, G.; Peralta, R. A.; Seixas, F. A. V.; Sá-Nakanishi, A. B.; Bracht, L.; Comar, J. F.; Bracht, A.; Peralta, R. M. (2017). Inhibition of α -Amylases by condensed and hydrolysable tannins: Focus on kinetics and hypoglycemic actions. *Enzyme Res.*, 1-12.
87. Kato, E.; Kawakami, K.; Kawabata, J. (2017). Macrocarpal C isolated from *Eucalyptus globulus* inhibits dipeptidyl peptidase 4 in an aggregated form. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 33, 106-109.
88. Kerru, N.; Singh-Pillay, A.; Awolade, P.; Singh, P. (2018). Current anti-diabetic agents, and their molecular targets: A review. *Eur. J. Med. Chem.*, 25, 436-488.
89. Kim, B. R.; Kim, H. Y.; Choi, I.; Kim, J. B.; Jin, C. H.; Han, A. R. (2018). DPP-IV Inhibitory potentials of flavonol glycosides isolated from the seed of *Lens culinaris*: In vitro and molecular docking analyses. *Molecules*, 23, 1-10.
90. Kim, D. H.; Paudel, P.; Yu, T.; Ngo, T. M.; Kim, J. A.; Jung, H. A.; Yokozawa, T.; Choi, J. S. (2017). Characterization of the inhibitory activity of natural tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* roots on protein tyrosine phosphatase 1B. *Chem-Biol Interact.*, 278, 65-73.
91. Kirchmair, J.; Göller, A. H.; Lang, D.; Kunze, J.; Testa, B.; Wilson, I. D.; Glen, R. C.; Schneider, G. (2015). Predicting drug metabolism: experiment and /or computation? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 14, 387-404.
92. Kops, C. B.; Sicho, M.; Mazzolari, A.; Kirchmair, J. (2020). GLORYx: Prediction of metabolites resulting from phase 1 and phase 2 biotransformations of xenobiotics. *Chem. Res. Toxicol.* 34, 1-54.
93. Koutsaviti, A.; Antonopoulou, V.; Vlassi, A.; Antonatos, S.; Michaelakis, A.; Papachristos, D. P.; Tzakou, O. (2018). Chemical composition and fumigant activity of essential oils from six plant families against *Sitophilus oryzae* (Col: Curculionidae). *J. Pest. Sci.*, 91, 873-886.
94. Kovacevic, S. Z.; Jevric, L. R.; Kuzmanovic, S. O. P.; Loncar, E. S. (2014). Prediction of *in silico* ADME properties of 1,2-*O*-isopropylidene aldohexose derivatives. *Iran. J. Pharm. Sci.*, 13, 899-907.
95. Krishnan, N.; Bonham, C. A.; Rus, I. A.; Shrestha, O. K.; Gauss, C. M.; Haque, A.; Tocilj, A.; Joshua-Tor, L.; Tonks, N. K. (2018). Harnessing insulin and leptin-induced oxidation of PTP1B for therapeutic development. *Nat. Commun.*, 9, 1-17.
96. Kumari, R.; Kotecha, M. (2016). A review on the standardization of herbal medicines. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 7, 97-106.
97. Kunle, O. F.; Egharevba, H. O.; Ahmadu, P. O. (2012). Standardization of herbal medicines-a review. *Int. J. Biodivers. Conserv.*, 4, 101-112.

98. Kyriakou, E.; Schmidt, S.; Dodd, G. T.; Pfuhlmann, K.; Simonds, S. E.; Lenhart, D.; Geerlof, A.; Schriever, S. C.; De Angelis, M.; Schramm, K. W.; Plettenburg, O.; Cowley, M. A.; Tiganis, T.; Tschöp, M. H.; Pfluger, P. T.; Sattler, M.; Messias, A. C. (2018). Celastrol promotes weight loss in diet-induced obesity by inhibiting the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP in the hypothalamus. *J. Med. Chem.*, 61, 11144-11157.
99. Lakhtakia, R. (2013). The history of diabetes mellitus. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.*, 13, 368-370.
100. Lantz, K. A.; Hart, S. G. E.; Planey, S. L.; Roitman, M. F.; Ruiz-White, I. A.; Wolfe, H. R.; McLane, M. P. (2010). Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MSI-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice. *Obesity*, 18, 1516-1523.
101. Lee, A. T. H., Ariffin, M. Z., Zhou, M., Ye, J. Z. Moochhla, S. M., Khanna, S. (2011). Forebrain medial septum region facilitates nociception in a rat formalin model of inflammatory pain. *Pain*, 152, 2528-2542.
102. Leeson, P. D.; Springthorpe, B. (2007). The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6, 881-890.
103. Le Bars, D.; Mouraux, A.; Plaghki, L. (2018). Fisiología del dolor: aspectos psicofisiológicos y mecanismos periféricos. *EMC-Anestesia-Reanimación*, 44, 1-21.
104. Li, S.; Depetris, R. S.; Barford, D.; Chernoff, J.; Hubbard, S. R. (2005). Crystal structure of a complex between protein tyrosine phosphatase 1B and the insulin receptor tyrosine kinase. *Structure*, 13, 1643-1651.
105. Li, C.; Luo, J.; Guo, S.; Jia, X.; Guo, C.; Li, X.; Xu, Q.; Shi, D. (2019). Highly selective protein tyrosine phosphatase inhibitor, 2,2',3,3'-tetrabromo-4,4',5,5'-tetrahydroxydiphenylmethane, ameliorates type 2 diabetes mellitus in BKS db mice. *Mol. Pharmaceutics*, 16, 1839-1850.
106. Liang, L. F., Du, S. N., Huang, K. Y., Li, K., Fan, Y. Y. Preliminary study of terpenes from the leaves of *Cyclocarya paliurus*. *Chem. Nat. Compd.* 2018; 54, 382-383.
107. Liang, Y. Z.; Xie, P.; Chan, K. (2004). Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B*, 812, 53-70.
108. Lim, E. K.; Ashford, D. A.; Hou, B.; Jackson, R. G.; Bowles, D. J. (2004). Arabidopsis glycosyltransferases as biocatalysts in fermentation for regioselective synthesis of diverse quercetin glucosides. *Biotechnol. Bioeng.*, 87, 623-631.
109. Lima, R. K.; Gracas Cardoso, M. D.; Andrade, M. A.; Guimaraes, P. L.; Batista, L. R.; Nelson D. L. (2012). Bactericidal and antioxidant activity of Essential oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 89, 523-528.

110. Lin, L.; Dong, Y.; Zhao, H.; Wen, L.; Yang, B.; Zhao, M. (2011). Comparative evaluation of rosmarinic acid, methyl rosmarinate and pedalitin isolated from *Rabdosia serra* (MAXIM). HARA as inhibitors of tyrosinase and α -glucosidase. *Food Chem.*, 129, 884-889.
111. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46, 3-26.
112. Liu, Z.; Lee, W.; Kim, S. N.; Yoon, G.; Cheon, S. H. (2011). Design, synthesis, and evaluation of bromo-retrochalcone derivatives as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 3755-3758.
113. Loureiro, D. R. P.; Soares, J. X.; Costa, J. C.; Magalhaes, A. F.; Azevedo, C. M. G.; Pinto, M. M. M.; Alfonso, C. M. M. (2019). Structures, activities, and drug-likeness of anti-infective xanthone derivatives isolated from the marine environment: A review. *Molecules*, 24, 1-23.
114. Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. (2009). Escape from flatland: Increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J. Med. Chem.*, 52, 6752-6756.
115. Ly, T. N.; Shimoyamada, M.; Yamauchi, R. (2006). Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3786-3793.
116. Mahmood, N. (2016). A review of α -amylase inhibitors on weight loss and glycemic control in pathological state such as obesity and diabetes. *Comp. Clin. Pathol.*, 25, 1253-1264.
117. Maldonado, E.; Cárdenas, J.; Bojórquez, H.; Escamilla, E. M.; Ortega, A. (1996). Amarisolide, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*. *Phytochemistry*, 42, 1105-1108.
118. Manzanero-Medina, G. I.; Vázquez-Dávila, M. A.; Lustre-Sánchez, H.; Gómez-Luna, R. E. (2018). Los huertos familiares de Oaxaca. Velázquez Gutiérrez, M.; Gallardo Gutiérrez, M.; Gandini, L.; Vázquez García, V.; Cross y Anzaldúa, E. M.; Echarri Cánovas, C. J.; Ríos Everardo, M.; Sánchez Castañeda, Y. (Eds.). Atlas biocultural de huertos familiares México: Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Veracruz y península de Yucatán. (pp. 222–275). Cuernavaca: UNAM, CRIM.
119. Marchioni, I.; Najjar, B.; Ruffoni, B.; Copetta, A.; Pistelli, L.; Pistelli, L. (2020). Bioactive compounds and aroma profile of some Lamiaceae edible flowers. *Plants*, 9, 1-30.
120. Marín, J. G. (2020). Propuesta de un modelo computacional para el estudio de la selectividad de los inhibidores alostéricos de PTP1B. *An Real Acad. Farm.*, 86, 99-112.
121. Marín-Peñalver, J. J.; Martín-Timón, I.; Sevillano-Collantes, C.; Del Cañizo-Gómez, F. J. (2016). Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes*, 7, 354-395.

122. Martin, G. M.; Kandasamy, B.; Dimairo, F.; Yoshioka, C.; Shyng, S. L. (2017). Anti-diabetic drug binding site in a mammalian K_{ATP} channel revealed by Cryo-EM. *eLife*, 1-27.
123. Martínez, A. L. (2015). Herbolaria mexicana para el tratamiento del dolor. *Ciencia*, 66, 60-67.
124. Martínez-Gordillo, M.; Bedolla-García, B.; Cornejo-Tenorio, G.; Fragoso-Martínez, I.; García-Peña, M. R.; González-Gallegos, J. G.; Lara-Cabrera, S. I.; Zamudio, S. (2017). Lamiaceae de México. *Bot. Sci.*, 95, 780-806.
125. Martínez-Mayorga, K.; Marmolejo-Valencia, A. F.; Cortes-Guzman, F.; García-Ramos, J. C.; Sánchez-Flores, E. I.; Barroso-Flores, J.; Medina-Franco, J. J.; Esquivel-Rodríguez, B. (2017). Toxicity assessment of structurally relevant natural products from mexican plants with antinociceptive activity. *J. Mex.Chem. Soc.*, 61, 186-196.
126. Mata, R.; Figueroa, M.; Navarrete, A.; Rivero-Cruz, I. (2019). Chemistry and Biology of Selected Mexican Medicinal Plants. Kinghorn, A. D.; Falk, H.; Gibbons, S.; Kobayashi, J.; Asakawa, Y.; Liu, J. K. (Eds.). In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. (pp. 1-142). Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG.
127. Matlock, M. K.; Hughes, T. B.; Swamidass, S. J. (2015). XenoSite server: a web-available site of metabolism prediction tool. *Bioinformatics*, 31, 1136-1137.
128. Méndez, R. T. (2020). Tratamiento del dolor en México. *Ciencia*, 71, 62-67.
129. Menting, J. G.; Whittaker, J.; Margetts, M. B.; Whittaker, L. J.; Kong, G. K-W.; Smith, B. J.; Watson, C. J.; Zakova, L.; Kletvikova, E.; Jiracek, J.; Chan, S. J.; Steiner, D. F.; Dodson, G. G.; Brzozowski, A. M.; Weiss, M. A.; Ward, C. W.; Lawrence, M. C. (2013). How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature*, 493, 241-245.
130. Mignani, S.; Rodrigues, J.; Tomas, H.; Jalal, R.; Singh, P. P.; Majoral, J.-P.; Vishwakarma, R. A. (2018). Present drug-likeness filters in medicinal chemistry during the hit and lead optimization process: how far can they be simplified? *Drug Discov. Today*, 23, 605-615.
131. Montanari, F.; Ecker, G. F. (2015). Prediction of drug-ABC-transporter interaction-recent advances and future challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 86, 17-26.
132. Moreno-Pérez, G. F.; González-Trujano, M. E.; Martínez-Gordillo, M. J.; Miguel-Chávez, R. S.; Basurto-Peña, F. A.; Dorazco-González, A.; Aguirre-Hernández, E. (2019). Amarisolide A and pedalitine as bioactive compounds in the antinociceptive effects of *Salvia circinata* (Lamiaceae). *Bot. Sci.*, 97, 355-365.
133. Moreno-Pérez, G. F.; Narváez-González, H. F.; González-Trujano, M. E. (2020). Plantas medicinales para el alivio de dolor. *Ciencia*, 71, 44-51.

134. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. (2009). AutoDock 4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, 30, 2785-2791.
135. Mostafa, M.; Takano, F.; Ohta, T. (2010). Unique phenyl ether type biflavonoids, zizyflavosides A and B with biomimetic synthesis for zizyflavoside A. *Heterocycles*, 81, 2497-2509.
136. Mouraux, A.; Plaghki, L.; Le Bars, D. (2018). Fisiología del dolor: mecanismos centrales y controles. *EMC-Anestesia-Reanimación*, 44, 1-22.
137. Nadin, A.; Hattotuwigama, C.; Churcher, I. (2012). Lead-Oriented synthesis: A new opportunity for synthetic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 1114-1122.
138. Nakai, H.; Okuyama, M.; Kim, Y. M.; Saburi, W.; Wongchawalit, J.; Mori, H.; Chiba, S.; Kimura, A. (2005). Molecular analysis of α -glucosidase belonging to GH-family 31. *Biologia, Bratislava*, 16, 131-135.
139. Ngo, Y. L.; Lau, C. H.; Chua, L. S. (2018). Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food Chem. Toxicol.*, 121, 687-700.
140. Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y. (1999). Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin. *J. Agr. Food. Chem.*, 47, 550-553.
141. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/95008> [Consulta: 8 Agosto 2020].
142. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020). Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> [Consulta: 15 Junio 2020].
143. Ortega, A.; Ortiz-Pastrana, N.; Bedolla-García, B. Y.; Toscano, R. A.; Bautista, E. (2017). NMR analysis and crystal structure of hydroxyclerodanes from mexican *Salvia* species. *J. Mol. Struct.*, 1141, 157-162.
144. Ortiz-Mendoza, N.; Zavala-Ocampo, L. M.; Martínez-Gordillo, M. J.; González-Trujano, M. E.; Peña, F. A. B.; Rodríguez, I. J. B.; Rivera Chávez, J. A.; Dorazco-González, A.; Aguirre-Hernández, E. (2020). Antinociceptive and anxiolytic-like effects of a *neo*-clerodane diterpene from *Salvia semiatrata* aerial parts. *Pharm. Biol.*, 58, 620-629.
145. Ovalle-Magallanes, B.; Rivero-Cruz, I.; Mata, R. (2014). Quality control tests for the crude drug of *Conyza filaginoides*. *Pharm. Biol.*, 52, 117-123.
146. Pabón-Henao, T.; Pineda-Saavedra, L. F.; Cañas-Mejía, O. D. (2015). Fisiopatología, evaluación y manejo del dolor agudo en pediatría. *Salutem Scientia Spiritus.*, 1, 25-37.
147. Pawliszyn, J. (1997). *Solid phase microextraction: Theory and practice*. John Willey & Sons.

148. Pérez-Nicolás, M.; Vibrans, H.; Romero-Manzanares, A. (2018). Can the use of the medicinal plants motivate forest conservation in the humid mountains of Northern Oaxaca, Mexico? *Bot. Sci.*, 96, 267-285.
149. Pillay, K.; Govender, P. (2013). Amylin uncovered: A review on the polypeptide responsible for type II diabetes. *BioMed. Res. Internl.*, 2013, 1-17.
150. Phillips, J.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.*, 26, 1781-1802.
151. Pollard, T. D.; Earnshaw, W. C. (2008). *Cell Biology*. Philadelphia, PA, USA: Elsevier saunders
152. Prieto-Martínez, F. D.; Norinder, U.; Medina-Franco, J. L. (2019). Cheminformatics explorations of natural products. Kinghorn, A. D.; Falk, H.; Gibbons, S.; Kobayashi, J.; Asakawa, Y.; Liu, J. K. (Eds.). In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. (pp. 1–37). Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG.
153. Proks, P.; De Wet, H.; Ashcroft, F. M. (2013). Molecular mechanism of sulphonylurea block of K_{ATP} channels carrying mutations that impair ATP inhibition and cause neonatal diabetes. *Diabetes*, 62, 1-34.
154. Puius, Y. A.; Zhao, Y.; Sullivan, M.; Lawrence, D. S.; Almo, S. C.; Zhang, Z. Y. (1997). Identification of a second aryl phosphate-binding site in protein-tyrosine phosphatase 1B: A paradigm for inhibitor design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 13420-13425.
155. Rachdaoui, N. (2020). Insulin: The friend and the foe in the development of type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 1-21.
156. Raja, S. N.; Carr, D. B.; Cohen, M.; Finnerup, N. B.; Flor, H.; Gibson S.; Keefe, F. J.; Mogil, J. S.; Ringkamp, M.; Sluka, K. A.; Song, X. J.; Stevens, B.; Sullivan, M. D.; Tutelman, P. R.; Ushida, T.; Vader, K. (2020). The revised international association for the study of pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161, 1976-1982.
157. Ramírez, D.; González, W.; Fissore, R. A.; Carvacho, I. (2017). Conotoxins as tools to understand the physiological function of voltage-gated calcium (Ca_v) channels. *Mar. Drugs.*, 15, 1-13.
158. 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.
159. Rangel-Grimaldo, M.; Macías-Rubalcava, M. L.; González-Andrade, M.; Raja, H.; Figueroa, M.; Mata, R. (2020). α -Glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Malbranchea circinata*. *J. Nat. Prod.*, 27, 675-683.

160. Rashid, M. (2020). Design, synthesis and ADMET prediction of bis-benzimidazole as anticancer agent. *Bioorg. Chem.*, 96, 1-18.
161. Rauf, A.; Jehan, N.; Ahmad, Z.; Mubarak, M. S. (2017). Analgesic potential of extracts and derived natural products from medicinal plants. *Pain Reli.-From Analg. to Altern. Ther.*, 37, 339-351.
162. Rehman, N. U.; Halim, S. A.; Al-Azri, M.; Khan, M.; Khan, A.; Rafiq, K.; Al-Rawahi, A.; Czuk, R.; Al-Harrasi, A. (2020). Triterpenic acids as non-competitive α -glucosidase inhibitors from *Boswellia elongate* with structure-activity relationship: *In vitro* and *in silico* studies. *Biomolecules*, 10, 1-19.
163. Reimers, E. A. L.; Cusimamani, E. F.; Rodríguez, E. A. L.; Zepeda del Valle, J. M.; Polesny, Z.; Pawera, L. (2018). An ethnobotanical study of medicinal plants used in Zacatecas state, Mexico. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 87, 1-15.
164. Rena, G.; Hardie, D. G.; Pearson, E. R. (2017). The mechanism of action of metformin. *Diabetologia*, 60, 1577-1585.
165. Rishton, G. M. (2008). Molecular diversity in the context of leadlikeness: compound properties that enable effective biochemical screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12, 340-351.
166. Rishton, G. M. (2003). Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. *Drug Discov. Today*, 8, 86-96.
167. Ríos, J. J.; Schinella, G. R.; Francini, F. (2016). Productos naturales para el tratamiento de la diabetes (II): Ensayos clínicos. *Revista de Fitoterapia*, 16, 49-55.
168. Ríos, J. J.; Andújar, I.; Schinella, G. R.; Francini, F. (2019). Modulation of diabetes by natural products and medicinal plants via incretins. *Planta Med.*, 85, 825-839.
169. Rivera-Chávez, J.; Bustos-Brito, C.; Aguilar-Ramírez, E.; Martínez-Otero, D.; Rosales-Vázquez, L. D.; Dorazco-González, A.; Cano-Sánchez, P. (2020). Hidroxy-*neo*-Clerodanes and 5, 10-*seco-neo*-Clerodanes from *Salvia decora*. *J. Nat. Prod.*, 83, 2212-2220.
170. Rocha-González, H. I.; Blaisdell-López, E.; Granados-Soto, V.; Navarrete, A. (2010). Antinociceptive effect of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin isolated from *Heterotheca inuloides*: Role of peripheral 5-HT₁ serotonergic receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 649, 154-160.
171. Röder, P. V.; Wu, B.; Liu, Y.; Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.*, 48, 1-19.
172. Roe, D. R.; Cheatham, T. E. III. (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J. Chem. Theory Comput.*, 9, 3084-3095.
173. Romo-Asunción, D.; Ávila-Calderón, M. A.; Ramos-López, M. A.; Barranco-Florido, J. E.; Rodríguez-Navarro, S.; Romero-Gómez, S.; Aldeco-Pérez, E. J.; Pacheco-Aguilar, J. R.; Rico-

- Rodríguez, M. A. (2016). Juvenomimetic and insecticidal activities of *Senecio salignus* (Asteraceae) and *Salvia microphylla* (Lamiaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Fla. Entomol.*, 99, 345-351.
174. Rudik, A.; Dmitriev, A.; Lagunin, A.; Filiminov, D.; Poroikov, V. (2015). *Bioinformatics*, 31, 2046-2048.
175. Rydberg, P.; Gloriam, D. E.; Zaretski, J.; Breneman, C.; Olsen, L. (2010). SMARTCyp: A 2D method for prediction of cytochrome P450-mediated drug metabolism. *ACS Med. Chem. Lett.*, 1, 96-100.
176. Sahoo, N.; Manchikanti, P.; Dey, S. Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*, 81, 462-471.
177. Salehi, B.; Ata, A.; Kumar, N. V. A.; Sharopov, F.; Ramírez-Alarcón, K.; Ruíz-Ortega, A.; Ayatollahi, S. A.; Fokou, P. V. T.; Kobarfard, F.; Zakaria, Z. A.; Iriti, M.; Taheri, Y.; Martorell, M.; Sureda, A.; Setzer, W. N.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Santini, A.; Capasso, R.; Ostrander, E. A.; Rhaman, A. U.; Choudhary, M. I.; Cho, W. C.; Sharifi-Rad, J. (2019). Antidiabetic potential of medicinal plants and their active components. *Biomolecules*, 9, 1-111.
178. Salinas-Arellano, E.; Pérez-Vásquez, A.; Rivero-Cruz, I.; Torres-Colin, R.; González-Andrade, M.; Rangel-Grimaldo, M.; Mata, R. (2020). Flavonoids and terpenoids with PTP-1B inhibitory properties from the infusion of *Salvia amarissima* Ortega. *Molecules*, 25, 1-18.
179. Sander, T.; Freyss, J.; Von Korff, M.; Rufener, C. (2015). DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J. Chem. Inf. Model.*, 55, 460-473.
180. Santana, K. L. D.; Galvao, M. D. S.; Jesus, M. S. D.; Nogueira, J. P.; Narain, N. (2017). HS-SPME optimization and extraction of volatile compounds from soursop (*Annona muricata* L.) pulp with emphasis on their characteristic impact compounds. *Food Sci. Technol.*, 37, 250-260.
181. Schroeder, C. I. y Lewis, R. J. (2006). ω -Conotoxins GVIA, MVIIA and CVID: SAR and clinical potential. *Mar. Drugs*, 4, 193-214.
182. Schweigert, N.; Zehnder, A. J. B.; Eggen, R. I. L. (2001). Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganism to mammals. *Environ. Microbiol.*, 3, 81-91.
183. Scott, L. J.; Spencer, C. M. (2000). Miglitol. A review of its therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 59, 521-549.
184. Seeliger, D.; De Groot, B. L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 24, 417-422.
185. Sels, J. P. JE.; Huijberts, M. S.P.; Wolffenbuttel, B. H. R. (1999). Miglitol, a new α -glucosidase inhibitor. *Exp. Opin. Pharmacother.*, 1, 149-156.

186. Shahani, S.; Shahani, L. (2015). Use of insulin in diabetes: a century of treatment. *Hong Kong Med. J.*, 21, 553-559.
187. Tang, Y.; Zhang, X.; Chen, Z.; Yin, W.; Nan, G.; Tian, J.; Ye, F.; Xiao, Z. (2018). Novel benzamido derivatives as PTP1B inhibitors with anti-hyperglycemic and lipid-lowering efficacy. *Acta Pharm. Sin. B.*, 8, 919-932.
188. Tjolsen, A.; Berge, O. G.; Hunskaar, S.; Rosland, J. H.; Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51, 5-17.
189. Tlacomulco-Flores, L. L.; Déciga-Campos, M.; González-Trujano, M. E.; Carballo-Villalobos, A. I.; Pellicer, F. (2019). Antinociceptive effects of *Salvia divinorum* and bioactive salvinorins in experimental pain models in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 248, 1-32.
190. Tonks, N. K. (2003). PTP1B: From the sidelines to the front lines! *FEBS Letters*, 546, 140-148.
191. Topcu, G. (2006). Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J. Nat. Prod.*, 69, 482-487.
192. Trevizan, L. F. N.; Do Nascimento, K. F.; Santos, J. A.; Leite Kassuya, C. A.; Lima Cardoso, C. A.; Vieira, M. D. C.; Moreira, F. M. F.; Croda, J.; Formagio, A. S. N. (2016). Anti-inflammatory, antioxidant and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of viridiflorol: The major constituent of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess) Radlk. *J. Ethnopharmacol.* 192, 1-24.
193. Trott, O.; Olson, A. J. (2010). Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.*, 31, 455-461.
194. Tundis, R.; Loizzo, M. R.; Menichini, F. (2010). Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: An update. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 10, 315-331.
195. Turner, N.; Zeng, X. Y.; Osborne, B.; Rogers, S.; Ye, J. M. (2016). Repurposing drugs to target the diabetes epidemic. *Trends Pharmacol. Sci.*, 37, 379-389.
196. Van den Dool, H.; Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 11, 463-471.
197. Van de Laar, F. A.; Lucassen, P. L. B. J.; Akkermans, R. P.; Van de Lisdonk, E. H.; Rutten, G. E. H. M.; Van Weel, C. (2005). Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 18, 1-184.
198. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.*, 45, 2615-2623.

199. Verma, M.; Gupta, S. J.; Chaudhary, A.; Garg, V. K. (2017). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as antidiabetic agents-A brief review. *Bioorg. Chem.*, 70, 267-283.
200. Verma, J.; Awasthi, C.; Jamal, Q. M. S.; Siddiqui, M. H.; Wadhwa, G.; Kesari, K. K. (2018). α -amylase inhibitor's performance in the control of diabetes mellitus: An application of computational biology. Wadhwa, G.; Shanmughavel P.; Singh, A.; Bellare, J. (Eds). *Current trends in bioinformatics: An insight*. (pp. 307-332). Singapore: Springer Singapore.
201. Verma, R. S.; Padalia, R. C.; Singh, V. R.; Goswami, P.; Chauhan, A.; Bhukya, B. (2017). Natural benzaldehyde from *Prunus pérsica* (L.) Batsch. *Int. J. Food Prop.*, 20, 1259-1263.
202. Viselli, S.; Chandar, N. (2010). *Biología Celular y Molecular*. Philadelphia, PA, USA: Lippincott William y Wilkins.
203. Voirin, B.; Viricel, M. R.; Favre-Bonvin, J.; Van den Broucke, C. O.; Lemli, J. (1985). 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone and other methoxylated flavonoids isolated from *Thymus satureioides*. *Planta Med.*, 51, 523-5.
204. Walker, R. C.; Crowley, M. F.; Case, D. A. (2007). The implementation of a fast and accurate QM/MM potential method in Amber. *J. Comput. Chem.*, 29, 1019-1031.
205. Wang, K.; Bao, L.; Ma, K.; Zhang, J.; Chen, B.; Han, J.; Ren, J.; Luo, H.; Liu, H. (2017). A novel class of α -glucosidase and HMG-CoA reductase inhibitors from *Ganoderma leucocontextum* and the anti-diabetic properties of ganomycin I in KK-A^y mice. *Eur. J. Med. Chem.*, 127, 1035-1046.
206. Wang, L.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E. M.; Blunder, M.; Liu, X.; Malainer, C.; Blazevic, T.; Schwaiger, S.; Rollinger, J. M.; Heiss, E. H.; Shuster, D.; Kopp, B.; Bauer, R.; Stuppner, H.; Dirsch, V. M.; Atanasov, A. G. (2014). Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): A review. *Biochem. Pharmacol.*, 92, 73-89.
207. Watanabe, R.; Ohashi, R.; Esaki, T.; Kawashima, H.; Natsume-Kitatani, Y.; Nagao, C.; Mizuguchi, K. (2019). Development of an *in silico* prediction system of human renal excretion and clearance from chemical structure information incorporating fraction unbound in plasma as a descriptor. *Sci. Rep.*, 9, 1-11.
208. Weyrich, L. S.; Duchene, S.; Soubrier, J.; Arriola, L.; Llamas, B.; Breen, J.; Morris, A. G.; Alt, K. W.; Caramelli, D.; Dresely, V.; Farrell, M.; Farrer, A. G.; Francken, M.; Gully, N.; Haak, W.; Hardy, K.; Harvati, K.; Held, P.; Holmes, E. C.; Kaidonis, J.; Lalueza-Fox, C.; De la Rasilla, M.; Rosas, A.; Semal, P.; Soltysiak, A.; Townsend, G.; Usai, D.; Whal, J.; Huson, D. H.; Dobney, K.; Cooper, A. (2017). Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. *Nature*, 544, 357-361.

209. William, S. J.; Goddard-Borger, E. D. (2020). α -glucosidase inhibitors as host-directed antiviral agents with potential for the treatment of COVID-19. *Biochem. Soc. Trans.*, 48, 1287-1295.
210. Wu, T. H.; Cheng, Y. Y.; Liou, J. R.; Way, T. D.; Chen, C. J.; Chen, Y. H.; Kuo, S. C.; El-Shazly, M.; Chang, F. R.; Wu, Y. C.; Liaw, C. C. (2014). Clerodane diterpenes from *Polyalthia longifolia* var. *pendula* protect SK-N-MC human neuroblastoma cells from β -Amyloid insult. *RSC Adv.*, 4, 23707-23712.
211. Xi, Y.; Zhang, Y.; Zhu, S.; Luo, Y.; Xu, P.; Huang, Z. (2020). PPAR-Mediated toxicology and applied pharmacology. *Cells*, 9, 1-22.
212. Xiao, J.; Kai, G.; Yamamoto, K.; Chen, X. (2013). Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: A review on structure-activity relationship aspect. *Crit. Rev. Food Sci.*, 53, 818-836.
213. Xu, J.; Wang, X.; Yue, J.; Sun, Y.; Zhang, X.; Zhao, Y. (2018). Polyphenols from acorn leaves (*Quercus liaotungensis*) protect pancreatic beta cells and their inhibitory activity against α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B. *Molecules*, 23, 1-12.
214. Yamamoto, K.; Miyake, H.; Kusunoki, M.; Osaki, S. (2010). Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose. *FEBS J.*, 277, 4205-4214.
215. Yamazaki, H.; Kanno, S. I.; Abdjul, D. B.; Namikoshi, M. (2017). A bromopyrrole-containing diterpene alkaloid from the Okinawan marine sponge *Agelas nakamurai* activates the insulin pathway in Huh-7 human hepatoma cells by inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27, 2207-2209.
216. Yang, S. B.; Yang, A. M.; Su, S. F.; Wang, H. H.; Wang, N. B.; Chen, Q. (2012). Neuronostatin induces hyperalgesia in formalin test in mice. *Neurosci. Lett.*, 506, 126-130.
217. Zabarar, D.; Wyllie, S. G. (2001). Quantitative analysis of terpenoids in the gas phase using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). *Flavour Fragr. J.*, 16, 411-416.
218. Zhang, N.; Wang, C.; Zhu, F.; Mao, H.; Bai, P.; Chen, L. L.; Zheng, T.; Peng, M. M.; Qiu, K. L.; Wang, Y.; Yu, M.; Xu, S.; Zhao, J.; Li, N.; Zhou, M. (2020). Risk factors for poor outcomes of diabetes patients with COVID-19: A single-center, retrospective study in early outbreak in China. *Front. Endocrinol.*, 11, 1-9.
219. Zhao, B. T.; Le, D. D.; Nguyen, P. H.; Ali, M. Y.; Choi, J. S.; Min, B. S.; Shin, H. M.; Rhee, H. I.; Woo, M. H. (2016). PTP1B, α -glucosidase, and DPP-IV inhibitory effects for chromene derivatives from the leaves of *Smilax china* L. *Chem-Biol. Interact.*, 256, 27-37.

220. Zhao, X.; Tao, J.; Zhang, T.; Jiang, S.; Wei, W.; Han, H.; Shao, Y.; Zhou, G.; Yue, H. (2019). Resveratrolside alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice by competitively inhibiting α -Glucosidase. *J. Agric. Food Chem.*, 67, 2886-2893.

9. Anexos

Anexo 1:

Salvia amarissima

- Figura S1.** Espectro de RMN-¹H de la amarisólida (**1**) en CD₃OD (400 MHz)
- Figura S2.** Espectro de RMN-¹³C de la amarisólida (**1**) en CD₃OD (100 MHz)
- Figura S3.** Espectro de RMN-¹H de nuchensin (**50**) en CD₃OD (700 MHz)
- Figura S4.** Espectro de RMN-¹³C de nuchensin (**50**) en CD₃OD (175 MHz)
- Figura S5.** Espectro de RMN-¹H de 6-hidroxiluteolina (**51**) en CD₃OD (700 MHz)
- Figura S6.** Espectro de RMN-¹³C de 6-hidroxiluteolina (**51**) en CD₃OD (175 MHz)
- Figura S7.** Espectro de RMN-¹H de la rutina (**52**) en CD₃OD (400 MHz)
- Figura S8.** Espectro de RMN-¹H del ácido rosmarínico (**54**) en CD₃OD (700 MHz)
- Figura S9.** Espectro de RMN-¹³C del ácido rosmarínico (**54**) en CD₃OD (175 MHz)
- Figura S10.** Espectro de RMN-¹H de la isoquercitrina (**53**) en CD₃OD (700 MHz)
- Figura S11.** Espectro de RMN-¹³C de la isoquercitrina (**53**) en CD₃OD (175 MHz)
- Figura S12.** Espectro de COSY de la amarisólida G (**55a,b**) en DMSO-*d*₆
- Figura S13.** Espectro de HSQC de la amarisólida G (**55a,b**) en DMSO-*d*₆
- Figura S14.** Espectro de HMBC de la amarisólida G (**55a,b**) en DMSO-*d*₆
- Figura S15.** Espectro de TOCSY de la amarisólida G (**55a,b**) en DMSO-*d*₆
- Figura S16.** Espectro de FTIR por reflectancia ATR de la amarisólida G (**55a,b**).
Aceite esencial lote (fresco-seco)
- Figura S17.** Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del 3-metoxi-*p*-cymeno (**58**)
- Figura S18.** Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del (*E*)-acetato de pinocarvilo (**59**)
- Figura S19.** Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del δ -elemeno (**60**)
- Figura S20.** Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del α -bourboneno (**61**)
- Figura S21.** Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del β -cariofileno (**39**)
- Figura S22.** Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del α -cariofileno (**62**)
- Figura S23.** Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del germancreno D (**63**)
- Figura S24.** Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del β -selineno (**64**)
- Figura S25.** Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del espatulenol (**65**).
Componentes de la mezcla volátil
- Figura S26.** Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del 2-hexenal (**66**)
- Figura S27.** Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del benzaldehído (**67**)
- Tabla S1.** Confórmeros para el cálculo de DC para el epímero 14 *R* de la amarisólida G (**55a,b**)
- Tabla S2.** Cálculo de DCE para el epímero 14 *R* de la amarisólida G (**55a,b**)
- Tabla S3.** Confórmeros para el cálculo de DC para el epímero 14 *S* de la amarisólida G (**55a,b**)
- Tabla S4.** Cálculo de DCE para el epímero 14 *S* de la amarisólida G (**55a,b**)

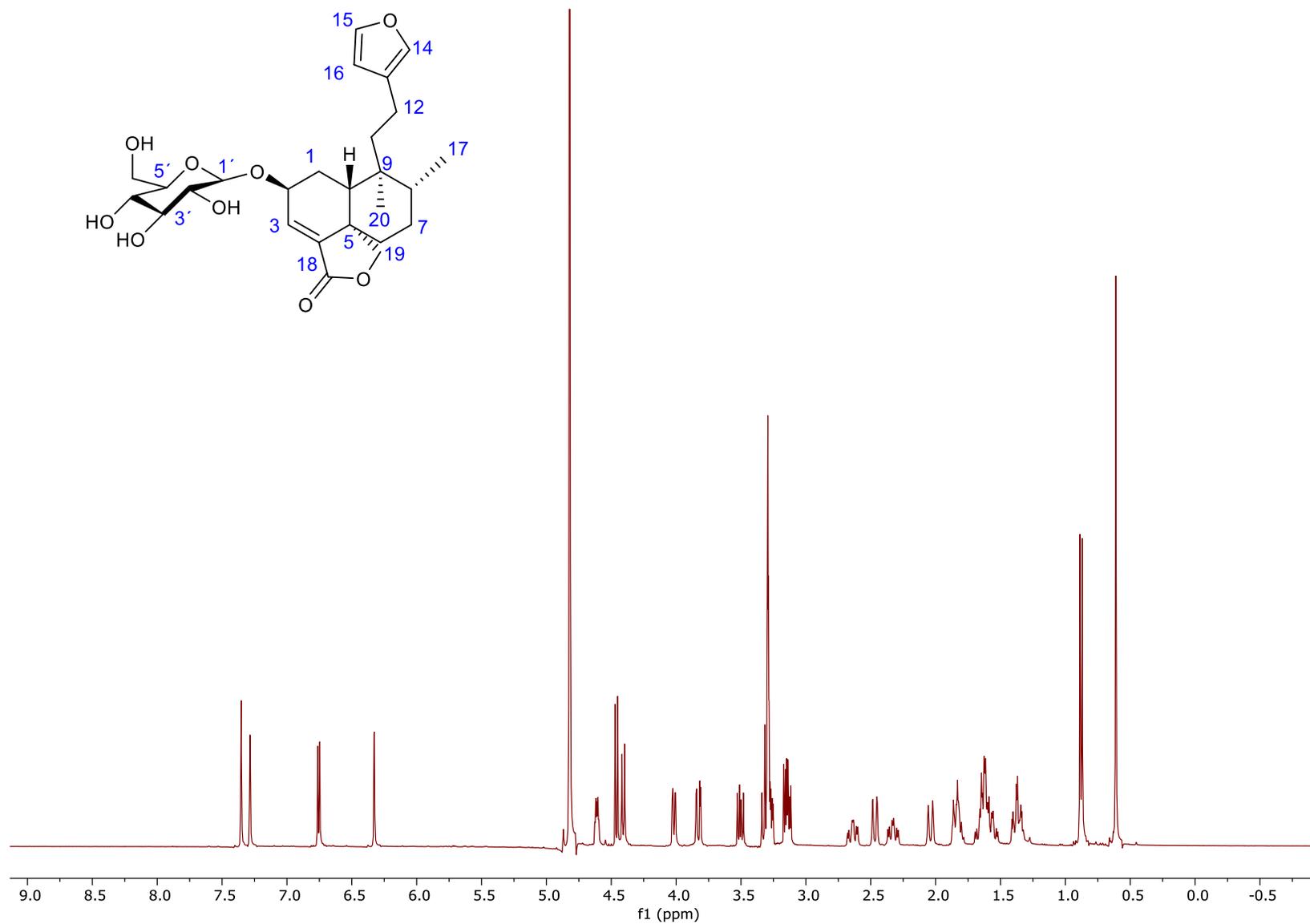


Figura S1. Espectro de RMN- ^1H de la amarisolida (**1**) en CD_3OD (400 MHz)

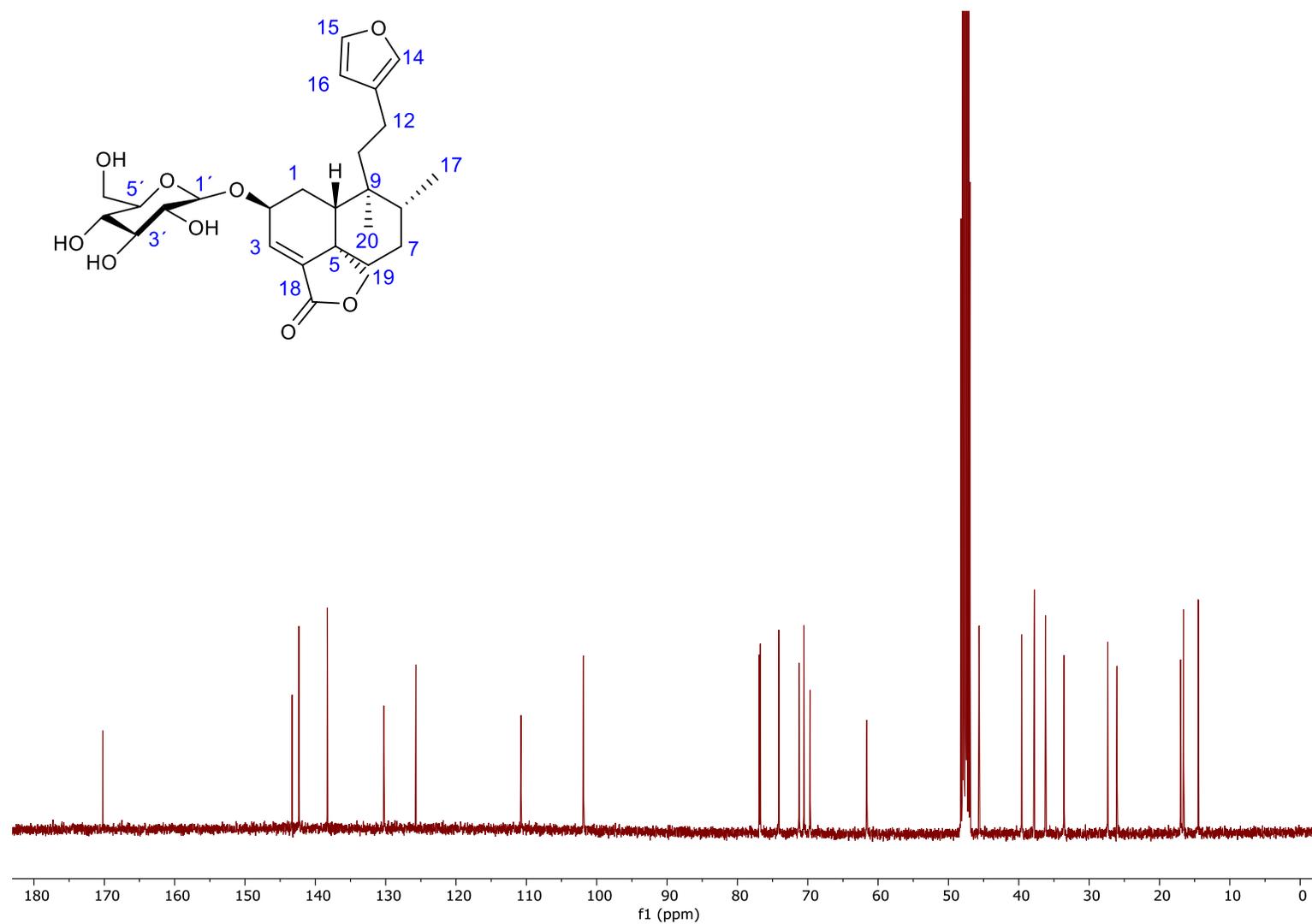


Figura S2. Espectro de RMN- ^{13}C de la amarisolida (**1**) en CD_3OD (100 MHz)

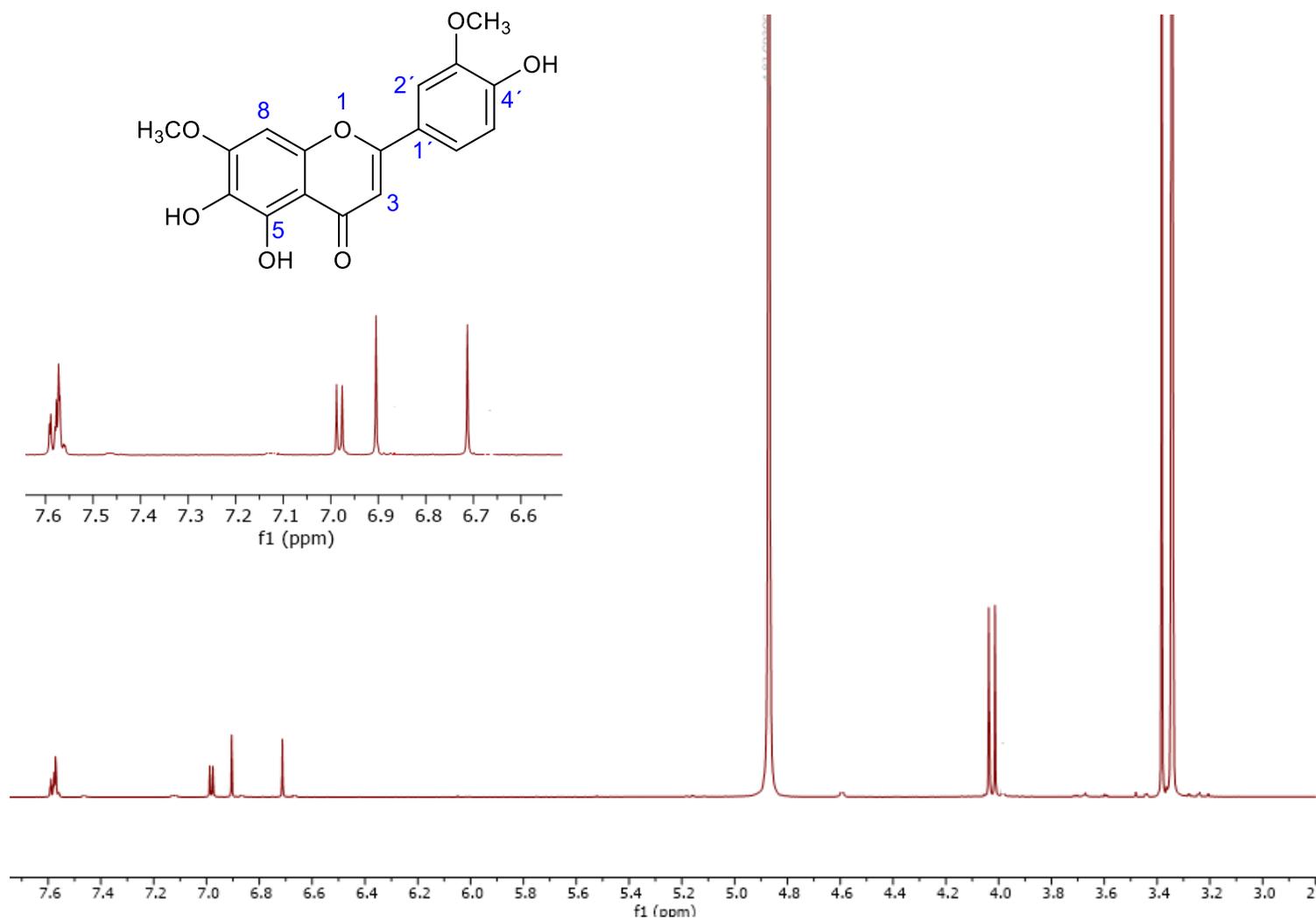


Figura S3. Espectro de RMN-¹H de nuchensin (**50**) en CD₃OD (700 MHz)

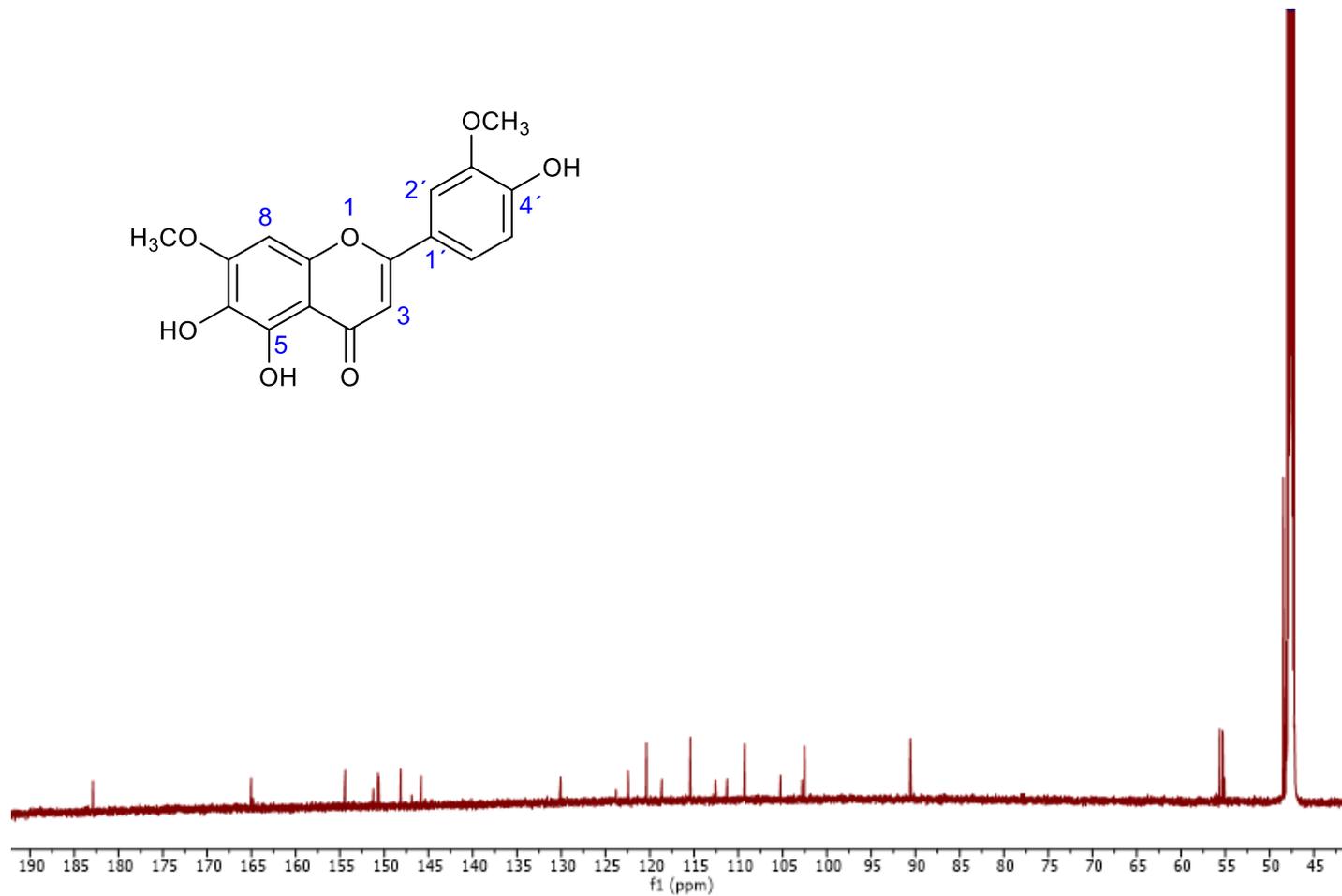


Figura S4. Espectro de RMN-¹³C de nuchensin (**50**) en CD₃OD (175 MHz)

