



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Re-investigación fitofarmacológica de la especie *Anoda
cristata* (L) Schldl. (Malvaceae)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

NANCY GALICIA MONTIJO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Rachel Mata Essayag

VOCAL: Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez

SECRETARIO: Dra. Berenice Ovalle Magallanes

1er. SUPLENTE: Dra. Isabel Del Carmen Rivero Cruz

2° SUPLENTE: Dra. Elena Guadalupe Ramírez López

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 111, Edificio E, Departamento de Farmacia

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

TUTORA

Dra. Berenice Ovalle Magallanes

SUSTENTANTE

Nancy Galicia Montijo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme las facilidades para llevar a cabo mis estudios de licenciatura.

A las instancias de la UNAM que financiaron estas investigaciones: Dirección General de Asuntos Académicos (DGAPA) con el proyecto PAPIIT-IA205621 y a la Facultad de Química con el proyecto PAIP 5000-9184.

A mi tutora, la Dra. Berenice Ovalle Magallanes por su asesoría en este trabajo.

A las doctoras Rachel Mata Essayag y Elia Brosla Naranjo Rodríguez por sus correcciones y comentarios al documento de tesis.

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

Al Dr. José Pedraza Chaverri y al M. en C. Omar Noel Medina Campos del departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM por todas facilidades brindadas para la realización de los ensayos basados en células hepáticas.

Al Dr. Mario A. Figueroa Saldívar del departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM por su apoyo en la adquisición de los cromatogramas de las muestras analizadas.

Al Dr. Manuel Rangel Grimaldo por su colaboración en los ensayos de inhibición de enzimas α -glucosidasas y PTP1B.

A las M. en C. Rosa Isela del Villar Morales y Nayeli López Balbiaux, y a la Q. Marisela Gutiérrez Franco de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química, por el registro de los espectros de resonancia magnética nuclear e infrarrojo, respectivamente.

DEDICATORIAS

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1 Generalidades botánicas y etnomédicas de <i>Anoda cristata</i>	2
1.2 Estudio de la polivalencia farmacológica de las plantas medicinales antidiabéticas ..	7
1.3 Problemática actual de la Diabetes Mellitus	8
1.4 Enzimas de interés para el tratamiento de la diabetes	14
1.4.1 Inhibidores de α -glucosidasas (AGIs)	14
1.4.2 Inhibidores de proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)	16
1.4.3 Inhibidores de glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa)	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
5. METODOLOGÍA.....	22
5.1 Material vegetal.....	22
5.2 Preparación de los extractos vegetales	22
5.3 Estudio químico	23
5.3.1 Cromatografía en capa fina	23
5.3.2 Cromatografía de líquidos	24
5.3.3 Métodos espectroscópicos	24
5.3.4 Separación de los componentes de la fracción A3 (residuo soluble en MeOH) ..	24
5.4 Evaluación farmacológica	25
5.4.1 Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa (α GHY) <i>in vitro</i>	25
5.4.2 Ensayo de inhibición de proteína tirosina fosfatasa (PTP1B) <i>in vitro</i>	25
5.4.3 Cultivo celular y preparación de fracciones orgánicas	26
5.4.4 Determinación del potencial citotóxico de las fracciones orgánicas de la decocción en hepatocitos.....	26
5.4.5 Ensayo de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) en hepatocitos	27
5.4.6 Análisis estadístico	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
6.1 Estudio químico	29
6.2 Evaluación farmacológica	41
6.2.1 Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa (α GHY) <i>in vitro</i>	41

6.2.2 Ensayo de inhibición de la enzima proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) <i>in vitro</i>	42
6.2.3 Ensayos basados en células.....	44
6.2.3.1 Determinación del potencial citotóxico de las fracciones orgánicas de la decocción en hepatocitos.....	44
6.2.3.2 Ensayo de inhibición de la enzima glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) en hepatocitos.....	46
7. CONCLUSIONES.....	51
8. PERSPECTIVAS.....	52
9. REFERENCIAS.....	53

Lista de Figuras

Figura 1	Distribución geográfica de la especie <i>A. cristata</i> en México y áreas de uso.....	3
Figura 2	Ejemplar de herbario de <i>Anoda cristata</i>	4
Figura 3	Actividades farmacológicas de la metoxiflavona diosmetina.....	5
Figura 4	Actividades farmacológicas de la metoxiflavona acacetina.....	6
Figura 5	Metoxiflavonas aisladas de la infusión de <i>A. cristata</i>	7
Figura 6	Polivalencia farmacológica de los metabolitos secundarios.....	8
Figura 7	Blancos farmacológicos de los agentes antidiabéticos más comunes.....	13
Figura 8	Ubicación y función de las enzimas α -glucosidasas.....	15
Figura 9	Papel de la PTP1B en la señalización de la insulina.....	17
Figura 10	Localización y función de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa).....	19
Figura 11	Espectro IR de la fracción de CH ₂ Cl ₂ (A1) de la decocción de <i>A. cristata</i>	30
Figura 12	Espectro IR de la fracción de AcOEt (A2) de la decocción de <i>A. cristata</i>	31
Figura 13	Espectro IR de la fracción de MeOH (A3) de la decocción de <i>A. cristata</i>	31
Figura 14	Cromatogramas de las fracciones orgánicas de <i>A. cristata</i> a 254 nm.....	32
Figura 15	Espectros UV (panel superior) y de masas (ionización en modo negativo, panel medio; ionización en modo positivo, panel inferior) de la acacetina (1).....	33
Figura 16	Espectros UV (panel superior) y de masas (ionización en modo negativo, panel medio; ionización en modo positivo, panel inferior) de la diosmetina (2).....	33
Figura 17	Espectros UV (panel superior) y de masas (ionización en modo negativo, panel medio; ionización en modo positivo, panel inferior) del compuesto mayoritario de la fracción solubilizada en MeOH (A3).....	34
Figura 18	Estructura de la 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona. R=residuo glicosídico.....	35
Figura 19	Espectro ¹ H-RMN de la fracción A3 en CH ₃ OH- <i>d</i> (400 MHz).....	36
Figura 20	Espectro ¹³ C-RMN de la fracción A3 en CH ₃ OH- <i>d</i> (100 MHz).....	37
Figura 21	Espectro ¹ H-RMN de la muestra MF6 en CH ₃ OH- <i>d</i> (400 MHz).....	39
Figura 22	Espectro ¹³ C-RMN de la muestra MF6 en CH ₃ OH- <i>d</i> (100 MHz).....	39
Figura 23	Espectro ¹ H-RMN de la muestra MF36 en CH ₃ OH- <i>d</i> (400 MHz).....	40
Figura 24	Espectro ¹³ C-RMN de la muestra MF36 en CH ₃ OH- <i>d</i> (100 MHz).....	40
Figura 25	Espectro UV (panel superior) y de masas (ionización en modo negativo, panel inferior) del compuesto en tiempo de retención 6.28 minutos.....	44
Figura 26	Determinación del potencial citotóxico en hepatocitos H4IIE.....	45
Figura 27	Determinación del potencial citotóxico de la acacetina (1) y de la diosmetina (2) en hepatocitos H4IIE.....	46
Figura 28	Determinación de la actividad G6Pasa en hepatocitos H4IIE.....	47
Figura 29	Determinación de la actividad G6Pasa de la acacetina (1) y de la diosmetina (2) en hepatocitos H4IIE.....	48
Figura 30	Determinación de la actividad G6Pasa de la acacetina (1) y de la diosmetina (2) en hepatocitos H4IIE.....	49
Figura 31	Propuesta de inactivación metabólica de la diosmetina (2) a luteolina (4) en hepatocitos H4IIE.....	50

Lista de diagramas

Diagrama 1. Proceso de reparto de la decocción libre de mucílago de <i>A. cristata</i>	23
Diagrama 2. Determinación de la citotoxicidad en hepatocitos H4IIE usando el ensayo de lactato deshidrogenasa.	27
Diagrama 3. Determinación de la inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) en hepatocitos H4IIE.	28
Diagrama 4. Separación de los componentes bioactivos de A3.	38

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
AGIs	Inhibidores de α -glucosidasas
α GHY	Enzima α -glucosidasa de levadura
CCF	Cromatografía en capa fina
CLUE-EM	Cromatografía de líquidos de ultraeficiencia acoplada a espectrometría de masas
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP-4	Dipeptidil peptidasa-4
EEM	Error estándar de la media
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
GLP-1	Péptido-1 parecido al glucagón
GLUT4	Transportador de glucosa 4
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
LDH	Lactato deshidrogenasa
MeOH	Metanol
NPH	Insulina Neutral Protamine Hagedorn
Pi	Fosfato inorgánico
PPAR γ	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
PTPs	Proteínas fosfatasas de tirosinas
RE	Retículo endoplásmico
RI	Resistencia a la insulina
SGLT2	Cotransportador sodio-glucosa 2
TMS	Tetrametilsilano
t _R	Tiempo de retención

RESUMEN

El presente trabajo describe la re-investigación química y farmacológica de la especie *Anoda cristata* (L) Schlttdl. (Malvaceae) conocida coloquialmente como alache o violeta, un tipo de quelite medicinal que se consume en el Valle de México por sus propiedades antidiabéticas. Como producto de este trabajo se estableció en ensayos *in vitro* el posible mecanismo de acción de la especie sobre tres enzimas claves en el metabolismo de la glucosa.

En primera instancia, las fracciones derivadas de la decocción (AcOEt, CH₂Cl₂ y una fracción solubilizada en MeOH) inhibieron a la enzima α -glucosidasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; la fracción de AcOEt tuvo el mejor perfil de actividad respecto a las otras fracciones. Por su parte, la fracción de CH₂Cl₂ inhibió de manera muy eficaz (más del 98%) a la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B). En las evaluaciones que se realizaron en hepatocitos H4IIE, se observó que las fracciones de AcOEt y CH₂Cl₂ eran citotóxicas. La fracción solubilizada en MeOH no fue citotóxica y sí fue muy activa en un ensayo de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) en hepatocitos H4IIE. Un análisis por cromatografía de líquidos de ultraeficiencia acoplada a espectrometría de masas permitió identificar a las metoxiflavonas acacetina y diosmetina como parte de las fracciones de AcOEt y CH₂Cl₂, no así en la fracción solubilizada en MeOH. El compuesto mayoritario de dicha fracción es un derivado glicosilado de la 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona.

Por otra parte, se determinó que las metoxiflavonas acacetina y diosmetina no eran citotóxicas en hepatocitos a las concentraciones evaluadas. Adicionalmente se estableció que la acacetina no inhibe a la enzima G6Pasa hepática, pero la diosmetina sí es inhibidora de dicha enzima.

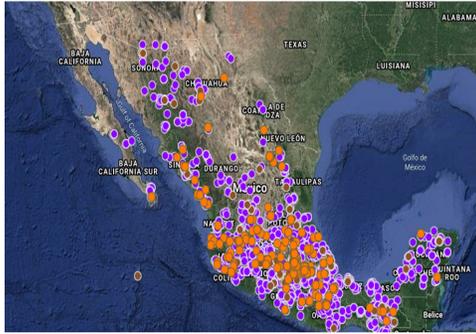
En suma, los resultados obtenidos en esta re-investigación racionalizan la eficacia antidiabética demostrada previamente para el alache. Los compuestos bioactivos presentes en *A. cristata* son polivalentes, pues son inhibidores de la enzima α -glucosidasa, de la PTP1B y de la glucosa-6-fosfatasa, tres blancos de interés para el tratamiento de la diabetes. Estos hallazgos le confieren a esta especie de quelite medicinal un valor agregado para su inclusión en las dietas de pacientes prediabéticos y diabéticos, y la posicionan como una alternativa viable en la terapia antidiabética.

1. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades botánicas y etnomédicas de *Anoda cristata*

Los países multidiversos como México, poseen una flora privilegiada cuyos usos están registrados desde las civilizaciones precolombinas. Muchos de los recursos vegetales forman parte de la dieta nacional (el maíz, el frijol, el chile, los nopales y los quelites) y muchos otros se emplean con fines medicinales. Se estima que hay 3350 especies de plantas medicinales cuyos usos se han mantenido y/o evolucionado en el tiempo (Mata et al., 2019). Existen varios textos contemporáneos que recopilan la información etnobotánica y etnofarmacológica de muchas de las especies de mayor uso por la población mexicana. Uno de los más importantes es el recurso electrónico *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana* (INPI, 2009), creado por el Instituto Nacional Indigenista y editado por la Universidad Nacional Autónoma de México, que contiene información de interés distribuida en varios apartados: 1) Diccionario Enciclopédico (que define formalmente las denominaciones coloquiales para padecimientos y/o enfermedades, así como las formas de tratamiento de los mismos), 2) La Medicina Tradicional de los Pueblos indígenas de México (un recurso geográfico que indica qué plantas medicinales usan los pueblos indígenas), 3) Flora Medicinal indígena de México (un listado del uso que dan los pueblos indígenas a la flora medicinal), y 4) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, el cual agrupa monografías de las especies medicinales empleadas en todo el país, y que incluye: nombre común y sinonimia popular, nombre científico y sinonimia botánica, descripción botánica y ecológica, etnobotánica y antropología, historia, fuentes de consulta y áreas de uso. Por la gran cantidad de información que agrupa, este recurso digital es uno de los referentes para investigar acerca del potencial farmacológico de la flora medicinal mexicana, e incluye una monografía de la especie objeto de estudio de esta investigación: *Anoda cristata*, cuya información relevante se resume a continuación.

El género *Anoda* pertenece a la familia Malvaceae y se le puede encontrar desde el sur de Estados Unidos de América hasta Bolivia, por lo que crece a distintas altitudes (de 0 a 2600 ms.n.m.) y climas (cálido, semicálido, semiseco y templado). A este género pertenece la especie *Anoda cristata* L. Schltl., que tiene varios nombres comunes como alache, amapola del campo, malva, malva cimarrona, panelita, quesitos, amapolita azul, amapola silvestre, malva abrisca, malvavisco, violeta de monte, malvilla, y botón (Mondragón & Vibrans, 2009). Es considerada una maleza que puede ser hallada en terrenos de cultivo de cereales (maíz, arroz, avena, trigo), leguminosas (frijol, lenteja, garbanzo), frutas o verduras (mango, manzana, melón, jitomate, chile, alfalfa, ajo, sandía) o en terrenos abandonados o a orillas de caminos y de arroyos. La **Figura 1** muestra la distribución de la especie en México y las zonas donde se usa con algún fin medicinal o de alimento (INPI, 2009).



Distribución geográfica de *A. cristata*
(Imagen tomada de Tropicos©)



Áreas de uso de *A. cristata*
(Imagen tomada de Biblioteca Digital de la
Medicina Tradicional Mexicana)

Figura 1 Distribución geográfica de la especie *A. cristata* en México y áreas de uso.

