



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Contribución al conocimiento de la  
composición química de la infusión obtenida de la  
especie vegetal *Justicia spicigera* Schltl.  
(Acanthaceae)

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ALEJANDRA PÉREZ ESQUIVEL



Ciudad Universitaria, CDMX

AÑO 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**     **Profesor:** Mata Essayag Rachel  
**VOCAL:**           **Profesor:** Pérez Vásquez Araceli  
**SECRETARIO:**   **Profesor:** Ovalle Magallanes Berenice  
**1er. SUPLENTE:** **Profesor:** Figueroa Saldívar Mario Alberto  
**2° SUPLENTE:**   **Profesor:** Fragoso Serrano Mabel Clara

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

---

DRA. ARACELI PÉREZ VÁSQUEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

---

Q.F.B. GABRIELA GARCÍA MARÍN

SUSTENTANTE:

---

ALEJANDRA PÉREZ ESQUIVEL

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al apoyo económico de los proyectos DGAPA PAPIIT IN217320, CONACyT CB CY011226 y PAIP-UNAM 5000-9140, de los cuales es responsable la Dra. Rachel Mata Essayag.

Al CONACyT por el apoyo otorgado a través de la beca Ayudante de Investigador Nacional nivel 3 o Emérito (Dra. Rachel Mata Essayag, Exp. del investigador 3803).

Agradecimiento a la Dra. Rachel Mata por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, la confianza y apoyo para el desarrollo de este proyecto. Muchas gracias.

Agradecimiento especial a mi tutora, la Dra. Araceli Pérez por su paciencia, apoyo y tiempo dedicado para orientarme a lo largo de mi estancia en el laboratorio. Muchas gracias.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz, por su asesoría y apoyo en cuestiones técnicas para el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Rafael Torres Colín del Instituto de Biología de la UNAM, por su valioso apoyo en la identificación y descripción de la especie vegetal *Justicia spicigera*.

A los miembros de mi jurado por sus valiosos comentarios y correcciones a este trabajo, enriqueciendo la versión final del mismo.

Al personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química: a la M. en C. Jessica Amacosta Castillo por el registro de los espectros de masas, a la Q. Marisela Gutiérrez Franco por los análisis de infrarrojo y ultravioleta, a las M. en C. Rosa Isela del Villar Morales y Nayeli López Balbiaux por el registro de los espectros de RMN, a la Q.F.B. Margarita Guzmán Villanueva por su apoyo en los análisis de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 124, en especial a Gaby, Sofí y Alberto, por enseñanzas brindadas y hacer de la estancia en el laboratorio de los momentos más agradables.

## DEDICATORIAS

A mis padres, Javier Pérez y Anabella Esquivel, porque todo lo que tengo y lo que soy se los debo a ustedes, no me resta más que agradecerles tanto amor, comprensión y cariño. A mis hermanas, Esmeralda y Ana, por ser mis mejores amigas y estar siempre a mi lado. Son lo mejor de mi vida, los amo.

Con todo mi cariño, a Belem Rivera, por brindarme su amistad, ser un apoyo incondicional y por todos los momentos que compartimos a lo largo de estos años. Siempre voy a agradecer que hayas estado ahí para escucharme.

Al equipo “maravilla”, Brenda y Alex, por las risas, noches de desvelo y por hacer el semestre virtual inolvidable. Los quiero.

# INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	2
LISTA DE FIGURAS .....	3
LISTA DE TABLAS.....	4
1. INTRODUCCIÓN .....	5
2. ANTECEDENTES .....	7
2.1 Aspectos generales de <i>Justicia spicigera</i> .....	7
2.2. Química y farmacología de <i>J. spicigera</i> .....	8
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	11
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	12
3.1. Material Vegetal .....	12
3.2. Procedimientos generales .....	13
3.2.1. Análisis cromatográficos .....	13
3.2.3. Determinación de constantes espectroscópicas y espectrométricas.....	14
3.2.4. Preparación de la infusión de la planta <i>J. spicigera</i> y de la fracción de AcOEt. 14	
3.2.5. Aislamiento de 2- <i>N</i> -( <i>p</i> -Coumaroil)-3- <i>H</i> -fenoxazin-3-ona (1).....	16
3.2.6. Aislamiento de 3"- <i>O</i> -acetil-canferitrina (2).....	16
3.2.7. Aislamiento de Canferitrina (3).....	16
3.2.8. Aislamiento de compuesto 7- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosido de Canferol (4) .....	16
3.2.9. Aislamiento de la 2,5-dimetoxibenzoquinona (6).....	17
3.2.10. Aislamiento de 4-hidroxifenil-(6'- <i>O</i> -[4"-hidroxi-3",5"-dimetoxi-benzoato]) de $\beta$ -D-glucopiranosido (7).....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	18
4.1. Elucidación estructural de la 2- <i>N</i> -( <i>p</i> -coumaroil)-3- <i>H</i> -fenoxazin-3-ona (1) .....	21
4.2. Elucidación estructural de los compuestos 3"- <i>O</i> -acetil-canferitrina (2) y de 7- <i>O</i> -ramnósido de canferol (4) .....	26
4.3. Elucidación estructural de 2,5-dimetoxiquinona (6) .....	30
4.4. Elucidación estructural de 4-hidroxifenil-(6'- <i>O</i> -[4"-hidroxi-3",5"-dimetoxibenzoato]) de $\beta$ -D-glucopiranosido (7) .....	31
4.5. Perisbivalvina B: Corrección de la estructura (5).....	33
4.6. Análisis cromatográfico de fracciones y compuestos puros .....	35
4.6.1 Cromatografía en capa delgada.....	35
4.6.2. Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas.....	37

5. CONCLUSIONES .....	40
6. PERSPECTIVAS.....	40
REFERENCIAS .....	41
ANEXOS.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CDMX	Ciudad de México
CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub>	Metanol deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
COSY	Espectro bidimensional de correlación homonuclear
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
ESI-EM	Espectro de masas por Electrospray
HMBC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HSQC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Agua desionizada
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>J. spicigera</i>	<i>Justicia spicigera</i> Schltdl. (Acanthaceae)
LC-EM	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
MEXU	Herbario Nacional de México
mg	miligramo
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
NOESY	Espectroscopia de mejoramiento nuclear de Overhauser
OMS	Organización Mundial de la Salud
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
TMS	Tetrametilsilano
<i>t</i> <sub>R</sub>	Tiempo de retención
UV	Luz ultravioleta
δ <sub>C</sub>	Desplazamiento químico de carbono
δ <sub>H</sub>	Desplazamiento químico de protón
λ	Longitud de onda



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metabolitos primarios y secundarios en plantas. ....	6
<b>Figura 2.</b> Flores y hojas de <i>Justicia spicigera</i> Schltld. ....	8
<b>Figura 3.</b> Estrategia metodológica para el aislamiento de metabolitos adicionales de <i>J. spicigera</i> .....	15
<b>Figura 4.</b> 3 <i>H</i> -fenoxazin-3-onas aisladas de <i>P. bivalvis</i> . ....	19
<b>Figura 5.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>1</b> . ....	22
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>1</b> . ....	23
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) del compuesto <b>1</b> . ....	23
<b>Figura 8.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) del compuesto <b>1</b> . ....	24
<b>Figura 9.</b> Correlaciones observadas en HMBC (CD <sub>3</sub> OD) para la molécula <b>1</b> . ....	24
<b>Figura 10.</b> Correlaciones importantes observadas en HMBC (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) para la molécula <b>1</b> . ....	25
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>2</b> . ....	27
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>2</b> . ....	28
<b>Figura 13.</b> Correlaciones HMBC observadas de la estructura <b>5</b> . ....	34
<b>Figura 14.</b> Cromatograma por CCD de los compuestos puros y las fracciones de AcOEt de <i>J. spicigera</i> . Visualización con lámpara de UV a <b>(1)</b> λ =254 nm y a <b>(2)</b> λ =365 nm. <b>(3)</b> Agente revelador: reactivo 4-anisaldehído. <b>(4)</b> Sin revelar. <b>A:</b> Compuesto <b>(6)</b> , <b>B:</b> Compuesto <b>(7)</b> , <b>C:</b> Compuesto <b>(1)</b> , <b>D:</b> Compuesto <b>(4)</b> , <b>E:</b> Compuesto <b>(2)</b> , <b>F:</b> Compuesto <b>(3)</b> , Fracción de AcOEt <i>J. spicigera</i> <b>G:</b> CDMX y <b>H:</b> Oaxaca. Sistema de elución: AcOEt, MeOH y H <sub>2</sub> O (85:10:5). ....	36
<b>Figura 15.</b> Partes aéreas de <i>J. spicigera</i> molidas. ....	36
<b>Figura 16.</b> Compuesto 2- <i>N</i> -( <i>p</i> -Coumaroil)-3- <i>H</i> -fenoxazin-3-ona <b>(1)</b> . ....	36
<b>Figura 17.</b> Cromatograma LC-EM (ESI positivo) de la fracción de AcOEt de la infusión <i>J. spicigera</i> (CDMX). Compuestos mayoritarios: 3''- <i>O</i> -acetil-canferitrina <b>(2)</b> y Canferitrina <b>(3)</b> . ....	37
<b>Figura 18.</b> Cromatograma LC-EM (ESI positivo) de la fracción de AcOEt de la infusión <i>J. spicigera</i> (Estado de Oaxaca). Compuestos mayoritarios 3''- <i>O</i> -acetil-canferitrina <b>(2)</b> y Canferitrina <b>(3)</b> . ....	38
<b>Figura 19.</b> Cromatograma LC-EM (ESI negativo) de la infusión de <i>J. spicigera</i> (CDMX). Compuestos mayoritarios: 3''- <i>O</i> -acetil-canferitrina <b>(2)</b> , Canferitrina <b>(3)</b> y 2- <i>N</i> -( <i>p</i> -Coumaroil)-3- <i>H</i> -fenoxazin-3-ona <b>(1)</b> . ....	38
<b>Figura 20.</b> Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto <b>1</b> . ....	47
<b>Figura 21.</b> Espectro UV cuantitativo del compuesto <b>1</b> . ....	47
<b>Figura 22.</b> Espectro HSQC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>1</b> . ....	48
<b>Figura 23.</b> Espectro HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>1</b> . ....	48
<b>Figura 24.</b> Espectro NOESY (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>1</b> . ....	49
<b>Figura 25.</b> Espectro HSQC (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) del compuesto <b>1</b> . ....	49
<b>Figura 26.</b> Espectro HMBC (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) del compuesto <b>1</b> . ....	50
<b>Figura 27.</b> Espectro COSY (H →H) (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) del compuesto <b>1</b> . ....	50
<b>Figura 28.</b> Espectro NOESY (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) del compuesto <b>1</b> . ....	51
<b>Figura 29.</b> Espectro de masas por Electrospray (ESI-EM), modo positivo del compuesto <b>1</b> . ....	51
<b>Figura 30.</b> Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto <b>2</b> . ....	52
<b>Figura 31.</b> Espectro UV cuantitativo del compuesto <b>2</b> . ....	52

<b>Figura 32.</b> Espectro HSQC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>2</b> .....	53
<b>Figura 33.</b> Espectro HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>2</b> .....	53
<b>Figura 34.</b> Espectro COSY (H →H) (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>2</b> .....	54
<b>Figura 35.</b> Espectro TOCSY (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>2</b> .....	54
<b>Figura 36.</b> Espectro NOESY (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>2</b> .....	55
<b>Figura 37.</b> Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto <b>3</b> .....	56
<b>Figura 38.</b> Espectro UV cuantitativo del compuesto <b>3</b> .....	56
<b>Figura 39.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>3</b> .....	57
<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>3</b> .....	57
<b>Figura 41.</b> Espectro HSQC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>3</b> .....	58
<b>Figura 42.</b> Espectro HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>3</b> .....	58
<b>Figura 43.</b> Espectro COSY (H →H) (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>3</b> .....	59
<b>Figura 44.</b> Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto <b>4</b> .....	60
<b>Figura 45.</b> Espectro UV cuantitativo del compuesto <b>4</b> .....	60
<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>4</b> .....	61
<b>Figura 47.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>4</b> .....	61
<b>Figura 48.</b> Espectro HSQC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>4</b> .....	62
<b>Figura 49.</b> Espectro HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>4</b> .....	62
<b>Figura 50.</b> Espectro NOESY (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>4</b> .....	63
<b>Figura 51.</b> Espectro COSY (H →H) (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>4</b> .....	63
<b>Figura 52.</b> Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto <b>6</b> .....	64
<b>Figura 53.</b> Espectro UV cuantitativo del compuesto <b>6</b> .....	64
<b>Figura 54.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>6</b> .....	65
<b>Figura 55.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>6</b> .....	65
<b>Figura 56.</b> Espectro HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>6</b> .....	66
<b>Figura 57.</b> Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto <b>7</b> .....	67
<b>Figura 58.</b> Espectro UV cuantitativo del compuesto <b>7</b> .....	67
<b>Figura 59.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>7</b> .....	68
<b>Figura 60.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>7</b> .....	68
<b>Figura 61.</b> Espectro HSQC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>7</b> .....	69
<b>Figura 62.</b> Espectro HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>7</b> .....	69
<b>Figura 63.</b> Espectro COSY (H →H) (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>7</b> .....	70
<b>Figura 64.</b> Espectro NOESY (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) del compuesto <b>7</b> .....	70

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Metabolitos aislados de <i>Justicia spicigera</i> reportados en la literatura.....	10
<b>Tabla 2.</b> Compuestos aislados de <i>J. spicigera</i> .....	20
<b>Tabla 3.</b> Datos espectroscópicos en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> y CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> para el compuesto <b>1</b> .....	25
<b>Tabla 4.</b> Datos de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) y <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD- <i>d</i> <sub>4</sub> ) de <b>2</b> , <b>3</b> y <b>4</b> . .....	29
<b>Tabla 5.</b> Datos de RMN para perisbivalvina B ( <b>5</b> ). .....	34

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos prehistóricos, los humanos han utilizado recursos naturales como plantas, animales, microorganismos y organismos marinos para aliviar y tratar enfermedades. Por lo que respecta a las plantas, a medida que el humano evolucionó, no solo fue capaz de decidir cuales servían para comer y cuales no, sino que también fue más allá y comenzó a asociar características curativas con ciertas plantas, clasificándolas en analgésicos, febrífugos, antiflogísticos, soporíferos, entre otras categorías. Con el transcurso de los años, el conocimiento del uso de las plantas se fue sistematizando y actualmente, el estudio de las drogas naturales, incluidas las plantas, es abordado por la Farmacognosia. Esta disciplina se enfoca particularmente al estudio de los principios activos de origen vegetal, fúngico, protista, animal y mineral, así como de los derivados que pudieran tener una aplicación en diferentes practicas terapéuticas (Cortez-Gallardo et al., 2004; Bruneto, 2001).

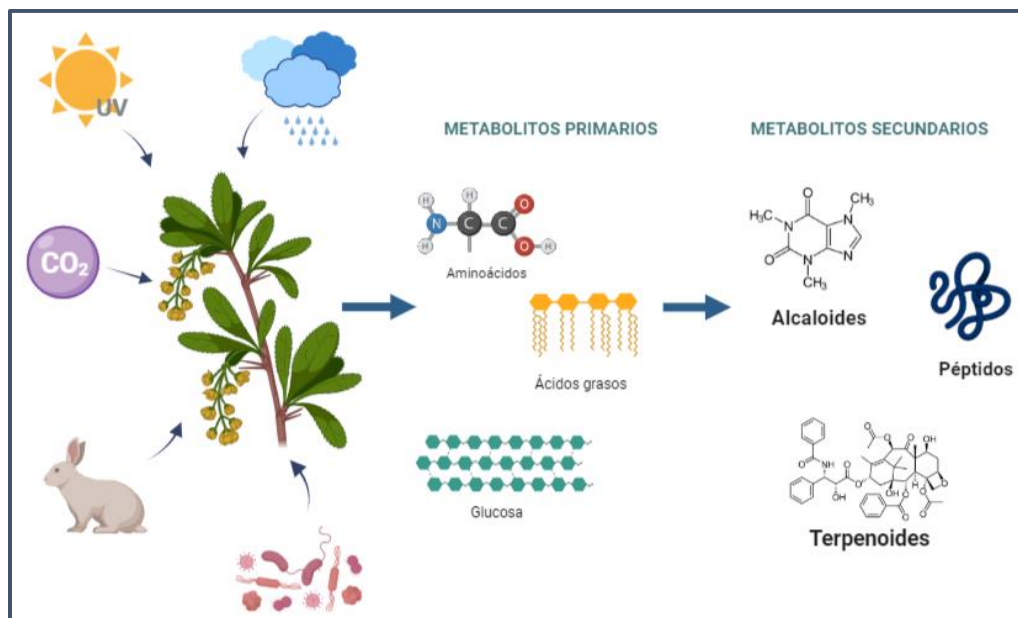
Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para sus necesidades de atención primaria de salud (*WHO Global Centre for Traditional Medicine*, 2022). La OMS destaca la importancia de las plantas medicinales como una fuente importante de productos medicinales, debido principalmente a que tienen una diversidad química única, lo que resulta en una amplia gama de actividades biológicas (Cortez-Gallardo et al., 2004).

De acuerdo con la definición de la Organización Mundial de la Salud, “*una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos*” (OMS, 1979).

Las plantas producen una asombrosa diversidad de compuestos. Algunos son parte de las vías metabólicas "primarias", lo cuales son base fundamental para su crecimiento, desarrollo y reproducción. El otro grupo importante de metabolitos

se denominan “metabolitos secundarios” o “metabolitos especializados” los cuales se biosintetizan, se almacenan y bajo condiciones particulares las plantas los usan. La biosíntesis y acumulación de metabolitos secundarios a menudo ocurre en plantas estresadas por múltiples factores, incluidos los efectos de elicitores y moléculas de señalización. De esta manera, los metabolitos secundarios juegan un papel muy importante en la adaptación de las plantas al medio ambiente y en la superación de las condiciones de estrés, lo cual permite que sean considerados compuestos bioactivos, con una gran importancia como fuentes potenciales de fármacos y medicamentos, aditivos alimentarios y bioquímicos de importancia industrial (Ramakrishna & Ravishankar, 2011).

En resumen, es importante mencionar que los metabolitos secundarios de las plantas medicinales son los responsables de las propiedades terapéuticas, presentan una gran diversidad estructural y mayor complejidad que los metabolitos primarios, muchos de ellos poseen distribución taxonómica restringida, es decir, estos compuestos son producidos por un grupo reducido de organismos. También, son indicadores importantes para evaluar la calidad de las plantas medicinales en cuyo caso, son llamados compuestos marcadores.



**Figura 1.** Metabolitos primarios y secundarios en plantas.

En este trabajo se pretende profundizar en la composición química de una de las especies medicinales más utilizadas en la Medicina tradicional de México, conocida como *Justicia spicigera* Schltdl. (Acanthaceae), y de esta manera contribuir en el conocimiento de su metabolismo secundario. Esto brindará la pauta para que algunos de sus metabolitos puedan ser estudiados farmacológicamente y entender muchos de los efectos terapéuticos demostrados de esta planta que tiene un gran valor medicinal.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Aspectos generales de *Justicia spicigera*

México es un país megadiverso, y las plantas, en particular las medicinales, se han usado desde la antigüedad. Este patrimonio cultural ha sido difundido por generaciones, de manera que algunas de estas costumbres aún se ejercen de manera cotidiana hasta el día de hoy en todo el país. México ocupa el segundo lugar mundial en registro de plantas medicinales y en la mayoría de los casos se desconoce los compuestos activos relacionados a sus propiedades terapéuticas (Cruz Pérez et al., 2021).

Dentro de las especies que tienen un amplio uso en México se encuentra *Justicia spicigera* Schltdl. (Acanthaceae) (Vega-Avila et al., 2012), conocida comúnmente como muicle o muitle. Sus antecedentes de uso están ampliamente documentados; así, por ejemplo, se utiliza como agente tintóreo, para curar disentería, diabetes, leucemia, anemia y enfermedades de índole cultural como susto y aire, (Atlas de la medicina tradicional de México, 2009). Por esta razón la planta ha sido objeto de múltiples estudios farmacológicos.

Las propiedades tintóreas de esta planta también han sido investigadas debido al uso de los pigmentos en varias artesanías y tejidos mexicanos, desde tiempos prehispánicos (Arberet et al., 2021). Lo anterior es con el fin de establecer las similitudes y diferencias del añil con la intención de incluirlo en los alimentos (Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, 2014).



**Figura 2.** Flores y hojas de *Justicia spicigera* Schltld.  
*Foto de cortesía por: Dra. Araceli Pérez*

## 2.2. Química y farmacología de *J. spicigera*

Debido al amplio uso de la planta en la medicina tradicional, se han reportado múltiples estudios farmacológicos de diferentes extractos hidroalcohólicos y acuosos de las partes aéreas de *J. spicigera*, los cuales han demostrado poseer actividad citotóxica (Cáceres-Cortés et al., 2001; Fernández-Pomares et al., 2018), anticancerígena (Jacobo-Salcedo et al., 2011), inmunomoduladora (Alonso-Castro et al., 2012), antihipertensiva (Esquivel-Gutiérrez et al., 2013), antidiabética (Ortiz-Andrade et al., 2012), ansiolítica, anticonvulsivante (González-Trujano et al., 2017),

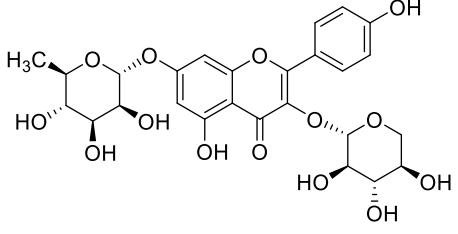
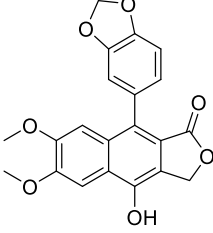
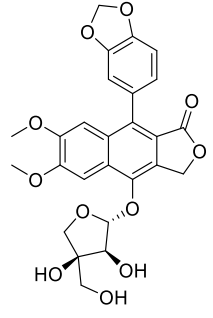
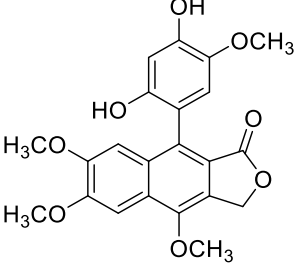
antibacteriana y antifúngica (Vega-Avila et al., 2012), antiparasitaria (E. Awad et al., 2018), espasmolítica (Ángeles-López et al., 2021), antiinflamatoria (Meckes et al., 2004) y antinociceptiva (Zapata-Morales et al., 2016).

De acuerdo con la exhaustiva revisión y análisis bibliográfico que presentó en su disertación escrita Montiel (2022), existen pocos metabolitos aislados e identificados para el género *Justicia* y particularmente para *Justicia spicigera*. Los estudios fitoquímicos revelan que esta planta está constituida principalmente por flavonoides (canferitrina, naringenina, kaempferol) (Esquivel-Gutiérrez et al., 2013; Euler & Alam, 1982), carotenoides, esteroides, alantoína (Domínguez et al. 1990), procumbenósido B (Perez Gutierrez et al., 2018) y algunos compuestos alifáticos (Vega-Avila et al., 2012). En la Tabla 1, se presentan metabolitos adicionales que no fueron incluidos en esta revisión.

Respecto a la farmacología de los compuestos aislados de *J. spicigera*, se mencionan a continuación algunas de las propiedades que disponen los principales metabolitos de la planta, como son canferitrina, procumbenósido B y alantoína.

En el caso de la canferitrina, destacan principalmente los estudios para evaluar su actividad como antiinflamatorio, antinociceptivo (De Melo et al., 2009) y antidiabético (De Sousa et al., 2004). Procumbenósido B demostró actividad antiinflamatoria (Perez Gutierrez et al., 2018) y finalmente, el compuesto alantoína demostró actividad antiinflamatoria, antinociceptiva (Florentino et al., 2016; Lee et al., 2010) y antidiabética (Tsai et al., 2014). Para conocer más detalles de la especie sobre su química y farmacología, existe un trabajo monográfico de actualización publicado (Montiel, 2022).

**Tabla 1.** Metabolitos aislados de *Justicia spicigera* reportados en la literatura.

Estructura	Nombre	Referencia
	<p>3-O-α-L-arabinopiranosido-7-O-α-L-ranopiranosido kaempferol</p>	<p>(Girón, 2015)</p>
	<p>Difilina</p>	<p>(Gutierrez &amp; Flores, 2018)</p>
	<p>Tuberculatina</p>	<p>(Gutierrez &amp; Flores, 2018)</p>
	<p>Cilinaftalida C</p>	<p>(Gutierrez &amp; Flores, 2018)</p>



## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las plantas medicinales son un recurso natural muy importante en México ya que son usadas aún en muchas comunidades rurales e indígenas, y también forman parte del autocuidado doméstico. Dentro de las plantas más consumidas en México se encuentra *J. spicigera*, la cual se recurre a ella para tratar la diabetes, como anticancerígena, antihipertensiva, antidisentérica, anticonvulsiva, para trastornos estomacales, para la anemia, para “limpiar” la sangre, por mencionar las más importantes (Araiza, 2000). Por lo que respecta a su composición química, hasta la fecha se conocen pocos metabolitos de esta importante especie vegetal, y por lo tanto no se han podido esclarecer aún todos los mecanismos de acción relacionados a las múltiples propiedades farmacológicas demostradas para la planta. Por esta razón, es importante identificar cuáles serían los principios activos que podrían en algún momento, brindar oportunidades para la generación de nuevos fármacos. Por otra parte, y no menos importante, conocer los metabolitos de las plantas, nos lleva también a comprender la diversidad química con la que cuentan las especies vegetales, no solo para conocer sus procesos de defensa (Sepúlveda Jiménez et al., 2003), sino también para poder identificar relaciones quimiotaxonomicas, lo que pueden llegar a ser muy importante dentro de la sistemática de plantas (Alonso-Castro et al., 2011).

Adicional a lo anterior, es importante mencionar que *J. spicigera* no se encuentra en ninguna de las tres ediciones actuales de la Farmacopea Herbolaria Mexicana, por lo que carece de estándares de calidad para productos elaborados a base de esta, de manera que se vuelve apremiante realizar sus estudios de composición.

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo general del presente trabajo es, caracterizar la mayor cantidad posible de metabolitos presentes en un extracto acuoso obtenido de las partes aéreas secas de *Justicia spicigera*.

Para el cumplimiento de este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

-Preparar un extracto acuoso por infusión, esto debido a que es uno de los preparados tradicionales de mayor uso de la planta.

-Realizar una extracción líquido-líquido de la infusión utilizando como disolvente orgánico, acetato de etilo (AcOEt), con la finalidad de disminuir la complejidad del extracto inicial.

-Realizar el estudio fitoquímico de la fracción de AcOEt aplicando técnicas cromatográficas convencionales, con la finalidad de aislar la mayor cantidad de metabolitos.

-Realizar el análisis espectroscópico y espectrométrico de los compuestos aislados, con la finalidad de establecer inequívocamente sus estructuras.

### **3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Material Vegetal**

Las partes aéreas de la especie vegetal *Justicia spicigera* fueron colectadas por la Dra. Araceli Pérez Vásquez en el municipio de San Pedro Jicayan, Jamiltepec, estado de Oaxaca en marzo 2017 y fueron identificadas por el Dr. Rafael Torres Colín en el Instituto de Biología, UNAM. En el Herbario Nacional (MEXU) se conserva un ejemplar de referencia con el número de voucher 1465410. Adicionalmente, se obtuvo un segundo lote comercial de las partes aéreas de *J. spicigera*, adquirido en el mercado “La Bola” en Coyoacán, Ciudad de México en diciembre de 2018.

El material vegetal fue sometido a un proceso de desecación a temperatura ambiente y posteriormente fue fragmentado en un molino de cuchillas de Willey modelo 4 (tamaño de la malla 2 micras).

## 3.2. Procedimientos generales

### 3.2.1. Análisis cromatográficos

El análisis cromatográfico en capa delgada (CCD) se realizó en placas de aluminio de diferentes dimensiones, recubiertas con una capa de gel de sílice 60 F254 (Merck). El sistema de elución utilizado fue una mezcla de AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (85:10:5). Para la visualización de las placas se empleó luz UV ( $\lambda = 254$  y 365 nm) y agentes cromógenos como sulfato cérico amoniacal y 4-anisaldehído (0,5 mL de 4-anisaldehído, 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mL de AcOH glacial y 85 mL de CH<sub>3</sub>OH), seguido de calentamiento (110° C aprox.) para desarrollar color.

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó en columnas de vidrio de diferentes capacidades, empacadas con gel de sílice y Sephadex LH-20 (Pharmacia). Como fase móvil, se utilizaron diferentes mezclas de AcOEt/MeOH para gel de sílice y en el caso de Sephadex LH-20 se utilizó Acetona/MeOH y MeOH (100%) en diferentes proporciones.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (LC-EM) se realizó en un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 equipado con un detector de triple cuadrupolo (QqQ) LC/MS 6410 y como modo de ionización se empleó al electrospray en modalidad positivo y negativo. La determinación del perfil cromatográfico del extracto acuoso total y de la fracción de AcOEt de *J. spicigera* se realizaron en una columna ZORBAX Extend-C-18 con un tamaño de partícula 5 $\mu$ m, un diámetro interno 4.6 mm y una longitud de 150 mm. Se utilizó como fase móvil un gradiente ácido fórmico al 0.1% (A)-ACN 100% (B): 0 min, 5% B; 10 min 5% B; 20 min 95% B; 30 min 95% B; 32 min 5% B Flujo: 0.50 mL/min.

### 3.2.3. Determinación de constantes espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H) y de carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C) fueron obtenidos con un equipo, marca Varian VNMRS, operados a una radiofrecuencia de 400 MHz (9.4 T) y se analizaron con el software MestReNova (v12.0.2). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en unidades de ppm con referencia a las señales del disolvente residual (DMSO-d<sub>6</sub>, CD<sub>3</sub>OD o CDCl<sub>3</sub>) o al Tetrametilsilano (TMS). Las mediciones UV se realizaron con un espectrofotómetro UV-vis Perkin- Elmer Lambda 2. Los espectros IR se realizaron en espectrofotómetro de FTIR/FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer. Estos análisis se llevaron a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

### 3.2.4. Preparación de la infusión de la planta *J. spicigera* y de la fracción de AcOEt

450 g de partes aéreas secas y molidas de *J. spicigera* colectadas en Oaxaca se extrajeron por infusión con 45 L de agua destilada durante 30 minutos. Posteriormente, se filtró y se sometió a un proceso de reparto con AcOEt (3 X 45 L). Las fracciones orgánicas resultantes fueron reunidas, se filtraron y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrido y finalmente se concentraron al vacío, para obtener 3.7 g (residuo color púrpura) de la fracción primaria de AcOEt.

La fracción de AcOEt fue sometida a un fraccionamiento por cromatografía en columna abierta (CCA), sobre gel de sílice desactivada al 20% con agua desionizada, usando como gradiente de elución Hexano-CHCl<sub>3</sub>-MeOH (90:10→0:100→80:20). Lo anterior, permitió la obtención de 38 fracciones (**F1-F38**).



### **3.2.5. Aislamiento de 2-*N*-(*p*-Coumaroil)-3-*H*-fenoxazin-3-ona (1)**

La fracción F8 fue seleccionada para realizar un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta empacada con Sephadex LH-20 en MeOH (100%). Del procedimiento anterior, se obtuvieron 15 fracciones (F8-1–F8-15), las cuales fueron analizadas por CCD y fueron reunidas por similitud cromatográfica. De las fracciones F8-7-F8-13, se obtuvieron 16 mg del compuesto **1**.

### **3.2.6. Aislamiento de 3"-*O*-acetil-canferitrina (2)**

Se realizó un fraccionamiento secundario a F29 por medio de una cromatografía en columna abierta, donde se utilizó como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil la mezcla de Acetona-MeOH (95:5). Se obtuvieron 15 fracciones (F29-1-F29-15) y fueron analizadas por medio CCD. Las fracciones F29-8-F29-10 fueron reunidas por similitud cromatográfica obteniendo 15 mg del compuesto **2**.

### **3.2.7. Aislamiento de Canferitrina (3)**

De la fracción F31, se observó un compuesto puro pero pigmentado, se realizaron múltiples lavados con MeOH para la obtención de 85 mg del compuesto **3**.

### **3.2.8. Aislamiento de compuesto 7-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosido de Canferol (4)**

La fracción F23 fue sometida a un fraccionamiento secundario por CCA sobre Sephadex LH-20, se utilizó como sistema de elución Acetona-MeOH (80:20). De lo anterior, se obtuvieron 8 fracciones (F23-1 – F23-8), las cuales fueron analizadas

por CCD y reunidas por similitud cromatográfica. La fracción F23-3 se purificó mediante CCA empacada con Sephadex LH-20, se utilizó como fase móvil MeOH (100%). De lo anterior, se obtuvieron 5 mg del compuesto **4**.

### **3.2.9. Aislamiento de la 2,5-dimetoxibenzoquinona (6)**

La fracción F4 fue sometida a múltiples lavados con MeOH, lo que permitió la obtención de 20 mg del compuesto **6**.

### **3.2.10. Aislamiento de 4-hidroxifenil-(6'-O-[4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxibenzoato]) de $\beta$ - D-glucopiranosido (7)**

La fracción F25, se purificó por cromatografía de columna abierta sobre Sephadex LH-20, como sistema de elución se utilizó MeOH (100%). Se obtuvieron 10 fracciones (F25-1-F25-10) fueron analizadas por CCD. La fracción F25-6 permitió la obtención de 5 mg del compuesto **7**.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

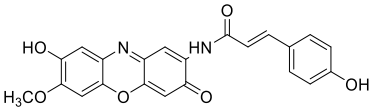
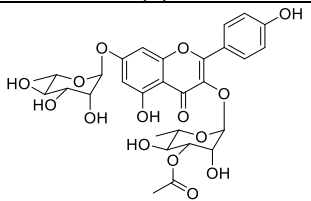
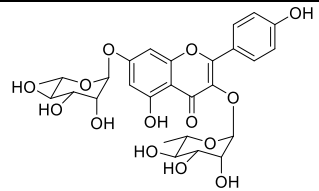
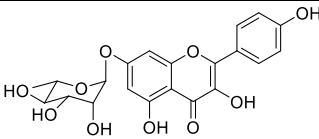
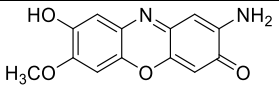
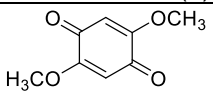
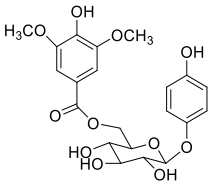
La especie vegetal *Justicia spicigera* fue seleccionada en este trabajo para una reinvestigación química considerando el criterio etnomédico de preselección de materias primas. De acuerdo con la información reunida por Montiel Cervantes (2022) en su tesis monográfica, la especie cuenta una gran reputación en nuestro país para tratar diferentes dolencias. Por esta razón, diferentes extractos han sido usados para comprobar varios de los efectos terapéuticos que se le atribuyen a la planta, lo que permite confirmar que es una de las especies más importantes dentro de la Medicina Tradicional de México. Esta importancia fitoterapéutica contrasta con lo reportado hasta la fecha para su composición química, ya que existen pocas investigaciones que aportan información sobre compuestos aislados y estructuralmente caracterizados inequívocamente. Por lo tanto, con la finalidad de contribuir al conocimiento de la composición química de *J. spicigera*, en este trabajo se seleccionó a la infusión como objeto de estudio, ya que es uno de los preparados tradicionales de mayor uso. A partir de la infusión se obtuvo una fracción de acetato de etilo (AcOEt) por extracción líquido-líquido, la cual, después de secarse in vacuo, se fraccionó por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Algunas fracciones obtenidas fueron seleccionadas para separaciones subsecuentes por columna abierta sobre sephadex LH-20 y/o gel de sílice. De estas separaciones se obtuvieron seis compuestos (**1-4, 6 y 7**), de los cuales **1 y 2** no están reportados en la literatura (Tabla 2). La estructura **1** corresponde a un compuesto nitrogenado de tipo 3*H*-fenoxazin-3-ona con un residuo de coumárico, y la estructura **2** a un derivado de canferitrina con un residuo de éster de acetato, unido a un carbono de una de las dos ramnosas. Los compuestos **4, 6 y 7**, ya se han aislados de otras especies vegetales, sin embargo, es la primera vez que se reportan para *J. spicigera*. La estructura **3** corresponde a la canferitrina.

Por lo que respecta al compuesto **5**, esta fue previamente aislado de *J. spicigera* por Montaña Cruz (2021) en una primera reinvestigación, y reportado en su tesis de licenciatura, sin embargo, se hace una corrección a la estructura, ya que no corresponde a un derivado de tipo flourenona como primeramente se planteó.



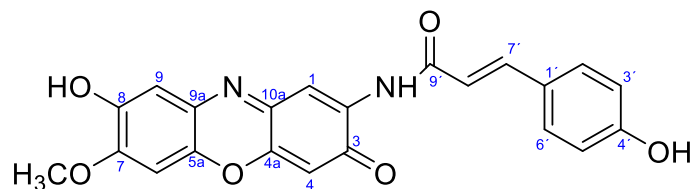


**Tabla 2.** Compuestos aislados de *J. spicigera*.

Estructura	Cantidad	Observaciones
 <p>2-<i>N</i>-(<i>p</i>-Coumaroil)-3<i>H</i>-fenoxazin-3-ona <b>(1)</b></p>	16 mg	Sin reportes de aislamiento
 <p>3''-<i>O</i>-Acetil-Canferitrina <b>(2)</b></p>	15 mg	Sin reportes de aislamiento
 <p>Canferitrina <b>(3)</b></p>	85 mg	Aislada previamente de <i>J. spicigera</i> , entre otras especies. (Euler & Alam, 1982)
 <p>7-<i>O</i>-Ramnósido de Canferol <b>(4)</b></p>	5 mg	Aislado previamente de: - <i>Aconitum vulparia</i> Rchb (Ranunculaceae) (Fico et al., 2003) - <i>Bryophyllum pinnatum</i> (Crassulaceae) (Tatsimo et al., 2012)
 <p>7-<i>O</i>-Ramnósido de Canferol <b>(4)</b></p>	16mg	Aislada previamente de: - <i>Peristrophe bivalvis</i> (Acanthaceae) (Thuy, TT et al., 2012)
 <p>Perisbivalvina B <b>(5)</b> *</p>	20 mg	Aislada previamente de: - <i>Phyllostachis nigra</i> (Poaceae) (Tamotsu et al., 1984) - <i>Plumeria rubra</i> (Apocynaceae) (Kardono et al., 1990)
 <p>2,5-Dimetoxiquinona <b>(6)</b></p>	5 mg	Aislado previamente de: - <i>Clematis parviloba</i> (Ranunculaceae) (Yan et al., 2010) - <i>Leea asiática</i> (Leeaceae) (Kil et al., 2019)
<p>4-Hidroxifenil-(6'-<i>O</i>-[4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxibenzoato]) de <math>\beta</math>-D-glucopiranosido <b>(7)</b></p>		

\*Aislado previamente por Montaña Cruz, 2021, pero la estructura se corrige en este trabajo.