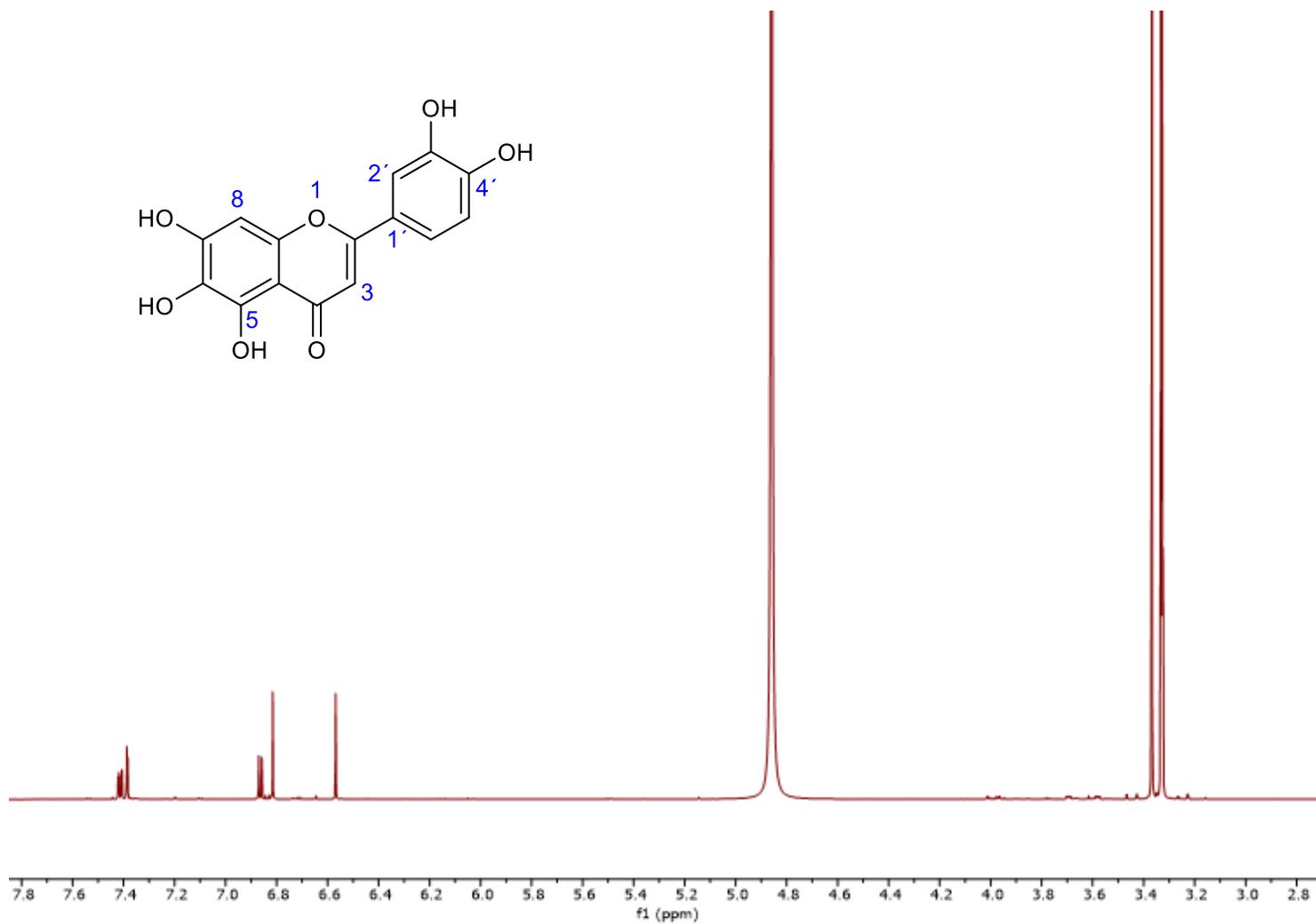


Figura S5. Espectro de RMN-¹H de 6-hidroxiluteolina (**51**) en CD₃OD (700 MHz)

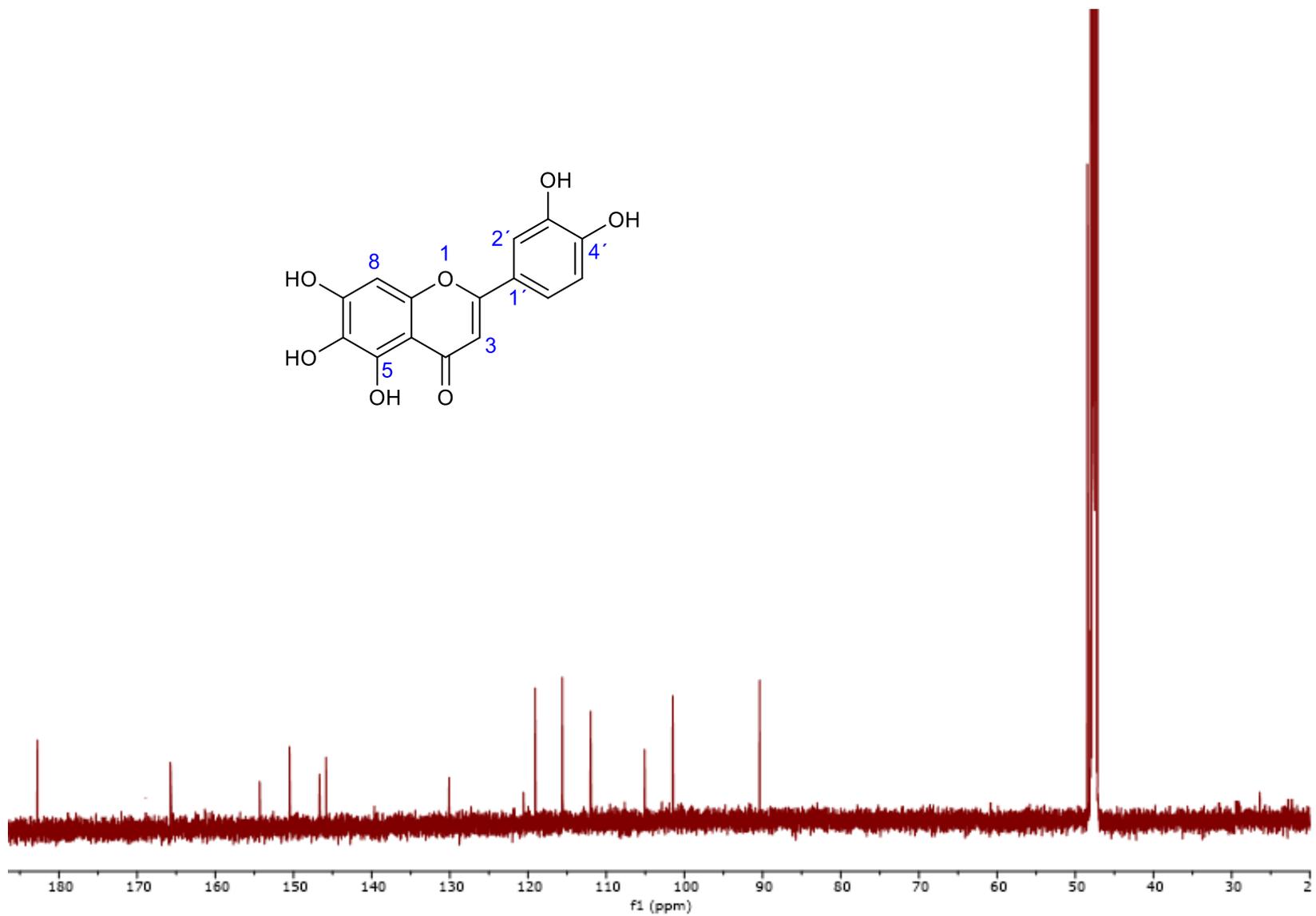
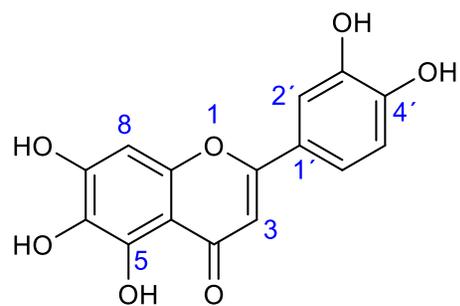


Figura S6. Espectro de RMN-¹³C de 6-hidroxluteolina (**51**) en CD₃OD (175 MHz)

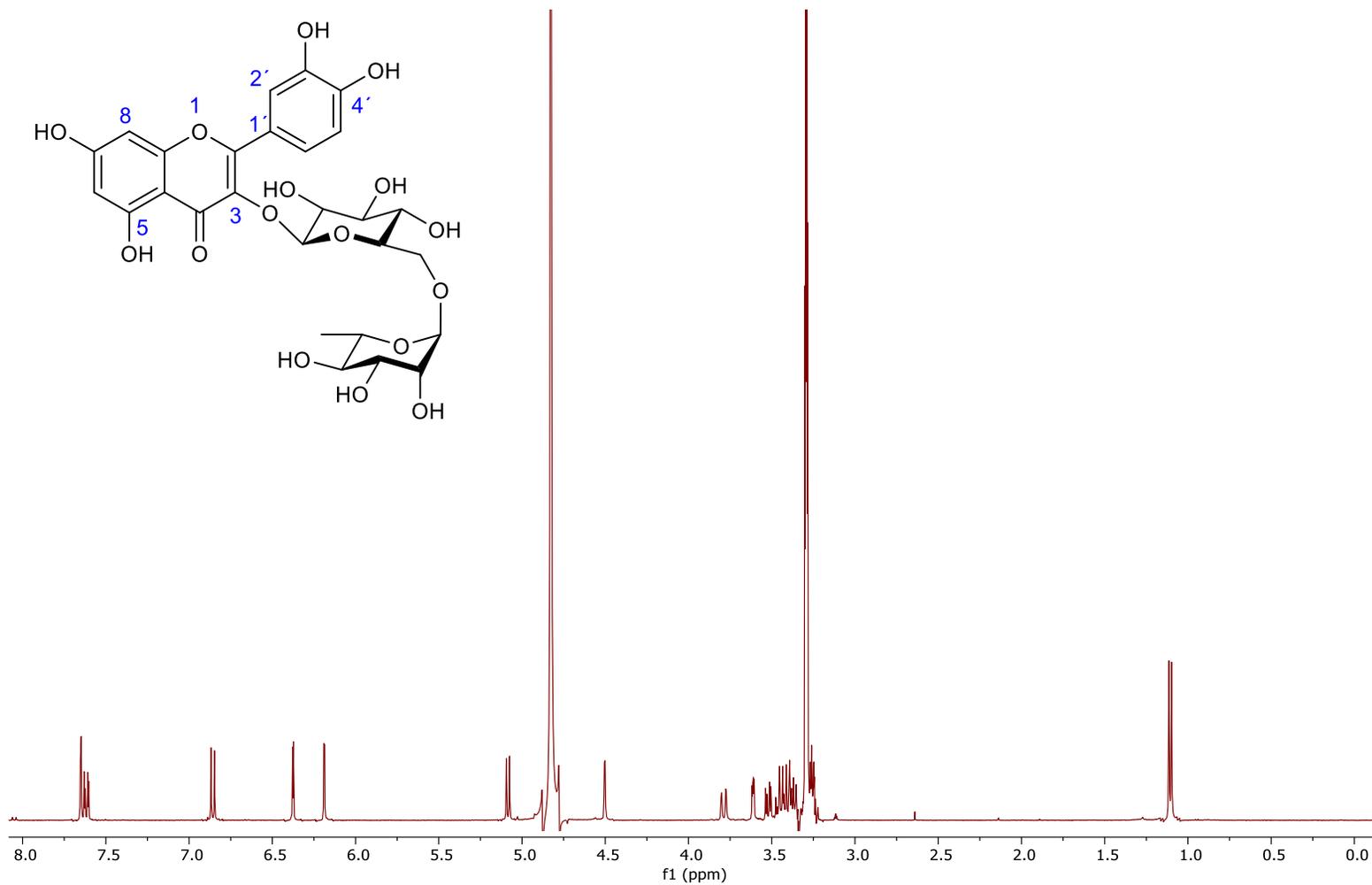


Figura S7. Espectro de RMN-¹H de la rutina (**52**) en CD₃OD (400 MHz)

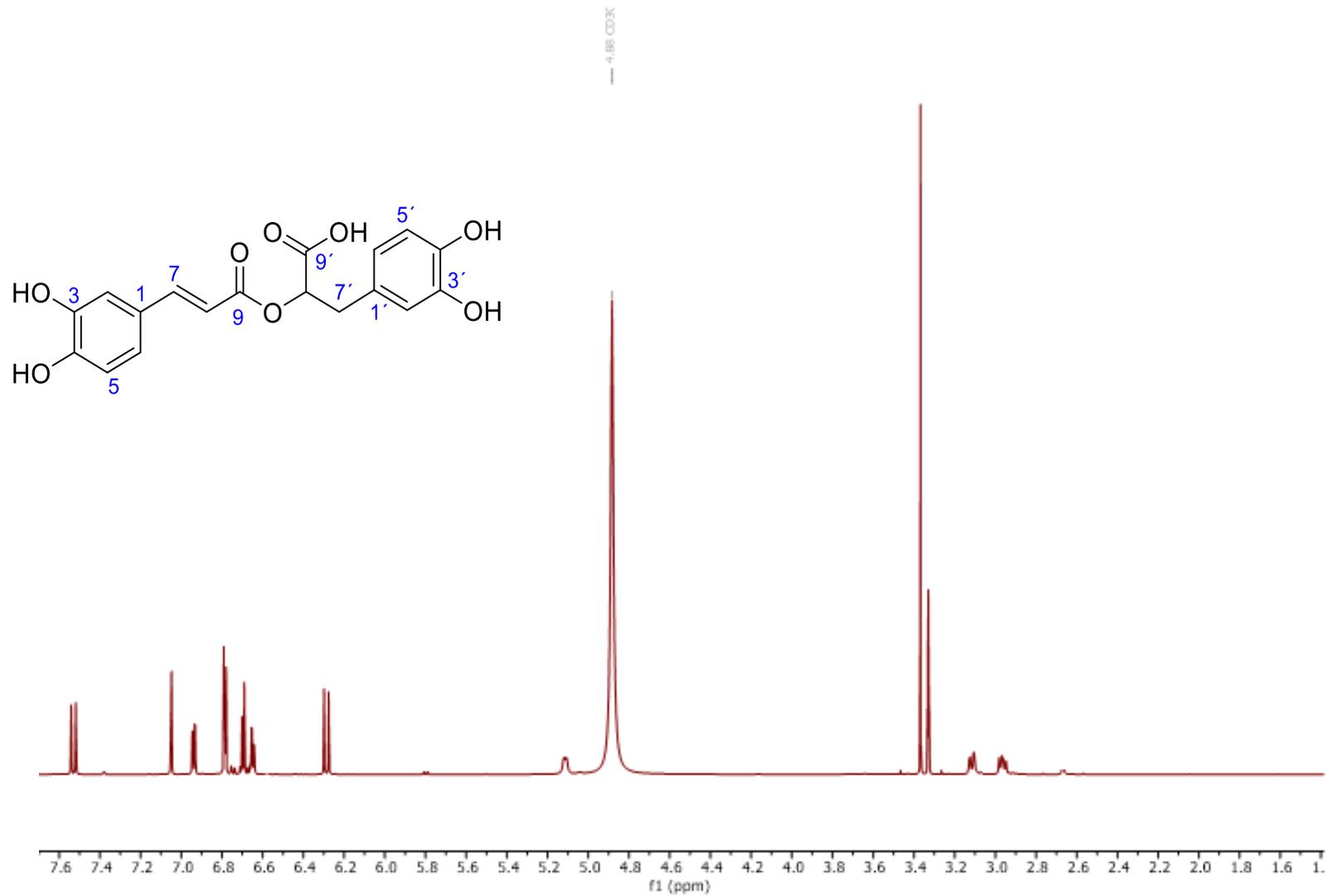


Figura S8. Espectro de RMN- ^1H del ácido rosmarínico (**54**) en CD_3OD (700 MHz)

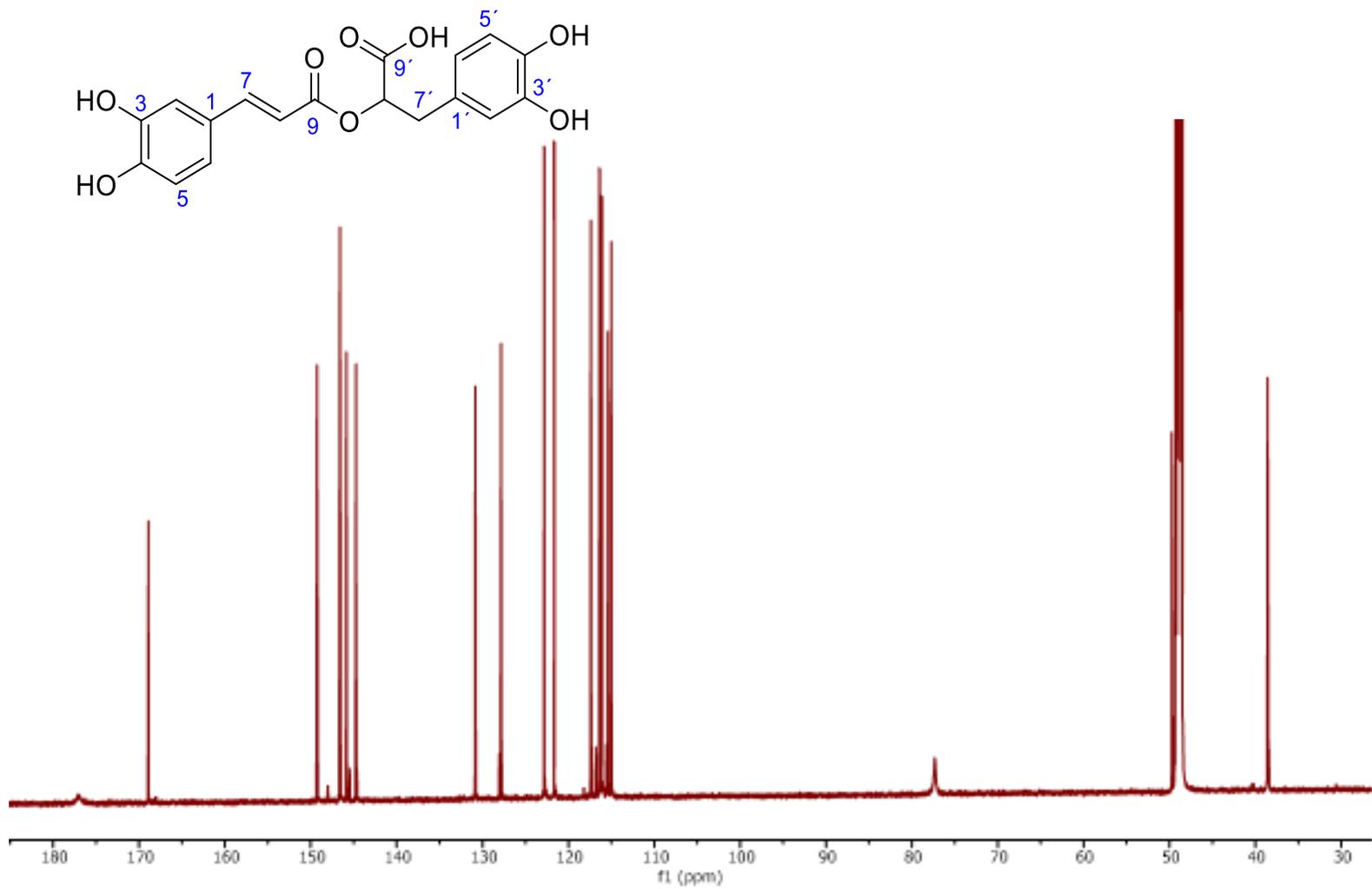


Figura S9. Espectro de RMN-¹³C del ácido rosmarínico (**54**) en CD₃OD (175 MHz)

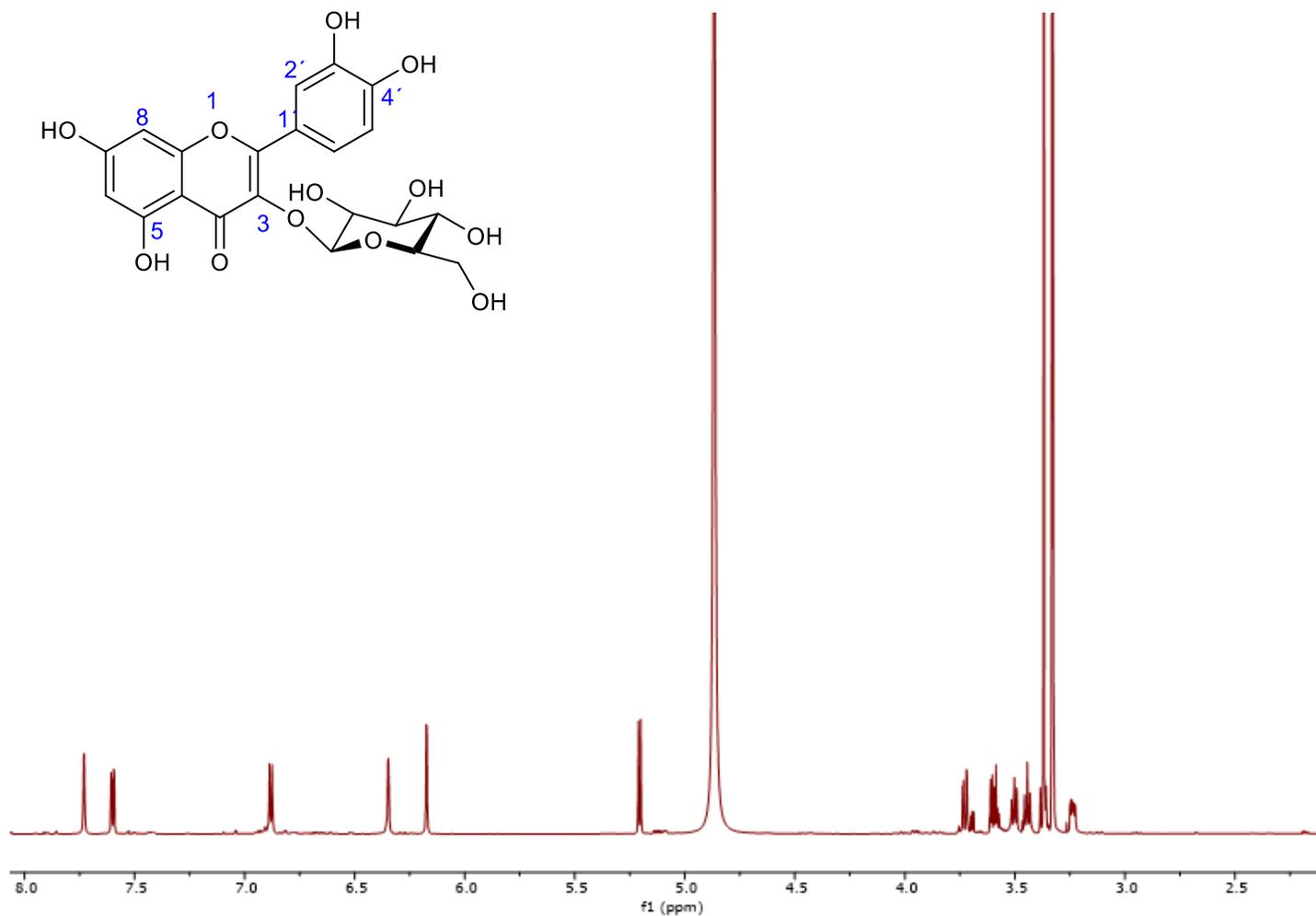


Figure S10. Espectro de RMN- ^1H de la isoquercitrina (**53**) en CD_3OD (700 MHz)

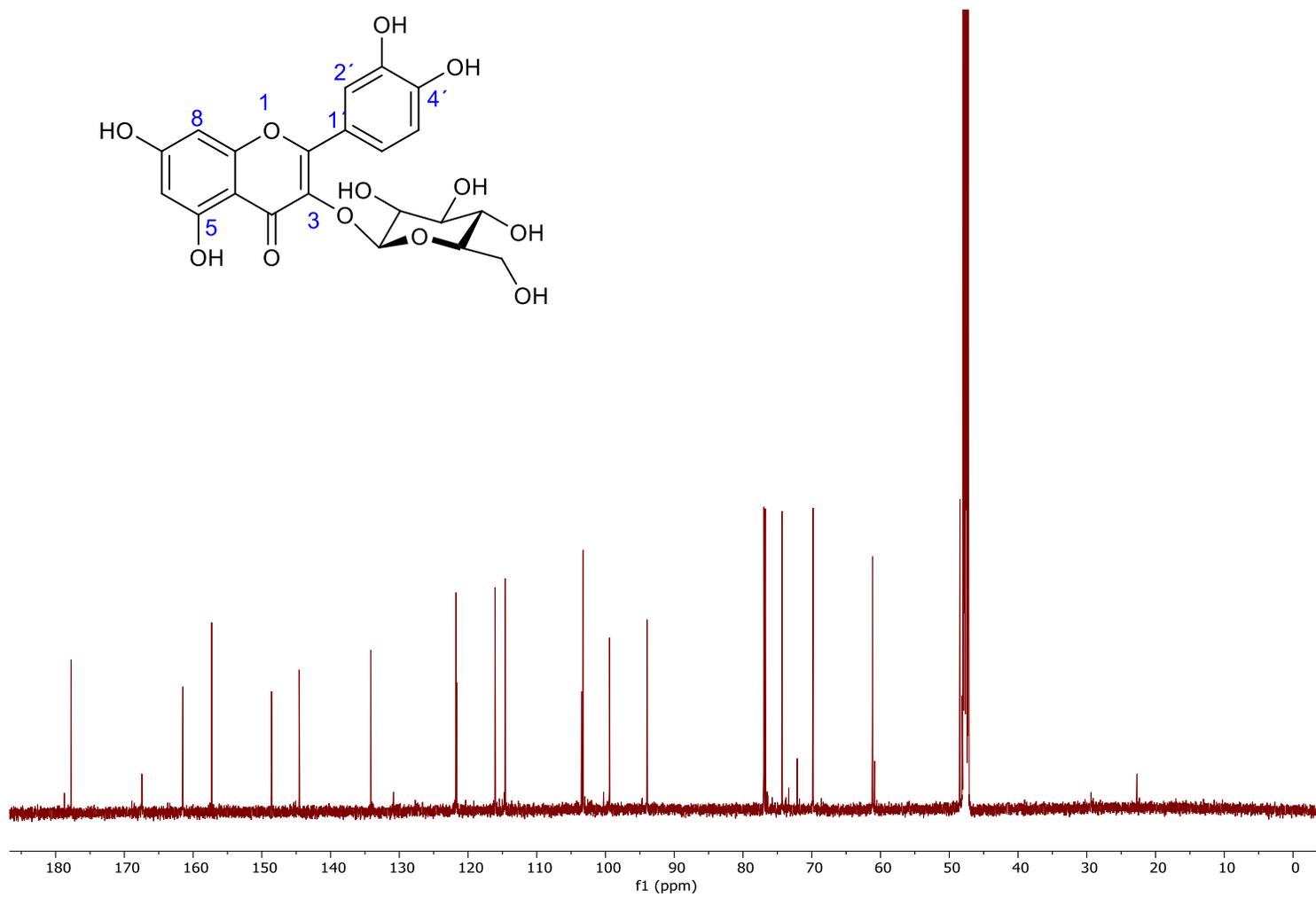


Figura S11. Espectro de RMN-¹³C de la isoquercitrina (**53**) en CD₃OD (175 MHz)

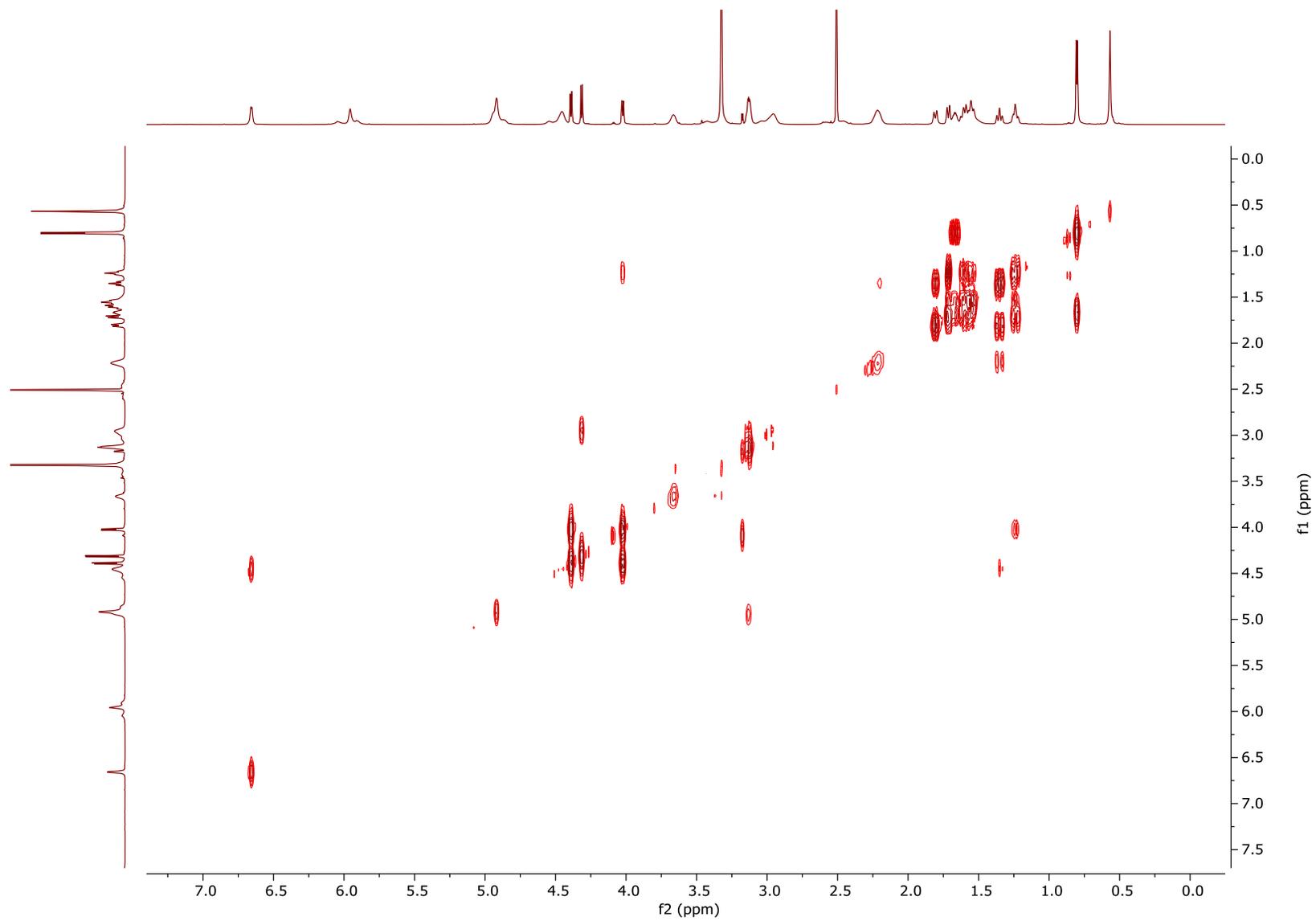


Figura S12. Espectro de COSY de la amarisolida G (**55a,b**) en DMSO- d_6

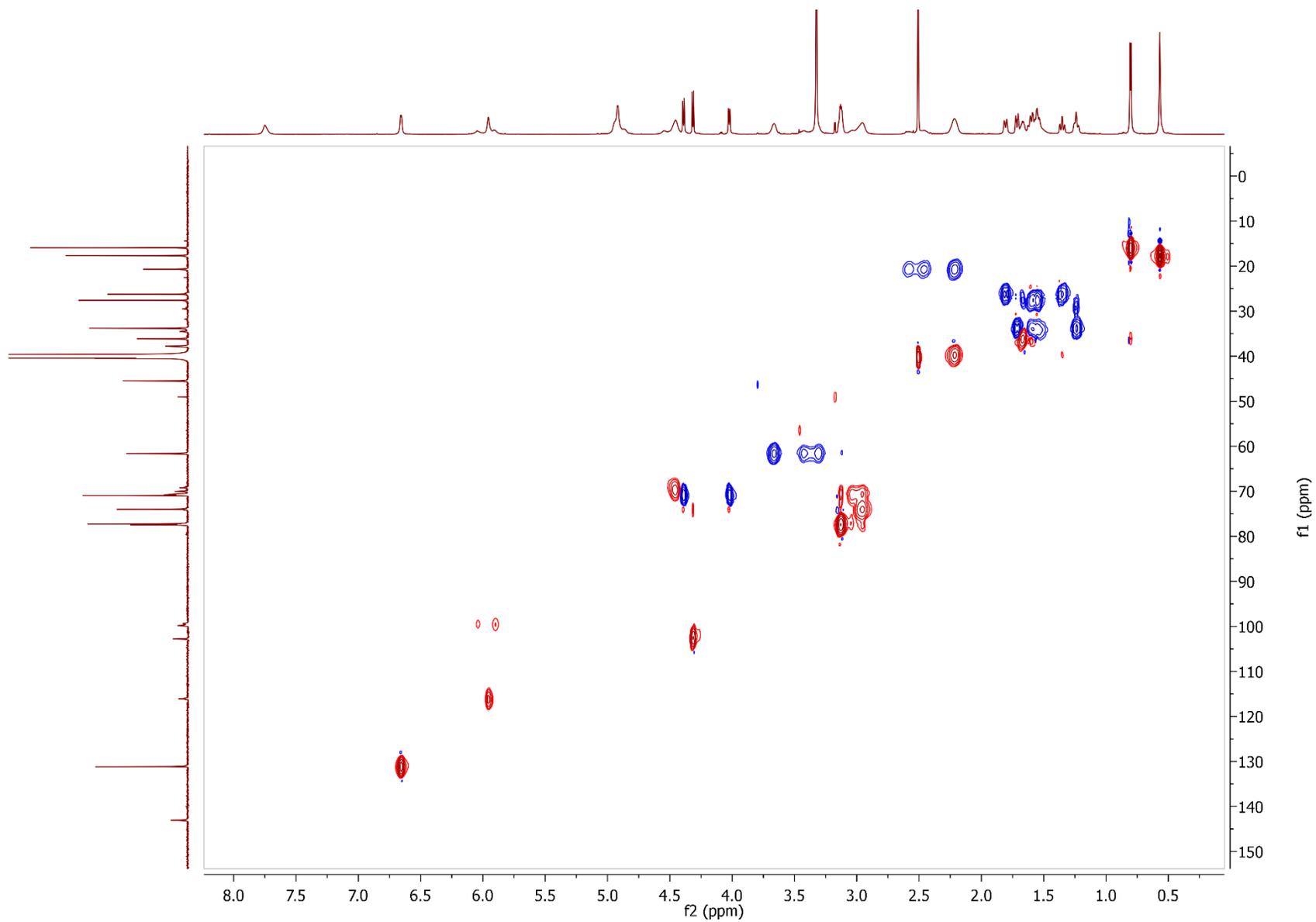


Figura S13. Espectro de HSQC de la amarísólida G (**55a,b**) en DMSO- d_6

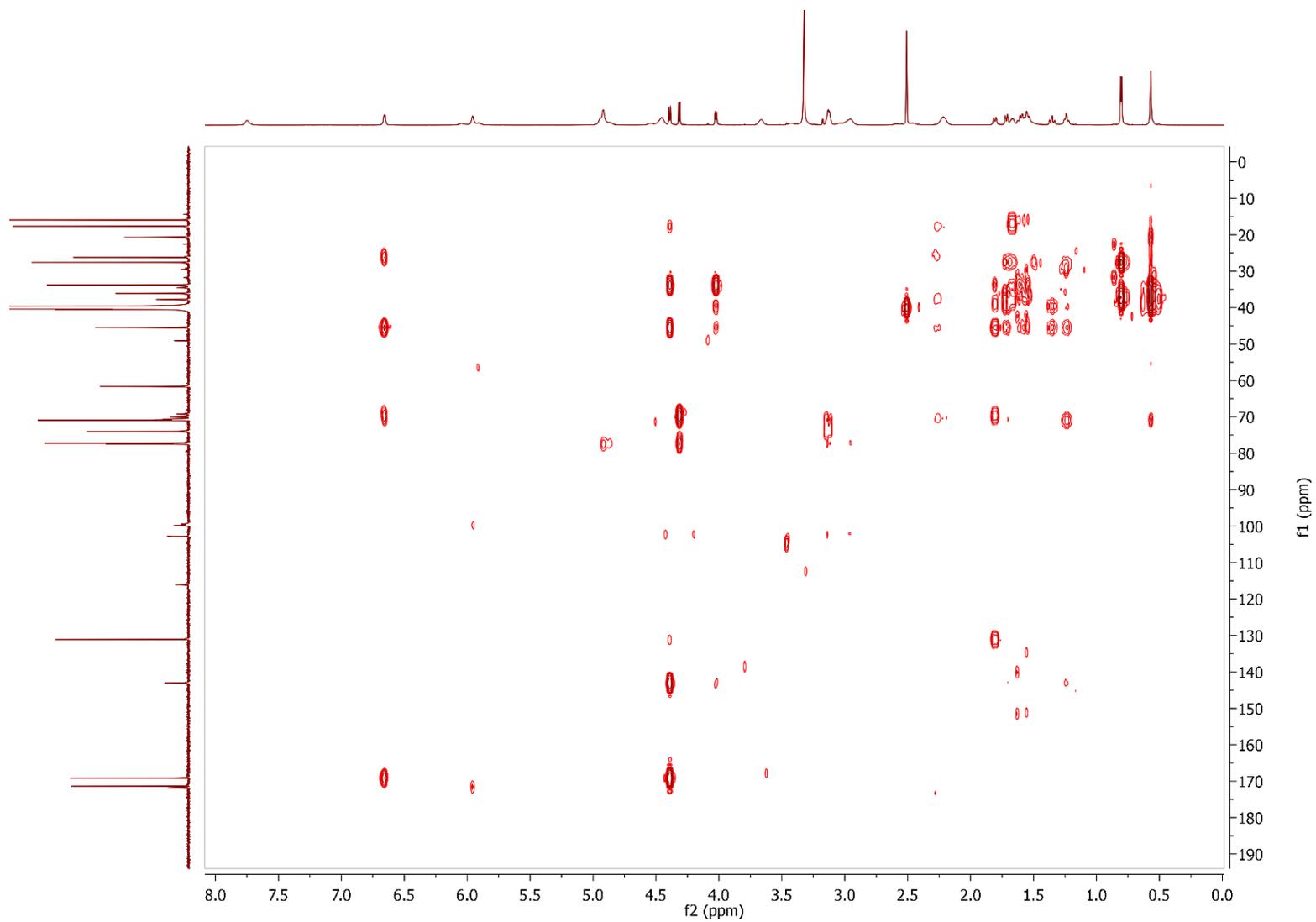


Figura S14. Espectro de HMBC de la amarisolida G (**55a,b**) en DMSO-*d*₆

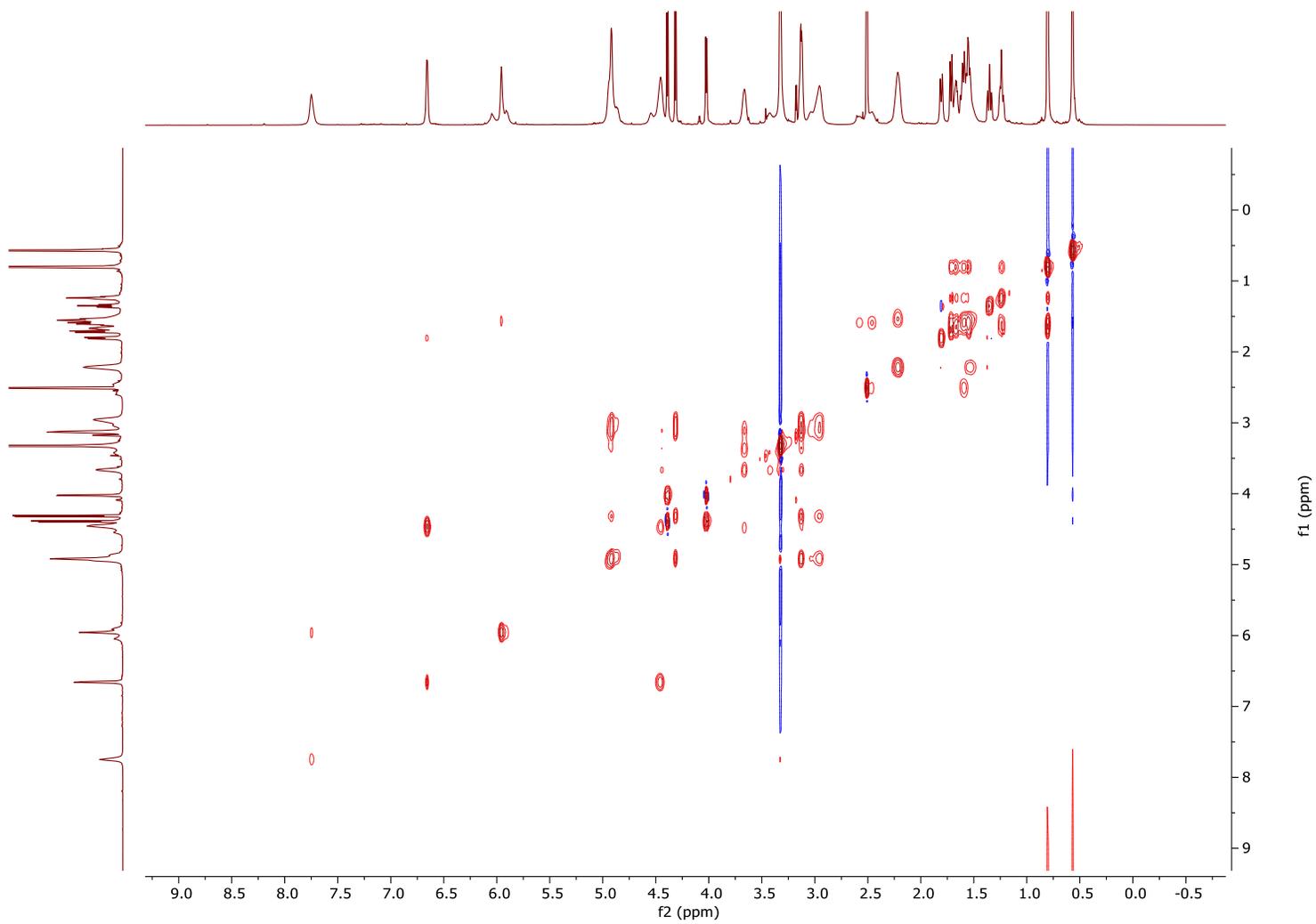


Figura S15. Espectro de TOCSY de la amarisolida G (**55a,b**) en DMSO- d_6

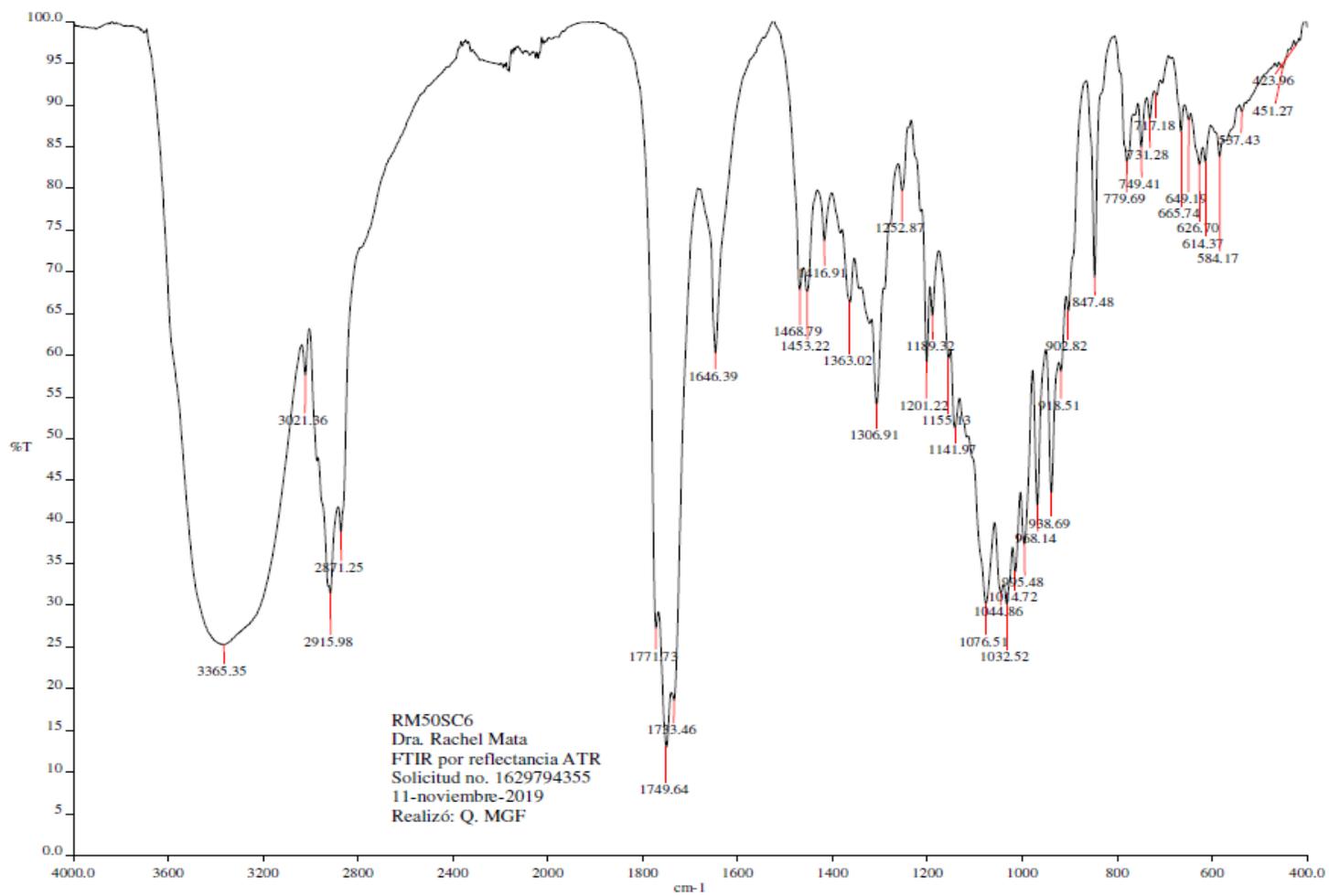
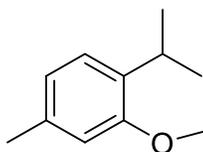


Figura S16. Espectro de FTIR por reflectancia ATR de la amarisolida G (**55a,b**).

3-Metoxi-*p*-cimeno (**58**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
978	480.894	1218.9	1215	4.4003	C ₁₁ H ₁₆ O	164



Peak True - sample "RM8AEPS:1", peak 1, at 480.894 s

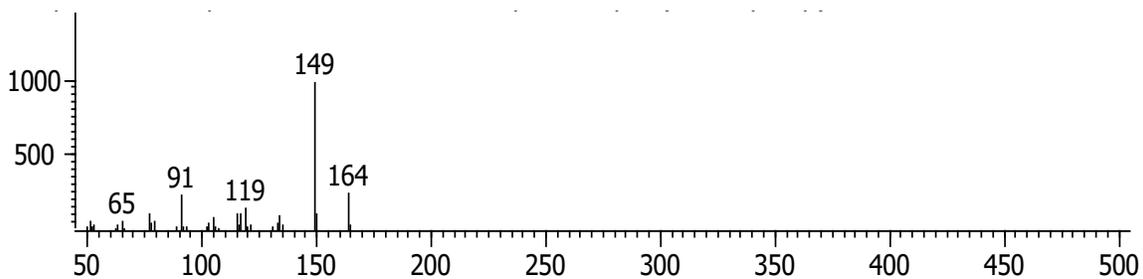
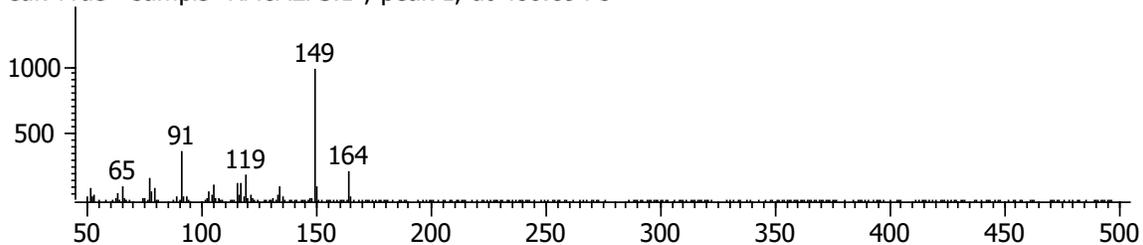
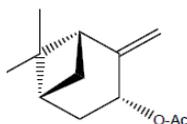


Figura S17. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del 3-metoxi-*p*-cimeno (**58**)

(*E*)-Acetato de pinocarvilo (**59**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
892	521.365	1313	1312	5.9871	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194.13



Peak True - sample "RM8AEPF:1", peak 1, at 52:

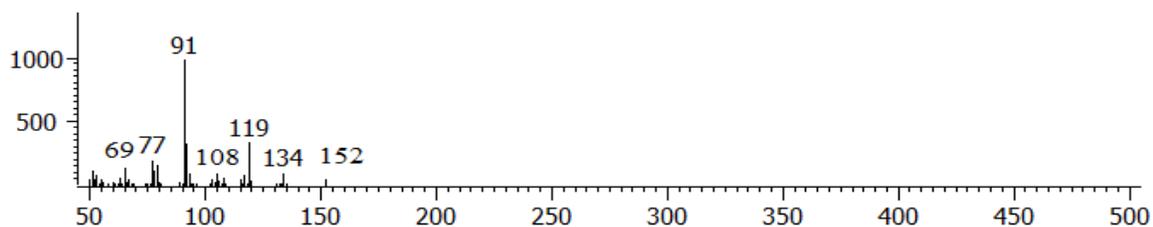
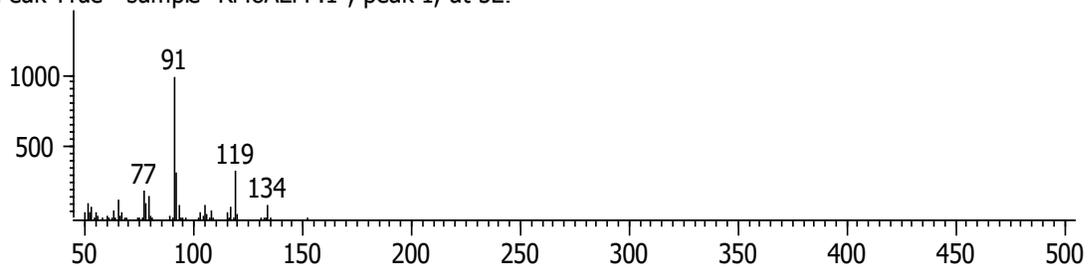
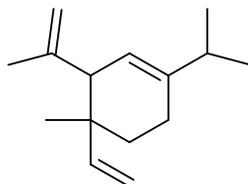


Figura S18. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) de (*E*)-acetato de pinocarvilo (**59**)

δ -Elemeno (**60**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
821	528.065	1328.5	1326	1.9926	C ₁₅ H ₂₄	204.35



Peak True - sample "RM8AEPF:1", peak 2, at 528.065 s

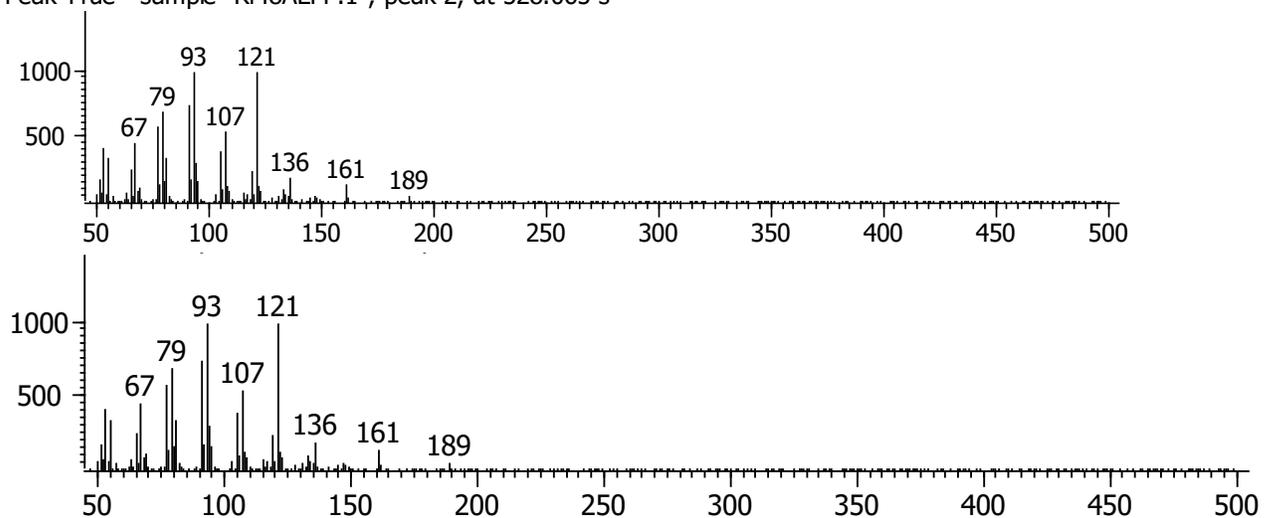
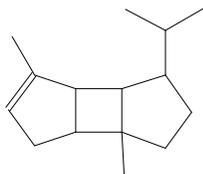


Figura S19. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del δ -elemeno (**60**)

α -Bourboneno (61)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
890	549.165	1377.6	1374	4.2411	C ₁₅ H ₂₄	204.35



Peak True - sample "RM8AEPF:1", peak 3, at 549.165 s

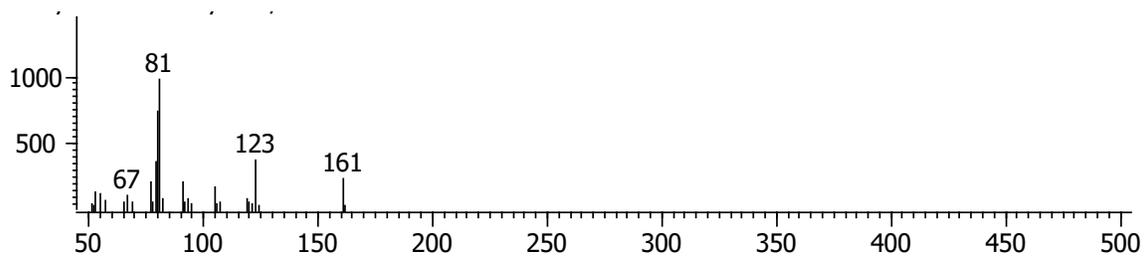
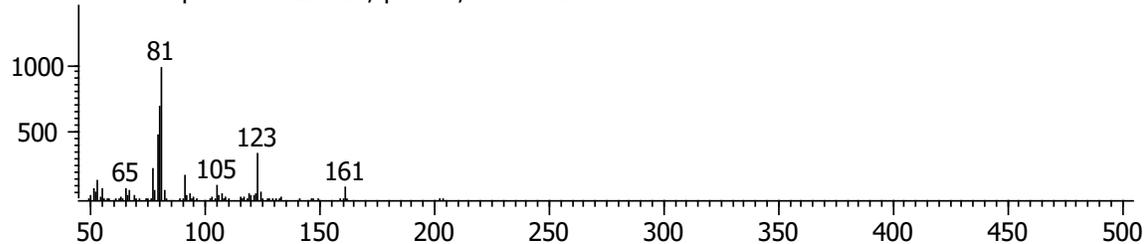
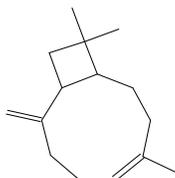


Figura S20. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) de α -bourboneno (61).