El alache es una planta anual que comienza a crecer a mediados de la primavera; florece y fructifica desde el verano hasta fines de otoño. Se caracteriza por ser una hierba rastrera hasta de 1 m de alto y su tallo está rodeado de vellosidades más o menos largas, sus hojas son verdes (a veces con una mancha morada irregular a lo largo del nervio central) y de forma variable: ovadas, lanceoladas o hastadas de 2 a 9 mm de longitud. Las flores tienen un cáliz de 5 a 10 mm de longitud y pétalos color lila o morados de 8 a 26 mm de longitud, con espinas radiales de 1.5 a 4 mm de largo. Sus semillas son reniformes irregulares de 2.5 a 3.5 mm de largo y 2.5 a 3 mm de ancho (**Figura 2**)(Mondragón & Vibrans, 2009).

El alache se utiliza como forraje y también se consume como alimento en forma de quelite. En algunos estados del centro y sur de México se emplea en padecimientos relacionados con el aparato digestivo, ya sea sola o en combinación con otras plantas, como el sauco (*Sambucus mexicana*), la hierba mora (*Solanum americanum*), o el estafiate (*Artemisia ludoviciana*). En 2009 se reportó que extractos acuosos y metanólicos provenientes de las hojas y tallos de *A. cristata* tenían actividad anti-*Helicobacter pylori* (Castillo-Juárez et al., 2009). También se ha descrito el consumo del cocimiento de las flores secas para tratar la tos y que el uso de la savia de la planta y los cocimientos de la corteza tienen actividad sobre el cuero cabelludo y la regeneración de heridas de la piel. Por último, se ha reportado que el alache tiene actividad antiinflamatoria y antipirética (INPI, 2009).

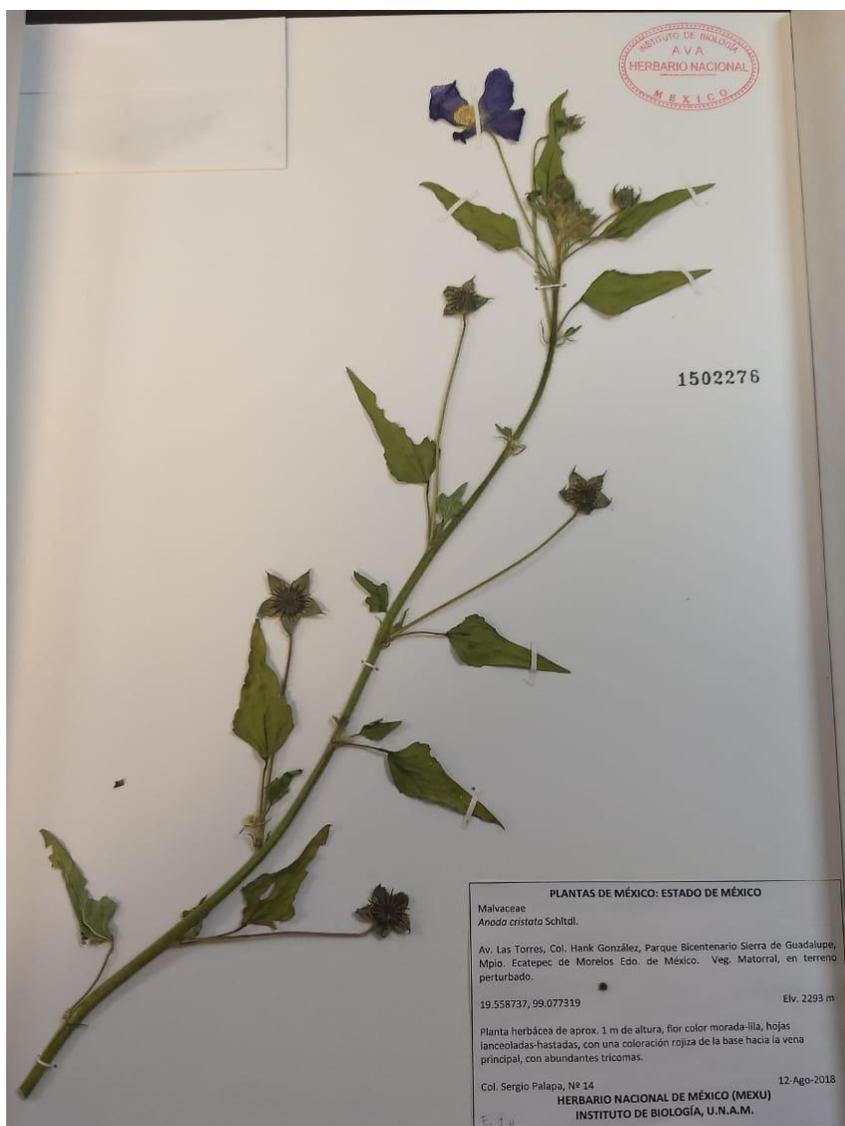


Figura 2. Ejemplar de herbario de *Anoda cristata*.

Depositada en el Herbario Nacional (MEXU 1502276)

En la última década, Brindis (2011) y Juárez-Reyes et al. (2015) demostraron que un extracto orgánico de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 y uno acuoso (infusión) de las partes aéreas del alache provocaban una disminución en los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos (nicotinamida-estreptozotocina) en ensayos hipoglucemiantes agudos y de tolerancia a carbohidratos. La infusión modificó una serie de parámetros bioquímicos alterados en ratas con síndrome metabólico (SM) inducido por fructosa: redujo la grasa abdominal, el índice de Lee, los niveles de glucosa, de triglicéridos y de ácido úrico en suero. También, causó un aumento en los niveles de insulina. Se ha sugerido que los efectos antihiperglucémicos de la infusión en una prueba de tolerancia a la sacarosa se deben a un mecanismo de tipo mecánico de atrapamiento por parte del mucílago presente en la especie, el cual impide la hidrólisis enzimática del

disacárido por las enzimas α -glucosidasas intestinales, retrasando así la absorción intestinal de glucosa. Dos de los compuestos aislados de esta infusión, las metoxiflavonas acacetina (**1**) y diosmetina (**2**) fueron hipoglucemiantes *in vivo* (3-31.6 mg/kg), y su mecanismo de acción posiblemente sea el bloqueo de los canales $K^+_{ATP}/SUR1/Kir6.2$ y la apertura de canales de Ca^{2+} en las células β -pancreáticas, lo cual provocaría la secreción de insulina y el efecto hipoglucemiante observado (Juárez-Reyes, 2016). Además de estas acciones, dichas metoxiflavonas tienen múltiples actividades farmacológicas, las cuales se resumen en las **Figuras 3 y 4** (Garg et al., 2022; Semwal et al., 2019). La metoxiflavona 5,3'5'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (**3**) también fue aislada de la infusión de *A. cristata* (**Figura 5**). Otros metabolitos identificados en la especie fueron el terpinen-4-ilo, timol, el (*E*, *Z*)-2,4-decadienal, 1-metoxi-4-metil-[2.2.2]bicyclooctano y la metil n-hexadecenil cetona.

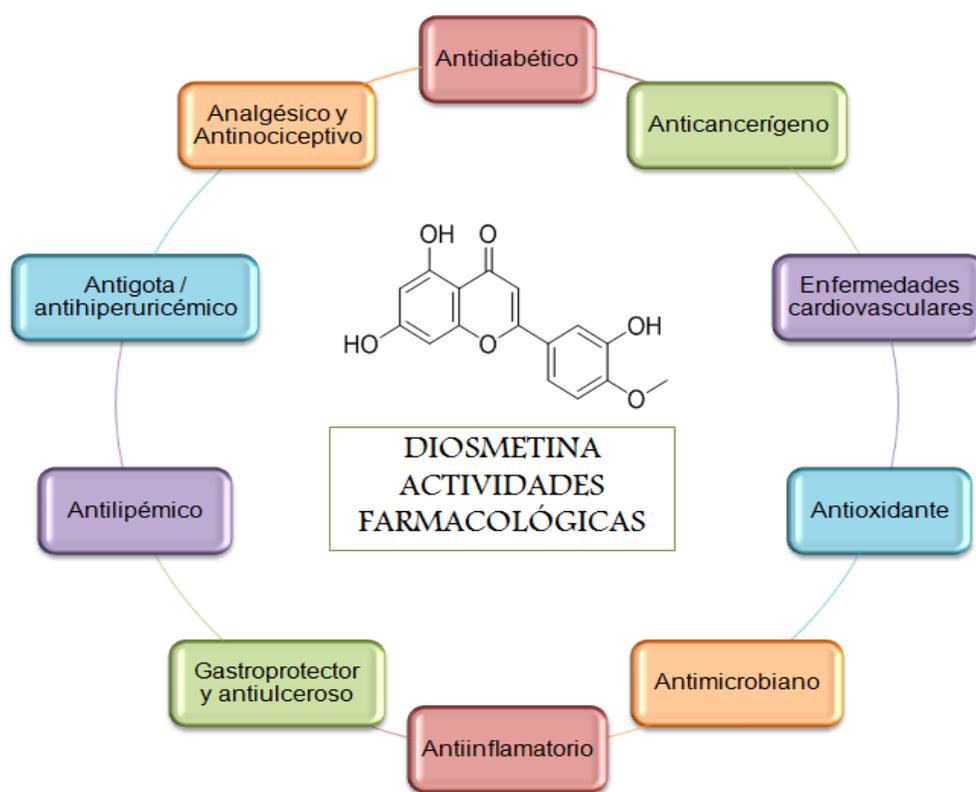


Figura 3. Actividades farmacológicas de la metoxiflavona diosmetina.

Construida con la información de Garg et al., 2022.

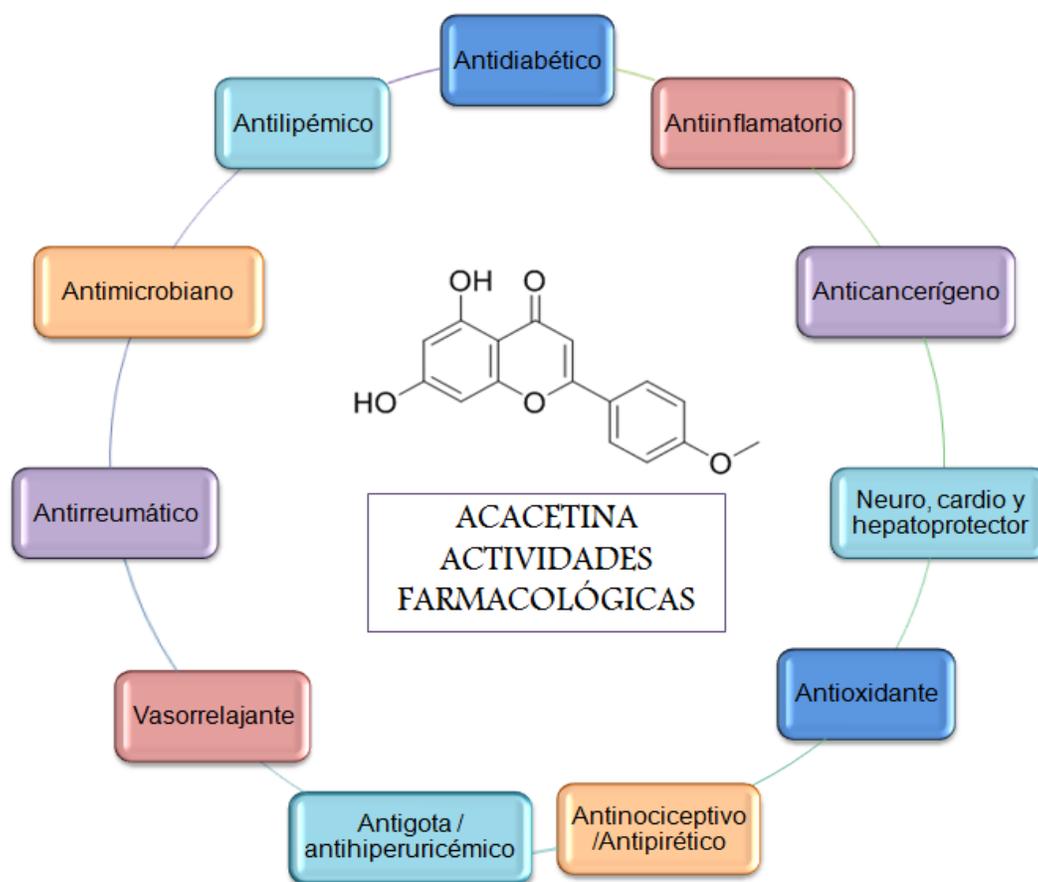


Figura 4. Actividades farmacológicas de la metoxiflavona acacetina.

Construida con información de Semwal et al., 2019.

Como puede observarse en las **Figuras 3 y 4**, las metoxiflavonas son moléculas polivalentes, es decir, que tienen más de una acción farmacológica, lo cual explicaría su eficacia en diferentes ensayos biológicos. Esta propiedad permite sugerir que estos metabolitos, contenidos en los extractos de *A. cristata* pudieran presentar algún otro mecanismo relacionado con la eficacia antidiabética, como la inhibición enzimática (α -glucosidasas, proteína tirosina fosfatasa 1B, dipeptidilpeptidasa-4, o glucosa-6-fosfatasa), el bloqueo del co-transporte de sodio-glucosa a nivel renal, como agonistas del receptor de incretinas, o activadores de AMPK, que son algunos de los blancos moleculares sobre los cuales actúan los fármacos antidiabéticos disponibles o bien, que son dianas de interés farmacológico.