#### 4.1. Elucidación estructural de la 2-*N*-(*p*-coumaroil)-3*H*-fenoxazin-3-ona (1)

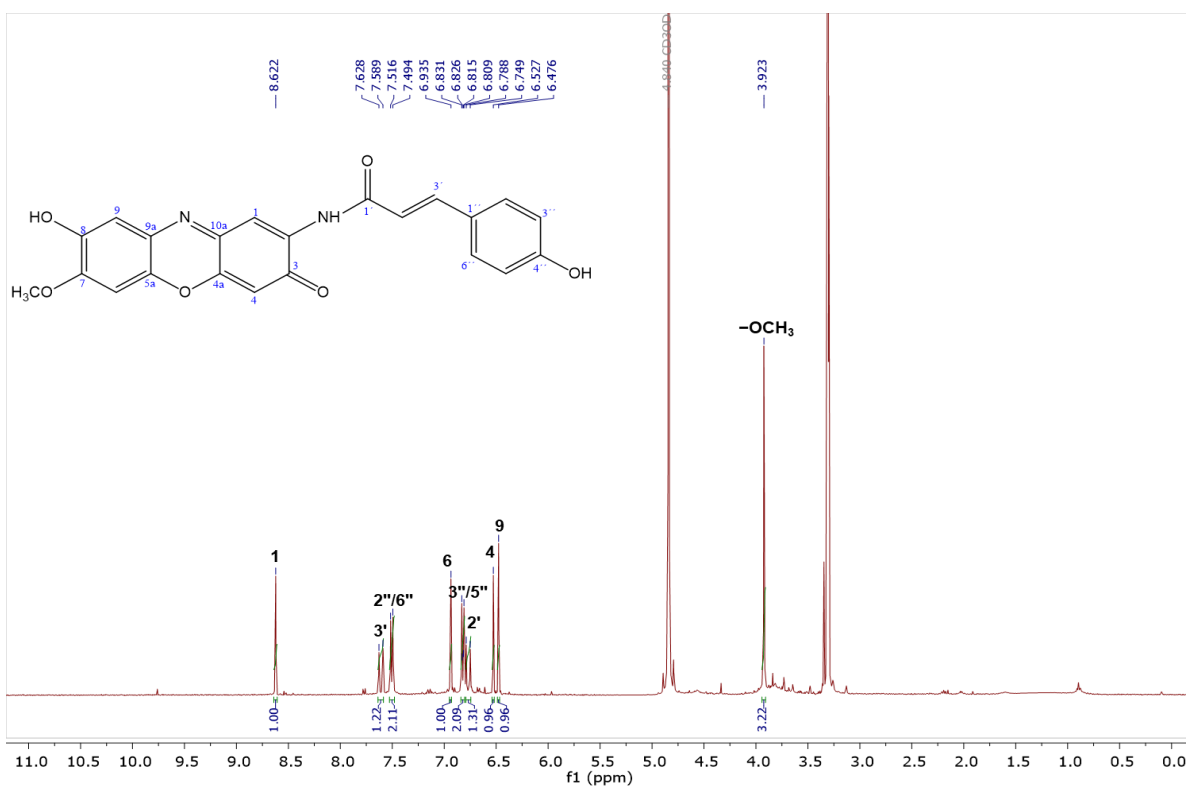


El compuesto **1** se aisló como un sólido vitreo rojo oscuro soluble en metanol, acetonitrilo y mezclas de metanol-agua. En el espectro de Infrarrojo (IR) se observan bandas de absorción características para grupos OH en  $\nu_{\max}$  3286  $\text{cm}^{-1}$ , para carbonilo de amida conjugada en  $\nu_{\max}$  1590  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro en el UV presentó tres bandas de absorción en  $\lambda$  224, 291 y 601 nm, esta última explica en parte su característico color oscuro de la molécula.

Su espectro de masas en alta resolución obtenido por el método electrospray en modo positivo (HRESIMS, por sus siglas en inglés) presentó un ion molecular de  $m/z$  405.1090  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (masa exacta calculada: 405.1081 uma,  $\Delta_{\text{ppm}} = 2.2$ ), que corresponde para la fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6^+$ . La molécula presenta un índice de instauración de 16.

Por lo que respecta a los espectros de RMN mono y bidimensionales, estos se obtuvieron tanto en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , como en  $\text{DMSO}-d_6$  (Figuras 5-8, Ver anexos: Figuras 22-28) y en los dos se observan señales muy similares para las phenoxazinonas reportadas en *P. bivalvis*. Así, en los espectros de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  se detectaron en la región de los aromáticos, cuatro singuletes correspondientes al residuo de 3*H*-phenoxazin-3-ona en  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 8.62 (H-1), 6.53 (H-4), 6.94 (H-6) y 6.48 (H-9) y que están en armonía con las reportadas para la perisbivalvina A (Thuy et al., 2012a). Tanto la perisbivalvina A como el compuesto **1**, presentan una señal característica para el protón de la amida a  $\delta_{\text{H}}$  9.02 (NH) detectada en el espectro obtenido en  $\text{DMSO}-d_6$  (Figura 7). Por lo que respecta a las señales correspondientes al residuo de coumárico, estas son perfectamente distinguibles, apareciendo en  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) a 160.9 (C-4'), 127.7 (C-1'), 7.51 (H-2', H-6')/131.0

(C-2', C-6'), 6.82 (H-3', H-5')/116.8 (C-3', C-5'), 7.61 (H-7')/143.3 (C-7') y 6.77 (H-8')/118.8 (C-8'). Las señales en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) que corresponden al anillo aromático ( $\delta_H$  7.51 y 6.82) integran para dos protones cada una, formando un sistema de tipo AA'BB' con valores de  $J = 8.5$  MHz, cada una. También se observan dos señales en  $\delta_H$  (CD<sub>3</sub>OD) 7.61 y 6.77, que pertenecen a los protones vinílicos y que de acuerdo con sus constantes de acoplamiento ( $J = 15.6$  MHz), corresponde al isómero *trans*.



**Figura 5.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>) del compuesto **1**.

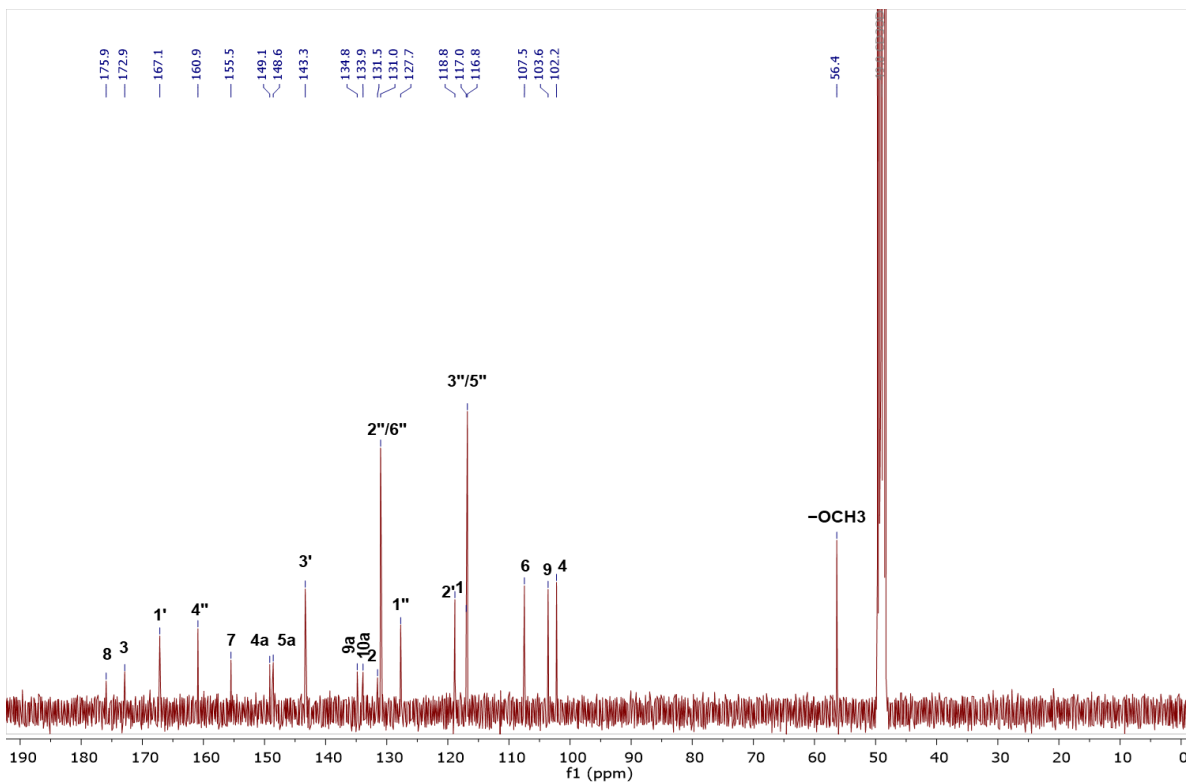


Figura 6. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto 1.

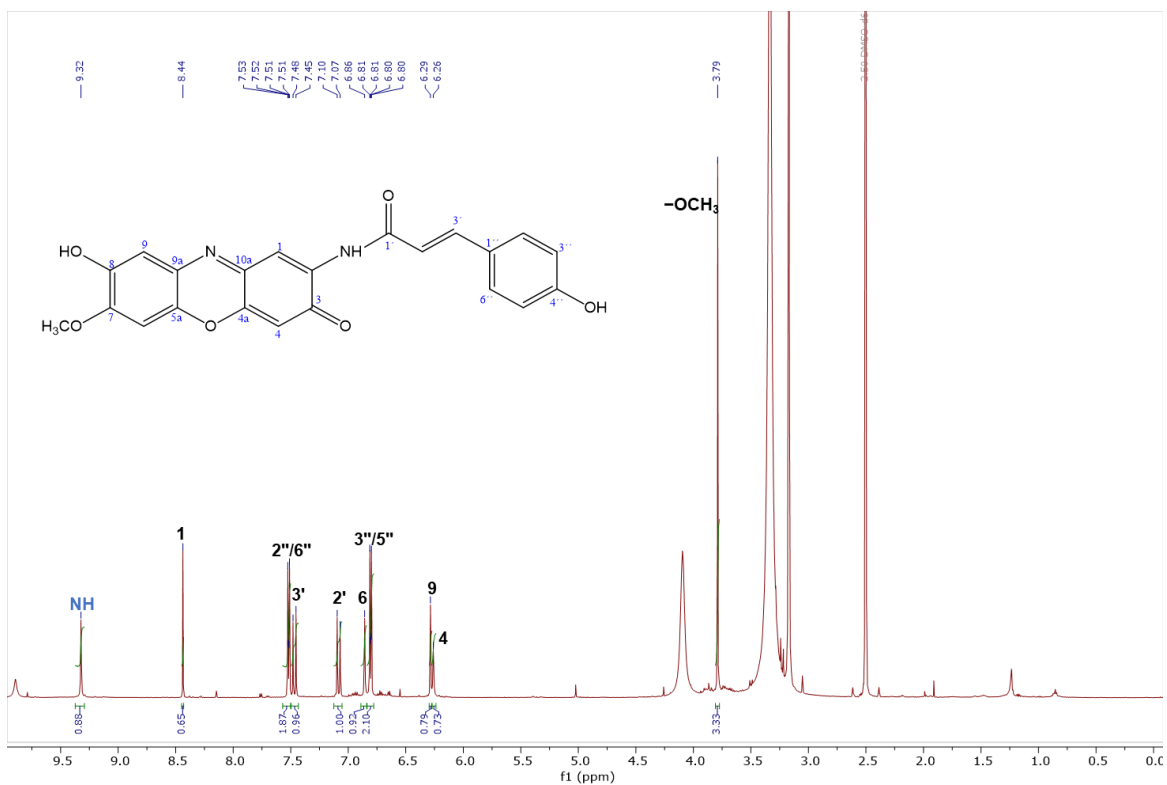
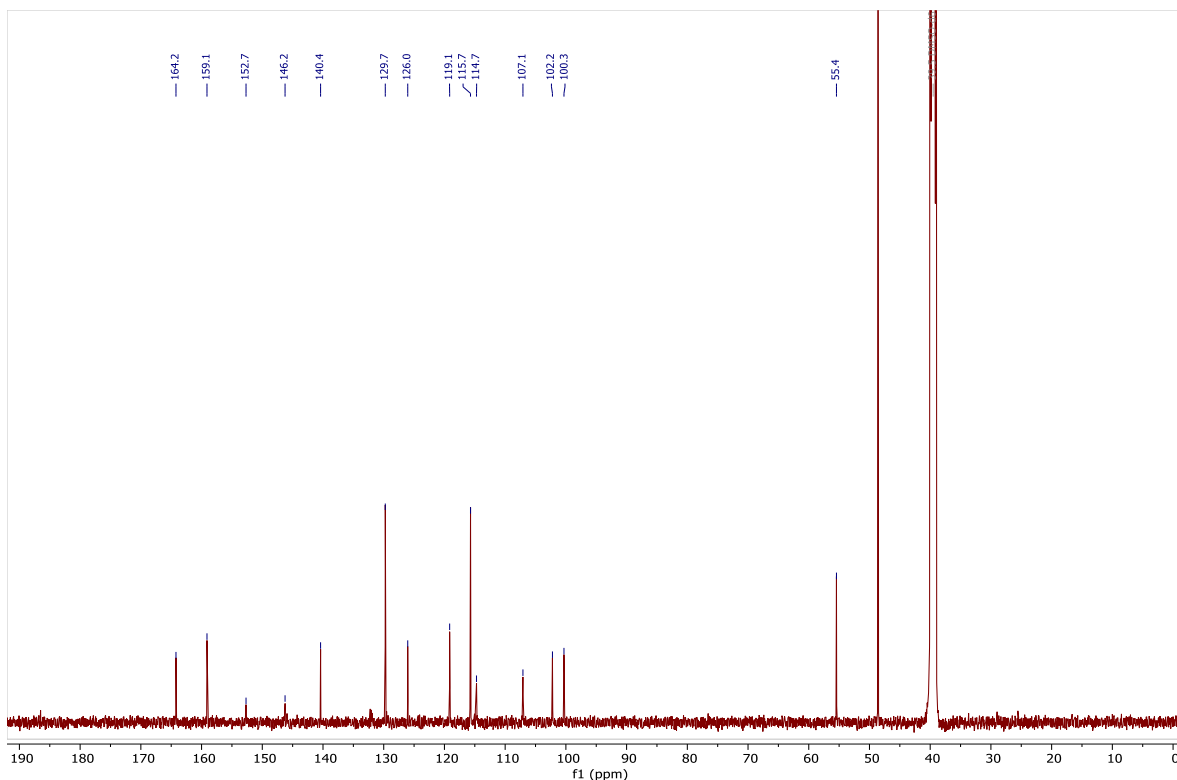
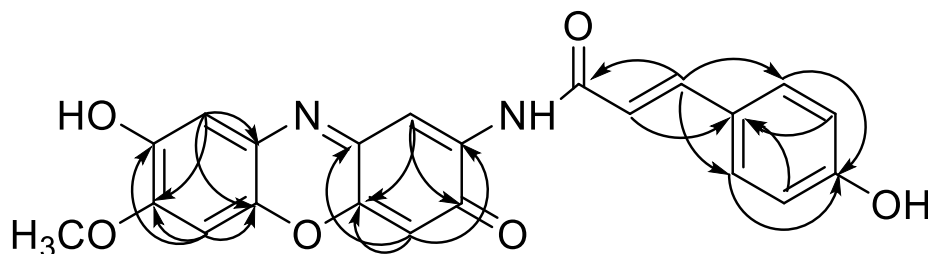


Figura 7. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) del compuesto 1.

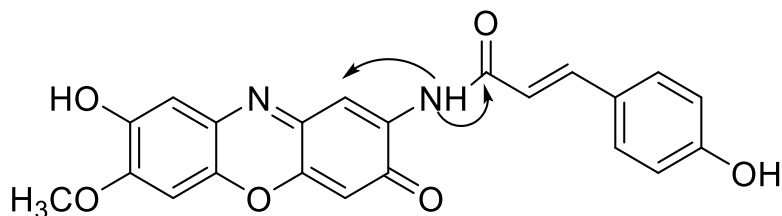


**Figura 8.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) del compuesto 1.

Las correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC permitieron confirmar la conectividad entre hidrógenos y carbono tanto del residuo de la 3*H*-phenoxazin-3-ona, como del coumárico (Figura 9). También, por medio del análisis de las correlaciones en HMBC obtenido con DMSO, se pudo confirmar la unión del coumárico mediante un enlace amida, entre estos dos residuos (Figura 10).



**Figura 9.** Correlaciones observadas en HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para la molécula 1.



**Figura 10.** Correlaciones importantes observadas en HMBC (DMSO- $d_6$ ) para la molécula **1**.

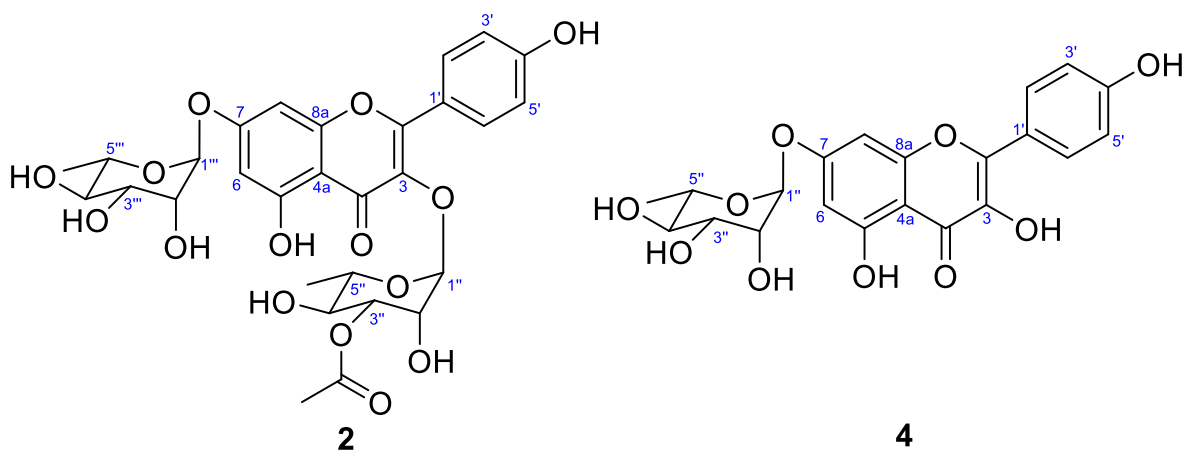
Toda esta información permite confirmar que la estructura **1** es un derivado de tipo 3*H*-phenoxazin-3-ona. La búsqueda en las bases de datos Sci Finder y PubMed, confirma también que no se encuentra reportada aún. En la tabla 3 se presentan los valores de desplazamiento en DMSO- $d_6$  y CD<sub>3</sub>OD que se detectaron para esta molécula.

**Tabla 3.** Datos espectroscópicos en DMSO- $d_6$  y CD<sub>3</sub>OD- $d_4$  para el compuesto **1**.

no.	DMSO- $d_6^a$			CD <sub>3</sub> OD- $d_4^a$		
	$\delta_c$	$\delta_H$ (J en Hz)	HMBC (H→C)	$\delta_c$	$\delta_H$ (J en Hz)	HMBC (H→C)
1	114.7	8.44 s	C-2	117.0	8.62 s	C-3, C-4a
2	146.3	-	-	131.5	-	-
3	**	-	-	172.9	-	-
4	102.7	6.26 s		102.2	6.53 s	C-2, C-4a, C-10a
4a	146.2	-	-	148.6	-	-
5a	**	-	-	149.1	-	-
6	107.1	6.86 s	C-8	107.5	6.94 s	C-5a, C-7, C-8
7	152.7	-	-	155.5	-	-
8	146.1	-	-	175.9	-	-
9	100.3	6.29 s	C-9a	103.6	6.48 s	C-9a, C-5a, C-7
9a	132.5	-	-	134.8	-	-
10a	146.1	-	-	133.9	-	-
1'	126.1	-	-	127.7	-	-
2'	129.7	7.53, d (8.5)	C-3', C-4''	131.0	7.51 d (8.6)	C-4''
3'	115.7	6.81, d (8.5)	C-1''	116.8	6.82 d (8.6)	C-1''
4'	159.1	-	-	160.9	-	-
5'	115.7	6.81, d (8.5)	C-1''	116.8	6.80 d (8.6)	C-1''
6'	129.7	7.53, d (8.5)	C-4''	131.0	7.51 d (8.6)	C-4''
7'	140.4	7.48, d (15.6)	C-1'	143.3	7.61 d (15.6)	C-1', C-2'', C-6''
8'	119.1	7.10, d (15.6)	C-1''	118.8	6.77 d (15.6)	C-1''
9'	164.2	-	-	167.1	-	-
7-	55.4	3.79 s	C-7	56.4	3.92 s	C-7
OMe						
NH	-	9.32 brs	C-1, C-1'	-	-	-

<sup>a</sup> RMN-<sup>1</sup>H a 400 MHz <sup>13</sup>C a 100 MHz. \*\*No detectado

## 4.2. Elucidación estructural de los compuestos 3''-O-acetil-canferitrina (2) y de 7-O-ramnósido de canferol (4)



Los compuestos **2** y **4** presentan como característica similar que contienen como aglicona al kampferol, así como residuos de ramnosa. Los dos se aislaron como sólidos amorfos blanquecinos solubles en metanol y mezclas de acetonitrilo-agua. Sus fórmulas moleculares fueron establecidas como  $C_{29}H_{32}O_{15}$  para **2** y  $C_{21}H_{20}O_{10}$  para **4**. También se aislaron cantidades adicionales de canferitrina (**3**) que, al ser un compuesto muy conocido y previamente reportado (Montaño Cruz, 2021), no se discutirá su elucidación.

El compuesto **2** es una entidad química nueva. Este presenta en el espectro de Infrarrojo (IR) bandas de absorción características para grupos OH en  $\nu_{\max}$  3368  $\text{cm}^{-1}$ , para grupo aromático en  $\nu_{\max}$  2930, 1595  $\text{cm}^{-1}$ , para carbonilo en  $\nu_{\max}$  1715, 1655  $\text{cm}^{-1}$  y para enlace C-O en  $\nu_{\max}$  1175  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro de UV presentó tres bandas en  $\lambda_{\max}$  a 204, 264 y 340 nm.

Para el caso del compuesto **4**, en el espectro de Infrarrojo (IR) se observan bandas de absorción características para grupos OH en  $\nu_{\max}$  3305  $\text{cm}^{-1}$ , para grupo aromático  $\nu_{\max}$  2924, 1589  $\text{cm}^{-1}$ , para carbonilo en  $\nu_{\max}$  1710, 1651  $\text{cm}^{-1}$  y para enlace C-O en  $\nu_{\max}$  1165  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro de UV presentó cinco bandas características para este tipo de flavonoides que se encuentran en  $\lambda_{\max}$  a 204, 253, 264, 322 y 363 nm.



Los datos de RMN mono y bidimensionales para el compuesto **4**, están en armonía con los reportados en la literatura (Fico, et al., 2003), lo que permite confirmar que se trata de 7-O-Ramnósido de canferol, un metabolito que se ha reportado en *Aconitum vulparia* Rchb (Ranunculaceae) (Fico et al., 2003), *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken (Crassulaceae) (Tatsimo et al., 2012), entre otras especies.

Por lo que respecta a los espectros de RMN del compuesto **2**, estos permitieron confirmar que se trata de un derivado de la canferitrina (**3**), presentando las señales perfectamente distinguibles para la aglicona de tipo canferol en la región aromática (ver tabla 4, Figura 11 y 12), así como las señales correspondientes a los dos residuos de sacárido, además de un residuo de éster de acetato en  $\delta_H/\delta_C$  2.14(3H, s, OAc-3'')/21.07 y  $\delta_C$  172.7 (OAc-3'').

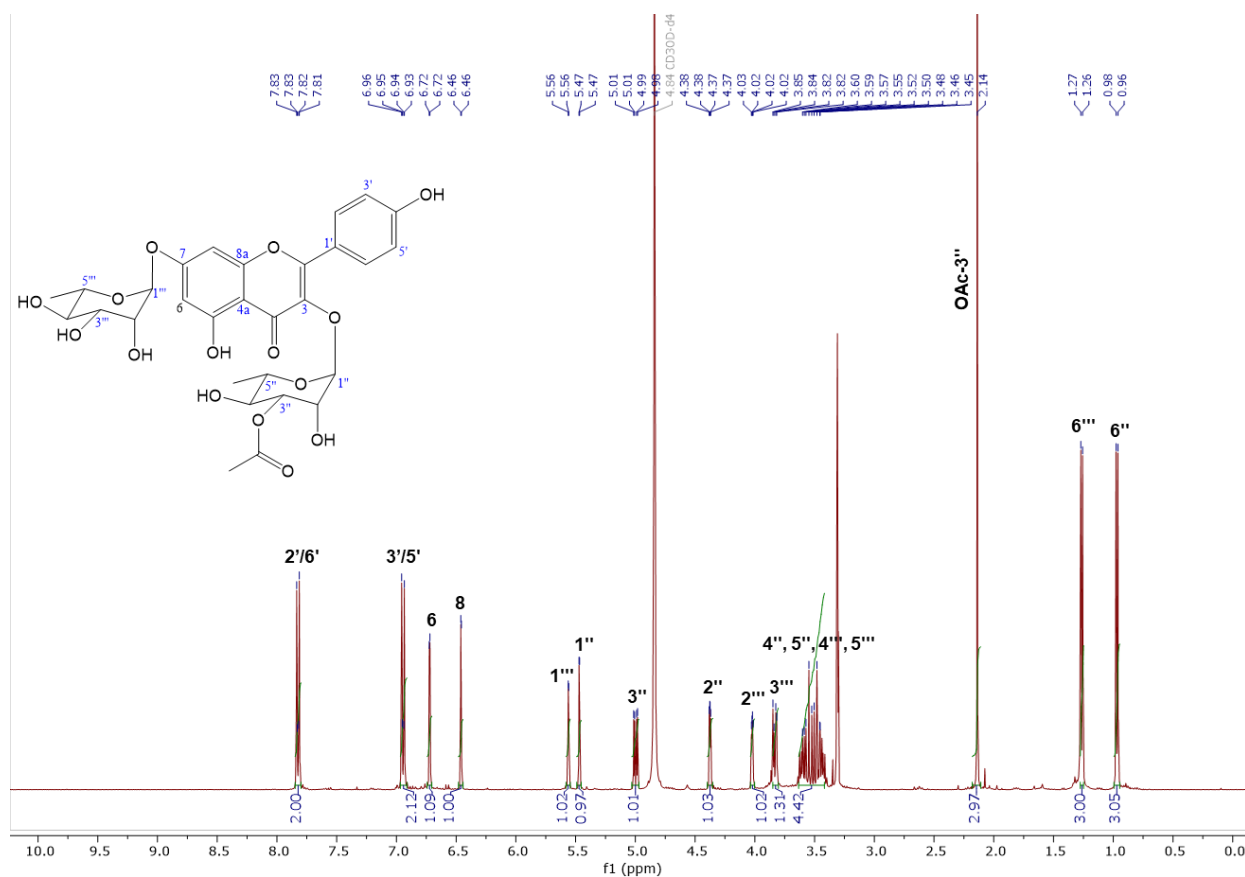
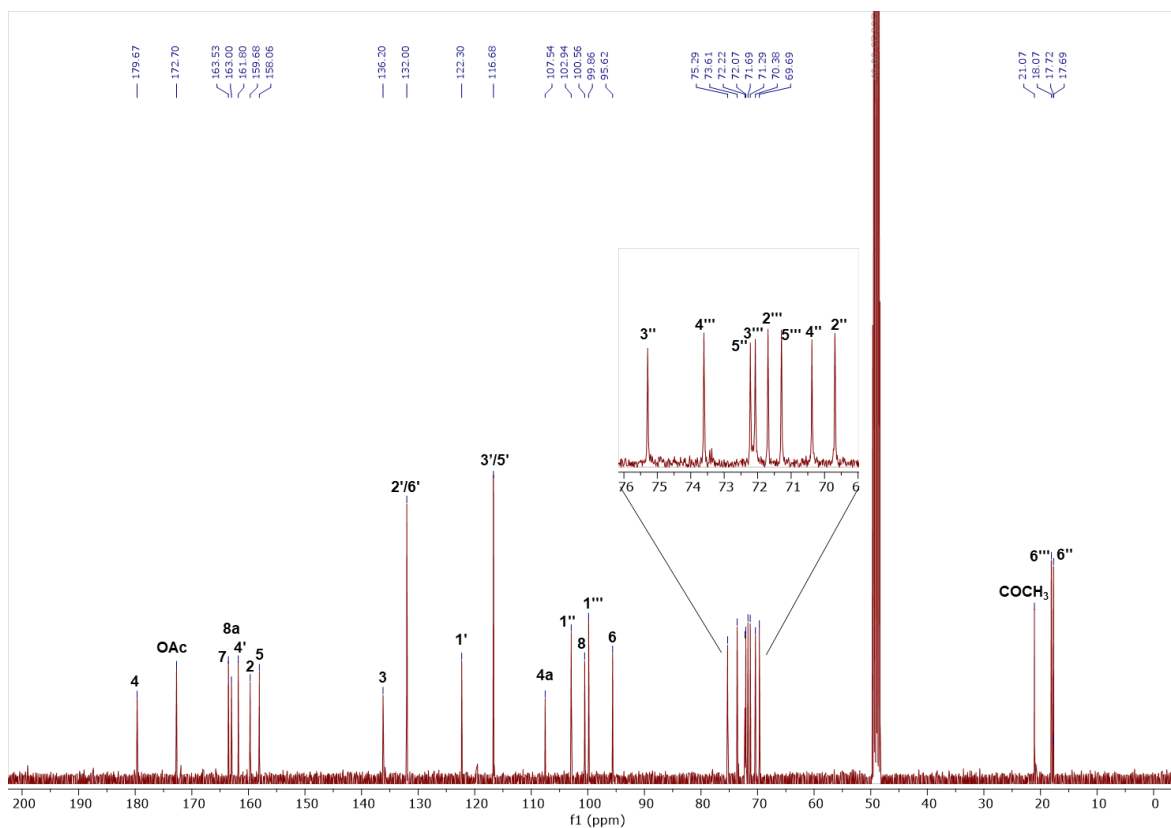


Figura 11. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto **2**.



**Figura 12.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto **2**.

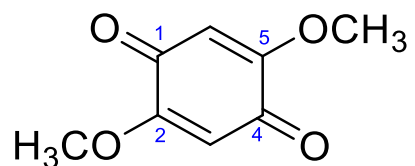
La unión del residuo de ácido acético en C-3'' ( $\delta_{\text{C}}$  75.3) de la ramnosa, unida a su vez al hidroxilo en C-3 de la aglicona, se confirmó analizando los espectro de HMBC, y COSY; en el primer experimento se observó la correlación a larga distancia entre protones del metilo (en  $\delta_{\text{H}}$  21.1) del éster acético y C-3'', y en el segundo, los cuadros de conectividad que permitieron determinar inequívocamente que el protón en  $\delta_{\text{H}}$  5.00 (1H, dd,  $J = 9.8, 3.2$  Hz) correspondía a H-3'', desplazado a campo más bajos debido a la presencia del residuo de acetato.

Todas estas evidencias permitieron confirmar que la estructura del compuesto **2** corresponde a un derivado de canferitrina al cual se le dio el nombre de 3''-O-acetil-canferitrina. Haciendo una búsqueda en las bases de datos especializadas se confirmó que aún no está reportada.

**Tabla 4.** Datos de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) de **2**, **3** y **4**.

no.	2		3		4	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (J en Hz)	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (J en Hz)	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (J en Hz)
2	159.7	-	159.8	-	158.0	-
3	136.2	-	136.5	-	134.8	-
4	179.7	-	179.7	-	179.9	-
5	158.1	-	158.1	-	161.0	-
6	100.6	6.46, d (2.2)	100.5	6.45, d (2.0)	100.0	6.76, d (2.1)
7	163.5	-	163.5	-	162.5	-
8	95.6	6.72, d (2.2)	95.6	6.71, d (2.1)	95.3	6.43, d (2.1)
4a	107.5	-	107.5	-	105.5	-
8a	163.0	-	163.0	-	156.7	-
1'	122.3	-	122.4	-	121.0	-
2'	132.0	7.82, d (8.8)	132.0	6.92, d (8.7)	130.9	8.12, d (8.8)
3'	116.7	6.94, d (8.8)	116.6	7.78, d (8.4, 1.5)	116.4	6.91, d (8.8)
4'	161.8	-	161.8	-	161.9	-
5'	116.7	6.94, d (8.8)	116.6	7.78, d (8.4, 1.5)	116.4	6.91, d (8.8)
6'	132.0	7.82, d (1.8)	132.0	6.92, d (8.7)	130.9	8.12, d (8.8)
1''	102.9	5.47, d (1.8)	103.5	5.35, d (1.7)	99.9	5.56, d (1.8)
2''	69.7	4.38, dd (3.2, 1.8)	69.9	4.18, dd (3.4, 1.8)	71.7	4.02, dd (3.5, 1.8)
3''	75.3	5.00, dd (9.8, 3.2)	72.0	3.82, dd (9.4, 3.5)	72.1	3.83, dd (9.4, 3.5)
4''	70.4	3.65-3.40 m	73.6	3.47, dd (9.5, 6.1)	73.6	3.48, t (9.4)
5''	72.2	3.65-3.40 m	71.3	3.59, dq (9.5, 6.1)	71.8	3.63, dd (9.5, 6.2)
6''	17.7	0.97, d (6.1)	17.7	0.89, d (5.6)	18.1	1.26, d (6.2)
1'''	99.9	5.56, d (1.8)	99.8	5.52, d (1.8)	-	-
2'''	71.7	4.02, dd (3.4, 1.8)	71.9	4.0, dd (3.4, 1.8)	-	-
3'''	72.1	3.83, dd (9.5, 3.5)	72.1	3.79, dd (9.4, 3.5)	-	-
4'''	73.6	3.65-3.40 m	73.6	3.35-3.32 m	-	-
5'''	71.3	3.65-3.40 m	71.3	3.35-3.32 m	-	-
6'''	18.1	1.26, d (6.1)	18.1	1.22, d (6.1)	-	-
OAc-3''	21.1	2.14, s	-	-	-	-
OAc-3'''	172.7	-	-	-	-	-

### 4.3. Elucidación estructural de 2,5-dimetoxiquinona (6)



El compuesto **6** fue aislado como sólido cristalino de color amarillo medianamente soluble en metanol y poco soluble en cloroformo, acetato de etilo y hexano.

En su espectro al infrarrojo se observan bandas características para un sistema carbonílico conjugado en  $\nu_{\max}$  1661  $\text{cm}^{-1}$  y para el sistema  $\pi$  cíclico, correspondiente a la presencia de  $\text{C}=\text{C}$  en  $\nu_{\max}$  3061 y 1590  $\text{cm}^{-1}$  y para la presencia del enlace  $\text{C}-\text{O}$  en  $\nu_{\max}$  1191  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro en el UV presentó dos bandas en  $\lambda_{\max}$  a 277 y 282 nm.

Su espectro de masas en alta resolución obtenido por el método electrospray en modo positivo (HRESIMS, por sus siglas en inglés) presentó un ion molecular de  $m/z$  169.0496  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (masa exacta calculada: 169.0495 uma,  $\Delta_{\text{ppm}} = 0.5$ ), que corresponde para la fórmula molecular  $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_4^+$ .

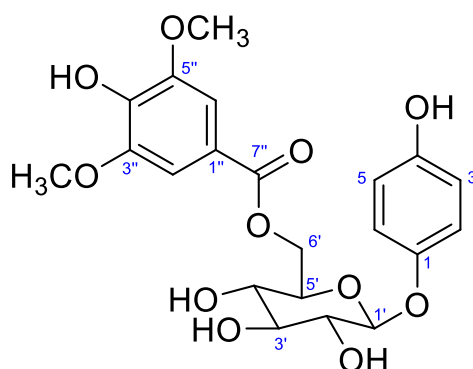
El espectro de RMN  $^1\text{H}$  presenta únicamente dos señales, una en  $\delta_{\text{H}}$  5.87, que integra para un protón y que corresponde para los protones H-3 y H-6 del sistema insaturado y otra en  $\delta_{\text{H}}$  3.85, que integra para tres y que corresponde a los protones del grupo  $\text{OCH}_3$ .

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se detectan cuatro señales, una en  $\delta_{\text{C}}$  181.80 que confirma la presencia de los dos carbonos carbonílicos en C-1 y C-4, otra en  $\delta_{\text{C}}$  159.71 que corresponde a los carbonos C-2 y C-5, otra en  $\delta_{\text{C}}$  105.62 que corresponde a los carbonos C-3 y C-6, y otra más en  $\delta_{\text{C}}$  56.75 que corresponde al carbono del residuo  $-\text{OCH}_3$ .

Todas estas señales están en armonía con las reportadas por Kim et al., (2001), lo que permite confirmar que la estructura **7** corresponde la 2,5-dimetoxiquinona. Este metabolito, después de la canferitrina es uno de los más

abundantes presentes en *J. spicigera*, sin embargo, este trabajo es el primer reporte de su aislamiento en esta planta.

#### 4.4. Elucidación estructural de 4-hidroxifenil-(6'-O-[4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxibenzoato]) de $\beta$ -D-glucopiranosido (7)



El compuesto **7** se aisló como sólido amorfo de color café soluble en metanol, cuya fórmula molecular corresponde a  $C_{21}H_{24}O_{11}$ . En el espectro Infrarrojo (IR) se observan bandas de absorción características para grupos OH en  $\nu_{\max}$   $3355\text{ cm}^{-1}$ , para grupo aromático  $\nu_{\max}$   $2934, 1509\text{ cm}^{-1}$ , para carbonilo en  $\nu_{\max}$   $1693\text{ cm}^{-1}$  y para enlace C-O en  $\nu_{\max}$   $1108\text{ cm}^{-1}$ . El espectro de UV presentó cuatro bandas en  $\lambda_{\max}$  a 205, 218, 278 y 482 nm.

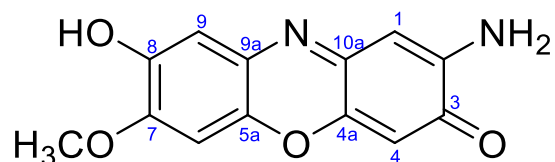
Su espectro de masas en alta resolución obtenido por el método electrospray en modo negativo (HRESIMS, por sus siglas en inglés) presentó un ion molecular de  $m/z$  451.1244  $[M - H]^-$  (masa exacta calculada: 451.1246 uma,  $\Delta_{\text{ppm}} = 0.4$ ), que corresponde para la fórmula molecular  $C_{21}H_{23}O_{11}^-$ .

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mostraron seis señales para un residuo de sacárido, así como señales en la región aromática correspondiente a los dos sistemas aromáticos de la molécula. Primeramente, para el residuo de sacárido, la señal del protón anomérico se localizó en  $\delta_{\text{H}}$  4.72, esto de acuerdo con la correlación en el HSQC, con el carbono en 103.7 (C-1'). Una vez detectado el protón anomérico, el análisis de los cuadros de conectividad en el espectro COSY permitieron confirmar a todos los protones vecinales a lo largo de todo el residuo del azúcar. El

protón anomérico presentó una constante de acoplamiento ca. 7.0 MHz, lo que indica la presencia de una conformación axial-axial con el protón H-2, permitiendo confirmar que se trata del anómero  $\beta$ . La identidad del residuo de azúcar fue inequívocamente confirmada como  $\beta$ -glucosa, esto con base en los análisis de las constantes de acoplamiento. Así el protón H-5 presenta tres constantes de acoplamientos  $J = 9.5, 7.4$  y  $2.7$  MHz, donde las constantes de acoplamiento  $J = 7.4$  y  $2.7$  MHz corresponden a los acoplamientos vecinales con H-6'a y H-6'b, y la  $J = 9.5$  MHz corresponde al acoplamiento con H-4' lo que indica la posición axial-axial con el protón H-4. En el caso de señales en la región aromática, éstas están en armonía con datos por RMN reportados por Kil, et al., 2019, quienes aislaron la molécula de *Leea asiática* (L.) Ridsdale (Leeaceae) y confirman la presencia del residuo de 4"-hidroxi-3",5"-dimetoxi-benzoato y otro residuo que corresponde a un grupo de tipo 1,4-dihidroxifenilo.

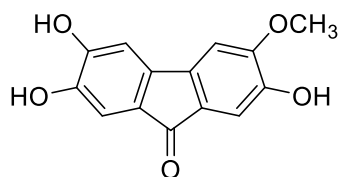
Todos estos análisis permiten confirmar que la estructura **7** corresponde al 4-hidroxifenil-(6'-O-[4"-hidroxi-3",5"-dimetoxi-benzoato]) de  $\beta$ -D-glucopiranosido (**7**), el cual fue aislado por primera vez de *Clematis parviloba* (Ranunculaceae) (Yan, et al., 2010).

#### 4.5. Perisbivalvina B: Corrección de la estructura (5)



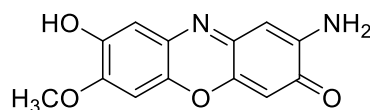
La perisbivalvina B (5) fue aislada por primera vez por Thũy y colaboradores (2012) de la especie vegetal *Peristrophe vibalbis*, que fue colectada en Vietnam. Fue la segunda 3*H*-fenoxazin-3-ona reportada en plantas, después de la peristrophina, que también fue aislada de *P. vibalbis*, colectada en China (Qin, et al., 1999). Posteriormente se reportó otra 3*H*-fenoxazin-3-ona, la perisbivalvina A (Thuy, et al., 2013). Montaña Cruz (2021) previamente había propuesto un derivado de tipo flourenona basándose en los datos de RMN mono y bidimensionales, pero haciendo un nuevo análisis a fondo de las señales que presentan los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, con las reportadas por Thuy et al., (2012), permiten comprobar que el compuesto aislado por Montaña Cruz es la perisbivalvina B (5) (Tabla 5).