β -Cariofileno (**39**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
933	563.765	1413.1	1414	15.055	C ₁₅ H ₂₄	204.35



Peak True - sample "RM8AEPF:1", peak 4, at 563.765 s

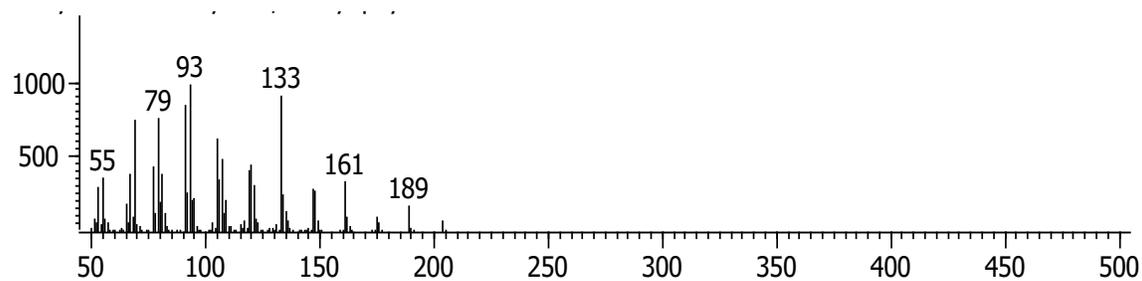
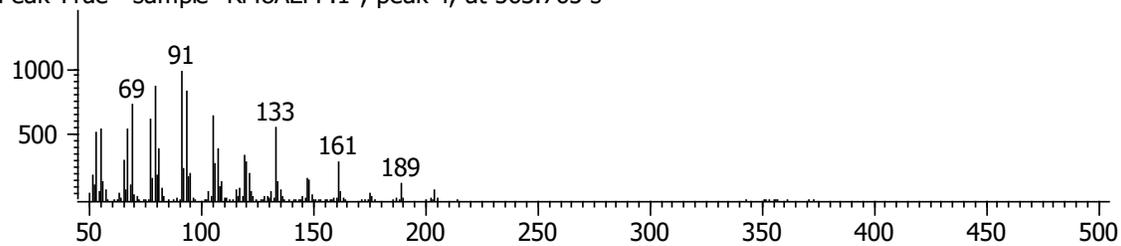
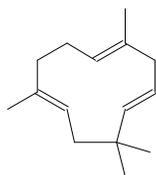


Figura S21. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) de β -cariofileno (**39**)

α -Cariofileno (**62**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
865	576.665	1447.3	1446	7.6881	C ₁₅ H ₂₄	204.35



Peak True - sample "RM8AEPF:1", peak 5, at 576.665 s

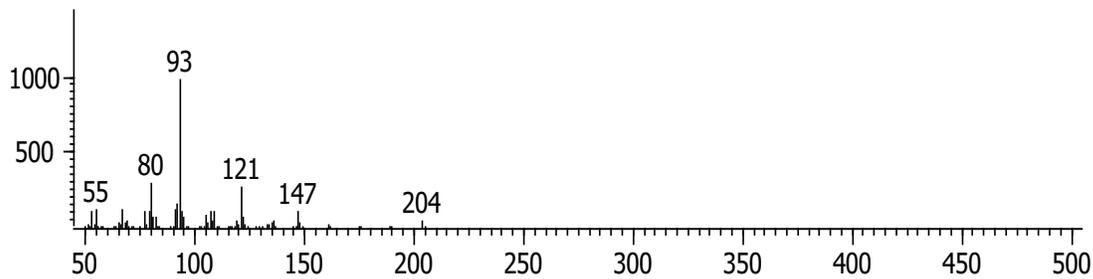
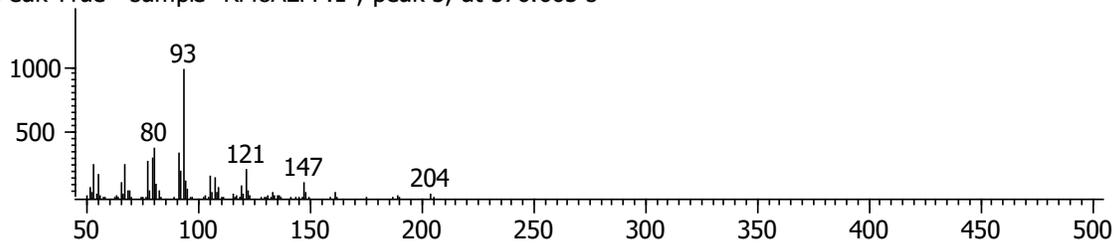
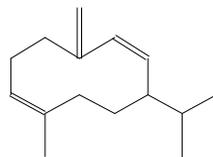


Figura S22. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) de α -cariofileno (**62**)

Germacreno D (**63**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
910	587.365	1475.7	1476	25.092	C ₁₅ H ₂₄	204.35



Peak True - sample "RM8AEPF:1", peak 6, at 587.365 s

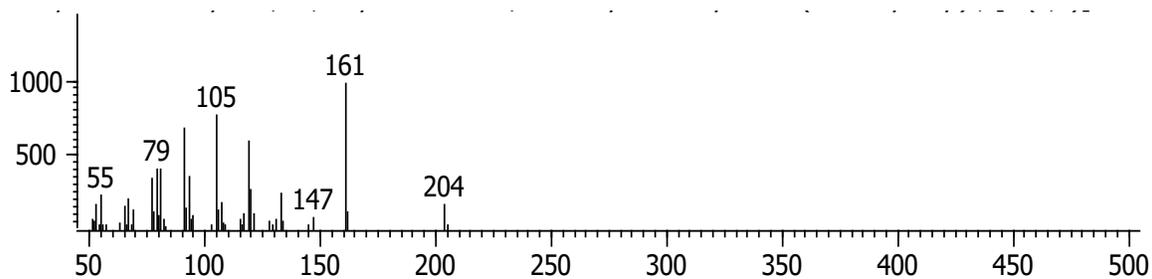
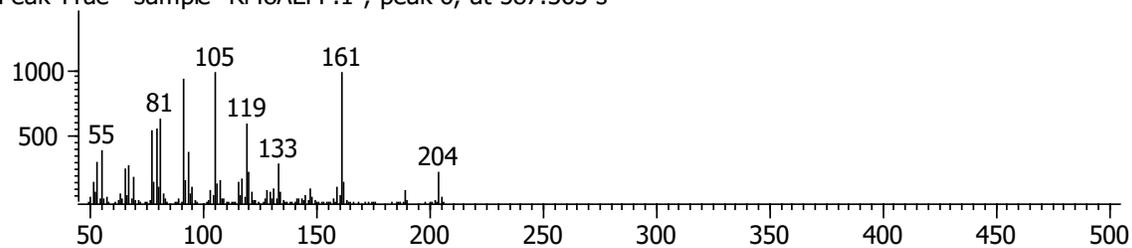
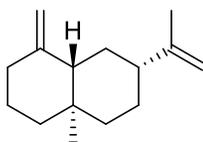


Figura S23. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) de germacreno D (**63**)

β -Selineno (**64**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
865	592.965	1490.5	1489	28.352	C ₁₅ H ₂₄	204.35



Peak True - sample "RM8AEPF:1", peak 7, at 592.965 s

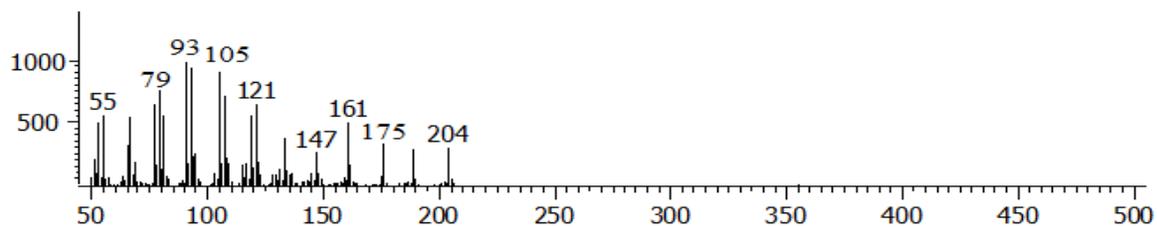
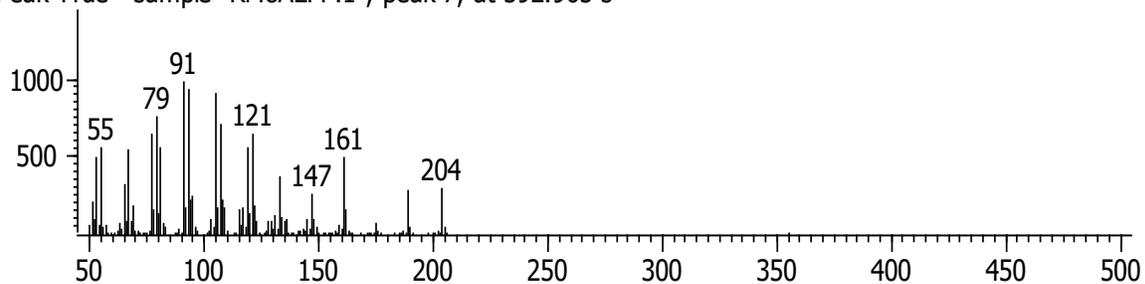
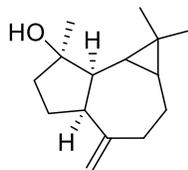


Figura S24. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) de β -selineno (**64**).

Espatulenol (**65**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
777	625.265	1576.1	1576	11.591	C ₁₅ H ₂₄ O	220



Peak True - sample "RM8AEPF:1", peak 8, at 625.265 s

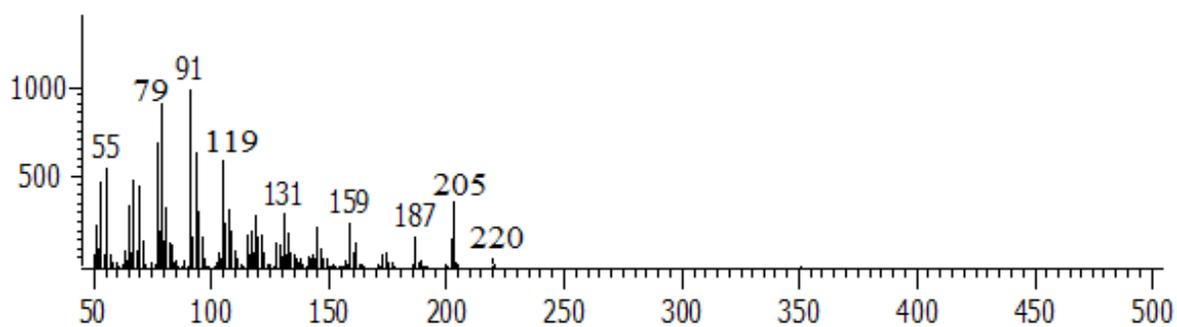
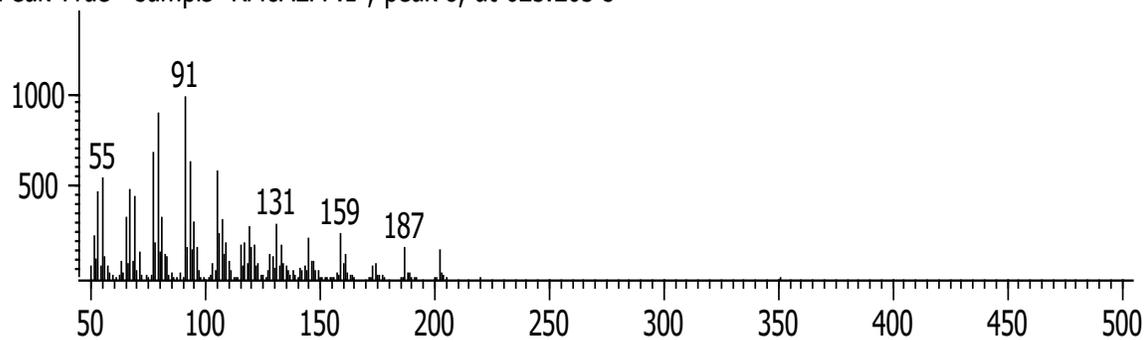


Figura S25. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) de espatulenol (**65**)

2-hexenal (**66**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
958	255.225	850.74	850	75.095	C ₆ H ₁₀ O	98.14

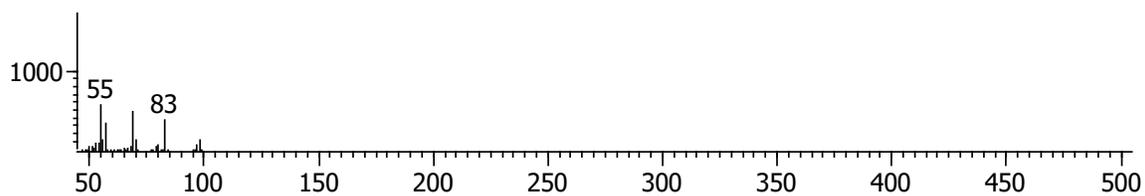
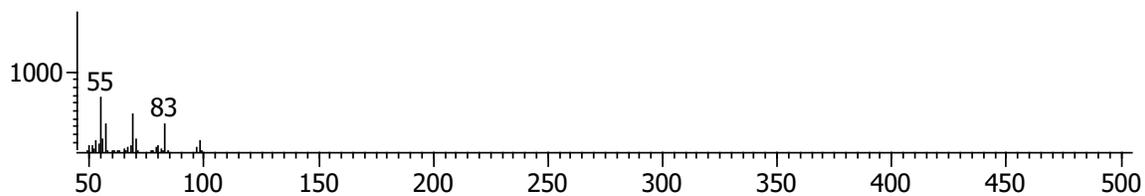
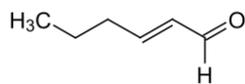


Figura S26. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del 2-hexenal (**66**)

Benzaldehído (67)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
942	333.675	952.01	951	24.905	C ₇ H ₆ O	106

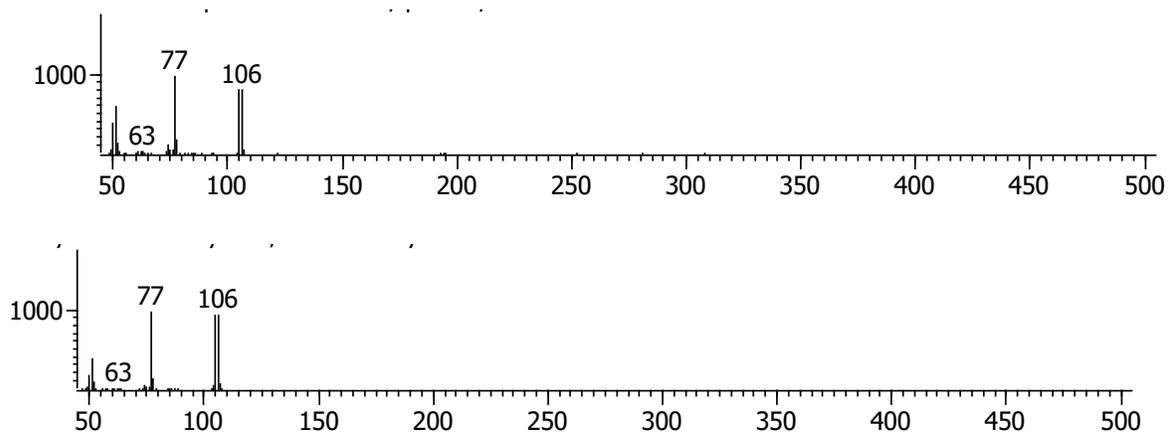
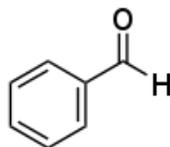


Figura S27. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del benzaldehído (67)

Tabla S1. Confórmers para el cálculo de DC para el epímero 14 *R* de la amarisólida G (**55a,b**)

Confórmers	^a Hartrees	kcal/mol ^a	ΔG	Fracción Molar ^b
1	-1682.09404	-1055530.172	0	0.153326
2	-1682.093744	-1055529.986	0.185742844	0.1241597
3	-1682.093744	-1055529.986	0.185742844	0.1241597
4	-1682.093734	-1055529.98	0.19201794	0.1241597
5	-1682.093485	-1055529.823	0.348267832	1.01E-01
6	-1682.093485	-1055529.823	0.348267832	1.01E-01
7	-1682.093448	-1055529.8	0.371485688	8.14E-02
8	-1682.093407	-1055529.774	0.397213582	8.14E-02
9	-1682.093324	-1055529.722	0.449296879	8.14E-02
10	-1682.092374	-1055529.126	1.045431007	2.83E-02
11	-1682.088622	-1055526.772	3.399847056	5.15E-04

^aSuma electrónica y energía libre de Gibbs en kcal/mol. ^bDistribución de Boltzmann.

Tabla S2. Cálculo de DCE para el epímero 14 *R* de la amarisólida G (**55a,b**)

Estado	Confórmers											λ _{max}
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	294.28	293.87	286.25	286.25	293.57	294.25	286.04	286.04	286.47	293.15	286.03	288.66
2	292.32	291.77	284.03	284.03	291.48	292.28	283.87	283.87	284.33	291.17	283.79	286.52
3	283.27	283.37	282.41	282.41	283.27	283.26	282.63	282.63	282.58	283.23	282.48	282.77
4	272.11	272.08	272.1	272.1	272.04	272.09	272.18	272.18	272.11	272.08	272.21	272.13
5	258.02	258.28	256.62	256.62	256.97	257.32	256.79	256.79	256.5	256.64	256.71	257.04
6	256.06	256.18	254.21	254.21	256.09	255.75	254.36	254.36	254.04	255.4	253.93	254.76
7	254.85	255.07	247.71	247.71	252.61	253.39	248.46	248.46	247.24	252.01	247.04	249.84
8	251.93	252.24	247.06	247.06	250.21	250.48	247.73	247.73	245.05	249.61	244.5	248.07
9	248.11	248.29	246.68	246.68	248.41	248.2	246.86	246.86	244.08	247.84	244.03	246.59
10	244.22	244.38	243.8	243.8	243.93	243.72	243.86	243.86	243.41	244.58	243.33	243.81
11	242.48	242.73	241.6	241.6	242.32	242.3	241.6	241.6	241.45	243.78	241.26	241.82
12	240.21	240.22	238.88	238.88	241.06	240.22	238.92	238.92	238.58	243.15	239.11	239.35
13	236.68	236.76	237.1	237.1	239.39	238.59	237.08	237.08	236.82	241.82	237.61	237.26
14	236.22	236.31	235.4	235.4	237.48	236.55	235.27	235.27	236.09	239.99	236.51	235.92
15	235.65	235.26	234.3	234.3	236.35	236.19	234.17	234.17	235.33	236.42	235.81	235.04
16	234.8	235.15	232.93	232.93	236.07	235.93	232.55	232.55	234.48	236.05	235.1	234.04
17	234.01	233.6	232.47	232.47	234.23	234.64	231.82	231.82	233.86	234.69	233.89	233.15
18	232.53	231.85	232.06	232.06	232.23	232.44	230.4	230.4	232.06	232.53	231.68	231.67
19	230.38	229.81	229.58	229.58	229.33	230.14	229.1	229.1	229.45	230.15	229.01	229.52
20	227.61	227.16	226.84	226.84	226.75	227.54	226.91	226.91	227.13	227.48	226.5	227.01
21	226.88	226.71	226.32	226.32	226.61	226.97	226.16	226.16	226.31	226.81	226.06	226.40
22	224.7	224.6	225.56	225.56	224.62	224.76	225.63	225.63	225.17	224.66	225.5	225.26
23	223.72	223.6	224.3	224.3	223.78	224.33	224.22	224.22	224.24	223.53	224.23	224.12
24	223.49	223.23	223.01	223.01	223.29	223.61	222.85	222.85	223.07	222.02	223	223.11
25	221.65	220.91	220.02	220.02	220.84	220.86	220.57	220.57	220.97	220.67	220.96	220.75
26	220.6	220.51	219.46	219.46	220.42	220.34	219.58	219.58	219.61	220.01	219.66	219.86
27	220.23	219.9	219.06	219.06	217.93	219.98	219.5	219.5	219.49	217.35	219.52	219.53
28	217.7	217.9	218.52	218.52	217.45	217.58	219.37	219.37	218.55	217.22	219.3	218.59

29	217.61	217.65	217.65	217.65	216.83	216.84	217.11	217.11	217.84	216.66	215.78	217.15
30	216.2	216.43	215.26	215.26	215.47	215.88	215.4	215.4	217.06	214.92	214.99	215.67
31	214.56	214.92	214.68	214.68	214.48	214.66	213.67	213.67	214.8	213.17	212.93	214.17
32	213.26	213.98	212.97	212.97	212.87	212.72	212.6	212.6	214.16	212.09	211.18	212.79
33	210.86	211.35	208.91	208.91	212.01	211.52	208.8	208.8	209.3	211.45	209.2	209.70
34	210.48	210.33	206.91	206.91	210.15	210.88	208.08	208.08	208.8	210.38	209.08	208.83
35	209.24	209.15	206.61	206.61	209.39	210.03	206.4	206.4	208.03	209.91	208.28	207.82
36	208.82	208.9	205.98	205.98	208.88	209.26	206.09	206.09	207.37	209.02	207.66	207.32
37	208.01	207.61	205.87	205.87	207.68	209.07	205.57	205.57	206.24	208.71	206.05	206.57
38	206.5	206.53	205.7	205.7	206.86	207.64	205.52	205.52	205.65	208.06	205.39	205.96
39	205.32	205.49	205.33	205.33	206.56	207.04	205.37	205.37	205.35	207.18	205.3	205.52
40	204.35	204.44	205.09	205.09	205.27	205.64	204.42	204.42	204.76	205.53	205.19	204.82
41	204.05	203.9	204.58	204.58	205.2	205.25	203.76	203.76	204.58	205.24	204.71	204.35
42	203.75	203.58	203.03	203.03	203.93	204.03	203.16	203.16	203.12	203.89	203.17	203.33
43	202.85	201.88	202.95	202.95	203.53	203.71	202.9	202.9	202.35	203.55	202.66	202.82
44	201.69	201.72	201.84	201.84	202.18	201.7	201.48	201.48	201.98	201.87	201.48	201.68
45	201.66	201.01	201.6	201.6	201.62	201.15	200.9	200.9	200.29	200.81	200.38	201.01

Tabla S3. Confórmeros para el cálculo de DC para el epímero 14 S de la amarisólida G (**55a,b**)

Confórmeros	Hartrees ^a	kcal/mol ^a	ΔG	Fracción Molar ^b
1	-1682.09404	-1055530.172	0	0.153326
2	-1682.093744	-1055529.986	0.185742844	0.1241597
3	-1682.093744	-1055529.986	0.185742844	0.1241597
4	-1682.093734	-1055529.98	0.19201794	0.1241597
5	-1682.093485	-1055529.823	0.348267832	1.01E-01
6	-1682.093485	-1055529.823	0.348267832	1.01E-01
7	-1682.093448	-1055529.8	0.371485688	8.14E-02
8	-1682.093407	-1055529.774	0.397213582	8.14E-02
9	-1682.093324	-1055529.722	0.449296879	8.14E-02
10	-1682.092374	-1055529.126	1.045431007	2.83E-02
11	-1682.088622	-1055526.772	3.399847056	5.15E-04

^aSuma electrónica y energía libre de Gibbs en kcal/mol. ^bDistribución de Boltzmann.

Tabla S4. Cálculo de DCE para el epímero 14 S de la amarisólida G (**55a,b**)

Estado	Confórmeros											λ_{\max}
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	294.28	293.87	286.25	286.25	293.57	294.25	286.04	286.04	286.47	293.15	286.03	288.66
2	292.32	291.77	284.03	284.03	291.48	292.28	283.87	283.87	284.33	291.17	283.79	286.52
3	283.27	283.37	282.41	282.41	283.27	283.26	282.63	282.63	282.58	283.23	282.48	282.77
4	272.11	272.08	272.1	272.1	272.04	272.09	272.18	272.18	272.11	272.08	272.21	272.13
5	258.02	258.28	256.62	256.62	256.97	257.32	256.79	256.79	256.5	256.64	256.71	257.04
6	256.06	256.18	254.21	254.21	256.09	255.75	254.36	254.36	254.04	255.4	253.93	254.76
7	254.85	255.07	247.71	247.71	252.61	253.39	248.46	248.46	247.24	252.01	247.04	249.84
8	251.93	252.24	247.06	247.06	250.21	250.48	247.73	247.73	245.05	249.61	244.5	248.07
9	248.11	248.29	246.68	246.68	248.41	248.2	246.86	246.86	244.08	247.84	244.03	246.59
10	244.22	244.38	243.8	243.8	243.93	243.72	243.86	243.86	243.41	244.58	243.33	243.81
11	242.48	242.73	241.6	241.6	242.32	242.3	241.6	241.6	241.45	243.78	241.26	241.82
12	240.21	240.22	238.88	238.88	241.06	240.22	238.92	238.92	238.58	243.15	239.11	239.35

13	236.68	236.76	237.1	237.1	239.39	238.59	237.08	237.08	236.82	241.82	237.61	237.26
14	236.22	236.31	235.4	235.4	237.48	236.55	235.27	235.27	236.09	239.99	236.51	235.92
15	235.65	235.26	234.3	234.3	236.35	236.19	234.17	234.17	235.33	236.42	235.81	235.04
16	234.8	235.15	232.93	232.93	236.07	235.93	232.55	232.55	234.48	236.05	235.1	234.04
17	234.01	233.6	232.47	232.47	234.23	234.64	231.82	231.82	233.86	234.69	233.89	233.15
18	232.53	231.85	232.06	232.06	232.23	232.44	230.4	230.4	232.06	232.53	231.68	231.67
19	230.38	229.81	229.58	229.58	229.33	230.14	229.1	229.1	229.45	230.15	229.01	229.52
20	227.61	227.16	226.84	226.84	226.75	227.54	226.91	226.91	227.13	227.48	226.5	227.01
21	226.88	226.71	226.32	226.32	226.61	226.97	226.16	226.16	226.31	226.81	226.06	226.40
22	224.7	224.6	225.56	225.56	224.62	224.76	225.63	225.63	225.17	224.66	225.5	225.26
23	223.72	223.6	224.3	224.3	223.78	224.33	224.22	224.22	224.24	223.53	224.23	224.12
24	223.49	223.23	223.01	223.01	223.29	223.61	222.85	222.85	223.07	222.02	223	223.11
25	221.65	220.91	220.02	220.02	220.84	220.86	220.57	220.57	220.97	220.67	220.96	220.74
26	220.6	220.51	219.46	219.46	220.42	220.34	219.58	219.58	219.61	220.01	219.66	219.86
27	220.23	219.9	219.06	219.06	217.93	219.98	219.5	219.5	219.49	217.35	219.52	219.53
28	217.7	217.9	218.52	218.52	217.45	217.58	219.37	219.37	218.55	217.22	219.3	218.59
29	217.61	217.65	217.65	217.65	216.83	216.84	217.11	217.11	217.84	216.66	215.78	217.15
30	216.2	216.43	215.26	215.26	215.47	215.88	215.4	215.4	217.06	214.92	214.99	215.67
31	214.56	214.92	214.68	214.68	214.48	214.66	213.67	213.67	214.8	213.17	212.93	214.17
32	213.26	213.98	212.97	212.97	212.87	212.72	212.6	212.6	214.16	212.09	211.18	212.80
33	210.86	211.35	208.91	208.91	212.01	211.52	208.8	208.8	209.3	211.45	209.2	209.70
34	210.48	210.33	206.91	206.91	210.15	210.88	208.08	208.08	208.8	210.38	209.08	208.83
35	209.24	209.15	206.61	206.61	209.39	210.03	206.4	206.4	208.03	209.91	208.28	207.82
36	208.82	208.9	205.98	205.98	208.88	209.26	206.09	206.09	207.37	209.02	207.66	207.32
37	208.01	207.61	205.87	205.87	207.68	209.07	205.57	205.57	206.24	208.71	206.05	206.57
38	206.5	206.53	205.7	205.7	206.86	207.64	205.52	205.52	205.65	208.06	205.39	205.96
39	205.32	205.49	205.33	205.33	206.56	207.04	205.37	205.37	205.35	207.18	205.3	205.52
40	204.35	204.44	205.09	205.09	205.27	205.64	204.42	204.42	204.76	205.53	205.19	204.82
41	204.05	203.9	204.58	204.58	205.2	205.25	203.76	203.76	204.58	205.24	204.71	204.35
42	203.75	203.58	203.03	203.03	203.93	204.03	203.16	203.16	203.12	203.89	203.17	203.33
43	202.85	201.88	202.95	202.95	203.53	203.71	202.9	202.9	202.35	203.55	202.66	202.82
44	201.69	201.72	201.84	201.84	202.18	201.7	201.48	201.48	201.98	201.87	201.48	201.68
45	201.66	201.01	201.6	201.6	201.62	201.15	200.9	200.9	200.29	200.81	200.38	201.06

Anexo 2:

Salvia microphylla

Figura S28. Espectro de RMN-¹H de ziziflavosido B (**56**) en CD₃OD (700 MHz)

Figura S29. Espectro de RMN-¹H de la orientina (**57**) en CD₃OD (700 MHz)

Aceite esencial lote (seco)

Figura S30. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del α -pineno (**44**)

Figura S31. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del β -pineno (**45**)

Figura S32. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del eucaliptol (**68**)

Figura S33. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del alcanfor (**69**).

Figura S34. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del β -cariofileno (**39**)

Figura S35. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del β -cubebeno (**70**).

Figura S36. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del α -cariofileno (**62**)

Figura S37. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del (-)-*cis*-cadina-1(6),4-dieno (**71**)

Figura S38. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del germacreno D (**63**)

Figura S39. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del (-)-calameneno (**72**)

Figura S40. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del germacreno B (**73**)

Figura S41. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del epóxido de italiceno (**74**)

Figura S42. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del viridiflorol (**75**)

Figura S43. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del carotol (**76**)

Figura S44. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del agarospirol (**77**)

Componentes de la mezcla volátil

Figura S45. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del eucaliptol (**68**)

Figura S46. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del isoborneol (**78**)

Figura S47. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del acetato de isobornilo (**48**)

Figura S48. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del α -cubebeno (**79**)

Figura S49. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del β -cubebeno (**70**)

Figura S50. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del sativeno (**80**)

Figura S51. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del α -amorfenol (**81**)

Figura S52. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del γ -gurjuneno (82)

Figura S53. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del α -vetispirano (83)

Figura S54. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del δ -cadineno (84)

Figura S55. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del germacreno B (73)

Figura S56. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del éter de cadineno (85)

Figura S57. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) de la bourbonanona (86)

Figura S58. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del cariofilenol (87)

Figura S59. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del β -vatiireno (88)

Figura S60. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del viridiflorol (75)

Figura S61. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del hinesol (89)

Figura S62. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del muurola-4,10 (14)-dieno-1 β -ol (90)

Figura S63. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del 10-epi- γ -eudesmol (91)

Figura S64. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del β -eudesmol (19)

Figura S65. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del α -eudesmol (36)

Figura S66. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del khusilol (92)

Figura S67. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) del valerianol (93)

Figura S68. Comparación del espectro de masas e índice de retención (literatura y experimental) de la (+)-valeranona (94)

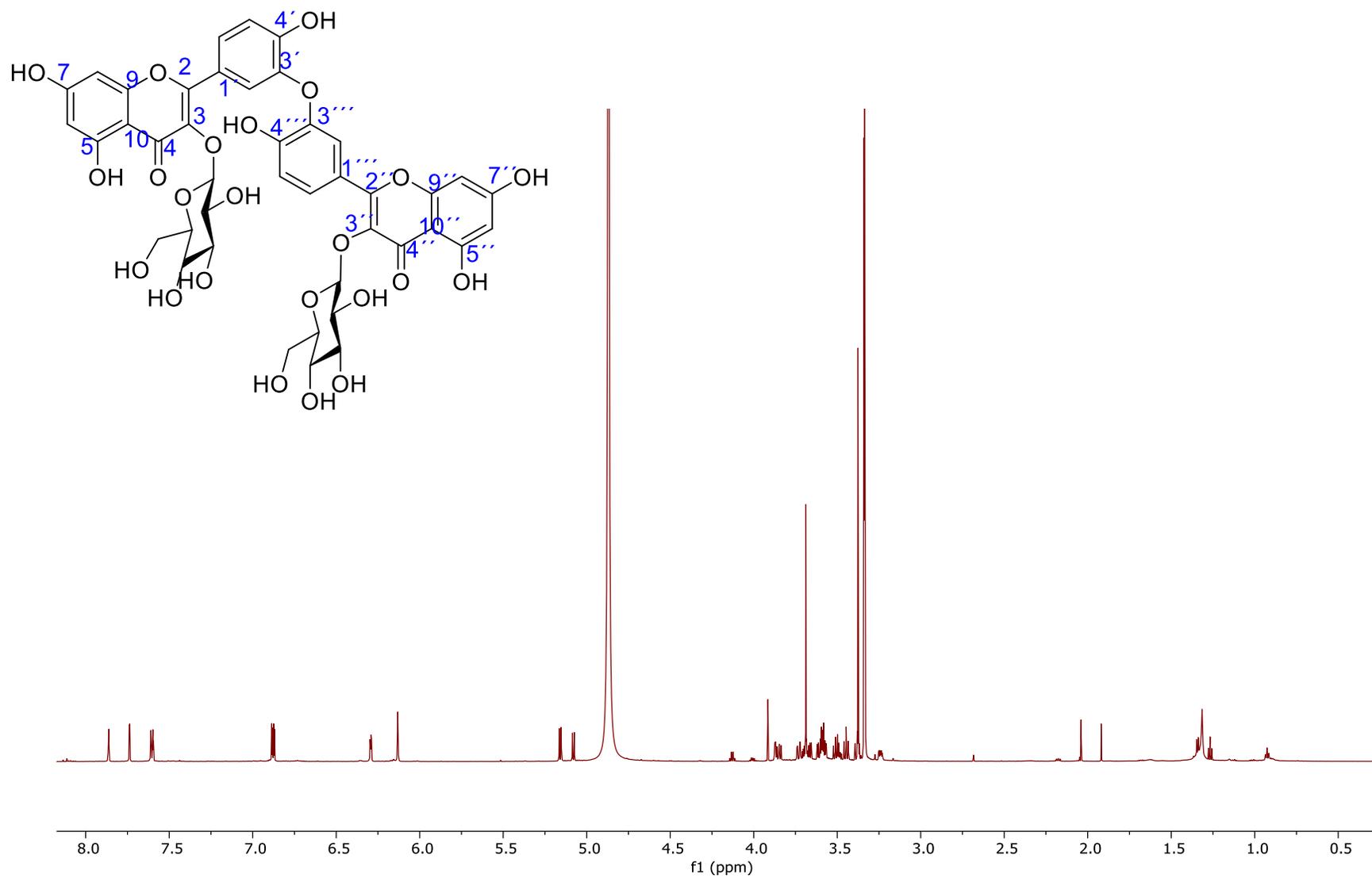


Figure S28. Espectro de RMN-¹H del ziziflavosido B (**56**) en CD₃OD (700 MHz)

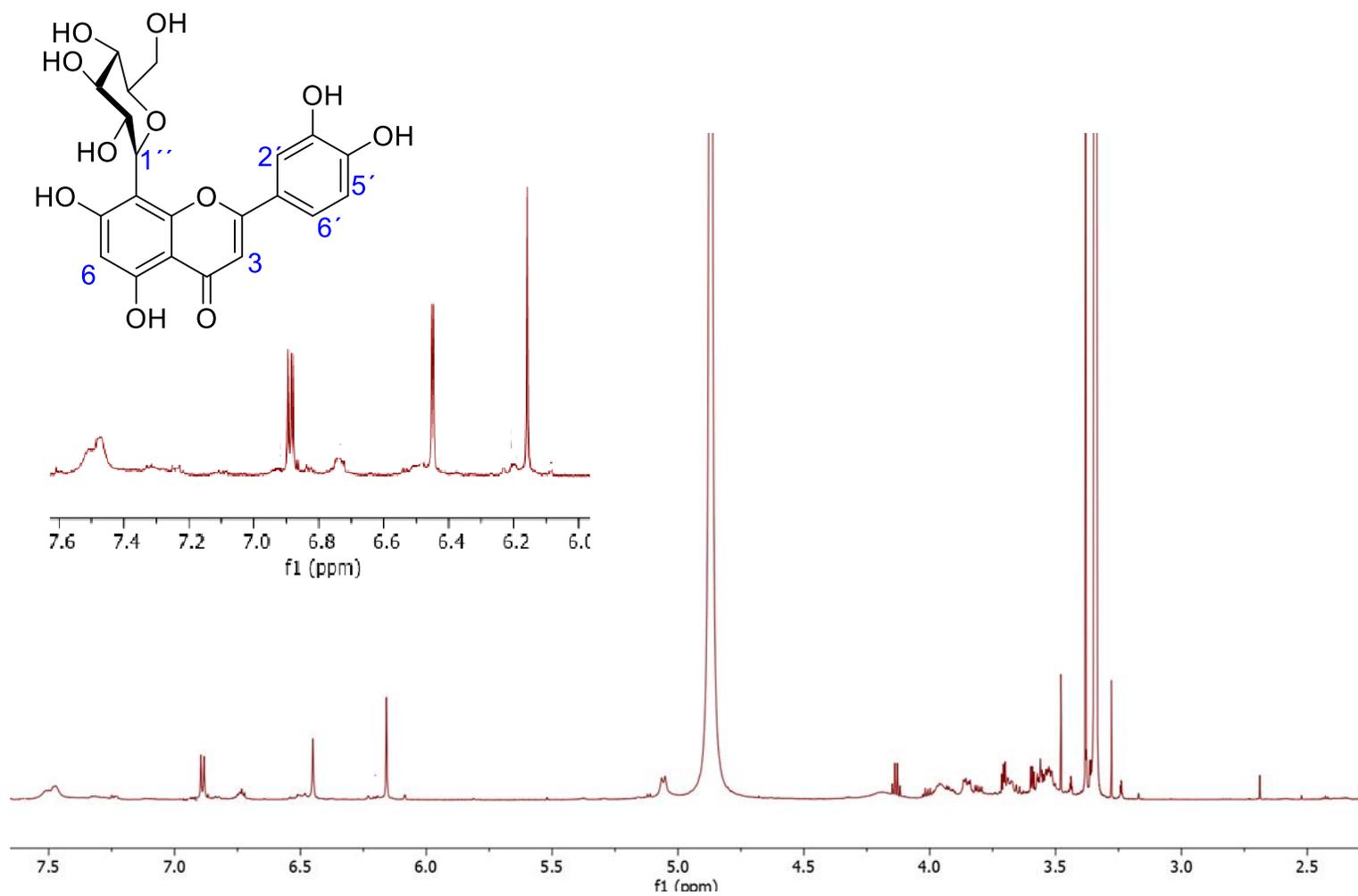
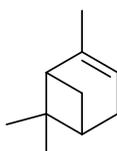


Figure S29. Espectro de RMN-¹H de la orientina (**57**) en CD₃OD (700 MHz)

α -Pino (44)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
888	312.966	922.51	927	3.1473	C ₁₀ H ₁₆	136



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 1, at 312.966 s

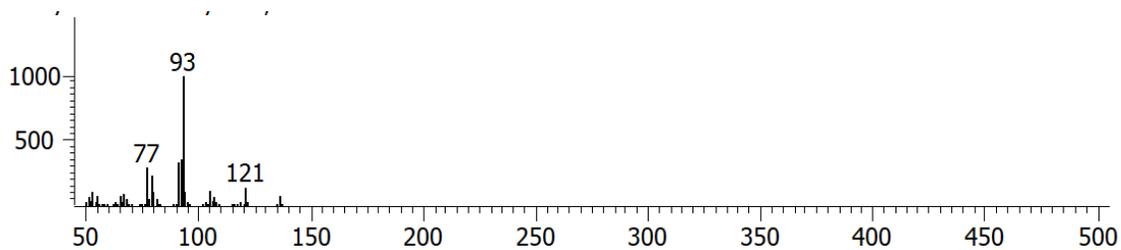
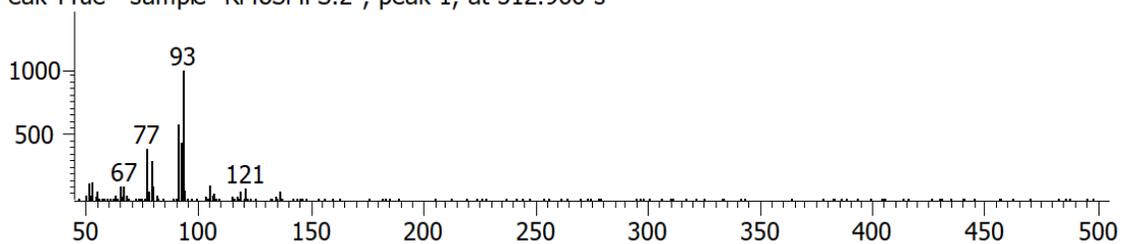
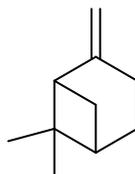


Figura S30. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del α -pino (44)

β -Pinoeno (45)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
973	342.716	964.89	970	2.444	C ₁₀ H ₁₆	136



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 2, at 342.716 s

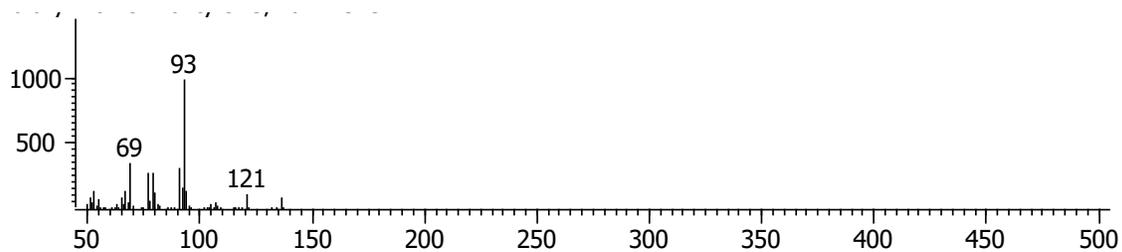
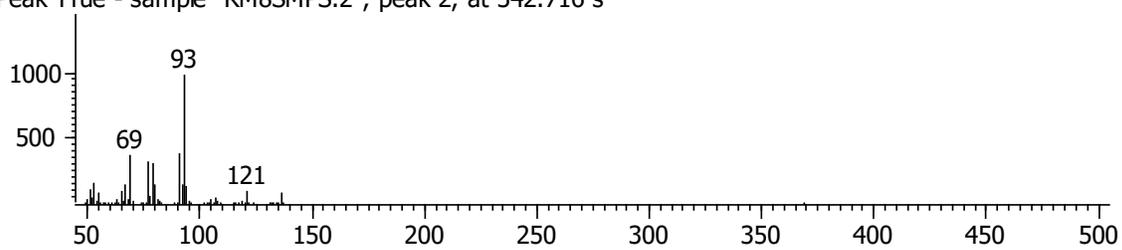


Figura S31. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del β -pinoeno (45)

Eucaliptol (**68**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
906	377.216	1018.7	1023	5.2264	C ₁₀ H ₁₈ O	154



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 3, at 377.216 s

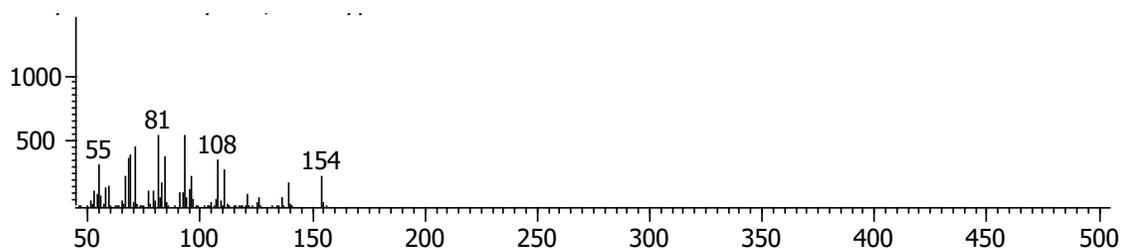
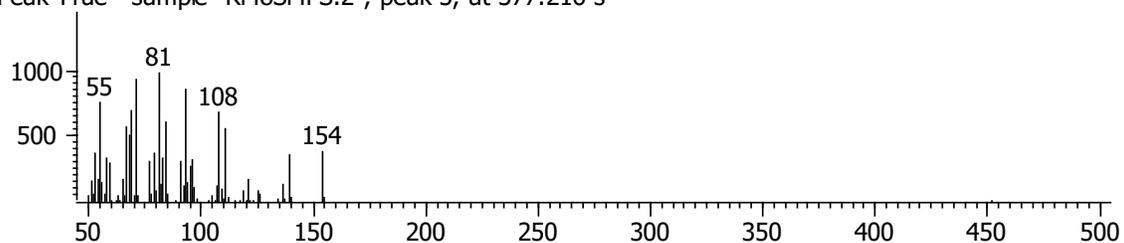


Figura S32. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) de eucaliptol (**68**)

Alcanfor (69)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
838	438.716	1135.4	1136	2.4486	C ₁₀ H ₁₆ O	152



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 4, at 438.716 s

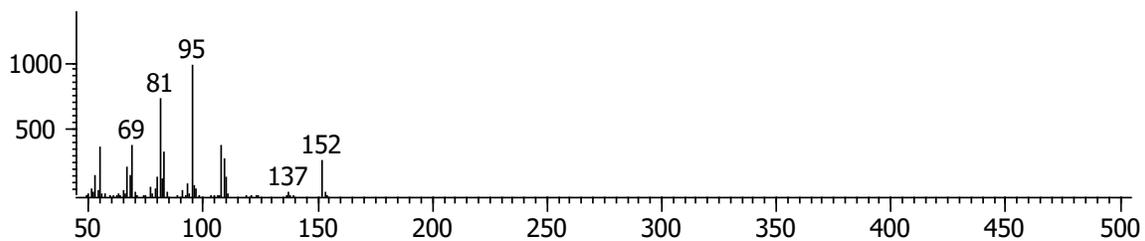
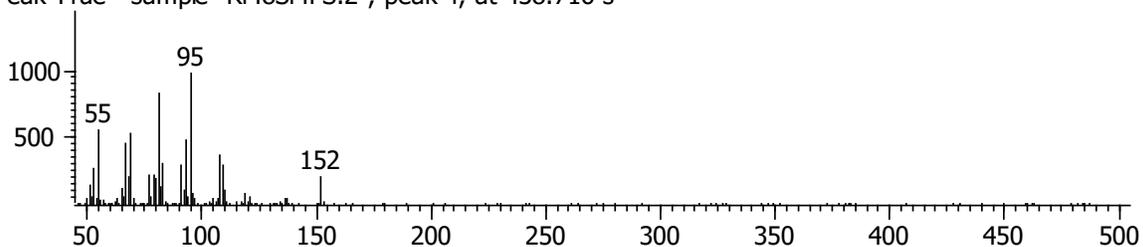
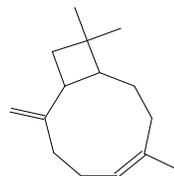