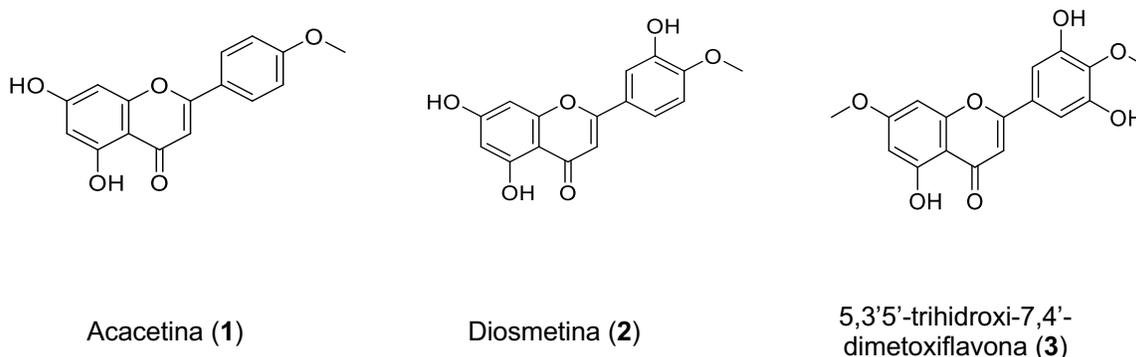


Figura 5. Metoxiflavonas aisladas de la infusión de *A. cristata* (Juárez-Reyes 2016)

1.2 Estudio de la polivalencia farmacológica de las plantas medicinales antidiabéticas

Las plantas medicinales se usan con fines curativos desde los orígenes de la humanidad; derivado de su estudio científico se ha determinado que sintetizan cientos de compuestos químicos en respuesta a su entorno que les permiten adaptarse y sobrevivir. Muchos de estos compuestos, denominados metabolitos secundarios, generan actividades biológicas en otros organismos, por lo que se les denomina con frecuencia *compuestos bioactivos*. La respuesta biológica generada se explica por su interacción con distintos receptores celulares, lo cual da pauta a su estudio farmacológico. Por esta razón es que a partir de las plantas medicinales y otros organismos se han obtenido muchas de las moléculas de relevancia terapéutica, como la morfina, la artemisinina o el paclitaxel (Newman & Cragg, 2020). Existen dos vertientes principales en el estudio de las plantas medicinales y sus metabolitos secundarios. La primera, de *carácter extractivo*, considera que las plantas contienen principios activos con acciones farmacológicas selectivas, los cuales pueden aislarse y evaluarse en modelos adecuados, de manera que se les atribuya el efecto farmacológico observado. La segunda vertiente es de *carácter polivalente*, la cual indica que el extracto de la planta es en sí la entidad bioactiva, y que las acciones farmacológicas observadas son el resultado de dos características de interés farmacológico de los metabolitos secundarios: la polivalencia y la sinergia (Efferth & Koch, 2010; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009). Este enfoque explica que los metabolitos secundarios poseen más de un mecanismo de acción, ya que interactúan con más de un blanco molecular con selectividad y afinidad moderadas (*polivalencia*) y que las acciones conjuntas originan el efecto farmacológico (*interacción aditiva o sinérgica*) (**Figura 6**). De esta manera, los metabolitos secundarios aislados de plantas antidiabéticas podrían interactuar al mismo tiempo con distintos blancos moleculares afectados en la diabetes mellitus, como los canales K_{ATP} , los co-transportadores de sodio-glucosa, o las enzimas α -glucosidasas, lo cual resulta una ventaja para el desarrollo de medicamentos a base de plantas que puedan reducir la hiperglucemia y complicaciones de la progresión de la enfermedad, sin necesidad de usar más de un fármaco.

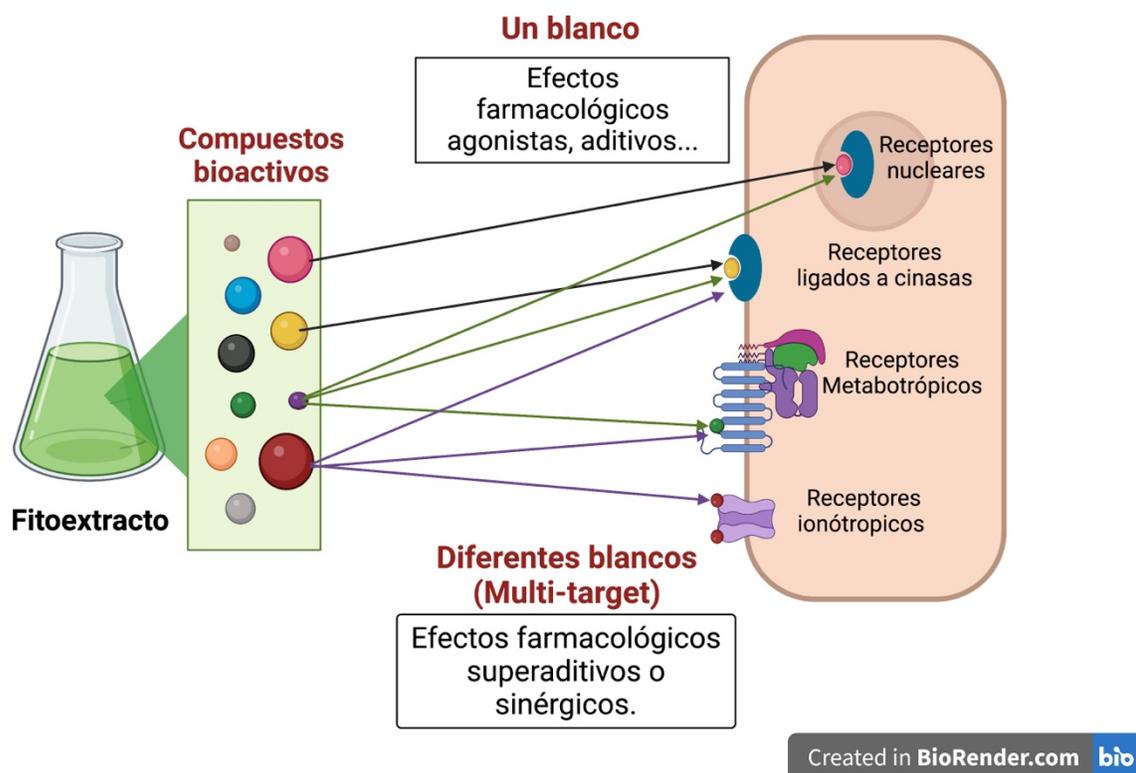


Figura 6. Polivalencia farmacológica de los metabolitos secundarios.

Adaptado de Wagner y, Ulrich-Merzenich, 2009.

1.3 Problemática actual de la Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) se ha convertido en un trastorno del estilo de vida común asociado con la obesidad y las enfermedades cardiovasculares. Los factores ambientales como la inactividad física, los entornos contaminados y las dietas poco saludables también juegan un papel fundamental en la patogénesis de esta enfermedad caracterizada por resistencia a la insulina e hiperglucemia crónica (Venkateswaran et al., 2021).

La diabetes mellitus (DM) ha captado una gran atención de los investigadores debido a las complicaciones micro y macrovasculares que producen una elevada tasa de mortalidad. Según el Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes de 2021, a nivel mundial, 537 millones de adultos son diabéticos y esta cifra podría aumentar hasta 783 millones en 2045 (IDF Diabetes Atlas, 2021). Más del 90% de los pacientes diabéticos padecen DM tipo 2 (DM2), cuyo principal síntoma fisiopatológico es la resistencia a la insulina (RI). La RI se relaciona con una vía de señalización anormal de la insulina en las células adiposas y en las de músculo esquelético, lo cual resulta en la reducción de la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) del citoplasma

a las membranas celulares, con la consecuente reducción de entrada de glucosa hacia los tejidos y la manifestación de hiperglucemia. Es importante mencionar que la RI también se desarrolla como consecuencia del sobrepeso y la obesidad. En el curso de estas afecciones, el exceso de ácidos grasos libres y triglicéridos puede depositarse en el hígado y los músculos. En el hígado, la oxidación excesiva de los ácidos grasos libres conduce a estrés oxidativo y, al mismo tiempo, la resistina y leptina (secretadas por el tejido adiposo), pueden bloquear la autofosforilación del receptor de insulina y provocar RI. Por esta razón, uno de los principales cursos de acción para prevenir la aparición de DM2 es reducir el sobrepeso y la obesidad, antes de iniciar las intervenciones farmacológicas antidiabéticas (Saadeldeen et al., 2020).

México ocupa el séptimo lugar a nivel mundial de prevalencia de DM2, con 14.1 millones de personas adultas con este padecimiento (IDF Diabetes Atlas, 2021), quienes, al ser diagnosticadas, se les indican que realicen cambios en su estilo de vida, de alimentación y de ejercicio para retrasar la progresión de la enfermedad. Puesto que este abordaje generalmente es ineficiente, las personas con diabetes deben ser tratadas y por lo general reciben algún medicamento hipoglucemiante contenido en el Cuadro Básico de Medicamentos elaborado por la Comisión Interinstitucional del Cuadro Básico y Catálogo de Insumos del Sector Salud, y cuya última actualización data de 2016. La **Tabla 1** contiene un resumen de los agentes hipoglucemiantes que se prescriben en las instituciones de salud pública (Comisión Interinstitucional del Cuadro Básico y Catálogo de Insumos del Sector Salud., 2016) y la **Figura 7** muestra un resumen sobre los órganos diana de estos agentes.

Tabla 1. Medicamentos hipoglucemiantes prescritos en instituciones de salud pública. Elaborada con datos de la Comisión Interinstitucional del Cuadro Básico y Catálogo de Insumos del Sector Salud., 2016.

Agente	Principal mecanismo de acción	Forma farmacéutica y vía de administración
Glibenclamida	Secretagogo de tipo sulfonilurea	Tableta con 5 mg, vía oral
Insulina humana	Hormona hipoglucemiante	Soluciones o suspensiones inyectables, vía subcutánea o intramuscular. Varios tipos de acuerdo con su perfil de acción (intermedia NPH, rápida regular e intermedia lenta)
Insulina aspártica	Hormona hipoglucemiante	Solución inyectable, vía intravenosa o subcutánea
Insulina detemir	Hormona hipoglucemiante	Solución inyectable, vía subcutánea
Insulina glargina	Hormona hipoglucemiante	Solución inyectable, vía subcutánea
Insulina glulisina	Hormona hipoglucemiante	Solución inyectable, vía intravenosa o subcutánea
Insulina lispro	Hormona hipoglucemiante	Solución inyectable, vía subcutánea
Insulina lispro, lispro protamina	Hormona hipoglucemiante	Solución inyectable, vía subcutánea
Metformina	Sensibilizador de insulina de tipo biguanida	Tableta con 850 mg, vía oral
Tolbutamida	Secretagogo de tipo sulfonilurea	Tableta con 500 mg, vía oral
Acarbosa	Inhibidor de las enzimas amilasa α -pancreática y α -glucosidasas intestinales	Tableta con 50 mg, vía oral

Tabla 1. Medicamentos hipoglucemiantes prescritos en instituciones de salud pública (Continuación).

Agente	Principal mecanismo de acción	Forma farmacéutica y vía de administración
Dapaglifozina	Inhibidor del cotransportador sodio-glucosa 2 (SGLT2)	Tableta con 10 mg, vía oral
Empaglifozina	Inhibidor de SGLT2	Tableta con 10 mg, vía oral
Empaglifozina/metformina	Combinación de mecanismos de inhibición de la reabsorción de glucosa con sensibilización a la insulina	Tableta con 5 mg/850 mg, vía oral Tableta con 12.5 mg/850 mg, vía oral Tableta con 12.5 mg/1000 mg, vía oral
Exenatida	Análogo de incretina (péptido-1 parecido al glucagón GLP-1)	Solución inyectable con 250 µg, vía subcutánea Suspensión inyectable de liberación prolongada con 2 mg, vía subcutánea
Lixisenatida	Agonista selectivo del receptor de GLP-1	Solución inyectable con 0.05 mg, vía subcutánea Solución inyectable con 0.10 mg, vía subcutánea
Liraglutida	Análogo de incretina (GLP-1)	Solución inyectable con 6 mg, vía subcutánea
Linagliptina	Inhibidor de la enzima DPP-4 (dipeptidil peptidasa-4)	Tableta con 5 mg, vía oral
Saxagliptina	Inhibidor de la enzima DPP-4	Tableta con 5 mg, vía oral
Sitagliptina	Inhibidor de la enzima DPP-4	Comprimido con 50 mg, vía oral Comprimido con 100 mg, vía oral

Tabla 1. Medicamentos hipoglucemiantes prescritos en instituciones de salud pública (Continuación)

Agente	Principal mecanismo de acción	Forma farmacéutica y vía de administración
Vidagliptina	Inhibidor de la enzima DPP-4	Comprimido con 50 mg, vía oral
Sitagliptina/metformina	Combinación de mecanismos de inhibición de la enzima DPP-4 con sensibilización a la insulina	Comprimido con 50 mg/500 mg, vía oral Comprimido con 50 mg/850 mg, vía oral Comprimido con 50 mg/1000 mg, vía oral
Linagliptina/metformina	Combinación de mecanismos de inhibición de la enzima DPP-4 con sensibilización a la insulina	Tableta con 2.5 mg/500 mg, vía oral Tableta con 2.5 mg/850 mg, vía oral Tableta con 2.5 mg/1000 mg, vía oral
Vidagliptina/metformina	Combinación de mecanismos de inhibición de la enzima DPP-4 con sensibilización a la insulina	Comprimido con 50 mg/500 mg, vía oral Comprimido con 50 mg/850 mg, vía oral Comprimido con 50 mg/1000 mg, vía oral
Pioglitazona	Agonista del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ), de tipo tiazolidinediona	Tableta con 15 mg, vía oral
Rosiglitazona	Agonista del receptor PPAR γ , de tipo tiazolidinediona	Tableta con 4 mg, vía oral

Como puede apreciarse en la **Tabla 1** y en la **Figura 7**, los agentes antidiabéticos disponibles actúan en diversos órganos y con distintos mecanismos, por lo que varían en eficacia y efectos colaterales. Por esta razón continúa la búsqueda de moléculas que tengan mejores perfiles de actividad y que además sean capaces de modular más de un blanco farmacológico, para así poder reducir el número de medicamentos prescritos a un paciente diabético. En los últimos diez años ha surgido un interés particular en los compuestos bioactivos que inhiben enzimas clave en el metabolismo energético, como lo son las enzimas α -glucosidasas (que participan en la hidrólisis de polisacáridos para su posterior absorción intestinal), la proteína tirosina fosfatasa 1B (que hidroliza los enlaces tirosina-fosfato generados por la autofosforilación del receptor de insulina), y la glucosa 6-fosfatasa (involucrada en la glucogenólisis y gluconeogénesis).