Cabe destacar que en el experimento de HMBC, se observan las correlaciones necesarias para establecer que el sistema 3*H*-fenoxazin-3-ona está presente (Figura 13).



2,3,7-trihidroxi-6-metoxi-9-flourenona  
Masa exacta: 258.0528

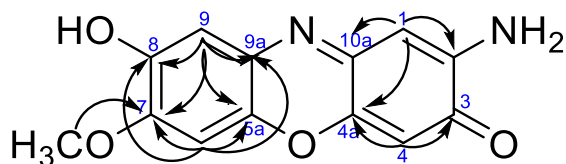
Estructura propuesta por Montaña Cruz (2021)  
Errónea



Perisbivalvina B  
Masa exacta:258.0641

Estructura propuesta por Pérez Esquivel  
(2022) Correcta

La biosíntesis de 3*H*-fenoxazin-3-onas en *J. spicigera* tiene una relevancia quimiotaxonómica, ya que es la segunda especie de Acanthaceae, después de *P. vibalbis*, donde se ha descrito su presencia. Finalmente cabe mencionar que este tipo de metabolitos no son comunes en plantas.



**Figura 13.** Correlaciones HMBC observadas de la estructura **5**.

**Tabla 5.** Datos de RMN para perisbivalvina B (**5**).

No.	Montaño Cruz, 2021 <sup>a</sup>		Thùy et al., 2012 <sup>b</sup>	
	$\delta_c$	$\delta_H$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	100.7	6.43	100.7	6.42
2	145.2	-	145.2	-
3	180.7	-	- <sup>c</sup>	-
4	102.9	6.30	102.8	6.28
4a	151.0	-	148.7	-
5a	140.7	-	140.3	-
6	108.9	7.06	108.6	7.03
7	149.0	-	152.8	-
8	153.4	-	180.6	-
9	103.6	6.81	103.7	6.79
9a	129.3	-	129.2	-
10a	147.8	-	147.6	-
7-OMe	56.7	3.89	56.7	3.90

<sup>a</sup>CD<sub>3</sub>OD 400 MHz; <sup>b</sup>CD<sub>3</sub>OD 500 MHz; <sup>c</sup>No se reporta el desplazamiento



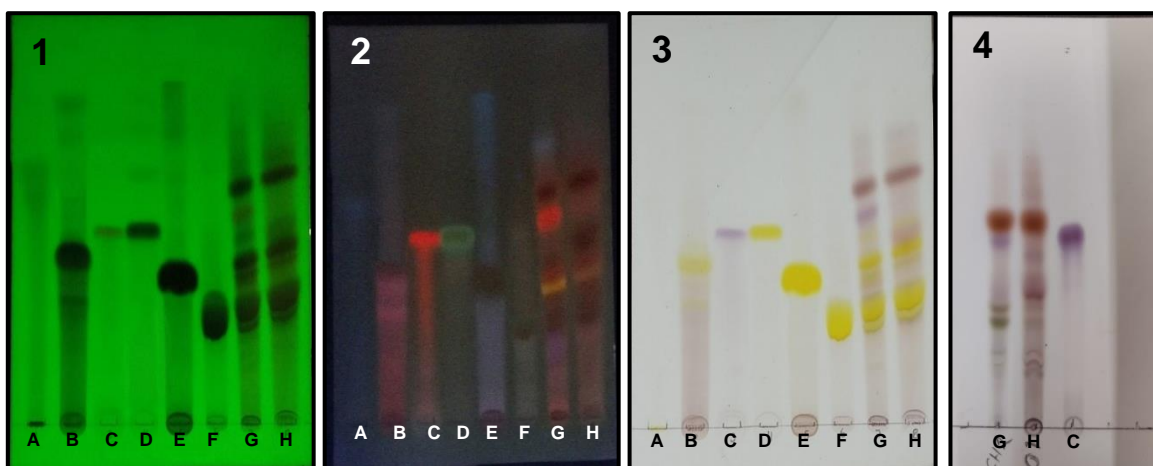
## 4.6. Análisis cromatográfico de fracciones y compuestos puros

### 4.6.1 Cromatografía en capa delgada

La cromatografía en capa delgada por adsorción (CCD), es una técnica cromatográfica sólido-líquido importante para el análisis rápido de pequeñas cantidades de muestras (cantidades analíticas), aunque también existe su versión para análisis a gran escala, conocida como cromatografía en capa delgada preparativa. En Fitoquímica, su uso cobra mayor relevancia no solo para analizar los extractos de plantas medicinales y compuestos puros, sino también como parte de los ensayos de control de calidad, necesarios para establecer la identidad química, así como para el análisis de la pureza de los extractos y compuestos puros.

Tanto los metabolitos como las fracciones de AcOEt de *J. spicigera* fueron analizadas utilizando esta técnica; se utilizó gel de sílice como fase estacionaria y un sistema de elución compuesto por AcOEt, MeOH y H<sub>2</sub>O (85:10:5). Todos los compuestos aislados en esta investigación (**1-4**, **6** y **7**) se compararon con las fracciones de AcOEt de la infusión preparada a partir de plantas recolectadas en Oaxaca y en la CDMX. Como se observa en la Figura 14, en las fracciones de AcOEt se detectan principalmente la 3''-O-acetil-canferitrina (**2**), la canferitrina (**3**), los cuales fueron los que se aislaron en mayor cantidad, así como el producto **1** y los otros compuestos minoritarios obtenidos en este estudio. La detección de estos productos será de utilidad en las pruebas de control de calidad de la planta.

Las cromatoplasmas se visualizaron primero a la luz visible para detectar los pigmentos; Así se pudo evidenciar el compuesto **1** (Figura 16) como un pigmento violeta intenso, lo cual se encuentra en armonía con su espectro al UV. Luego se utilizó luz ultravioleta a dos longitudes de onda ( $\lambda_{\text{max}}$  254 nm y 365 nm); y finalmente, se utilizó una solución ácida de aldehído anísico como segundo revelador (Figura 14). Esta prueba cromatográfica se puede adoptar como una prueba de identidad de la especie.



**Figura 14.** Cromatograma por CCD de los compuestos puros y las fracciones de AcOEt de *J. spicigera*. Visualización con lámpara de UV a (1)  $\lambda = 254$  nm y a (2)  $\lambda = 365$  nm. (3) Agente revelador: reactivo 4-anisaldehído. (4) Sin revelar. A: Compuesto (6), B: Compuesto (7), C: Compuesto (1), D: Compuesto (4), E: Compuesto (2), F: Compuesto (3), Fracción de AcOEt *J. spicigera* G: CDMX y H: Oaxaca. Sistema de elución: AcOEt, MeOH y H<sub>2</sub>O (85:10:5).



**Figura 15.** Partes aéreas de *J. spicigera* molidas.

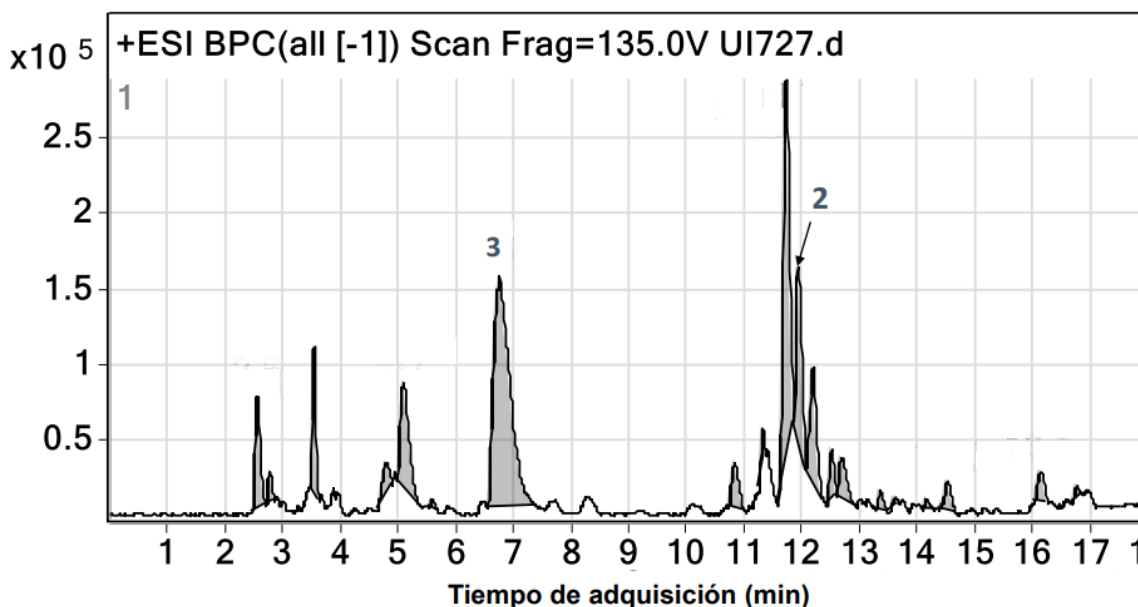


**Figura 16.** Compuesto 2-*N*-(*p*-Coumaroil)-3-*H*-fenoxazin-3-ona (1).

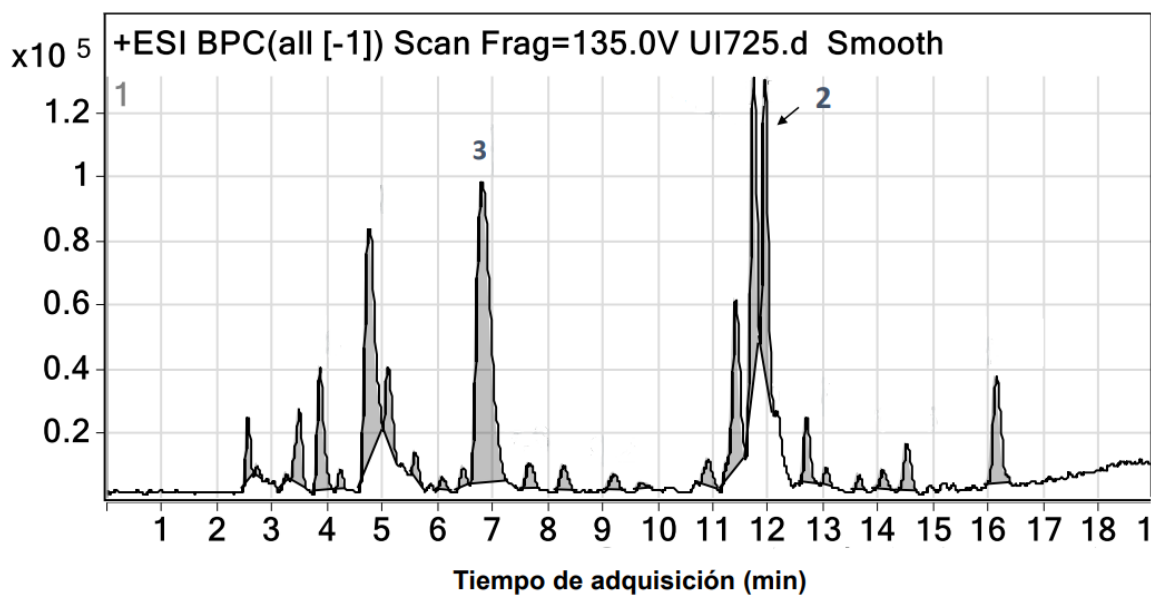
#### 4.6.2. Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas

La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS, por sus siglas en inglés), es una técnica que permite el análisis de mezclas de compuestos polares, poco volátiles y/o termolábiles. Proporciona información cualitativa y cuantitativa, ya que, además de la separación de los componentes de la mezcla, se obtiene el espectro de masas correspondiente a cada componente (Guzmán, 2022). En las Figuras 17-18 se ilustran los perfiles cromatográficos de las fracciones de AcOEt del preparado tradicional de *J. spicigera* recolectadas en la CDMX y estado de Oaxaca y como se puede observar, los tiempos de retención ( $t_R$ ) de los picos son casi idénticos. Por lo tanto, la especie adquirida en el mercado “La Bola”, CDMX; se trata de *Justicia spicigera*, ya que presenta la misma composición química que la especie recolectada en el estado de Oaxaca (número de voucher 1465410, MEXU).

Además de la información anterior, el perfil cromatográfico permitió identificar al compuesto canferitrina (**3**) como principal mayoritario y seguido del compuesto 3"-O-acetil-canferitrina (**2**).

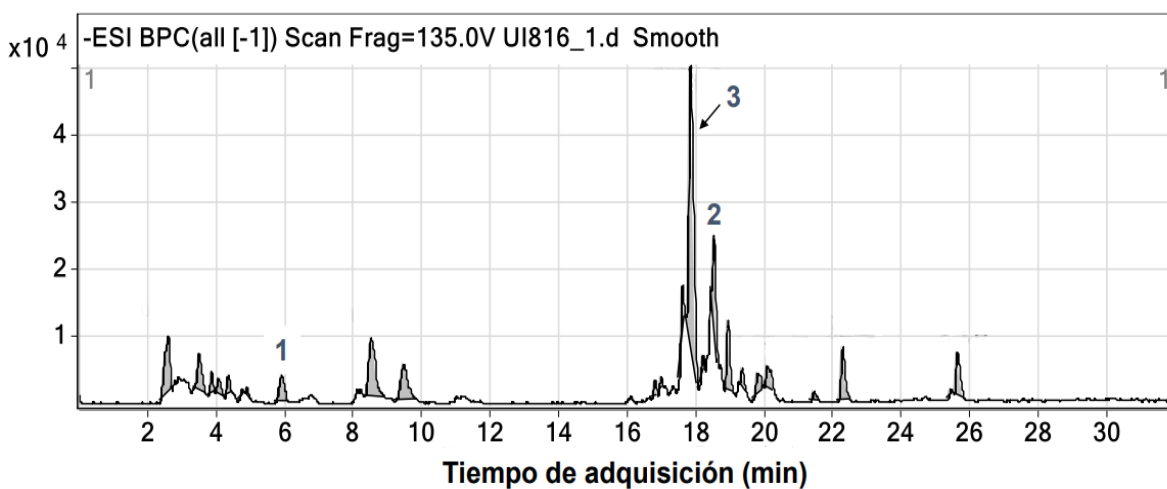


**Figura 17.** Cromatograma LC-EM (ESI positivo) de la fracción de AcOEt de la infusión *J. spicigera* (CDMX). Compuestos mayoritarios: 3"-O-acetil-canferitrina (**2**) y Canferitrina (**3**).



**Figura 18.** Cromatograma LC-EM (ESI positivo) de la fracción de AcOEt de la infusión *J. spicigera* (Estado de Oaxaca). Compuestos mayoritarios 3''-O-acetil-canferitrina (**2**) y Canferitrina (**3**).

Por otra parte, se estableció el perfil cromatográfico de la infusión, y en el cromatograma resultante (Figura 19) se observa un compuesto mayoritario, que al igual que en la fracción de AcOEt corresponde a la canferitrina (**3**), con un  $t_R = 17.8$  min. También fue posible detectar al compuesto 3''-O-acetil-canferitrina (**2**) así como, el compuesto 2-*N*-(*p*-Coumaroil)-3-*H*-fenoxazin-3-ona (**1**).



**Figura 19.** Cromatograma LC-EM (ESI negativo) de la infusión de *J. spicigera* (CDMX). Compuestos mayoritarios: 3''-O-acetil-canferitrina (**2**), Canferitrina (**3**) y 2-*N*-(*p*-Coumaroil)-3-*H*-fenoxazin-3-ona (**1**).

Como se mencionó, la determinación de la identidad química, composición y pureza forman parte de los parámetros destinados a establecer la calidad de un producto herbolario o de una planta medicinal y de esta manera se brinda a la población la certeza de que puedan ser seguros y eficaces. Para nuestro caso, la canferitrina (**3**) corresponde a uno de los principales metabolitos de la especie, y por esta razón, este metabolito podría ser considerado el marcador principal para el desarrollo de las pruebas de identidad química y composición. Además, es un compuesto característico, estable y abundante en la planta de estudio, es de fácil detección en cromatografía de capa delgada.

Adicionalmente, desde el punto de vista de la sustentabilidad, el control de calidad está encaminado a contribuir en la conservación, manejo y uso de especies vegetales en peligro de extinción, o especies amenazadas que tienen alta demanda en la población. De modo que, el desarrollo de una monografía farmacopéica y/o monografía tipo OMS de la especie promueve el uso racional de *J. spicigera* como medicamento herbal antidiabético.

## 5. CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de seis metabolitos adicionales de *Justicia spicigera*, dos de los cuáles, el compuesto 2-*N*-(*p*-Coumaroil)-3*H*-fenoxazin-3-ona (**1**) y el compuesto 3"-*O*-acetil-canferitrina (**2**), son entidades químicas nuevas.

Los compuestos **4**, **6** y **7** es la primera vez que se aíslan de *J. spicigera*.

En el caso del compuesto **5**, se realizó un análisis riguroso de cada uno de los espectros que previamente Montaña Cruz (2021) había obtenido y se pudo corregir la estructura. Esta corresponde a la perisbivalvina B, previamente aislada de otra Acanthaceae, *Peristrophe bivalvis*. Este representa el primer reporte de este metabolito en *Justicia spicigera*.

Se demostró que la canferitrina (**3**) es uno de los metabolitos mayoritarios; por lo tanto, podría ser uno de los principales marcadores activos de la especie.

## 6. PERSPECTIVAS

Desarrollar un método analítico validado, donde se propone el uso de canferitrina (**3**) como marcador, encaminado a la identificación y cuantificación del marcador seleccionado en matrices de *J. spicigera*.

Explorar la participación de los metabolitos aislados en mecanismos de acción involucrados en las múltiples propiedades farmacológicas de la planta.

## REFERENCIAS

- Alonso-Castro, A. J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez, M. D. C., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., & García-Carrancá, A. (2012). Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltld (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, *141*(3), 888–894. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2012.03.036>
- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, *133*(3), 945–972. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2010.11.055>
- Ángeles-López, G. E., González-Trujano, M. E., Rodríguez, R., Déciga-Campos, M., Brindis, F., & Ventura-Martínez, R. (2021). Gastrointestinal activity of *Justicia spicigera* Schltld. in experimental models. *Natural Product Research*, *35*(11), 1847–1851. [https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1637873/SUPPL\\_FILE/GNPL\\_A\\_1637873\\_SM7049.PDF](https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1637873/SUPPL_FILE/GNPL_A_1637873_SM7049.PDF)
- Aragao, P. C. De A., De Toledo, J. B., Morais, A. A., Braz Filho, 11. (1990). Substâncias Naturais Isoladas de *Stigmaphyllon tormentosum* e *Byrsonima variabilis*. *Quim. Nova*. *13*, 254–259.
- Araiza Mancio, A. (2000). Presencia del muicle (*Justicia spicigera* Schlecht) en la herbolaria mexicana. [Tesis de Licenciatura] Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arberet, L., Pottier, F., Michelin, A., Nowik, W., Bellot-Gurlet, L., & Andraud, C. (2021). Spectral characterisation of a traditional Mesoamerican dye: relationship between in situ identification on the 16th century Codex Borbonicus manuscript and composition of *Justicia spicigera* plant extract. *Analyst*, *146*(8), 2520–2530. <https://doi.org/10.1039/D1AN00113B>
- Atlas de la Medicina Tradicional de México del INI/UN Atlas de la Medicina Tradicional de México del INI/UNAM/INPI/DGTIC. (2009). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado septiembre 4, 2021, de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- Bruneton, J. (2001) *Farmacognosia: Fitoquímica. Plantas medicinales*. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, S.A.
- Baqueiro-Peña, I., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2014). Uses of *Justicia spicigera* in medicine and as a source of pigments. *Functional Foods in Health and Disease*, *4*(9), 401–414. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v4i9.150>
- Cáceres-Cortés, J. R., Cantú-Garza, F. A., Mendoza-Mata, M. T., Chavez-González, M. A., Ramos-Mandujano, G., & Zambrano-Ramírez, I. R. (2001). Cytotoxic activity of *Justicia spicigera* is inhibited by bcl-2 proto-oncogene and

- induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion. *Phytotherapy Research*, 15(8), 691–697. <https://doi.org/10.1002/PTR.791>
- Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J. P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., & Juan F. Rodríguez-Landa. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*. <https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/381/393>
- Cruz Pérez, A. L., Barrera Ramos, J., Bernal Ramírez, L. A., Bravo Avilez, D., & Rendón Aguilar, B. (2021). Actualized inventory of medicinal plants used in traditional medicine in Oaxaca, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 17(1), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13002-020-00431-y>
- De Melo, G. O., Malvar, D. do C., Vanderlinde, F. A., Rocha, F. F., Pires, P. A., Costa, E. A., de Matos, L. G., Kaiser, C. R., & Costa, S. S. (2009). Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 228–232. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2009.04.024>
- De Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T. B., Pizzolatti, M. G., Szpoganicz, B., & Barreto Silva, F. R. M. (2004). Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *Journal of Natural Products*, 67(5), 829–832. <https://doi.org/10.1021/NP030513U/ASSET/IMAGES/LARGE/NP030513UF1.JPEG>
- Domínguez X.A., Achenback H., Conzález C.C., Ferré-D´Amare A.R., 1990. Estudio químico del muítle (*Justicia spicigera*). *Rev. Latinoamer. Quím.* 21, 142–143.
- E. Awad, N., A. Abdelkawyb, M., H. Abdel Rahman, E., A. Hamed, M., & S. Ramadan, N. (2018). Phytochemical and in vitro screening of *Justicia spicigera* ethanol extract for antioxidant activity and in vivo assessment against *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Anti-Infective Agents*, 16. <https://doi.org/10.2174/2211352516666180126161247>
- Esquivel-Gutiérrez, E. R., Noriega-Cisneros, R., Arellano-Plaza, M., Ibarra-Barajas, M., Salgado-Garciglia, R., & Saavedra-Molina, A. (2013). Antihypertensive effect of *Justicia spicigera* in L-NAME-induced hypertensive rats. *Pharmacologyonline*, 2(August), 120–127.
- Euler, K. L., & Alam, M. (1982). Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*, 45(2), 220–221. [https://doi.org/10.1021/NP50020A020/ASSET/NP50020A020.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/NP50020A020/ASSET/NP50020A020.FP.PNG_V03)
- Fernández-Pomares, C., Juárez-Aguilar, E., Domínguez-Ortiz, M. Á., Gallegos-Estudillo, J., Herrera-Covarrubias, D., Sánchez-Medina, A., Aranda-Abreu, G. E., Manzo, J., & Hernández, M. E. (2018). Hydroalcoholic extract of the widely used Mexican plant *Justicia spicigera* Schlttdl. exerts a cytostatic effect on LNCaP prostate cancer cells. *Journal of Herbal Medicine*, 12, 66–72.



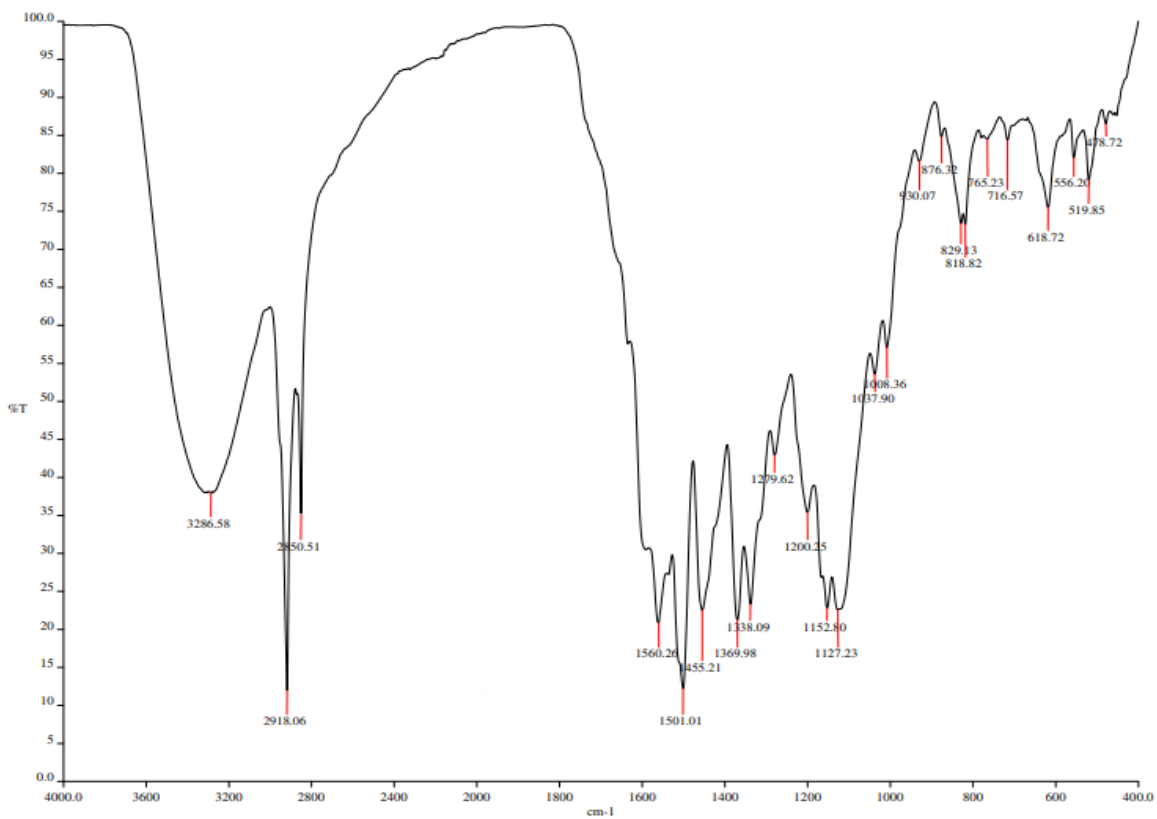
<https://doi.org/10.1016/J.HERMED.2017.09.003>

- Fico, G., Braca, A., Morelli, I., & Tomè, F. (2003). Flavonol glycosides from *Aconitum vulparia*. *Fitoterapia*, 74(4), 420–422. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00045-5)
- Florentino, I. F., Silva, D. P. B., Galdino, P. M., Lino, R. C., Martins, J. L. R., Silva, D. M., De Paula, J. R., Tresvenzol, L. M. F., & Costa, E. A. (2016). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Memora nodosa* and allantoin in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 186, 298–304. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2016.04.010>
- Girón, N. (2015). *Evaluación de la actividad antidiabética antioxidante in vitro de extractos polares de Justicia spicigera y elucidación estructural de los compuestos fenólicos mayoritarios*. [Universidad Tecnológica de la Mixteca]. <http://repositorio.utm.mx/bitstream/123456789/69/1/2015-MCPNA-NGC.pdf>
- González-Trujano, M. E., Domínguez, F., Pérez-Ortega, G., Aguillón, M., Martínez-Vargas, D., Almazán-Alvarado, S., & Martínez, A. (2017). Justicia spicigera Schlttdl. and kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 240–248. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.05.075>
- Gutierrez, R. M. P., & Flores, S. O. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using cilinaphthalide c from justicia spicigera on HeLa and caski cancer cell lines. *Journal of Bionanoscience*, 12(4), 528–537. <https://doi.org/10.1166/JBNS.2018.1555>
- Guzmán, M. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. Recuperado Junio 15, 2022, de <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/cromatografia-de-liquidos-acoplada-a-espectrometria-de-masas/>
- Jacobo-Salcedo, M. D. R., Alonso-Castro, A. J., Salazar-Olivo, L. A., Carranza-Alvarez, C., González-Espiñola, L. A., Domínguez, F., Maciel-Torres, S. P., Garcíá-Lujan, C., González-Martínez, M. D. R., Gómez-Sánchez, M., Estrada-Castilloñ, E., Zapata-Bustos, R., Medellín-Milañ, P., & Garcíá-Carrancá, A. (2011). Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Mexican Medicinal Plants: <https://doi.org/10.1177/1934578X1100601234>, 6(12), 1925–1928. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100601234>
- Kardono, L. B. S., Tsauri, S., Padmawinata, K., Pezzuto, J. M., & Kinghorn, A. D. (1990). Cytotoxic constituents of the bark of plumeria rubra collected in indonesia. *Journal of Natural Products*, 53(6), 1447–1455. [https://doi.org/10.1021/NP50072A008/ASSET/NP50072A008.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/NP50072A008/ASSET/NP50072A008.FP.PNG_V03)
- Kil, H. W., Rho, T., & Yoon, K. D. (2019). Phytochemical Study of Aerial Parts of *Leea asiatica*. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 1733, 24(9), 1733. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24091733>

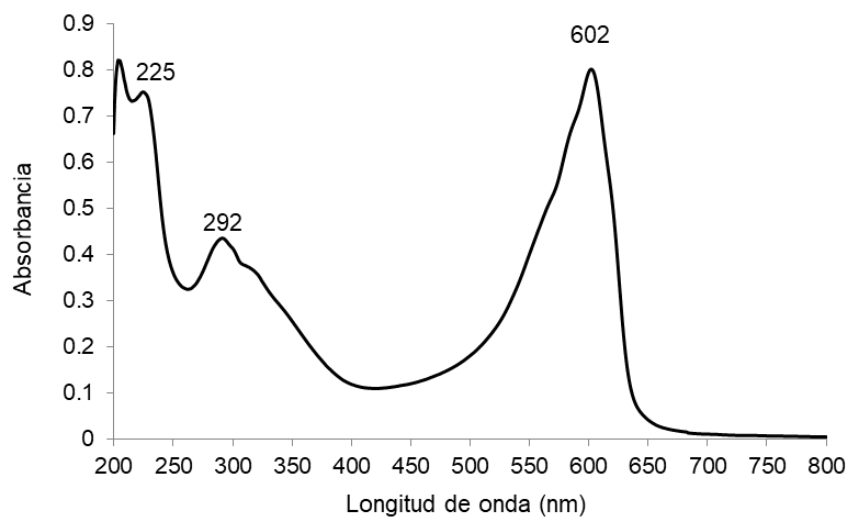
- Kim, C. Y.; Im, H. W.; Kim, H. K.; Huh, H. (2001). Accumulation of 2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone in suspension cultures of *Panax ginseng* by a fungal elicitor preparation and a yeast elicitor preparation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, (1-2), 239–242.
- Lee, M. Y., Lee, N. H., Jung, D., Lee, J. A., Seo, C. S., Lee, H., Kim, J. H., & Shin, H. K. (2010). Protective effects of allantoin against ovalbumin (OVA)-induced lung inflammation in a murine model of asthma. *International Immunopharmacology*, 10(4), 474–480.  
<https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2010.01.008>
- Meckes, M., David-Rivera, A. D., Nava-Aguilar, V., & Jimenez, A. (2004). Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine*, 11(5), 446–451.  
<https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2003.06.002>
- Montaño, Y., (2021). Estudio químico de la especie medicinal *Justicia spicigera* Schldl. (Acanthaceae). [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, UNAM.
- Montiel, K., (2022). Trabajo Monografico de actualización: Revisión química y farmacológica de la especie medicinal *Justicia spicigera* Schldl: una aproximación a su revalorización en la medicina tradicional de México [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, UNAM.
- Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V. E., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L. A., Domínguez, F., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., & García-Carrancá, A. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schldl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 455–462. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2012.06.043>
- Perez Gutierrez, R., Mota Flores, J., & Neira Gonzalez, A. (2018). Anti-inflammatory Effect of Procumbenoside B from *Justicia spicigera* on Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages and Zebrafish Model. *Pharmacognosy Research*, 10(2), 218–224.  
[https://doi.org/10.4103/pr.pr\\_97\\_17](https://doi.org/10.4103/pr.pr_97_17)
- Qin, JP, Xu, X, Wu, LZ, Ling, ZJ and Pu, QL. (1999). Structure elucidation of two compounds from *Peristrophe roxburghiana*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 34: 596–599.
- Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. <https://doi.org/10.4161/Psb.6.11.17613>, 6(11), 1720–1731. <https://doi.org/10.4161/PSB.6.11.17613>
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355–363.  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221317>

- Tamotsu, N., Yeol-ik, S., Taichi, O., Ushio, S. (1984). Inhibitors of Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Phosphodiesterase in *Phyllostachys nigra* MUNRO var. *henonis* STAPF. and *Phragmites communis* TRIN., and Inhibition by Related Compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 32(2), 578-584.
- Tatsimo, S. J. N., Tamokou, J. D. D., Havyarimana, L., Csupor, D., Forgo, P., Hohmann, J., Kuate, J. R., & Tane, P. (2012). Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Research Notes*, 5(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-158/TABLES/2>
- Thuy, T. T., Huong, N. T. T., Nhung, L. T. H., Ninh, P. T., Delfino, D. V., & Van Sung, T. (2013). Isolation, characterisation and biological evaluation of a phenoxazine, a natural dyestuff isolated from leaves of *Peristrophe bivalvis*. *Natural Product Research*, 27(8), 771–774. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.698409>
- Thuy, T.T., Lam, T.H., Huong, N.T.T., Nhung, L.T.H., Ninh, P.T., Anh, N.T.H., Sung, T.V., 2012. Nghiên cứu thành phần và độc tính của chất màu tú' lá cây cam tím (*Peristrophe bivalvis*). TCHH, T. 6, 394–397.
- Thuy, T.T., Lam, T.H., Huong, N.T.T., Nhung, L.T.H., Ninh, P.T., Anh, N.T.H., Thao, T.T.P., Sung, TV., 2012. Natural phenoxazine alkaloids from *Peristrophe bivalvis* (L.) Merr. *Biochem. System. Ecol.* 44, 205–207. <https://doi:10.1016/j.bse.2012.05.009>
- Tsai, C. C., Chen, L. J., Niu, H. S., Chung, K. M., Cheng, J. T., & Lin, K. C. (2014). Allantoin activates imidazoline I-3 receptors to enhance insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nutrition and Metabolism*, 11(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-41/FIGURES/4>
- Vega-Avila, E., Tapia-Aguilar, R., Reyes-Chilpa, R., Guzmán-Gutiérrez, Silvia Pérez-Flores, J., & Velasco-Lezama, R. (2012). Actividad antibacteriana y antifúngica de Justicia Spicigera. *Revista Latinoamericana de Química*, 40(2). [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-59432012000200003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432012000200003)
- WHO Global Centre for Traditional Medicine . (n.d.). Recuperado Junio 16, 2022, de <https://www.who.int/initiatives/who-global-centre-for-traditional-medicine>
- Zapata-Morales, J. R., Alonso-Castro, A. J., Domínguez, F., Carranza-Álvarez, C., Castellanos, L. M. O., Martínez-Medina, R. M., & Pérez-Urizar, J. (2016). Antinociceptive Activity of an Ethanol Extract of *Justicia spicigera*. *Drug Development Research*, 77(4), 180–186. <https://doi.org/10.1002/DDR.21307>
- Yan L-h., Xu L-z., Wang Z-m., Zhang Q-w., Yang S-l. (2010). Two new phenolic glycosides from the stems of *Clematis parviloba*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 45 (12): 1527–153.

# ANEXOS



**Figura 20.** Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto 1.



**Figura 21.** Espectro UV cuantitativo del compuesto 1.

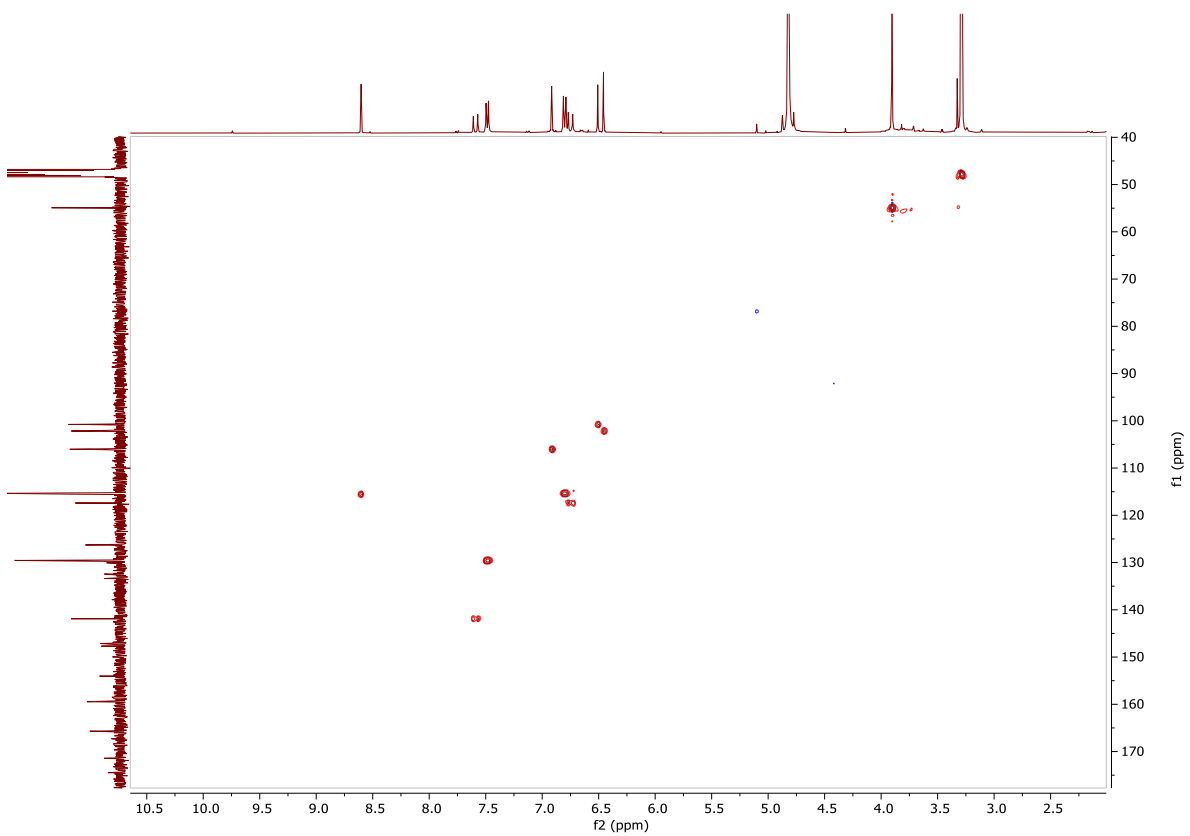


Figura 22. Espectro HSQC (400 MHz,  $CD_3OD-d_4$ ) del compuesto 1.