Figura S33. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del alcanfor (69)

β -Cariofileno (39)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
957	563.266	1411.8	1411	5.4215	C ₁₅ H ₂₄	204.35



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 5, at 563.266 s

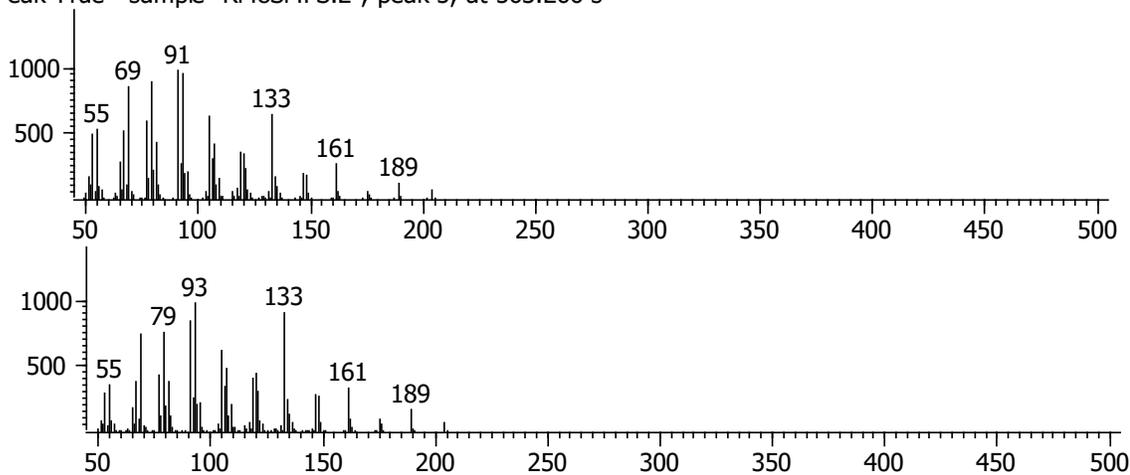
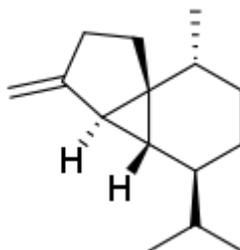


Figura S34. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del β -cariofileno (39)

β -Cubebeno (**70**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
821	572.266	1435.7	1426	4.7496	C ₁₅ H ₂₄	204



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 6, at 572.266 s

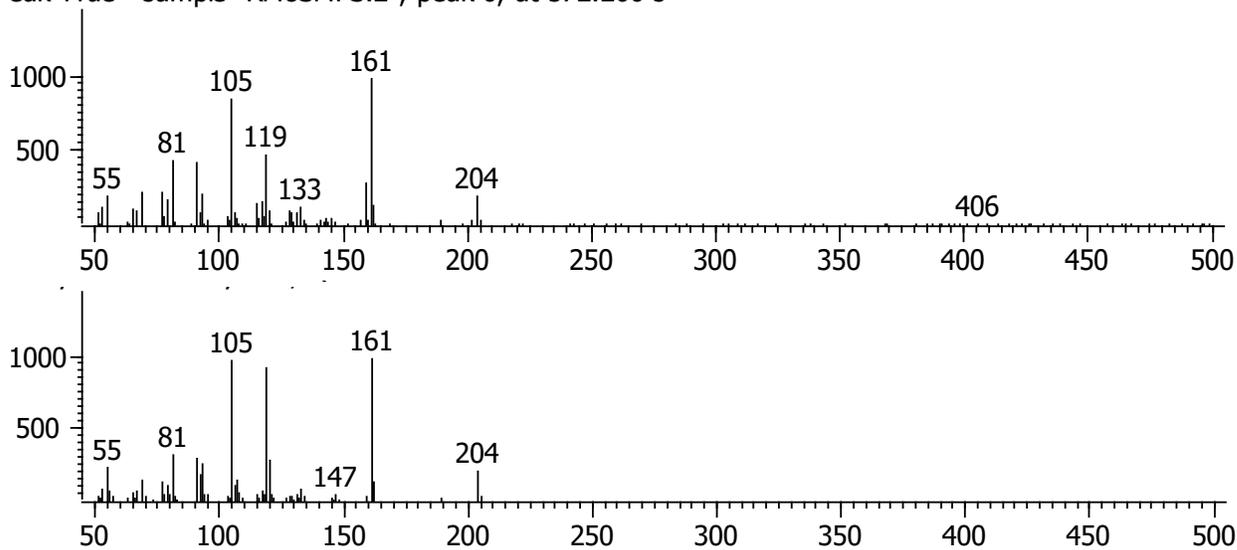
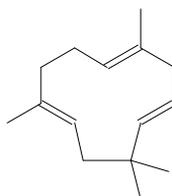


Figura S35. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del β -cubebeno (**70**)

α -Cariofileno (**62**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
902	576.016	1445.6	1445	1.2617	C ₁₅ H ₂₄	204.35



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 7, at 576.016 s

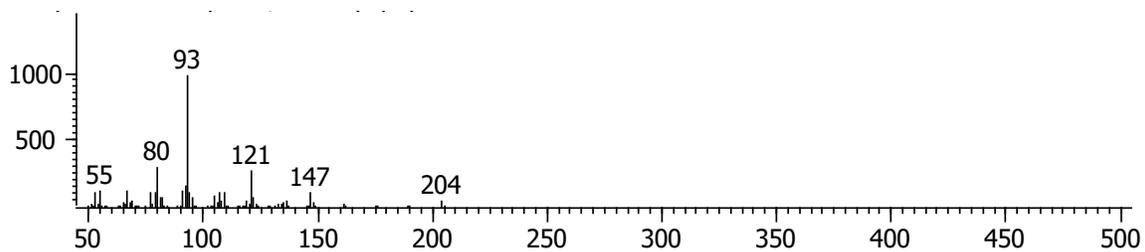
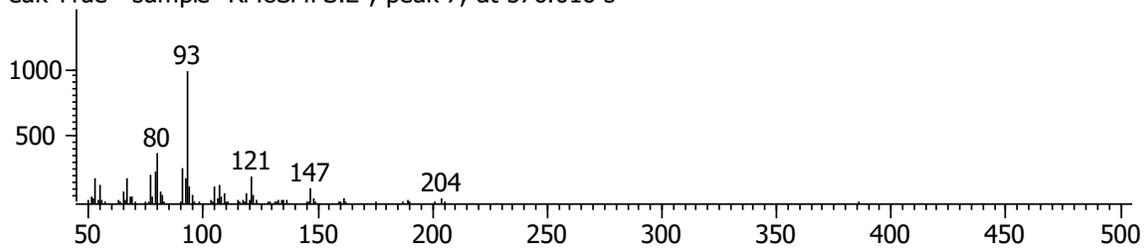
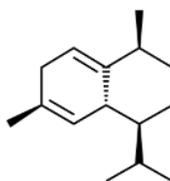


Figura S36. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del α -cariofileno (**62**)

(-)-*cis*-cadina-1(6), 4 dieno (**71**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
870	579.366	1454.5	1463	0.81263	C ₁₅ H ₂₄	204.35



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 8, at 579.366 s

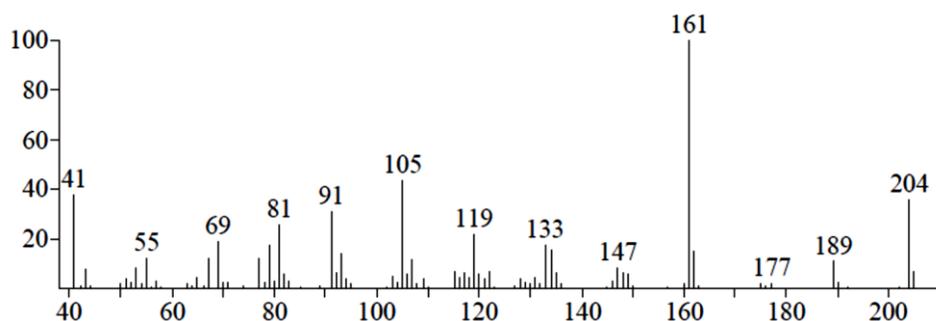
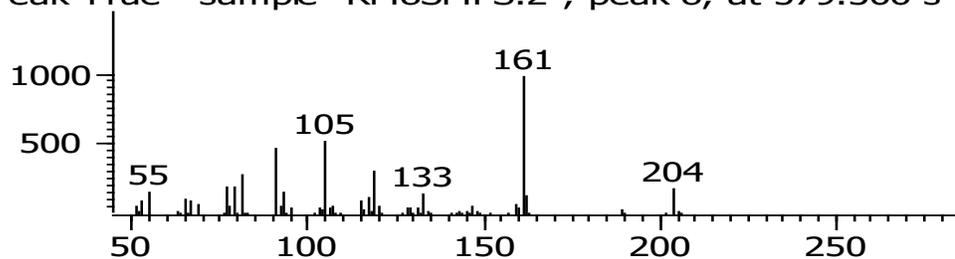
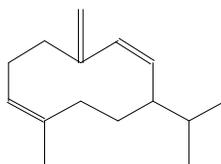


Figura S37. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del (-)-*cis*-cadina-1(6), 4 dieno (**71**)

Germacreno D (**63**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
910	591.016	1485.4	1485	2.4198	C ₁₅ H ₂₄	204.35



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 9, at 591.016 s

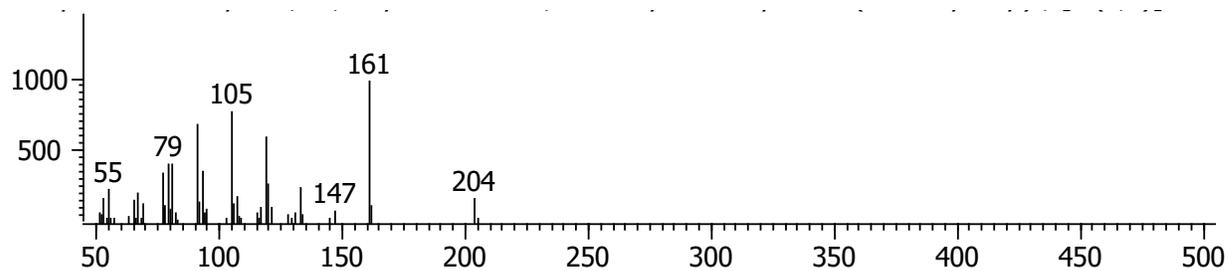
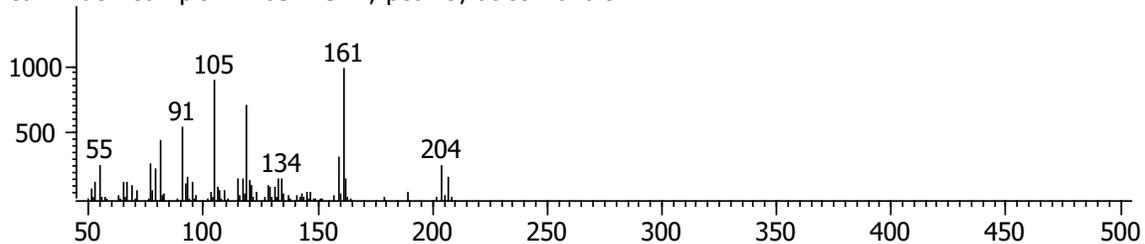
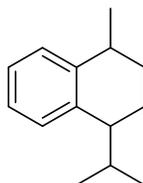


Figura S38. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del germacreno D (**63**)

(-)-Calameneno (72)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
864	601.066	1512	1513	3.8756	C ₁₅ H ₂₂	202



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 10, at 601.066 s

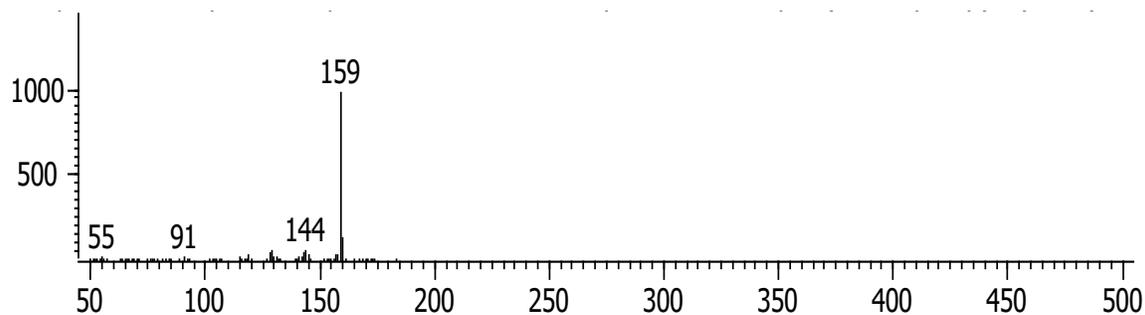
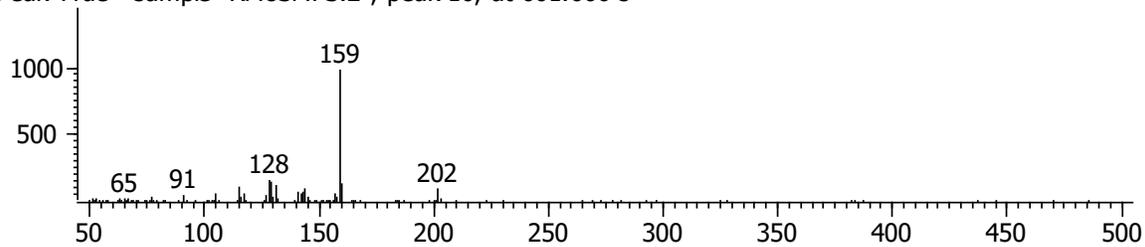
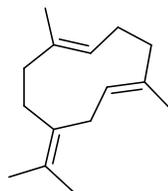


Figura S39. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del (-)-calameneno (72)

Germacreno B (73)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
870	610.966	1538.2	1535	9.8049	C ₁₅ H ₂₄	204



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 11, at 610.966 s

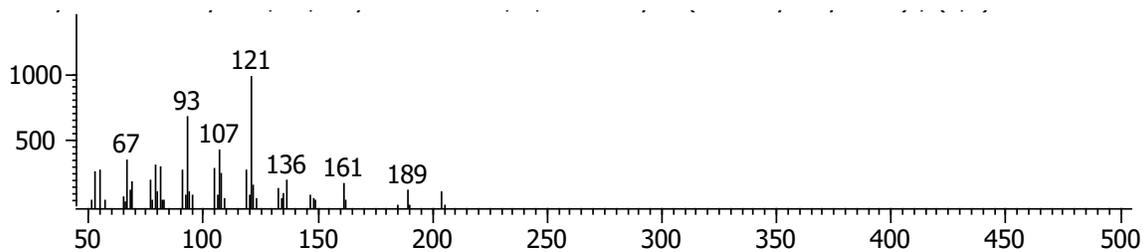
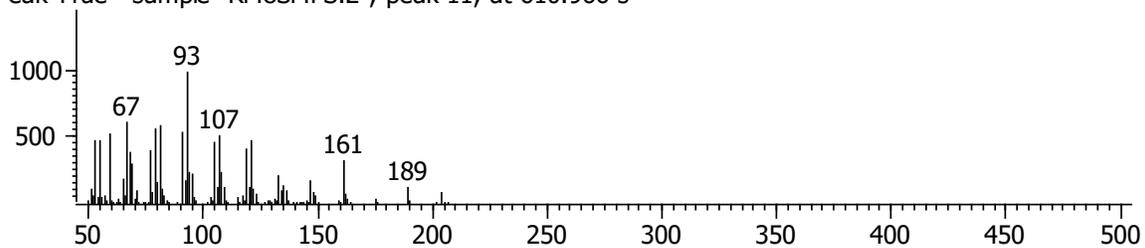
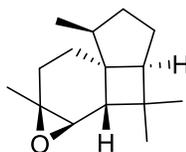


Figura S40. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del germacreno B (73)

Epóxido de Italiceno (**74**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
	614.366	1547.2	1548	13.173	C ₁₅ H ₂₄ O	220



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 12, at 614.366 s

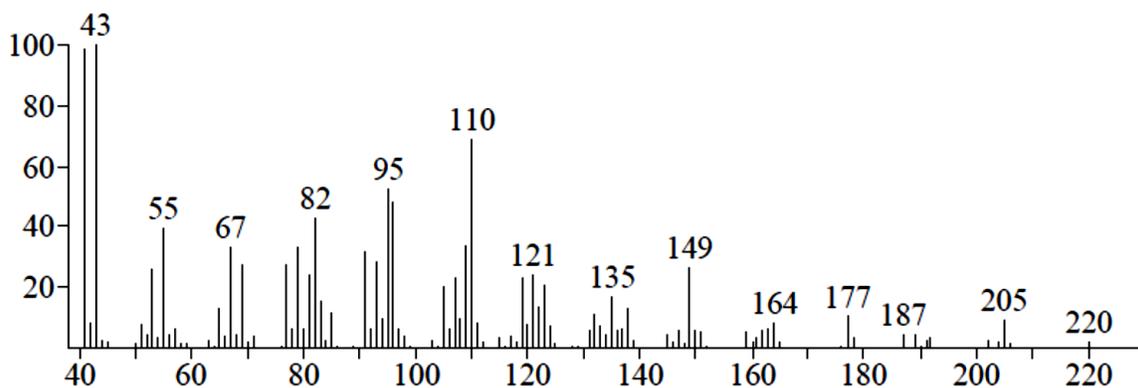
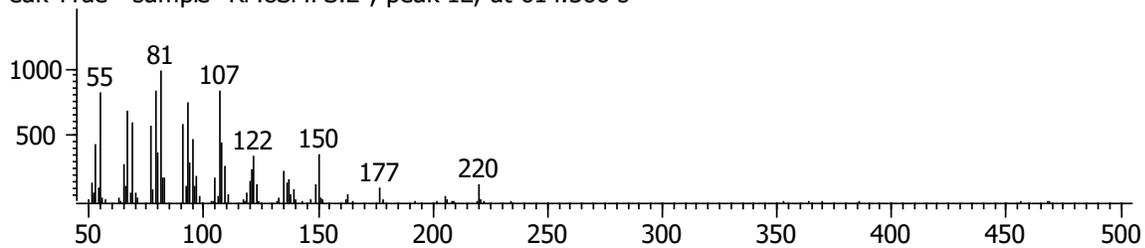
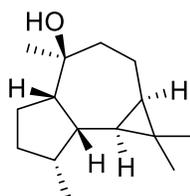


Figura S41. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del epóxido de italiceno (**74**)

Viridiflorol (75)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
	630.066	1588.9	1588	26.462	C ₁₅ H ₂₆ O	222



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 13, at 630.066 s

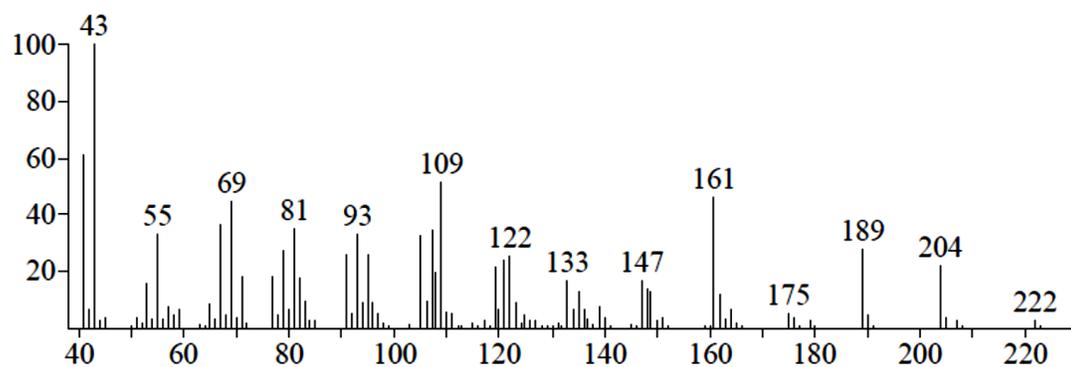
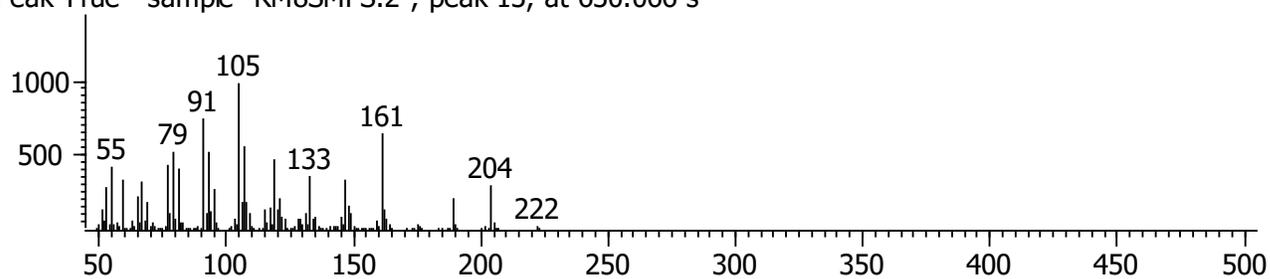
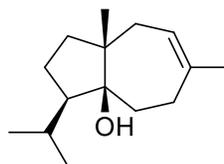


Figura S42. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del viridiflorol (75)

Carotol (**76**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
	633.316	1597.5	1598	9.7507	C ₁₅ H ₂₆ O	222



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 14, at 633.316 s

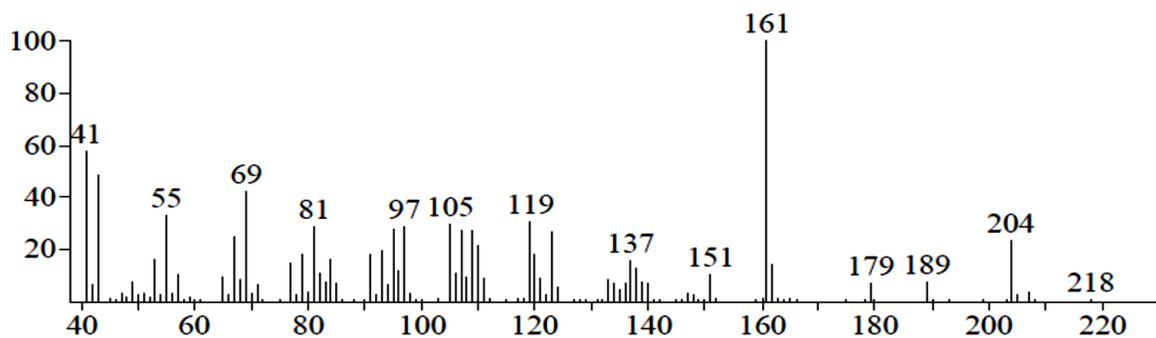
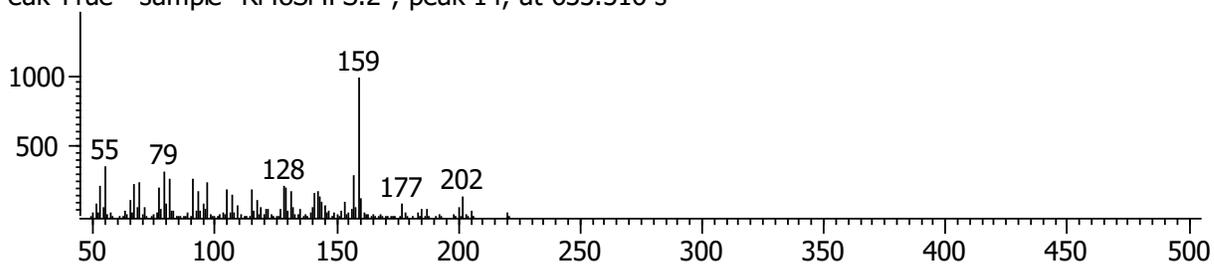
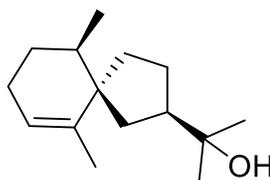


Figura S43. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del carotol (**76**)

Agarospinol (77)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
	649.516	1645.7	1642	9.00	C ₁₅ H ₂₆ O	222



Peak True - sample "RM8SMPS:2", peak 15, at 649.516 s

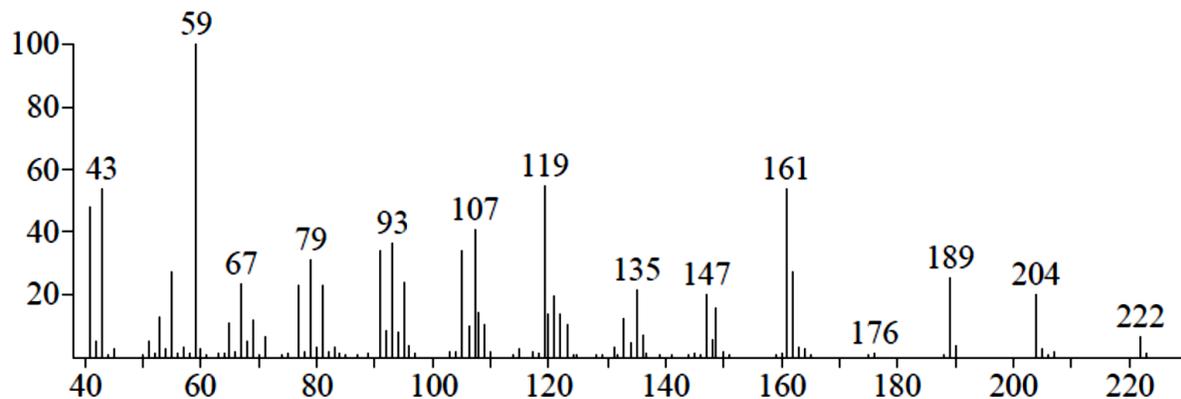
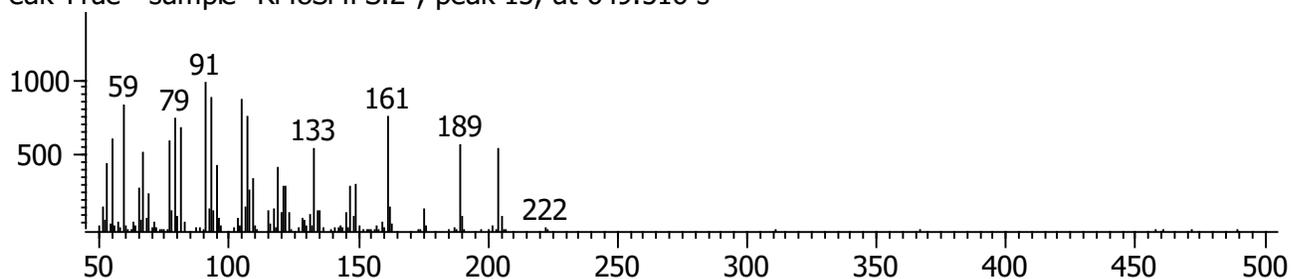


Figura S44. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del agarospinol (77)

Eucaliptol (68)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
906	378.297	1020.7	1028	0.98	C ₁₀ H ₁₈ O	154



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 3, at 378.297 s

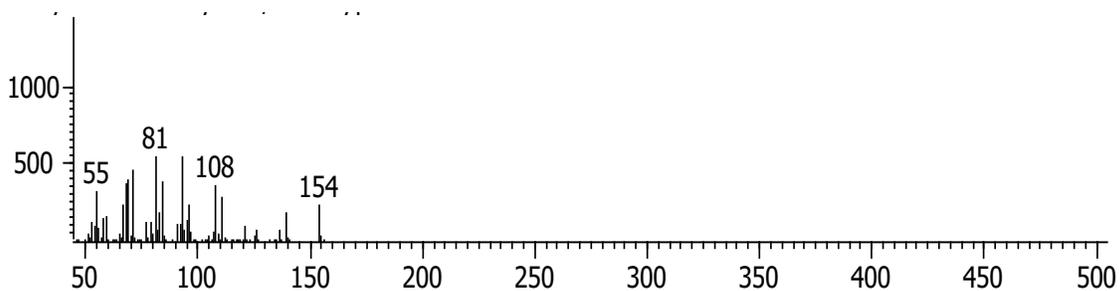
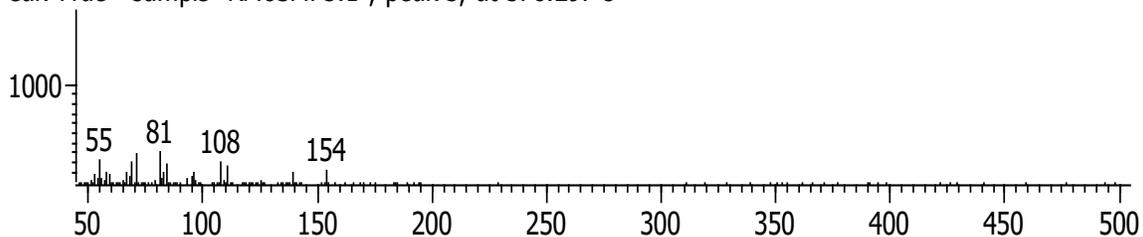
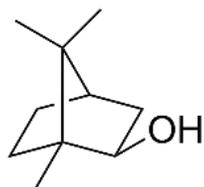


Figura S45. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del eucaliptol (68)

Isoborneol (78)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
860	449.797	1156.4	1153	0.74	C ₁₀ H ₁₈ O	154



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 4, at 449.797 s

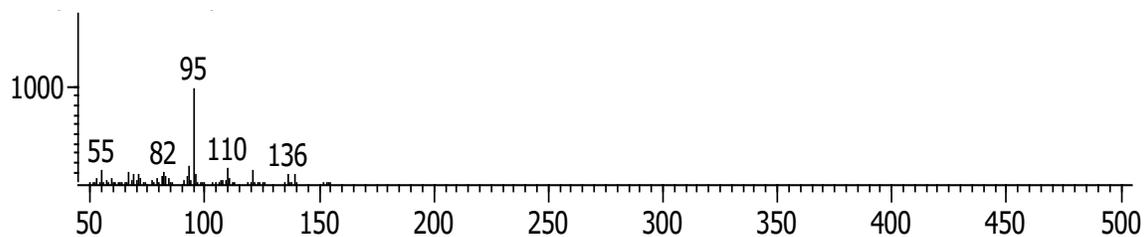
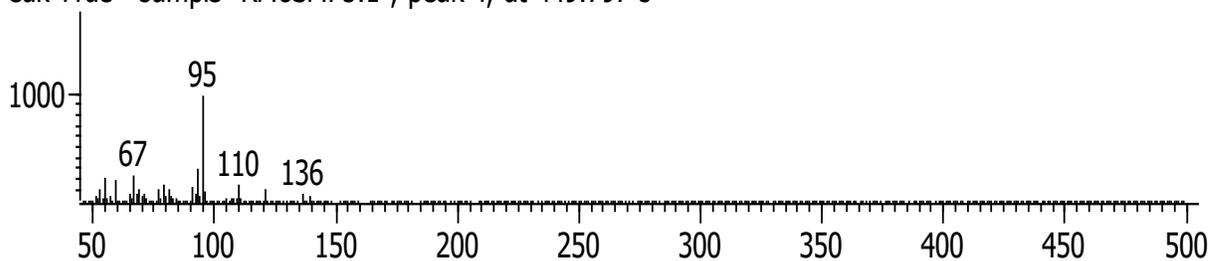
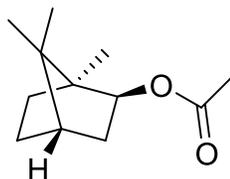


Figura S46. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del isoborneol (78)

Acetato de isobornilo (**48**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
910	504.797	1274.4	1286	2.81	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 5, at 504.797 s

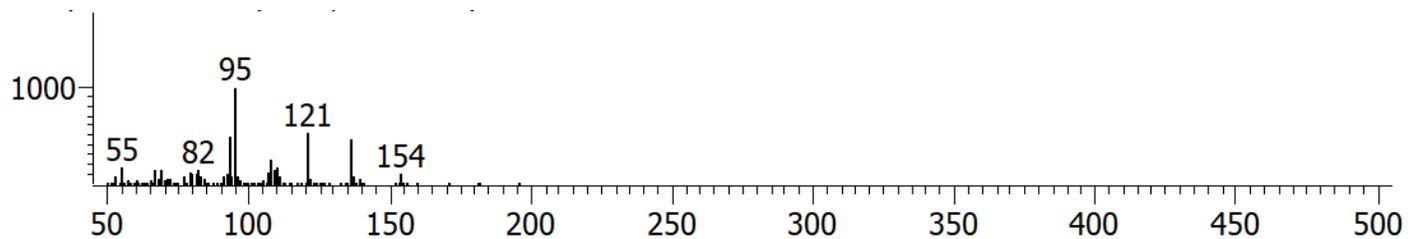
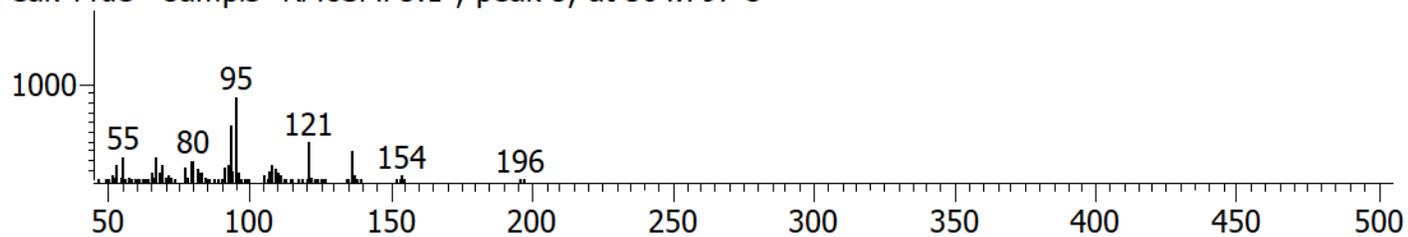
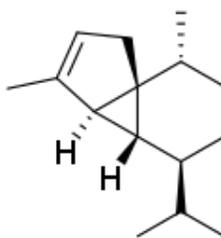


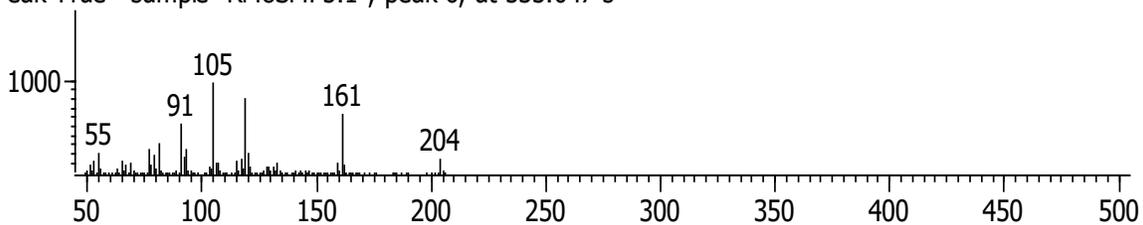
Figura S47. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del acetato de isobornilo (**48**)

α -Cubebeno (**79**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
873	533.047	1340.1	1342	1.90	C ₁₅ H ₂₄	204



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 6, at 533.047 s



Library Hit - similarity 873, " α -Cubebene"

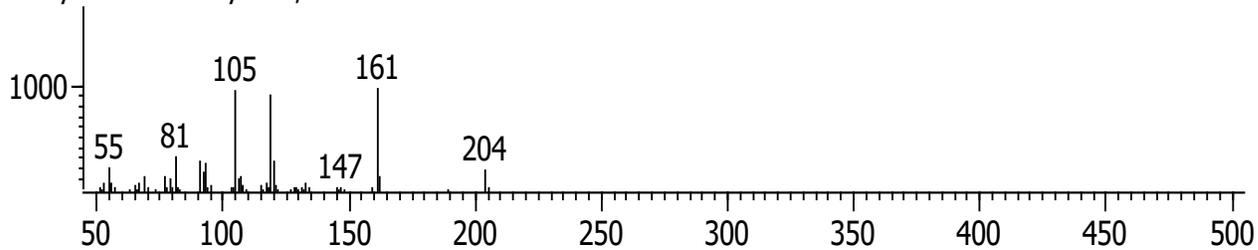
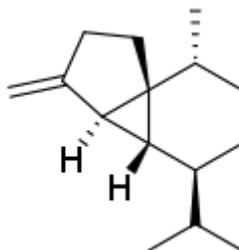


Figura S48. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del α -cubebeno (**79**)

β -Cubebeno (70)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
821	549.397	1378.1	1381	0.83	C ₁₅ H ₂₄	204



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 7, at 549.397 s

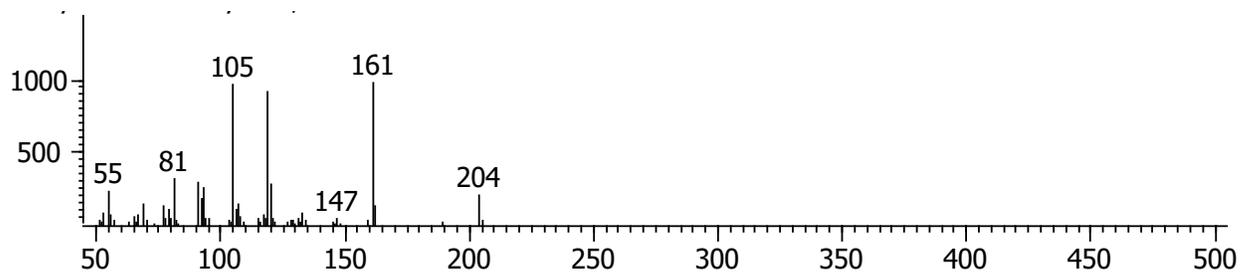
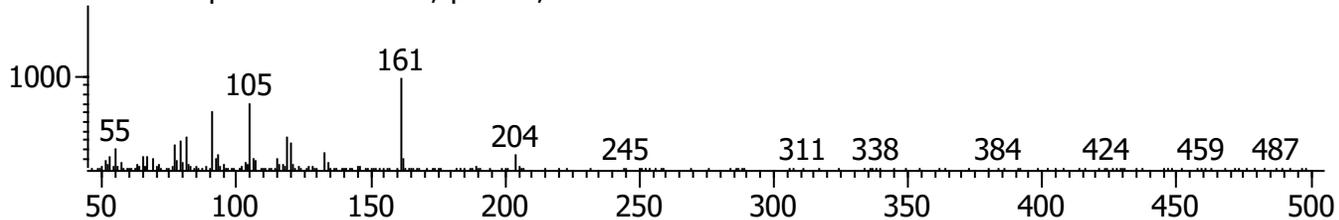
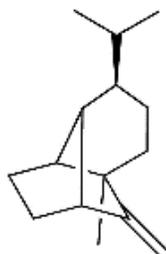


Figura S49. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del β -cubebeno (70)

Sativeno (**80**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
801	552.447	1385.2	1387	0.93	C ₁₅ H ₂₄	204



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 8, at 552.447 s

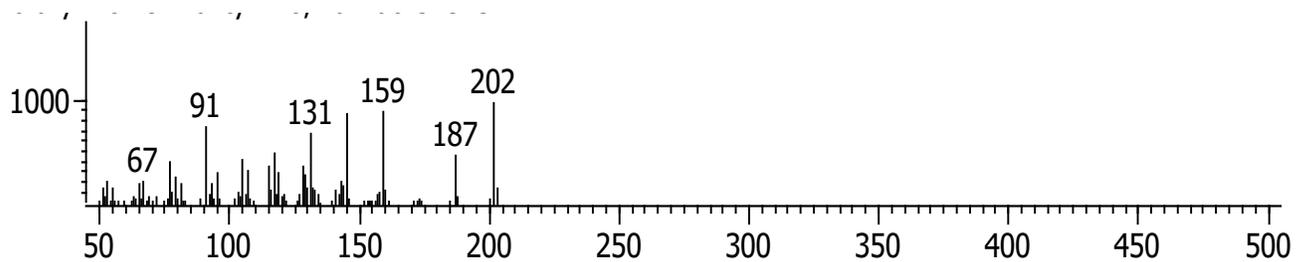
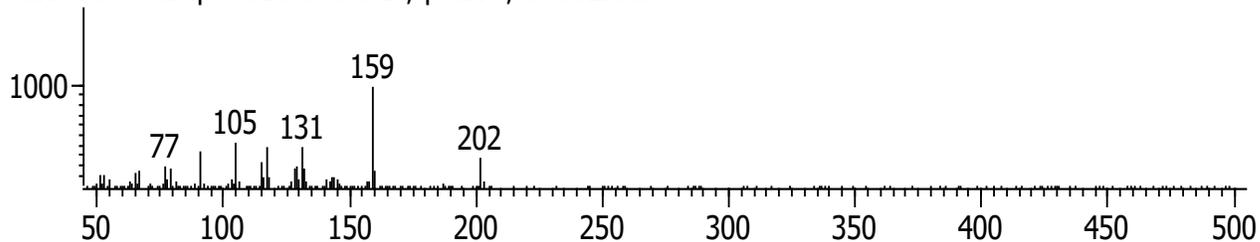
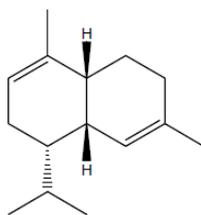


Figura S50. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del sativeno (**80**)

α -Amorfenol (**81**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
802	591.497	1486.6	1484	2.73	C ₁₅ H ₂₄	204



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 10, at 591.497 s

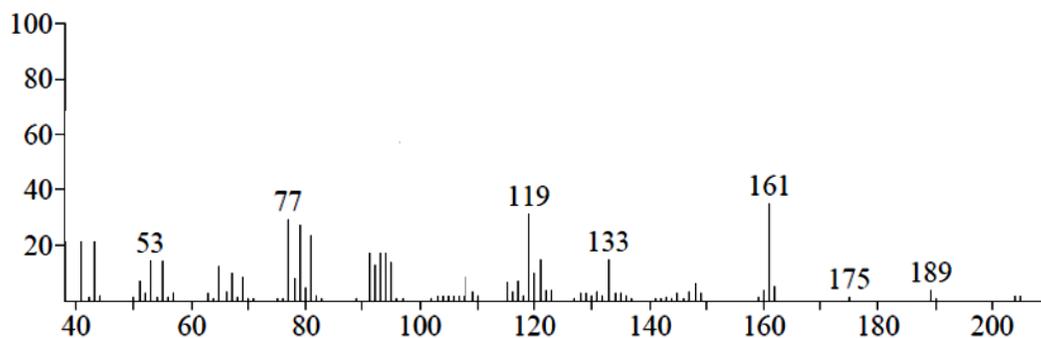
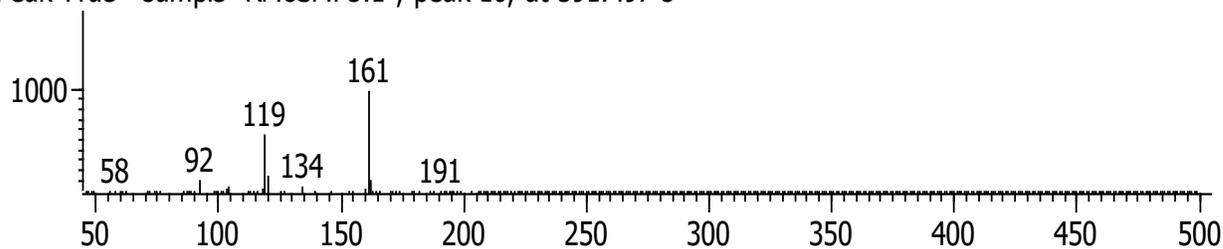
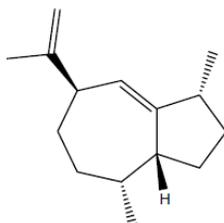


Figura S51. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del α -amorfenol (**81**)

γ -Gurjuneno (**82**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
830	591.897	1488	1479	2.69	C ₁₅ H ₂₄	204



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 11, at 591.897 s

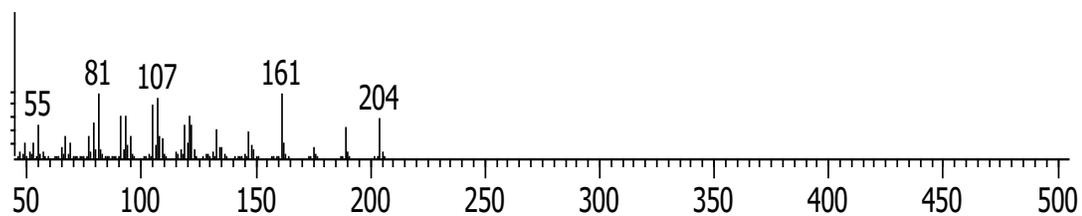
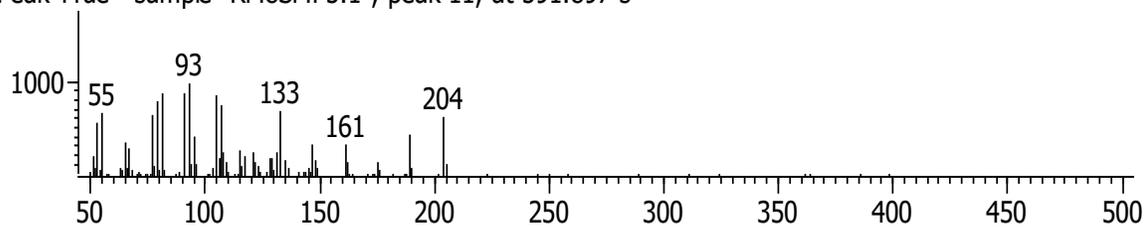
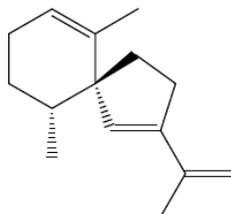


Figura S52. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del γ -gurjuneno (**82**)

α -Vetispirano (**83**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
807	593.247	1491	1490	2.69	C ₁₅ H ₂₂	202



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 13, at 593.247 s

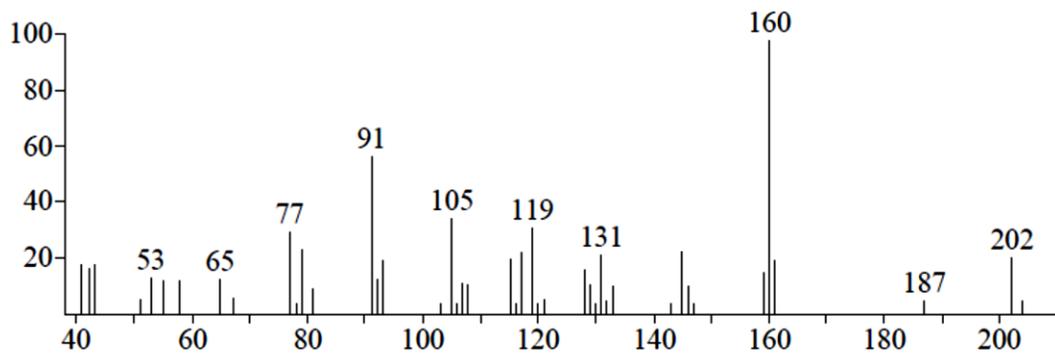
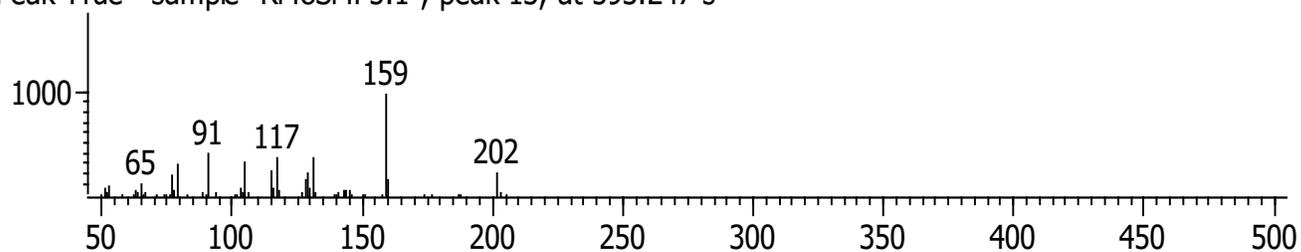
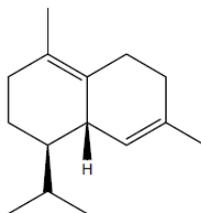


Figura S53. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del α -vetispirano (**83**)

δ -Cadineno (**84**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
818	601.947	1514	1515	3.13	C ₁₅ H ₂₄	204



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 15, at 601.947 s

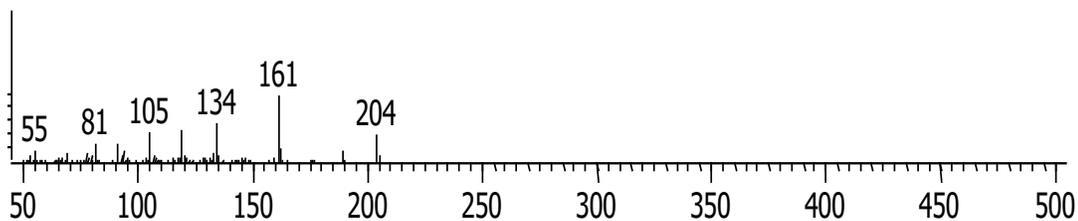
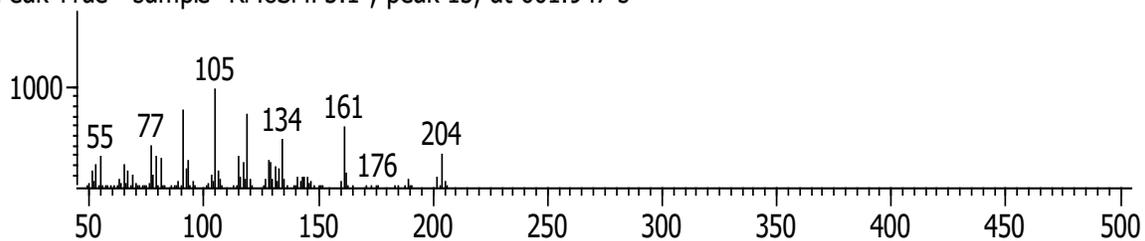


Figura S54. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del δ -cadineno (**84**)

Germacreno B (73)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
870	612.297	1541.8	1545	2.21	C ₁₅ H ₂₄	204

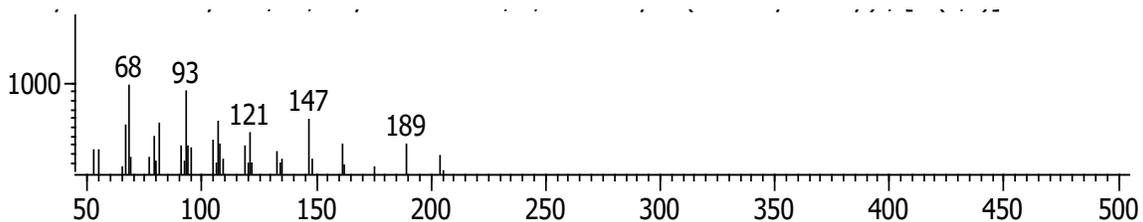
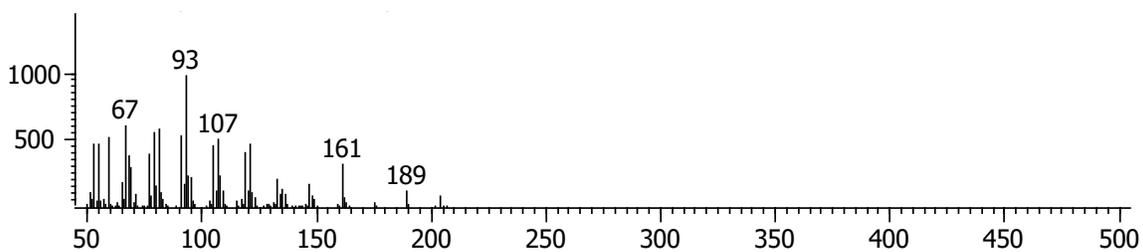
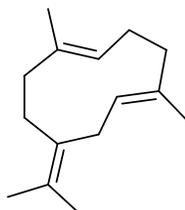
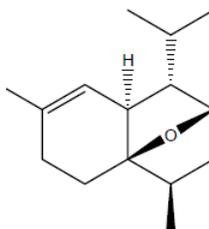