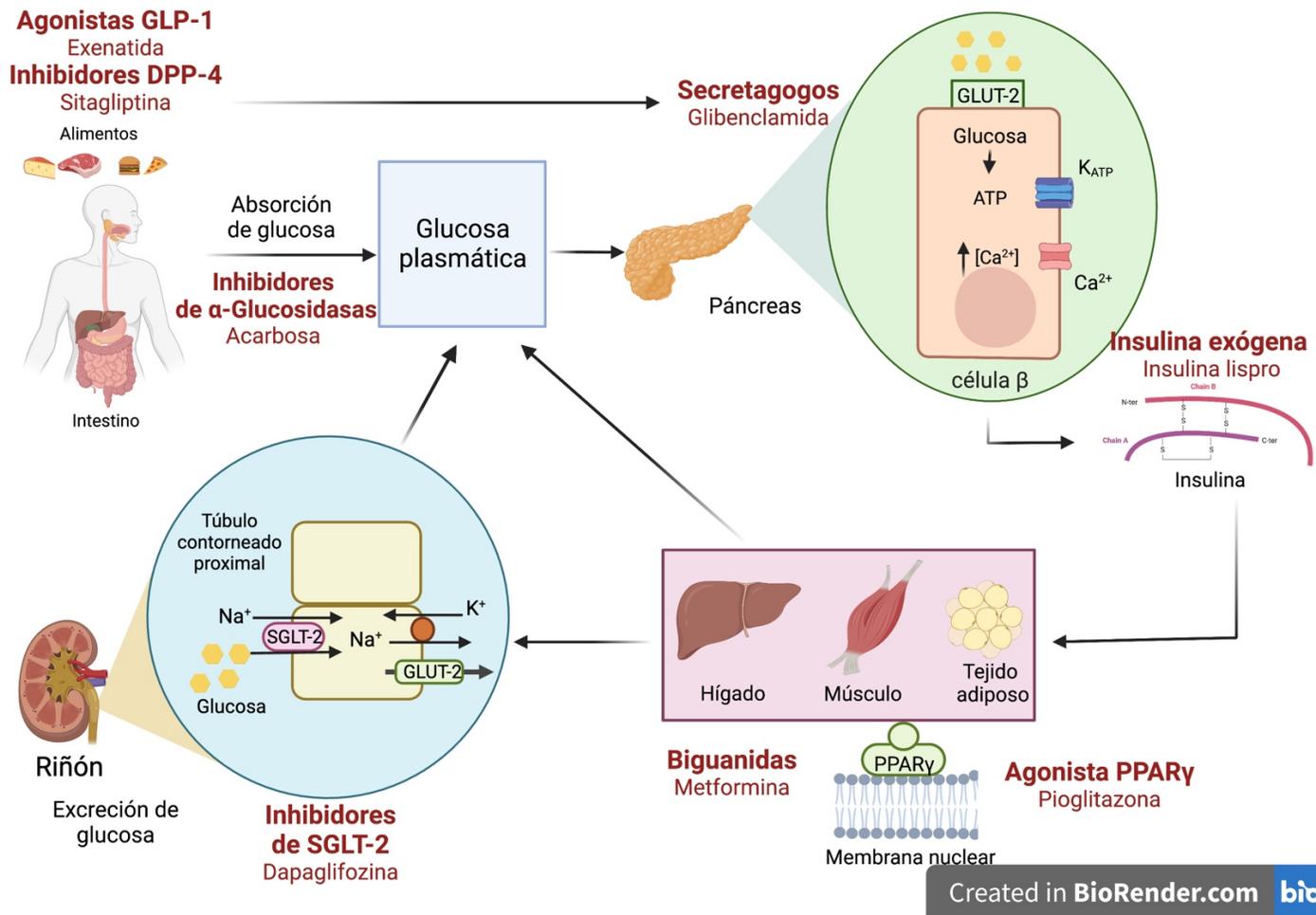


Figura 7. Blancos farmacológicos de los agentes antidiabéticos más comunes.

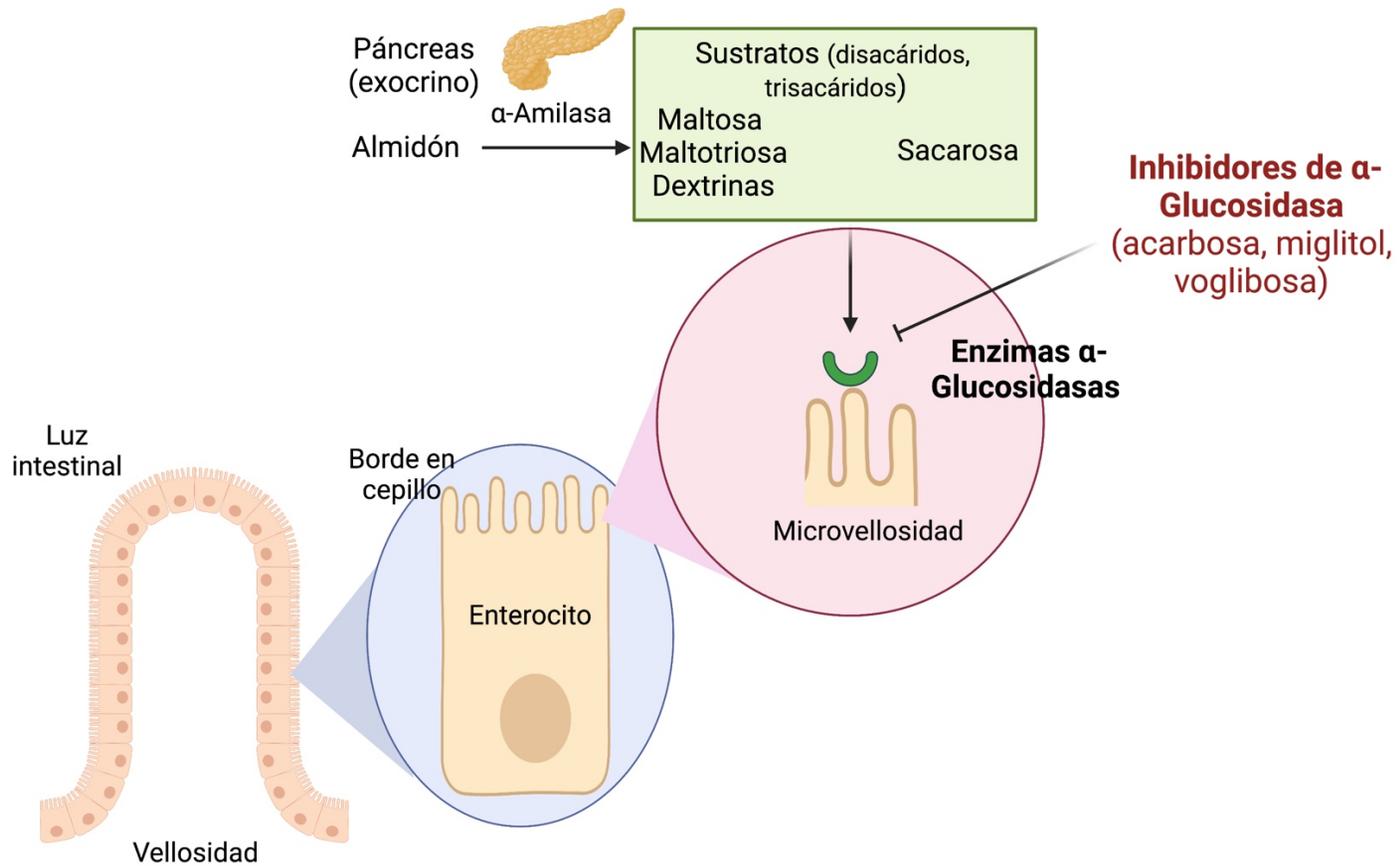
Imagen creada con información del Cuadro Básico de Medicamento (2016).

1.4 Enzimas de interés para el tratamiento de la diabetes

1.4.1 Inhibidores de α -glucosidasas (AGIs)

La mayor parte del proceso digestivo de alimentos que contienen carbohidratos complejos ocurre en el intestino delgado. Las enzimas α -glucosidasas son enzimas pertenecientes a la familia GH31 que se localizan en la membrana de los enterocitos, y que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos de carbohidratos para generar unidades más sencillas (glucosa y monosacáridos relacionados) que pueden absorberse en los epitelios intestinales (**Figura 8**). En el humano, existen dos tipos de α -glucosidasas a nivel intestinal: la maltasa-glucoamilasa y la sacarasa-isomaltasa (Khursheed et al., 2019). La actividad de estas enzimas contribuye al aumento de la glucosa postprandial, la cual está asociada con el incremento en los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c), un factor de riesgo para complicaciones micro y macrovasculares (Dash et al., 2012). Los inhibidores de α -glucosidasas (AGIs, por sus siglas en inglés) pueden retrasar la liberación de glucosa de los carbohidratos provenientes de la dieta, reduciendo así el pico postprandial. Esta estrategia farmacológica es muy útil para prevenir la hiperglucemia asociada a las dietas altas en calorías y así retardar la progresión hacia la DM2 (Venkateswaran et al., 2021).

En la terapéutica mundial, los dos AGIs más prescritos son la acarbosa y el miglitol (ambos productos de origen natural). La acarbosa se puede usar de forma muy segura en combinación con insulina para tratar a pacientes con DM tipo 1; inclusive sus acciones son similares a aquéllas que provoca la administración conjunta de nateglinida (un secretagogo del grupo de las metiglinidas) con insulina (Dash et al., 2012; Kim et al., 2011). Por estas razones, las enzimas α -glucosidasas representan un blanco de interés para el descubrimiento de nuevas moléculas antidiabéticas de origen natural. Una revisión reciente señala que los compuestos bioactivos más importantes que tienen esta actividad pertenecen a compuestos de tipo flavonoide, derivados fenólicos, polisacáridos, taninos, antocianinas, saponinas y esteroides (Hossain et al., 2020).



Created in **BioRender.com** **bio**

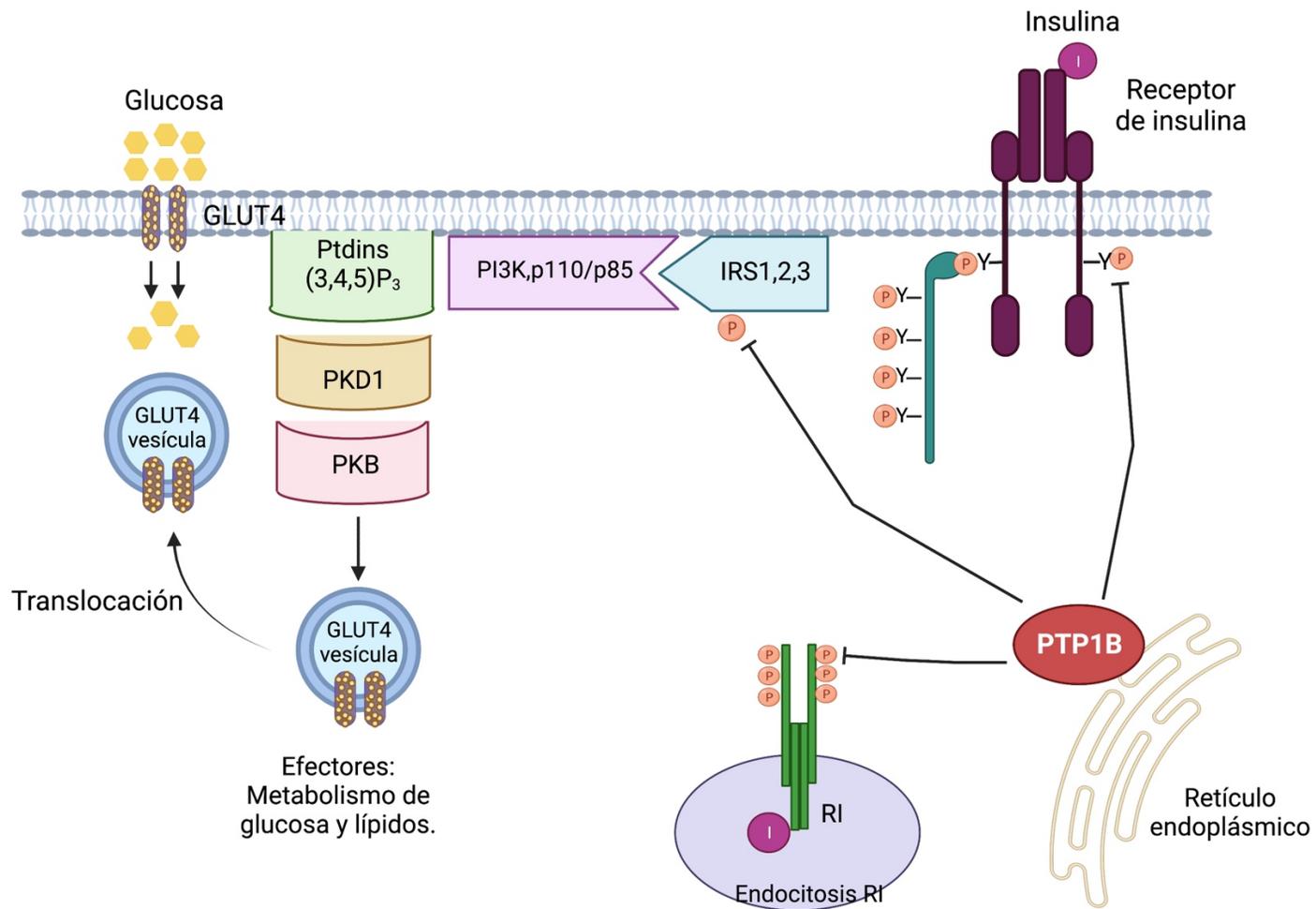
Figura 8. Localización y función de las enzimas α -glucosidasas.

Adaptado de <https://www.pngkey.com/maxpic/u2r5a9i1w7y3u2r5/>

1.4.2 Inhibidores de proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)

Las acciones metabólicas de la insulina se deben a la activación de cascadas de señalización intracelular que comienzan cuando la unión hormona-receptor origina una autofosforilación del receptor en residuos de tirosina (Tyr), para posteriormente desencadenar otra serie de eventos de fosforilación/desfosforilación de cinasas de Tyr y serina/treonina (Ser/Thr), los cuales generan las acciones de la hormona. La regulación a la baja de la señalización de la insulina puede darse a nivel de la desfosforilación de residuos claves de Tyr en el asa de activación del receptor por la activación de proteínas fosfatasas de Tyr (PTPs) (**Figura 9**). Las PTPs se clasifican en citosólicas y de membrana (Johnson et al., 2002).

La mayoría de las evidencias experimentales que provienen de estudios realizados con PTPs citosólicas, principalmente con la PTP1B, han demostrado que la inhibición de esta enzima aumenta el nivel de fosforilación del receptor de insulina y sus sustratos, promoviendo así la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4 y la captura de glucosa en las células de tejidos periféricos (Reyes Olivares & Arellano Plancarte, 2008). La PTP1B es un blanco de interés terapéutico porque es un modulador negativo de las vías de señalización de insulina y de leptina, por lo que no sólo puede aplicarse a la terapéutica de la diabetes, sino a la de la obesidad y el cáncer. Más de 300 moléculas han demostrado ser inhibidoras de PTP1B *in vitro*, pero sólo unas pocas (ertiprotafib, trodusquemina y JTT-551) alcanzaron la fase de investigación clínica, pero no avanzaron debido a su baja eficacia y efectos adversos. Por ello, continúa la búsqueda de moléculas inhibidoras de PTP1B que tengan buenos perfiles de seguridad y eficacia.