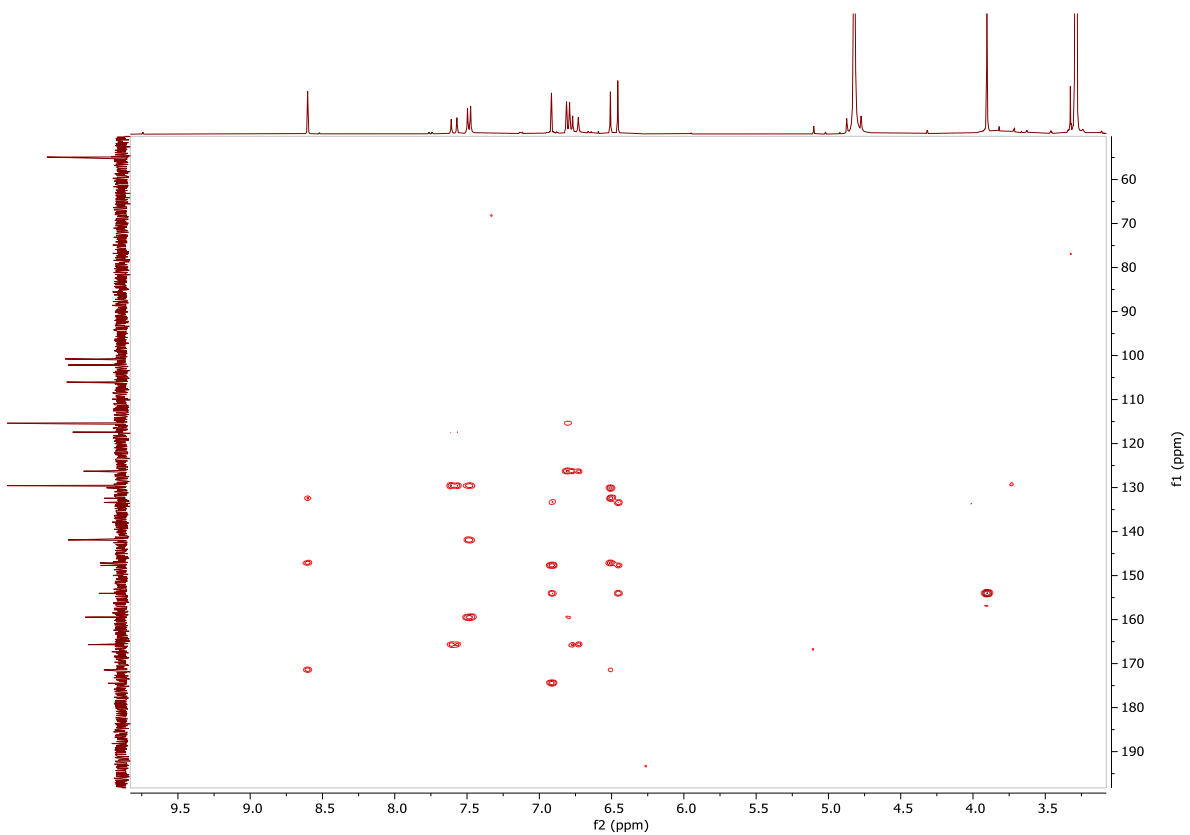
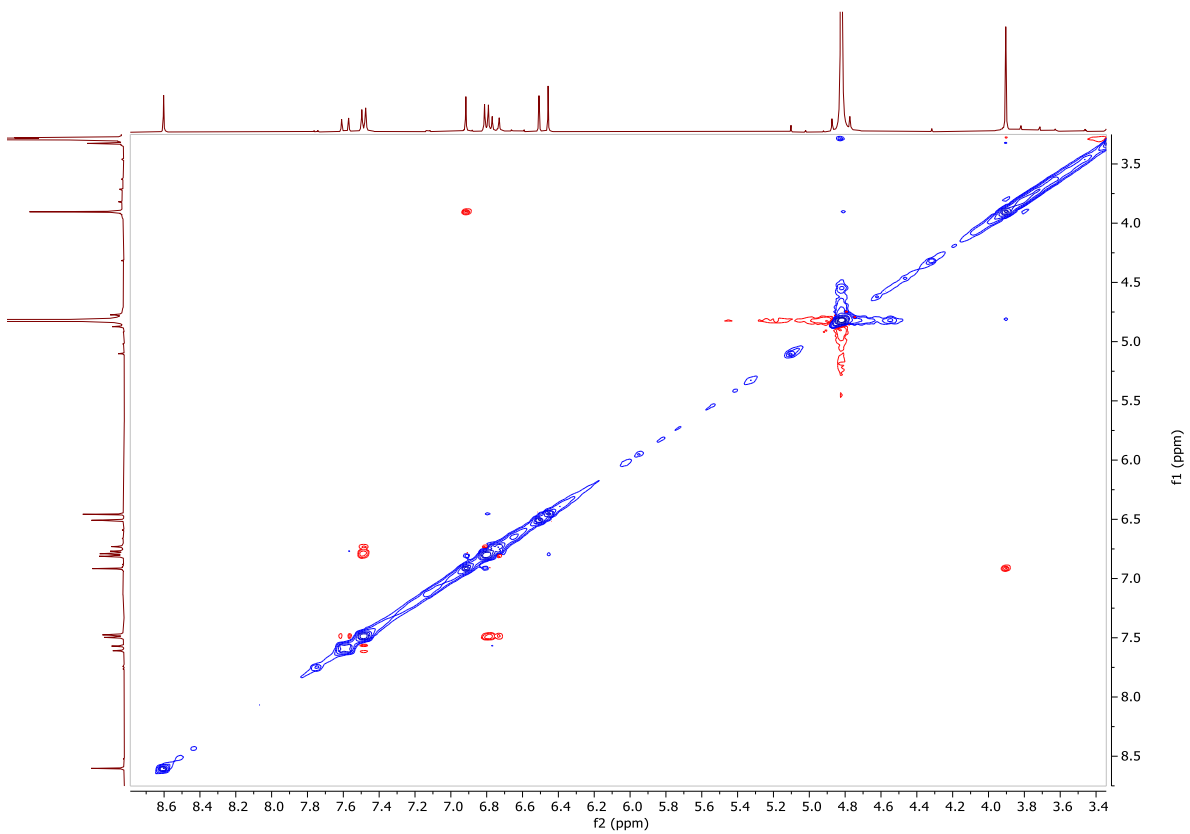
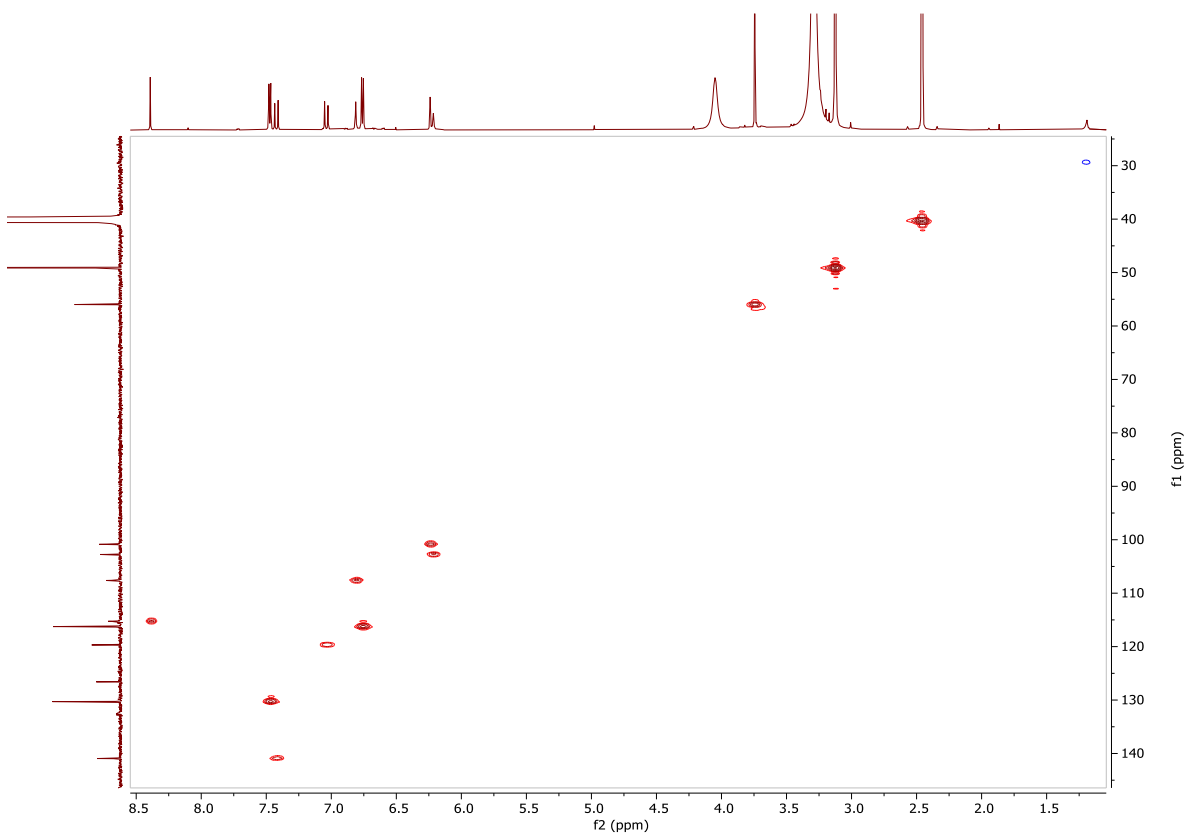


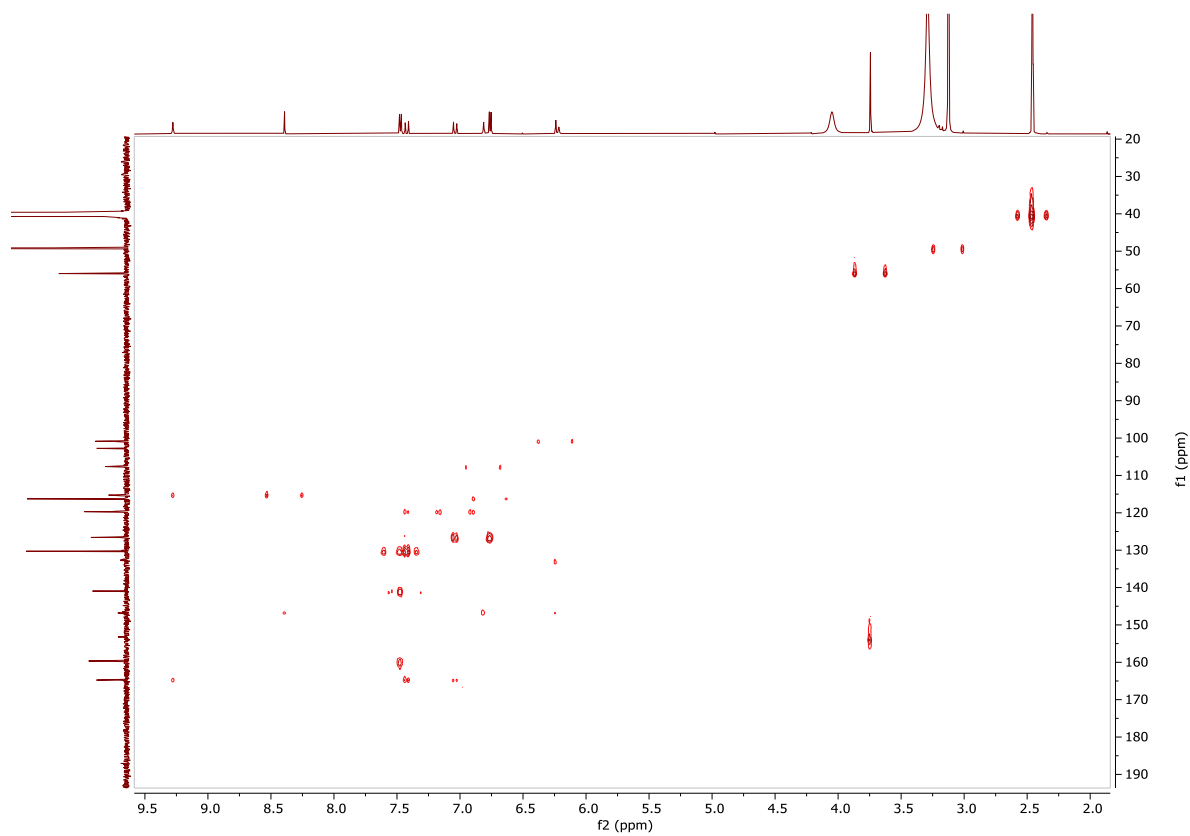
Figura 23. Espectro HMBC (400 MHz,  $CD_3OD-d_4$ ) del compuesto 1.



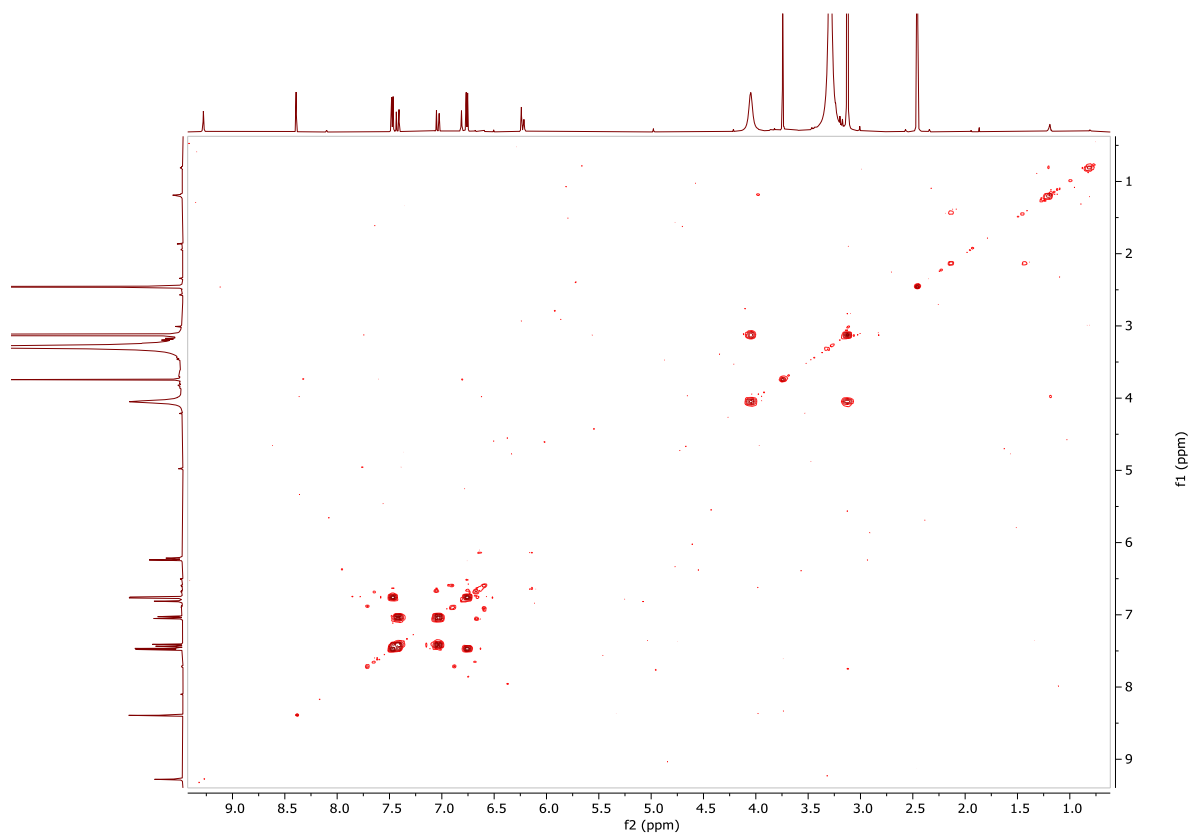
**Figura 24.** Espectro NOESY (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>) del compuesto 1.



**Figura 25.** Espectro HSQC (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) del compuesto 1.

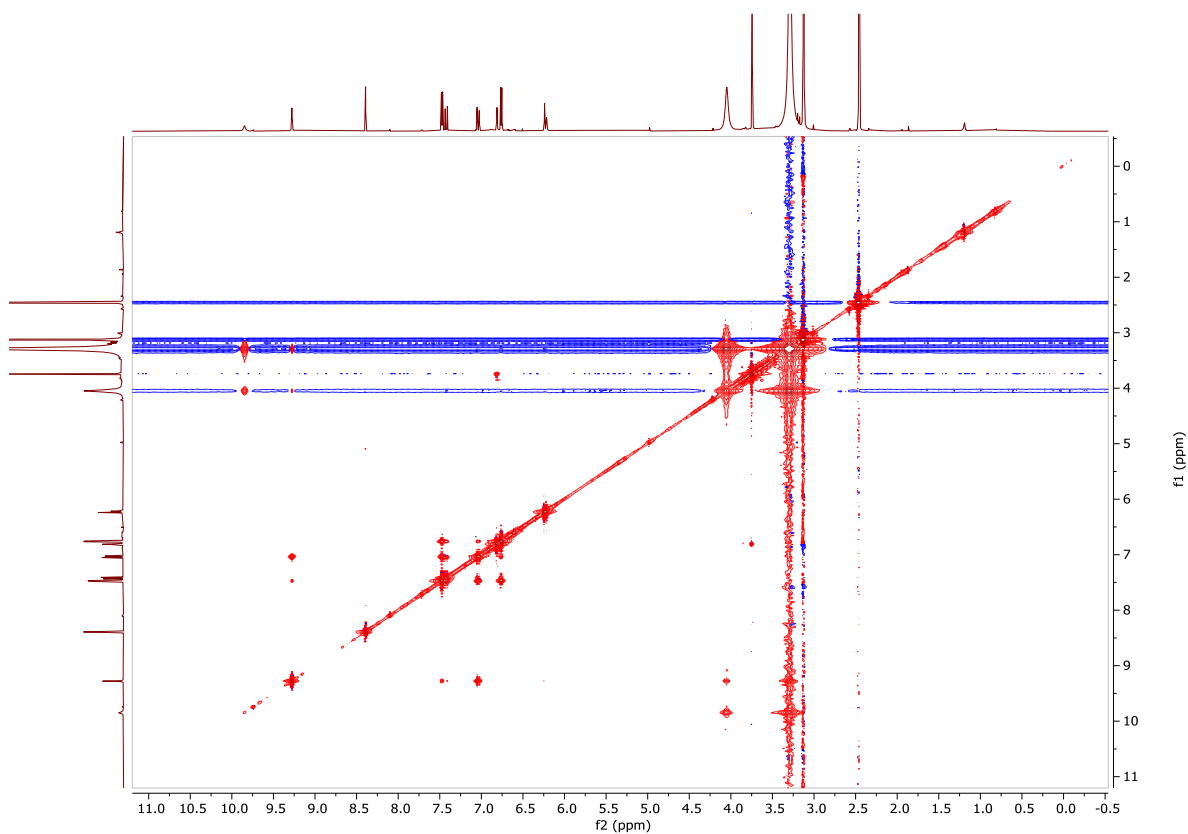


**Figura 26.** Espectro HMBC (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) del compuesto 1.

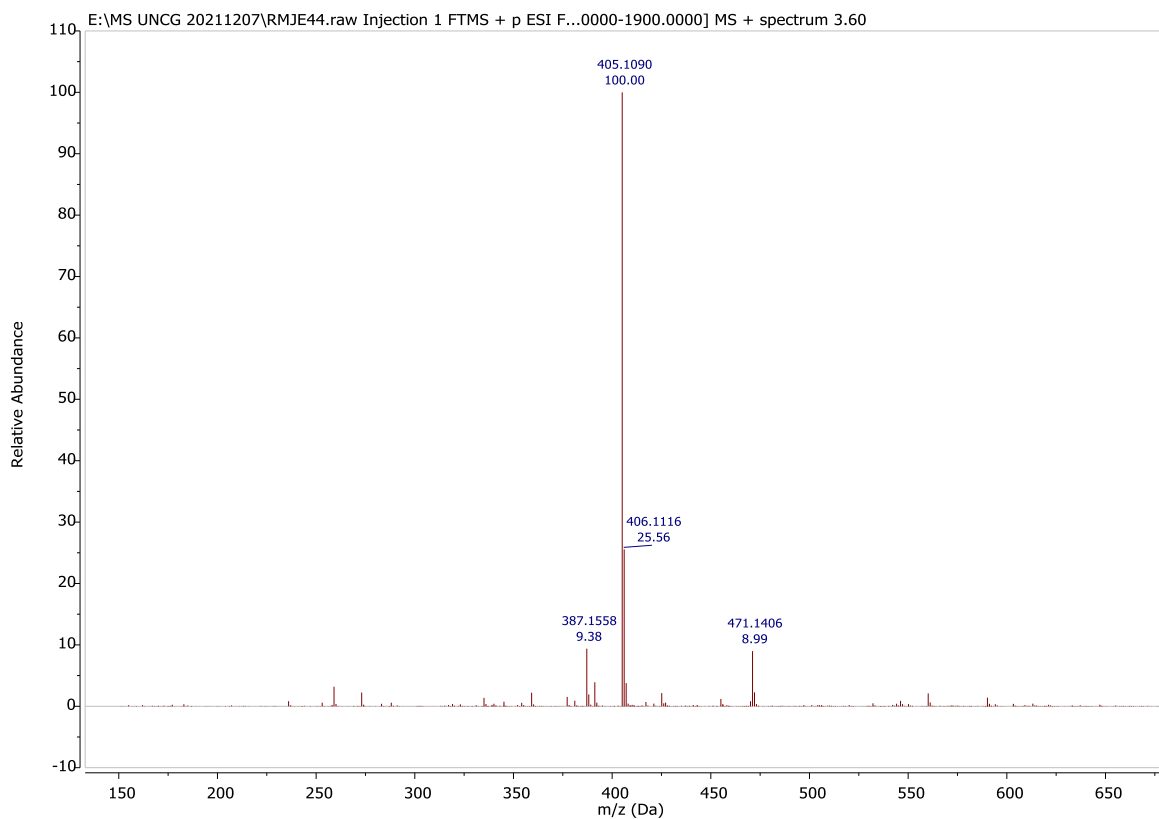


**Figura 27.** Espectro COSY (H  $\rightarrow$  H) (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) del compuesto 1.





**Figura 28.** Espectro NOESY (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) del compuesto 1.



**Figura 29.** Espectro de masas por Electrospay (ESI-EM), modo positivo del compuesto 1.

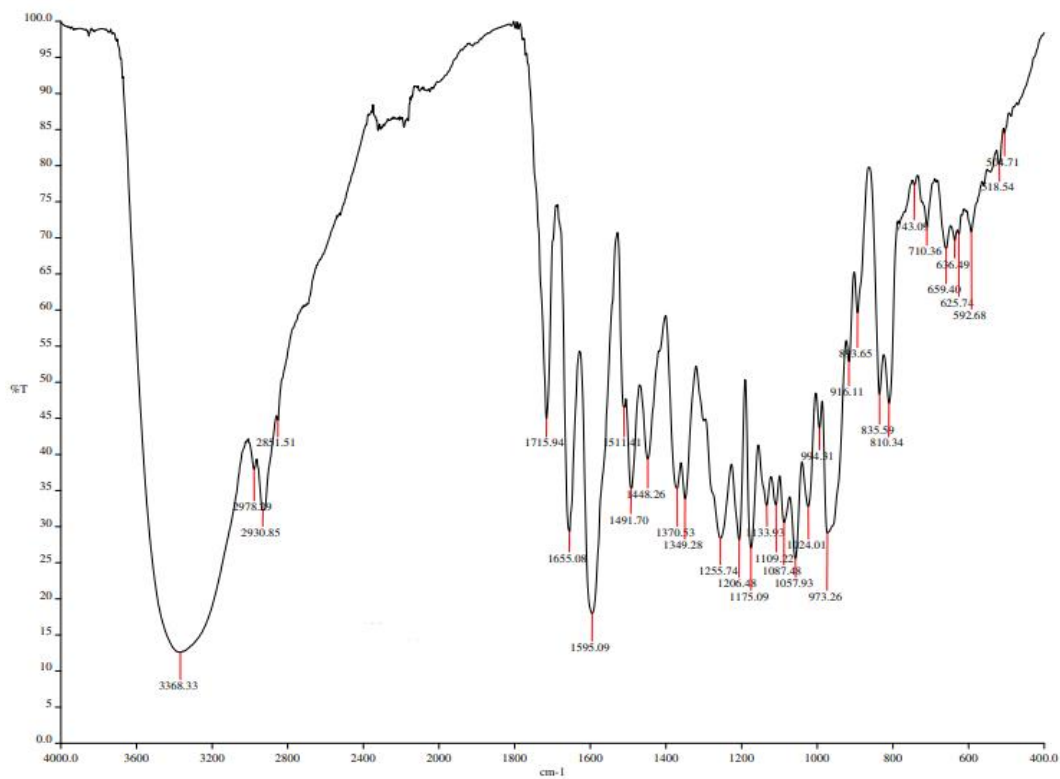


Figura 30. Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto 2.

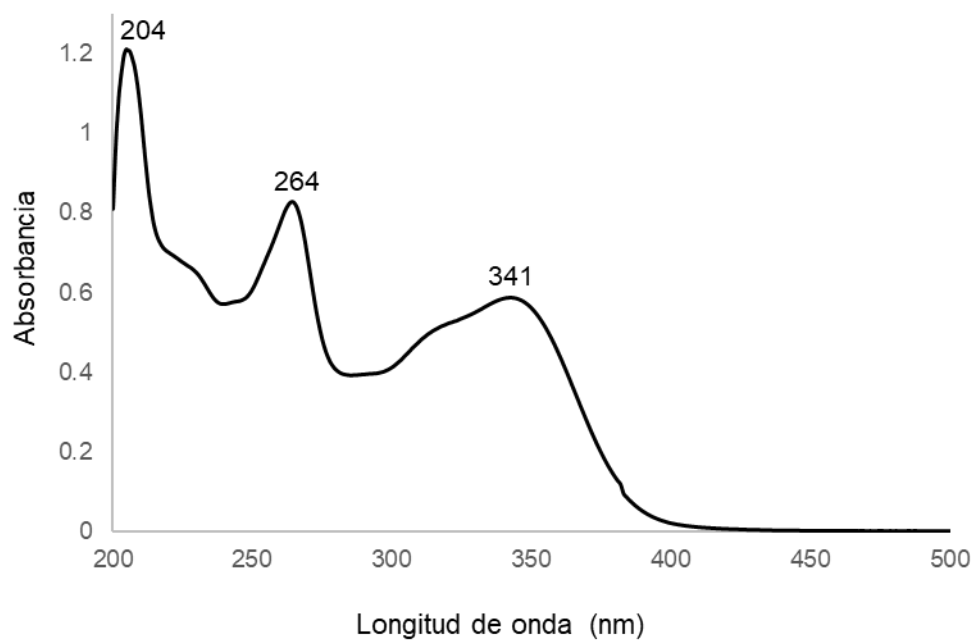


Figura 31. Espectro UV cuantitativo del compuesto 2.

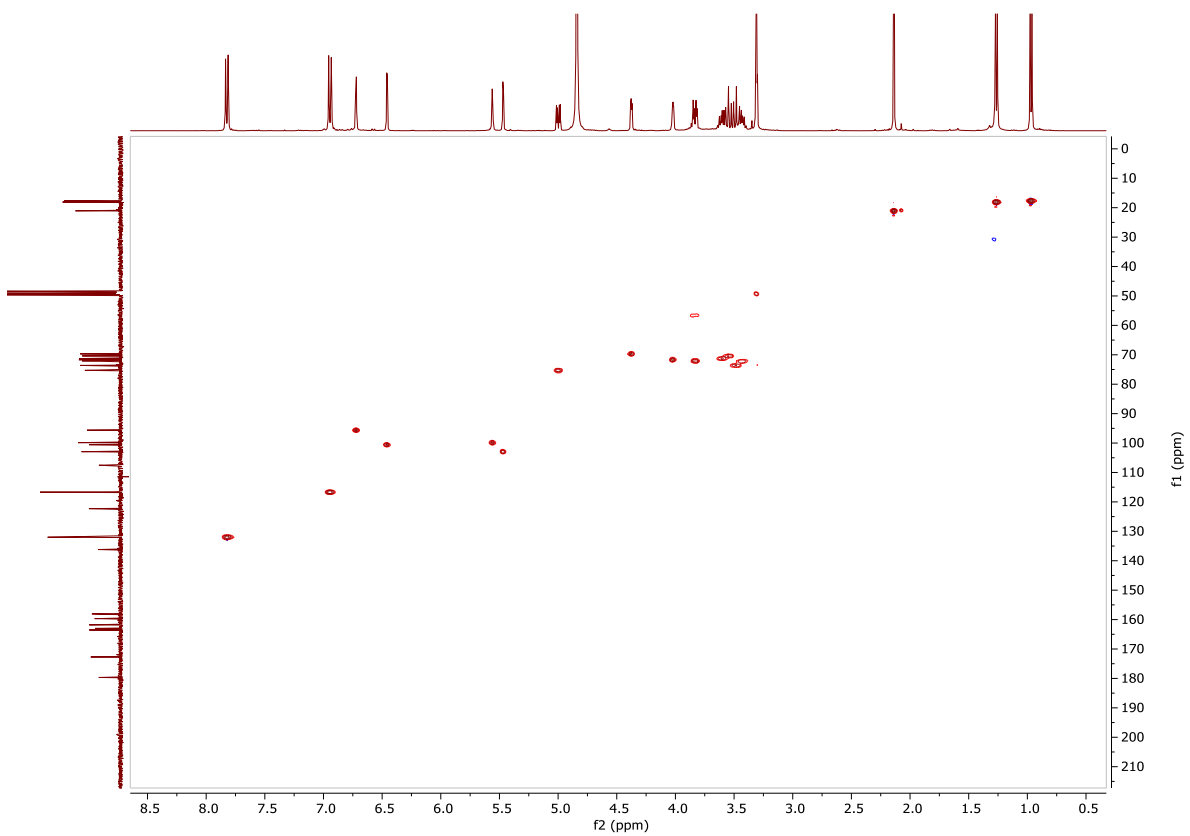


Figura 32. Espectro HSQC (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto 2.

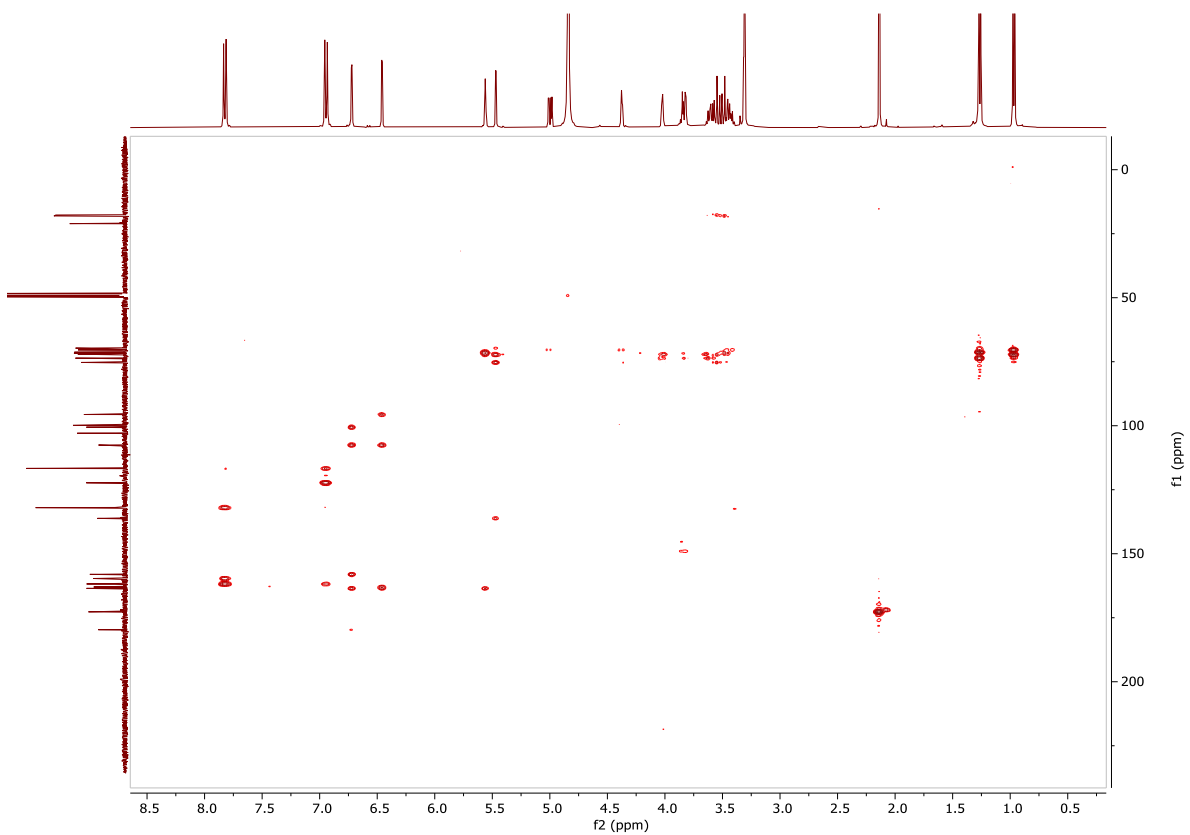
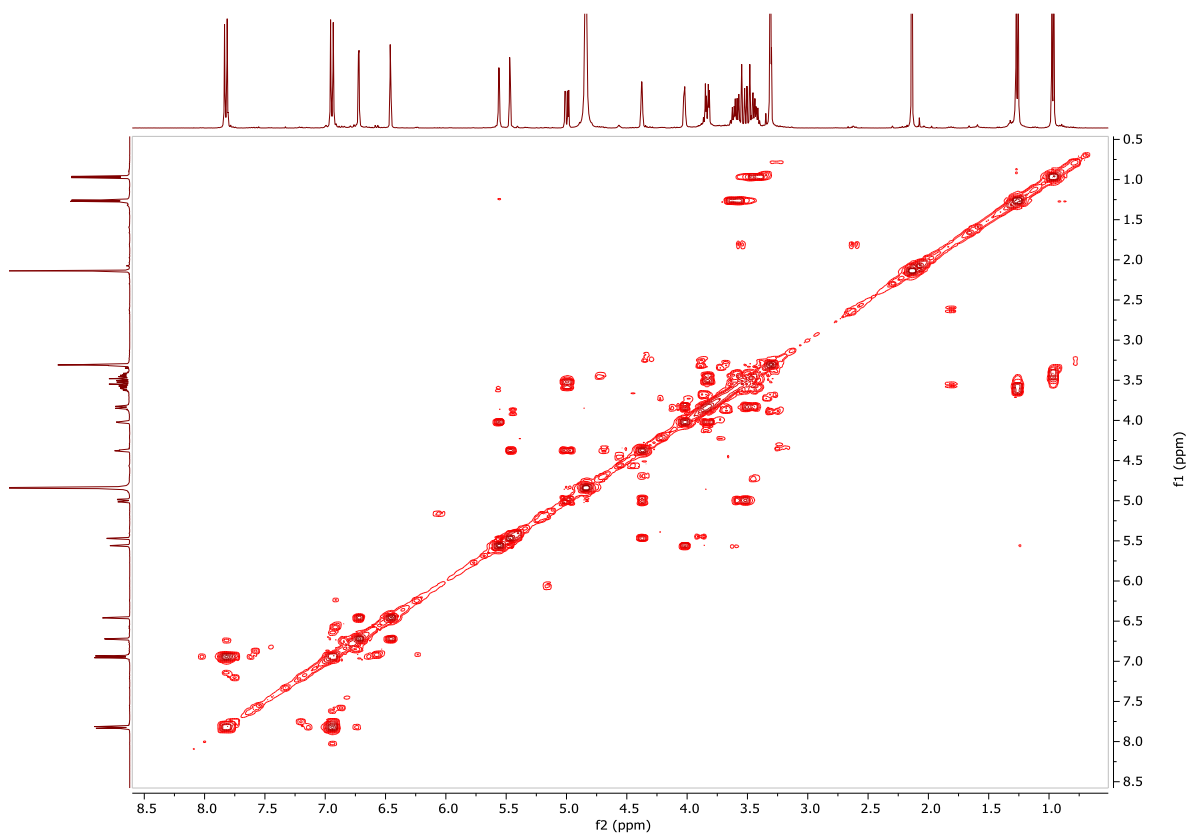
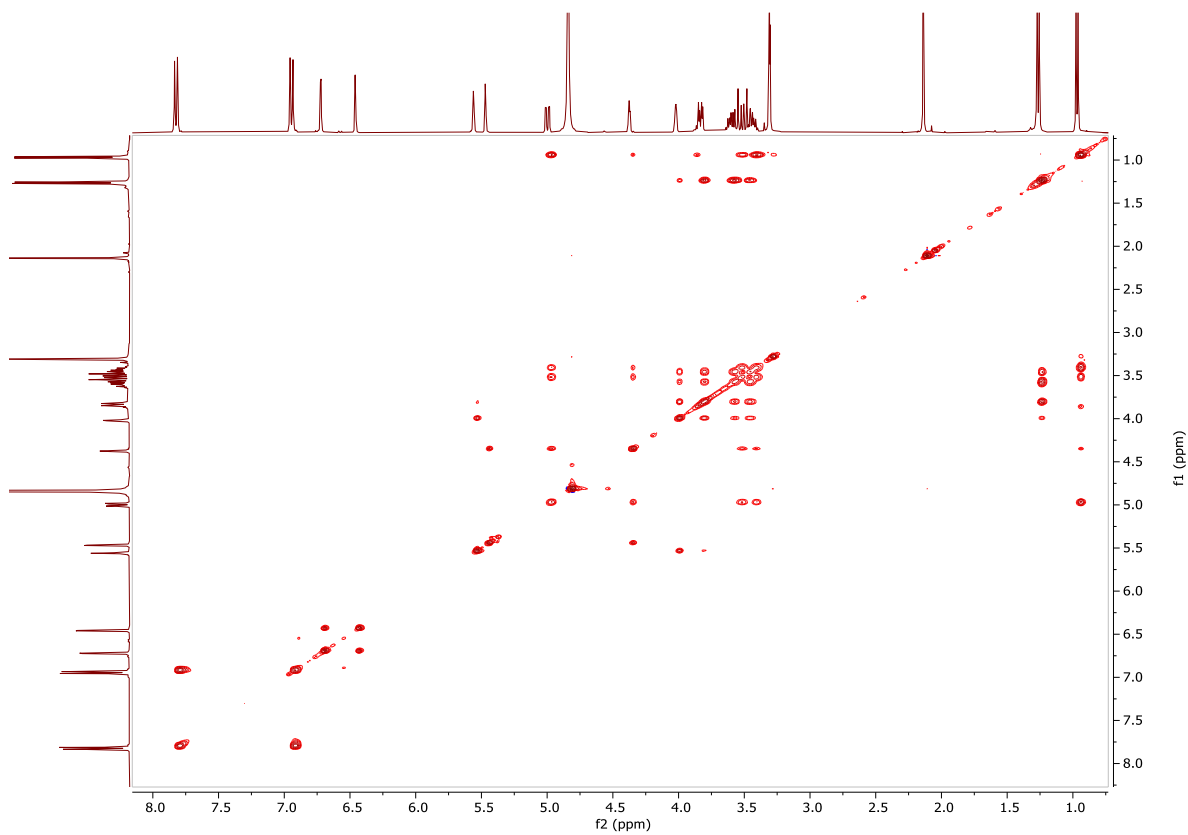


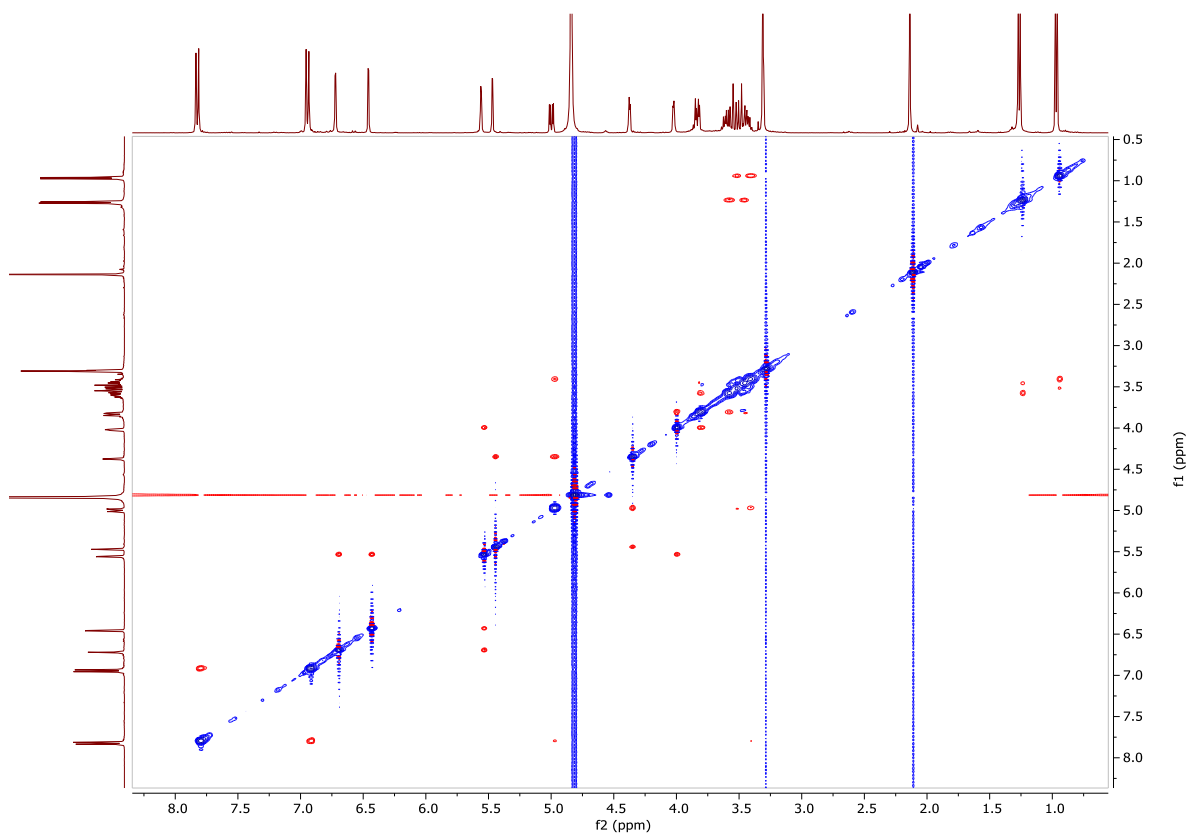
Figura 33. Espectro HMBC (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto 2.