Figura S55. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del germacreno B (73)

Éter de cadineno (**85**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
	615.897	1551.3	1553	8.26	C ₁₅ H ₂₄ O	220



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 17, at 615.897 s

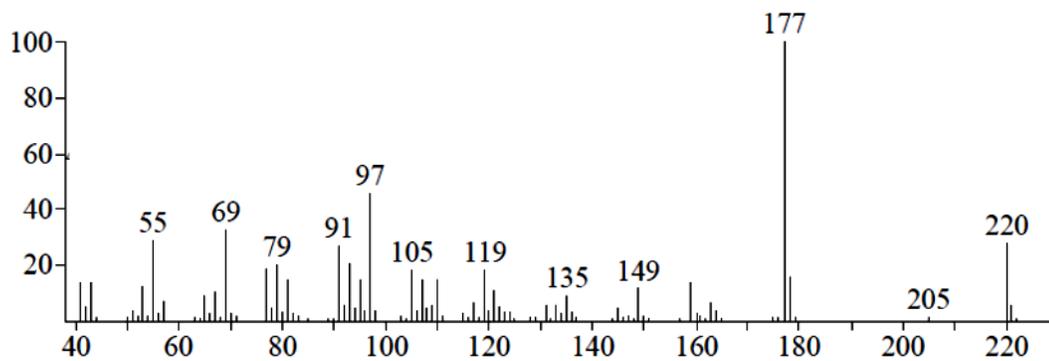
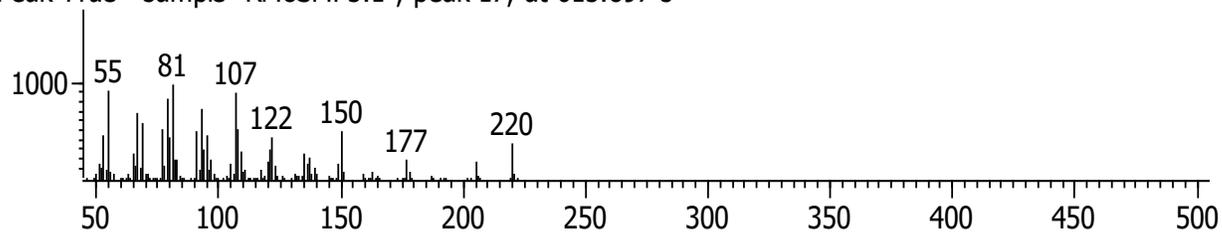
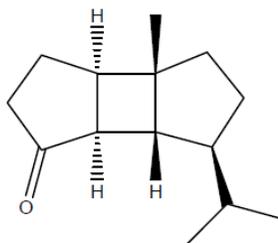


Figura S56. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del éter de cadineno (**85**)

Bourbonanona (**86**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
	619.247	1560.2	1558	8.26	C ₁₄ H ₂₂ O	206



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 18, at 619.247 s

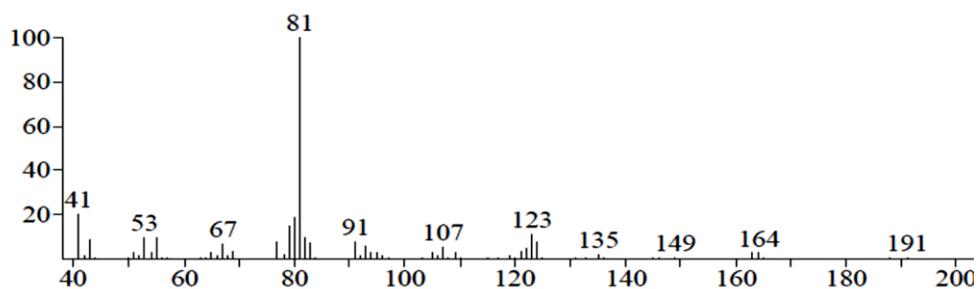
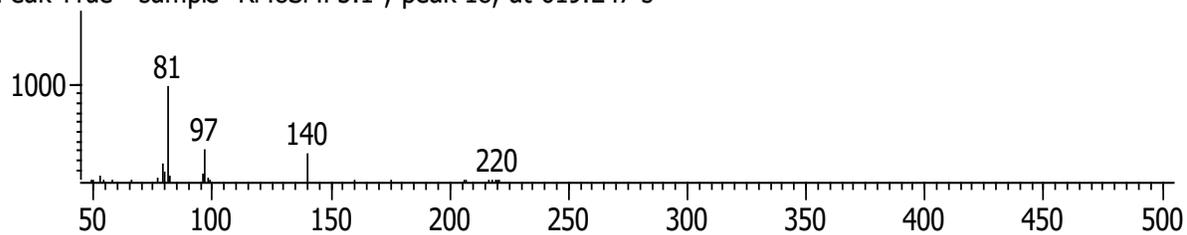
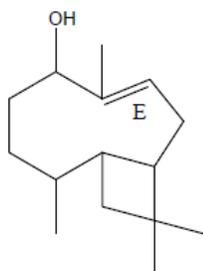


Figura S57. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) de la bourbonanona (**86**)

Cariofilenol (**87**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
	623.347	1571.1	1572	2.65	C ₁₅ H ₂₆ O	222



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 20, at 623.347 s

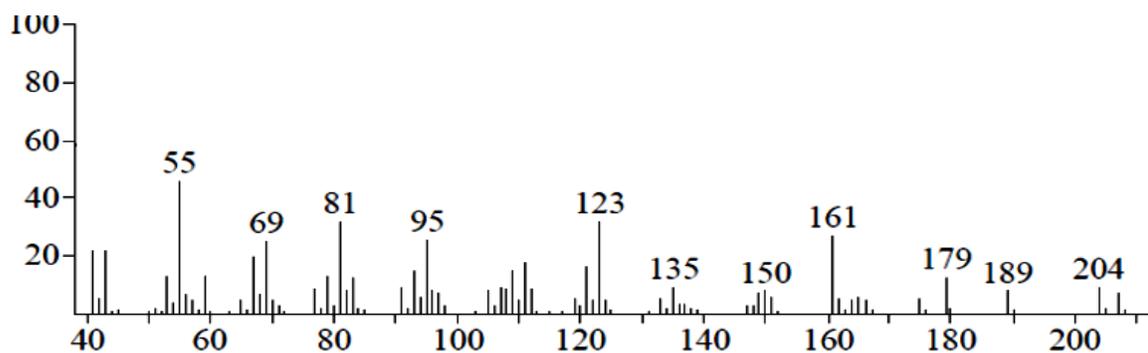
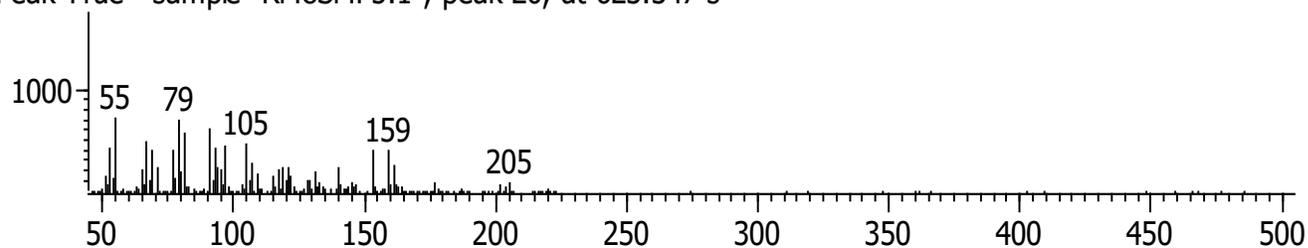
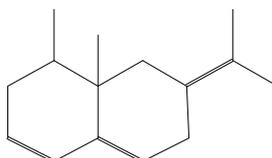


Figura S58. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del cariofilenol (**87**)

β -Vatireno (88)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
755	628.447	1584.6	1574	3.39	C ₁₅ H ₂₂	202



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 21, at 628.447 s

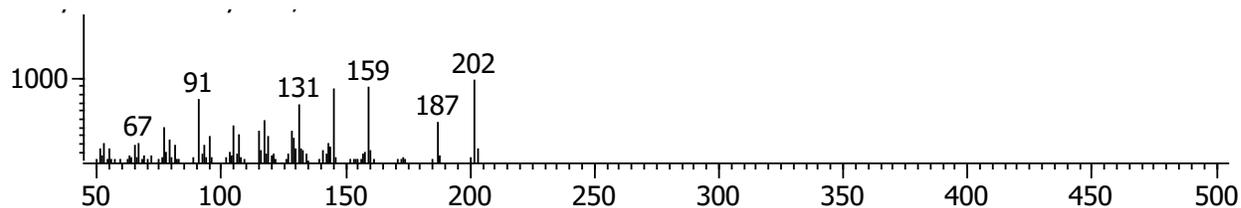
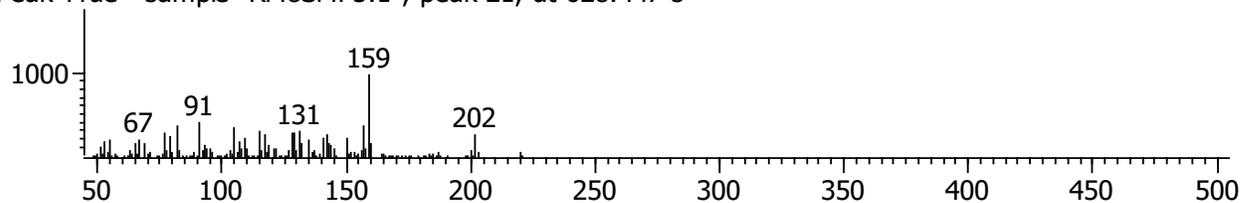
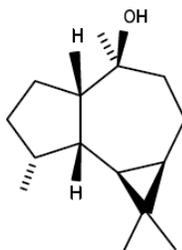


Figura S59. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del β -vatireno (88)

Viridiflorol (**75**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
865	630.247	1589.3	1589	3.39	C ₁₅ H ₂₆ O	222



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 22, at 630.247 s

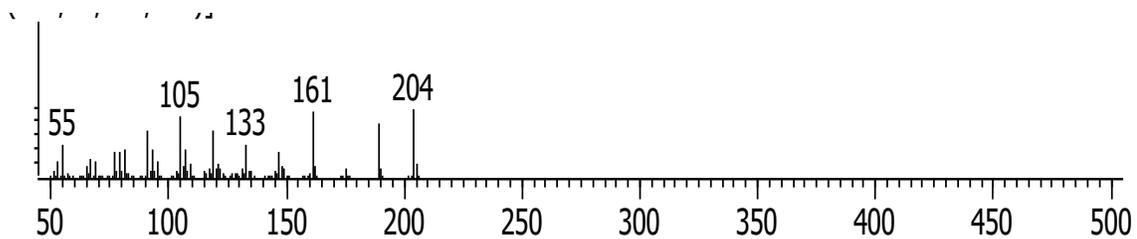
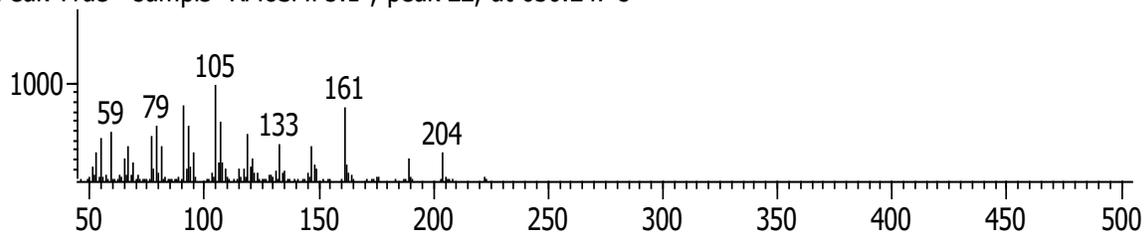
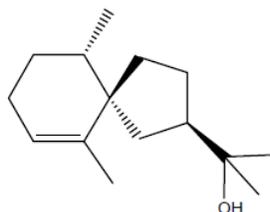


Figura S60. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del viridiflorol (**75**)

Hinesol (**89**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
	643.147	1627	1632	6.27	C ₁₅ H ₂₆ O	222



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 23, at 643.147 s

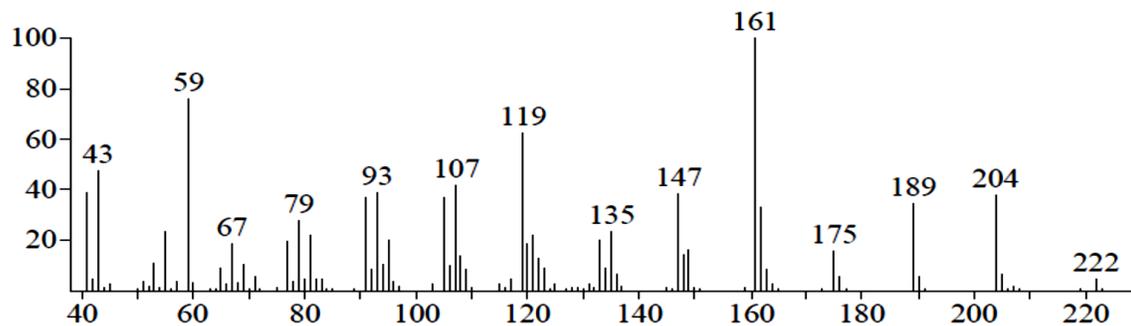
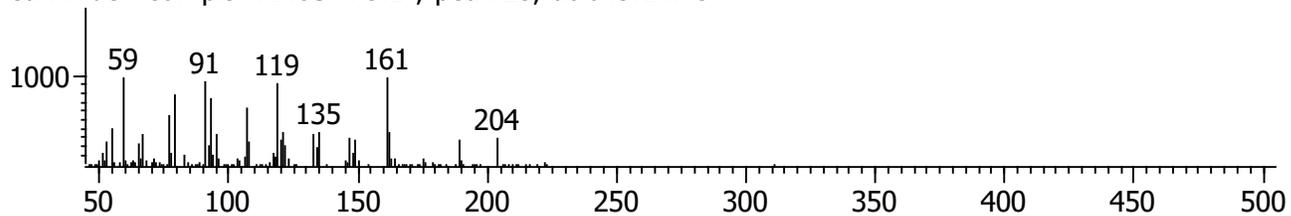
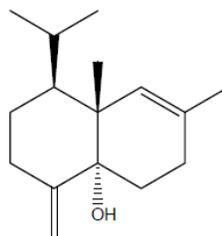


Figura S61. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del hinesol (**89**)

Muurola-4,10 (14)-dieno-1 β -ol (**90**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
813	643.497	1628	1631	6.33	C ₁₅ H ₂₄ O	220



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 24, at 643.497 s

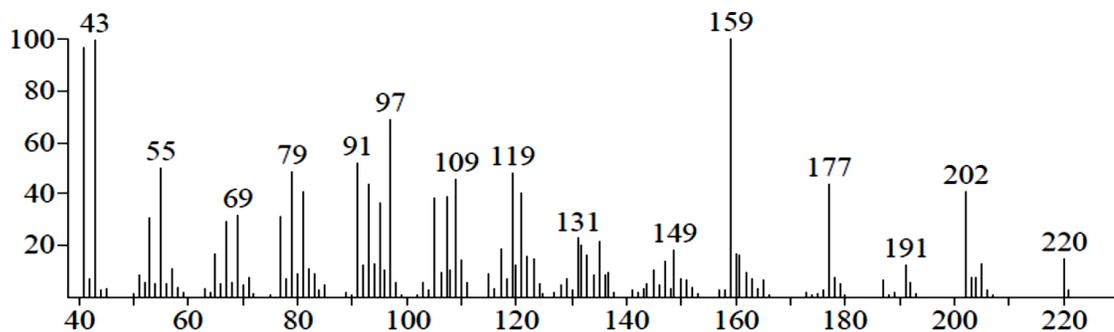
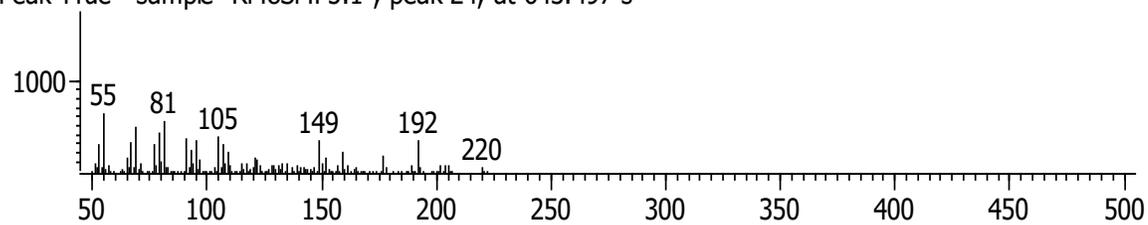
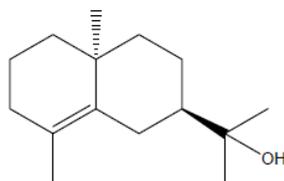


Figura S62. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del muurola-4,10 (14)-dieno-1 β -ol (**90**)

10-epi- γ -eudesmol (**91**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
	644.447	1630.5	1624	6.35	C ₁₅ H ₂₆ O	222



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 25, at 644.447 s

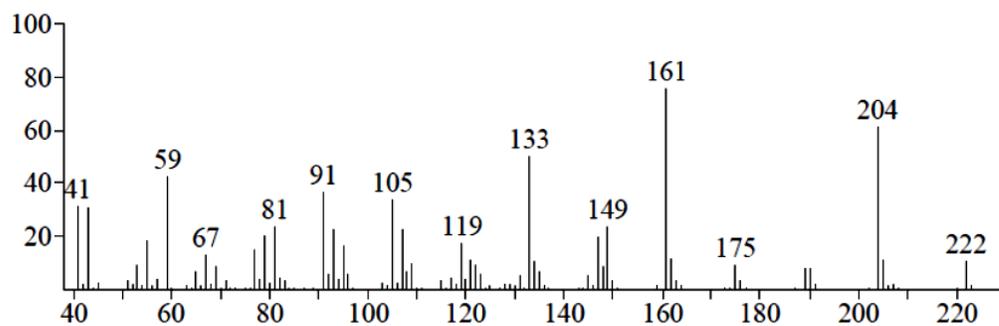
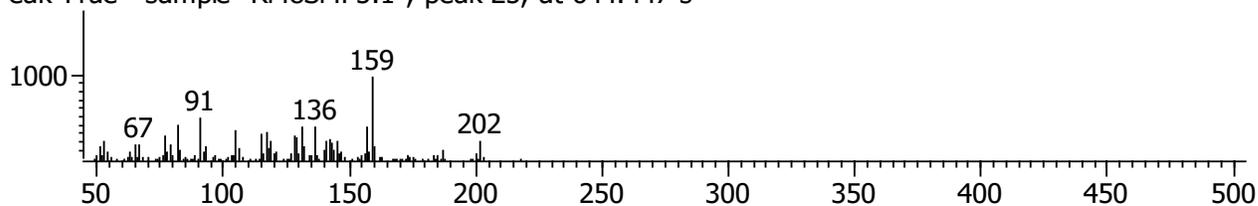
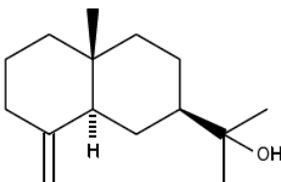


Figura S63. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del 10-epi- γ -eudesmol (**91**)

β -Eudesmol (**19**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
805	650.297	1648.1	1649	5.05	C ₁₅ H ₂₆ O	222



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 26, at 650.297 s

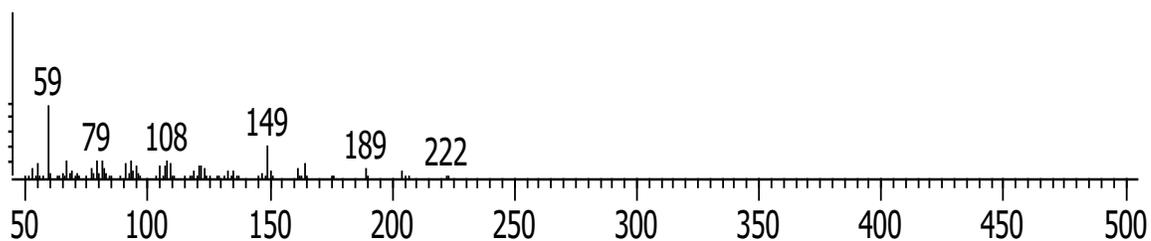
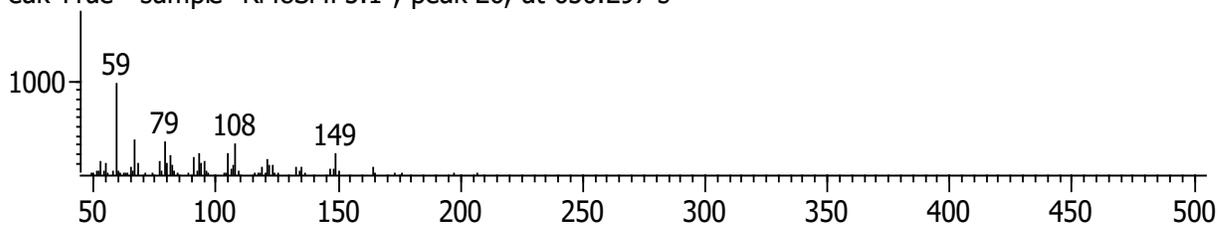
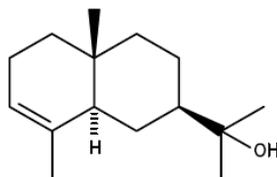


Figura S64. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del β -eudesmol (**19**)

α -Eudesmol (**36**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
800	650.797	1649.6	1652	5.05	C ₁₅ H ₂₆ O	222



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 27, at 650.797 s

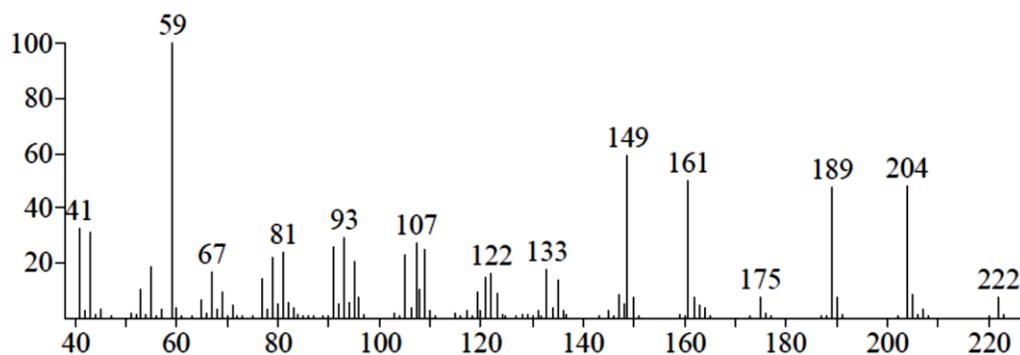
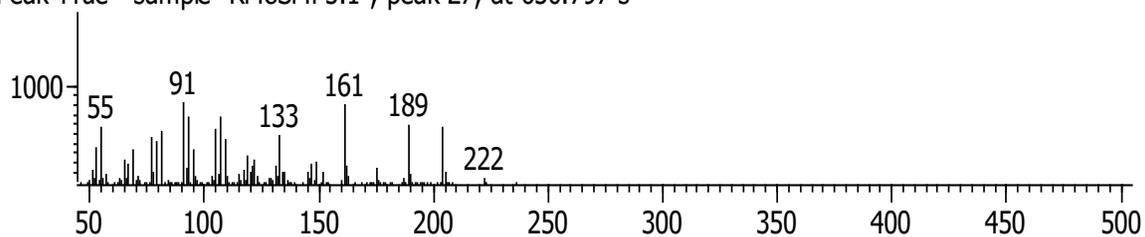
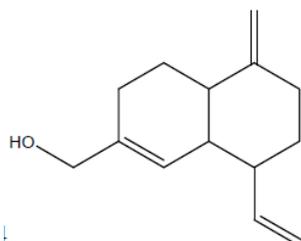


Figura S65. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del α -eudesmol (**36**)

Khusilol (92)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
	651.547	1651.8	1648	5.05	C ₁₄ H ₂₀ O	204



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 28, at 651.547 s

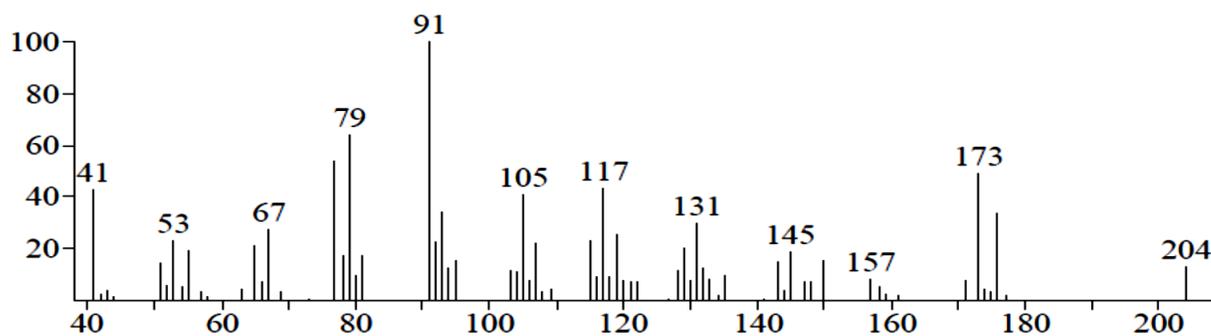
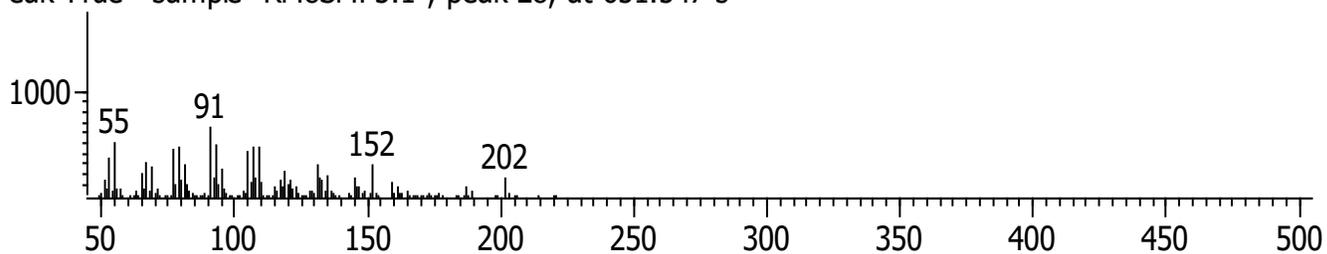
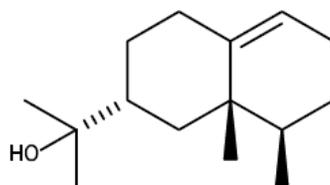


Figura S66. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del khusilol (92)

Valerianol (**93**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
	652.147	1653.6	1655	5.05	C ₁₅ H ₂₆ O	222



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 29, at 652.147 s

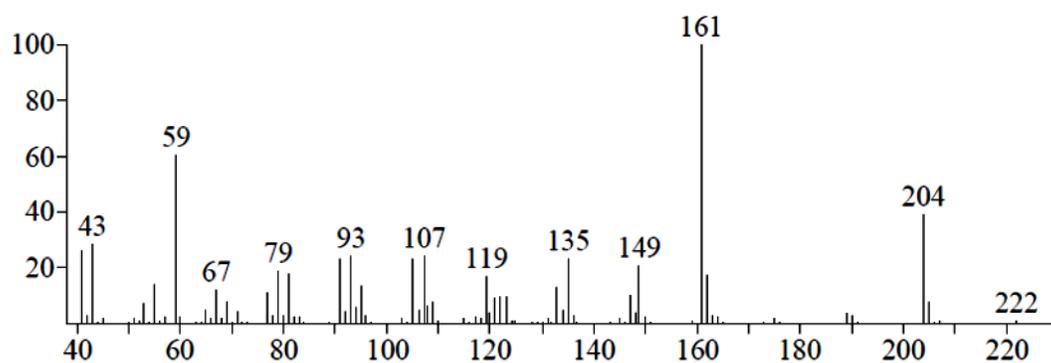
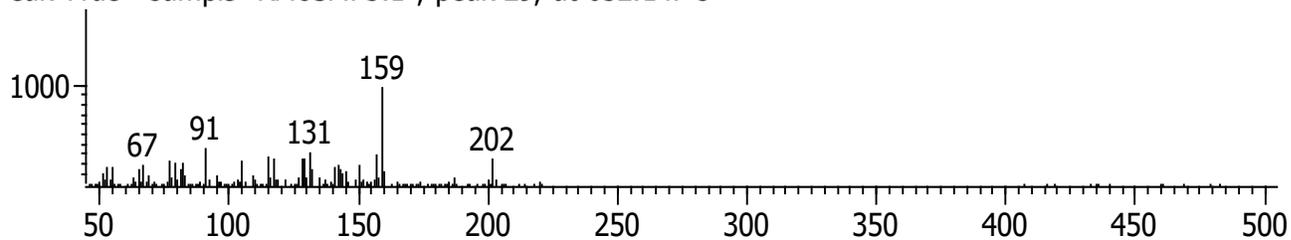
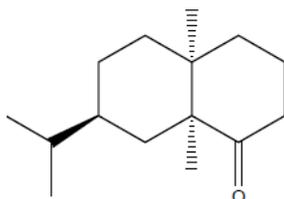


Figura S67. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) del valerianol (**93**)

(+)-Valeranona (**94**)

Similitud	Tiempo de retención (s)	Índice de retención (Experimental)	Índice de retención (literatura)	Área %	Fórmula	PM
934	658.197	1672	1669	3.69	C ₁₅ H ₂₆ O	222



Peak True - sample "RM8SMP5:1", peak 30, at 658.197 s

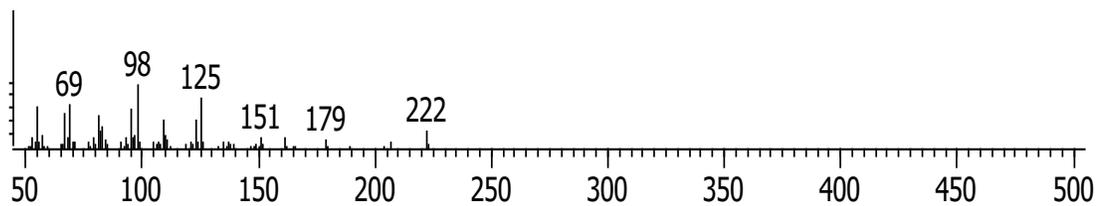
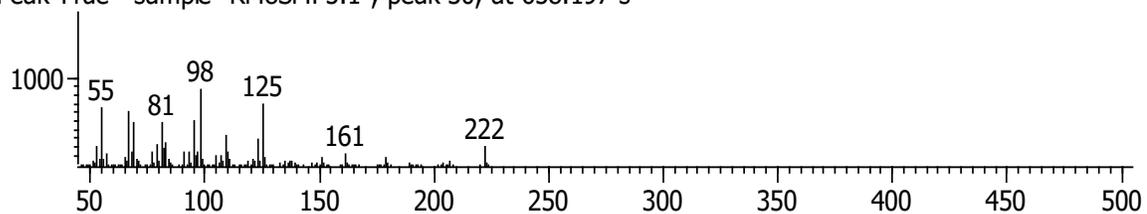


Figura S68. Comparación de espectros de masas e índice de retención (experimental y literatura) de la (+)-valeranona (**94**)

Anexo 3:

Organismos fúngicos (CC6:6, CC4:9 y *Malbranchea fulva*)

Figura S69. Metabolitos secundarios aislados de microorganismos

Figura S70. Posible sitio de unión para la terezina D (**97**; amarillo) con la enzima α -glucosidasa *Saccharomyces cerevisiae* (rosa; PDB 3A4A).

Figura S71. Representación en 3D del posible modo de unión de la terezina D (**97**) con la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Figura S72. Interacciones enzima-ligando en 2D de la terezina D (**97**) con la α -glucosidasa de levadura.

Figura S73. Espectro de RMN-¹H del alternariol (**95**) en DMSO-*d*₆ (500 MHz)

Figura S74. Espectro de RMN-¹³C del alternariol (**95**) en DMSO-*d*₆ (125 MHz)

Figura S75. Espectro de RMN-¹H del ácido kójico (**96**) en CD₃OD (500 MHz)

Figura S76. Espectro de RMN-¹³C del ácido kójico (**96**) en CD₃OD (125 MHz)

Figura S77. Espectro de RMN-¹H de la terezina D (**97**) en CD₃OD (700 MHz)

Figura S78. Espectro de RMN-¹³C de la terezina D (**97**) en CD₃OD (175 MHz)

1. Parte experimental

1.1. Material fúngico

Los hongos rotulados CC6:6 y CC4:9 se aislaron a partir de las muestras de suelo de diversas zonas de valle de Cuatrociénegas, estado de Coahuila, México (26°52'53" N, 102°8'11" O, 795 msnm y 21°51'14" N, 102°8'43" O, 771 msnm; respectivamente). Una muestra de referencia se depositó en la colección de hongos microscópicos del Herbario Nacional (MEXU). Esta actividad la ejecutó un microbiólogo o micólogo experto de los Institutos de Ecología (Dra. Valeria Souza Saldívar) o Biología (María del Carmen González) de la UNAM. La especie fúngica *Malbranchea fulva* Sigler y Carmichael (ATCC® 34531) fue adquirido de la American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA, EUA).

1.2. Preparación de los extractos fúngicos para la realización de las pruebas biológicas de selección.

La preparación del inóculo de la especie fúngica objeto de estudio, se realizó a partir de un cultivo puro en medio agar papa dextrosa (PDA; Difco® Fischer Scientific, Hampton, NH, EUA). Para ello el microorganismo fue cultivado en 30 mL de medio caldo papa dextrosa (PDB; Difco® Fischer Scientific, Hampton, NH, EUA), durante 8 días a temperatura ambiente y con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas, con la finalidad de incrementar la biomasa. Se efectuó la fermentación en pequeña escala de los hongos CC6:6 y CC4:9 utilizando un sustrato solido (50 g de arroz en 120 mL de agua) como medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 500 mL, todos en condiciones estáticas, a temperatura ambiente y con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas, durante 20 días. La preparación de los extractos orgánicos se llevó a cabo mediante un proceso de maceración exhaustiva, utilizando una mezcla de CHCl₃-MeOH (1:1) como disolvente de extracción. Posteriormente, se fragmentó manualmente el contenido de cada matraz y se colocaron en agitación a 100 rpm durante 1 h. Al cabo del proceso de

extracción, se filtró al vacío el contenido de cada matraz y se sometió a un proceso de reparto adicionando CHCl_3 . Enseguida, se separó la fase orgánica de la fase acuosa, y esta se sometió a un proceso de extracción con CHCl_3 (3×50 mL). Las fases orgánicas se filtraron y se concentraron a presión reducida. Posteriormente los extractos fueron reconstituidos con 80 mL de una mezcla $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$ (1:1) y se sometieron a un proceso de reparto con hexano (3×80 mL); las fracciones de hexano se descartaron, mientras que las fracciones de $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$ se concentraron a presión reducida hasta sequedad.

La especie *Malbranchea fulva* fue resembrada en cajas de Petri con medio agar peptona-extracto de levadura-dextrosa (PYG; ATCC[®], Manassas, VA, EUA) para su conservación. La preparación del inóculo se realizó a partir de un cultivo puro en medio agar PYG, el cual se dejó crecer por 15-20 días. Al término de este periodo, el microorganismo fue cultivado en 80 mL de medio caldo peptona-extracto de levadura-dextrosa (PYG; ATCC[®], Manassas, VA, EUA) previamente esterilizado (autoclave durante 15 minutos a 121 °C) con agar que contenía al microorganismo y se mantuvieron en agitación a 90 rpm durante 8 días a temperatura ambiente y con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas. Se realizó la fermentación a mediana escala del hongo *M. fulva* utilizando el medio líquido PYG como medio de cultivo en matraz Fernbach de 2 L, en condiciones estáticas y/o en agitación a 90 rpm, a temperatura ambiente y con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas, durante 30 días.

La preparación de los extractos orgánicos se llevó a cabo mediante un proceso de maceración exhaustiva, utilizando una mezcla de $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (1:1) como disolvente de extracción. Se colocaron en agitación a 90 rpm por dos horas. Al término de este proceso de extracción, se filtró al vacío el contenido de cada matraz (para eliminar el micelio). Se separó la fase orgánica de la fase acuosa mediante un método de reparto. Los extractos orgánicos se filtraron y se concentraron *in vacuo*. Posteriormente, el extracto fue reconstituido con $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$ (1:1) y se sometió a un proceso de reparto con hexano; las fracciones de hexano se descartaron, mientras que la fracción polar se concentró a presión reducida.

Las fracciones polares obtenidas a partir de los tres microorganismos objeto de estudio, se sometieron a procesos de purificación y evaluación biológica.

1.3. Estudio químico de los hongos CC6:6 y CC4:9

1.3.1. Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios

El extracto desgrasado del hongo CC6:6 (220 mg) se purificó por CCA, empleando una fase normal de gel de sílice 70-230 mallas y utilizando un gradiente de elución entre Hex-Acetato-MeOH con incrementos graduales de polaridad, se obtuvieron 12 fracciones primarias ($F_1\text{-}F_{12}$), las cuales se reunieron con base en su similitud cromatográfica. Enseguida la fracción F_4 (25 mg) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante CCA sobre Sephadex LH-20 (150 g) y una fase móvil de

MeOH-CH₂Cl₂ (7:3). De este proceso se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento de 13 mg que se identificó como alternariol (**95**) (Stinson et al., 1986).

Alternariol (**95**). Sólido blanco; pf 204-206 °C; RMN-¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H (ppm): 11.77 (1H, s, 3-OH), 10.85 (1H, brs, 4'-OH), 10.36 (1H, brs, 5-OH), 7.25 (1H, d, *J*= 2.1 Hz, H-6), 6.72 (1H, d, *J*= 2.6 Hz, H-5'), 6.64 (1H, d, *J*= 2.6 Hz, H-3'), 6.37 (1H, d, *J*= 2.0 Hz, H-4), 2.71 (3H, s, H-8'); RMN-¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C (ppm): 165.4 (C-5), 164.6 (C-7), 164.0 (C-3), 158.4 (C-4'), 152.6 (C-2'), 138.3 (C-6'), 138.1 (C-1), 117.5 (C-5'), 109.0 (C-1'), 104.3 (C-6), 101.6 (C-3'), 100.1 (C-4), 97.4 (C-2), 25.2 (C-8').

La fracción polar del hongo CC4:9 (916 mg) fue reconstituido en una mezcla de CHCl₃-MeOH (98:2) y adsorbida en la cantidad mínima de celita y fue fraccionada utilizando una cromatografía tipo flash en fase normal sílice-gel Gold (40 g) y una columna RediSep Rf, se utilizó un gradiente de elución entre hexano-cloroformo-acetato de etilo-metanol con incrementos graduales de polaridad, un flujo de 40 mL/min y 50.0 CV (volúmenes de columna, por sus siglas en inglés) sobre 60 min. Todas las fracciones fueron colectadas en un volumen de 20 mL y fueron agrupadas 10 fracciones conforme a su perfil UV y ELSD. Las fracciones y el rendimiento obtenido del fraccionamiento primario se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Fraccionamiento primario de la fracción de CH₃CN-MeOH (1:1) del hongo CC4:9.

Etiqueta	No. Fracción	Rendimiento (mg)
F ₁	1-30	0.4
F ₂	31-35	4.6
F ₃	36-41	181.9
F ₄	42-54	31.6
F ₅	55-56	16.7
F ₆	57-61	70.1
F ₇	62-69	141.1
F ₈	70, 73-80	34.4
F _{8.1}	71-72	42
F ₉	81-110	151.2
F ₁₀	111-128	144.4
	Recuperado	821.4
	% Rendimiento	89.67

Al momento de reunir la fracción F₈, la F_{8.1} (42 mg) se agrupó por separado debido a que presentaba un sólido café. Al separar éste por filtración, se le realizaron varios lavados con una mezcla hexano:acetato de etilo (9:1) para eliminar las impurezas. Al cabo de este proceso se logró obtener 27 mg de un sólido blanco que se identificó como ácido kójico (**96**) (Li et al., 2003).

Ácido kójico (**96**). Sólido blanco; pf 152-154 °C; RMN-¹H (500 MHz, CD₃OD) δ_H (ppm): 7.93 (1H, s, H-6), 6.47 (1H, brs, H-3), 4.38 (2H, s, H-7); RMN-¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ_C (ppm): 175.6 (C-4), 169.2 (C-2), 146.1 (C-5), 139.8 (C-6), 109.3 (C-3), 59.8 (C-7).

1.4. Estudio químico del hongo *Malbranchea fulva*

1.4.1. Aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos secundarios

Se reunieron los extractos desgrasados del hongo *M. fulva* (500 mg) obtenidos a partir de un mes en reposo y a la primera, segunda y tercera semana en agitación. El extracto fue reconstituido en una mezcla de CHCl₃-MeOH (98:2) y adsorbida en la cantidad mínima de celita y fue fraccionada utilizando una cromatografía tipo flash en fase normal sílice-gel Gold (12 g) y una columna RediSep Rf, se utilizó un gradiente de elución entre hexano-cloroformo-acetato de etilo-metanol con incrementos graduales de polaridad, un flujo de 30 mL/min y 80.0 CV sobre 44.8 min. Todas las fracciones fueron colectadas y fueron agrupadas 7 fracciones conforme a su perfil UV y ELSD. El rendimiento de cada fracción se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Fraccionamiento primario de la fracción de CH₃CN-MeOH (1:1) del hongo *M. fulva*.

Etiqueta	No. Fracción	Rendimiento (mg)
F ₁	1-29	4.2
F ₂	30-35	24.1
F ₃	36-55	13.3
F ₄	56-79	42.5
F ₅	80-111	177.5
F ₆	112-129	102
F ₇	130-150	81.6
	Recuperado	445.2
	% Rendimiento	89.04

La fracción F₆ (102 mg) fue purificada mediante CLAE-FR utilizando un gradiente de 0.1% ácido fórmico acuoso-MeCN (60:40 a 12:88 en 18 min), con un flujo de 21.24 mL/min; de la cual se obtuvo 5 mg de terezina D (**97**; t_R 7.25 min) (Wang y Gloer, 1995).

Terezina D (**97**). Polvo ligeramente amarillo; pf 192-194 °C; RMN-¹H (700 MHz, CD₃OD) δ_H (ppm): 7.45 (1H, dd, $J= 8.0, 1.1$ Hz, H-15), 7.09 (1H, s, H-9), 6.95 (1H, dd, $J= 8.0, 7.1$ Hz, H-14), 6.88 (1H, dd, $J= 7.1, 1.0$ Hz, H-13), 5.41 (1H, tdt, $J= 7.2, 2.9, 1.5$ Hz, H-18), 4.27 (1H, td, $J= 4.2, 1.3$ Hz, H-2), 3.71 (1H, qd, $J= 7.0, 1.3$ Hz, H-5), 3.54 (2H, d, $J= 7.2$ Hz, H-17), 3.45 (1H, dd, $J= 14.7, 4.0$ Hz, H-7a), 3.16 (1H, dd, $J= 14.8, 4.3$ Hz, H-7b), 1.75 (6H, s, H-20, 21), 0.37 (3H, d, $J=7.1$ Hz, H-22); RMN-¹³C (175 MHz, CD₃OD) δ_C (ppm): 170.5 (C-6), 169.2 (C-3), 136.2 (C-11), 133.6 (C-19), 129.0 (C-16), 125.3 (C-12), 125.3 (C-9), 123.0 (C-18), 121.3 (C-13), 120.1 (C-15), 117.5 (C-14), 109.4 (C-8), 57.1 (C-2), 51.4 (C-5), 30.6 (C-7), 30.2 (C-17), 25.6 (C-21), 19.6 (C-22), 17.6 (C-20).

1.5. Resultados y discusión

Originalmente la propuesta del proyecto de doctorado pretendía estudiar organismos fúngicos (CC6:6, CC4:9 y *Malbranchea fulva*) como fuentes potenciales de inhibidores de las enzimas α -glucosidasa y PTP-1B, para contribuir al descubrimiento de agentes antidiabéticos potenciales. Sin embargo, los problemas suscitados con una de las especies conllevaron al cambio de proyecto. A continuación, se resumen los resultados obtenidos de esta propuesta inicial. Así, también se obtendrán los parámetros fisicoquímicos y biofarmacéuticos de cada uno de los compuestos obtenidos en este trabajo de investigación.

1.5.1. Aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios

Mediante la aplicación de diversas técnicas cromatográficas, fue posible aislar de organismos fúngicos CC6:6 y CC4:9, los compuestos conocidos como alternariol (**95**) y ácido kójico (**96**), respectivamente (Fig. S69). A partir de la especie *Malbranchea fulva*, adquirida de la Colección de Cultivos Tipo de Estados Unidos de América (ATCC por sus siglas en inglés), se aisló el producto natural llamado terezina D (**97**) (Fig. S69). La caracterización química de estos compuestos se realizó con base en el análisis de sus espectros de resonancia magnética y por comparación con los datos previamente reportados en la literatura.

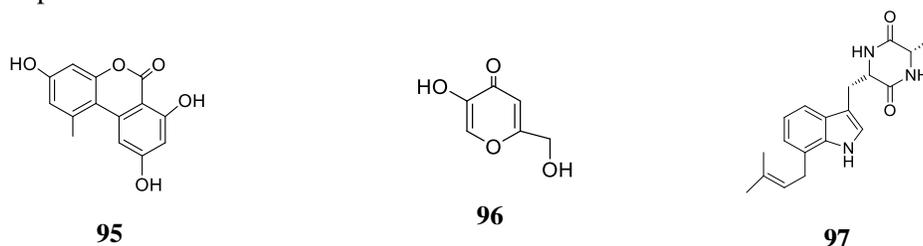


Figura S69. Metabolitos secundarios aislados de microorganismos.

1.5.2. Evaluación del efecto inhibitorio sobre la actividad de la α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Los compuestos aislados a partir de los organismos fúngicos se evaluaron mediante un ensayo enzimático *in vitro* con la finalidad de determinar su efecto inhibitorio sobre la enzimática α -glucosidasa de levadura. Los resultados indican que únicamente la terezina D (**97**) mostró actividad moderada sobre de la enzima α -glucosidasa de levadura, con una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de $1046 \pm 5 \mu\text{M}$. Los valores de las CI_{50} y de los % de inhibición se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Actividad de las fracciones y los compuestos (**95–97**) de los microorganismos en la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Fracción MeCN-MeOH (1:1)/ compuestos puros	Actividad en la enzima α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> $CI_{50} \pm \text{DE} (\mu\text{M})$
Fracción CH ₃ CN-MeOH (1:1) CC6:6 ^a	27.7 %
Fracción CH ₃ CN-MeOH (1:1) CC4:9 ^a	24.5 %
Fracción de CH ₃ CN-MeOH (1:1) <i>Malbranchea fulva</i> ^a	83 %
Alternariol (95)	Inactivo
Ácido kójico (96)	Inactivo
terezina D 97	1046 ± 5
Acarbosa ^b	596 ± 6

^aPorcentaje de inhibición a 1000 $\mu\text{g/mL}$; ^bControl positivo.

1.5.3. Estudios de acoplamiento molecular sobre la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Para determinar el posible modo de unión de la terezina D (**97**), se realizaron estudios de acoplamiento molecular, empleando la estructura obtenida por rayos X de la enzima α -glucosidasa de levadura (código PDB 3A4A), ya que esta fue la enzima utilizada en la evaluación biológica. La estructura del compuesto **97** se optimizó geométricamente utilizando el programa Spartan '10; posteriormente, se encontró el posible sitio de interacción de acuerdo con diferentes factores energéticos, empleando el programa AutoDock Tools. El protocolo utilizado se validó reproduciendo el modo de unión de la glucosa en el sitio catalítico (RMSD = 0.811 Å).

Los resultados del acoplamiento molecular del producto **97** con la enzima de levadura revelan un posible sitio de unión en el sitio catalítico de la enzima (Fig. S70); el análisis predice la formación de cuatro puentes de hidrógeno entre los aminoácidos His280, Gln279, Asp352 y Glu277 con el carbonilo del fragmento de dicetopiperazina y el nitrógeno de la parte del indol. También parecen

intervenir interacciones electrostáticas de Van der Waals con los aminoácidos Phe303, His351, Asp69, Asp215, Val216, Arg442, Phe159, Glu411 y Tyr158. Se identificaron dos interacciones π -sigma y π -alquilo entre los metilos del fragmento de isopreno y los residuos Tyr72, His112 y Phe178. Las interacciones observadas entre la terezina D (**97**) y la enzima α -glucosidasa de levadura se muestra en detalle en la Tabla 4 y las Figuras S71 y S72.

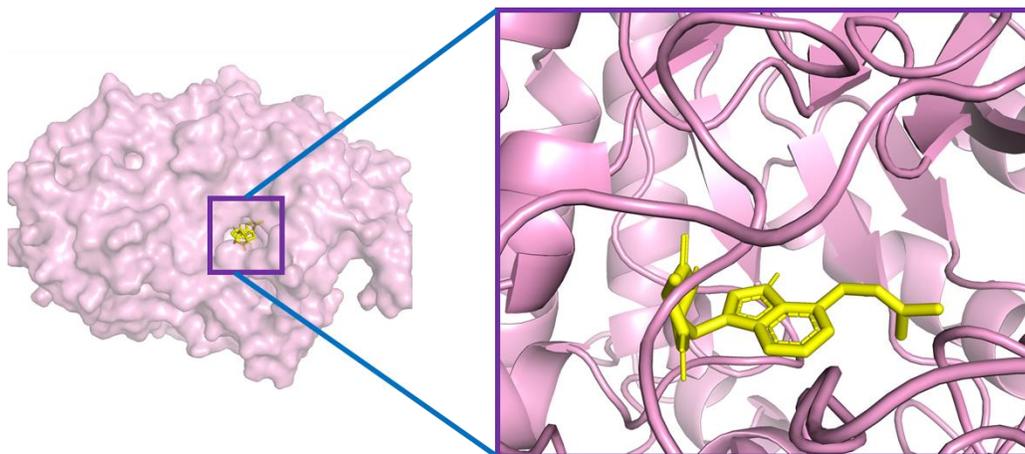


Figura S70. Posible sitio de unión para la terezina D (**97**; amarillo) con la enzima α -glucosidasa *Saccharomyces cerevisiae* (rosa; PDB 3A4A).