Created in **BioRender.com** **bio**

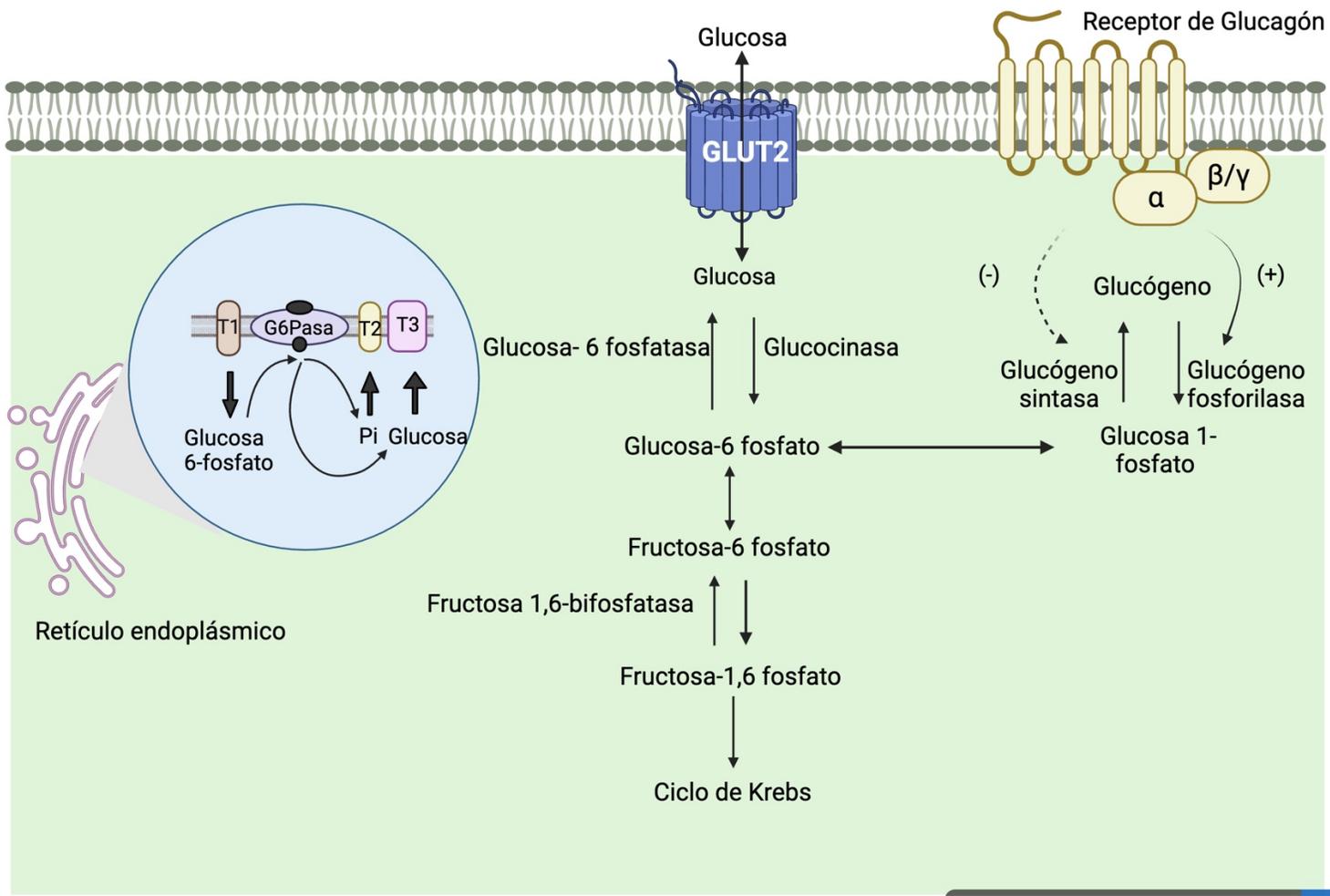
Figura 9. Papel de la PTP1B en la señalización de la insulina.

Adaptado de Johnson et al., 2002.

1.4.3 Inhibidores de glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa)

La enzima glucosa-6-fosfatasa es un sistema multicomponente que se localiza en el retículo endoplásmico (RE), cuya función es catalizar la conversión de glucosa-6-fosfato (G6P) a glucosa y fosfato inorgánico (Pi). La G6Pasa coordina la función de un intercambiador G6P/Pi (SCL37A4) que permite la llegada de G6P desde el citosol hasta la luz del RE, para que dicho sustrato sea hidrolizado por la subunidad catalítica del complejo (G6PC) (Claxton et al., 2022). Se ha descrito que hay tres isoformas de la subunidad catalítica: G6PC1, G6PC2, y G6PC3, que se expresan de manera selectiva en distintos tejidos. G6PC1 se encuentra principalmente en riñones e hígado; en este último órgano es clave en el paso final de producción de glucosa mediante la gluconeogénesis y la glucogenólisis (**Figura 10**). Por su parte, G6PC2, también conocida como proteína relacionada con la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica del islote (IGRP), se encuentra predominantemente en las células β -pancreáticas. Por último, G6PC3 se expresa en los riñones, los testículos, el músculo esquelético y el cerebro; su sustrato es el 1,5-anhidroglucitol-6-fosfato (Rahim et al., 2022).

La insulina y el glucagón regulan la expresión génica de G6PC1; la primera la reprime, y la segunda, la estimula. Incluso, la síntesis de ARNm de esta subunidad catalítica y la actividad G6Pasa se encuentran elevadas en modelos animales con DM1 y DM2, por lo que se ha relacionado el incremento en la actividad catalítica de G6PC1 con la patogenia de la diabetes mellitus; la activación de G6PC1 incrementa la producción de glucosa hepática, lo cual es una de las principales causas de hiperglucemia en la DM2 (Sharabi et al., 2015). La inhibición o disminución de la actividad de esta enzima puede retrasar la liberación de glucosa libre en sangre y, por lo tanto, puede ayudar en el manejo de la hiperglucemia asociada con la DM2 (Naz et al., 2020; Shieh et al., 2004). De acuerdo con la revisión bibliográfica efectuada, no hay ningún fármaco que inhiba a estas enzimas; no obstante, existen reportes de la actividad inhibitoria de G6Pasa de extractos vegetales y metabolitos aislados de éstos, en particular de tipo antocianina, derivados fenólicos, alcaloides y triterpenos (Nachar et al., 2017; Naz et al., 2020; Ovalle-Magallanes et al., 2019). Por estas razones, la inhibición de G6Pasa es una diana de interés terapéutico para tratar la DM2.



Created in **BioRender.com** **bio**

Figura 10. Localización y función de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa).

Adaptado de Rahim et al., 2022 y Sharabi et al., 2015.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La búsqueda de moléculas antidiabéticas con mecanismos de acción conocidos o novedosos forma parte de los programas académicos de muchas instituciones médicas y universitarias del mundo. Esta búsqueda se explica por la alta prevalencia de la DM2 a nivel mundial y por las complicaciones asociadas a su progresión. Las plantas medicinales siguen siendo las principales fuentes de compuestos bioactivos, por lo que a partir del conocimiento de la Medicina Tradicional se ha logrado determinar que muchas especies de plantas medicinales y/o de alimento tienen eficacia antidiabética que se debe a sus diversos metabolitos secundarios. Este es el caso de *Anoda cristata* (L) Schltdl. (Malvaceae), una malva medicinal y que también es consumida como quelite (alimento). Entre 2010 y 2015 se estableció la eficacia antidiabética *in vivo* para la infusión de esta especie y la presencia de las metoxiflavonas acacetina y diosmetina en la misma. Puesto que no existen reportes adicionales sobre otros metabolitos secundarios ni acerca de los mecanismos de acción de la especie, el presente trabajo de tesis tuvo como objetivo hacer la re-investigación fitoquímica y fitofarmacológica de la especie. Considerando que los productos naturales exhiben el fenómeno de polivalencia farmacológica, es decir, que ejercen sus acciones a través de más de una diana molecular, la presente investigación fue diseñada para establecer la capacidad inhibitoria de las fracciones orgánicas derivadas de la decocción (diclorometano, acetato de etilo y metanol) sobre tres enzimas de interés farmacológico para tratar la DM2: α -glucosidasa, proteína tirosina fosfatasa 1B y glucosa-6-fosfatasa.

3. HIPÓTESIS

Anoda cristata ejerce sus acciones antidiabéticas a través de múltiples blancos farmacológicos, y por lo tanto tiene más de un compuesto activo. Las fracciones orgánicas derivadas de la decocción contendrán metabolitos secundarios polivalentes que inhibirán a las enzimas α -glucosidasas, proteína tirosina-fosfatasa 1B y glucosa-6-fosfatasa en ensayos *in vitro* y basados en células.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Establecer la eficacia de *A. cristata* en modelos *in vitro* mediante estudios biodirigidos con la finalidad de aislar sus principios activos, contribuyendo así al conocimiento fitoquímico y fitofarmacológico de la especie.

4.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto *in vitro* de fracciones orgánicas derivadas de la decocción de *A. cristata* sobre la actividad de las enzimas: α -glucosidasa (α GHY), proteína tirosina-fosfatasa 1B (PTP1B) y glucosa-6-fosfatasa.
- Establecer de manera preliminar la composición de las fracciones orgánicas activas en el ensayo de inhibición de glucosa-6-fosfatasa.

5. METODOLOGÍA

5.1 Material vegetal

El material vegetal se recolectó el 12 de agosto de 2019 en el Parque Bicentenario Sierra de Guadalupe (municipio de Ecatepec de Morelos, Estado de México). Un ejemplar identificado por el M. en C. Rafael Torres Colín del Instituto de Biología de la UNAM está en el Herbario Nacional (MEXU 1502276). Se separaron las raíces de las partes aéreas (droga cruda), las cuales se fragmentaron en un molino tipo Wiley usando una malla de 2 mm.

5.2 Preparación de los extractos vegetales

Para la preparación de los extractos vegetales se utilizó cristalería de laboratorio variada (vasos de precipitados, matraces Erlenmeyer, embudos de filtración rápida, probetas, embudos de separación, matraces bola y columnas cromatográficas), así como placas de agitación y calentamiento, balanza analítica y espátulas. Los disolventes que se usaron fueron de grado analítico (hexano, acetato de etilo, diclorometano, metanol, etanol y agua destilada) y se adquirieron a Solinteli S.A. de C.V. (Ciudad de México).

Se prepararon dos tipos de extractos acuosos de la droga cruda: uno por infusión (IAC), adicionando 250 mL de agua destilada hirviendo a 10 g de la droga y dejando reposar durante 30 min, y otro por decocción (DAC), calentando las mismas cantidades de droga y agua destilada, hasta alcanzar la ebullición y manteniendo el calentamiento durante 15 min. En ambos casos, se observó la formación de mucílago. Ambos extractos se dejaron enfriar a temperatura ambiente para retirar el material vegetal por filtración simple. El mucílago se separó de los extractos mediante precipitación con etanol absoluto, adicionando 250 mL a los extractos acuosos filtrados. Posteriormente, las infusiones o decocciones libres de mucílago se sometieron a procesos de reparto sucesivos entre disolventes orgánicos de distinta polaridad. Puesto que el rendimiento de las fracciones orgánicas fue mayor para el caso de la decocción, en lo sucesivo sólo se prepararon aquellas fracciones derivadas de la decocción. En todos los casos, las fracciones orgánicas se separaron y secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador. El proceso descrito en el **Diagrama 1** se realizó tantas veces fue necesario para producir cantidades suficientes de las fracciones orgánicas de diclorometano (A1), acetato de etilo (A2) y metanol (A3) para realizar sus estudios biológicos y químicos.

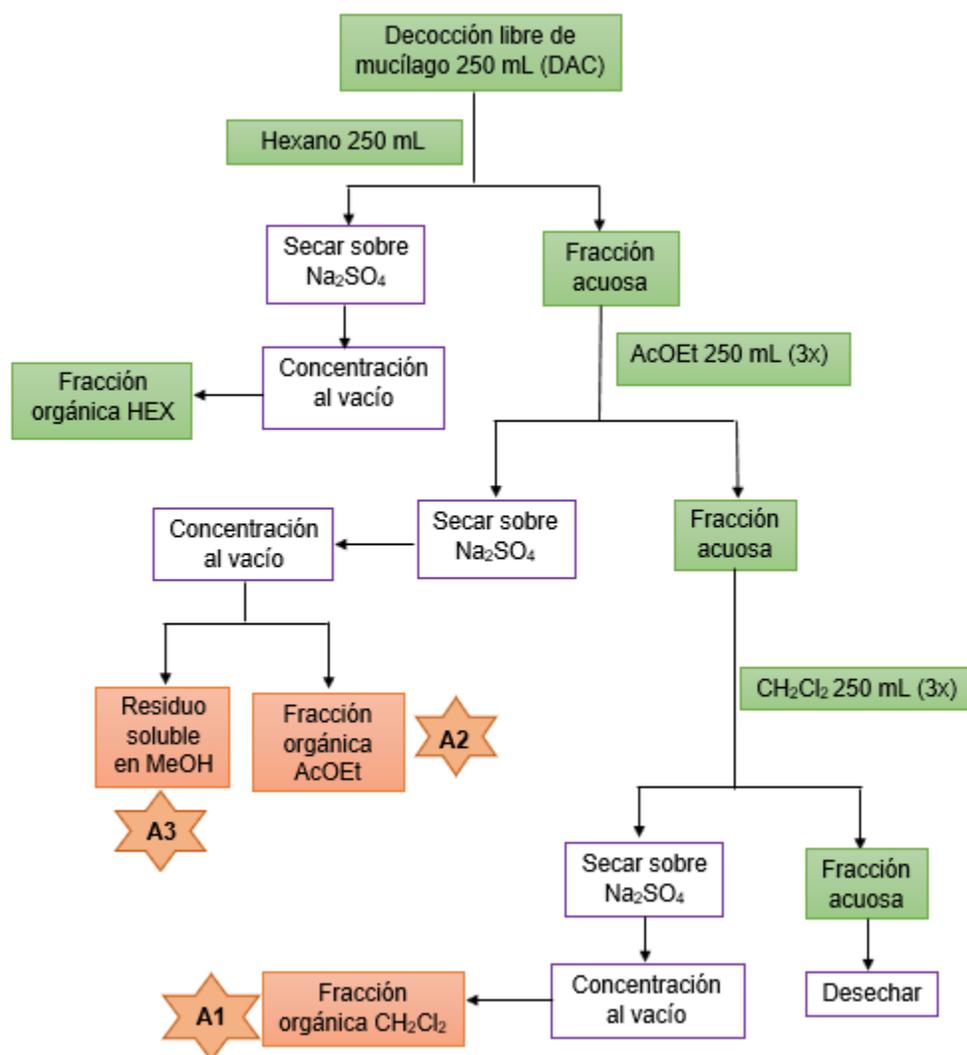


Diagrama 1. Proceso de reparto de la decocción libre de mucílago de *A. cristata*.

A1: Fracción orgánica de CH₂Cl₂; **A2:** Fracción orgánica de AcOEt; **A3:** Residuo soluble en MeOH.

5.3 Estudio químico

5.3.1 Cromatografía en capa fina

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron utilizando placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas de gel de sílice de 0.25 mm de grosor (gel de sílice 60 F254, 10-12 µm; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y empleando diferentes sistemas de elución. La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV (λ 254 y 356 nm) y como agente cromógeno se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal y calentamiento.