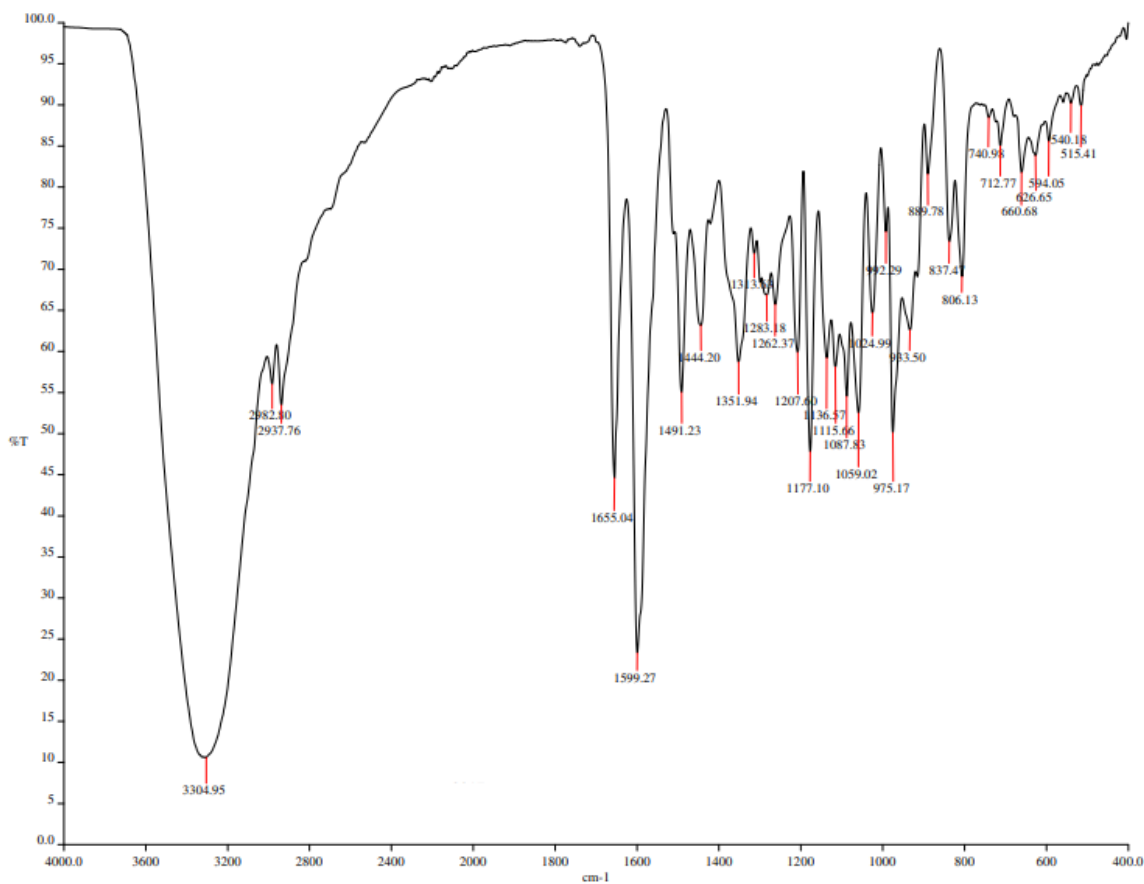
**Figura 34.** Espectro COSY (H → H) (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>) del compuesto **2**.



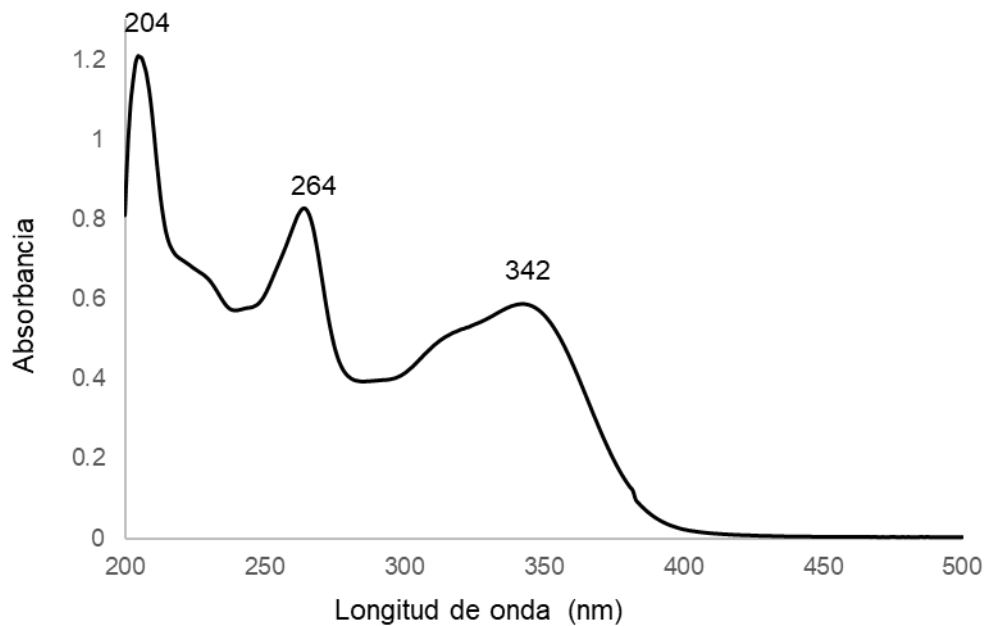
**Figura 35.** Espectro TOCSY (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>) del compuesto **2**.



**Figura 36.** Espectro NOESY (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto **2**.



**Figura 37.** Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto 3.



**Figura 38.** Espectro UV cuantitativo del compuesto 3.

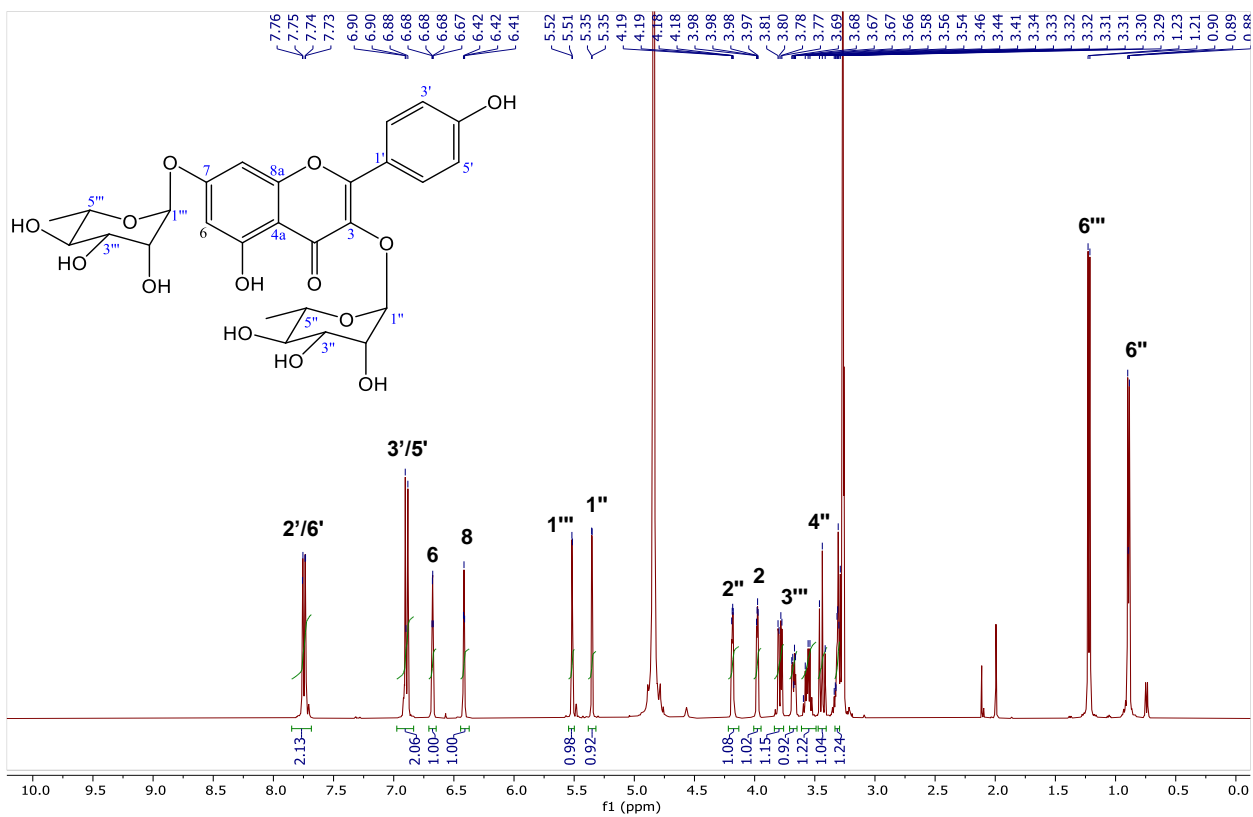


Figura 39. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto 3.

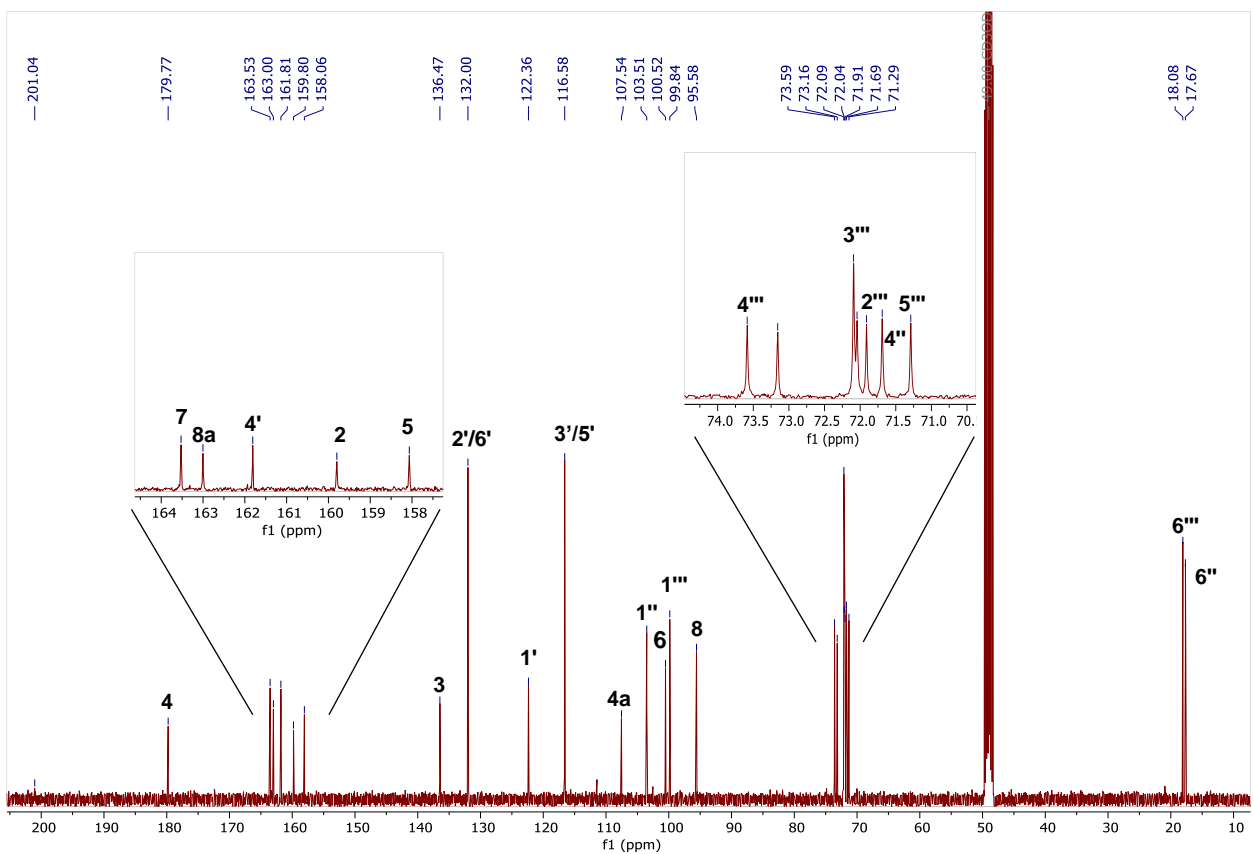


Figura 40. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto 3.

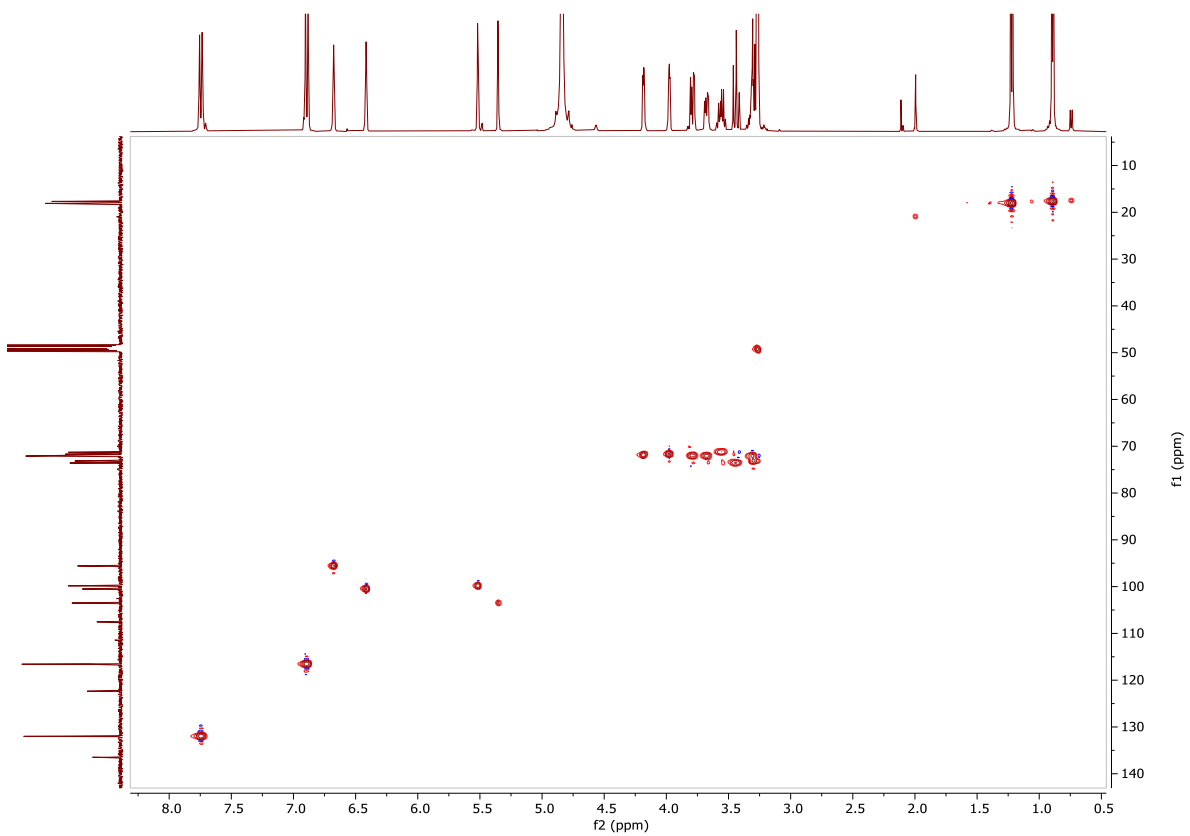


Figura 41. Espectro HSQC (400 MHz,  $CD_3OD-d_4$ ) del compuesto 3.

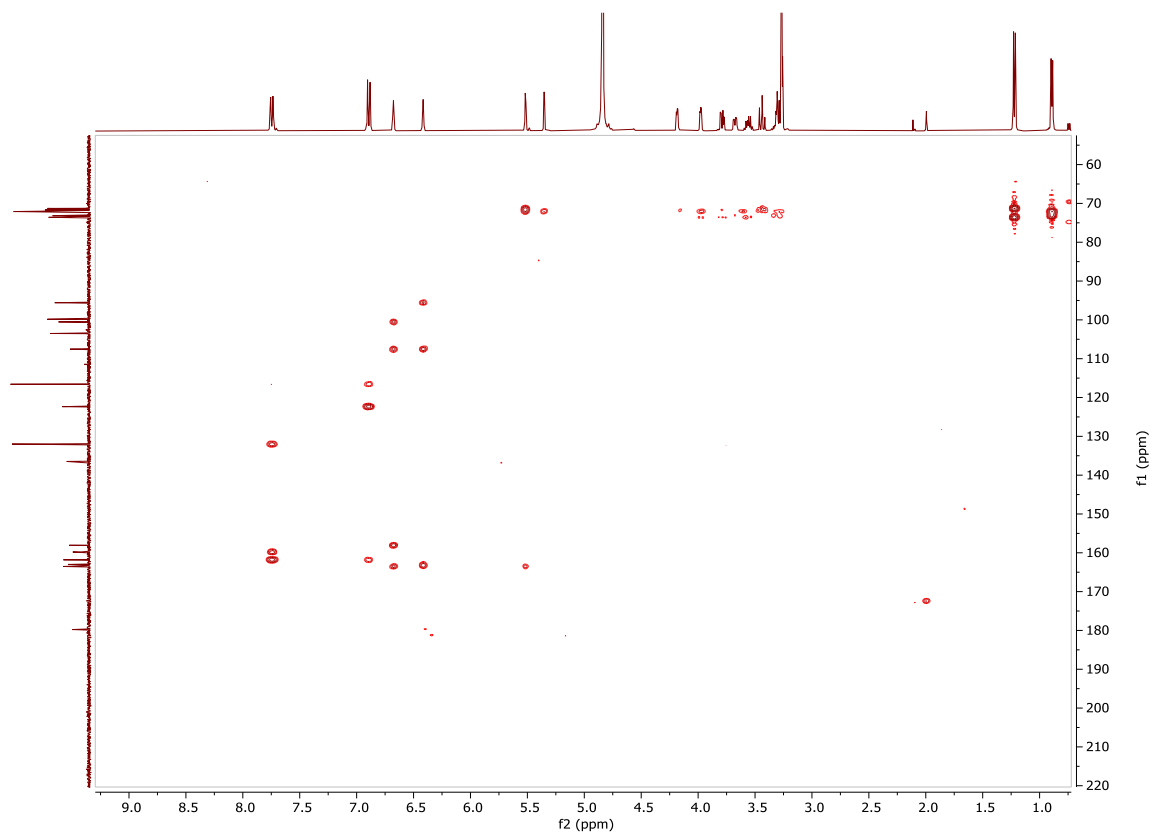
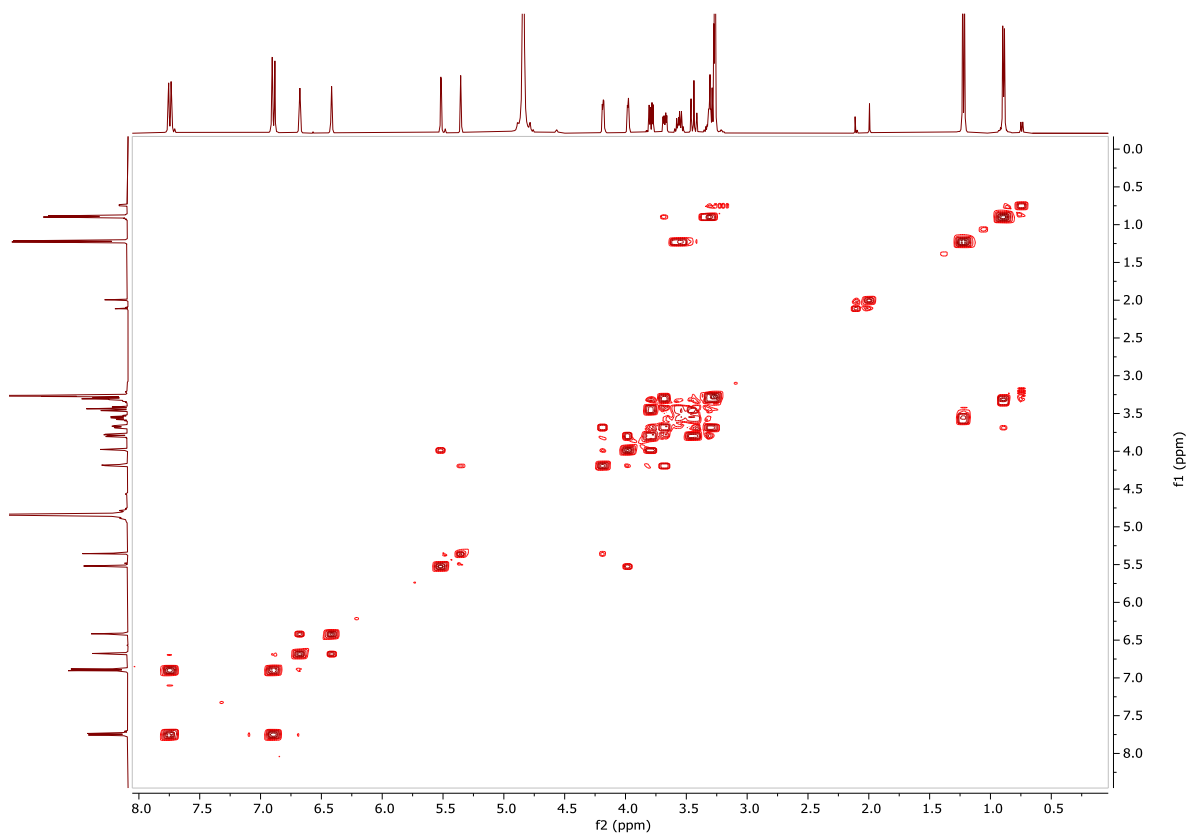
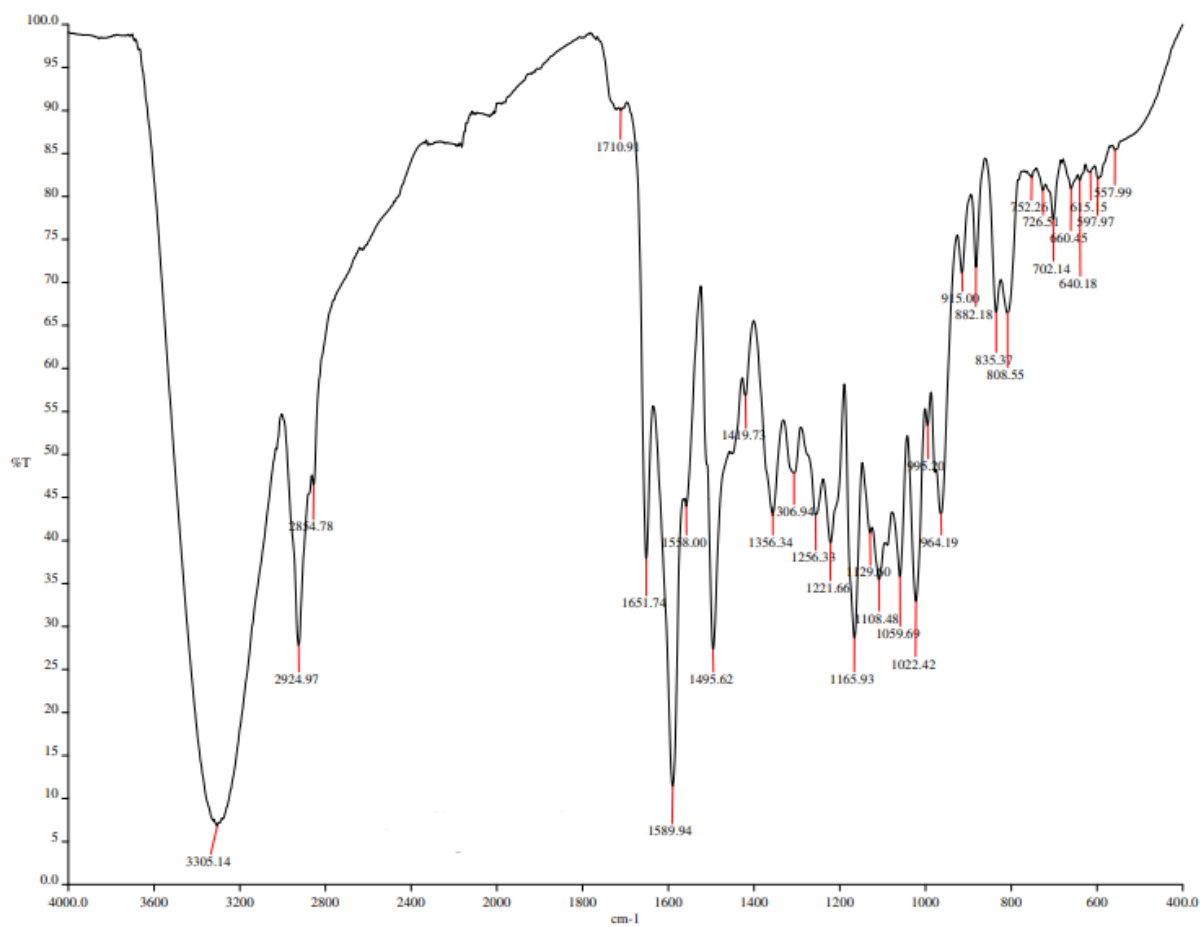


Figura 42. Espectro HMBC (400 MHz,  $CD_3OD-d_4$ ) del compuesto 3.

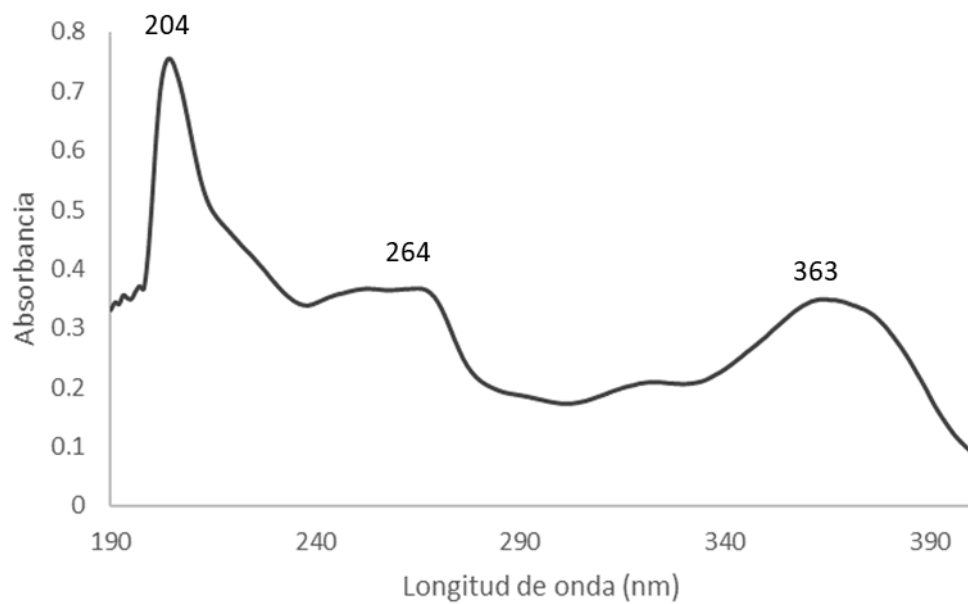




**Figura 43.** Espectro COSY (H →H) (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>) del compuesto **3**.



**Figura 44.** Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto 4.



**Figura 45.** Espectro UV cuantitativo del compuesto 4.

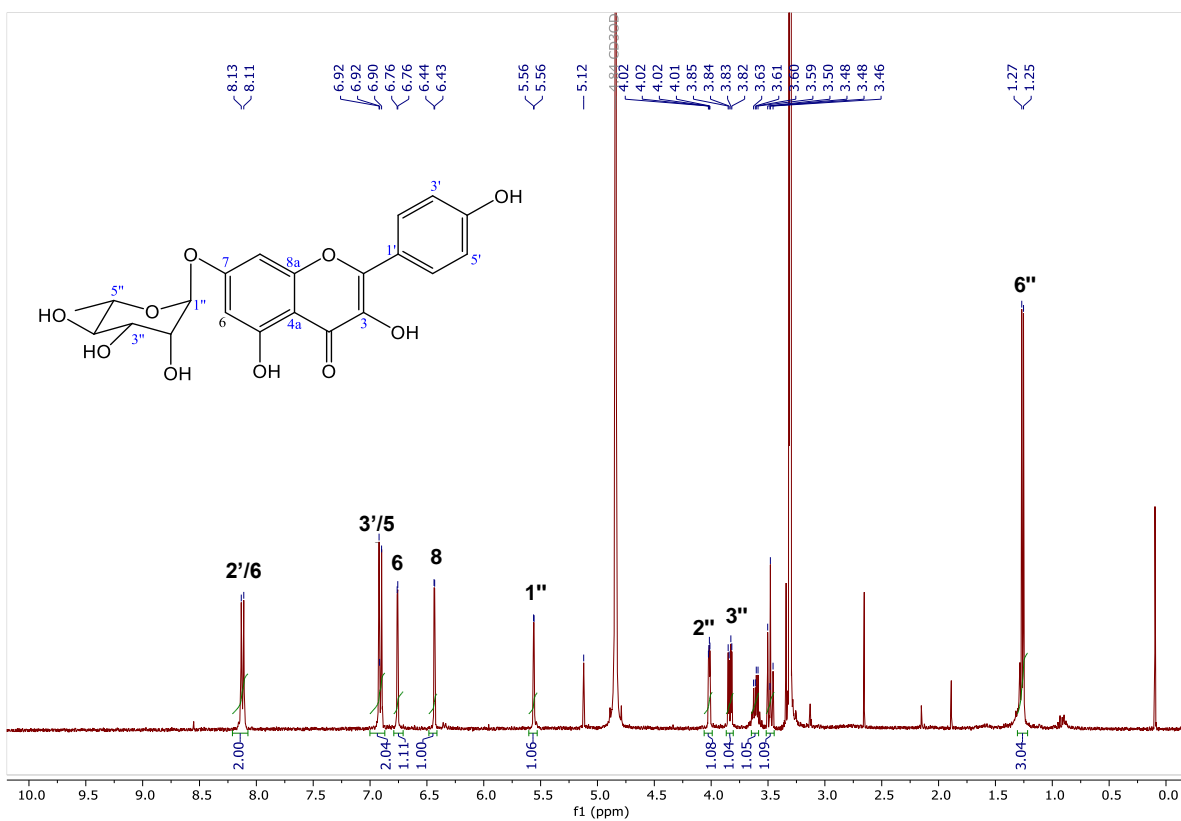


Figura 46. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto 4.

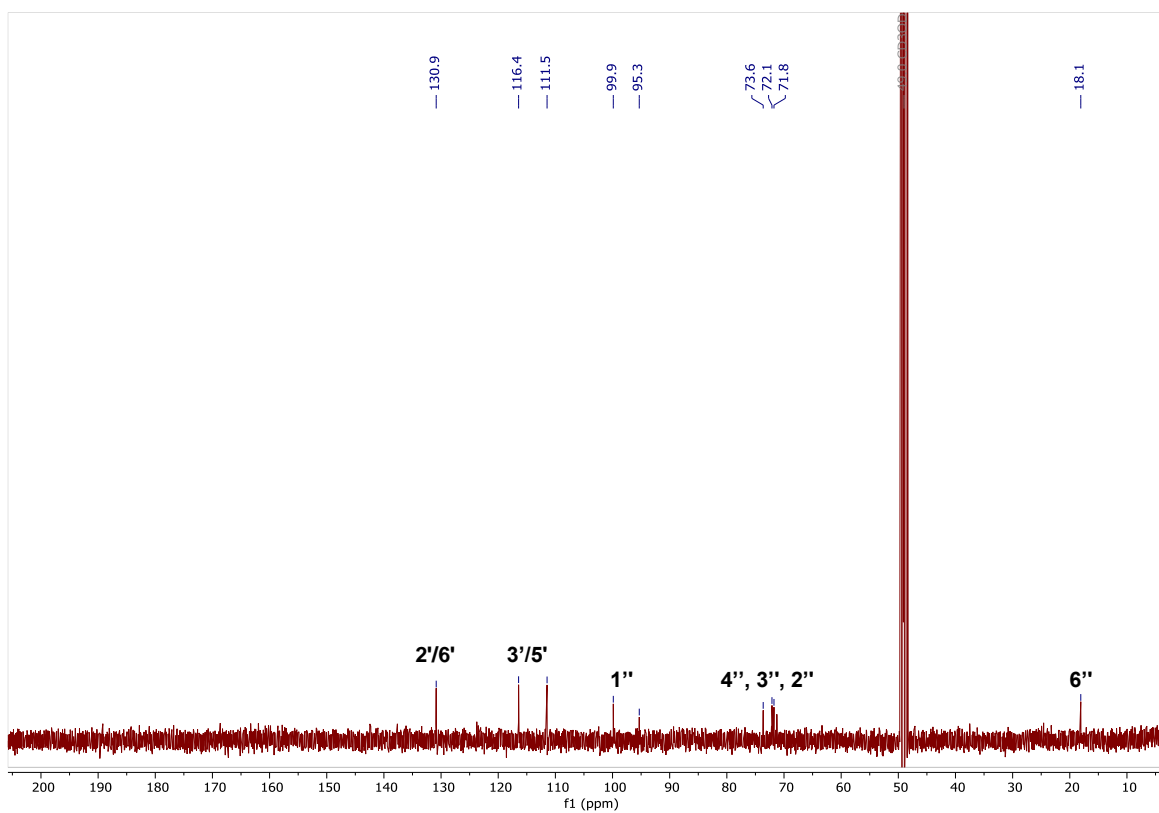


Figura 47. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto 4.

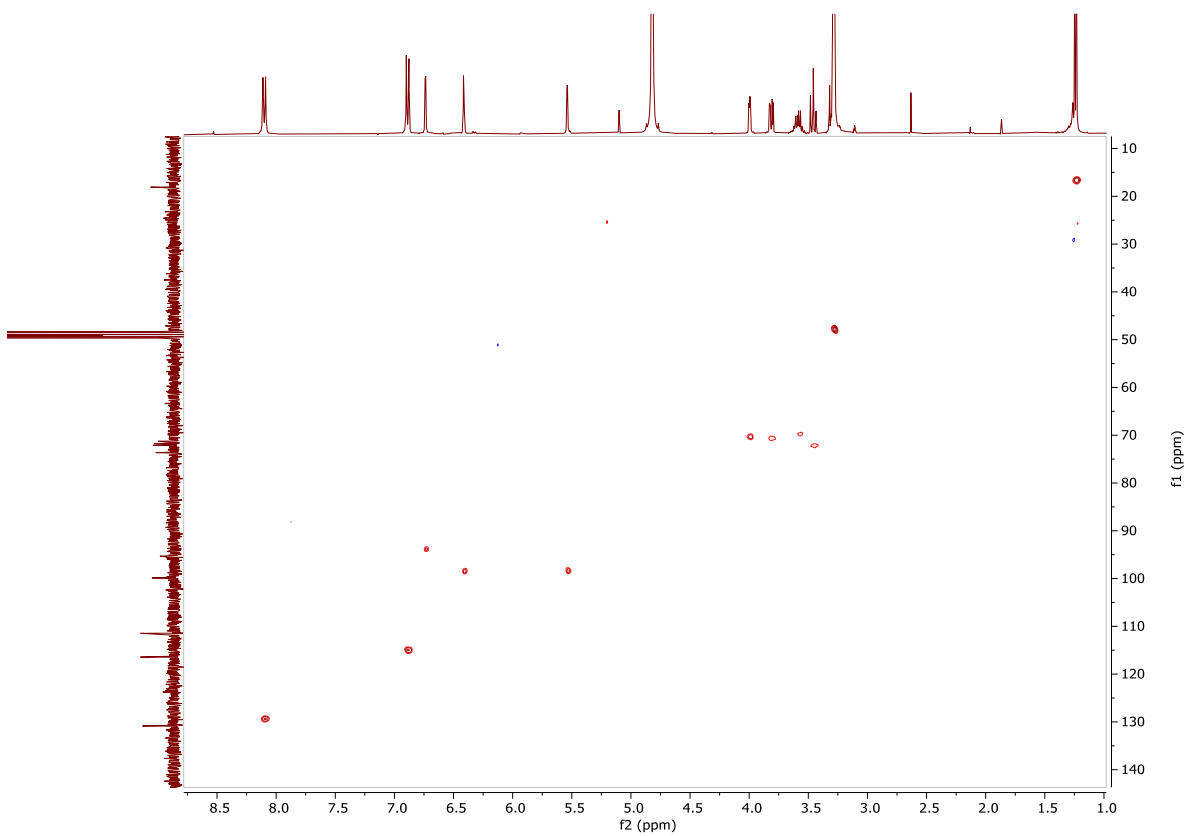


Figura 48. Espectro HSQC (400 MHz,  $CD_3OD-d_4$ ) del compuesto 4.

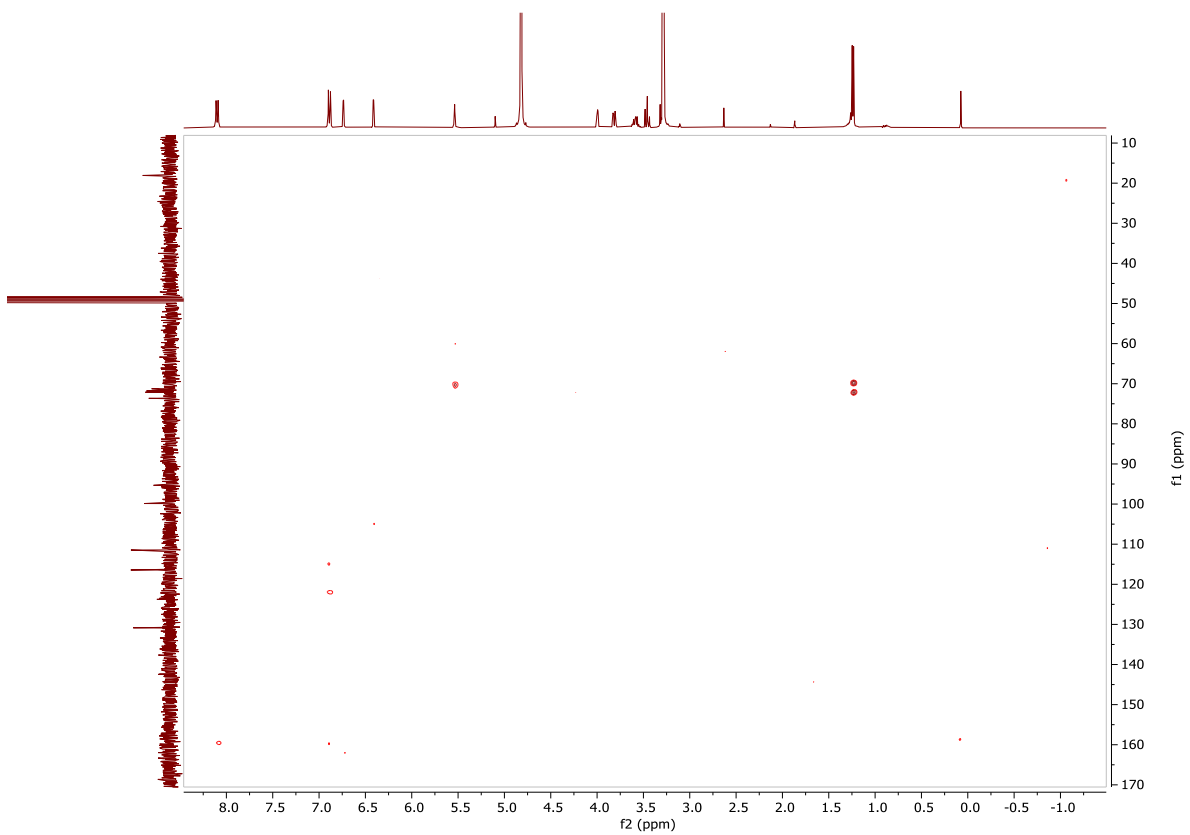


Figura 49. Espectro HMBC (400 MHz,  $CD_3OD-d_4$ ) del compuesto 4.