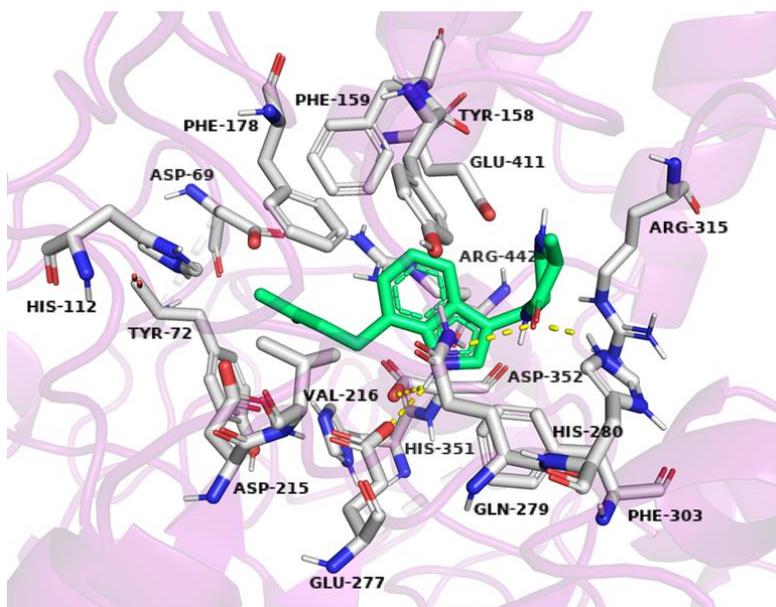


Figura S71. Representación en 3D del posible modo de unión de la terezina D (**97**) con la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

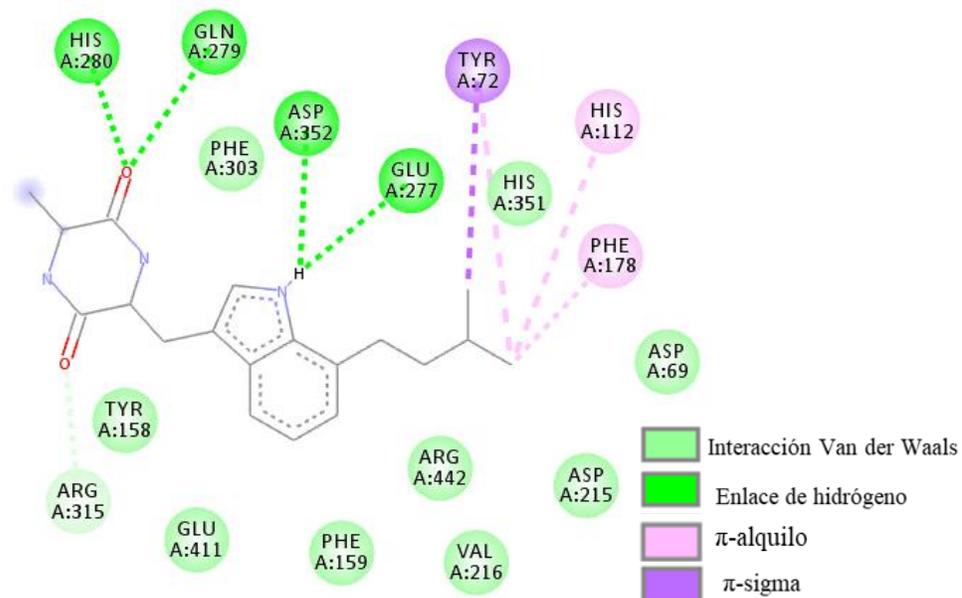


Figura S72. Interacciones enzima-ligando en 2D de la terezina D (**97**) con la α -glucosidasa de levadura.

Tabla 4. Principales interacciones entre la terezina D (**97**), la acarbosa y la enzima α -glucosidasa de levadura.

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)	Interacciones			
		Enlace de hidrógeno	Van der Waals	Enlace CH-O	π -sigma/ π -alquilo
Terezina D (97)	-8.5	His280, Gln279, Asp352, Glu277	Phe303, His351, Asp69, Asp215, Arg442, Val216, Phe159, Glu411, Tyr158	Arg315	Tyr72/Tyr72, His112, Phe178
Acarbosa	-9.0	Ser304, Thr310, Asp307, Asp242, Pro312, Arg315, Asn415, Glu411	Gly309, Val308, Ala329, Glu332, Gln279, Phe303, His280, Tyr158, Phe159, Tyr316, Phe314, Ser240, Ser311	Leu313	

1.6. Referencias de apoyo

1. Li, X.; Jeong, J. H.; Lee, K. T.; Rho, J. R.; Choi, H. D.; Kang, J. S.; Son, B.W. (2003). γ -Pirona derivatives, kojic acid methyl esters from a marine-derived fungus *Alternaria* sp. *Arch. Pharm. Res.*, 26, 2003.
2. Stinson, E. E.; Wise, W. B.; Moreau, R. A.; Jurewicz, A. J.; Pfeffer, P. E. (1986). Alternariol: evidence for biosynthesis via norlichexanthone. *Can. J. Chem.*, 64, 1590-1594.
3. Wang, Y.; Gloer, J. B. (1995). Terezines A-D: New amino acid-derived bioactive metabolites from the coprophilous fungus *Sporormiella teretispora*. *J. Nat. Prod.*, 58, 93-99.

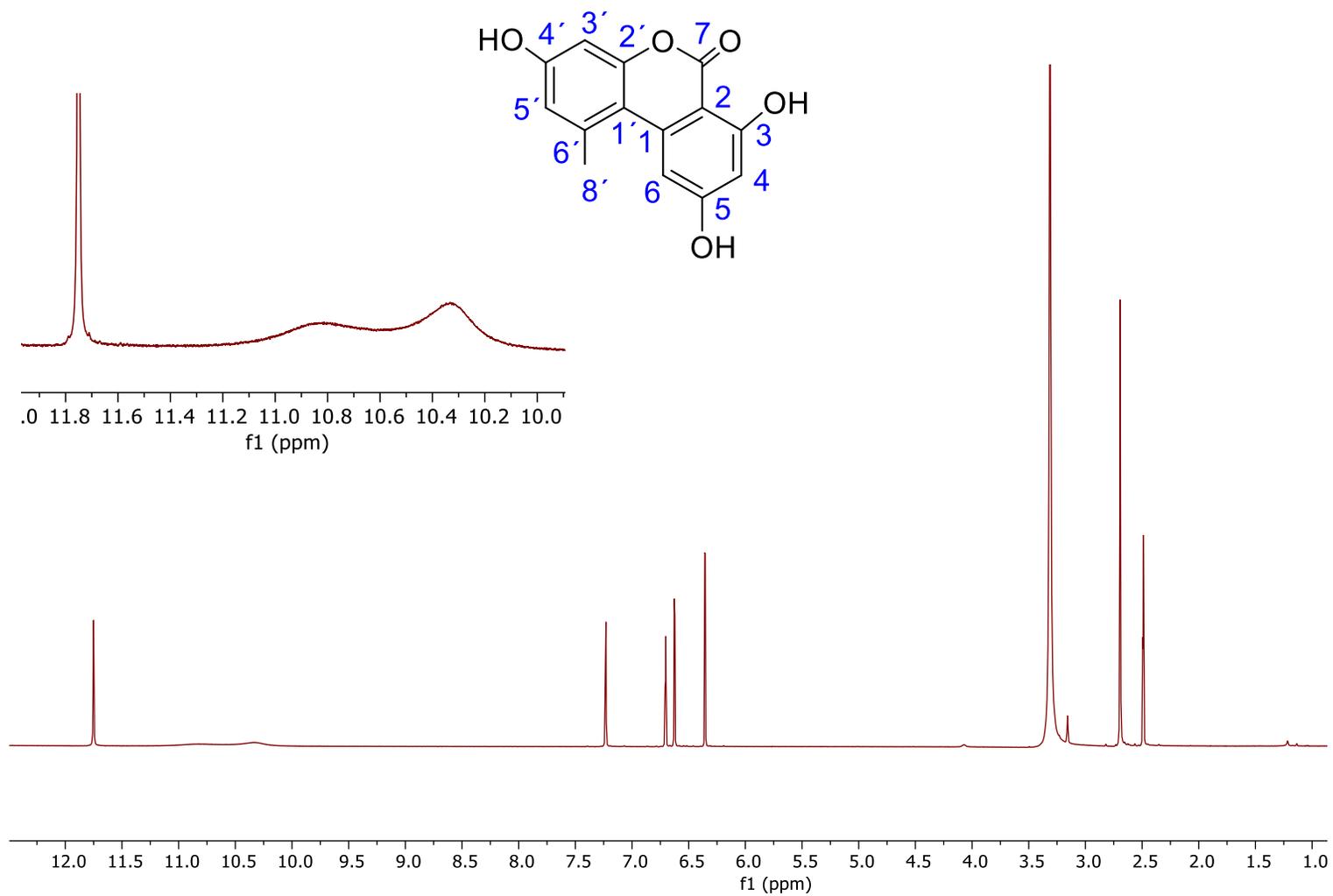


Figura S73. Espectro de RMN-¹H del alternariol (**95**) en DMSO-*d*₆ (500 MHz)

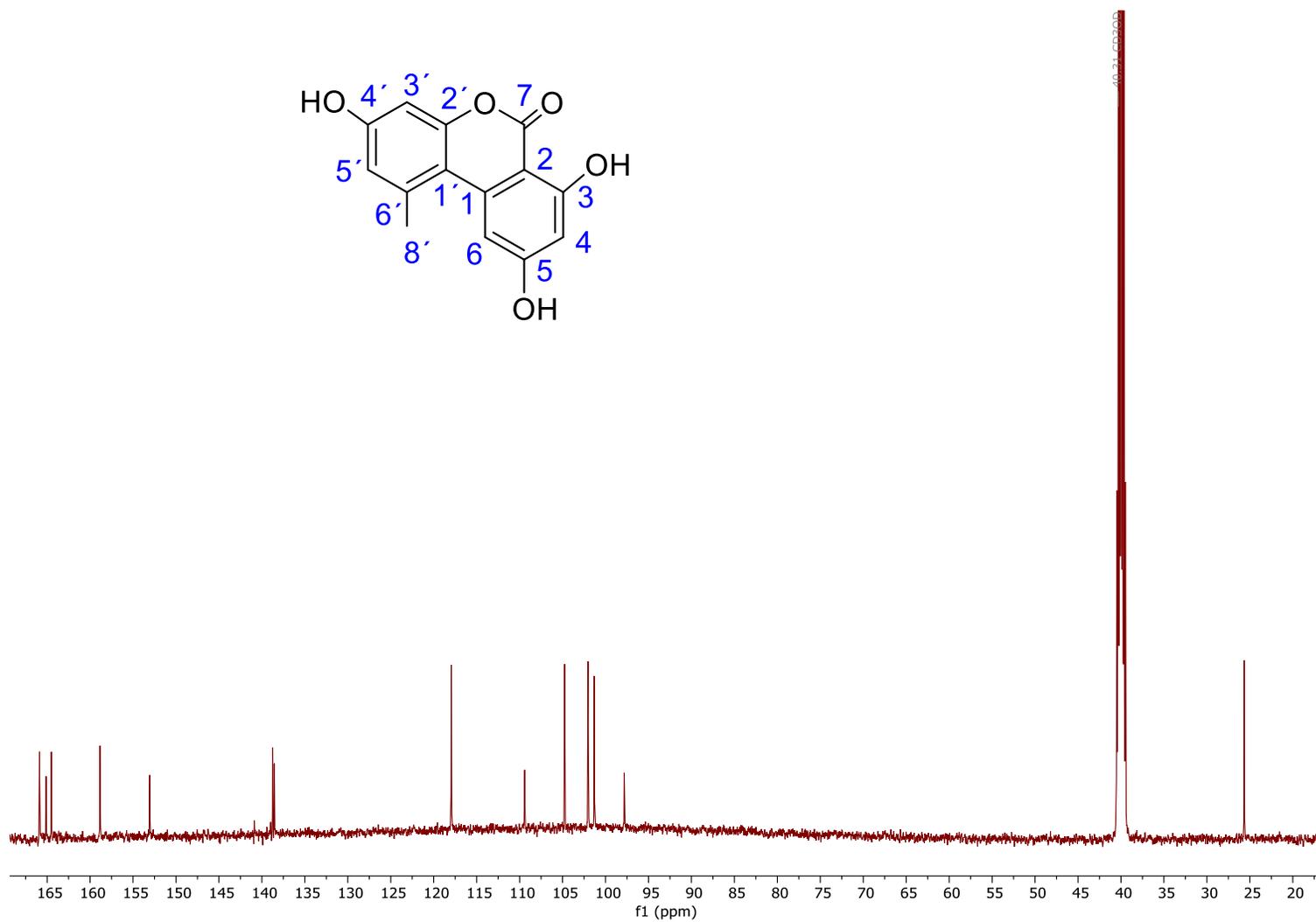


Figura S74. Espectro de RMN- ^{13}C del alternariol (**95**) en DMSO- d_6 (125 MHz)

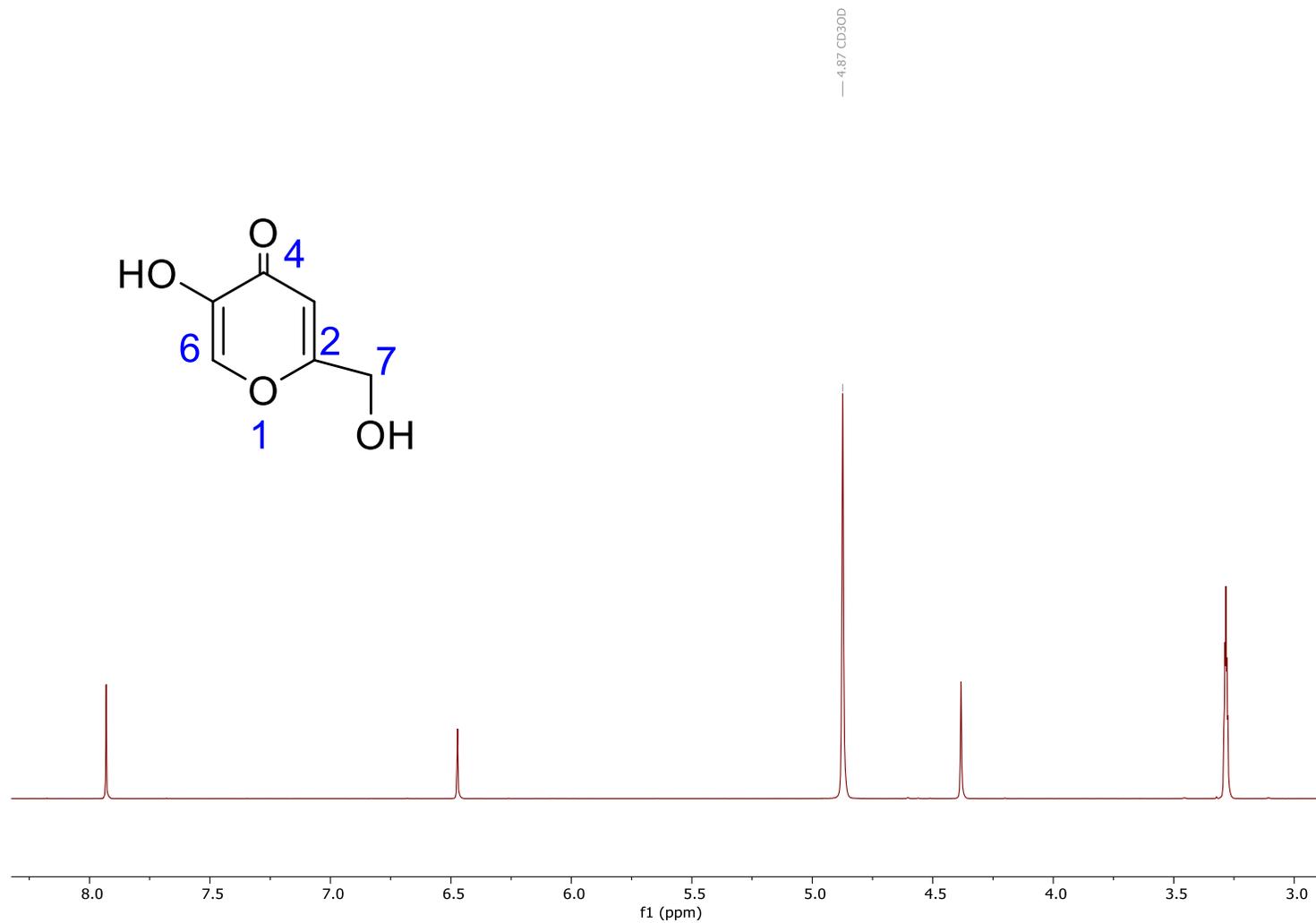


Figura S75. Espectro de RMN-¹H del ácido kójico (**96**) en CD₃OD (500 MHz)

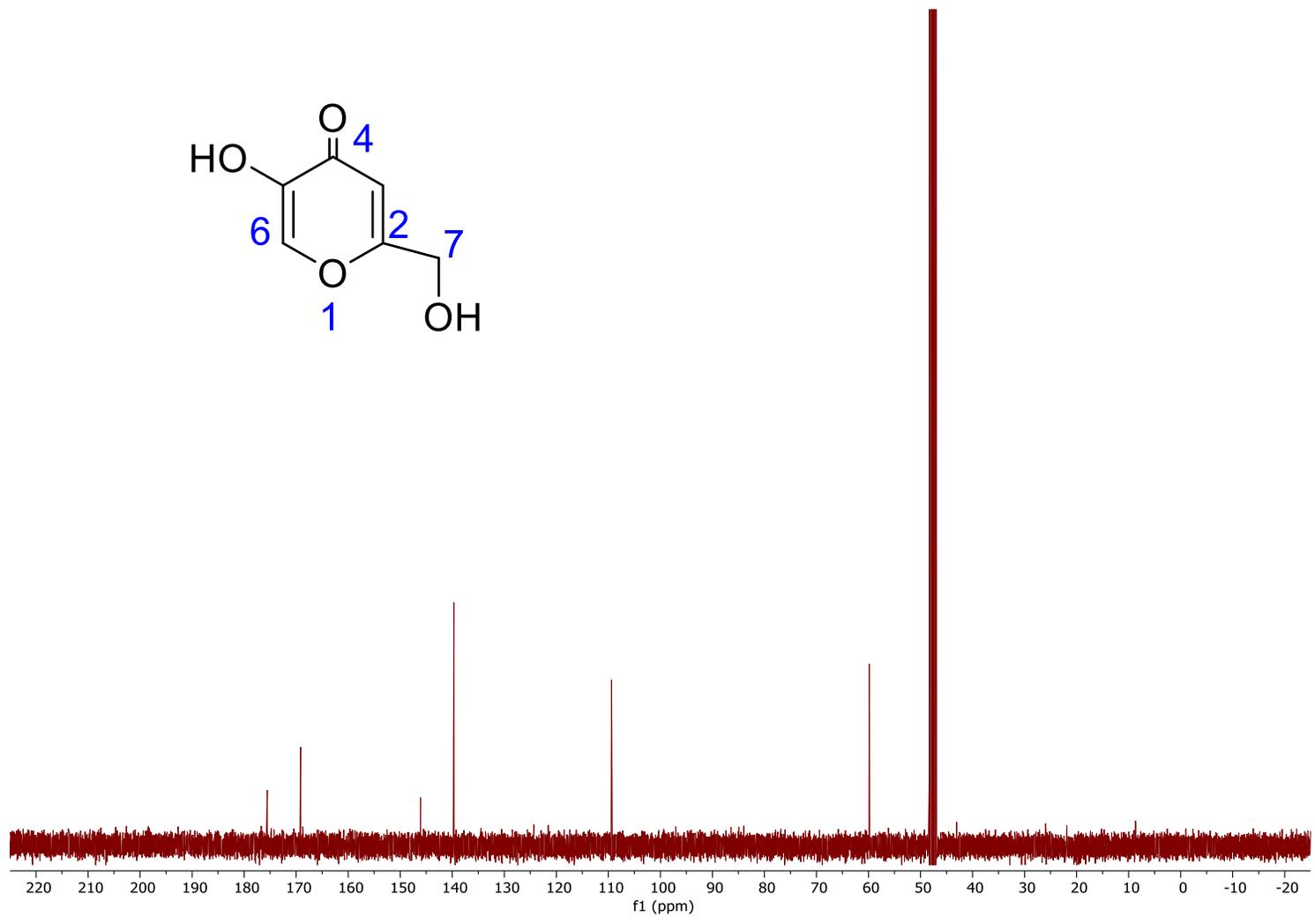


Figura S76. Espectro de RMN- ^{13}C del ácido kójico (**96**) en CD_3OD (125 MHz)

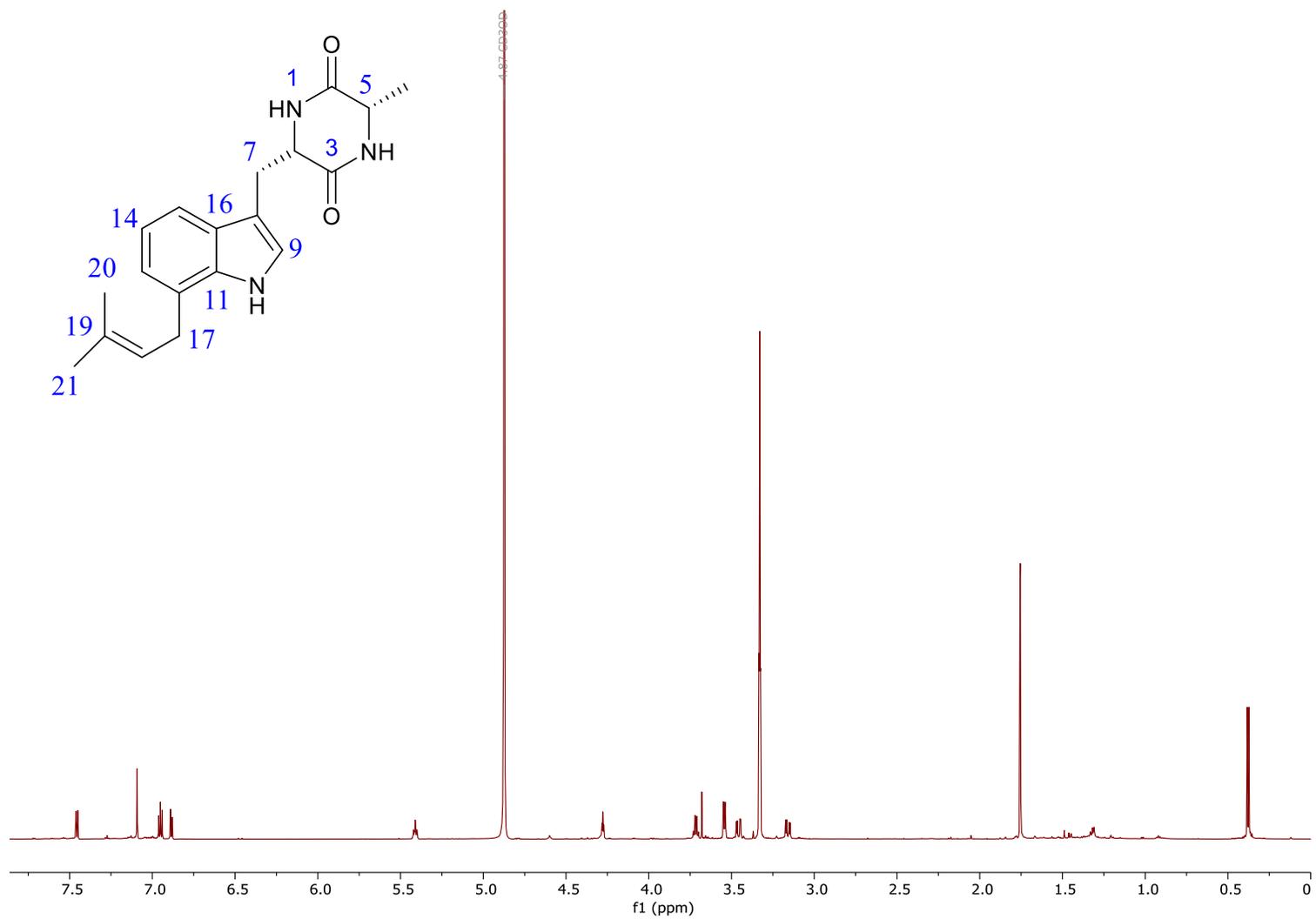


Figura S77. Espectro de RMN-¹H de la terezina D (**97**) en CD₃OD (700 MHz)

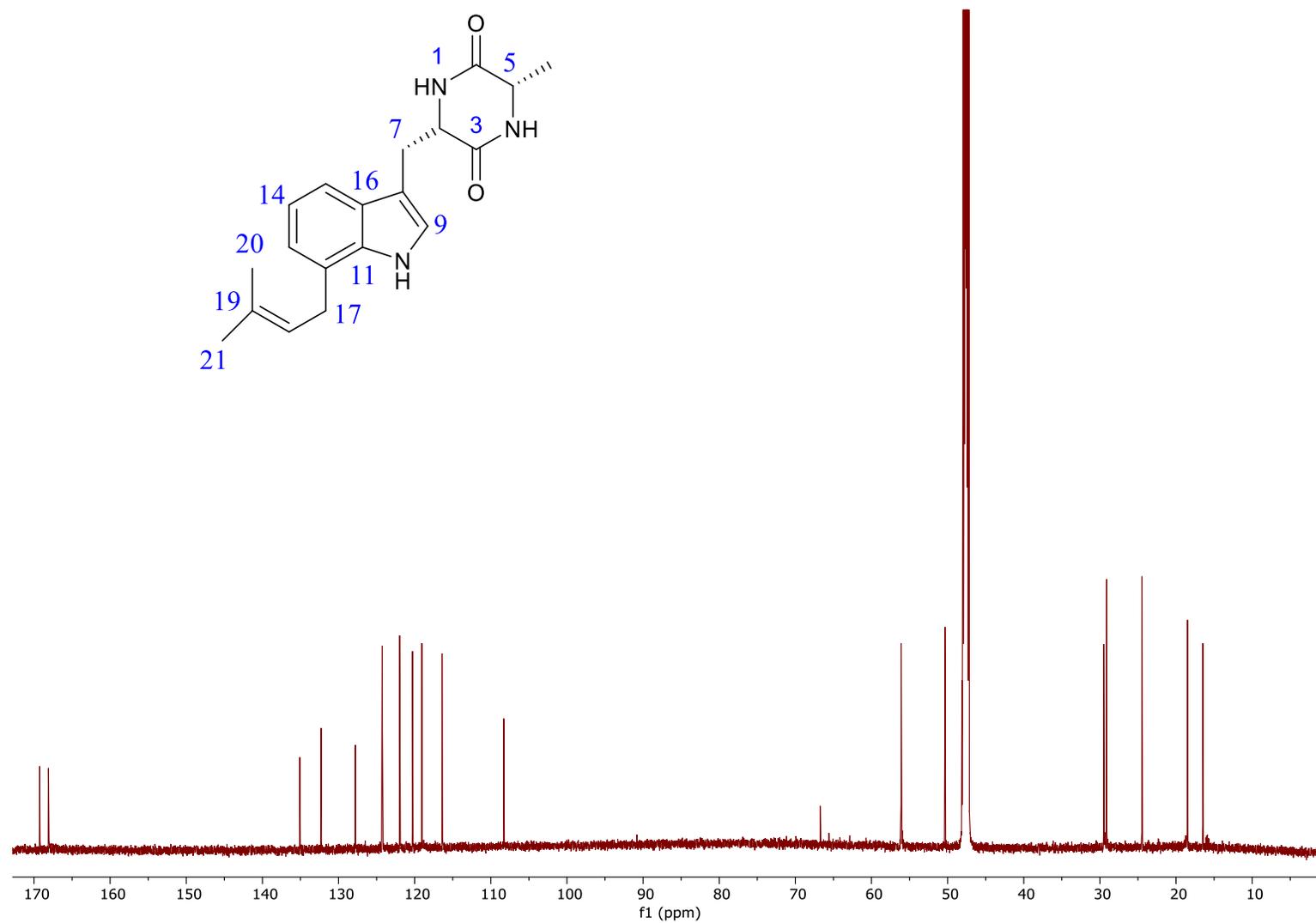


Figura S78. Espectro de RMN-¹³C de la terezina D (**97**) en CD₃OD (175 MHz)

Anexo 4:

Captura de pantalla de los descriptores moleculares de los compuestos 1 y 97

1. Amarisólida (1)

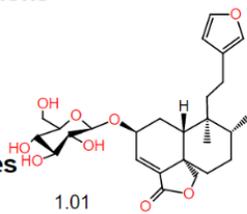
OSIRIS Property Explorer

Predicted toxicity risks

- mutagenic
- tumorigenic
- irritant
- reproductive effective

Predicted properties

cLogP	█	1.01
Solubility	█	-3.48
Molweight	█	492.56
TPSA	█	138.82
Druglikeness	█	-2.96
H bond acceptor	█	9
H bond donor	█	4
Nb stereocenters	█	10
Nb rotatable bonds	█	6
Drug-Score	█	0.40



Molinspiration_property_engine v2018.10

miLogP	0.60
TPSA	138.82
natoms	35
MW	492.56
nON	9
nOHNH	4
nviolations	0
nrotb	6
volume	446.03

[Get data as text](#) (for copy / paste).

Molecule 1
⊗

SMILES OCC1OC(OC2C=C3C(=O)OCC43C(C2)C(C)(C)C2cocc2)C(CC4)C(C(C1O)O)O

Physicochemical Properties	
Formula	C26H36O9
Molecular weight	492.56 g/mol
Num. heavy atoms	35
Num. arom. heavy atoms	5
Fraction Csp3	0.73
Num. rotatable bonds	6
Num. H-bond acceptors	9
Num. H-bond donors	4
Molar Refractivity	123.27
TPSA	138.82 Å²

Lipophilicity	
Log P _{o/w} (iLOGP)	3.24
Log P _{o/w} (XLOGP3)	2.12
Log P _{o/w} (WLOGP)	1.32
Log P _{o/w} (MLOGP)	0.35
Log P _{o/w} (SILICOS-IT)	1.58
Consensus Log P _{o/w}	1.72

Water Solubility	
Log S (ESOL)	-3.94
Solubility	5.67e-02 mg/ml ; 1.15e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (Ali)	-4.67
Solubility	1.06e-02 mg/ml ; 2.16e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log S (SILICOS-IT)	-2.84
Solubility	7.12e-01 mg/ml ; 1.45e-03 mol/l
Class	Soluble

Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	Yes
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K _p (skin permeation)	-7.80 cm/s

Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	No; 2 violations: MW>480, #atoms>70
Veber	Yes
Egan	No; 1 violation: TPSA>131.6
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	No; 1 violation: MW>350
Synthetic accessibility	6.89

2. Terezina D (97)

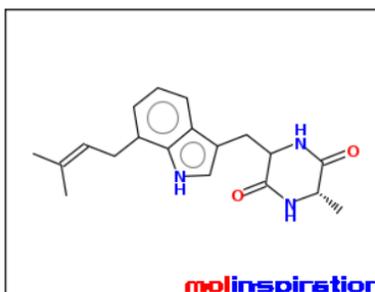
OSIRIS Property Explorer

Predicted toxicity risks

- mutagenic
- tumorigenic
- irritant
- reproductive effective

Predicted properties

cLogP	2.46
Solubility	-3.42
Molweight	325.41
TPSA	73.99
Druglikeness	4.33
H bond acceptor	5
H bond donor	3
Nb stereocenters	2
Nb rotatable bonds	4
Drug-Score	0.90



Molinspiration_property_engine v2018.10

miLogP	2.46
TPSA	73.99
natoms	24
MW	325.41
nON	5
nOHNH	3
nviolations	0
nrotb	4
volume	309.31

[Get data as text](#) (for copy / paste).

[Get 3D geometry](#). BETA

Solubilidad del agua	
Log S (ESOL)	-3,85
Solubilidad	4,60e-02 mg / ml; 1,42e-04 mol / l
Clase	Soluble
Registro S (Ali)	-4,36
Solubilidad	1,41e-02 mg / ml; 4,33e-05 mol / l
Clase	Moderadamente soluble
Registro S (SILICOS-IT)	-5,85
Solubilidad	4,60e-04 mg / ml; 1,41e-06 mol / l
Clase	Moderadamente soluble

Farmacocinética	
Absorción GI	Alto
Permeante BBB	No
Sustrato de P-gp	sí
Inhibidor de CYP1A2	No
Inhibidor de CYP2C19	sí
Inhibidor de CYP2C9	sí
Inhibidor de CYP2D6	No
Inhibidor de CYP3A4	sí
Log K _p (permeación cutánea)	-6,06 cm / s

Druglikeness	
Lipinski	Sí; 0 violación
Ghose	sí
Veber	sí
Egan	sí
Muegge	sí
Puntuación de biodisponibilidad	0,55

Química medicinal	
ESFUERZOS	0 alerta
Brenk	1 alerta: aislado_alqueno
Leadlikeness	sí
Accesibilidad sintética	3,41

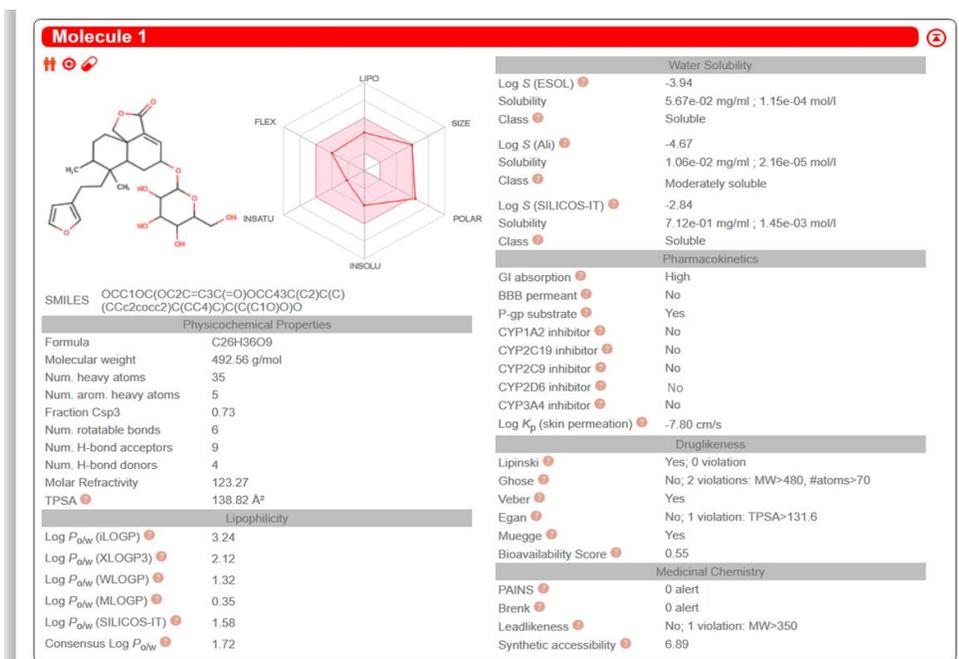
Sonrisas CC(=CCc1ccc2c1[nH]cc2CC1NC(=O)[C@@H](NC1=O)C

Propiedades fisicoquímicas	
Fórmula	C19H23N3O2
Peso molecular	325,40 g / mol
Num. átomos pesados	24
Num. arom. átomos pesados	9
Fracción Csp3	0,37
Num. enlaces rotativos	4
Num. Aceptores de enlaces H	2
Num. Donantes de bonos H	3
Refractividad molar	102,74
TPSA	73,99 Å²

Lipofilia	
Log P _{o/w} (iLOGP)	2,54
Log P _{o/w} (XLOGP3)	3,14
Log P _{o/w} (WLOGP)	1,46
Log P _{o/w} (MLOGP)	1,60
Log P _{o/w} (SILICOS-IT)	3,77
Registro de consenso P _{o/w}	2,50

Captura de pantalla de las tendencias farmacocinéticas de los compuestos 1 y 97

1. Amarisólida (1)



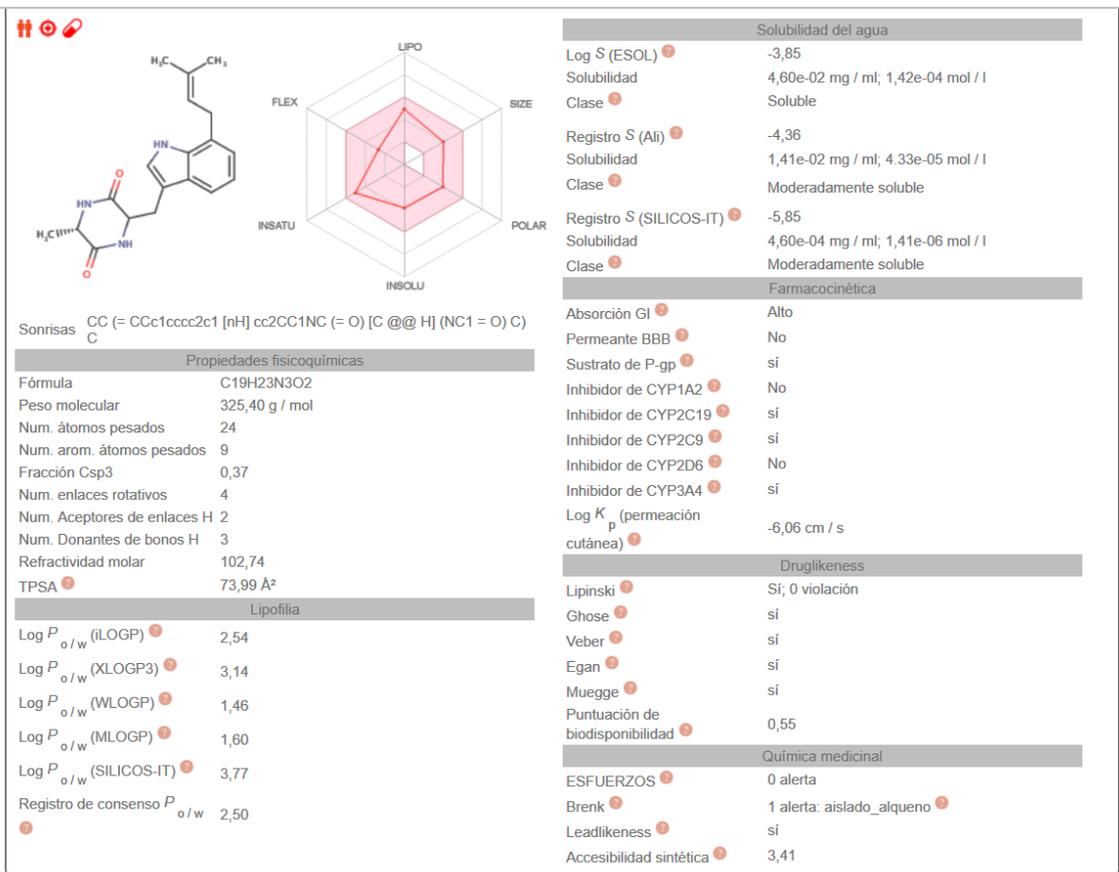
	Bbb	0.0499201
	Buffer_solubility_mg_L	157.284
	Caco2	18.0178
	CYP_2C19_inhibition	No
	CYP_2C9_inhibition	<input type="text" value="No"/>
	CYP_2D6_inhibition	No
	CYP_2D6_substrate	<input type="text" value="Si"/>
	CYP_3A4_inhibition	No
	CYP_3A4_substrate	<input type="text" value="No"/>
	Hia	77.067630
	MDCK	0.0942246
	Pgp_inhibition	Inhibidor
	Plasma_Protein_Binding	87.355102
	Pure_water_solubility_mg_L	30.591
	Skin_Permeability	-4.71556
	SKlogD_value	1.526870

Estado: Terminado

Resultado: [descargar](#)

Nombre	fe_class_pred	CR_class_pred	CLr_pred	CLr_comment
Documento sin título-1	Bajo	Im	1.1119	

2. Terezina D (97)



	Bbb	1.37712
	Buffer_solubility_mg_L	146.342
	Caco2	9.46929
	CYP_2C19_inhibition	No
	CYP_2C9_inhibition	No
	CYP_2D6_inhibition	No
	CYP_2D6_substrate	No
	CYP_3A4_inhibition	No
	CYP_3A4_substrate	Débil
	Hia	88.528639
	MDCK	7.64985
	Pgp_inhibition	No
	Plasma_Protein_Binding	85.300243
	Pure_water_solubility_mg_L	25.4191
	Skin_Permeability	-4.29015
	SKlogD_value	2.678610
	SKlogP_value	2.678610

Estado: Terminado

Resultado: [descargar](#)

Nombre	fe_class_pred	CR_class_pred	CLr_pred	CLr_comment
6-hidroxiluteolina.sdf	Bajo	5	2.1418	

Captura de pantalla de las reacciones metabólicas de los compuestos 1 y 97

1. Amarisólida (1)

Way2Drug PREDICTIVE SERVICES
Understanding Chemical-Biological Interactions

SOMP - Sitio de Predicción del Metabolismo

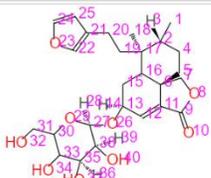
» Casa » Contactos » Conjuntos de Entrenamiento » Productos/Servicios » Interpretación » Ejemplos

Sonrisas

Usar archivos

Marvin JS Editor

C[C@@H]1CC[C@@]23C
Hacer predicción



3A4| 2D6| 2C19| 2C9| 1A2| UGT| Standard|

Save *.sdf
Save *.pdf

CYP2D6		
Atom number	Rang	DeltaP
24	1	0.316
20	2	0.225
26	3	-0.826
17	4	-0.820
8	5	-0.786
29	6	-0.773
40	7	-0.733
34	8	-0.678
37	8	-0.678
32	9	-0.676
10	10	-0.649
11	11	-0.634
21	12	-0.631
6	13	-0.630
23	14	-0.622
38	15	-0.568

Way2Drug PREDICTIVE SERVICES
Understanding Chemical-Biological Interactions

SOMP - Sitio de Predicción del Metabolismo

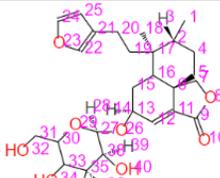
» Casa » Contactos » Conjuntos de Entrenamiento » Productos/Servicios » Interpretación » Ejemplos

Sonrisas

Usar archivos

Marvin JS Editor

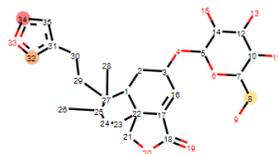
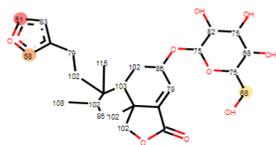
C[C@@H]1CC[C@@]23C
Hacer predicción



3A4| 2D6| 2C19| 2C9| 1A2| UGT| Standard|

Save *.sdf
Save *.pdf

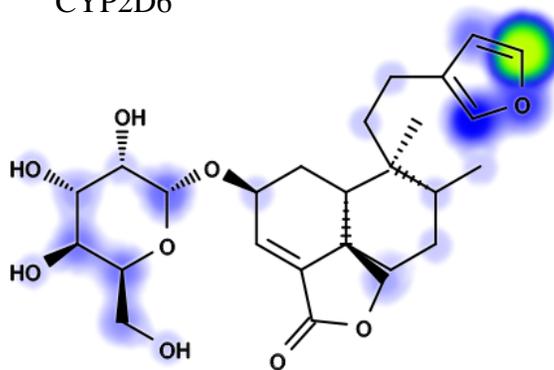
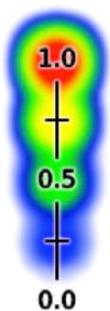
CYP2C9		
Atom number	Rang	DeltaP
31	1	0.551
1	2	0.008
17	3	-0.726
6	4	-0.724
40	5	-0.709
34	6	-0.708
37	6	-0.708
11	7	-0.687
8	8	-0.644
9	9	-0.625
21	10	-0.535
29	10	-0.535
26	11	-0.521
32	12	-0.509
27	13	-0.506
30	14	-0.487



Clasificación 2D6	Átomo	Puntuación 2D6	Energía	2DSASA	Span2end	N+dist	Similitud
1	C.34	51.2	52.9	42.1	0	0	0.7
2	C.32	58.1	52.9	38.0	1	0	0.3
3	C.8	67.7	62.2	29.4	1	0	0.4
4	C.10	68.5	62.2	9.4	1	0	0.3

Clasificación 2C9	Atomo	Puntuación 2C9	Energía	2DSASA	Span2end	COO-Dist	Similitud
1	C.34	51.2	52.9	42.1	0	0	0.7
2	C.32	57.3	52.9	38.0	1	0	0.3
3	C.8	66.9	62.2	29.4	1	0	0.4
4	C.10	67.7	62.2	9.4	1	0	0.3

CYP2D6



Structure	Molecule Name	ID_GLOrYx	Rank	Priority_score	Reaction_type	Parent_ID	Parent_InChI
	Untitled Docun 1						
	Untitled Docun		1	0.372	aromatic hydro 1	InChI=1S/C26H	CC1C
	Untitled Docun		2	0.2976715698	sulfation_alph 1	InChI=1S/C26H	CC1C
	Untitled Docun		3	0.256	aromatic hydro 1	InChI=1S/C26H	CC1C

2. Terezina D

Way2Drug PREDICTIVE SERVICES
Understanding Chemical-Biological Interactions

SOMP - Sitio de Predicción del Metabolismo

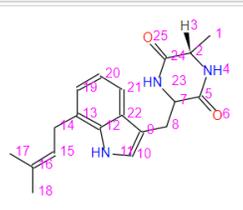
» [Casa](#) | » [Conjuntos de Entrenamiento](#) | » [Productos/Servicios](#) | » [Interpretación](#) | » [Ejemplos](#) | » [Contactos](#)

[Sonrisas](#)

[Usar archivos](#)

[Marvin JS Editor](#)

C[C@@H]1NC(=O)C(CC2
[Hacer predicción](#)



[3A4](#) | [2D6](#) | [2C19](#) | [2C9](#) | [1A2](#) | [UGT](#) | [Standard](#)

[Save *.sdf](#)
[Save *.pdf](#)

CYP2C19		
Atom number	Rang	DeltaP
17	1	0.433
18	1	0.433
14	2	0.304
20	3	0.135
2	4	0.067
3	5	0.041
1	6	0.014
12	7	-0.863
22	8	-0.850
11	9	-0.827
10	10	-0.811
9	11	-0.759
13	12	-0.658
5	13	-0.571
8	14	-0.542
23	15	-0.512

Way2Drug PREDICTIVE SERVICES
Understanding Chemical-Biological Interactions

SOMP - Sitio de Predicción del Metabolismo

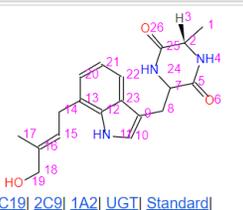
» [Casa](#) | » [Conjuntos de Entrenamiento](#) | » [Productos/Servicios](#) | » [Interpretación](#) | » [Ejemplos](#) | » [Contactos](#)

[Sonrisas](#)

[Usar archivos](#)

[Marvin JS Editor](#)

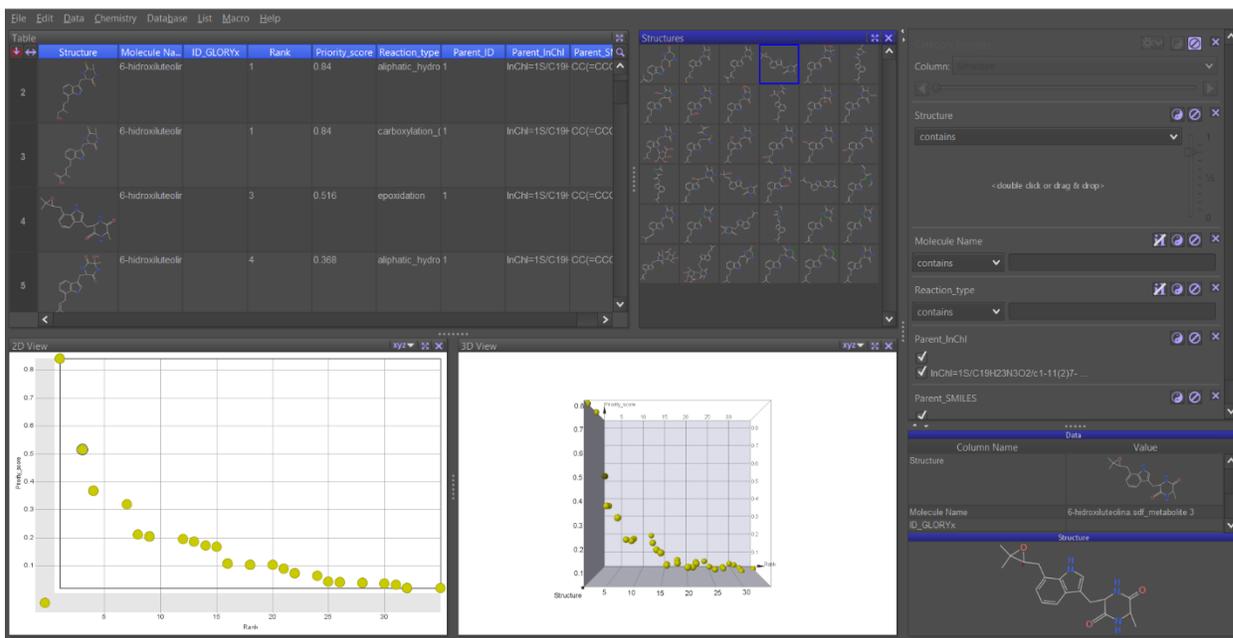
C[C@@H]1NC(=O)C(CC2
[Hacer predicción](#)



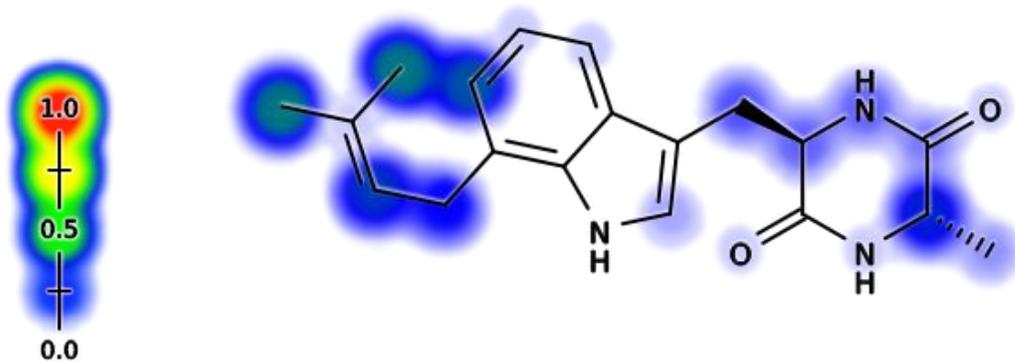
[3A4](#) | [2D6](#) | [2C19](#) | [2C9](#) | [1A2](#) | [UGT](#) | [Standard](#)

[Save *.sdf](#)
[Save *.pdf](#)

CYP2C19		
Atom number	Rang	DeltaP
18	1	0.478
14	2	0.305
17	3	0.273
16	4	0.172
21	5	0.085
2	6	0.025
12	7	-0.824
23	8	-0.813
11	9	-0.789
10	10	-0.772
9	11	-0.721
13	12	-0.624
19	13	-0.594
5	14	-0.545
8	15	-0.518
24	16	-0.494



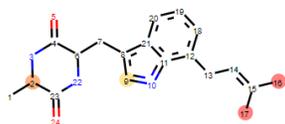
CYP2C19



Sonrisas

3A4 2D6 2C9

1



Clasificación 2C9	Átomo	Puntuación 2C9	Energía	2DSASA	Span2end	COO-Dist	Similitud
1	C.16	64.1	66.4	58.5	0	0	0.7
2	C.2	69.3	63.9	11.4	1	0	0.3
3	C.9	73.1	50.6	29.5	6	0	0.3
4	C.14	76.6	65.6	19.9	2	0	0.3
5	C.10	76.7	50.0	24.0	0	0	0.4

Captura de pantalla de bioactividad de los compuestos 1 y 97

1. Amarisólida (1)

Elegir archivo amarisolida.mol

Get prediction

[Molinspiration bioactivity score](#) v2018.03

GPCR ligand 0.49
 Ion channel modulator 0.36
 Kinase inhibitor -0.08
 Nuclear receptor ligand 0.48
 Protease inhibitor 0.28
 Enzyme inhibitor 0.71

0,639	0,007	Anneoplastic (lung cancer)
0,673	0,027	Anaphylatoxin receptor antagonist
0,648	0,006	Antibacterial
0,651	0,018	Glycerol-ether monooxygenase inhibitor
0,641	0,029	Phosphatase inhibitor
0,593	0,010	Mycotoxin-S-conjugate amidase inhibitor
0,596	0,014	Aspartyltransferase inhibitor
0,589	0,011	Proliferative diseases treatment
0,577	0,005	Dementia treatment
0,579	0,018	Beta glucuronidase inhibitor
0,567	0,007	Heat shock protein 27 antagonist
0,560	0,007	Myc inhibitor
0,570	0,030	Apoptosis agonist

Objetivo	Nombre común	ID de Uniprot	ID DE ChEMBL	Clase objetivo	Probabilidad*	Activos conocidos (3D / 2D)
Cotransportador de sodio / glucosa 2	SLC5A2	P31639	CHEMBL3884	Transportador electroquímico		602 / 0
Cotransportador de sodio / glucosa 1	SLC5A1	P13866	CHEMBL4979	Transportador electroquímico		175 / 0
Proteína de choque térmico HSP 90-alfa	HSP90AA1	P07900	CHEMBL3880	Otra proteína citosólica		27 de / 3
Receptor de adenosina A3	ADORA3	P0DMS8	CHEMBL256	Receptor acoplado a proteínas de la familia AG		289 / 0
Tirosina-proteína quinasa SYK	SYK	P43405	CHEMBL2599	Quinasa		70 / 0

2. Terezina D (97)

Elegir archivo terezina D.mol

Get prediction

[Molinspiration bioactivity score](#) v2018.03

GPCR ligand 0.44
 Ion channel modulator 0.24
 Kinase inhibitor 0.21
 Nuclear receptor ligand -0.02
 Protease inhibitor 0.40
 Enzyme inhibitor 0.37

All Pa>Pi Pa>0,3 Pa>0,7

Pa	Pi	Activity
0,788	0,033	CDP-glycerol glycerophosphotransferase inhibitor
0,496	0,018	Muscular dystrophy treatment
0,473	0,001	Beta-cyclopiazionate dehydrogenase inhibitor
0,511	0,065	Protein-disulfide reductase (glutathione) inhibitor
0,448	0,004	Somatostatin 2 agonist
0,454	0,037	Pancreatic elastase inhibitor
0,424	0,009	Cancer associated disorders treatment
0,481	0,070	General pump inhibitor
0,502	0,105	Antiischemic, cerebral
0,415	0,034	Myc inhibitor

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Ghrelin receptor	GHSR	Q92847	CHEMBL4616	Family A G protein-coupled receptor		34 / 149
Neurokinin 1 receptor	TACR1	P25103	CHEMBL249	Family A G protein-coupled receptor		168 / 350
Mu opioid receptor	OPRM1	P35372	CHEMBL233	Family A G protein-coupled receptor		76 / 743
Delta opioid receptor	OPRD1	P41143	CHEMBL236	Family A G protein-coupled receptor		86 / 570
Neurokinin 3 receptor	TACR3	P29371	CHEMBL4429	Family A G protein-coupled receptor		151 / 46

Captura de pantalla de los descriptores moleculares de los compuestos 104-106

1. Compuesto (104)

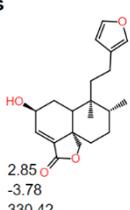
OSIRIS Property Explorer

Predicted toxicity risks

- mutagenic
- tumorigenic
- irritant
- reproductive effective

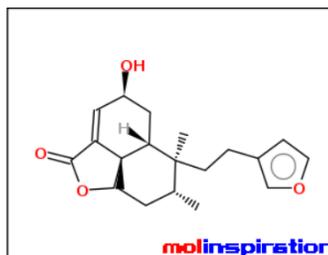
Predicted properties

cLogP	2.85
Solubility	-3.78
Molweight	330.42
TPSA	59.67
Druglikeness	0.58
H bond acceptor	4
H bond donor	1
Nb stereocenters	5
Nb rotatable bonds	3
Drug-Score	0.73



molinspiration

miSMILES: C[C@@H]3CC[C@@]12COC(=O)C1=C[C@@H](O)C[C@@H]2[C@@]3(C)CCc4ccoc4
Dtxsid40904912



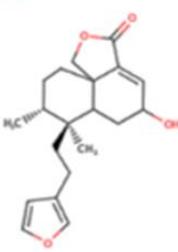
[Molinspiration_property_engine](#) v2018.10

miLogP	2.31
TPSA	59.67
natoms	24
MW	330.42
nON	4
nOHNH	1
nviolations	0
nrotb	3
volume	313.91

[Get_data_as_text](#) (for copy / paste).