5.3.2 Cromatografía de líquidos

Los perfiles cromatográficos de las fracciones A1 (CH₂Cl₂), A2 (AcOEt) y A3 (MeOH) se obtuvieron usando un cromatógrafo de líquidos de ultra alta eficiencia Waters Acquity UPLC H-Class[®] con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) acoplado a un detector de masas SQD2 mediante la técnica ionización por electrospray (UPLC-EM-ESI) en los modos positivo (ESI⁺) y negativo (ESI⁻). Las fracciones se prepararon disolviendo 1 mg en 1 mL de una mezcla dioxano:MeOH 1:1 grado CG y se filtraron a través de una membrana Acrodisc[®] de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de espesor antes de ser inyectadas al cromatógrafo. Se usó una columna fase reversa Acquity[®] BEH C₁₈ (2.1 × 100 mm, 1.7 µm), utilizando como fase móvil una mezcla binaria de CH₃CN (**A**) y agua (**B**; 0.1% ácido fórmico) en un gradiente de elución lineal: 0 min 15% **A**; 8 min 100% **A**; 10 min 100% **A**; 10.5 min 15% **A**; flujo: 0.3 mL/min, volumen de inyección: 3 µL; condiciones de análisis: voltaje capilar: 2.0 kV; voltaje cono: 30 V; temperatura de solvatación: 400°C; gas de solvatación: nitrógeno (N₂) 650 L/h; gas cono: 10 L/h; PDA: 200-400 nm con una resolución de 4 nm. El control del equipo, adquisición y procesamiento de datos se realizaron utilizando el programa Empower 2.0 (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). La identificación de las metoxiflavonas acacetina (**1**) y diosmetina (**2**) se realizó por coelución de soluciones de 1 mg/mL de las fracciones con una solución de 1 mg/mL de cada flavona (mezcla de dioxano:MeOH 1:1 grado CG). Se analizaron los espectros UV y las masas obtenidas en ESI⁺ y ESI⁻ para los picos de interés.

5.3.3 Métodos espectroscópicos

El registro de los espectros de infrarrojo de las fracciones A1, A2 y A3, así como los espectros de ¹H y ¹³C de la fracción A3 y compuestos aislados estuvo a cargo de personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Los espectros de IR se obtuvieron con un equipo Perkin-Elmer 1605 (4000a 400 cm⁻¹) y los de RMN de se registraron en metanol deuterado (CD₃OD) en un espectrómetro Varian Unity Plus 400 a 400 MHz, usando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

5.3.4 Separación de los componentes de la fracción A3 (residuo soluble en MeOH)

Se pesaron 307 mg de la fracción A3, los cuales fueron solubilizados en 2.5 mL de una mezcla 95:5 de MeOH:H₂O desionizada. La solución fue sonicada por 2 min y se aplicó a una columna cromatográfica empacada con Sephadex LH-20 previamente acondicionada (acondicionada con MeOH:H₂O desionizada 95:5; volumen de lecho 132 mL). Tras la aplicación de la muestra, se realizó una elución isocrática de la columna usando una mezcla 95:5 MeOH:H₂O desionizada. Se colectaron 18 fracciones de 15 mL cada una. Las fracciones se secaron y se analizaron por CCF con un sistema de elución AcOEt:MeOH:H₂O en una proporción 7.0: 2.5: 0.5. La placa se observó al UV y se reveló usando sulfato cérico amoniacal. Con esto, las fracciones obtenidas se reunieron en seis fracciones primarias (FI-FVI). La fracción primaria FVI (8.9 mg) se purificó usando

cromatografía semipreparativa sobre vidrio (TLC silica gel 60 F254, Merck), usando un sistema de elución AcOEt:MeOH:H₂O en una proporción 7.0: 2.5: 0.5. De este proceso se obtuvieron 2.9 mg de un compuesto de color amarillo que fueron analizados usando RMN.

Por otra parte, las fracciones primarias III y IV (III/IV) se reunieron (163.6 mg) para separar usando cromatografía en columna con Sephadex-LH como soporte (acondicionada con MeOH:acetona 95:5 ; volumen de lecho 112 mL). La fracción III/IV se disolvió en 2 mL de MeOH y la elución se llevó a cabo usando una mezcla de MeOH:acetona 95:5. Se colectaron 20 fracciones de 15 mL cada una. Las fracciones secundarias se secaron y se analizaron por CCF con las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Luego del análisis cromatográfico se generaron ocho fracciones secundarias (FIII/IV 1-8). La fracción III/IV-6 (5.1 mg) era un compuesto de color amarillo que fue analizado usando RMN.

5.4 Evaluación farmacológica

5.4.1 Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa (α GHY) *in vitro*

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de las fracciones A1, A2 y A3 se utilizó la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (α GHY; Sigma-Aldrich® México) y una técnica descrita previamente en la literatura (Rangel-Grimaldo et al., 2020). Las fracciones se disolvieron en MeOH a dos concentraciones: 200 ppm y 1000 ppm. Se usó acarbosa 30 mM como control positivo. En placas de 96 pozos se colocaron 10 μ L de las soluciones por triplicado y se incubaron por 10 min a 37 °C con 20 μ L de una solución de la enzima α GHY (0.4 U/mL en buffer de fosfatos). Después de ese tiempo se agregaron 10 μ L de una solución del sustrato *p*-nitrofenol- α -D-glucopiránosido (5 mM) y se incubó nuevamente a 37 °C. Al finalizar este tiempo, se midió la absorbancia con un espectrofotómetro BioRad® modelo iMark (Hercules, CA, EE. UU.) a una longitud de onda de 415 nm utilizando el software Microplate Manager® 6 (versión 6.3, BioRad®, Hercules, CA, EE. UU.). El porcentaje de inhibición enzimática se calculó de acuerdo a lo reportado previamente.

5.4.2 Ensayo de inhibición de proteína tirosina fosfatasa (PTP1B) *in vitro*

Se realizó un ensayo de inhibición de la PTP1B de acuerdo con reportes previos (Rangel-Grimaldo et al., 2020). Las fracciones A1, A2 y A3 se disolvieron en una mezcla de DMSO y una solución amortiguadora de Tris (Tris, 20 mM, pH 6.7). Las fracciones A2 y A3 precipitaron en esta mezcla, por lo que sólo se evaluó la fracción A1 a las concentraciones de 200 ppm y 1000 ppm. Como control positivo se utilizó ácido ursólico disuelto en una mezcla de DMSO y Tris (1:1) a una concentración de 1 mM. En placas de 96 pozos se colocaron 10 μ L de las soluciones por triplicado y se incubaron por 5 min a 37 °C con 20 μ L de una solución la enzima (22 nM en Tris). Después de ese tiempo se agregaron 10 μ L de una solución del sustrato *p*-nitrofenilfosfato (5 mM) y se incubó nuevamente a 25 °C durante 15 min. Al cabo de ese tiempo se determinó la absorbancia a 415 nm usando el lector de

placas descrito en el apartado anterior. El porcentaje de inhibición enzimática se calculó de acuerdo con lo reportado previamente por Rangel-Grimaldo y colaboradores (2020).

5.4.3 Cultivo celular y preparación de fracciones orgánicas

Se cultivaron hepatocitos de rata (H4IIE) adquiridos a The American Type Culture Collection (ATCC, EE. UU.) bajo condiciones estándar empleando medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) alto en glucosa adicionado con 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina) y suplementado con 10% de suero fetal bovino. Se siguieron condiciones de cultivo estándar (37 °C en una atmósfera 95%-5% CO₂-aire humidificado) para proliferación y siembra en placas de 48 pozos (Ovalle-Magallanes et al., 2019). Se prepararon soluciones concentradas (50 mg/mL) de las fracciones A1 (CH₂Cl₂), A2 (AcOEt) y A3 (MeOH), o concentradas (5 mM) de las metoxiflavonas acacetina y diosmetina (00017 Lot. # BCBZ7094 y D7321 Lot. # SLBR8613V, respectivamente; adquiridas comercialmente a Sigma-Aldrich® México), usando DMSO grado cultivo celular como disolvente. Las soluciones se filtraron sobre una membrana estéril de polietersulfona de 0.22 µm y se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su uso. A partir de las soluciones concentradas se prepararon por dilución con DMSO las distintas soluciones que se usaron en los experimentos.

5.4.4 Determinación del potencial citotóxico de las fracciones orgánicas de la decocción en hepatocitos

Se establecieron las concentraciones máximas no tóxicas de las fracciones A1, A2 y A3 y de las metoxiflavonas acacetina y diosmetina, mediante una prueba de citotoxicidad basada en la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Ovalle-Magallanes et al., 2019). Se construyeron curvas concentración-respuesta logarítmicas de las tres fracciones (A1, A2, A3) usando cinco niveles de concentración final en pozo: 10, 56, 100, 316 y 562 µg/mL; las concentraciones de metoxiflavonas (acacetina y diosmetina) analizadas fueron 1.0, 1.77, 3.16, 5.62, 10, 17.7, 31.6 y 56.2 µM. En todos los casos, la concentración máxima de DMSO fue 1%. Los tratamientos y el control (DMSO 1%) se disolvieron en DMEM libre de suero y se aplicaron a células cultivadas en placas de 48 pozos (90% de confluencia). Luego de 18 h de incubación se siguió la metodología descrita en el **Diagrama 2** para determinar la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa usando un kit comercial (LDH colorimetric kit, Roche, Alemania). Los resultados de este ensayo están expresados como el promedio ± EEM del porcentaje de muerte calculado como la proporción entre la LDH liberada respecto a la total (LDH liberada + LDH celular) de tres experimentos realizados en pases celulares distintos por triplicado.

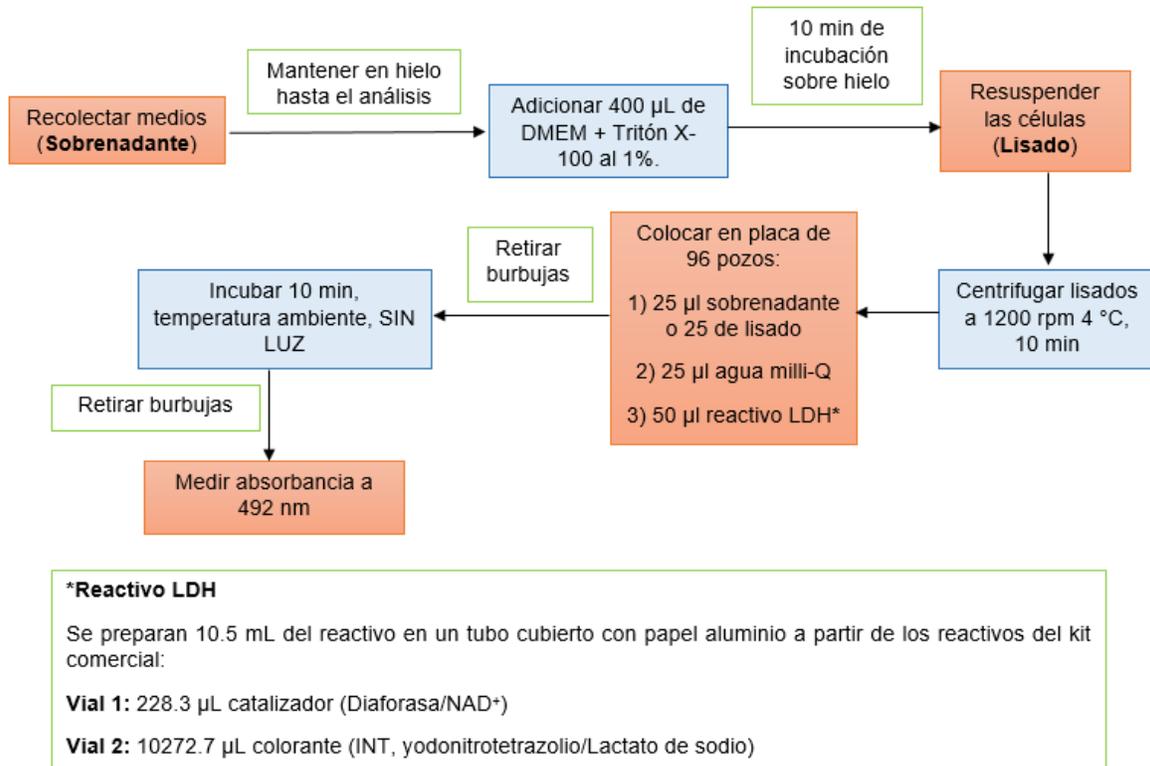


Diagrama 2. Determinación de la citotoxicidad en hepatocitos H4IIE usando el ensayo de lactato deshidrogenasa.

5.4.5 Ensayo de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) en hepatocitos

En este ensayo se construyeron curvas concentración-respuesta a cinco niveles de la fracción metanólica de la decocción A3 (10, 30, 56.2 y 100 µg/mL), de acetina (1, 1.78, 3.16, 5.62 y 10 µM) y de diosmetina (1.78, 3.16, 5.62, 10 y 17.7 µM). Los hepatocitos se sembraron en placas de 48 pozos y cuando alcanzaron 90% de confluencia se trataron durante 18 h con las concentraciones descritas. Se usaron DMSO al 1% e insulina (100 nM) como controles de disolvente y positivo, respectivamente. Transcurrido el tiempo del tratamiento, se llevó a cabo el procedimiento descrito en el **Diagrama 3**. Los resultados de este ensayo están expresados como el promedio ± EEM del porcentaje de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa (relacionada con la glucosa cuantificada) de tres experimentos independientes por duplicado (n = 6) (Ovalle-Magallanes et al., 2019).

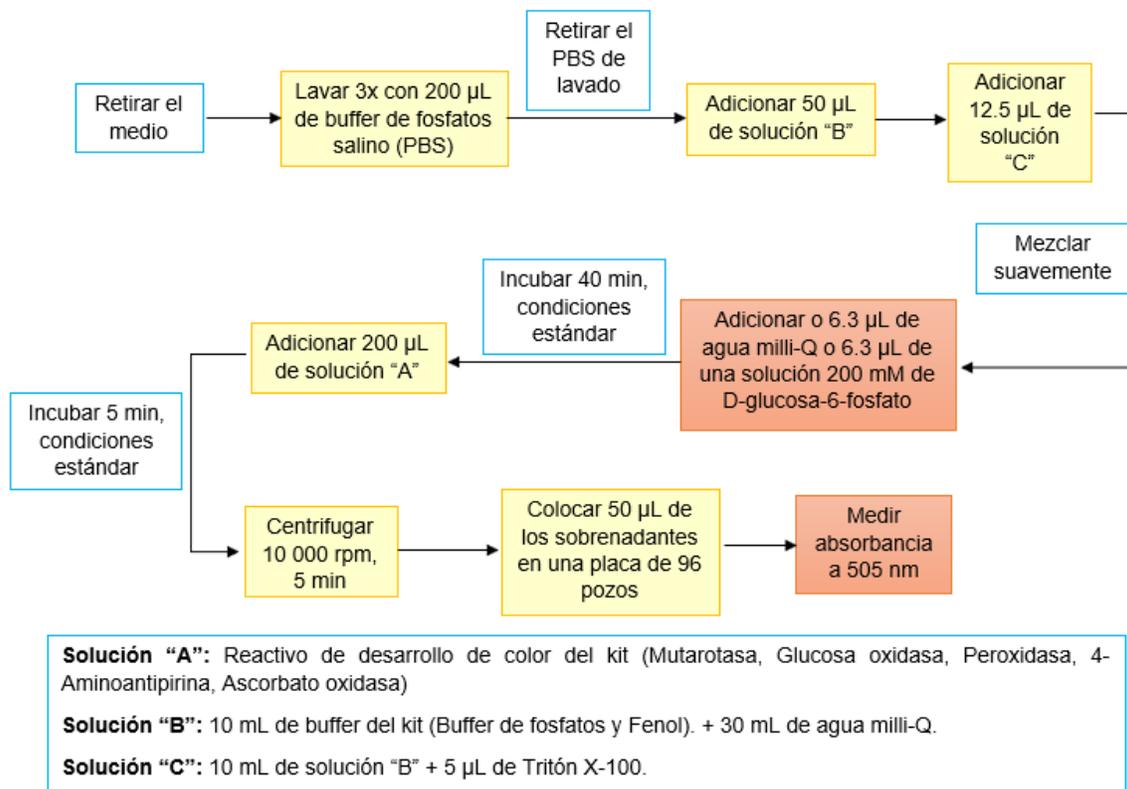


Diagrama 3. Determinación de la inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) en hepatocitos H4IIE.