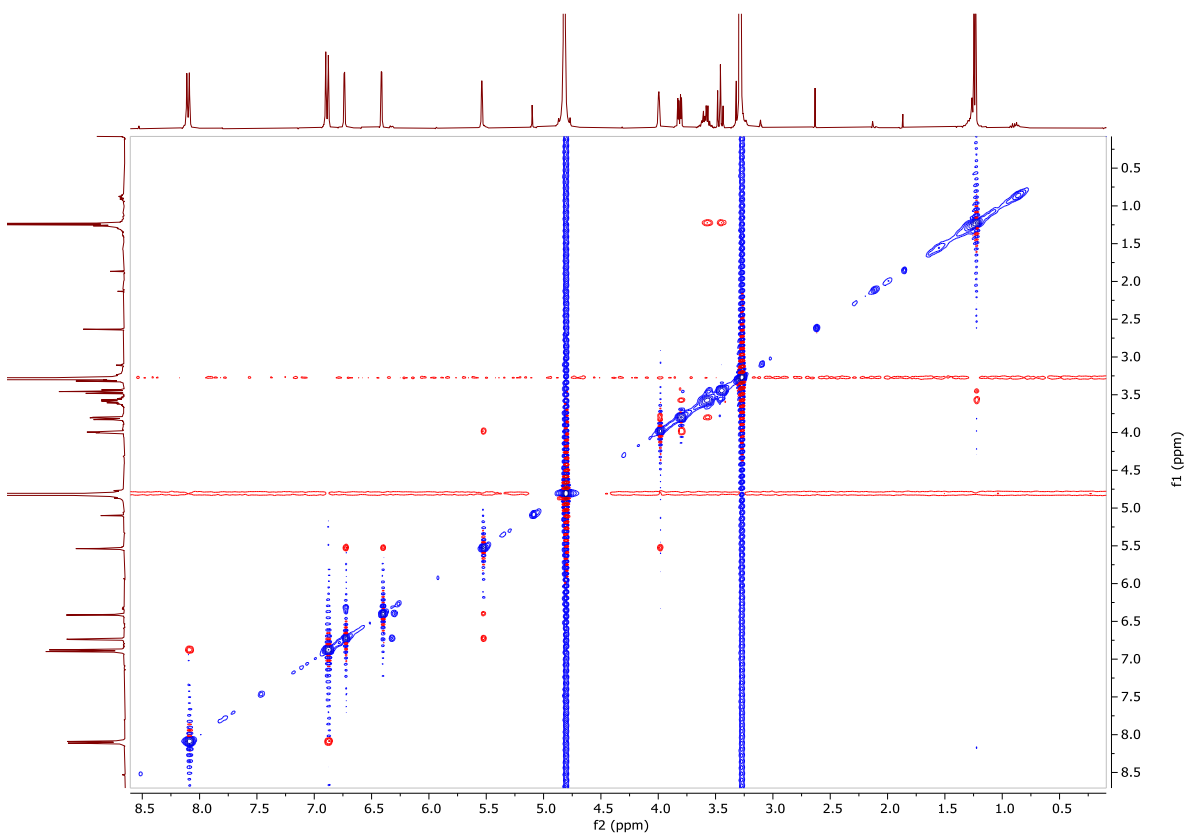


Figura 50. Espectro NOESY (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto 4.

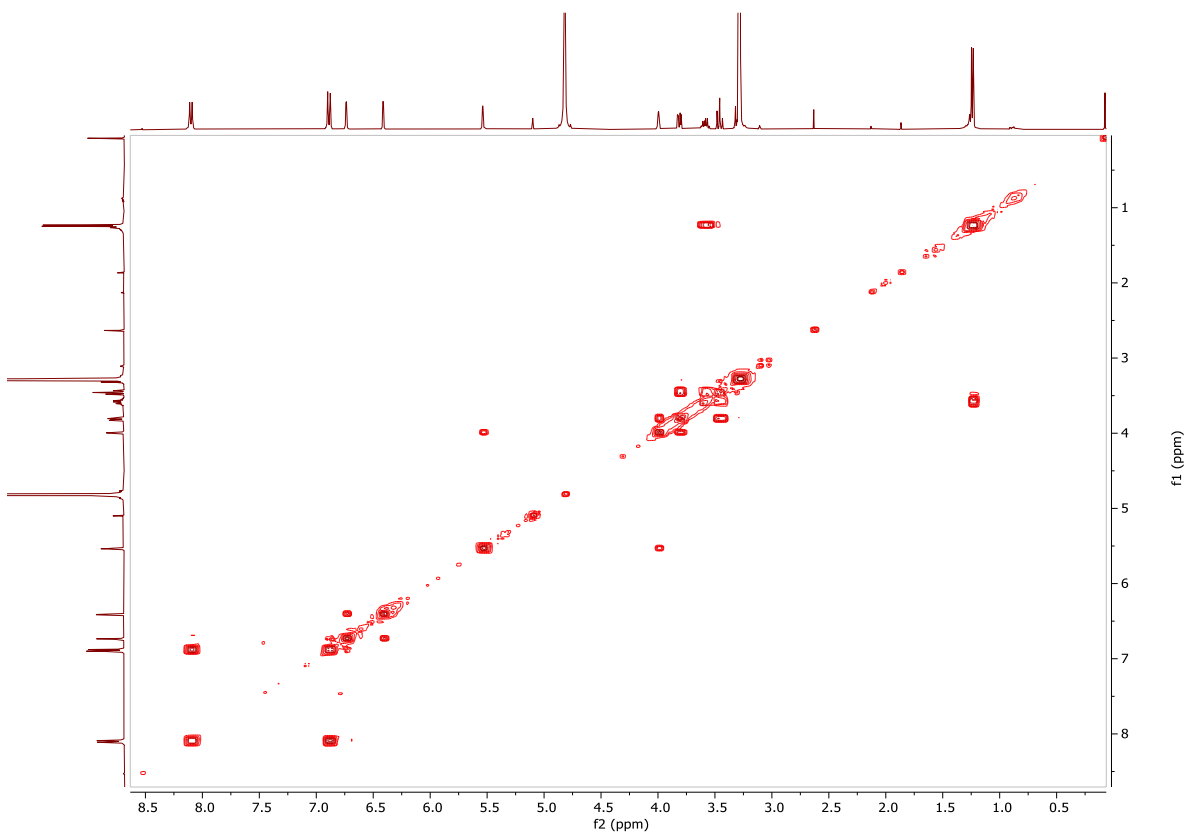


Figura 51. Espectro COSY (H  $\rightarrow$  H) (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto 4.

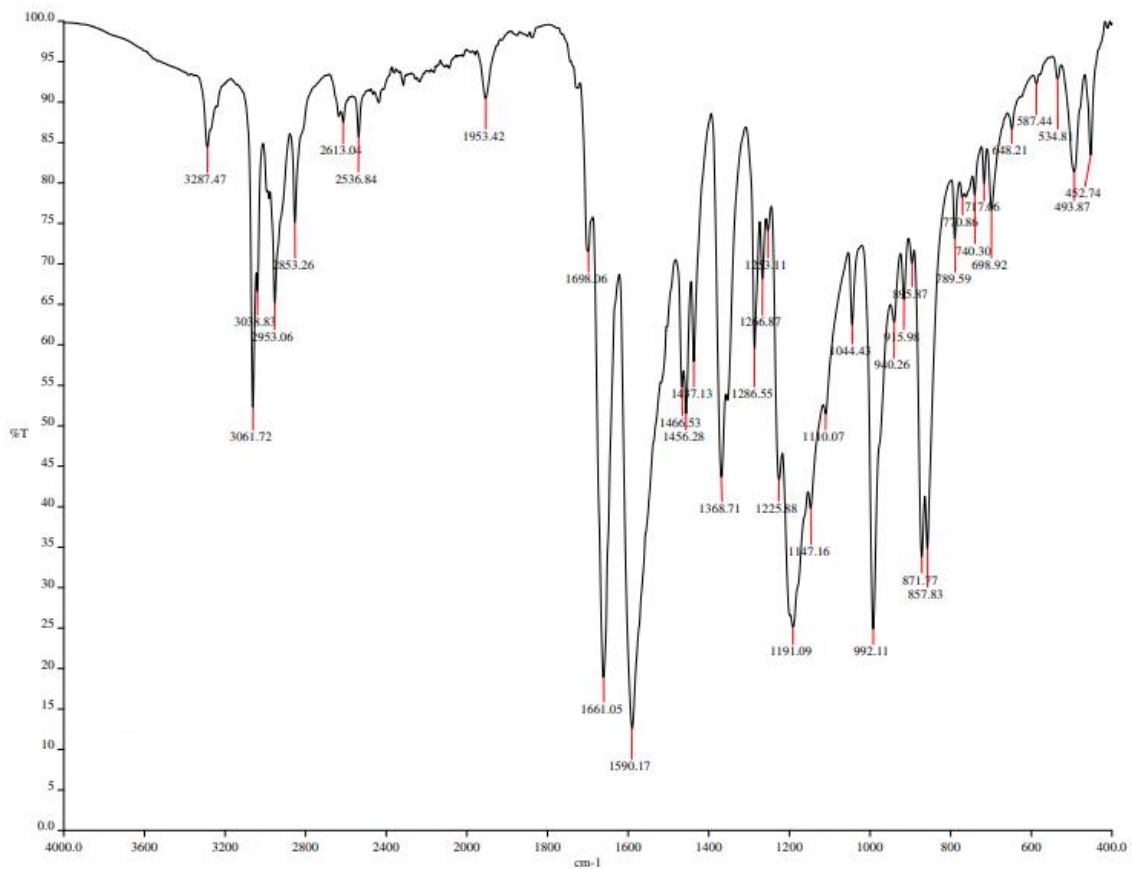


Figura 52. Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto 6.

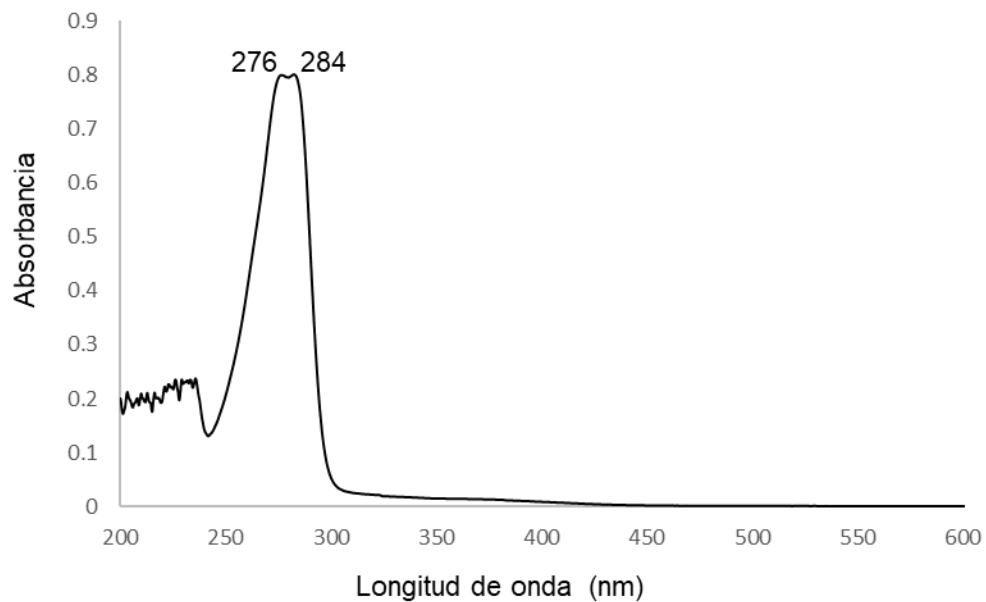


Figura 53. Espectro UV cuantitativo del compuesto 6.

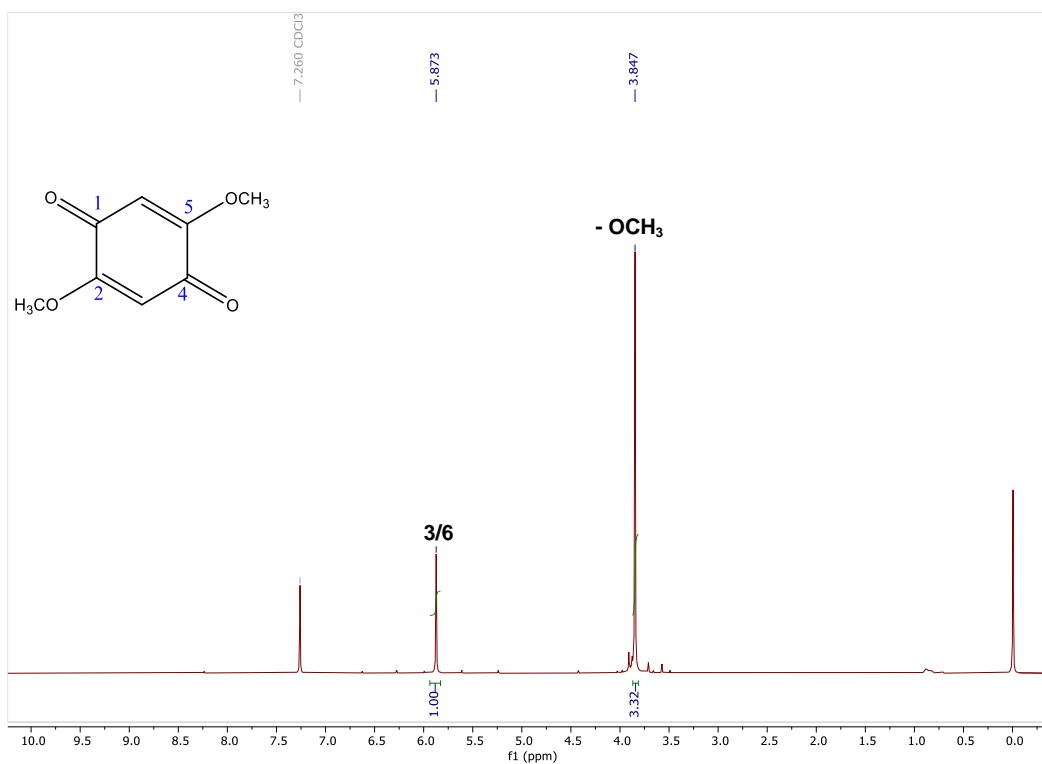


Figura 54. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 6.

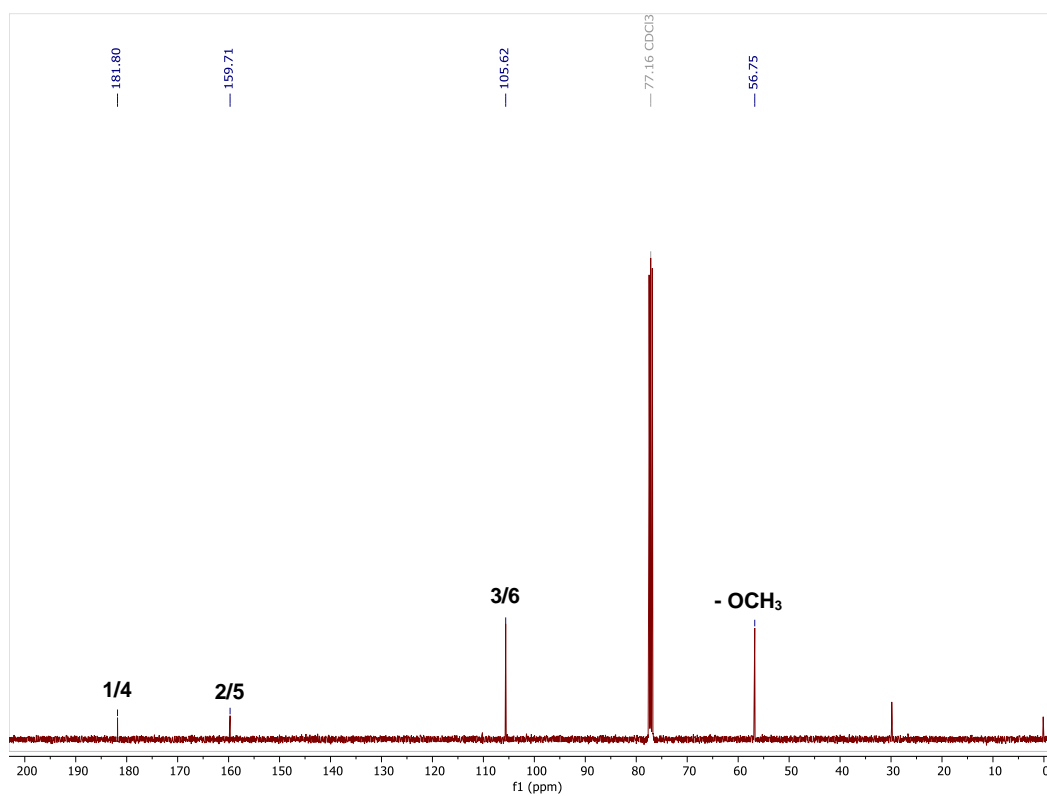


Figura 55. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 6.

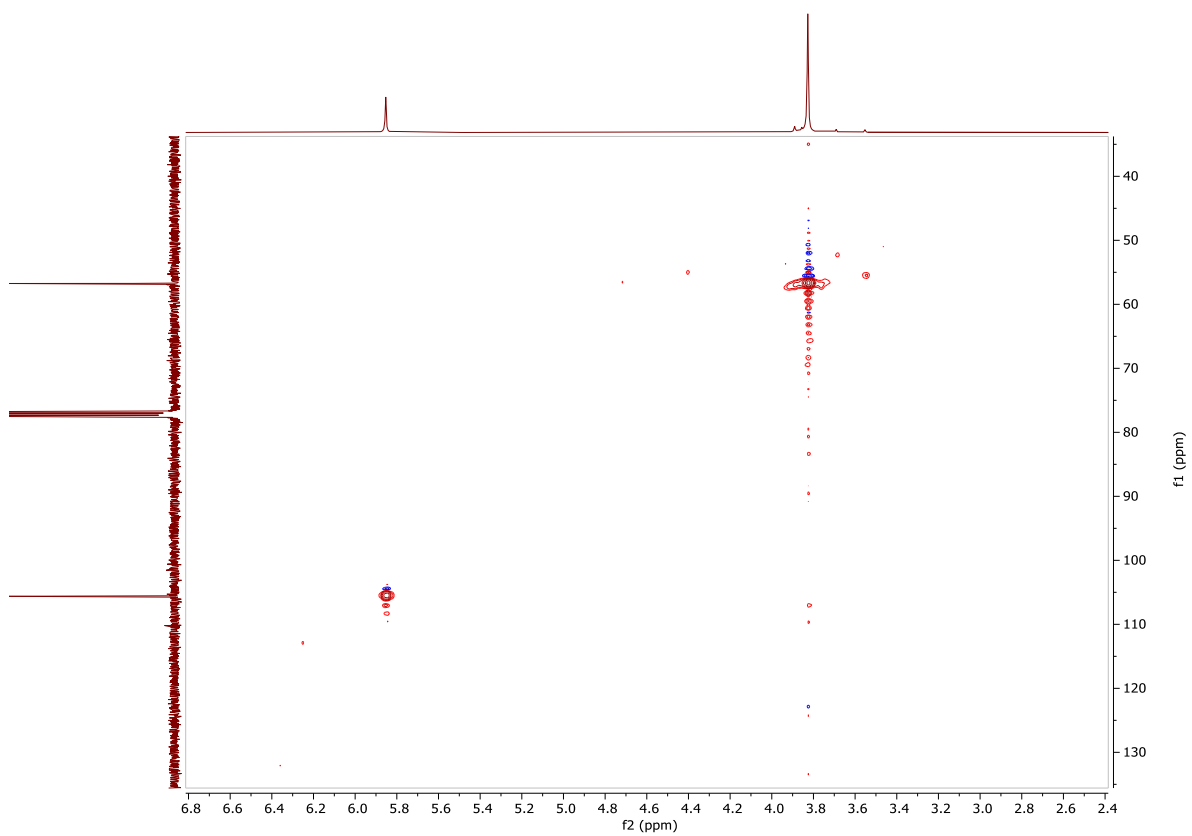
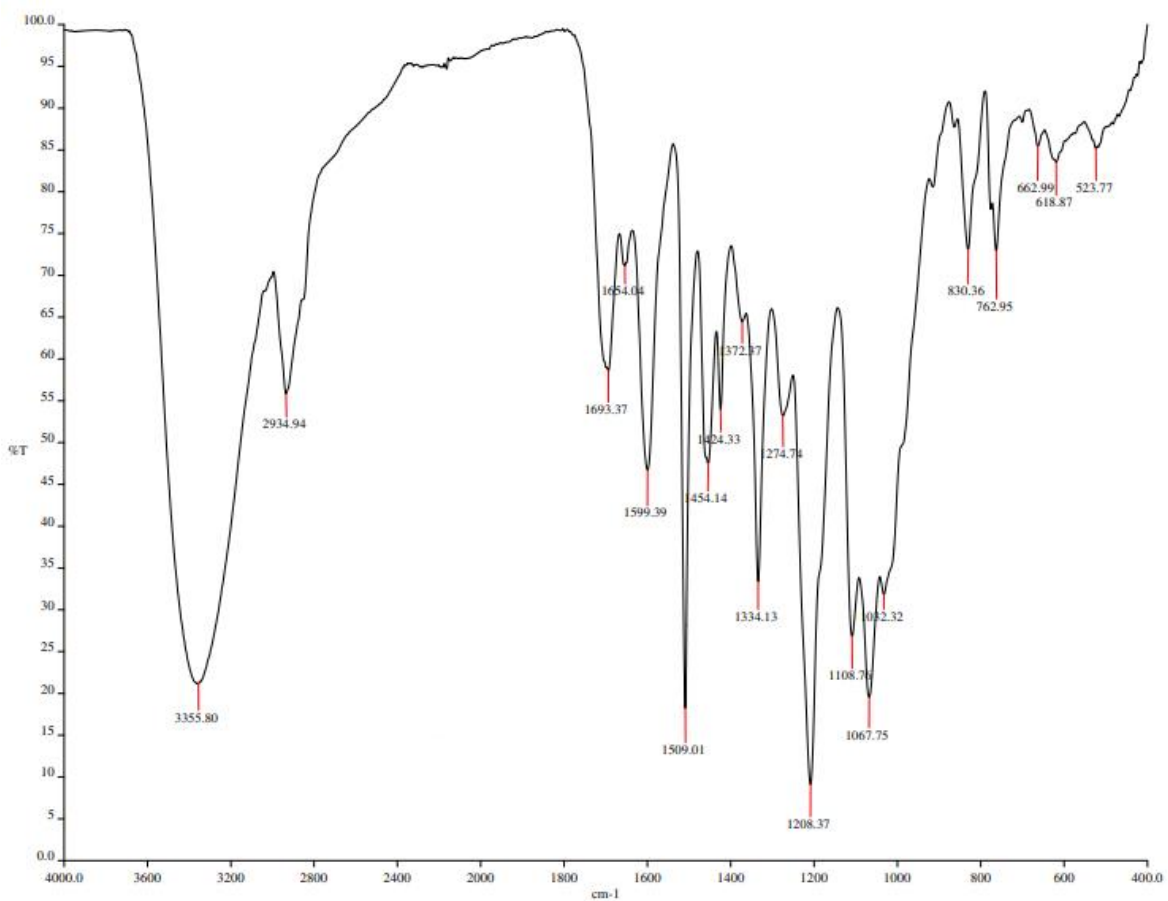
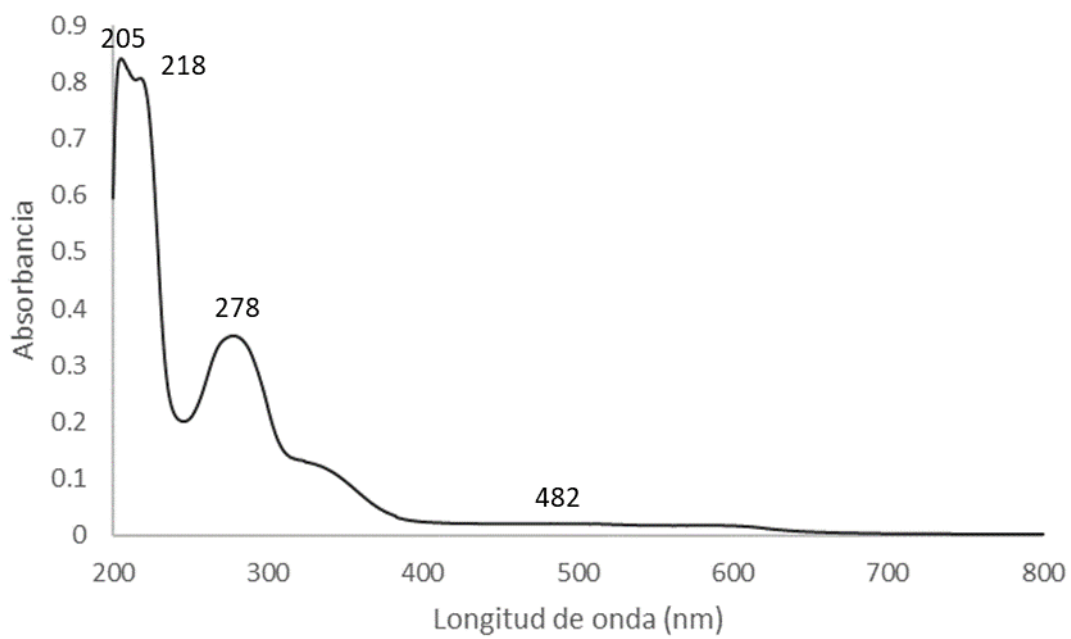


Figura 56. Espectro HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 6.





**Figura 57.** Espectro infrarrojo (FTIR-ATR) del compuesto 7.



**Figura 58.** Espectro UV cuantitativo del compuesto 7.

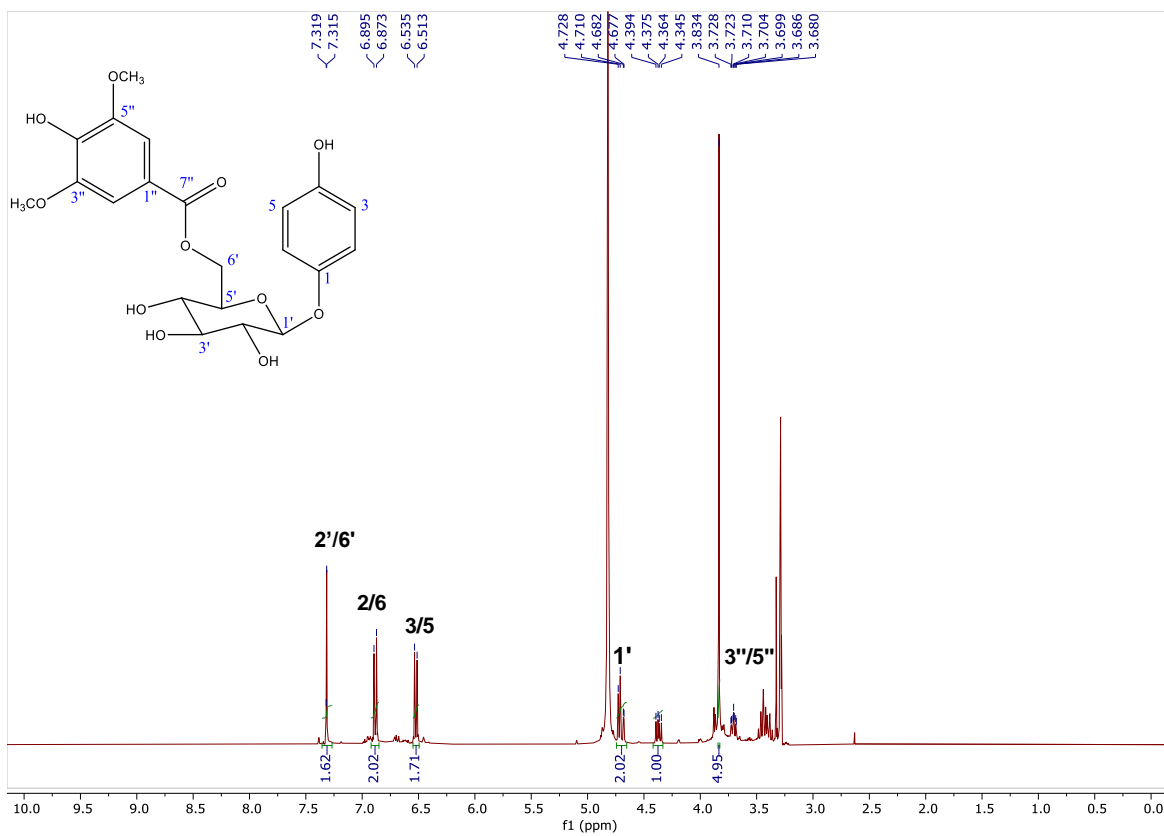


Figura 59. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto 7.

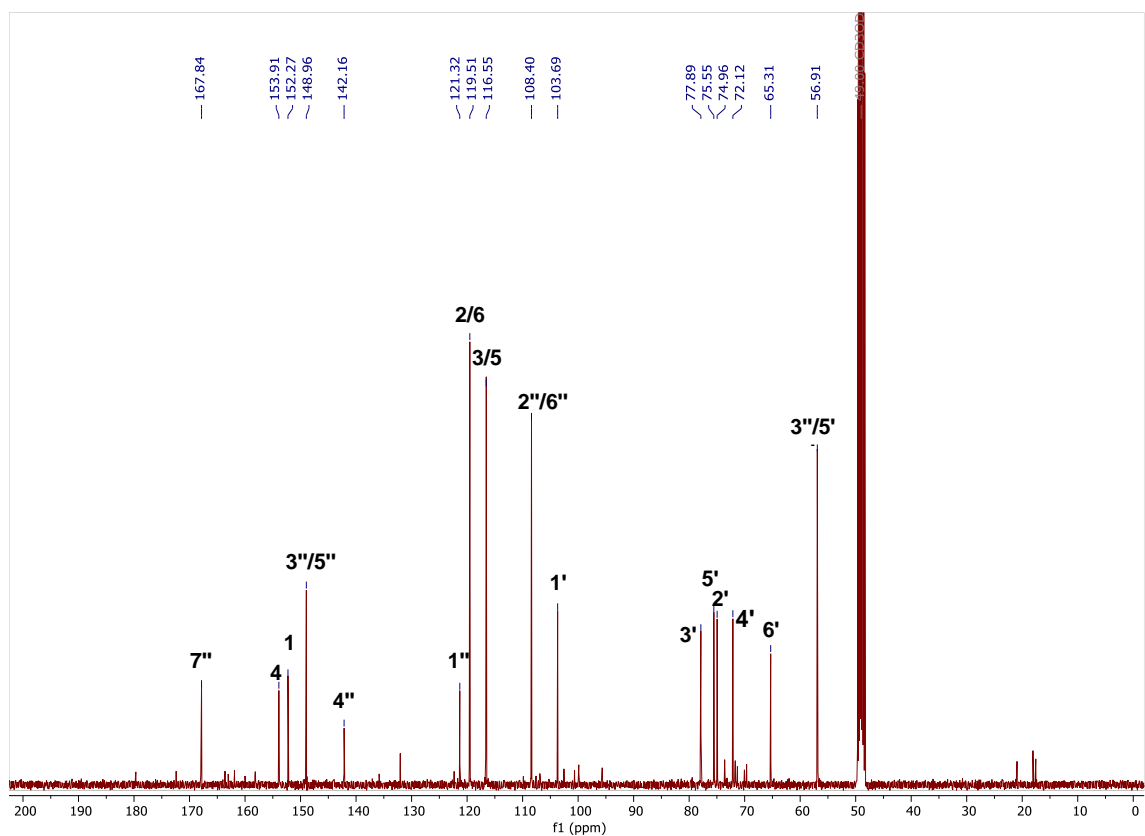


Figura 60. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) del compuesto 7.

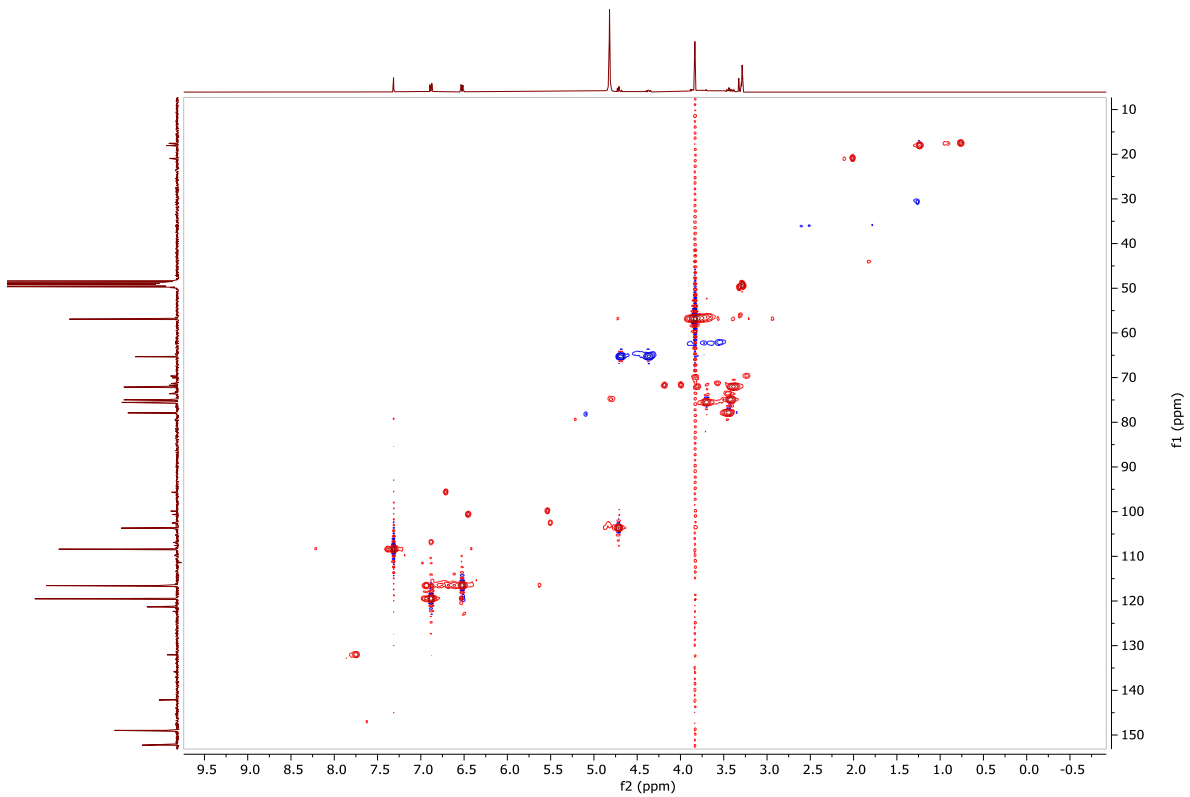


Figura 61. Espectro HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>) del compuesto 7.

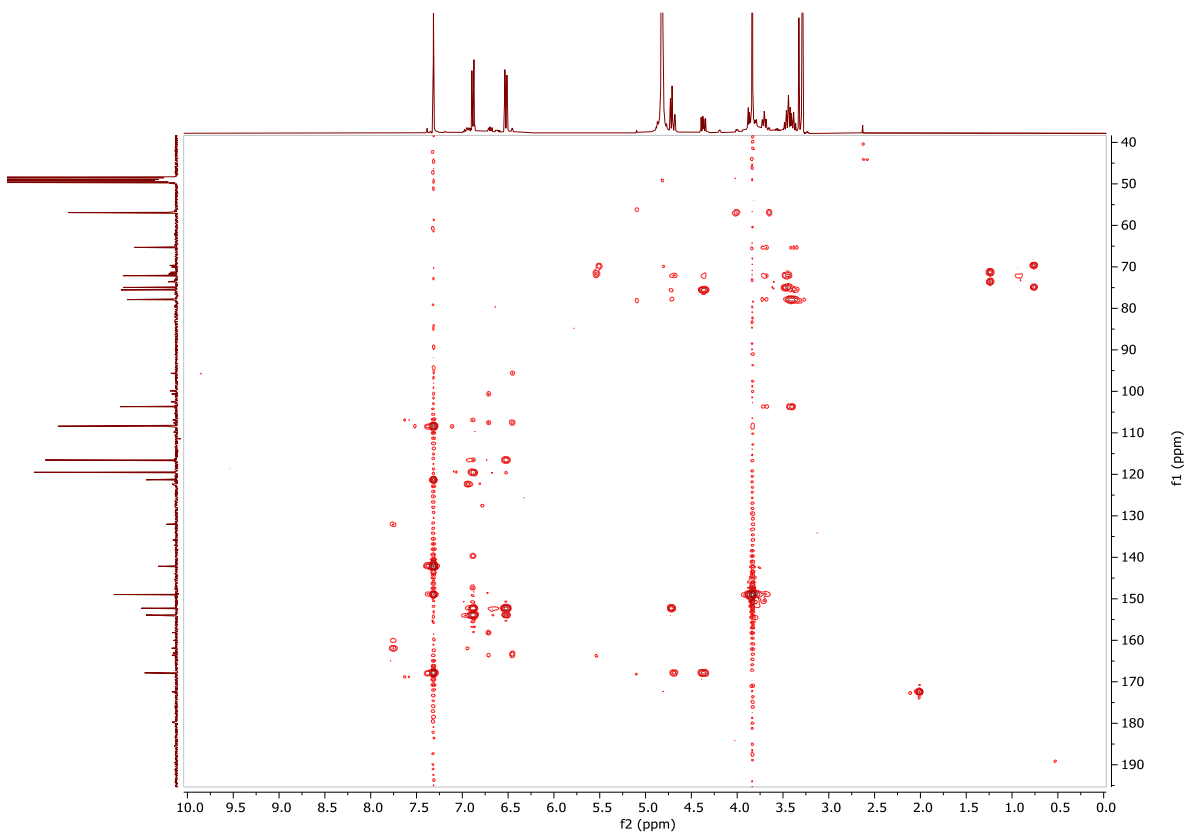


Figura 62. Espectro HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>) del compuesto 7.

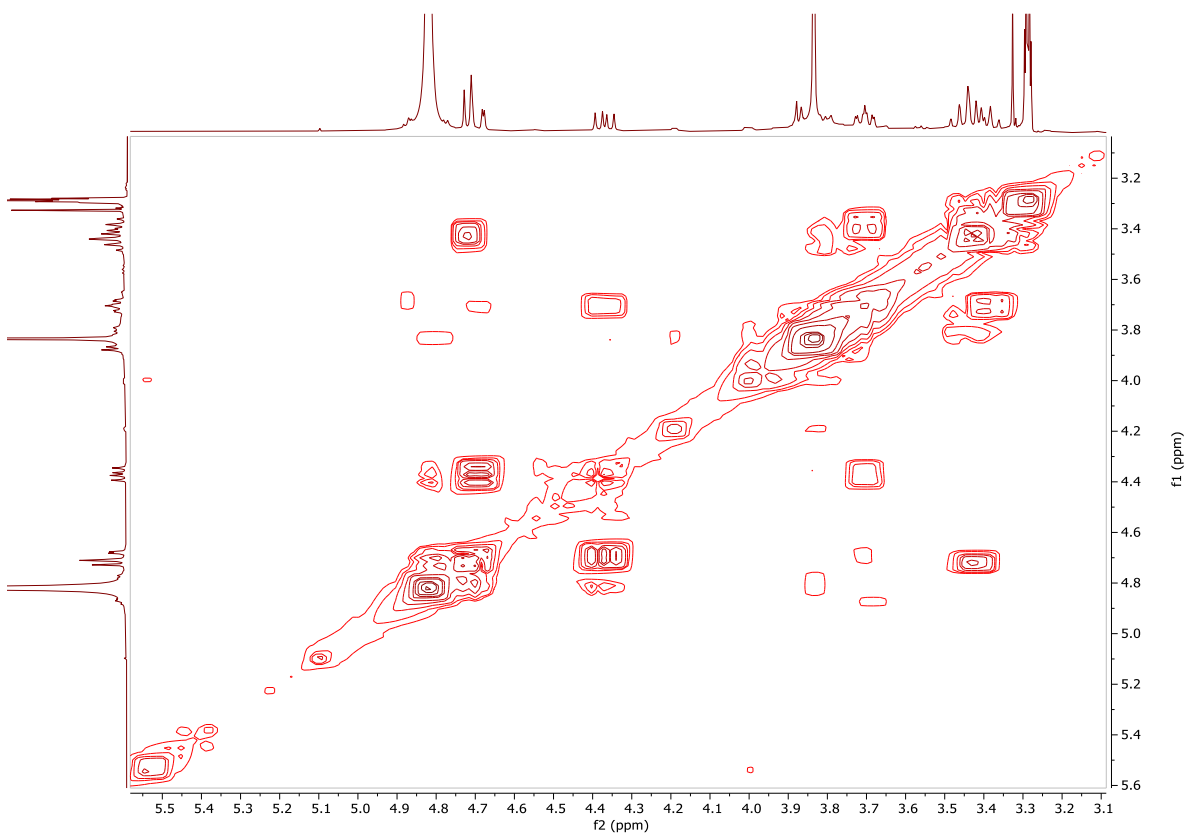


Figura 63. Espectro COSY (H → H) (400 MHz,  $CD_3OD-d_4$ ) del compuesto 7.