[Get_3D_geometry](#) BETA

Molecule 1




SMILES: OC1C=C2C(=O)OCC32C(C1)[C@@](C)(C)C(Cc4ccoc4)(C3)C

Physicochemical Properties	
Formula	C20H26O4
Molecular weight	330.42 g/mol
Num. heavy atoms	24
Num. arom. heavy atoms	5
Fraction Csp3	0.65
Num. rotatable bonds	3
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	1
Molar Refractivity	90.89
TPSA	59.67 Å²
Lipophilicity	
Log P_{ow} (iLOGP)	2.92
Log P_{ow} (XLOGP3)	3.71
Log P_{ow} (WLOGP)	3.50
Log P_{ow} (MLOGP)	2.67
Log P_{ow} (SILICOS-IT)	3.70
Consensus Log P_{ow}	3.30

Water Solubility	
Log S (ESOL)	-4.18
Solubility	2.17e-02 mg/ml ; 6.58e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log S (Ali)	-4.65
Solubility	7.33e-03 mg/ml ; 2.22e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log S (SILICOS-IT)	-4.59
Solubility	8.57e-03 mg/ml ; 2.59e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	Yes
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-5.68 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	No; 1 violation: XLOGP3>3.5
Synthetic accessibility	5.46

2. Compuesto (105)

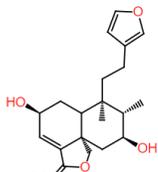
OSIRIS Property Explorer

Predicted toxicity risks

- mutagenic
- tumorigenic
- irritant
- reproductive effective

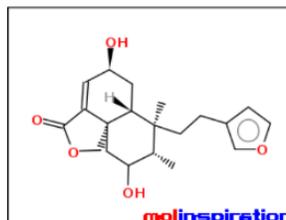
Predicted properties

cLogP	1.99
Solubility	-3.38
Molweight	346.42
TPSA	79.90
Druglikeness	1.39
H bond acceptor	5
H bond donor	2
Nb stereocenters	6
Nb rotatable bonds	3
Drug-Score	0.82



molinspiration

miSMILES: C[C@@H]3C(O)C[C@@]12COC(=O)C1=C[C@@H](O)C[C@@H]2[C@@]3(C)CCc4ccoc4

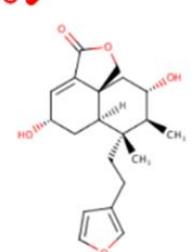


Molinspiration_property_engine v2018.10

miLogP	1.39
IPSA	79.90
natoms	25
MW	346.42
nON	5
nOHNH	2
nviolations	0
nrotb	3
volume	321.96

[Get data as text](#) (for copy / paste).

Molecule 1
⊞



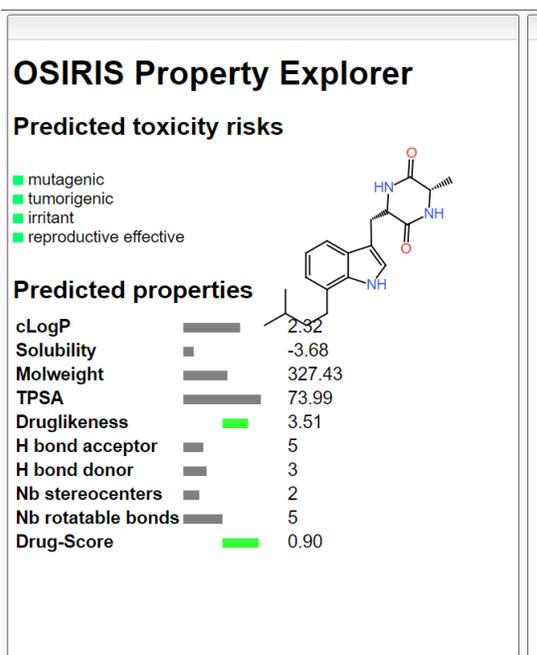
SMILES: O[C@@H]1C=C2C(=O)OC[C@@]32[C@@H](C1)[C@@](C)(CCc1ccoc1)[C@@H]([C@H](C3)O)C



Water Solubility	
Log S (ESOL)	-3.54
Solubility	9.89e-02 mg/ml ; 2.88e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (Ali)	-3.88
Solubility	4.62e-02 mg/ml ; 1.33e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (SILICOS-IT)	-3.77
Solubility	5.87e-02 mg/ml ; 1.69e-04 mol/l
Class	Soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	Yes
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K _p (skin permeation)	-6.60 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	5.65

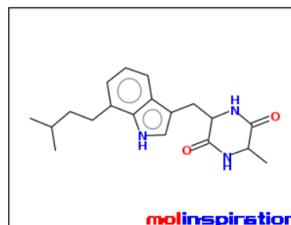
Physicochemical Properties	
Formula	C ₂₀ H ₂₆ O ₅
Molecular weight	346.42 g/mol
Num. heavy atoms	25
Num. arom. heavy atoms	5
Fraction Csp ³	0.65
Num. rotatable bonds	3
Num. H-bond acceptors	5
Num. H-bond donors	2
Molar Refractivity	92.05
TPSA	79.90 Å ²
Lipophilicity	
Log P _{ow} (iLOGP)	2.56
Log P _{ow} (XLOGP3)	2.55
Log P _{ow} (WLOGP)	2.47
Log P _{ow} (MLOGP)	1.84
Log P _{ow} (SILICOS-IT)	2.80
Consensus Log P _{ow}	2.45

3. Compuesto (106)



molinspiration

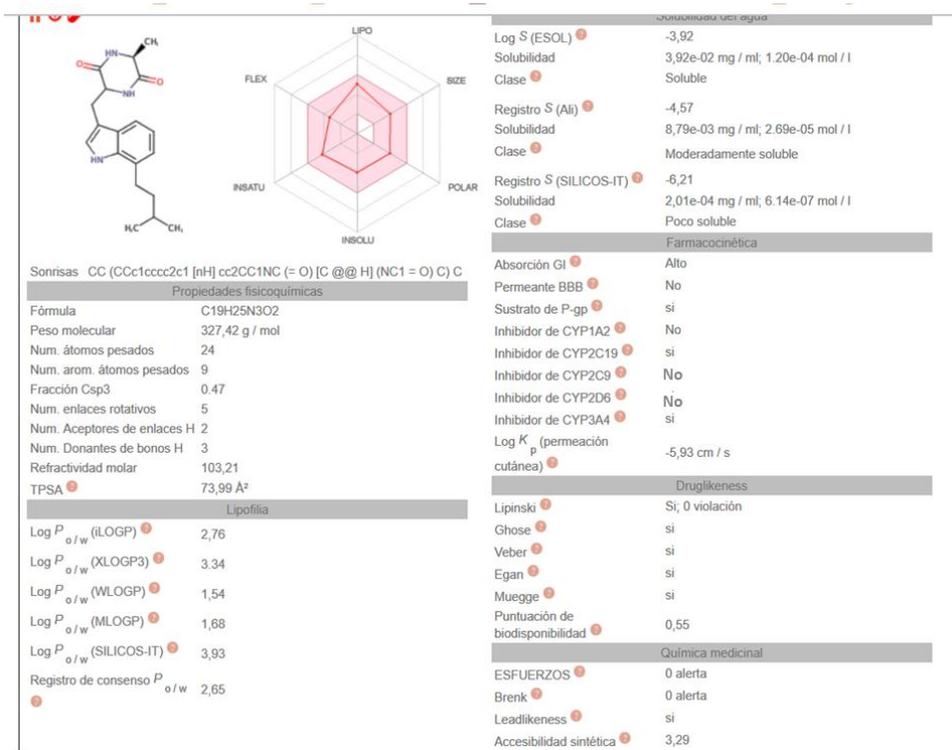
miSMILES: CC(C)CCc2cccc3c(CC1NC(=O)C(C)NC1=O)c[nH]c23



[Molinspiration_property_engine](#) v2018.10

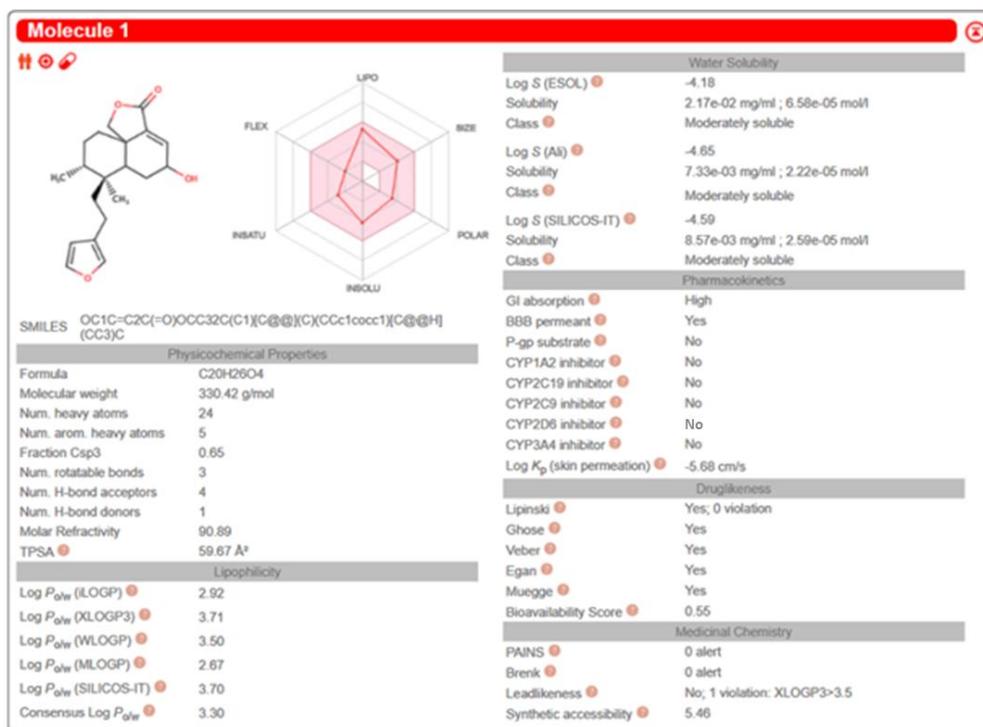
miLogP	2.69
TPSA	73.99
natoms	24
MW	327.43
nON	5
nOHNH	3
nviolations	0
nrotb	5
volume	315.52

[Get data as text](#) (for copy / paste).



Captura de pantalla de las tendencias farmacocinéticas de los compuestos 104-106

1. Compuesto (104)



Resultados

Clasificación de perfiles --- predichos ADMET

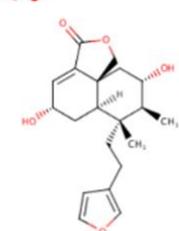
Modelo	Resultado	Probabilidad
Absorción		
Barrera Blood-Brain	BBB+	0.9399
Absorción intestinal humana	HIA+	0.9949
Permeabilidad a Caco-2	Caco2+	0.7092
Sustrato de glicoproteína P	Sustrato	0.7417
Inhibidor de la glicoproteína P	No inhibidor	0.5792
Transportador de catión orgánico renal	No inhibidor	0.6236
	No inhibidor	0.7178
Distribución		
Localización subcelular	Mitocondrias	0.8150
Metabolismo		
CYP450 2C9 Sustrato	No-sustrato	0.8076
CYP450 2D6 Sustrato	No-sustrato	0.9009
CYP450 3A4 Sustrato	Sustrato	0.7186
Inhibidor CYP450 1A2	No inhibidor	0.7556
Inhibidor CYP450 2C9	No inhibidor	0.8872
Inhibidor CYP450 2D6	No inhibidor	0.8616
Inhibidor CYP450 2C19	No inhibidor	0.8776
Inhibidor CYP450 3A4	Inhibidor	0.6707
Promiscuidad inhibidora del CYP	Promiscuidad inhibidora del CYP baja	0.8432

⊕	Hia	95.680621
⊕	MDCK	203.174
⊕	Pgp_inhibition	Inhibidor
⊕	Plasma_Protein_Binding	98.000
⊕	Pure_water_solubility_mg_L	4.73816
⊕	Skin_Permability	-2.10274
⊕	SKLogD_value	3.908170

Nombre	fe_class_pred	CR_class_pred	CLr_pred	CLr_comment
aglicona de amarisolida2.mol	Bajo	R	0.018	*

2. Compuesto (105)

Molecule 1



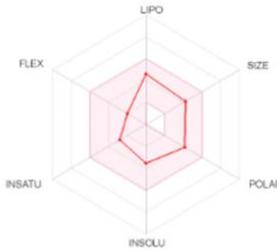
SMILES: O[C@@H]1C=C2C(=O)OC[C@]32[C@H](C1)[C@@](C)(CCc1ccoc1)[C@@H]([C@H](C3)O)C

Physicochemical Properties

Formula	C20H26O5
Molecular weight	346.42 g/mol
Num. heavy atoms	25
Num. arom. heavy atoms	5
Fraction Csp3	0.65
Num. rotatable bonds	3
Num. H-bond acceptors	5
Num. H-bond donors	2
Molar Refractivity	92.05
TPSA	79.90 Å²

Lipophilicity

Log P _{ow} (ILOGP)	2.56
Log P _{ow} (XLOGP3)	2.55
Log P _{ow} (WLOGP)	2.47
Log P _{ow} (MLOGP)	1.84
Log P _{ow} (SILICOS-IT)	2.80
Consensus Log P _{ow}	2.45



Water Solubility

Log S (ESOL)	-3.54
Solubility	9.89e-02 mg/ml ; 2.86e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (Ali)	-3.88
Solubility	4.62e-02 mg/ml ; 1.33e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (SILICOS-IT)	-3.77
Solubility	5.87e-02 mg/ml ; 1.69e-04 mol/l
Class	Soluble

Pharmacokinetics

GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	Yes
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K _p (skin permeation)	-6.60 cm/s

Druglikeness

Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

Medicinal Chemistry

PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	5.65

Resultados

Clasificación de perfiles --- predichos ADMET

Modelo	Resultado	Probabilidad
Absorción		
Barrera Blood-Brain	BBB+	0.8979
Absorción intestinal humana	HIA+	0.9839
Permeabilidad a Caco-2	Caco2+	0.6855
Sustrato de glicoproteína P	Sustrato	0.8192
Inhibidor de la glicoproteína P	No inhibidor	0.8370
Transportador de catión orgánico renal	No inhibidor	0.6553
	No inhibidor	0.7117
Distribución		
Localización subcelular	Mitocondrias	0.8431
Metabolismo		
CYP450 2C9 Sustrato	No-sustrato	0.7992
CYP450 2D6 Sustrato	No-sustrato	0.9003
CYP450 3A4 Sustrato	Sustrato	0.7558
Inhibidor CYP450 1A2	No inhibidor	0.7442
Inhibidor CYP450 2C9	No inhibidor	0.9115
Inhibidor CYP450 2D6	No inhibidor	0.8621
Inhibidor CYP450 2C19	No inhibidor	0.8786
Inhibidor CYP450 3A4	Inhibidor	0.6539
Promiscuidad inhibidora del CYP	Promiscuidad inhibidora del CYP baja	0.7419

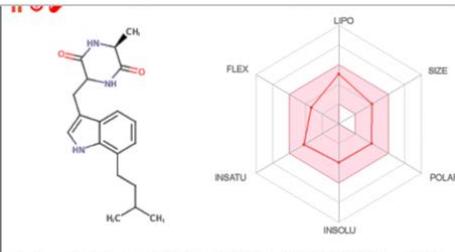
🟢	CYP_3A4_substrate	Sustrato
🟢	Hia	92.992589
🟢	MDCK	58.8049
🟢	Pgp_inhibition	No
🟢	Plasma_Protein_Binding	99.827161
🟢	Pure_water_solubility_mg_L	134.244
🟢	Skin_Permeability	-3.71108

Estado: ✔Terminado

Resultado: [descargar](#)

Nombre	fe_class_pred	CR_class_pred	CLr_pred	CLr_comment
aglicona de amarisolida2.sdf	Bajo	R	0,086	*

3. Compuesto (106)



Sonrisas CC(CCC1CCCC2C1[NH]C(=O)C2)C(=O)[C@@H](NC1=O)C

Propiedades fisicoquímicas

Fórmula C₁₉H₂₅N₃O₂

Peso molecular 327,42 g / mol

Num. átomos pesados 24

Num. arom. átomos pesados 9

Fracción Csp³ 0,47

Num. enlaces rotativos 5

Num. Aceptores de enlaces H 2

Num. Donantes de bonos H 3

Refractividad molar 103,21

TPSA 73,99 Å²

Lipofilia

Log P_{o/w} (ILOGP) 2,76

Log P_{o/w} (XLOGP3) 3,34

Log P_{o/w} (WLOGP) 1,54

Log P_{o/w} (MLOGP) 1,68

Log P_{o/w} (SILICOS-IT) 3,93

Registro de consenso P_{o/w} 2,65

Solubilidad del agua

Log S (ESOL) -3,92

Solubilidad 3,92e-02 mg / ml; 1,20e-04 mol / l

Clase Soluble

Registro S (Ali) -4,57

Solubilidad 8,79e-03 mg / ml; 2,69e-05 mol / l

Clase Moderadamente soluble

Registro S (SILICOS-IT) -6,21

Solubilidad 2,01e-04 mg / ml; 6,14e-07 mol / l

Clase Poco soluble

Farmacocinética

Absorción GI Alto

Permeante BBB No

Sustrato de P-gp sí

Inhibidor de CYP1A2 No

Inhibidor de CYP2C19 sí

Inhibidor de CYP2C9 No

Inhibidor de CYP2D6 No

Inhibidor de CYP3A4 sí

Log K_p (permeación cutánea) -5,93 cm / s

Druglikeness

Lipinski Sí; 0 violación

Ghose sí

Veber sí

Egan sí

Muegge sí

Puntuación de biodisponibilidad 0,55

Química medicinal

ESFUERZOS 0 alerta

Brenk 0 alerta

Leadlikeness sí

Accesibilidad sintética 3,29

Resultados		
Clasificación de perfiles --- predichos ADMET		
Modelo	Resultado	Probabilidad
Absorción		
Barrera Blood-Brain	BBB+	0.7241
Absorción intestinal humana	HIA+	0.9887
Permeabilidad a Caco-2	Caco2-	0.6546
Sustrato de glicoproteína P	Sustrato	0.7636
Inhibidor de la glicoproteína P	Inhibidor	0.5886
Transportador de catión orgánico renal	No inhibidor	0.7963
Transportador de catión orgánico renal	No inhibidor	0.8238
Distribución		
Localización subcelular	Mitocondrias	0.6171
Metabolismo		
CYP450 2C9 Sustrato	No-sustrato	0.7893
CYP450 2D6 Sustrato	No-sustrato	0.7772
CYP450 3A4 Sustrato	Sustrato	0.6585
Inhibidor CYP450 1A2	No inhibidor	0.6048
Inhibidor CYP450 2C9	No inhibidor	0.6880
Inhibidor CYP450 2D6	No inhibidor	0.8993
Inhibidor CYP450 2C19	Inhibidor	0.5309
Inhibidor CYP450 3A4	No inhibidor	0.6469
Promiscuidad inhibidora del CYP	Alta promiscuidad inhibitorina del CYP	0.5292
Excreción		
Toxicidad		

Pre ADMET Casa acerca de Semejanza de drogas Adme Toxicidad Comunidad

<input type="checkbox"/>	Bbb	1.66008
<input type="checkbox"/>	Buffer_solubility_mg_L	365.908
<input type="checkbox"/>	Caco2	9.5471
<input type="checkbox"/>	CYP_2C19_inhibition	No
<input type="checkbox"/>	CYP_2C9_inhibition	No
<input type="checkbox"/>	CYP_2D6_inhibition	No
<input type="checkbox"/>	CYP_2D6_substrate	No
<input type="checkbox"/>	CYP_3A4_inhibition	No
<input type="checkbox"/>	CYP_3A4_substrate	Sustrato
<input type="checkbox"/>	Hia	87.826376
<input type="checkbox"/>	MDCK	9.46445
<input type="checkbox"/>	Pgp_inhibition	No
<input type="checkbox"/>	Plasma_Protein_Binding	86.083619
<input type="checkbox"/>	Pure_water_solubility_mg_L	10.5226
<input type="checkbox"/>	Skin_Permeability	-4.29271
<input type="checkbox"/>	SKlogD_value	2.751830
<input type="checkbox"/>	SKlogP_value	2.751830

Estado: Terminado

Resultado: [descargar](#)

Nombre	fe_class_pred	CR_class_pred	CLr_pred	CLr_comment
106.cdx	Bajo	S	2.1984	

Captura de pantalla de bioactividad de los compuestos 104-106

1. Compuesto (104)

Elegir archivo | aglicona de amarisolida2.mol

Get prediction

All
 Pa>Pi
 Pa>0,3
 Pa>0,7

Pa	Pi	Activity
0.811	0.010	Antineoplastic
0.749	0.003	Caspase 8 stimulant
0.695	0.006	Antineoplastic (lung cancer)
0.674	0.019	Phosphatase inhibitor
0.631	0.015	Caspase 3 stimulant
0.566	0.007	Heat shock protein 27 antagonist
0.570	0.013	Antineoplastic (breast cancer)
0.549	0.012	Chemopreventive
0.537	0.034	Apoptosis agonist
0.505	0.006	Antineoplastic (melanoma)

Molinspiration bioactivity score v2018.03

GPCR ligand	0.62
Ion channel modulator	0.48
Kinase inhibitor	-0.19
Nuclear receptor ligand	0.88
Protease inhibitor	0.38
Enzyme inhibitor	0.74

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Kappa Opioid receptor (<i>by homology</i>)	OPRK1	P41145	CHEMBL237	Family A G protein-coupled receptor		311 / 131
Estrogen receptor beta	ESR2	Q92731	CHEMBL242	Nuclear receptor		53 / 0
Testis-specific androgen-binding protein	SHBG	P04278	CHEMBL3305	Secreted protein		51 / 0
Estrogen receptor alpha	ESR1	P03372	CHEMBL206	Nuclear receptor		44 / 0
UDP-glucuronosyltransferase 2B7	UGT2B7	P16662	CHEMBL4370	Enzyme		6 / 0

2. Compuesto (105)

Elegir archivo | Aglicona amarisol... droxiledo 105.mol

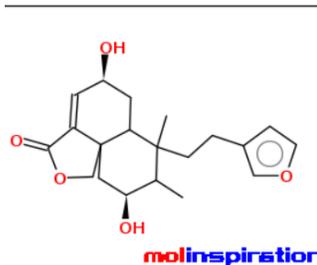
Get prediction

All Pa-Pi Pa-0.3 Pa-0.7 ok

Pa	Pi	Activity
0.856	0.006	Antineoplastic
0.757	0.005	Antineoplastic (breast cancer)
0.728	0.003	Caspase 8 stimulant
0.710	0.005	Antineoplastic (lung cancer)
0.639	0.023	Phosphatase inhibitor
0.568	0.019	Caspase 3 stimulant
0.545	0.009	Heat shock protein 27 antagonist
0.548	0.024	Antifungal
0.593	0.089	Antieczematia
0.570	0.082	CYP2H substrate

molinspiration

iMILES: CC3[C@@H](O)CC12COC(=O)C1=C[C@@H](O)CC2C3(C)CCc4ccoc4



[Molinspiration bioactivity score](#) v2018.03

GPCR ligand	0.56
Ion channel modulator	0.36
Kinase inhibitor	-0.22
Nuclear receptor ligand	0.81
Protease inhibitor	0.45
Enzyme inhibitor	0.71

[Get data as text](#) (for copy / paste).

[Get 3D geometry](#) BETA

was request 8 out of 1000 available this month for your site 177 240 152 246

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Kappa Opioid receptor	OPRK1	P41145	CHEMBL237	Family A G protein-coupled receptor	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	203 / 168 ↓
Cyclooxygenase-1	PTGS1	P23219	CHEMBL221	Oxidoreductase	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	6 / 0 ↓
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	P07900	CHEMBL3880	Other cytosolic protein	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	6 / 2 ↓
Corticosteroid binding globulin	SERPINA6	P08185	CHEMBL2421	Secreted protein	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	10 / 0 ↓
Tyrosine-protein kinase JAK1	JAK1	P23458	CHEMBL2835	Kinase	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	55 / 0 ↓

3. Compuesto (106)

molinspiration

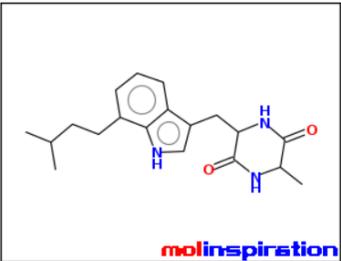
miSMILES: CC(C)CCc2cccc3c(CC1NC(=O)C(C)NC1=O)c[nH]c23

Molinspiration bioactivity_score v2018.03

GPCR ligand	0.44
Ion channel modulator	0.21
Kinase inhibitor	0.11
Nuclear receptor ligand	-0.17
Protease inhibitor	0.50
Enzyme inhibitor	0.21

[Get data as text](#) (for copy / paste).

[Get_3D_geometry](#) BETA



Pa	Pi	Activity
0.692	0.058	Testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) inhibitor
0.620	0.039	Pseudolysin inhibitor
0.596	0.026	General pump inhibitor
0.528	0.014	Pancreatic elastase inhibitor
0.455	0.003	Somatostatin 2 agonist
0.537	0.087	Antischematic, cerebral
0.455	0.005	Cancer associated disorders treatment
0.455	0.009	Antibiotic Glycopeptide-like
0.436	0.002	Beta-cyclopiasonate dehydrogenase inhibitor

Objetivo	Nombre común	ID de Uniprot	ID DE ChEMBL	Clase objetivo	Probabilidad*	Activos conocidos (3D / 2D)
Receptor opioide mu	OPRM1	P35372	CHEMBL233	Receptor acoplado a proteínas de la familia AG		93 / 1186
Receptor de grelina	GHSR	Q92847	CHEMBL4616	Receptor acoplado a proteínas de la familia AG		41 / 151
Receptor de neuroquinina 1	TACR1	P25103	CHEMBL249	Receptor acoplado a proteínas de la familia AG		203 / 458
Receptor de neuroquinina 3	TACR3	P29371	CHEMBL4429	Receptor acoplado a proteínas de la familia AG		171 / 83
Receptor opioide delta	OPRD1	P41143	CHEMBL236	Receptor acoplado a proteínas de la familia AG		98 / 999

Article

Flavonoids and Terpenoids with PTP-1B Inhibitory Properties from the Infusion of *Salvia amarissima* Ortega

Eric Salinas-Arellano ¹, Araceli Pérez-Vásquez ¹, Isabel Rivero-Cruz ¹, Rafael Torres-Colin ², Martín González-Andrade ³, Manuel Rangel-Grimaldo ¹ and Rachel Mata ^{1,*}

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; ersalinass@hotmail.com (E.S.-A.); perezva@unam.mx (A.P.-V.); riveroic@unam.mx (I.R.-C.); manuel_erg_p9@hotmail.com (M.R.-G.)

² Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; rafael.torres@ib.unam.mx

³ Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; martin@bq.unam.mx

* Correspondence: rachel@unam.mx; Tel.: +52-55-56225289

Academic Editor: Raffaele Capasso

Received: 17 June 2020; Accepted: 30 July 2020; Published: 1 August 2020



Abstract: An infusion prepared from the aerial parts of *Salvia amarissima* Ortega inhibited the enzyme protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) ($IC_{50} \sim 88$ and $33 \mu\text{g/mL}$, respectively). Phytochemical analysis of the infusion yielded amarisolide (1), 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone (2), 6-hydroxyluteolin (3), rutin (4), rosmarinic acid (5), isoquercitrin (6), pedalitin (7) and a new *neo*-clerodane type diterpenoid glucoside, named amarisolide G (8a,b). Compound 8a,b is a new natural product, and 2–6 are reported for the first time for the species. All compounds were tested for their inhibitory activity against PTP-1B; their IC_{50} values ranged from 62.0 to $514.2 \mu\text{M}$. The activity was compared to that of ursolic acid ($IC_{50} = 29.14 \mu\text{M}$). The most active compound was pedalitin (7). Docking analysis predicted that compound 7 has higher affinity for the allosteric site of the enzyme. Gas chromatography coupled to mass spectrometry analyses of the essential oils prepared from dried and fresh materials revealed that germacrene D (15) and β -selinene (16), followed by β -caryophyllene (13) and spathulenol (17) were their major components. An ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry method was developed and validated to quantify amarisolide (1) in the ethyl acetate soluble fraction of the infusion of *S. amarissima*.

Keywords: *Salvia amarissima*; PTP-1B activity; amarisolide G; diabetes

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia due to insulin resistance, or the relative absence of the hormone. The prevalence of the disease is continuously increasing, with approximately 463 million people living with diabetes nowadays. Mexico is one of the countries more affected by type 2 diabetes mellitus, with more than 12 million cases. The population sector more affected is the indigenous people owing to variations in its traditional way of life and the effects of industrial developments [1]. Mexican population employs more than 300 plant species to treat the symptoms of diabetes; in some cases, the patients combine allopathic therapies with the botanical remedies [2]. These plants are an essential part of the country's alternative medical care, and the best testimony of their efficacy is their persistence in Mexican markets and other places for crude or fresh drug selling. Therefore, it is crucial to analyze these plants to establish their composition,

security, efficacy, and to develop a suitable methodology for quality control of the crude drug following good practice guidelines.

Quality control of herbal drugs is the base for their efficacy and safety. Quality control of herbal drugs aims to define their identity, purity and content of active principles or marker compounds. The chemical composition of plants, and hence of their therapeutic preparations, is variable, so standardization is necessary to guarantee comparable therapeutic effects. To prove the constant composition of herbal preparations, there are appropriate standard analytical methods to establish relevant criteria for uniformity. Standard analytical techniques include, among others, high-performance liquid chromatography. For many years, the World Health Organization (WHO) has encouraged all its country members to elaborate pharmacopeic monographs providing comprehensive scientific information on the quality of their most commonly used medicinal plants. Following WHO guidelines, Mexico has developed the Mexican Herbal Pharmacopeia, which contained monographs with definitions, analytical techniques for identity and composition, as well as storage regulations of the most widely used Mexican Herbal drugs [2,3].

Like other pharmaceutical products, herbal drugs should fulfill the basic requirements of being efficacious and safe. To establish herbal drugs' efficacy and safety is necessary to perform preclinical and clinical assays, including those of the healer or medical doctor in rural communities who apply locally produced herbal preparations. When assessing the efficacy of the plants, it is essential to study both the traditional preparations and their components; this is because sometimes the efficacy is attained with the combinations of compounds in the preparations, which may be acting through synergy, network pharmacology or by targeting several nonrelated proteins involved in the pathology of a disease. Altogether, these studies can lead to the development of standardized phytomedicines of good quality and discover good drug candidates or molecules useful for lead optimization or even fragment-based drug discovery [3].

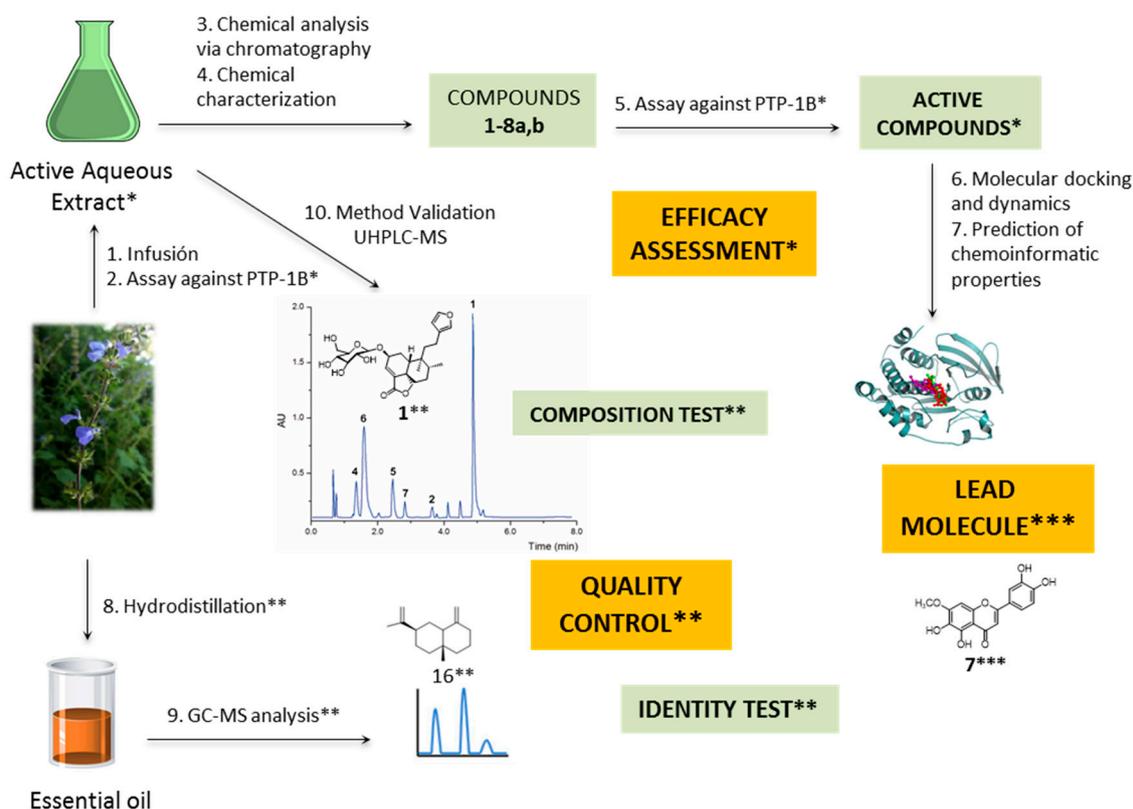
Among the species highly valued in Mexico for treating diabetes is *Salvia amarissima* Ortega (syn. *Salvia circinata* Cav.) belonging to the mint family. It is a perennial aromatic shrub native to Mexico, listed as medicinal in the catalog of plants from the Royal Botanical Expeditions to New Spain. Like many other New World *Salvia* species, *S. amarissima* is melittophilous (bee-pollinated). A tea brewed from dried aerial parts of the plant is useful in Mexican folk medicine for treating diabetes, ulcers and helminthiases [4,5]. The species is commonly regarded as "insulina" (insulin), referring to its efficacy to improve the diabetic condition [5]. Previous phytochemical studies allowed the isolation of some *neo*-clerodane diterpenoids, including amarisolide (1) [6], a few *seco*-clerodane diterpenoids [6–10] and some flavonoids [6,8]. The traditional preparation of the plant collected in Puebla, Mexico, as well as amarisolide (1), and some of the flavonoids showed inhibitory activity against mammal α -glucosidases *in vitro* and *in vivo*. The preparation and compounds were hypoglycemic and reduced the postprandial peak significantly during an oral sucrose tolerance test in healthy mice [8]. Some of the *seco*-clerodane diterpenoids were cytotoxic against a few human cancer cell lines, had modulatory activity in a breast cancer cell line resistant to vinblastine and exhibited antiprotozoal action [7,9–11]. Furthermore, the traditional preparation lack toxicity when tested according to the Lorke criteria. [8]. More recently, the antinociceptive properties of an aqueous extract of the plant, 1 and 7 were demonstrated [12].

Based on the above considerations, this investigation aimed: (i) to determine the effect of the traditional preparation (infusion) of the plant collected in Oaxaca and their components on the activity of the protein tyrosine phosphatase (PTP-1B) in order to assess a new molecular target, and get a better insight in the *in vivo* hypoglycemic effect previously demonstrated [8]. This target was chosen, considering that this enzyme acts as a negative regulator of insulin and leptin dependent signal cascades holding therapeutic utility in type 2 diabetes mellitus and obesity [13]. (ii) To analyze the chemical composition of the essential oil. (iii) To set up an appropriate procedure using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) to quantify one active or marker compound of the plant's infusion. The chemical composition of the plant's essential oil and the UHPLC procedure will allow developing

a pharmacopeic monograph of *S. amarissima*, as they represent valuable identity and composition tests, respectively.

2. Results and Discussion

Scheme 1 summarizes the whole work.



Scheme 1. Workflow diagram of this study. * Efficacy studies. ** Quality control analyses. *** Discovery of a lead molecule.

2.1. Chemical Constituents of the Aqueous Extract

An aqueous extract (AE) from *S. amarissima* inhibited the PTP-1B activity significantly, with an IC_{50} value of $88.6 \pm 5.4 \mu\text{g/mL}$. Workup of AE by solvent partitioning and repeated chromatography afforded eight compounds (Figure 1), namely amarisolide (1), 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone (2), 6-hydroxyluteolin (3), rutin (4), rosmarinic acid (5), isoquercitrin (6), pedalitin (7) and a *neo*-clerodane type diterpenoid glycoside, named amarisolide G (8a,b). Compound 8a,b, is a new natural product characterized by conventional spectroscopic and spectrometric techniques. The known compounds were identified by comparing their spectroscopic data with those previously described (Figures S1–S11, Supplementary Material) [8,14,15]. Compounds 2–6 are reported for the first time for this species. In addition, thin layer chromatographic (TLC) analysis revealed that these compounds were present in the AE prepared from the fresh material.

Product 8a,b was obtained as a white solid optically active. DART-HRMS (Direct Analysis In Real Time-High Resolution Mass Spectrometry) established its molecular formula as $C_{26}H_{36}O_{11}$. The IR spectrum included bands for hydroxyl (3365 cm^{-1}) and α,β -unsaturated- γ -lactone (1749 cm^{-1}) functionalities (Figure S12, Supplementary Material) [8]. The NMR spectra of 8a,b (Table 1; Figures S13–S18, Supplementary Material) were closely similar to those of amarisolide D (8c), a *neo*-clerodane type of diterpenoid with an α,β -unsaturated- γ -lactone at C-4/C-5, a five-membered keto- γ -lactol methyl ether and a β -D-glucopyranosyloxy moiety at C-2 [8]. Thus, in compound 8a,b the signals for the five-membered keto- γ -lactol methyl ether were replaced by those of a keto- γ -lactol moiety.

Accordingly, the NMR spectra showed signals at δ_{H} 5.90, 6.05 (brs, H-14)/ δ_{C} 99.4, 99.9 (C-14), δ_{H} 5.96 (brs, H-16)/ δ_{C} 116.1 (C-16), δ_{C} 171.4 (C-13) and δ_{C} 171.9 (C-15) (Table 1). Since the resonances for H-14 appeared as two separate signals, the intensity of each corresponding to one-half proton, compound **8a,b** is a 1:1 mixture of C-14 epimers. The doubling of C-14 signal in the ^{13}C -NMR spectra provided further evidenced (Table 1). The ^{13}C -NMR chemical shifts (Table 1) of C-11-C-16 and the key HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) correlations of H-12 and H-14 established the point of attachment of the ethyl fragment (C-11-C-12) to the keto- γ -lactone ring. The most relevant HMBC correlations were H-12a (δ_{H} 1.72) with C-14 (δ_{C} 99.4 and 99.9); H-12b (δ_{H} 1.56) with C-14 (δ_{C} 99.4 and 99.9); and H-14 (δ_{H} 5.90 and 6.05) with C-12 (δ_{C} 33.8). The NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) interactions revealed that the relative configuration at the stereogenic centers of **8a,b** was identical to that of amarisolides A–D [8]. The electronic circular dichroism spectrum of **8a,b** showed negative Cotton effects at ~ 212 and ~ 250 nm due to the electronic transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$, respectively, of the α,β -unsaturated- γ -lactone. The latter data indicated that the absolute configuration at the stereogenic centers C-2, C-5, C-8, C-9 and C-10 of compound **8a,b** was *S, S, R, R* and *R*, respectively. The *D* configuration of the β -glucopyranosyloxy moiety was established as previously described [8]. On the basis of these evidences, compound **8a,b** was characterized as (2*S*,5*S*,8*R*,9*R*,10*R*,14*R*,*S*)-2-(*O*- β -*D*-glucopyranosyl)-*neo*-clerodan-14-hydroxy-3,13-diene-14,15;18,19-diolide (**8a,b**) and was designated with the trivial name of amarisolide G.

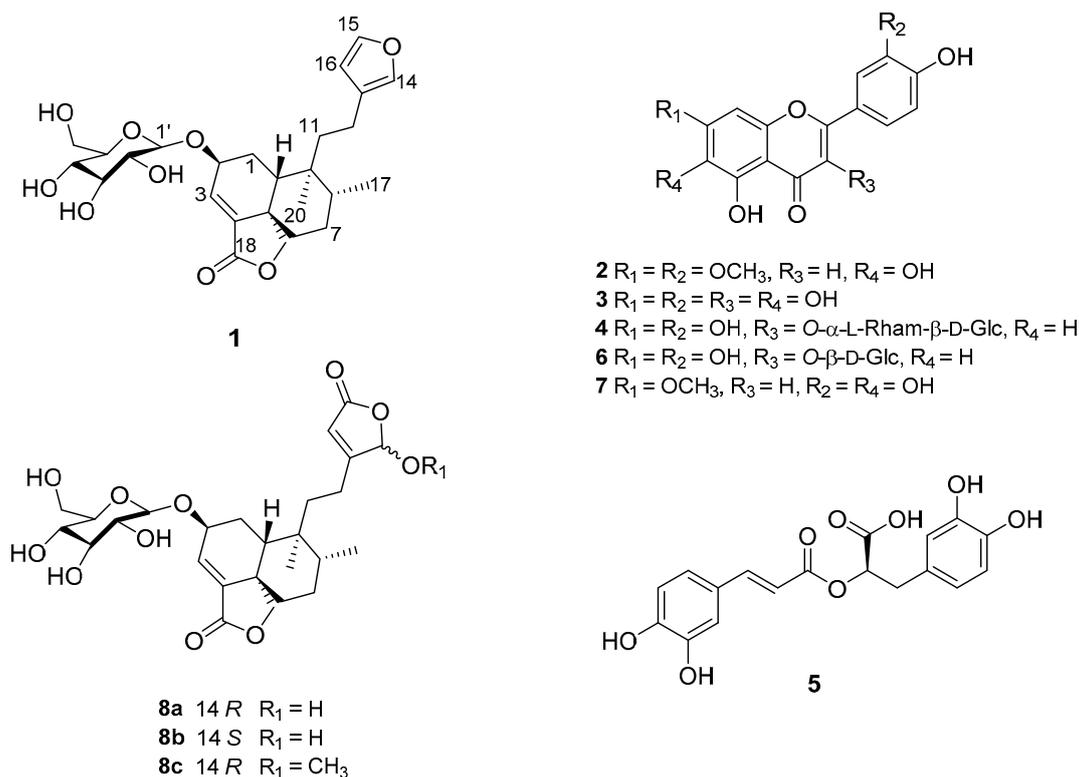


Figure 1. Structures of compounds (1–**8a,b**) from *S. amarissima*.

2.2. Chemical Constituents of the Essential Oil

Dried and fresh plant materials were analyzed to assess any change during the drying process. Since it is an aromatic plant, the chemical profile of the essential oil is valuable as an identity test. The essential oil content of distilled aerial parts was 0.02% and 0.03% for fresh and dried material, respectively. In each case, eight major compounds were identified, representing 99.96 and 99.97% of the composition of the essential oil, respectively. As observed in Table 2 and Figures S19 and S20 (Supplementary Material), the major components in both samples were germacrene D (15) and

β -selinene (**16**), followed by β -caryophyllene (**13**) and spathulenol (**17**). The only mutually exclusive constituents were 3-methoxy-*p*-cymene (**9**) present in the dried material, and δ -elemene (**11**) found only in the fresh plant. These differences are not due to seasonal changes because the plant material was from the same batch.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data for compound **8a,b** in $\text{DMSO-}d_6$.

Position	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (J/Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
1	α : 1.35 dd (13.6, 3.2) β : 1.81 brd (13.7)	26.3
2	4.44–4.49 m	70.0
3	6.66 d (6.4)	131.1
4		143.0
5		45.4
6	α : 1.72 td (12.7,3.3) β : 1.22–1.26 m	33.8
7	α : 1.53–1.58 m β : 1.65–1.70 m	27.6
8	1.65–1.70 m	36.2
9		37.8
10	2.21 d (15.1)	40.5
11	1.59–1.64 m	27.6
12	α : 1.71–1.74 m β : 1.53–1.64 m	33.8
13		171.4
14	α : 5.90 brs β : 6.05 brs	99.4
15		99.9
16	5.96 brs	171.9
17	0.80 d (6.5)	116.1
18		15.9
19a	4.39 d (8.2)	169.2
19b	4.02 d (8.2)	70.9
20	0.57 s	17.7
1'	4.31 d (7.7)	102.8
2'	2.96–3.05 m	74.1
3'	3.13–3.16 m	77.2
4'	2.96–3.05 m	70.7
5'	3.13–3.16 m	77.4
6'	α : 3.43–3.47 m β : 3.63–3.69 m	61.6
14-OH	7.75 brs	
2'-OH	4.92 brs	
3'-OH	4.92 brs	
4'-OH	4.92 brs	
6'-OH	3.33 s	

Assignments based on the analysis of the HSQC (Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) and HMBC experiments; *J* values (Hz) in parentheses. ^a 700 MHz. ^b 175 MHz.

It is worth mentioning that the oils from other *Salvia* species analyzed also contains sesquiterpenes. In this context, *Salvia ceratophylla*, *S. aethiopsis* L., *S. palaestina* Benth and *S. xanthocheila* Boiss. ex Benth., are rich sources of germacrene D (**15**) [16]; β -caryophyllene (**13**) is the major component of *S. nemorosa* L., *S. verticillata* L., *S. virgata* Ortega and *S. hydrangea* DC. ex Benth. Finally, germacrene B was the major compound of *S. syriaca* L. [17,18].

Table 2. GC-MS identified compounds from the essential oils of *S. amarissima*.