5.4.6 Análisis estadístico

En todos los ensayos con células, las diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control de disolvente (DMSO) se obtuvieron con el programa estadístico GraphPad Prism (versión 9.0; GraphPad Inc., EE. UU. para Windows), mediante un ANOVA de una vía seguido de una prueba Dunnett ($p < 0.05$) (GraphPad Prism 9 User Guide - What's New? Multiple Comparisons, 2022).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo es una re-investigación química y farmacológica de *Anoda cristata*, una especie vegetal cuyos usos se encuentran en el límite de lo medicinal y el consumo como alimento. El alache es un quelite apreciado medicinalmente cuya eficacia antidiabética en murinos fue establecida previamente (Juárez-Reyes, 2016), pero no se determinaron mecanismos de acción que explicaran sus efectos antidiabéticos ni se identificaron metabolitos secundarios adicionales a las metoxiflavonas acacetina (**1**) y diosmetina (**2**) en el extracto acuoso. Por esta razón se desarrolló una metodología química y farmacológica simultánea para establecer la composición química de la decocción de la especie y sus posibles mecanismos de acción sobre tres enzimas clave en la homeostasis de la glucosa: α -glucosidasas, proteína tirosina fosfatasa 1B y glucosa-6-fosfatasa, de manera que se generara información para racionalizar su uso medicinal y poder proponer su revaloración como una especie comestible con un valor agregado para tratar enfermedades metabólicas.

6.1 Estudio químico

Los reportes previos acerca de la fitoquímica y farmacología de *A. cristata* refieren el estudio de un extracto acuoso de las partes aéreas de la especie obtenido mediante la técnica de infusión (Juárez-Reyes et al., 2015). Considerando que adicionalmente el alache se consume como quelite, es decir, que los cocimientos de la planta se ingieren como alimento y como medicina (INPI, 2009), se decidió ensayar la preparación de un extracto acuoso mediante la técnica de decocción, para posteriormente realizar extracciones líquido-líquido sucesivas. En esta re-investigación observamos que los dos extractos acuosos preparados de acuerdo con los métodos de infusión (previamente descrito) y decocción presentaron la formación de mucílago. La separación de éste se llevó a cabo mediante precipitación con etanol absoluto y fue eficiente en el caso de la decocción, ya que se obtuvieron 1.453 g de mucílago por cada 100 g de droga cruda contra 0.5 g de mucílago en la infusión. Ambos extractos acuosos libres de mucílago se sometieron a un proceso de reparto líquido-líquido sucesivo con hexano, acetato de etilo y diclorometano. El rendimiento de las fracciones orgánicas de la infusión fue muy bajo (menor a 10 mg por cada 100 g de droga), por lo que se realizaron sólo las decocciones y las fracciones orgánicas resultantes de los repartos con hexano (82.5 mg/100 g de planta), AcOEt (A2; 330 mg/100 g de planta) y CH₂Cl₂ (A1; 32 mg/100 g de planta), así como la obtención de una fracción solubilizada en MeOH (A3; 239 mg/100 g de planta).

El análisis cromatográfico en capa fina (CCF) usando distintos sistemas de elución permitió establecer de manera preliminar la presencia de las metoxiflavonas acacetina (**1**) y diosmetina (**2**) en las fracciones orgánicas de AcOEt (A2) y CH₂Cl₂ (A1), pero no en la de MeOH (A3). La identificación de ambas metoxiflavonas es consistente con los reportes previos de Juárez-Reyes et al. (2015). Adicionalmente, el análisis de los espectros de IR de las fracciones A1 (CH₂Cl₂), A2 (AcOEt), y de la fracción solubilizada en MeOH (A3), permitió distinguir la presencia de funcionalidades distintas en cada una de ellas. Por ejemplo, en la fracción A1 se observaron bandas de absorción en ν_{\max} 3392, 2921, 2852 y 1459 cm⁻¹, características de la presencia de grupos hidroxilo y alcanos (**Figura 11**). La fracción A2

presentó bandas de absorción en ν_{\max} 3355, 2924, 2854, 1708 cm^{-1} , características de la presencia de grupos hidroxilos, aromáticos, aldehídos y cetonas (**Figura 12**). Por último, la fracción A3 (soluble en MeOH) mostró bandas de absorción muy intensas en ν_{\max} 3329, 2925, 1651, y 1603 cm^{-1} , indicativas de la presencia de grupos hidroxilos, aromáticos, y aldehídos (**Figura 13**).

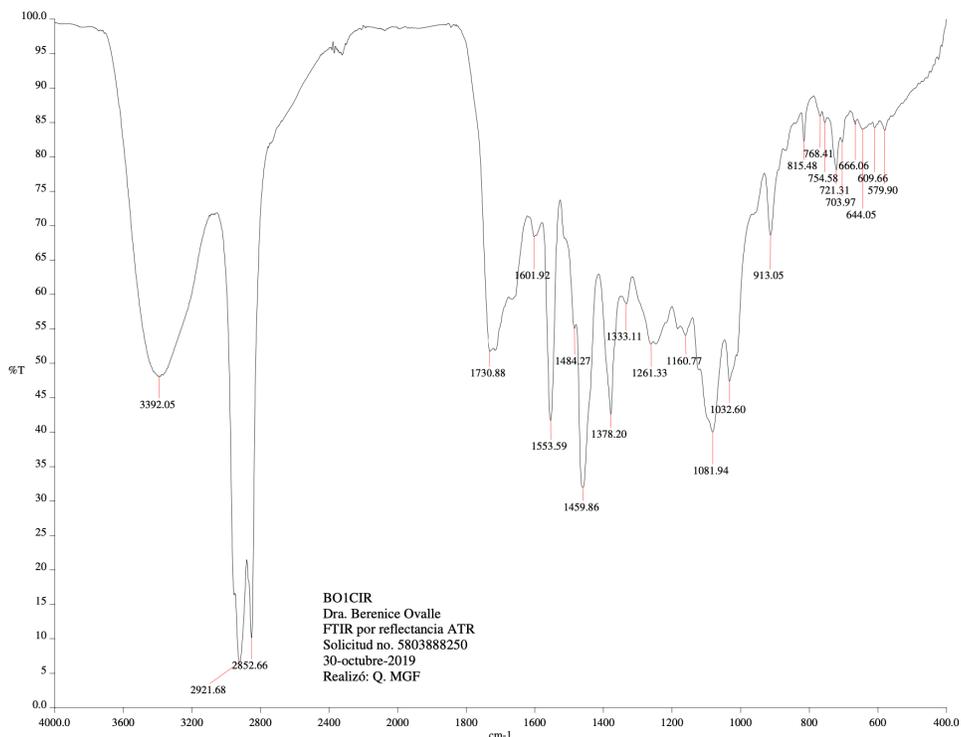


Figura 11. Espectro IR de la fracción de CH_2Cl_2 (A1) de la decocción de *A. cristata*

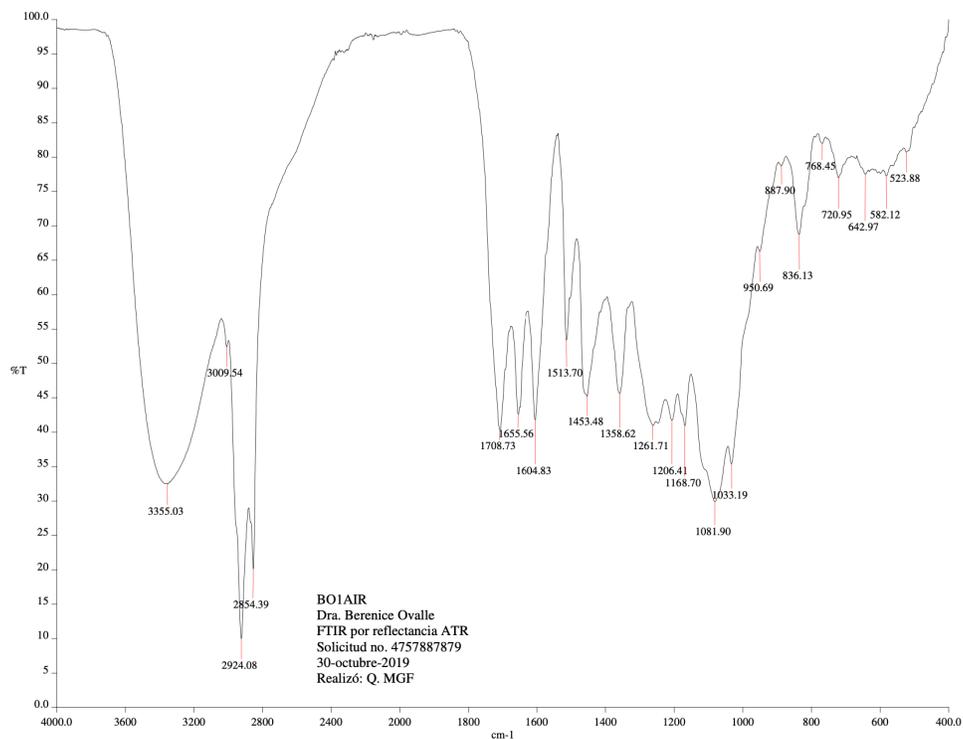


Figura 12. Espectro IR de la fracción de AcOEt (A2) de la decocción de *A. cristata*

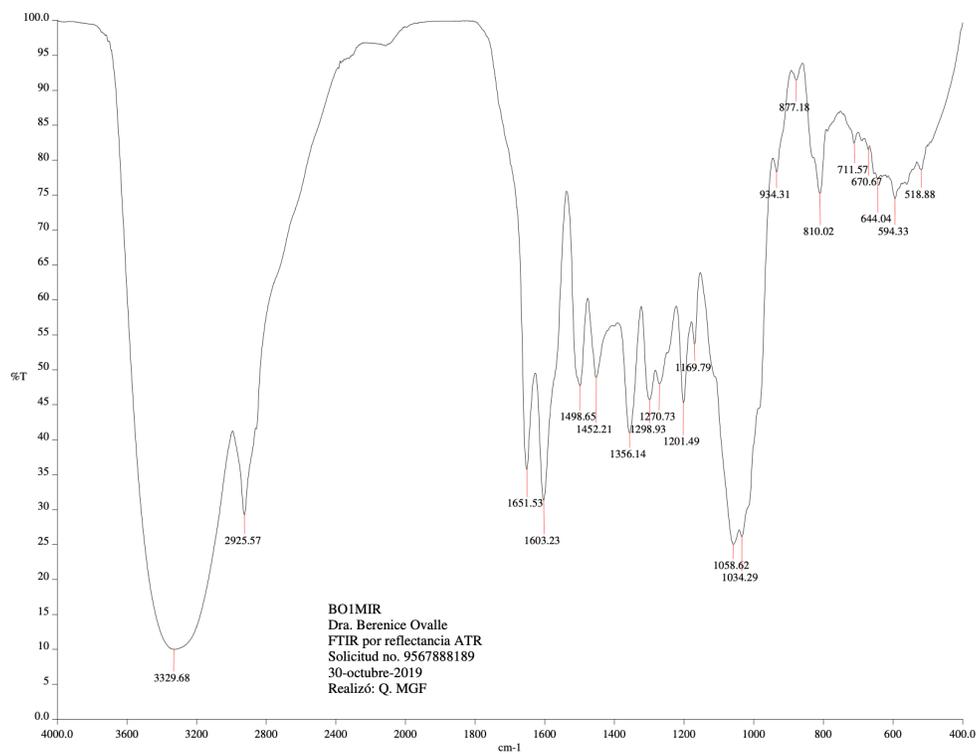


Figura 13. Espectro IR de la fracción de MeOH (A3) de la decocción de *A. cristata*

Se procedió a obtener los perfiles de las fracciones orgánicas de la decocción usando cromatografía de líquidos de ultraeficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLUE-EM; **Figura 14**). Las metoxiflavonas acetina (**1**) y la diosmetina (**2**) fueron identificadas en A1 y A2 por sus masas (284.26 g/mol y 300.26 g/mol, respectivamente), sus espectros UV ($\lambda_{\text{máx}}$ = 222.5 nm y 221 nm, respectivamente), así como por co-elución con estándares adquiridos comercialmente (**1**: t_R = 6.18 min; **2**: t_R = 5.22 min; **Figura 15 y Figura 16**). La inspección de la magnitud de las áreas bajo la curva de los picos de las metoxiflavonas **1** y **2** indicaba que éstas se encontraban en mayor cantidad en A2 que en A1.