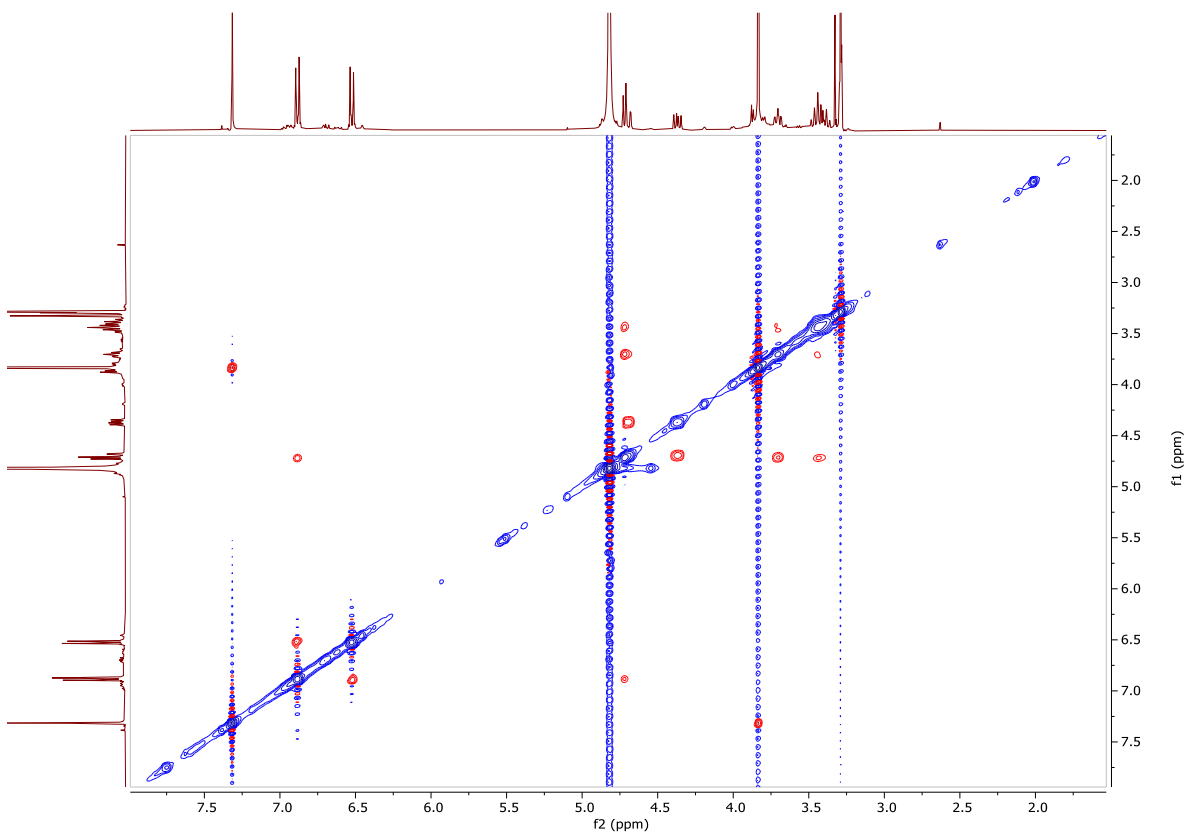


Figura 64. Espectro NOESY (400 MHz,  $CD_3OD-d_4$ ) del compuesto 7.



## Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of compounds from *Justicia spicigera* (Acanthaceae)

Araceli Pérez-Vásquez<sup>a, \*\*</sup>, Miriam Díaz-Rojas<sup>a</sup>, Erika V. Castillejos-Ramírez<sup>a</sup>, Alejandra Pérez-Esquivel<sup>a</sup>, Yuliet Montaña-Cruz<sup>a</sup>, Isabel Rivero-Cruz<sup>a</sup>, Rafael Torres-Colín<sup>b</sup>, Martín González-Andrade<sup>c</sup>, Rogelio Rodríguez-Sotres<sup>d</sup>, José Alberto Gutiérrez-González<sup>a</sup>, Abraham Madariaga-Mazón<sup>e, f</sup>, Rachel Mata<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico

<sup>e</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico

<sup>f</sup> Unidad Académica Del Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Merida, 97302, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*J. spicigera*  
Acanthaceae  
Protein tyrosine phosphatase 1B  
2-N-(p-coumaroyl)-3H-phenoxazin-3-one  
3'-O-Acetyl-kaempferitrin  
Kaempferitrin  
Perisbivalvine B  
2,5-Dimethoxy-p-benzoquinone

### ABSTRACT

An infusion from the aerial parts of *Justicia spicigera* Schldl., an herb commonly used to treat diabetes, inhibited the activity of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B). Two undescribed compounds, 2-N-(p-coumaroyl)-3H-phenoxazin-3-one, and 3'-O-acetyl-kaempferitrin, along with kaempferitrin, kaempferol 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, perisbivalvine B and 2,5-dimethoxy-p-benzoquinone were isolated from the active extract. Their structures were elucidated by a combination of spectroscopic and spectrometric methods. The isolates were evaluated for their inhibitory activity against PTP1B; the most active compounds were 2-N-(p-coumaroyl)-3H-phenoxazin-3-one, and perisbivalvine B with IC<sub>50</sub> values of 159.1  $\pm$  0.02  $\mu$ M and 106.6  $\pm$  0.01  $\mu$ M, respectively. However, perisbivalvine B was unstable. Kinetic analysis of 2-N-(p-coumaroyl)-3H-phenoxazin-3-one and 2,5-dimethoxy-p-benzoquinone (obtained in good amounts) indicated that both compounds behaved as parabolic competitive inhibitors and bind to the enzyme forming complexes with 1:1 and 1:2 stoichiometry. Docking of 2-N-(p-coumaroyl)-3H-phenoxazin-3-one and 2,5-dimethoxy-p-benzoquinone to PTP1B<sub>1-400</sub> predicted a good affinity of these compounds for PTP1B catalytic site and demonstrated that the binding of a second ligand is sterically possible. The 1:2 complex was also supported by the second docking analysis, which predicted an important contribution of  $\pi$ -stacking interactions to the stability of these 1:2 complexes. Finally, an UHPLC-MS method was developed and validated to quantify the content of kaempferitrin in the infusion of the plant.

### 1. Introduction

*Justicia spicigera* Schldl. (Acanthaceae), is a perennial herb found across Mexico, Central America, to Colombia. In Mexico, the plant is known as muicle, and muiltle, among other names. The leaf and fruits are used in ethnomedicine to treat various diseases such as dysentery, skin infections, nervous-related disorders, circulation illnesses, and diabetes; also, the plant is helpful as a blood-purifying agent (Atlas de la Medicina Tradicional, 2009; Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). Since Prehispanic times, the plant has also been used as a dyeing agent (Atlas

de la Medicina Tradicional, 2009); according to Arberet et al. (2021) this species was used as a vegetal colorant in the Prehispanic Borbonicus Codex. Previous phytochemical studies on *J. spicigera* revealed that its main constituents were flavonoids (kaempferitrin, naringenin, kaempferol) (Euler and Alam, 1982; Esquivel-Gutiérrez et al., 2013), carotenoids (Domínguez et al., 1990; Real-Sandoval et al., 2020), sterols, allantoin (Domínguez et al., 1990), the lignan procumbenoside B (Pérez-Gutiérrez et al., 2018), a few aliphatic compounds (Vega-Avila et al., 2012), and eucalyptol, fatty acid derivatives, azulene, and cinamic acid esters (Baqueiro-Peña and Guerrero-Beltrán, 2017). From

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [perezva@unam.mx](mailto:perezva@unam.mx) (A. Pérez-Vásquez), [rachel@unam.mx](mailto:rachel@unam.mx) (R. Mata).

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113410>

Received 17 March 2022; Received in revised form 19 August 2022; Accepted 20 August 2022

0031-9422/© 20XX

the pharmacological point of view, different extracts prepared from the aerial parts have shown cytotoxic (Cáceres-Cortés et al., 2001; Jacobo-Salcedo et al., 2011; Alonso-Castro et al., 2012; Fernández-Pomares et al., 2018), immunomodulatory (Alonso-Castro et al., 2012), antiprotozoal (Ponce-Macotela et al., 2001; Peraza-Sánchez et al., 2005; 2007), antihelminthic (Awad et al., 2018), antibacterial and antifungal (Vega-Avila et al., 2012; Jacobo-Salcedo et al., 2011), anti-inflammatory (Meckes et al., 2004), anti-obesity (Real-Sandoval et al., 2020) antidiabetic (Ortiz-Andrade et al., 2012); antihypertensive (Esquivel-Gutiérrez et al., 2013; Magos-Guerrero et al., 2017), antinociceptive (Zapata-Morales et al., 2016; Ángeles-López et al., 2019), anticonvulsant, anxiolytic (González-Trujano et al., 2017) and spasmolytic (Ángeles-López et al., 2019) activities. Most studies have been carried out with the aqueous or ethanol extracts and the flavonoid kaempferitrin. Regarding toxicological studies, two different investigations indicated that the ethanol and aqueous extracts were not toxic to mice in acute models (Alonso-Castro et al., 2012; González-Trujano et al., 2017).

In our continued efforts to discover protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors from natural sources (Rebollar-Ramos et al., 2021; Díaz-Rojas et al., 2021; Rangel-Grimaldo et al., 2020), herein we report the enzymatic inhibition of the components from an infusion prepared from the aerial parts of *J. spicigera*.

PTP1B is an intracellular monomeric enzyme-containing 431 amino acids localized in the endoplasmic reticulum, in insulin-targeted tissues (liver, muscle and fat). PTP1B negatively regulates insulin and leptin signaling systems. Furthermore, many humans and animal studies have demonstrated that in type 2 diabetes mellitus (T2DM) insulin resistance is accomplished by increases in PTP1B activity, dephosphorylating the insulin receptor and thus interrupting the insulin signaling pathways. Consequently, PTP1B inhibition is an important way to improve insulin resistance and normalize glucose levels in patients with T2DM. Many natural products have been reported as potent and selective PTP1B inhibitors (Casertano et al., 2022; Singh et al., 2022), but only tro-

usquemine 2, from the dogfish shark, and some analogs have entered clinical trial (Kazakova et al., 2022). Accordingly, developing new and safe PTP1B inhibitors is of great significance because T2DM continue to be a public health problem worldwide (Kumar et al., 2020; Singh et al., 2022; Zhao et al., 2018).

## 2. Results and discussion

### 2.1. Isolation and characterization

Partitioning with EtOAc (FO1, IC<sub>50</sub> = 91.8 ± 4.6 µg/mL) of an active infusion from the leaves of *J. spicigera*, followed by column chromatography on silica gel and Sephadex LH-20 yielded two unreported compounds, 2-*N*-(*p*-coumaroyl)-3*H*-phenoxazin-3-one (1), and 3'-*O*-acetyl-kaempferitrin (2) along with the known compounds kaempferitrin (3) (Aragao et al., 1990), kaempferol 7-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (4) (Fico et al., 2003), perisbivalvine B (Thuy et al., 2012a,b) (5), and 2,5-dimethoxy-*p*-benzoquinone (6) (Kim et al., 2001) (Fig. 1).

Compound 1, isolated as a blue amorphous powder, showed a protonated molecular ion peak at *m/z* 405.1090 [M + H]<sup>+</sup> (calcd 405.1081), corresponding to a molecular formula of C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, as revealed in the high-resolution electrospray ionization mass spectrum (HRESIMS). The UV-VIS [ $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ) 224 (3.87), 291 (3.63), 601 (3.90) nm] and NMR data (Table 1; Figs. S1–S12) revealed that compound 1 was the amide of the *p*-coumaric acid of perisbivalvine B (4) (Thuy et al., 2012a). The <sup>1</sup>H NMR signals in CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> of the 3*H*-phenoxazin-3-one nucleus were observed at  $\delta_{\text{H}}$  8.62 (H-1), 6.53 (H-4), 6.94 (H-6) and 6.48 (H-9) as seen in perisbivalvine A (7), an amide isolated from *Peristrophe bivalis* (L.) Merr. (Acanthaceae) and other natural 3*H*-phenoxazin-3-ones (Thuy et al., 2012a, 2012b, 2013; Bezerra Gomes et al., 2010). The <sup>13</sup>C NMR chemical shifts (Table 1) of the phenoxazine core were closed to those of 7 except for the signal for C-5a, which in the case of compound 1 was assigned based on the HMBC correlations H-9 and H-6/C-

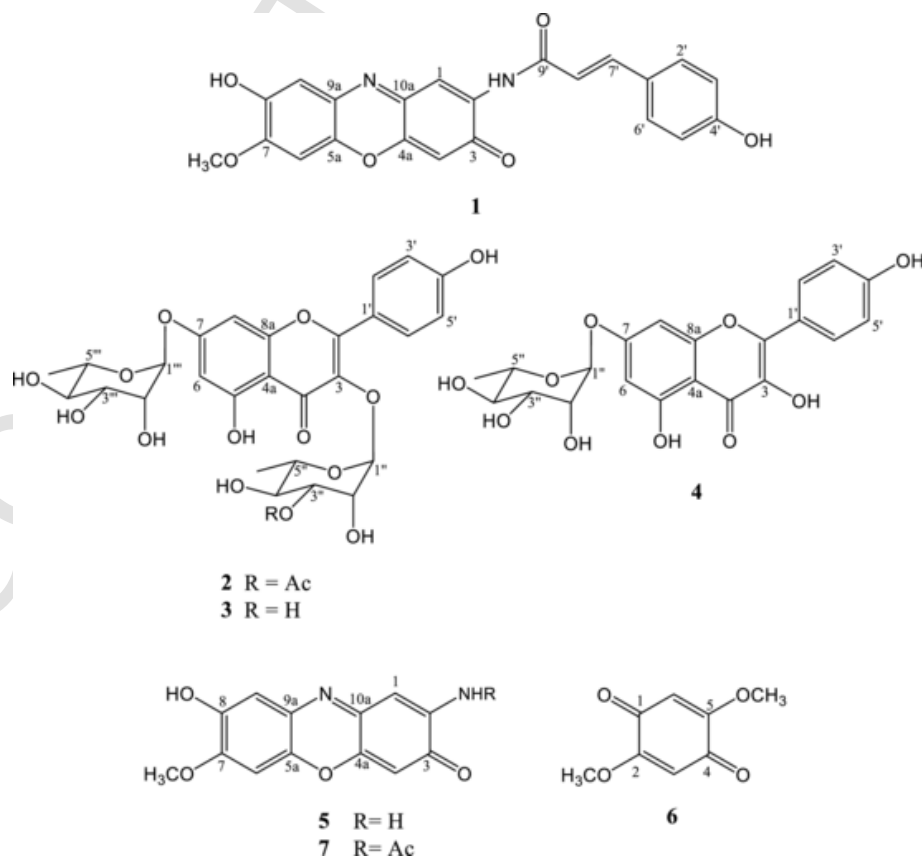


Fig. 1. Structures of compounds 1–6 from *J. spicigera*.

**Table 1**

<sup>1</sup>H (400 MHz) and <sup>13</sup>C (100 MHz) NMR spectroscopic data in DMSO-*d*<sub>6</sub> and CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> for **1**.

DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>				CH <sub>3</sub> OH- <i>d</i> <sub>4</sub>		
no.	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC (H→C)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC (H→C)
1	114.7	8.44 s	C-2	117.0	8.62 s	C-3, C-4a, C-10a
2	146.3	–	–	131.5	–	–
3	186.5	–	–	172.9	–	–
4	102.7	6.26 s	–	102.2	6.53 s	C-2, C-4a, C-10a, C-3
4a	146.2	–	–	148.6	–	–
5a	146.1	–	–	149.1	–	–
6	107.1	6.86 s	–	107.5	6.94 s	C-5a, C-7, C-8, 9a
7	152.7	–	–	155.5	–	–
8	<sup>a</sup>	–	–	175.9	–	–
9	100.3	6.29 s	C-9a	103.6	6.48 s	C-9a, C-5a, C-7, C-8
9a	132.5	–	–	134.8	–	–
10a	146.1	–	–	133.9	–	–
1'	126.1	–	–	127.7	–	–
2'	129.7	7.53, d (8.5)	C-7', C-4'	131.0	7.51 d (8.6)	C-4'
3'	115.7	6.81, d (8.5)	C-1'	116.8	6.82 d (8.6)	C-1'
4'	159.1	–	–	160.9	–	–
5'	115.7	6.81, d (8.5)	C-1'	116.8	6.80 d (8.6)	C-1'
6'	129.7	7.53, d (8.5)	C-4'	131.0	7.51 d (8.6)	C-4'
7'	140.4	7.48, d (15.6)	C-9'	143.3	7.61 d (15.6)	C-9', C-2', C-6'
8'	119.1	7.10, d (15.6)	C-1'	118.8	6.77 d (15.6)	C-1'
9'	164.2	–	–	167.1	–	–
7-OMe	55.4	3.79 s	C-7	56.4	3.92 s	C-7
NH	–	9.32 brs	C-1, C-9'	–	–	–

<sup>a</sup> Not detected.

5a. Thuy et al. (2012a; 2012b) assigned the chemical shift of C-5a at δ<sub>C</sub> 130.6 (in CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>), which is inconsistent with an aromatic carbon attached to oxygen. However, many other phenoxazine-type of compounds, including chandranimycin D and pitucamycin (Bezerra Gomes et al., 2010), venezueline E (Ren et al., 2013), and maroxazinone (Abdelfattah, 2013), the chemical shift magnitude for C-5a is similar to compound **1**. The presence of the *p*-coumaric acid residue was supported by the typical signals of a *p*-disubstituted benzene ring [δ<sub>H</sub>/δ<sub>C</sub> 127.7 (C-1'); 7.51 (H-2', H-6')/131.0 (C-2', C-6'); 6.82 (H-3', H-5')/116.8 (C-3', C-5'); and 160.9 (C-4') in CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>] attached to a C<sub>3</sub> side chain [δ<sub>H</sub>/δ<sub>C</sub> 167.1 (C-9'), 6.77 (H-8')/118.8 (C-8'); 7.61 (H-7')/143.3 (C-7')]. The splitting patterns (d, *J* = 15.6 Hz) of H-7' and H-8' were consistent with the *trans* configuration of the double bond of the *para*-coumaric residue. On the other hand, the presence of the secondary amide at C-2 was ascertained based on the chemical shift of C-9' and the HMBC correlations observed between δ<sub>H</sub> 9.02 (NH)/δ<sub>C</sub> 164.2 (C-9') and 114.7 (C-1) in the experiment registered in DMSO-*d*<sub>6</sub> (Figs. S9–S12). Further analysis of the HMBC experiment registered in CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> showed the correlations between δ<sub>H</sub> 6.94 (1H, s, H-6) and the carbons at δ<sub>C</sub> 56.4 (7-OMe), 134.8 (C-9a), and 175.9 (C-8), thus, indicating that the methoxy group was at C-7 (Figs. S1–S5). This observation was further substantiated by the NOESY correlation H-6/7-OMe. Other relevant correlations are indicated in Table 1. Based on, these considerations compound **1** was characterized as 2-*N*-(*p*-coumaroyl)-3*H*-phenoxazin-3-one (**1**).

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Chemical shifts were calculated and compared with the experimental data to corroborate the correct NMR assignments of **1**. The methodology involves a conformational analysis using molecular mechanics, geometry optimization using density functional theory (DFT),

and chemical shifts calculations with the GIAO tensors method (Table S1–S3, Fig. S23). The calculated chemical shifts in DMSO-*d*<sub>6</sub> are generally in agreement with the observed data, with a mean absolute error (MAE) of 2.18 (Table S12).

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Chemical shifts were calculated and compared with the experimental data to corroborate the correct NMR assignments of **1**. The methodology involves a conformational analysis using molecular mechanics, geometry optimization using density functional theory (DFT), and chemical shift calculations with the GIAO tensors method (Table S1–S3, Fig. S23). The calculated chemical shifts in DMSO-*d*<sub>6</sub> agree with the observed data, with a mean absolute error (MAE) of 2.18 (Table S12).

Previously Thuy et al. (2012a) proposed that compound **7** might exist as a tautomeric charged species like **7a** in solution (Fig. S24), which could possess a faster rate of interconversion than the NMR time scale. To assess this possibility, a theoretical study of all possible, stable tautomers of **1**, namely **1a–1c** (Fig. S24), was carried out using the same level of the theory mentioned above. In each case, a conformational search of each tautomer was considered. The chemical shifts of **1a–1c** were calculated (Figs. S25–S27). According to Table S5, the calculated chemical shifts for C-2 and C-9 in tautomer **1a** were closer to the experimental values registered in DMSO-*d*<sub>6</sub>. On the other hand, in tautomer **1b**, the calculated chemical shifts for C-1 and C-9 were closer to the experimental value (Table S8). Finally, the calculated chemical shift for C-8 in tautomer **1c** (Table S11) was identical to the experimental value observed for C-8 in CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>. Together, it seems to support Thuy's proposal (2012a).

Compound **2** was isolated as an amorphous white solid. Its molecular formula was deduced as C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>O<sub>15</sub> based on the pseudomolecular ion observed at *m/z* 619.1668 [M-H]<sup>–</sup> in the HRESIMS. Its UV and NMR (Table 2), (Figs. S13–S22) data were close to those of kaempferitrin (**3**). However, there were two significant differences in the NMR spectra: (i) the chemical shifts of the rhamnose moiety attached to C-3 were different [δ<sub>H</sub>/δ<sub>C</sub> 5.47 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-1''/102.9 (C-1'')); 4.38 (1H, dd, *J* = 3.2, 1.8 Hz, H-2'')/69.7 (C-2''); 5.00 (1H, dd, *J* = 9.8, 3.2 Hz, H-

**Table 2**

<sup>1</sup>H (400 MHz) and <sup>13</sup>C (100 MHz) NMR spectroscopic data in CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> for **2**.

no.	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC (H→C)
2	159.7	–	
3	136.2	–	
4	179.7	–	
5	158.1	–	
6	100.6	6.46, d (2.2)	C-4a, C-5, C-7, C-8
7	163.5	–	
8	95.6	6.72, d (2.2)	C-4a, C-6, C-7, C-8a
4a	107.5	–	
8a	163.0	–	
1'	122.3	–	
2'	132.0	7.82, d (8.8)	C-2, C-4', C-6'
3'	116.7	6.94, d (8.8)	C-1', C-4', C-5'
4'	161.8	–	
5'	116.7	6.94, d (8.8)	C-1', C-3', C-4'
6'	132.0	7.82, d (8.8)	C-2, C-2', C-4'
1''	102.9	5.47, d (1.8)	C-5'', C-3''
2''	69.7	4.38, dd (3.2, 1.8)	C-4''
3''	75.3	5.00, dd (9.8, 3.2)	C-4''
4''	70.4	3.65–3.40 m	
5''	72.2	3.65–3.40 m	
6''	17.7	0.97, d (6.1)	C-4'', C-5''
1'''	99.9	5.56, d (1.8)	C-7, C-2'', C-5''
2'''	71.7	4.02, dd (3.4, 1.8)	C-4'', C-3''
3'''	72.1	3.83, dd (9.5, 3.5)	
4'''	73.6	3.65–3.40 m	
5'''	71.3	3.65–3.40 m	
6'''	18.1	1.26, d (6.1)	C-4'', C-5''
OAc-3''	21.1	2.14, s	OAc-3''
OAc-3'''	172.7	–	



3'')/75.3 (C-3''), 3.40–3.65 (m, H-4'' and H-5'')/70.38 (C-4''), 72.22 (C-5''); 0.97 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz, H-6'')/17.7 (C-6''); and (ii) there were observed signals for an acetic acid residue [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  2.14 (3H, s, OAc-3'')/21.07(OAc-3''),  $\delta_{\text{C}}$  172.7 (OAc-3'')]. The splitting pattern for the signal at  $\delta_{\text{H}}$  5.00 (1H, dd,  $J = 9.8$ , 3.2 Hz, H-3''), the COSY (Fig. S17), and HMBC (Fig. S16) correlations located the acetyl group at C-3''.

## 2.2. Enzymatic evaluations

Compounds **1–3**, **5** and **6** isolated from the active EtOAc fraction ( $\text{IC}_{50} = 91.8 \pm 4.6$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), were evaluated for their inhibitory activity against PTP1B (Table 3) using a spectrophotometric enzymatic assay (Rangel-Grimaldo et al., 2020). The most active compounds were **1** and **5**, with  $\text{IC}_{50}$  values of  $159.1 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$  and  $106.6 \pm 0.01$   $\mu\text{M}$ , respectively. None of the compounds were more active than the EtOAc fraction, suggesting a synergistic effect. The positive control was ursolic acid (Table 3). The curves obtained for each molecule are presented in the Supplementary data (Fig. S28). Kaempferitrin (**3**) was previously evaluated (Zhao et al., 2016) but the authors did not report the  $\text{IC}_{50}$  value.

The observed inhibition of PTP1B agrees with the findings of Ortiz-Andrade et al. (2012) who demonstrated that an ethanol extract of *J. spicigera* stimulated glucose uptake in insulin-resistant human and murine adipocytes in a concentration dependent manner. Furthermore, the extract induced glucose lowering effects during a glucose tolerance test in normoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats. Resistance to the hormones insulin and leptin are hallmarks of both type 2 diabetes and obesity. Drugs that can ameliorate this resistance should be effective in treating type 2 diabetes and possibly obesity, since PTP1B functions as a negative regulator of insulin and leptin signal transduction (Kumar et al., 2020; Zhao et al., 2018).

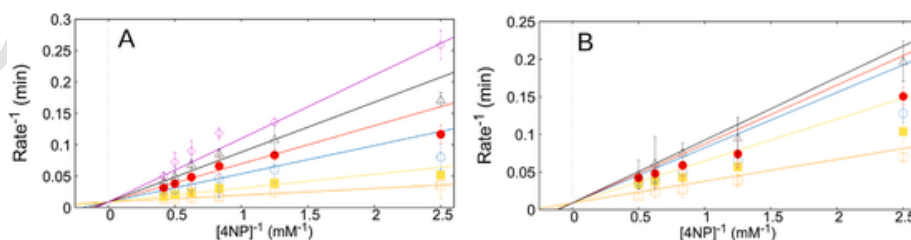
## 2.3. Kinetic mechanism of inhibition

Kinetic analysis of compounds **1** and **6** (obtained in reasonable amounts) was performed to determine the type of enzymatic inhibition. Compound **5**, the most active, was too unstable for this type of analysis. The hydrolytic activity of PTP1B against 4-NP was measured as variable concentrations of this artificial substrate in the absence or presence of compounds **1** and **6** at increasing concentrations. Then the data were

**Table 3**  
Values of  $\text{IC}_{50}$  of isolated compounds.

Compounds	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$r^{2a}$
<b>1</b>	$159.1 \pm 0.02$	0.9950
<b>2</b>	$306.7 \pm 0.20$	0.9990
<b>3</b>	$306.7 \pm 0.20$	0.9990
<b>5</b>	$106.6 \pm 0.01$	0.9990
<b>6</b>	$455.5 \pm 0.5$	0.9980
Ursolic acid	$21.8 \pm 0.4$	0.9960

<sup>a</sup>  $r^2$  = adjustment by nonlinear regression of inhibition curve.



**Fig. 2.** Inhibition patterns of PTP1B fitted to a global total competitive parabolic inhibition (Eq. (1)). The activity was assayed as a function of 4-NP concentration and in the absence (□) or presence of increasing concentrations of inhibitor. In (A) compound **1** was added at concentrations of (●), 0.08 (○), 0.10 (●), 0.12 (△), and 0.14 (◊) mM. In (B) compound **6** was added at concentrations of 0.4 (●), 0.6 (○), 0.65 (●), and 0.7 (△) mM. The error bars indicate  $\pm$  s.d. and the lines were drawn from Eq. (1) using the parameter values in Table 3.

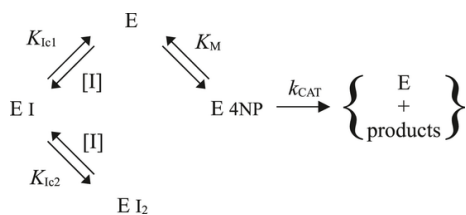
fitted to several models for total linear inhibition, as described in the Experimental section. The best inhibition model for both compounds was parabolic competitive inhibition (Fig. 2). The fit to the linear competitive equation did not correctly describe the inhibition at high inhibitor concentrations (Fig. S29). This mechanism of inhibition implies a mutually exclusive binding of the inhibitor, and the substrate, allows for two molecules of the inhibitor to bind to the enzyme (Scheme 1, Eq. (1)). However, the binding of the first inhibitor molecule does not have to reinforce the binding of the second molecule, i.e., this kinetic model neither does imply cooperative inhibitor binding nor does it indicate the order of addition; it just requires enzyme-inhibitor complexes with 1:1 and 1:2 stoichiometry. The  $K_i$  values for the first and second addition of an inhibitor molecule to the protein active site, the size of reduced  $\chi^2$ , residuals distribution, and the uncertainty in the parameter support the parabolic competitive inhibition of compounds **1** and **6** (Table 4). So far, no PTP1B with this kinetic behavior has been reported, probably because the data is usually processed using the classic Lineweaver–Burk method. The docking analysis below is consistent with our findings. According to a recent review, natural products might act as non-competitive as the flavonoid derivative licoagrone from *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae) or cyanidin-3-arabinoside, isolated from *Vaccinium gaultheriifolium* (Griff.) Hook. f. ex C.B. Clarke (Ericaceae) fruits, which is a mixed type of inhibitor. Celastrol, a terpenoid, is a non-competitive inhibitor, and others, such as  $2\alpha$ -hydroxy-7-oxo-pimara-8(9),15-diene, are competitive types (Singh et al., 2022).

## 2.4. Docking analysis

PTP1B is a protein of 435 amino acids. There are 288 structures deposited in the Protein Data Bank (PDB). Most of these structures have been resolved up to position 300, regarded as its structured zone. It has been proposed that PTP1B has an unstructured region corresponding to residues 300 to 435. AlphaFold is an AI system developed by DeepMind that predicts three-dimensional protein structures from its amino acid sequence; using this program, PTP1B<sub>1–400</sub> was well resolved up to position 300 (Fig. S30). Using the model PTP1B<sub>1–400</sub> generated by AlphaFold, an MD simulation was performed to predict how the PTP1B<sub>300–400</sub> region is molded in solution. Fig. 3 shows the results of the MD simulation. The RMSD of the system indicates that from 40 ns, the structure stabilizes (Fig. 3A). The RMSF (Fig. 3B) parameter shows that the unstructured region of the protein is the most flexible throughout the MD simulation (amino acids 300–400). Fig. 3C offers the structural model before and after 50 ns of MD simulation, where we can see that the unstructured region (purple) is folding to the structured part. This final model was used for the docking analysis of compounds **1–3**, **5**, and **6**.

Docking of compounds **1–3**, **5**, and **6** to PTP1B<sub>1–400</sub> (Fig. 4, Table 5) predicted a good affinity of these compounds for the PTP1B active site, and the order of binding affinity predicted from the *in-silico*  $K_i$  estimates is in reasonable agreement with the experimental  $\text{IC}_{50}$  values (Table 3). The theoretical  $K_i$  have the following order of affinity  $1 > 5 > 2 > 3$





**Scheme 1.** Equilibria for the parabolic competitive total inhibition.

**Table 4**

Kinetic parameter estimates for the inhibition patterns shown in Fig. 2 fitted to equation (1).

Compound	Parameter	Estimate	A.S.E. <sup>a</sup>	C. V. <sup>b</sup> (%)
<b>1</b>	$V_M$	113.9	$\pm 8.7$	7.6
	reduced $\chi^b$	5.207	$\pm 0.10$	11.2
	dof. <sup>3</sup>	166	$\pm 0.16$	22..4
		$K_{Ic1}$	0.70	$\pm 0.09$
<b>6</b>	$V_M$	113.5	$\pm 14.2$	12.5
	reduced $\chi^b$	2.809	$\pm 0.59$	18.2
	dof. <sup>3</sup>	86	$\pm 0.12$	20.9
		$K_{Ic2}$	0.90	$\pm 0.21$

<sup>a</sup> A.S.E. = Asymptotic Standard Error.

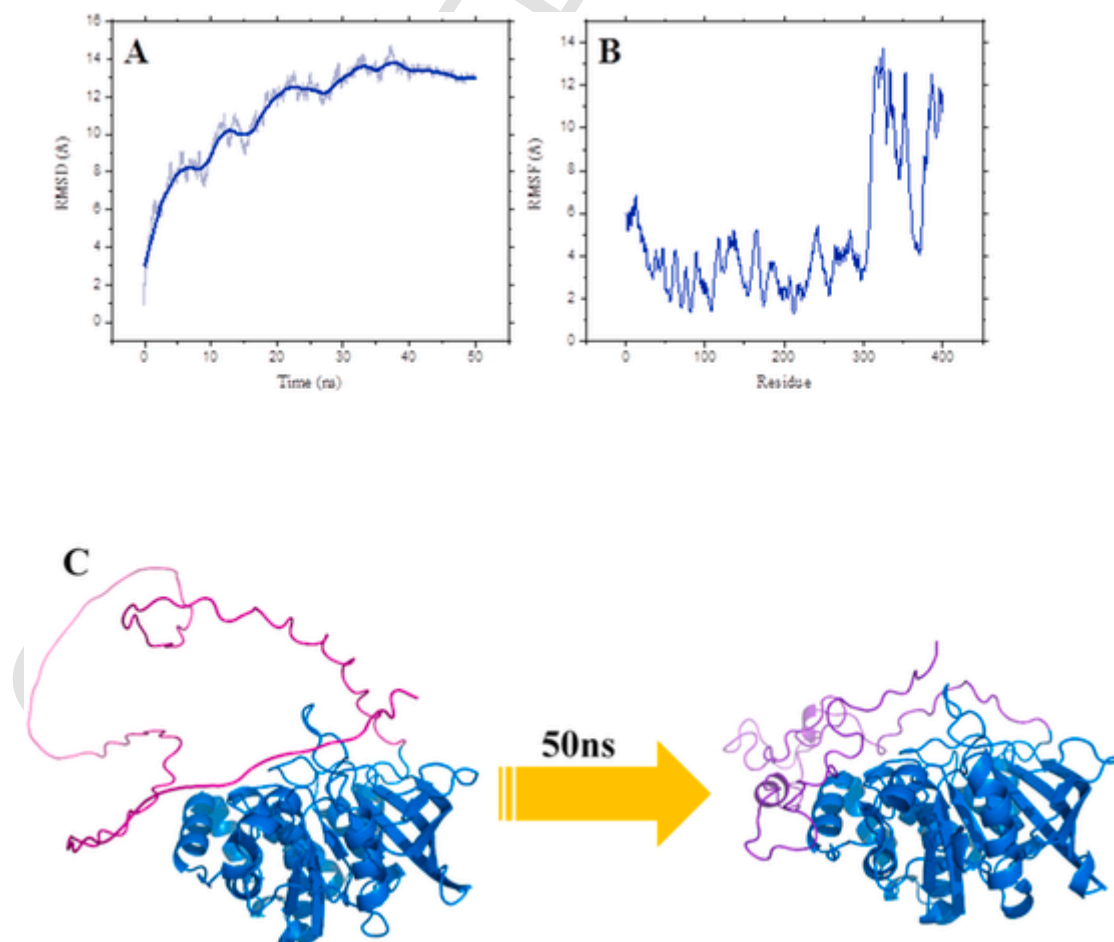
<sup>b</sup> C.V. = coefficient of variation; dof = degree of freedom.

> **6**. Visual inspection of the interactions shows that compounds **2** and **5** exhibit hydrogen bonding interactions.

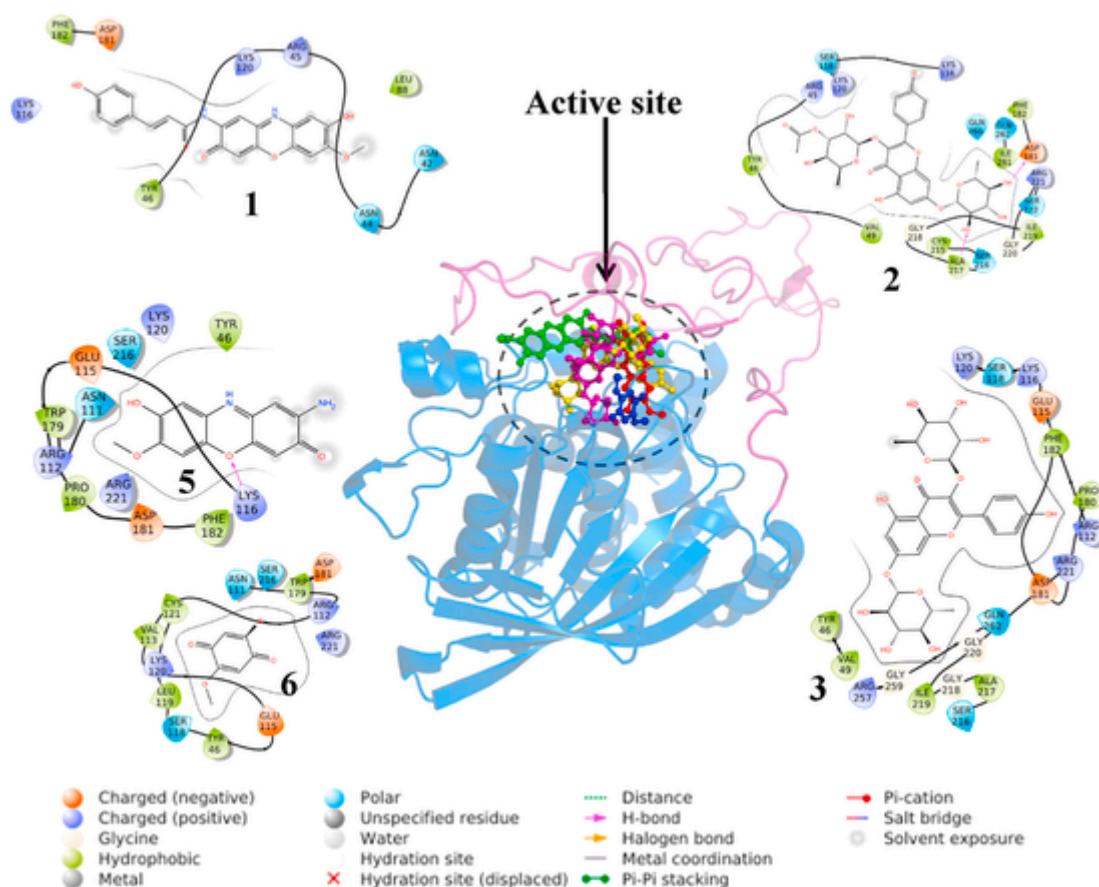
According to the kinetic inhibition setting (Table 4), it is proposed that two inhibitor molecules may be interacting at the active site. A docking study with a second molecule of compounds **1** and **6** was performed (Fig. 5, Table 5), and the results indicated that the binding of a second ligand is sterically possible. The 1:2 complex was also supported by the second docking analysis, which also predicted an important contribution of  $\pi$ -stacking interactions to the stability of these 1:2 complexes.

#### 2.5. Drug likeness, pharmacokinetics, and medicinal chemistry friendliness of **1**

The drug-likeness, pharmacokinetics, and friendliness medicinal chemistry properties of compound **1** were analyzed using the SwissADME web software (Daina et al., 2017). The physicochemical properties (lipophilicity, size, polarity, solubility, flexibility, and saturation) of **1** are summarized in Figs. S32 and S33. Most red geometric figures in the bioavailability radar plot fall in the pink area, but the unsaturation number is out of acceptable parameters. The program projected that **1** has a good drug-likeness score (0.55), showing no violation of Lipinski et al. (1996), Egan et al. (2000), Veber et al. (2002), and Muegge et al. (2001) rules which is acceptable for compounds becoming commercial drugs. The pharmacokinetic predictions showed that **1** has a good chance of passively permeating the gastrointestinal (G.I.) barrier but does not permeate the blood-brain barrier (BBB). These results were



**Fig. 3.** Analysis of 50ns of molecular dynamics simulation. A) The RMSD & Time plot, B) The RMSF & Residues plot, and C) Structural model at the beginning and after 50 ns of the molecular dynamics of the PTP1B<sub>1-400</sub>.



**Fig. 4.** Analysis of the PTP1B-compounds complex with 1–3, 5 and 6. In the center the PTP1B is shown in cartoons with compounds (1; green sticks), (2; purple sticks), (3; yellow sticks), (5; red sticks), and (6; blue sticks). On the periphery are shown the analysis of the interactions with the residues at 4 Å. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

**Table 5**  
Theoretical binding properties of PTP1B-Compounds 1–3, 5 and 6 complexes.

Compounds	$K_i$ (mM)	EB (kcal/mol)	Interacting residues
1	104	-2.03	Asn42, Asn44, Arg45, Tyr46, Lys116, Lys120, Asp181, Phe182
1-bis	69	-5.68	Arg45, Lys120, Ser118, Lys116
2	174	-5.11	Arg45, Tyr46, Val49, Lys116, Ser118, Lys120, Asp181, Phe182, Cys215, Ser216, Ala217, Gly218, Ile219, Gly220, Ser222, Arg221, Ile261, Gln262, Gln266
3	202	-5.02	Tyr46, Arg112, Glu115, Lys116, Ser118, Lys120, Val49, Pro180, Asp181, Phe182, Ser216, Ala217, Gly218, Ile219, Gly220, Arg221, Arg257, Gly259, Gln262
5	111	-4.76	Try46, Asn111, Arg112, Glu115, Lys116, Lys120, Trp179, Pro180, Asp181, Phe182, Ser216, Arg221
6	761	-4.17	Try46, Asn111, Arg112, Val113, Glu115, Ser118, Leu119, Lys120, Cys121, Ser216, Arg221, Trp179, Asp181
6-bis	1380	-3.80	Try46, Glu115, Lys116, Gly117, Ser118, Lys120, Asp181

Bis = refers to the second docking.

also graphically symbolized using the BOILED-Egg model (Fig. S33), where the compound fell inside the white ellipse.