Compound	CAS Number	Peak Area (%)		
		R_I [a]	Sa-Batch 1	Sa-Batch 2
3-Methoxy- <i>p</i> -cymene (9)	1076-56-8	1219		4.40
(<i>E</i>)-Pinocarvyl acetate (10)	1686-15-3	1313	5.98	2.10
δ -Elemene (11)	20307-84-0	1329	1.99	
α -Bourbonene (12)	5208-58-2	1378	4.24	4.11
β -Caryophyllene (13)	87-44-5	1413	15.05	21.27
α -Caryophyllene (14)	1139-30-6	1447	7.68	4.21
Germacrene D (15)	37839-63-7	1476	25.09	24.26
β -Selinene (16)	17066-67-0	1491	28.35	30.16
Spathulenol (17)	6750-60-3	1576	11.59	9.45
Total peak area (%)			99.97	99.96

[a] R_I retention indices relative to series of *n*-alkanes (C₈-C₂₀) on a DB-5 column.

2.3. Evaluation of Compounds 1–8a,b on the PTP-1B Inhibitory Activity

One of the major causes of type 2 diabetes mellitus is insulin resistance, which occurs when the hormone cannot activate signaling pathways in major metabolic tissues (muscles, fat and liver). Insulin resistance involves several inhibitory molecules that interfere with tyrosine phosphorylation of the insulin receptor. Among those, PTP-1B is a promising therapeutic target since it inactivates crucial signaling effectors in the insulin- and leptin-signaling cascades by dephosphorylating their tyrosine residues [13]. Therefore, natural products 1–8a,b were tested against PTP-1B (Table 3). Among the flavonoids tested, the most active component was pedalitin (7) with an IC₅₀ of 62.0 ± 4.1 μM (19.0 μg/mL), whereas of the diterpenoids was amarisolide (1) (279.9 ± 26.0 μM; 137.9 μg/mL). In both cases, the inhibitory effect was concentration-dependent. The inhibitory activity against PTP-1B reported for compounds 4 and 6 correlated well with that found in this work [19,20]. On the other hand, rosmarinic acid (5) is an ingredient of an active extract of *Rosmarinus officinalis* against PTP-1B [21]. However, in this study we report for the first time the effect of the pure 5. The activity of the isolates 1–8a,b was compared to that of ursolic acid (UA, IC₅₀ = 28.1 ± 1.2 μM), which in other studies displayed lower IC₅₀ values (~3.1 μM) [22].

Table 3. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) inhibitory activity of compounds (1–8a,b) from *S. amarissima* expressed as IC₅₀.

	μg/mL ± SD	μM ± SD
1	137.9 ± 12.8	279.9 ± 26.0
2	62.5 ± 2.3	189.4 ± 7.0
3	24.2 ± 0.7	80.1 ± 2.2
4	197.3 ± 10.1	323.4 ± 16.6
5	49.4 ± 6.7	137.1 ± 18.7
6	120.7 ± 14.7	259.9 ± 31.7
7	19.6 ± 1.3	62.0 ± 4.1
8a,b	269.7 ± 3.6	514.2 ± 6.8
UA [a]	-	28.1 ± 1.2

[a] Positive control. Values are representative of three independent determinations.

The results of the PTP-1B are significant. They suggest that the traditional preparation of *S. amarissima*, with hypoglycemic and antihyperglycemic properties demonstrated in vivo [8] (i.e., the overall action), contains compounds such as 1–8a,b that might weakly target different proteins (i.e., PTP-1B and others) within the same signaling network thus shutting insulin signaling cascade process by network pharmacology. It is also possible that compounds 1–6 and 8a,b, with weaker activity than compound 7, altogether put forth a biochemical effect by synergism (i.e., a synergism between weakly

active compounds against PTP-1B). Finally, molecules like compounds **1**, **4**, **5** and **7** can exert their action binding different targets such as PTP-1B and α -glycosidases, among others (polypharmacology). The fact that rutin (**4**) [23] and rosmarinic acid (**5**) [21] are multitarget antidiabetic compounds, and compounds **1** and **7** inhibited α -glycosidases in vivo [8] strengthen any of these possibilities.

2.4. Docking Study

To predict the preferred binding orientation of compounds **1**, **UA** and **7** into PTP-1B, we performed a docking analysis. Compound **1** was not among the most active compounds but included for comparative purposes. These substances **1**, **7** and **UA** were docked with the co-crystallized structure of PTP-1B at the catalytic (PDB ID: 1G7F) and allosteric (PDB ID: 1T49) sites. The results in Figure 2 and Table 4 indicate that all ligands bind at the same site as the co-crystallized ligands 892 (3-(3,5-dibromo-4-hydroxy-benzoyl)-2-ethyl-benzofuran-6-sulfonic acid (4-sulfamoyl-phenyl)-amide) and INZ (2-[4-[(2s)-2-[[[(1s)-1-carboxy-2-phenylethyl]amino]carbonyl]amino]-3-oxo-3-(pentylamino)propyl]phenoxy]malonic acid) [24,25]. The estimated energy binding is different for each compound. Compound **1** has a higher affinity for the catalytic site, which is more and conserved site, while compound **7** and **UA** targeted its more hydrophobic and less conserved allosteric site. The RMSD values for ligands **1** and **7** are in the range of 2 to 3 Å, which indicates that the ligands do not precisely overlap but maintain the correct orientation [26,27]. The amino acids interacting with compounds **1** and **7**, as well as **UA** are similar to those previously reported for other inhibitors (Table 4; Figures S30 and S31 of the Supplementary Material) [24,25]. At the allosteric site, compound **7** has hydrophobic interactions with Ala189, Leu192, Phe280 and Phe196 while **UA** with Leu192, Phe280 and Phe196. Therefore, pedalitin (**7**) behaves as **UA** regarding its higher affinity for the allosteric site. For **UA**, the key structural feature is the pentacyclic core displaying a nonpolar characteristic, which interacts with nonpolar residues in the allosteric site [28]. For compound **7**, apparently beside the tricyclic structure, the lack of oxygen at C-3 of the flavonoid core seems to be essential. It will be necessary to pursue a kinetic analysis to determine if experimentally compound **7** is an allosteric inhibitor of PTP-1B. It is essential to mention, that the less-conserved PTP-1B allosteric site is an ideal target for a compound to inhibit PTP-1B activity because the problems associated with inhibition at catalytic site will disappear. Thus, this study may provide an important lead among flavones for the development of novel PTP-1B allosteric inhibitors.

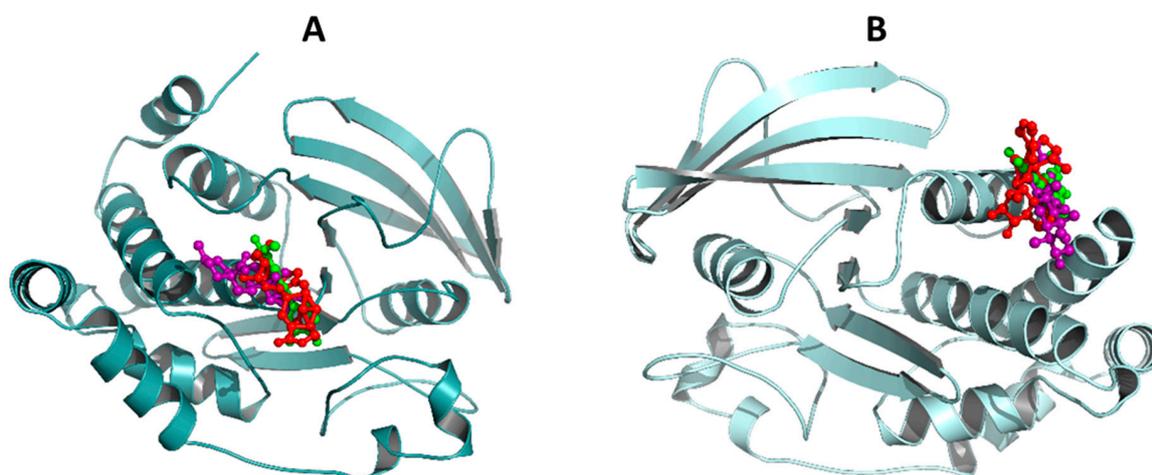


Figure 2. Structural models of the binding sites of the PTP-1B ligand complexes. In cyan cartoons (PTP-1B protein), red sticks (**1**), green sticks (**7**) purple sticks (**UA**) at the catalytic (A) and allosteric sites (B). Images created with Pymol.

Table 4. Results of the dockings analyses.

	Catalytic Site				Allosteric Site			
	K_i (μM) ¹	BE (kcal/mol)	RMSD (\AA) ³	Residues ²	K_i (μM) ¹	BE (kcal/mol)	RMSD (\AA) ³	Residues ²
1	0.55	−8.5	2.89	Tyr46, Asp48, Val49, Phe182, Gly183, Cys215, Ser216, Ala217, Gly220, Arg221, Gln262, Thr263 and Gln266	8.39	−6.8	2.15	Phe196, Lys197, Arg199, Glu200, Gly277, Phe280 and Ile281
7	9.94	−6.8	2.73	Tyr46, Asp48, Val49, Trp179, Asp181, Phe182, Gly183, Ala217, Ile219, Arg221, Gln262 and Gln266	2.16	−7.7	2.27	Ala189, Leu192, Glu276, Gly277, Phe280, Phe196, Lys197 and Glu200
UA	2.56	−7.6	1.35	Phe182, Gly183, Cys215, Ala217, Gly218, Ile219, Gly220, Arg221, Gln262, Thr263 and Gln266	0.78	−8.3	1.73	Asn193, Phe196, Asp263, Phe280, Leu192 and Ile281

¹ K_i values were calculated using the equation $\Delta G = RT \ln K_i$ [26] ² Residues interacting 4 \AA of the compound;

³ RMSD were calculated from the co-crystallized ligands for **UA**; and for **1** and **7** from **UA**. BE, binding energy.

2.5. Molecular Dynamics of PTP-1B-Compounds **1**, **7** and **UA** Complexes

Molecular dynamics (MD) studies of the complexes PTP-1B-compounds **1**, **7** and **UA** were carried out to evaluate the stability of the docked complexes illustrate in Figure 3. Table 5 shows the theoretical parameters calculated from 100 ns of MD. All PTP-1B-compound complexes show negative ΔG (affinity parameter) consistent with their stability. Compound **1** has a ΔG similar to **UA** at the catalytic site, while compound **7** has a lower ΔG than **AU** at the same site. Figures 3 and 4 show the structural models, RMSD and Root Mean Square Fluctuations (RMSF) of the molecular trajectories for compounds **1** and **7**, respectively. The RMSD of the complexes is lower with respect to PTP-1B in both the catalytic and allosteric MDs, which indicates the conformational stability of the complexes. In the RMSF analysis, it is observed an area between residues 27–50 (corresponding to a loop), which is stabilized with the ligands. The data obtained with the MDs are complementary and conscious with the docking data and experimental results.

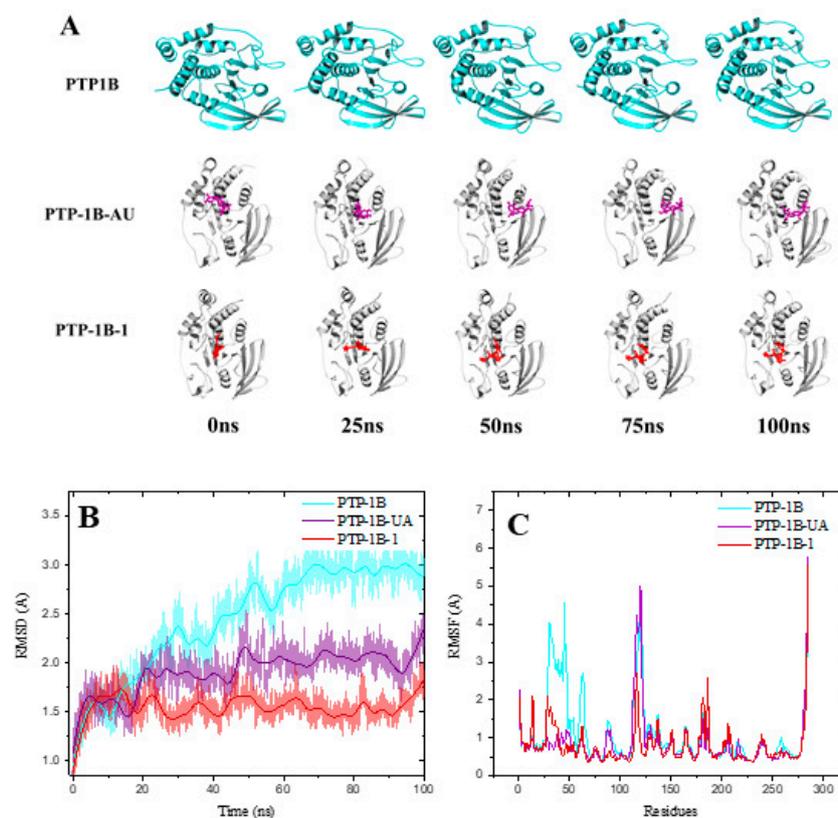


Figure 3. Molecular dynamics at the catalytic site of PTP-1B for compound **1**. (A) Structural models, (B) RMSD and (C) Root Mean Square Fluctuations (RMSF) from molecular trajectories. **AU** = **UA**.

Table 5. Calculations of the theoretical energy components from the trajectories of molecular dynamics.

Complex.	ΔE_{vdw}	ΔE_{ele}	ΔG_{GB}	ΔG_{NP}	ΔG_{solv}	ΔG_{bind}
PTP-1B-UA ¹	-21.88 ± 0.44	-20.02 ± 1.08	27.60 ± 1.63	-41.91 ± 1.26	25.39 ± 1.04	-16.51 ± 0.36
PTP-1B-UA ²	-28.67 ± 0.23	-1.21 ± 0.46	10.89 ± 0.42	-27.78 ± 0.48	7.73 ± 4.21	-20.05 ± 0.21
PTP-1B-1	-36.22 ± 0.47	-18.53 ± 0.77	41.62 ± 0.55	-54.76 ± 1.00	36.84 ± 0.53	-17.92 ± 0.61
PTP-1B-7	-35.95 ± 0.45	-4.27 ± 0.31	12.90 ± 0.33	-40.22 ± 0.55	9.06 ± 0.33	-31.16 ± 0.46

¹ Catalytic site; ² Allosteric site; ΔE_{vdw} , contributions by van der Waals interactions; ΔE_{ele} , electrostatic energy; ΔG_{GB} , polar solvation energy; ΔG_{np} , nonpolar solvation energy; ΔG_{solv} , desolvation free energy ($\Delta G_{solv} = \Delta G_{GB} + \Delta G_{nonpol}$); ΔG_{bind} , binding affinity.

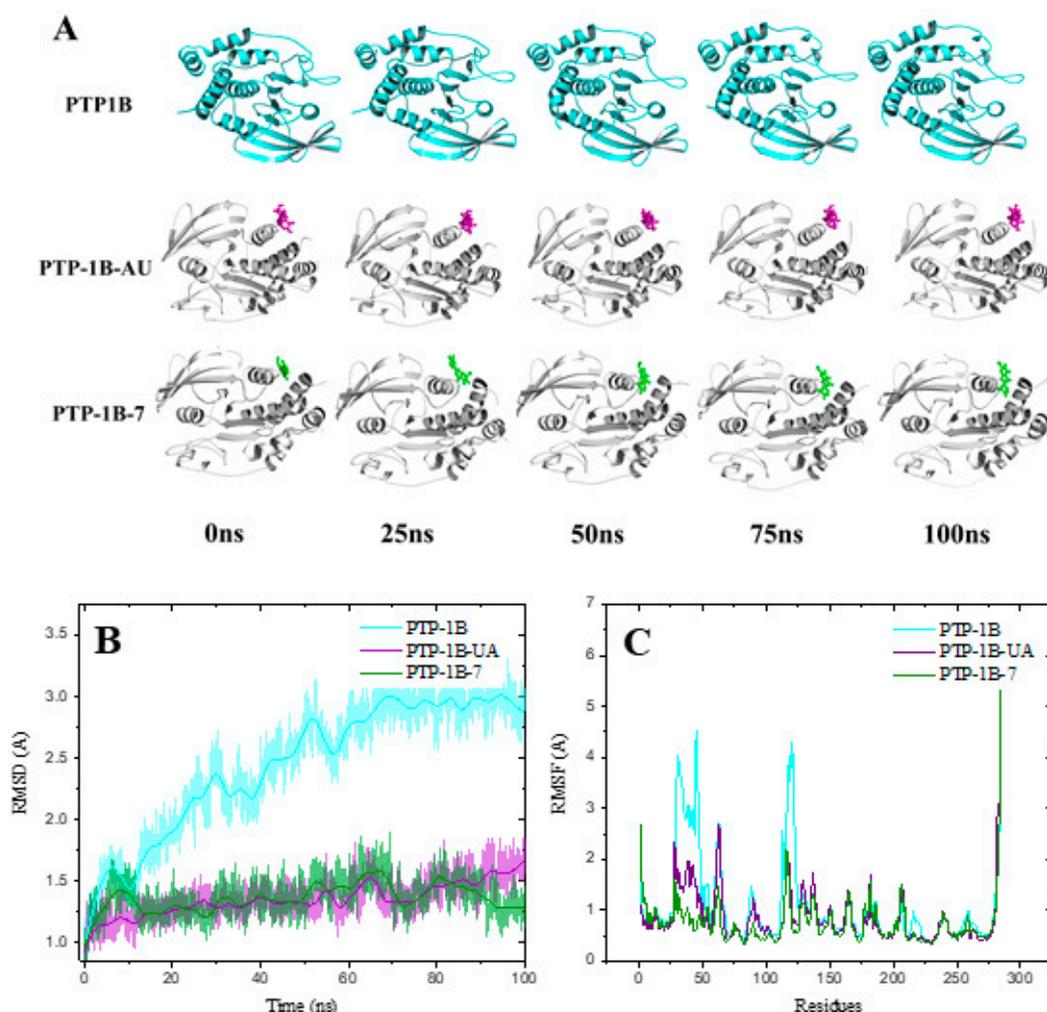


Figure 4. Molecular dynamics at the allosteric site of PTP-1B for compound 7. (A) Structural models, (B) RMSD and (C) RMSF from molecular trajectories.

2.6. Drug Likeness for Compounds 1, 7 and UA

According to the SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/index.php>), and Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) databases which predict the most probable targets of small bioactive molecules, compounds 1, 7 and UA 1, 7 could target any protein with percentages of 26.7, 40 and 40 %, respectively. SwissTargetPrediction predicted PTP-1B inhibition for these compounds with probabilities of 0, 0.1266 and 0.95, respectively. According to these predictions, UA should have been 7.5 times more active than compound 7; however, experimentally, UA was only 2.2 times more than compound 7 (Figures S31–S34).

Next, using the Osiris Property Explorer server (<http://cheminformatics.ch/propertyExplorer>), relevant properties for compounds 1, 7 and UA were calculated and summarized in Table 6.

These properties indicate whether a molecule is a potential drug. The logP value is a measure of a compound's hydrophilicity. Low hydrophilicity and, therefore, high logP values cause poor absorption. For a compound being well absorbed, its logP value must not be greater than 5.0; logP values between 1.35 and 1.8 indicate perfect oral and intestinal absorption. Thus, compounds **1** and **7** could have proper absorption, but not **UA**.

Table 6. Physicochemical properties of compounds **1**, **7** and **UA**.

	1	7	UA
LogP	1.01	1.92	6
Solubility (LogS)	−3.48	−2.58	−6.11
Molecular weight	492.56	316.26	456.71
Druglikeness	−2.96	1.8	−3.66
H bond acceptor	9	7	3
H bond donor	4	4	2
Nb stereocenters	10	0	10
Nb rotatable bonds	6	2	1
Drug score	0.40	0.52	0.26

The data was calculated using the OSIRIS Property Explorer server (http://www.cheminfo.org/Chemistry/Cheminformatics/Property_explorer/index.html).

The aqueous solubility of a compound influences its absorption and distribution characteristics; a low solubility goes along with inadequate absorption. More than 80% of the drugs on the market have a logS value higher than −4. Compounds **1** and **UA** present −3.48 and −6.11, respectively. The drug-likeness parameter is a complex balance of various molecular properties and structural features that determine whether a molecule is similar to the known drugs. These properties, mainly hydrophobicity, electronic distribution, hydrogen bonding characteristics, molecule size and flexibility, and of course presence of various pharmacophoric features influence the behavior of molecule in a living organism, including bioavailability, transport properties, affinity to proteins, reactivity, toxicity, metabolic stability and many others. A positive value indicates that a molecule contains predominantly fragments, which are frequently present in commercial drugs [29]; compound **7** has a drug-likeness value of 1.8. The H bond acceptor and H bond donor's parameters indicate a molecule's ability to interact to a greater or lesser degree with a protein; compounds **1** and **7** present a higher number of possible hydrogen bridges than **UA**. Finally, the drug-score is an indicator that qualifies the potential of a compound for being a drug based on all the calculated parameters; compound **7** has the best drug-score (0.52), which is in harmony with the experimental and theoretical data.

2.7. Development and Validation of an UHPLC-MS Method for Quantifying **1**

Initial assessments about the complexity of samples of AE were based on visual comparisons of their chromatographic profiles. The ethyl acetate soluble fraction of AE yielded the best profile. Chromatographic separation was performed on Acquity UHPLC[®] BEH Shield C₁₈ column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) applying a binary gradient elution of water (0.1% formic acid) and MeCN. The total run time was 10 min. As illustrated in Figure 5 compounds **1**, **2** and **4–7** are present in the chromatogram. All compounds were identified by their retention times and *m/z* values corresponding to [M − H][−] ions. Compounds **1**, **2** and **4–7** showed an effective baseline resolution. The pseudo molecular ions of these compounds appeared at *m/z* 609.54 [M − H][−] (**4**; R_T 1.36 min), 463.46 [M − H][−] (**6**; R_T 1.60 min), 359.23 [M − H][−] (**5**; R_T 2.46 min), 315.48 [M − H][−] (**7**; R_T 2.82 min), 329.70 [M − H][−] (**2**; R_T 3.65 min) and 491.23 [M − H][−] (**1**; R_T 4.89 min). The main component of the ethyl acetate fraction was amarisolide (**1**), then selected as a marker for validation. So far amarisolide (**1**) has been only isolated from this species, which makes it an excellent marker compound for quality control. It is worth mentioning that the neo-clerodanes type compounds detected in the infusion were **1** and **8a,b**, but not the minor diterpenoids we previously isolated from the organic extract of the plant [8].

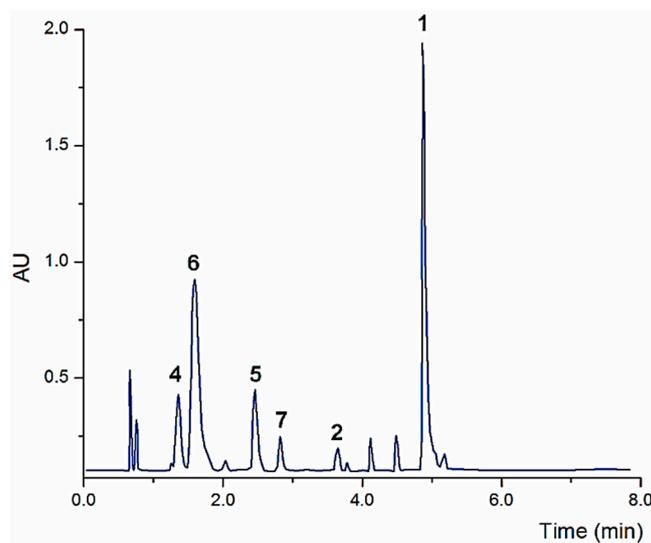


Figure 5. Representative LC chromatogram of the ethyl acetate soluble fraction prepared from the infusion of *S. amarissima* (Detection: 270 nm). Peak identification: 4: R_T 1.36 min; 6: R_T 1.60 min; 5: R_T 2.46 min; 7: R_T 2.82 min; 2: R_T 3.65 min; 1: R_T 4.89 min.

The analytical method was validated in terms of precision, accuracy, linearity and recovery according to the Q2 (R1) guideline published by the International Conference on Harmonisation (ICH) [30]. The linearity of the system was tested using a concentration range of **1** between 5 to 100 $\mu\text{g/mL}$ and was found to be linear ($R^2 = 0.9994$ (UV) and 0.9921 (Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS) in the concentration range used. The CV was less than 0.13% at each concentration level analyzed. The limit of identification (LOD) and quantification (LOQ) values were 1.22 and 3.70 $\mu\text{g/mL}$, respectively for UV detection; and 0.60 and 1.82 $\mu\text{g/mL}$, respectively for ESI-MS detection.

The linearity of the method was tested by recovery assay; the linear regression equation were found to be $y = 5636.35x - 4337.55$ (UV detection) and $y = 5252.80x + 64,101.76$ (ESI-MS detection). The recovery ranges for the standard were expressed as the concentration detected as a percentage of the expected concentration and were found in the ranges of 100.7–101.7 % for UV detection and 83.7–95.7% for ESI-MS detection. The reproducibility and repeatability of the analytical method were evaluated in terms of the intermediate precision by analyzing 6 replicates of the stock solution (50 $\mu\text{g/mL}$) in two different days. The relative SD (RSD; $n = 6$) was calculated for each sample evaluated. The results indicated that their chromatographic patterns were similar showing the presence of amarisolide (**1**). The CV values for accuracy were less than 0.11%. Subsequently, compound **1** was quantified, and the mean concentration calculated was 116 mg/g in dry matter.

3. Materials and Methods

3.1. General Procedures

IR spectra were recorded using a Bruker Tensor 27 FT-IR spectrophotometer (Bruker Corp., Billerica, MA, USA). Optical rotations were recorded at the sodium D-line wavelength using a Perkin Elmer model 343 polarimeter at 20 °C (Perkin Elmer, MA, USA). NMR spectra were registered on a Bruker AVANCE III HD with TCI CryoProbe 700 H-C spectrometer at 700 MHz (^1H) or 175 MHz (^{13}C), using TMS as an internal standard (Bruker Corp., Billerica, MA, USA). DARTHRMS were acquired with a JEOL AccuTOF-DART JMS-T100LC (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) spectrometer in positive mode. For GC-MS analyses, an Agilent 6890N series gas chromatograph coupled to a LECO (Laboratory Equipment Corporation) time-of-flight mass spectrometer detector (MS-TOF; Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) was used. UHPLC-MS analyses were performed on a Waters

Acquity UHPLC-H[®]Class system (Waters, Darmstadt, Germany) equipped with a quaternary pump, sample manager, column oven and photodiode array detector (PDA) interfaced with an SQD2 single mass spectrometer detector with an electrospray ion source. Column chromatography (CC) was carried out on Sephadex LH-20 (GE Healthcare, IL, USA). Thin layer chromatographic (TLC) analyses were performed on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck, Darmstadt, Germany), or C₁₈-silica gel matrix plates Analtech plates (Merck, Darmstadt, Germany), visualization of the plates was carried out using an (NH₄)₄Ce(SO₄)₄ (10%) solution in H₂SO₄. Reagent-grade EtOAc, CHCl₃, CH₂Cl₂ and MeOH were purchased from J.T. Baker (Avantor Performance Materials, PA, USA). MeCN, MeOH and water LC-MS or HPLC grades were purchased from Honeywell Burdick & Jackson (Morristown, NJ, USA). All other analytical grade solvents and reagents were obtained from various commercial sources. Amarisolide (**1**) was isolated from the species *S. amarissima* in the present study. The purity was determined to be more than 98% by UHPLC-MS.

3.2. Plant Material

Salvia amarissima was collected in Capulálpam de Méndez, Ixtlán de Juárez, Oaxaca, in January 2019 (Sa-Batch 1 (fresh) and Sa-Batch 2 (air-dried)). A voucher specimen (Number 1502277) was deposited at the National Herbarium of Mexico (MEXU), Instituto de Biología, UNAM. R. Torres-Colin achieved the botanical identification of the plant. The plant was air-dried and ground to a fine powder (2 mm) in a Thomas Wiley Model 4 Mill.

3.3. Extracts and Essential Oils Preparation

AE from *S. amarissima* (dried aerial parts) was prepared with 250 mL of boiling water and 12.5 g of the crude drug for 30 min. After filtration, the aqueous extract was concentrated in vacuo to obtain 0.1 g of a green residue. This process was repeated as necessary to prepare 10 g of AE. The ethyl acetate soluble fraction was prepared via partitioning with EtOAc (3 × 250 mL) from the aqueous extract. The resulting organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated in vacuo to yield 130 mg of a brown residue (yield 1.0%).

EOs were prepared from fresh (Sa-batch 1) and air-dried (Sa-batch 2) plant material (200 g in 1.5 L of distilled water) by hydrodistillation in a modified Clevenger type apparatus for 3 h. In both cases, the hydrodistilled was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 2 L). The resulting organic phases were dried over Na₂SO₄ and concentrated in vacuo to yield an oily yellow residue (0.040 g, yield 0.02% in the case of the fresh material, and 0.063 g, yield 0.03% for the dried plant). All samples were stored at −4 °C until chemical analysis.

3.4. Separation of Active Compounds from the Ethyl Acetate Soluble Fraction

The ethyl acetate soluble fraction (100 mg) was subjected to CC on Sephadex LH-20 (400 g) using MeOH as eluent; fractions were pooled into 20 secondary fractions (F₁–F₂₀) according to their TLC profiles. From fraction F₁₆ (73 mg) crystallized 60 mg of amarisolide (**1**). Preparative RP-TLC of fraction F₂₀ (10 mg) yielded 1.2 mg of 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone (**2**) and 4.2 mg of 6-hydroxyluteolin (**3**).

3.5. Separation of Active Compounds from AE

AE (4.3 g) was fractionated via CC on Sephadex LH-20 using a gradient system of methanol–water (water 40–100%); this process gave 12 secondary fractions (AE₁–AE₁₂). From fraction AE₉ (35 mg) crystallized 30 mg of rutin (**4**; m.p. 241–242 °C). From fraction AE₁₁ (15 mg) crystallized 5 mg of isoquercitrin (**6**). Fraction AE₆ (220 mg) was further purified on a Sephadex CC, eluting with MeOH, to yield 16 mg of rosmarinic acid (**5**). Preparative TLC on silica gel [ethyl acetate-methanol (85:15)] of fraction AE₅ (11 mg) afforded 1 mg of pedalitin (**7**). Finally, preparative RP-TLC of AE₆ (10 mg, MeOH) afforded 4 mg of an epimeric mixture of amarisolide G (**8a,b**).

Amarisolide G (**8a,b**): White solid; m.p. 133–135 °C. $[\alpha]_D^{20} = -149$ ($c = 1$ mg/mL, MOH). UV (MeOH): λ_{\max} ($\log \epsilon$) 206 (0.612) nm. IR (KBr): ν_{\max} 3365, 1749 cm^{-1} . ECD (c 0.2 mM, MeOH): λ_{\max} ($\Delta\epsilon$) 212 (−5.21), 250 (−4.65) nm. ^1H and ^{13}C -NMR: see Table 1. HRESIMS: m/z 525.2317 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. 525.2330 for $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_{11}$).

3.6. Enzymatic Hydrolysis of **8a,b**

Compound **8a,b** (2 mg) was mixed with β -glucosidase (2 mg, Sigma-Aldrich, MO, USA) in phosphate buffer solution (2 mL, 100 mM at pH 7); and kept at 40 °C for 15 days. Subsequently, the reaction mixture was extracted with CHCl_3 , and the aqueous phase was concentrated to dryness and subjected to TLC analysis. D-Glucose was identified by comparison of the retention factor and optical rotation value with those of the authentic sample.

3.7. UHPLC-MS Analysis and Method Validation

The analytical method (Figure 5) was developed using an Acquity UHPLC[®] BEH Shield C₁₈ column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) at 40 °C. The mobile phase consisted of (A) water (0.1% formic acid) and (B) acetonitrile with a linear gradient elution program: 0–10 min, 20–100% (B); 10–10.5 min, 20% (B); 10.5–13 min, 20% (B). The flow rate was set to 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$, and the sample injection volume was 3.0 μL ; detection was achieved with a PDA detector at 270 nm. For the identification of compounds, each sample was analyzed with the electrospray ion source operating in both positive (ESI⁺) and negative (ESI[−]) ionization modes. The ESI-MS conditions consisted of capillary voltage at 3.0 or 2.5 kV in positive and negative ion modes, respectively; dry heater temperature 150 °C; and nitrogen as the sheath gas flow. MS spectra were obtained within a mass range of m/z 100–1000 using nitrogen as the collision gas. The MassLynk software (version 4.1) was used to control of the UHPLC-MS system and for data acquisition and processing.

The method was validated according to the ICH guidelines [30]. For linearity, amarisolide (**1**) was accurately weighed and dissolved in dioxane-methanol (v/v , 1:1) to prepare stock solution at a final concentration of 1 mg/mL. Six working solutions in the range of 5–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the standard were prepared from serial dilutions from the stock solution. Each concentration was prepared in sextuplicate. The linearity was assessed estimating the slope, y-intercept and coefficient of determination (R^2) using the least squares method. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for the standard were determined at signal-to-noise (S/N) ratios of 3 and 10, respectively. Recovery experiments were carried out to evaluate the accuracy, assaying independently three amounts equivalent to 50 (ca. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 100 (ca. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or 125% (ca. 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$). At each level, compound **1** was added simultaneously to the ethyl acetate soluble fraction (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Each sample was injected twice and analyzed according to the method previously described. The mean percentage recovery for the standard was found to be between 98 and 102% by means of Fisher's F test [30]. Finally, the repeatability and inter-day precision was evaluated by testing six identical samples according to the above described method on two consecutive days and by two different analysts by triplicate. The relative standard deviation (RSD) was calculated for each determination as a measure of precision and repeatability.

3.8. GC-MS Analysis of the Essential Oils

For GC-MS analyses, compounds were separated on a DB-5 capillary column (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with the following temperature program: oven temperature was programmed from 40 to 260 °C at 4 °C/min during 20 min, and finally up to 340 °C for 20 min isothermally; injector and MS transfer line temperatures were set at 200 and 300 °C, respectively; Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min; split ratio, 1:20. A mixture of the homologous series of n-alkanes (C_8 – C_{20}) in CH_2Cl_2 was directly injected into the GC under the above temperature program, in order to calculate the linear retention indices (R_I). All mass spectra were acquired in EI mode (scan range m/z 40–400, ionization energy 70 eV). The components were identified using retention index (R_I) of peaks in the chromatogram [31,32] and by comparison of their mass spectra with those of standard library

data (NIST) of the GC-MS system and literature data or with those of authentic samples available commercially. All determinations were performed in triplicate.

3.9. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibition Assay

The expression and purification of hPTP-1B was performed as previously described [33]. Aqueous extract (AE), ethyl acetate soluble fraction, pure compounds and positive control were dissolved in DMSO or MeOH or Tris buffer solution (Tris-HCl, 20 mM, pH 7). Aliquots of 0–10 μ L of testing materials (triplicated) were incubated for 5 min with 20 μ L of enzyme stock solution in Tris-HCl (22 nM). After incubation, 10 μ L of p-nitrophenylphosphate (pNPP; 5 mM) was added and further incubated for 15 min at 25 $^{\circ}$ C; then, the absorbance was determined (λ_{\max} 415 nm). For all samples, the inhibitory activity was determined as a percentage in comparison to the blank (Tris-HCl) according to the following equation:

$$\% \text{ PTP1B} = \left(1 - \frac{A_{415t}}{A_{415C}}\right) \times 100 \quad (1)$$

where % PTP-1B is the percentage of inhibition, A_{415t} is the corrected absorbance of the extracts, fraction, or compounds under testing ($A_{415\text{end}} - A_{415\text{initial}}$) and A_{415C} is the absorbance of the blank ($A_{415\text{end blank}} - A_{415\text{initial blank}}$). The IC_{50} was calculated by regression analysis, using the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^S} \quad (2)$$

where A_{100} is the maximum inhibition, I is the inhibitor concentration, IC_{50} is the concentration required to inhibit the activity of the enzyme by 50% and S is the cooperative degree.

3.10. Docking Studies

To perform the docking at the catalytic site, the PTP1B-INZ complex corresponding to the PDB 1G7F was used, which has a resolution of 1.8 Å. For the allosteric site, the PDB 1T49 (resolution of 1.9) was used. The two PDBs used were selected considering the resolution and that they had co-crystallized ligands at the sites of interest. All compounds were built using the HyperChem 8.0 release program and optimized geometrically using the Gaussian 09 program, revision A.02 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA) at DFT B3LYP/3-21G level of theory. The protein and ligands were further prepared using the utilities implemented by AutoDockTools 1.5.4 (<http://mglttools.scripps.edu/>). The protein was adding polar hydrogen atoms, Kollman united-atom partial charges, and to the ligands computing Gasteiger–Marsilli formalism charges, rotatable groups which were assigned automatically as were the active torsions. Blind docking was carried out using AutoDock Vina version 2.0 [34]. The root mean square deviation (RMSD) values were obtained by comparing the best pose generated in AutoDock. The initial parameters used for the active site were a grid box size was 42 Å \times 40 Å \times 40 Å in the x, y and z dimensions and grid center 9.73, 18.00, 971 to 1G7F.PDB. For the allosteric site docking were a grid box size was 42 Å \times 40 Å \times 40 Å in the x, y and z dimensions and grid center 9.73, 18.00, 971 used 1T49.pdb. For both sites, the exhaustiveness was 25, and the ten best poses were obtained. The analysis of the docking was made with PyMol (Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY) [35].

3.11. Molecular Dynamics Simulation

All the structural complexes were verified, cleaned and ordered with the pdb4amber scrip before starting the preparation in order to generate suitable topologies from the LEaP module of AMBER 19 [36,37]. Each structure and complex was subjected to the following protocol: hydrogens and other missing atoms were added using the LEaP module with the leaprc.protein.ff19SB parameter set; Cl^- or K^+ counterions were added to neutralize the system; the complexes were then solvated in an octahedral box of explicit TIP3P model water molecules localizing the box limits at 12 Å from the protein surface. Molecular dynamic simulations were performed at 1 atm and 315 K, maintained

with the Berendsen barostat and thermostat, using periodic boundary conditions and particle mesh Ewald sums (grid spacing of 1 Å) for treating long-range electrostatic interactions with a 10 Å cutoff for computing direct interactions. The SHAKE algorithm was used to satisfy bond constraints, allowing the employment of a two fs time step for the integration of Newton's equations as recommended in the Amber package [36,38]. Amber leaprc.protein.ff19SB force field [39] parameters were used for all residues. All calculations were made using Graphics Processing Units (GPU) accelerated MD engine in AMBER (pmemd.cuda), a program package that runs entirely on CUDA®(Compute Unified Device Architecture)-enabled GPUs [40]. The protocol consisted of performing a minimization of the initial structure, followed by 50ps heating and pressure equilibration at 315 K and 1.0 atm pressure, respectively. Finally, the system is equilibrated with 500ps before starting the production of MD. The production of the MD consisted of 100 ns for each complex. Frames were saved at ten ps intervals for subsequent analysis. All analyses were done using CPPTRAJ [41] part of AMBER19 utilities and OriginPro 9.1. The calculations of RMSD and Root Mean Square Fluctuations (RMSF) were made, considering the C, CA and N. The charts were built with OriginPro 2018 SR1, and the trends were adjusted with the function processing smooth (method lowess span). VMD and PyMOL [35] were used to visualize and create the images from the MD.

3.12. Chemoinformatic Properties of Compounds 1, 7 and AU

The biological and chemoinformatic properties of compounds 1, 7 and AU were explored using the servers Swiss TargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/index.php>), Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) and Osiris Property Explorer server (<http://cheminformatics.ch/propertyExplorer/>) [29,42].

4. Conclusions

The AE of *S. amarissima* contains rutin (4) and rosmarinic acid (5), which inhibit intestinal glucose absorption, promote glucose uptake in muscle cells and suppress insulin-resistance, among other effects. On the other hand, pedalitin (7), which behave in silico as an allosteric inhibitor of PTP-1B, could contribute to its overall antidiabetic action via α -glucosidase and selective PTP-1B inhibition, and other mechanisms yet to be determined. The overall action of AE could be attained via network pharmacology, synergism and or polypharmacology. Altogether, our studies on *S. amarissima* tend to support its medicinal use for the treatment of diabetes in Mexican folk medicine. The chromatographic analyses developed and validated in this study will allow the development of a pharmacopeic monograph, and generate standardized preparations of this very Mexican plant. The analytical UHPLC method was suitable for its intended purpose, the quantification of amarisolide (1) according to the Q2 (R1) guideline. Overall, the scientific information generated for this plant will contribute to its rational use in Mexican folk medicine. Like many other New World melittophilous *Salvia* species, *S. amarissima* is a rich source of bioactive compounds.

Supplementary Materials: The following are available online. NMR, IR and MS spectrum of the isolated or identified compounds, TIC chromatograms of the essential oils and Residues of interaction to 4 Å of compounds 1, 7 and UA at the catalytic and allosteric sites of PTP-1B are available online.

Author Contributions: This work is part of the PhD thesis of E.S.-A. who performed the experiments; analysis of spectral data, A.P.-V.; UHPLC-MS method validation, I.R.-C.; docking analysis, M.R.-G.; expression and purification of hPTP-1B, docking, molecular dynamics and parameters calculations, M.G.-A.; botanical characterization of the species, R.T.-C.; conception, funding acquisition, structure elucidation, writing and editing, R.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research was supported by grants from CONACyT CB A1-S-11226 and DGAPA IN 217320 awarded to R.M.

Acknowledgments: The authors recognize the valuable support of M.I. Velásquez-López from Facultad de Medicina; and Georgina Duarte from Facultad de Química. We are indebted to Biol. Itzi Fragoso and Martha Martínez Gordillo (Facultad de Ciencias, UNAM) for their valuable help in the identification of the plant material. We also recognize the support of Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC, UNAM) for the resources to carry out computational calculations through the Miztli supercomputing system (LANCAD-UNAM-DGTIC-313). E.S.-A. acknowledges the fellowship from CONACyT (289212) to pursue graduate studies.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. International Diabetes Federation (IDF). Diabetes Atlas, 9th ed. Available online: <http://www.diabetesatlas.org> (accessed on 13 March 2020).
2. Mata, R.; Figueroa, M.; Navarrete, A.; Rivero-Cruz, I. Chemistry and Biology of Selected Mexican Medicinal Plants. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, A.D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J., Asakawa, Y., Liu, J.K., Eds.; Springer Nature Switzerland AG: Cham, Switzerland, 2019; Volume 108, pp. 1–142.
3. Efferth, T.; Greten, H.J. Quality control for medicinal plants. *Med. Aromat. Plants* **2012**, *1*, 1000e131.
4. Calderón, R.G.; Rzedowski, J. *Flora Fanerogámica del Valle de México*, 2nd ed.; Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro: Mexico City, Mexico, 2010; pp. 1–1406.
5. López, F.C.E.; Sánchez, D.G.; Arrieta, B.D.; Román, G.J.H. Estudio preliminar fitoquímico y de la actividad antimicrobiana de *Salvia amarissima* Ortega. *Cienc. y Tecnol.* **2010**, *9*, 67–76.
6. Maldonado, E.; Cárdenas, J.; Bojórquez, H.; Escamilla, E.M.; Ortega, A. Amarisolide, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1105–1108. [[CrossRef](#)]
7. Bautista, E.; Fragoso-Serrano, M.; Ortiz-Pastrana, N.; Toscano, R.A.; Ortega, A. Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A-C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia* **2016**, *114*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Flores-Bocanegra, L.; González-Andrade, M.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R. α -Glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1584–1593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Fragoso-Serrano, M.; Ortiz-Pastrana, N.; Luna-Cruz, N.; Toscano, R.A.; Alpuche-Solis, A.G.; Ortega, A.; Bautista, E. Amarisolide F, an acylated diterpenoid glucoside and related terpenoids from *Salvia amarissima*. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 631–635. [[CrossRef](#)]
10. Bautista, E.; Fragoso-Serrano, M.; Toscano, R.A.; García-Peña, M.R.; Ortega, A. Teotihuacanin, a diterpene with an unusual spiro-10/6 system from *Salvia amarissima* with potent modulatory activity of multidrug resistance in cancer cells. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3280–3282. [[CrossRef](#)]
11. Calzada, F.; Bautista, E. Plants used for the treatment of diarrhoea from Mexican Flora with amoebicidal and giadicial activity, and their phytochemical constituents. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *253*, 1–49. [[CrossRef](#)]
12. Moreno-Pérez, G.F.; González-Trujano, M.E.; Martínez-Gordillo, M.J.; San Miguel-Chávez, R.; Basurto-Peña, F.A.; Dorazco-González, A.; AguirreHernández, E. Amarisolide A and pedalitin as bioactive compounds in the antinociceptive effects of *Salvia circinata*. *Bot. Sci.* **2019**, *97*, 355–365. [[CrossRef](#)]
13. Klamann, L.D.; Boss, O.; Peroni, O.D.; Kim, J.K.; Martino, J.L.; Zabolotny, J.M.; Moghal, N.; Lubkin, M.; Kim, Y.B.; Sharpe, A.H. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 5479–5489. [[CrossRef](#)]
14. Voirin, B.; Viricel, M.R.; Favre-Bonvin, J.; Van den Broucke, C.O.; Lemli, J. 5,6,4'-Trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone and other methoxylated flavonoids isolated from *Thymus satureioides*. *Planta Med.* **1985**, *51*, 523–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Airoidi, C.; Sironi, E.; Dias, C.; Marcelo, F.; Martins, A.; Rauter, A.P.; Nicotra, F.; Jimenez-Barbero, J. Natural compounds against Alzheimer's disease: Molecular recognition of A β 1-42 peptide by *Salvia sclareoides* extract and its major component, rosmarinic acid, as investigated by NMR. *Chem. Asian, J.* **2013**, *8*, 596–602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Bagci, E.; Kocak, A. Essential oil composition of the aerial parts of two *Salvia*, L. (*S. multicaulis* Vahl. Enum and *S. tricochlada* Benth) species from east Anatolian region (Turkey). *Int. J. Sci. Tech.* **2008**, *3*, 13–18.

17. Salehi, P.; Tolami, L.B.; Sefidkon, F. Essential oil composition of *Salvia xanthocheila* Boiss. ex Benth. from Iran. *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 442–443. [[CrossRef](#)]
18. Sonboli, A.; Babakhani, B.; Mehrabian, A.R. Antimicrobial activity of six constituents of the essential oil from *Salvia*. *Z. Naturforsch.* **2006**, *61*, 160–164. [[CrossRef](#)]
19. Zhao, B.T.; Le, D.D.; Nguyen, P.H.; Ali, M.Y.; Choi, J.S.; Min, B.S.; Shin, H.M.; Rhee, H.I.; Woo, M.H. PTP1B, α glucosidase, and DPP-IV inhibitory effects for chromene derivatives from the leaves of *Smilax china* L. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *253*, 27–37. [[CrossRef](#)]
20. Xu, J.; Wang, X.; Yue, J.; Sun, Y.; Zhang, X.; Zhao, Y. Polyphenols from a corn leaves (*Quercus liaotungensis*) protect pancreatic beta cells and their inhibitory activity against α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B. *Molecules* **2018**, *23*, 2167. [[CrossRef](#)]
21. Ngoa, Y.L.; Lau, C.H.; Chua, L.S. Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *121*, 687–700. [[CrossRef](#)]
22. Oh, J.; Choe, S.; Kim, D.W.; Lee, S.H.; Na, M.K. Rhododendric acid A, a new ursane-type PTP1B inhibitor from the endangered plant *Rhododendron brachycarpum* G. Don. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6116–6119.
23. Al-Ishaq, R.K.; Abotaleb, M.; Kubatka, P.; Kajo, K.; Busselberg, D. Flavonoids and their anti-diabetic effects: Cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels. *Biomolecules* **2019**, *9*, 430. [[CrossRef](#)]
24. Wiesmann, C.; Barr, J.J.; Kung, J.; Zhu, J.; Erlanson, D.A.; Shen, W.; Fahr, B.J.; Zhong, M.; Taylor, L.; Randal, M.; et al. Allosteric Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 730–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shrestha, S.; Seong, S.H.; Park, S.G.; Min, B.S.; Jung, A.H.; Chi, J.S. Insight into the PTP1B inhibitory activity of arylbenzofurans: An in vitro and in silico study. *Molecules* **2019**, *24*, 2893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gohlke, H.; Klebe, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2644–2676. [[CrossRef](#)]
27. Ramírez, D.; Caballero, J. Is it reliable to take the molecular docking top scoring position as the best solution without considering available structural data? *Molecules* **2018**, *23*, 1038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Zhang, X.-Y.; LI, W.; Wang, J.; Li, N.; Cheng, M.S.; Koike, K. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activities of ursane-type triterpenes from Chinese raspberry, fruits of *Rubus chingii*. *Chin. J. Nat. Med.* **2019**, *17*, 15–21.
29. Khan, T.; Lawrence, A.J.; Azad, I.; Raza, S.; Joshi, S.; Khan, A.R. Computational drug designing and prediction of important parameters using in silico methods- A review. *Curr. Comput. Aided Drug. Des.* **2019**, *15*, 384–397. [[CrossRef](#)]
30. International Conference on Harmonization (ICH) Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. In ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Geneva, Switzerland, 1 November 2005. Available online: [http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2\(R1\).pdf](http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1).pdf) (accessed on 17 June 2020).
31. Van den Dool, H.; Kratz, P.D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed Gas-Liquid partition Chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1963**, *11*, 463–471. [[CrossRef](#)]
32. Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007; pp. 1–804.
33. Rangel-Grimaldo, M.; Macías-Rubalcava, M.L.; González-Andrade, M.; Raja, H.; Figueroa, M.; Mata, R. α -Glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Malbranchea circinata*. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 675–683. [[CrossRef](#)]
34. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [[CrossRef](#)]
35. DeLano, W.L. Use of PYMOL as a communications tool for molecular science. *Abstr. Pap. A.C.S.* **2004**, *228*, U313–U314.
36. Case, D.A.; Betz, R.M.; Cerutti, D.S.; Cheatham, T.E., III; Darden, T.A.; Duke, R.E.; Giese, T.J.; Gohlke, H.; Goetz, A.W.; Homeyer, N.; et al. AMBER. 2015. Available online: <http://ambermd.org/doc12/Amber16.pdf> (accessed on 31 July 2020).
37. Case, D.A.; Cheatham, T.E., III; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K.M., Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R.J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comp. Chem.* **2005**, *26*, 1668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Walker, R.C.; Crowley, M.F.; Case, D.A. The implementation of a fast and accurate QM/MM potential method in Amber. *J. Comp. Chem.* **2008**, *29*, 1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Tian, C.; Kasavajhala, K.; Kellon, A.; Belfon, K.; Raguette, L.; Huang, H.; Miguez, A.N.; Bickel, J.; Wang, Y.; Pincay, J.; et al. ff19SB: Amino-acid specific protein backbone parameters trained against quantum mechanics energy surfaces in solution. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16*, 528–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Salomon-Ferrer, R.; Gotz, A.W.; Poole, D.; Le Grand, S.; Walker, R.C. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh Ewald. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3878–3888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Roe, D.R.; Cheatham, T.E., III. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. Cheatham. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084–3095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bhal, S.K. *LogP-making sense of the value*; Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/LABS): Toronto, ON, Canada, 2007; pp. 1–4.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).