In addition, the prediction revealed that the compound is not a glycoprotein (P-gp) substrate, which actively pumps many drugs out of cells but could behave as a CYP450 (CYP1A2, CYP2C9, and CYP3A4) enzyme inhibitor (Fig. S32). The latter action is responsible for drug-drug interactions, leading to undesirable adverse effects.

Regarding the medicinal chemistry analysis, one lead-like criterion is violated, the molecular weight higher than 350 (Teague et al., 1999). The outcome of the pan assay interference structures (PAINS) model does not show alert, but according to the Brenk rules, there are two alerts, the presence of a Michael acceptor and a polycyclic aromatic system (Brenk et al., 2008; Baell and Holloway, 2010). The synthetic accessibility is acceptable. Thus, we repeat the calculation with compound 7 (Figs. S34 and S35), present in *P. bivalvis*. This structure showed excellent pharmacokinetic and lead- and drug-likeness profiles.

The mutagenic, tumorigenic, irritant, and reproductive toxicity risks of 1 were measured employing the Osiris program. The toxicity risks are estimated with color code. In this case, the potential toxic risks were displayed in green, indicating potential safety in vivo (Fig. S36).

## 2.6. Method validation

*J. spicigera* is a widely used herb for treating different ailments in Mexico. Therefore, a pharmacopeic UHPLC analytic method, inexistent in the Mexican Herbal Pharmacopeia, was developed and validated according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines (ICH, 2015). The system's linearity was tested in the concentration range between 5 and 100 µg/mL and was found to be linear in the concentration range used. The linear regression equations were found to be  $y = 2194.96x - 2100.97$  ( $R^2 = 0.999$ ) for UV detection and  $y = 453.10x - 313.31$  ( $R^2 = 0.992$ ) for ESI<sup>-</sup> detection.

LOD values were 2.03 and 1.83 µg/mL for the UV and ESI<sup>-</sup> detection, respectively, whereas the LOQ values were 6.21 and 5.56 µg/mL for the UV and ESI<sup>-</sup> detection, respectively. The linearity of the method was tested by recovery assay. The linear regression equations for 3 were

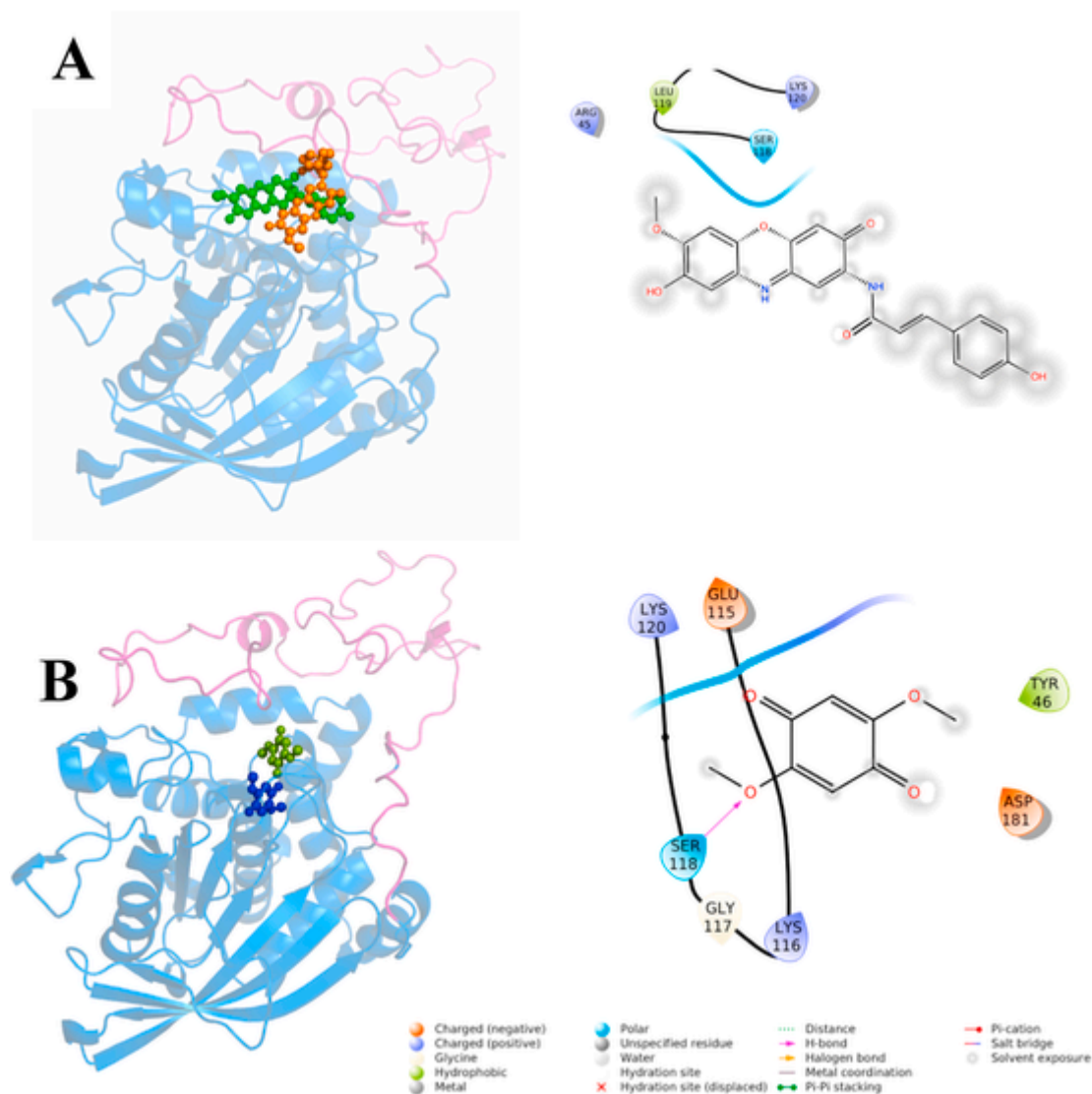


Fig. 5. Analysis of the PTP1B-compounds complex with a second ligand molecule. A) PTP1B1 complex; B) PTP1B-6 complex.

found to be  $y = 1.0042x - 0.0656$  ( $R^2 = 0.9995$ ) for UV detection and  $y = 1.0028x + 0.038$  ( $R^2 = 0.9993$ ) for ESI<sup>-</sup> detection. The recovery ranges for **3** were expressed as a percentage of the expected concentration and were found to be 97.7–102.3%. The CV value for accuracy was less than 1.25%.

The reproducibility and repeatability of the analytical method were evaluated in terms of the intermediate precision by analyzing six replicates of the stock solution (50 µg/mL) on two different days. The relative SD (RSD;  $n = 6$ ) was calculated for each sample evaluated. The results indicated that their chromatographic pattern was similar, showing the presence of the primary peak in each case. The CV values for precision were less than 2.4%.

Subsequently, the validated UHPLC-MS method was applied for quantitative analysis (Fig. S37). The content of kaempferitrin (**3**) in FO1 were  $14.7 \pm 1.01$  mg/g and  $10.8 \pm 0.28$  mg/g, and in FO2 were  $16.9 \pm 0.99$  mg/g and  $12.1 \pm 0.38$  mg/g, for ESI<sup>-</sup> and UV detection in both cases.

### 3. Conclusions

This investigation has shown that the traditional preparation from the aerial parts of *J. spicigera* biosynthesized specialized metabolites that inhibited the activity of PTP1B, a key regulator of the insulin and

leptin signaling cascades. Among the isolates predominated two undescribed metabolites, 2-*N*-(*p*-coumaroyl)-3*H*-phenoxazin-3-one (**1**), and 3'-*O*-acetyl-kaempferitrin (**2**), along with 2,5-dimethoxy-*p*-benzoquinone (**6**) and kaempferitrin (**3**). Since none of the isolates were more active than the EtOAc fraction of the infusion, the overall enzymatic inhibition of the extract might be due to a synergistic effect. Kinetic analysis of inhibitors **1** and **6** indicated that they behaved as parabolic competitive inhibitors and bound to the enzyme forming complexes with 1:1 and 1:2 stoichiometry. Docking studies predicted the excellent affinity of these compounds by the catalytic site of PTP1B<sub>1-400</sub> and that the binding of a second ligand is sterically possible. The 1:2 complex was also supported by the second docking analysis using the same enzyme, which predicted an essential contribution of  $\pi$ -stacking interactions to the stability of these 1:2 complexes. Compound **1** showed reasonable pharmacokinetic, lead- and drug-likeness properties and toxicological profiles, according to SwissADME and Osiris Property Explorer predictions, respectively. Inhibition of PTP1B by the extracts and compounds **1–6** agrees with previous *in vivo* antidiabetic studies on *J. spicigera* preparations, and they might be the antidiabetic active principles. It is important to point out that this is the first report of the presence of phenoxazines in the genus *Justicia*, although *Peristrophe bivalvis*, which belongs to the same family, biosynthesizes this type of substance. Interestingly both species are used as vegetal dyeing agents,

and the behavior in solution of **1** and **5** suggests that they are responsible for the tinting properties of *J. spicigera*. Finally, to contribute to the rational use of *J. spicigera* as an antidiabetic herbal drug, a pharmacopeic UHPLC-MS method was developed and validated to standardize the raw material so commonly used in Mexico.

## 4. Experimental

### 4.1. General experimental procedures

UV measurements were done using a PerkinElmer Lambda 2 UV-vis Spectrophotometer. A PerkinElmer FTIR/FIR Spectrum 400 was used to record the InfraRed spectra. NMR spectra were acquired on a Varian VNMRs 400 MHz (9.4 T) apparatus and were analyzed with the MestReNova (v12.0.2) software. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm with reference to the residual solvent signals (DMSO- $d_6$ , CD<sub>3</sub>OD or CDCl<sub>3</sub>). Structural assignments were based on <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, and HMBC spectra. Analytical TLC was performed on aluminum plates precoated with silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). After development with an appropriate solvent system, the plates were evaluated under UV light ( $\lambda = 254$  and 365 nm) and then sprayed with 4-anisaldehyde reagent (0.5 mL of 4-anisaldehyde, 5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mL glacial AcOH and 85 mL of CH<sub>3</sub>OH). Column chromatography was carried out using silica gel 60 (230–400 mesh), or Sephadex LH-20.

### 4.2. Plant material

The aerial parts of *Justicia spicigera* Schltdl. (Acanthaceae) were collected from San Pedro Jicayan, Jamiltepec, Oaxaca (GPS 16°27' N/98°00' W) in March 2017 and identified by Dr. Rafael Torres Colín from the Instituto de Biología, UNAM. A voucher specimen (1,465,410) is stored at the National Herbarium of Mexico (MEXU); this batch was used to prepare FO1 and to isolate all compounds. A second commercial batch of the aerial parts of *J. spicigera* was purchased at the market "La Bola" in Mexico City in December 2018 and was used to prepare the organic fraction FO2 for quantifying compound **3**.

### 4.3. Extraction and isolation

The air-dried and powdered aerial parts (5 g) of *J. spicigera* were extracted by infusion with 500 mL of distilled hot water for 30 min. Subsequently, this extract was filtered and successively extracted with EtOAc (500 mL x 3). The organic fractions were combined, filtered, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo* to give a dark purple residue (41.1 mg, 83.6% of inhibition at 1000 ppm). This process was repeated to collect 3.7 g of FO1 (using a total of 450.0 g of plant, and 45 L of water), which were subjected to a silica gel column chromatography using gradient elution with hexane/CHCl<sub>3</sub>/MeOH (90:10 → 0:100 → 80:20). This separation afforded 38 fractions (F1–F38). Fraction F4 was repeatedly washed with MeOH to obtain 20.0 mg of **6**. Fraction F8 was chromatographed on a Sephadex LH-20 column (MeOH) to yield 15 fractions (F8-1–F8-15). From fractions F8-7 and F8-13 were obtained **5** (5.1 mg) and **1** (16.0 mg), respectively. Fraction F23 was chromatographed on a Sephadex LH-20 column (acetone/MeOH, 95:5) to afford 8 fractions (F23-1–F23-8). Subfraction F23-3 was purified on a Sephadex LH-20 column (MeOH) to yield **4** (5.2 mg). Fraction F29 was separated by Sephadex LH-20 eluting with Acetone/MeOH (95:5) to give **2** (15.3 mg). Fraction F31 was separated by silica gel using gradient elution with CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/MeOH to afford 85.0 mg of **3**.

FO2 was prepared as described above for FO1, using 5.1 g of the commercial material and 500 mL of water. After filtration and concentration *in vacuo*, 31.9 mg of FO2 were obtained. Both extract presented the same UHPLC profile.

#### 4.3.1. 2-N-(p-coumaroyl)-3h-phenoxazin-3-one (**1**)

Blue amorphous solid; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 224 (3.87), 291 (3.63), 601 (3.90) nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3286, 2918, 2350, 2850, 1501, 1127 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H (400 MHz, methanol- $d_4$  and DMSO- $d_6$ ) and <sup>13</sup>C (100 MHz, methanol- $d_4$  and DMSO- $d_6$ ) NMR spectra, see Table 1; HRESIMS  $m/z$  405.1090 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>, 405.1081).

#### 4.3.2. 3'-O-acetyl-kaempferitrin (**2**)

Amorphous white solid; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -200° (c 0.5, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 204 (4.49), 264 (4.29), 341 (4.14) nm; IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3368, 2930, 1715, 1655, 1595, 1175 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra, see Table 2; HRESIMS  $m/z$  619.1668 [M - H]<sup>-</sup> (calcd for C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>O<sub>15</sub><sup>-</sup>, 619.1685).

### 4.4. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition assay

A spectrophotometric method was used to detect the inhibitory activity of extracts and compounds on PTP1B (Rangel-Grimaldo et al., 2020). The analyses were carried out by triplicated; the test material and positive control (ursolic acid) were dissolved in DMSO or buffer solution. The test materials (mM or  $\mu$ M), enzyme (0.022 nM) and buffer solution [Tris-HCl 50 mM, pH = 6.8] and 0.125 mM of 4-nitrophenyl phosphate (4-NP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were incubated at room temperature during 15 min as previously described. At the end of the incubation time, the reaction was terminated adding 5  $\mu$ L of NaOH (10 M); then, the absorbance was measured at 405 nm (t<sub>15</sub>). The inhibitory activity was determined as percentage in comparison to the blank (Tris) according to the following equation:

$$\%Inhibition_{PTP1B} = \left( 1 - \frac{A_{405(s)}}{A_{405(b)}} \right) \times 100\%$$

where  $A_{405(s)}$  is the  $\Delta A$  of the sample ( $A_{t15} - A_{t0}$ );  $A_{405(b)}$  is the  $\Delta A$  of the blank obtained in the same manner than the sample. With the data obtained, the enzyme inhibition curve was made, for which the average percentage of inhibition was plotted as a function of the inhibitor concentration. To calculate the IC<sub>50</sub>, a non-linear regression was performed, using Origin 8.0 software (Origin Labs, MA, USA).

#### 4.4.1. Kinetic analysis

The conditions for preparation of reagents (enzyme and substrate), incubation and analysis of results was the same as those described in the previous sections (Rangel-Grimaldo et al., 2020; Jiménez-Arreola et al., 2020; Díaz-Rojas et al., 2021). Additional steps in the methodology are described below.

To characterize the type of inhibition exerted by **1** and **6** on PTP1B, the hydrolysis of 4-NP at sub-saturating state and increasing concentrations of each compound was measured. An enzyme saturation curve was made with a 4-NP stock solution (10 mM); then a series of curves with variable 4-NP concentrations and at least five fixed concentrations of the inhibitors were built; considering the IC<sub>50</sub> value as the midpoint, the type of inhibition of **1** and **6** was estimated; each point of the curves were obtained by triplicated. The concentration of compound giving 50% inhibition of activity was interpolated from the results, by fitting to a general inhibition model. The resulting set of activities was fitted globally using the non-linear regression algorithm of Levenberg-Marquardt as implemented in GNUplot (Williams and Kelley, 2011). Each set was fitted to the kinetic equations for linear competitive, linear uncompetitive, linear non-competitive (classic), linear mixed type, parabolic competitive, parabolic uncompetitive and parabolic non-competitive inhibitions mechanism. The best fit was judged by the value of reduced chi squared ( $\chi^2$ ), residuals distribution, and the uncertainty in the parameter estimates. The best description of the inhibition data for compounds **1** and **6** was obtained with Eq. (1) as depicted in Scheme 1, where  $V_M$  and  $K_M$  are the maximum velocity and the Michaelis constant for the substrate 4-NP, respectively, while  $K_{i1}$



and  $K_{ic2}$  are the inhibition constants for the linear and quadratic inhibition components for the tested compound.

$$v_0 = \frac{V_M [4NP]}{K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_{ic1}} + \frac{[I]^2}{K_{ic2}^2} \right) + [4NP]} \quad (\text{Eq. 1})$$

#### 4.5. Structural model of PTP1B<sub>1-400</sub>

Structural model of the human PTP1B<sub>1-400</sub> protein was obtained from AlphaFold Protein Structure Database developed by DeepMind and EMBL-EBI (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). The UniProt code P18031 corresponds to the PTPN1 gene, which codes for human PTP1B is among the proteins housed in the database predicted by AlphaFold. The pdb file was downloaded from the following link: <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P18031> (Jumper et al., 2021). The coordinates of this model were prepared to perform a Molecular Dynamics (MD) simulation using the LEAP module from AmberTools2021. The structure was submitted to the following procedure: hydrogens were added using the LEaP module with the leaprc.protein.ff19SB force field; K<sup>+</sup> counter ions were also included to neutralize the system. The protein was solvated in an octahedral box of explicit TIP3P model water molecules localizing the box limits at 12 Å from the protein surface. MD 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 femtoseconds (fs) time step for the integration of Newton's equations as recommended in the Amber package. All calculations were made using graphics processing units (GPUs) accelerated MD engine in AMBER (pmemd.cuda), a program package that runs entirely on CUDA-enabled GPUs (Case et al., 2005, 2021; Salomon-Ferrer et al., 2013). The protocol consisted of performing a minimization of the initial structure, followed by 50 picoseconds (ps) heating and pressure equilibration at 315 K and 1.0 atm pressure, respectively. Finally, the system is equilibrated with 500 ps before starting the production of MD. The production of the MD consisted of 50 nano seconds (ns). Frames were saved at 10 ps intervals for subsequent analysis. All analyzes were done using CPPTRAJ (Ren et al., 2013). The calculations of root mean square deviations (RMSD) and root mean square fluctuation (RMSF) were made, considering the C, CA, and N. The charts were built with OriginPro 9.1, and the trends were adjusted with the function processing smooth (method lowest span).

#### 4.6. Docking

Docking analysis was done using the structural model of the PTP1B<sub>1-400</sub> obtained after the MD simulation. Structures 1–3, 5 and 6 were constructed and minimized using AVOGADRO software (Hanwell et al., 2012). AutoDockTools 1.5.4 was used to prepare the pdb files of both protein and compounds. Polar hydrogen atoms and the Kollman united-atom partial charges were added to the protein structures. In contrast, Gasteiger-Marsili charges and rotatable groups were automatically assigned to the structures of the ligands. We use Autodock Vina to do the docking, covering the entire enzyme (Forli et al., 2016). The grid box size was 126 Å × 126 Å × 126 Å in the x, y, and z dimensions and central coordinates of 54.94, 68.66, and 63.45 for x, y, z, respectively; with exhaustiveness of 8. The visualization of the best conformational states was achieved with PyMOL version 2.4.0 and Maestro version 5.3.156 (De Lano, 2004).

#### 4.7. Drug-likeness analysis of bioactive compounds using Swiss ADME and osiris tools

SwissADME online server (<http://www.swissadme.ch/>) (Daina et al., 2017) was used to predict physicochemical, lipophilicity, pharmacokinetics, water solubility, druglikeness and medicinal chemistry properties of the natural product 1 and 7. In addition, the bioavailability radar was plotted to find out if the predicted properties fall entirely in the pink colored zone; the optimal range of each property as plotted: lipophilicity (LIPO): -0.7 < XLOGP 3 < +5.0; SIZE: 150 g/mol < MW < 500 g/mol; POLAR (polarity): 20 Å<sup>2</sup> < topological surface area (TPSA) < 130 Å<sup>2</sup>; INSOLU (insolubility): 0 < log S (ESOL) < 6; INSATU (unsaturation): 0.25 < fraction of Csp3 < 1; and FLEX (flexibility): 0 < number of rotatable bonds < 9. The BOILED-Egg construction model was also obtained to assess the gastrointestinal absorption and brain penetration of 1 and 7. The medicinal chemistry features such as PAINS (pan-assay interference or promiscuous substances), Brenk alert (undesirables' structural fragments), lead-likeness and synthetic accessibility were investigated. Such molecule may be achieved as druglikeness. Osiris Property Explorer free software (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) was used to predict mutagenicity, tumorigenicity, and irritative and reproductive effects of the bioactive compounds.

#### 4.8. UHPLC-MS analysis and method validation

##### 4.8.1. Standards, chemicals, and samples

Kaempferitrin (3) was used as reference compound and was isolated from the species *J. spicigera*. The purity and identity of the compound were confirmed by chromatographic analysis (TLC, HPLC) and by spectral means comparison (NMR, ESI-MS) with published spectral data (Aragao et al., 1990).

The stock solution of kaempferitrin (3) was prepared at a final concentration of 1 mg/mL in water. The working standard solutions of 3 ranging from 5 to 100 µg/mL were prepared by diluting standard solution in water. Sample solutions of each extract (50 µg/mL) were prepared following the same procedure as the stock standards solutions. The organic fractions FO1 and FO2 of *J. spicigera* were used to assess the method and were prepared at a concentration of 1 mg/mL in acetonitrile-water (50:50). Before analysis, all solutions were filtrated using 0.20 µm GHP membranes.

##### 4.8.2. Ultra-high performance liquid chromatography photodiode array-mass spectrometry analysis

UHPLC analysis was performed on a Waters Acquity UPLC H-Class system (Waters Corp.), including quaternary solvent manager, sampler manager, column heater, and photodiode array detector (PDA) interfaced with an SQD2 single mass spectrometer detector with an electrospray ion source. MassLynk software version 4.1 was used to control the UPLC-ESI-MS system and for data acquisition and processing. An Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 × 100 mm) equipped with a Acquity UPLC BEH C18 guard column (Vanguard 2.1 × 5.0 mm) was used for the UHPLC analysis. The column temperature was maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of water containing 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B), at a flow rate of 0.3 mL/min. The following linear gradient was used: 0 min, 15% B in the next 10 min to 20% B, in the next 2 min to 30% B, and, finally, in the next 1 min to 100% B. The total run time for the analysis was 14.5 min and the injection volume was 3 µL. The detection wavelength was 285 nm. For the identification of 3, each sample was analyzed with the electrospray ion source operating in both positive (ESI<sup>+</sup>) and negative (ESI<sup>-</sup>) ionization modes. The following MS parameters for ESI<sup>+</sup> were used: 30 V spray and 3.0 kV capillary voltages; 350 °C capillary temperature, and 650 L/h of source gas flow. For the ESI<sup>-</sup> mode, spray and capillary voltages were respectively 30 V and 2.5 kV; capillary temperature was 350 °C, and

source gas flow of 650 L/h. MS spectra were obtained within a mass range of  $m/z$  100–1000 using nitrogen as the collision gas.

#### 4.8.3. Method validation

The proposed UHPLC-ESI-MS method for quantitative analysis was validated based on linearity, LOD, LOQ, intra-day and inter-day precisions, and accuracy. Compound **3** was accurately weighed and dissolved in water to prepare stock solution at a final concentration of 1 mg/mL. Six working solutions in the range of 5–100 µg/mL 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. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of kaempferitrin (**3**) were estimated at signal-to-noise ratios ( $S/N$ ) of 3 and 10, respectively. The precision of the method was analyzed preparing six identical replicates for **3** on two different days and by two different analysts. Variations of the peak area were taken as the measures of precision and are expressed as relative standard deviations (RSDs).

Finally, method accuracy was tested by recovery experiments, assaying three known amounts of **3** (10, 50, and 75 µg/mL). The mean percentage recovery for **3** was found to be between 98 and 102% by means of Fisher's F-test.

#### Uncited references

Roe and Cheatham, 2013.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

No data was used for the research described in the article.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants of Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA, IN-217320) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, CY011226) awarded to R.M. The authors recognize the valuable support of Nayeli Lopez Balbiaux, Rosa Isela del Villar (NMR spectra), Marisela Gutiérrez Franco (UV and IR spectra), Jessica Amacosta Castillo (MS spectra) from USAII-Facultad de Química UNAM for recording spectra.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113410>.

#### References

- Abdelfattah, M.S., 2013. A new bioactive aminophenoxazinone alkaloid from a marine-derived actinomycete. *Nat. Prod. Res.* 27, 2126–2131. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2096607>.
- Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Aragáez, V., Juárez-Vázquez, M.D.C., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., García-Carrancá, A., 2012. Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schldtl (Acanthaceae). *J. Ethnopharmacol.* 141, 888–894. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.036>.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99, 325–348. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>.
- Ángeles-López, G.E., González-Trujano, M.E., Rodríguez, R., Déciga-Campos, M., Brindis, F., Ventura-Martínez, R., 2019. Gastrointestinal activity of *Justicia spicigera* Schldtl in experimental models. *Nat. Prod. Res.* 35, 1847–1851. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1637873>.

- Aragao, P.C. de A., de Toledo, J.B., Morais, A.A., Filho, R.B., 1990. Substâncias Naturais Isoladas de *Stigmaphyllon tormentosum* e *Byrsonima variabilis*. *Quim. Nova* 13, 254–259.
- Arberet, L., Pottier, F., Michelin, A., Nowik, W., Bellot-Gurlet, L., Andraud, C., 2021. Spectral characterization of a traditional Mesoamerican dye: relationship between in situ identification on the 16th century Codex Borbonicus manuscript and composition of *Justicia spicigera* plant extract. *Analyst* 146, 2520–2530. <https://doi.org/10.1039/D1AN00113B>.
- Atlas de la Medicina Tradicional de México del INI/UNAM/INPI/DGTIC, 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/> (Accessed 20 December 2021) accessed.
- Awad, N.E., Abdelkawy, M.A., Hamed, M.A., Ramadan, N.S., Abdel, Rahman, E.H., 2018. Phytochemical and in vitro screening of *Justicia spicigera* ethanol extract for antioxidant activity and in vivo assessment against *Schistosoma mansoni* Infection in Mice. *Antiinfect. Agents* 16, 49–56. <https://doi.org/10.2174/2211352516666180126161247>.
- Baell, J.B., Holloway, G.A., 2010. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* 53, 2719–2740. <https://doi.org/10.1021/jm901137j>.
- Baqueiro-Peña, I., Guerrero-Beltrán, J.A., 2017. Physicochemical and antioxidant characterization of *Justicia spicigera*. *Food Chem.* 218, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.078>.
- Bezerra Gomes, P., Nett, M., Dahse, H.-M., Hertweck, C., 2010. Pitucamycin: structural merger of a phenoxazinone with an epoxyquinone antibiotic. *J. Nat. Prod.* 73, 1461–1464. <https://doi.org/10.1021/np100344u>.
- Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I.H., Frearson, J., Wyatt, P.G., 2008. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem* 3, 435–444. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>.
- Cáceres-Cortés, J.R., Cantú-Garza, F.A., Mendoza-Mata, M.T., Chávez-González, M.A., Ramos-Mandujano, G., Zambrano-Ramírez, I.R., 2001. Cytotoxic activity of *Justicia spicigera* is inhibited by bcl-2 proto-oncogene and induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion. *Phytother Res.* 15, 691–697. <https://doi.org/10.1002/ptr.791>.
- Case, D.A., Cheatham, III, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, Jr, K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Woods, R.J., 2005. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* 26, 1668–1688. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>.
- Case, H.M.A.D.A., Belfon, K., Ben-Shalom, I.Y., Brozell, S.R., Cerutti, D.S., Cheatham, III, T.E., Cruzeiro, V.W.D., Darden, T.A., Duke, R.E., Giambasu, G., Gilson, M.K., Gohlke, H., Goetz, A.W., Harris, R., Izadi, S., Izmailov, S.A., Jin, C., Kasavajhala, K., Kaymak, M.C., King, E., Kovalenko, A., Kurtzman, T., Lee, T.S., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Liu, J., Luchko, T., Luo, R., Machado, M., Man, V., Manathunga, M., Merz, K.M., Miao, Y., Mikhailovskii, O., Monard, G., Nguyen, H., O'Hearn, K.A., Onufriev, A., Pan, F., Pantano, S., Qi, R., Rahnamoun, A., Roe, D.R., Roitberg, A., Sagui, C., Schott-Verdugo, S., Shen, J., Simmerling, C.L., Skrynnikov, N.R., Smith, J., Swails, J., Walker, R.C., Wang, J., Wei, H., Wolf, R.M., Wu, X., Xue, Y., York, D.M., Zhao, S., Kollman, P.A., 2021. Amber 2021.
- Casertano, M., Genovese, M., Piazza, L., Balestri, F., Del Corso, A., Vito, A., Paoli, P., Santi, A., Imperatore, C., Menna, M., 2022. Identifying human PTP1B enzyme inhibitors from marine natural products: perspectives for developing of novel insulin-mimetic drugs. *Pharmaceuticals* 15. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105626>. . art. no. 325.
- 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. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- De Lano, W.L., 2004. Use of PYMOL as a communications tool for molecular science. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 228, U313–U314.
- Díaz-Rojas, M., Raja, H., González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J., Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, I., Mata, R., 2021. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the fungus *Malbranchea albolutea*. *Phytochemistry* 184, 112664. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112664>. , art. no.
- Domínguez, X.A., Achenback, H., González, C.C., Ferré-D'Amare, A.R., 1990. Estudio químico del muítle (*Justicia spicigera*). *Rev. Latinoam. Quim.* 21, 142–143.
- Egan, W.J., Merz, K.M., Baldwin, J.J., 2000. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J. Med. Chem.* 43, 3867–3877. <https://doi.org/10.1021/jm000292e>.
- Esquivel-Gutiérrez, E.R., Noriega-Cisneros, R., Arellano-Plaza, M., Ibarra-Barajas, M., Salgado-Garciglia, R., Saavedra-Molina, A., 2013. Antihypertensive effect of *Justicia spicigera* in L-NAME-induced hypertensive rats. *Pharmacologyonline* 2, 120–127.
- Euler, K.L., Alam, M., 1982. Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *J. Nat. Prod.* 45, 220–221. <https://doi.org/10.1021/np50020a020>.
- Fernández-Pomares, C., Juárez-Aguilar, E., Domínguez-Ortiz, M.Á., Gallegos-Estudillo, J., Herrera-Covarrubias, D., Sánchez-Medina, A., Aranda-Abreu, G.E., Mazo, J., Hernández, M.E., 2018. Hydroalcoholic extract of the widely used Mexican plant *Justicia spicigera* Schldtl. exerts a cytostatic effect on LNCaP prostate cancer cells. *J. Herb. Med.* 12, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.09.003>.
- Fico, G., Braica, A., Morelli, I., Tomè, F., 2003. Flavonol glycosides from *Aconitum vulparia*. *Fitoterapia* 74, 420–422. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(03\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(03)00045-5).
- Forli, S., Huey, R., Pique, M.E., Sanner, M.F., Goodsell, D.S., Olson, A.J., 2016. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat. Protoc.* 11, 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>.
- González-Trujano, M.E., Domínguez, F., Pérez-Ortega, G., Aguillón, M., Martínez-Vargas, D., Almazán-Alvarado, S., Martínez, A., 2017. *Justicia spicigera* Schldtl. and kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products. *Biomed. Pharmacother.* 92, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.075>.

- Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.R., 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminf.* 4, 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- ICH. Harmonised Tripartite Guideline, 2015. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology: Q2A Y Q2B, Q2 (R1), Switzerland.
- Jacobo-Salcedo, M.D.R., Alonso-Castro, A.J., Salazar-Olivo, L.A., Carranza-Álvarez, C., González-Espíndola, L.N., Domínguez, F., Maciel-Torres, S.P., García-Lujan, C., González-Martínez, M.D.R., Gómez-Sánchez, M., Estrada-Castillón, E., Zapata-Bustos, R., Medellín-Milán, P., García-Carranca, A., 2011. Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Nat. Prod. Commun.* 6, 1925–1928. <https://doi.org/10.1177/1934578x1100601234>.
- Jiménez-Arreola, B.S., Aguilar-Ramírez, E., Cano-Sánchez, P., Morales-Jiménez, J., González-Andrade, M., Medina-Franco, J.L., Rivera-Chávez, J., 2020. Dimeric phenolones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: insights into mechanistic kinetics in vitro and in silico studies. *Bioorg. Chem.* 101, 103893. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103893>.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Kazakova, O., Giniyatullina, G., Babkov, D., Wimmer, Z., 2022. From marine metabolites to the drugs of the future: squalamine, trodusquemine, their steroid and triterpene analogues. *Int. J. Mol. Sci.* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23031075>. , art. no. 1075.
- Kim, C.Y., Im, H.W., Kim, H.K., Huh, H., 2001. Accumulation of 2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone in suspension cultures of Panax ginseng by a fungal elicitor preparation and a yeast elicitor preparation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 239–242. <https://doi.org/10.1007/s002530000557>.
- Kumar, A., Rana, D., Rana, R., Bhatia, R., 2020. Protein tyrosine phosphatase (PTP1B): a promising drug target against life-threatening ailments. *Curr. Mol. Pharmacol.* 13, 17–30.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1996. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (Suppl. L), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- Magos-Guerrero, G.A., Santiago-Mejía, J., Carrasco, O.F., 2017. Exploratory studies of some Mexican medicinal plants: Cardiovascular effects in rats with and without hypertension. *J. Interact. Ethnopharmacol.* 6, 274–279. <https://doi.org/10.5455/ijce.20170706061922>.
- Meekes, M., David-Rivera, A.D., Nava-Aguilar, V., Jimenez, A., 2004. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine* 11, 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.06.002>.
- Muegge, I., Heald, S.L., Brittelli, D., 2001. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *J. Med. Chem.* 44, 1841–1846. <https://doi.org/10.1021/jm015507e>.
- Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V.E., Alonso-Castro, A.J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L.A., Domínguez, F., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., García-Carranca, A., 2012. Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schldtl (Acanthaceae). *J. Ethnopharmacol.* 143, 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.043>.
- Peraza-Sánchez, S.R., Poot-Kantún, S., Toores-Tapia, L.W., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Cedillo-Rivera, R., 2005. Screening of native plants from Yucatan for e. 43, 594–598. <https://doi.org/10.1080/13880200500301720>.
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumontel, E., García-Miss, M.R., Mut-Martín, M., 2007. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia* 78, 315–318. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.013>.
- Pérez-Gutiérrez, R., Mota-Flores, J., Neira-González, A., 2018. Anti-inflammatory effect of procumbenoside B from *Justicia spicigera* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages and zebrafish model. *Pharma Res.* 10, 218–224. <https://doi.org/10.4103/pr.pr.97.17>.
- Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., de la Mora-de la Mora, J.L., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Martínez-Gordillo, M.N., 2001. Mortality and morphological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 44, 151–152.
- Rangel-Grimaldo, M., Macías-Rubalcava, M.L., González-Andrade, M., Raja, H., Figueroa, M., Mata, R., 2020.  $\alpha$ -Glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Malbranchea circinata*. *J. Nat. Prod.* 83, 675–683. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01108>.
- Real-Sandoval, S.A., Gutiérrez-López, G.F., Domínguez-López, A., Paniagua-Castro, N., Michicotl-Meneses, M.M., Jaramillo-Flores, M.E., 2020. Downregulation of proinflammatory liver gene expression by *Justicia spicigera* and kaempferitrin in a murine model of obesity-induced by a high-fat diet. *J. Funct. Foods* 65, 103781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103781>.
- Rebollar-Ramos, D., Ovalle-Magallanes, B., Palacios-Espinosa, J.F., Macías-Rubalcava, M.L., Raja, H.A., González-Andrade, M., Mata, R., 2021.  $\alpha$ -Glucosidase and PTP-1B inhibitors from *Malbranchea dendritica*. *ACS Omega* 6, 22969–22981. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03708>.
- Ren, J., Liu, D., Tian, L., Wei, Y., Proksch, P., Zeng, J., Lin, W., 2013. Venezuelan A-G, new phenoxazine-based alkaloids and aminophenols from *Streptomyces venezuelae* and the regulation of gene target Nur77. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 301–304. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.10.096>.
- Roe, D.R., Cheatham, T.E., 2013. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J. Chem. Theor. Comput.* 9, 3084–3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>.
- Salomon-Ferrer, R., Götz, A.W., Poole, E., Le Grand, S., Walker, R.C., 2013. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh Ewald. *J. Chem. Theor. Comput.* 9, 3878–3888. <https://doi.org/10.1021/ct400314y>.
- Singh, S., Singh Grewal, A., Grover, R., Sharma, N., Chopra, B., Kumar Dhingra, A., Arora, S., Redhu, S., Lather, V., 2022. Recent updates on development of protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors for treatment of diabetes, obesity and related disorders. *Bioorg. Chem.* 121, 105626. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105626>. , art. no.
- Teague, S.J., Davis, A.M., Leeson, P.D., Oprea, T., 1999. The design of leadlike combinatorial libraries. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 3743–3748. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19991216\)38:24<3743:AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19991216)38:24<3743:AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U).
- Thuy, T.T., Lam, T.H., Huong, N.T.T., Nhung, L.T.H., Ninh, P.T., Anh, N.T.H., Sung, T.V., 2012a. Nghiên cứu thành phần và độc tính của chất màu tím lá cây cam tím (*Peristrophe bivalvis*). *TCHH*, T. 6, 394–397.
- Thuy, T.T., Lam, T.H., Huong, N.T.T., Nhung, L.T.H., Ninh, P.T., Anh, N.T.H., Thao, T.T.P., Sung, T.V., 2012b. Natural phenoxazine alkaloids from *Peristrophe bivalvis* (L.) Merr. *Biochem. System. Ecol.* 44, 205–207. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.05.009>.
- Thuy, T.T., Huong, N.T.T., Nhung, L.T.H., Lam, T.H., Ninh, P.T., Delfino, D.V., Sung, T.V., 2013. Isolation, characterization, and biological evaluation of a phenoxazine, a natural dyestuff isolated from leaves of *Peristrophe bivalvis*. *Nat. Prod. Res.* 27, 771–774. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.698409>.
- 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. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- Vega-Avila, E., Tapia-Aguilar, R., Reyes-Chilpa, R., Guzmán-Gutiérrez, S.L., Pérez-Flores, J., Velasco-Lezama, R., 2012. Actividad antibacteriana y antifúngica de *Justicia spicigera*. *Rev. Latinoam. Quim.* 40, 75–82.
- Williams, T., Kelley, C., 2011. GnuPlot 4.5: an interactive plotting program. URL: <http://gnuplot.infohttp://gnuplot.info>. (Accessed 7 January 2022). (Last accessed).
- Zapata-Morales, J.R., Alonso-Castro, A.J., Domínguez, F., Carranza-Álvarez, C., Castellanos, L.M., Martínez-Medina, R.M., Pérez-Urizar, J., 2016. Antinociceptive activity of an ethanol extract of *Justicia spicigera*. *Drug Dev. Res.* 77, 180–186. <https://doi.org/10.1002/ddr.21307>.
- Zhao, B.T., Le, D.D., Nguyen, P.H., Ali, M.Y., Choi, J.S., Min, B.S., Shin, H.M., Rhee, H.L., Woo, M.H., 2016. PTP1B,  $\alpha$ -glucosidase, and DPP-IV inhibitory effects for chromene derivatives from the leaves of *Smilax china* L. *Chem. Biol. Interact.* 253, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.012>.
- Zhao, B.T., Nguyen, D.H., Le, D.D., Choi, J.S., Min, B.S., Woo, M.H., 2018. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from natural sources. *Arch. Pharm. Res. (Seoul)* 41, 130–161. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0997-8>.