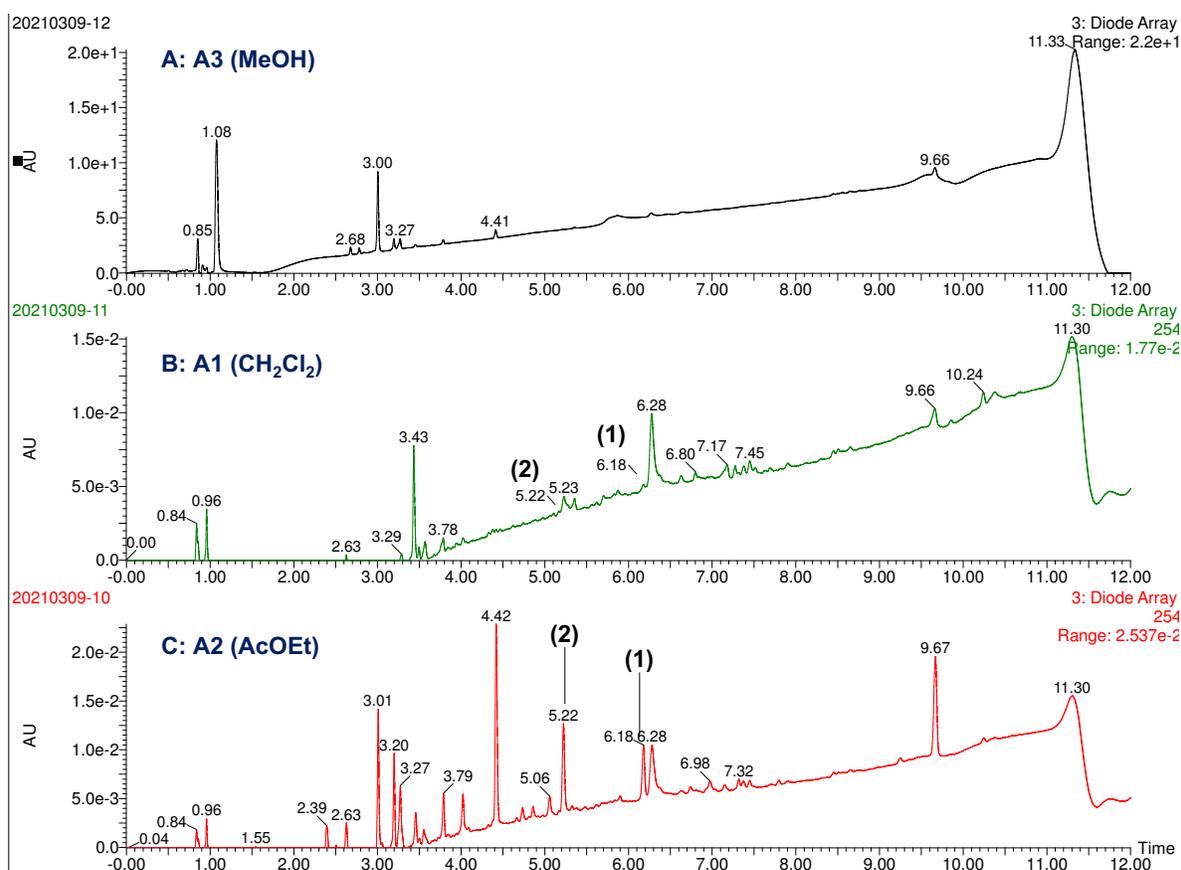


Figura 14. Cromatogramas de las fracciones orgánicas de *A. cristata* a 254 nm. Columna Acquity UPLC® BEH 18; 1.7 μm d.i.; 2.1 \times 50 mm. Velocidad de flujo 0.3 mL/min. Panel A: fracción solubilizada en MeOH (A3); panel B, fracción de CH₂Cl₂ (A1); panel C, fracción de AcOEt (A2). Acetina (**1**) y diosmetina (**2**) en t_R = 6.18 min y 5.22 min, respectivamente.

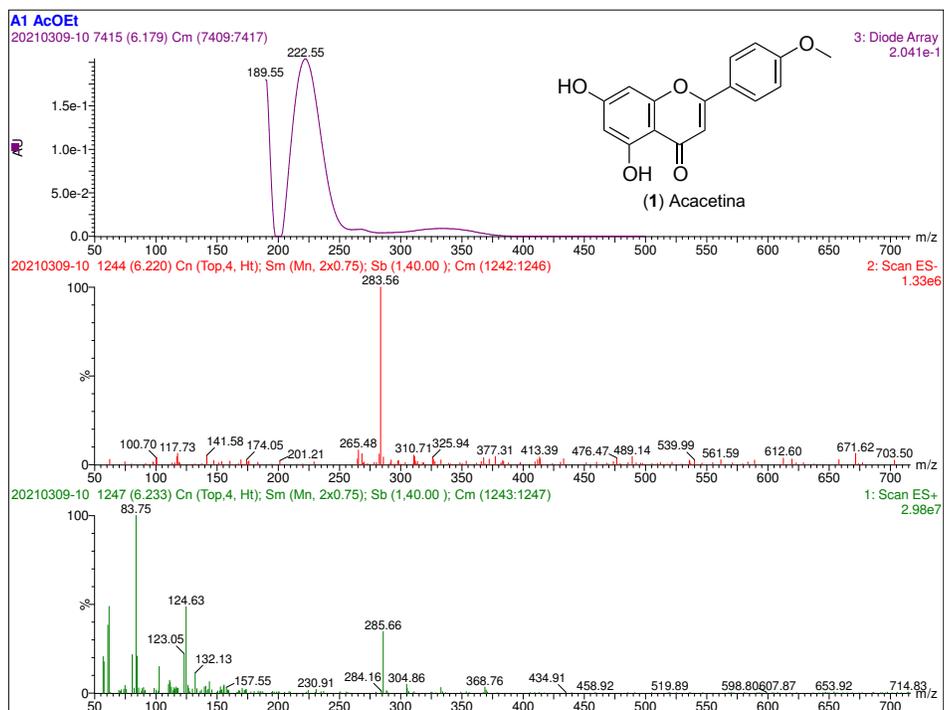


Figura 15. Espectros UV (panel superior) y de masas (ionización en modo negativo, panel medio; ionización en modo positivo, panel inferior) de la acetina (1).

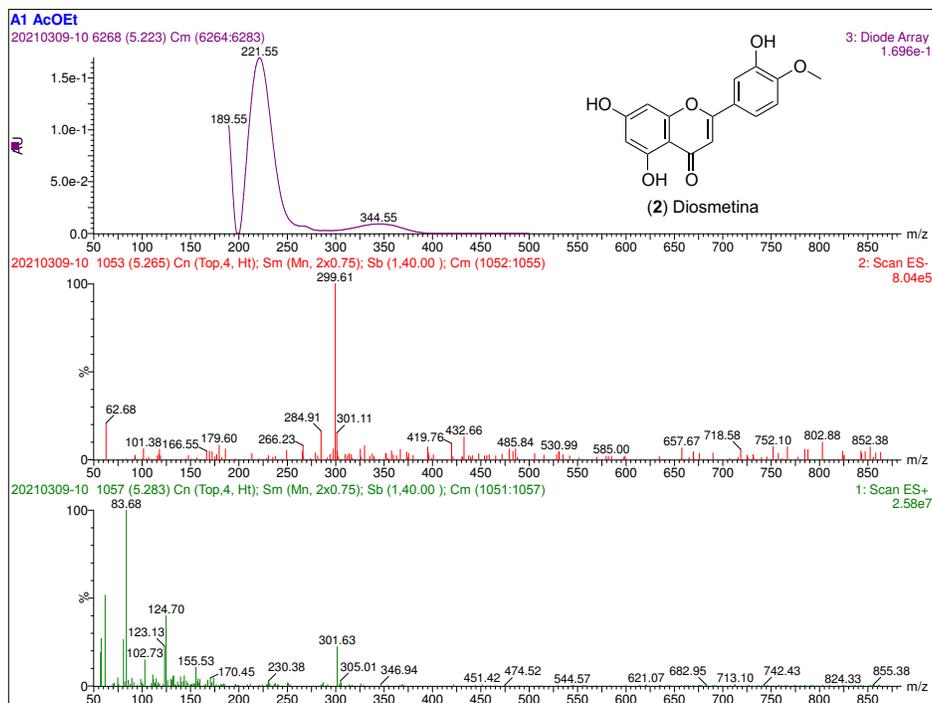


Figura 16. Espectros UV (panel superior) y de masas (ionización en modo negativo, panel medio; ionización en modo positivo, panel inferior) de la diosmetina (2).

Como puede apreciarse en los cromatogramas, cada fracción tiene un perfil de composición distinto, y cada una tiene un compuesto mayoritario. Para la fracción A1 (CH₂Cl₂) el pico mayoritario fue aquél en $t_R = 3.43$ min (m/z 651.3), el de la fracción A2 (AcOEt) fue el pico en $t_R = 4.42$ min (m/z 594.15) y el de la fracción A3 (MeOH) se ubicaba en $t_R = 3.01$ min (m/z 609.52). Todos estos compuestos son más polares que las metoxiflavonas **1** y **2** y también tienen más masa, lo cual indica que posiblemente se trata de componentes glicosilados.

De hecho, el espectro de masas del compuesto mayoritario de la fracción A3 ($t_R = 3.01$ min) obtenido mediante la técnica de ionización por electrospray en modo negativo (**Figura 17**) mostró un ion en un valor de m/z de 609.52, que permitió establecer una fórmula molecular de C₂₇H₃₀O₁₆.

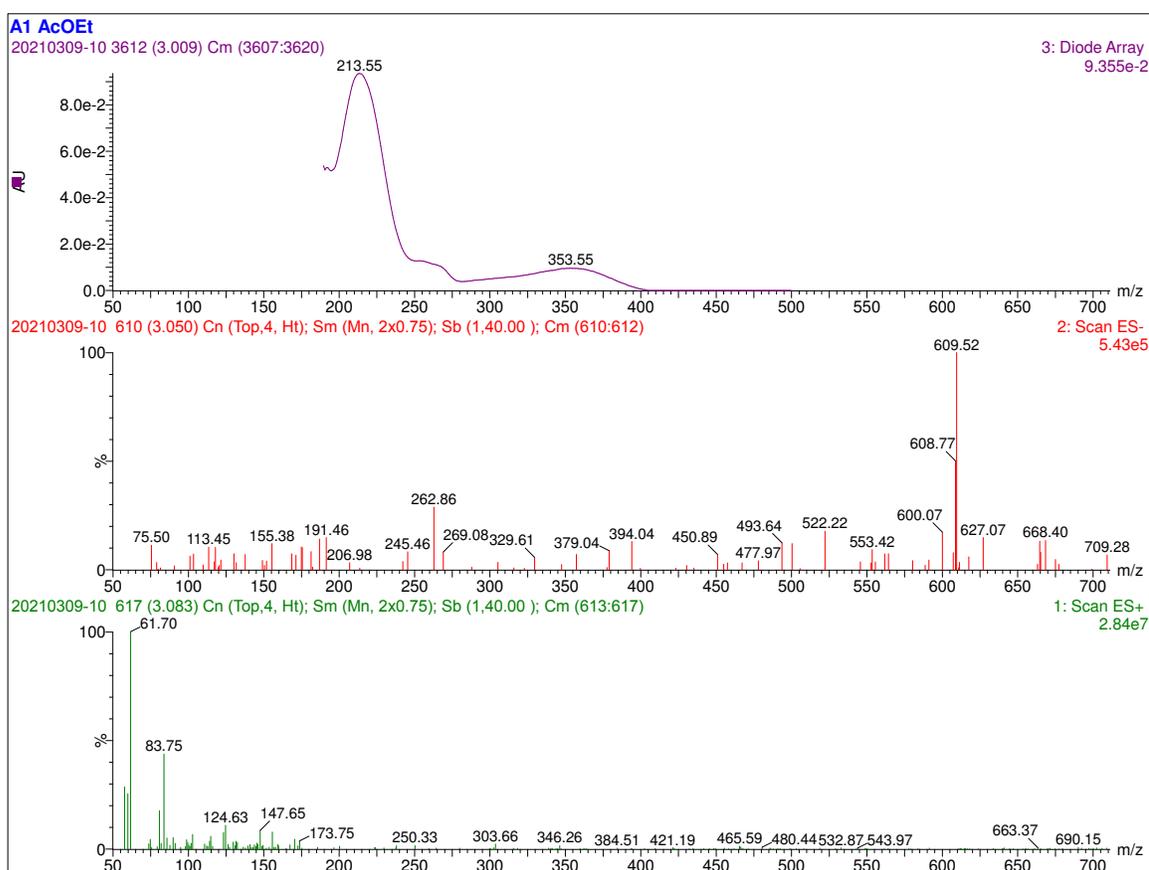


Figura 17. Espectros UV (panel superior) y de masas (ionización en modo negativo, panel medio; ionización en modo positivo, panel inferior) del compuesto mayoritario de la fracción solubilizada en MeOH (A3)

El análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de la fracción soluble de MeOH A3 permitió identificar señales que indicaron la presencia de un derivado de la 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona como uno de los compuestos mayoritarios en la fracción.

El espectro ^1H -RMN (**Figura 19**) mostró señales en la región de los aromáticos con un desplazamiento de δ_{H} 6.39 (d, $J = 2.1$ Hz), 6.20 (d, $J = 2.1$ Hz), asignables a los protones del anillo A, H-8 y H-6 respectivamente, ambos con una constante de acoplamiento que indicó su posición en meta. Adicionalmente se observó la presencia de un sistema ABX que corresponde a los protones H-2', H-6' y H-5' del anillo B [δ_{H} 7.66 (d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.62 (dd, $J = 2.2, 8.5$ Hz, H-6'), 6.86 (d, $J = 8.5$ Hz, H-5')]. Se identificó la presencia de un protón anomérico con una constante de acoplamiento que indica la configuración β del mismo [δ_{H} 5.09 (d, $J = 7.8$ Hz)], sugiriendo la presencia de al menos un residuo glicosídico. Finalmente se identificó un singulete con un desplazamiento en δ_{H} 3.63 que plantea la presencia de un grupo metoxilo. El conjunto de todas estas señales propone la presencia de un núcleo de 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona con residuos glicosilados. Por otra parte, el análisis de RMN- ^{13}C (**Figura 20**) permitió identificar un grupo carbonilo asignable al carbono C-4 con un desplazamiento en δ_{C} 179.4, así como señales con desplazamientos entre δ_{C} 166.1 y 104.7 que corresponden a los carbonos de los núcleos A, B y C de la molécula. Además, se identificó un carbono anomérico (δ_{C} 102.4), y una serie de señales con desplazamiento entre δ_{C} 78.2 y 68.5, atribuibles a los protones de los residuos glicosídicos. El análisis conjunto de todos los espectros obtenidos durante la presente investigación, así como los datos reportados en la literatura (Bueno et al., 2016; Hassan et al., 2019; Wang et al., 2012) sugieren que la fracción solubilizada en MeOH (A3) tiene como compuesto mayoritario un derivado glicosilado de la 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona (**Figura 18**).

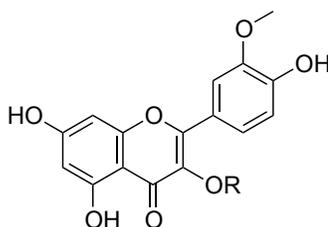


Figura 18. Estructura de la 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona. R=residuo glicosídico

RMN- ^1H (400 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d$) δ_{H} (ppm) 7.66 (d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.62 (dd, $J = 2.2, 8.5$ Hz, H-6'), 6.86 (d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.39 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.20 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.09 (d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.63 (s, OCH_3).

RMN- ^{13}C (100 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d$) δ_{C} (ppm) 179.4 (C-4), 166.1 (C-7), 163 (C-5), 159.4 (C-9), 158.5 (C-2), 149.8 (C-4'), 145.8 (C-5'), 135.6 (C-3), 123.5 (C-2'), 123.1 (C-1'), 117.7 (C-3'), 116 (C-6'), 104.7 (C-8a), 102.4 (C-1''), 100 (C-6), 94.9 (C-8).

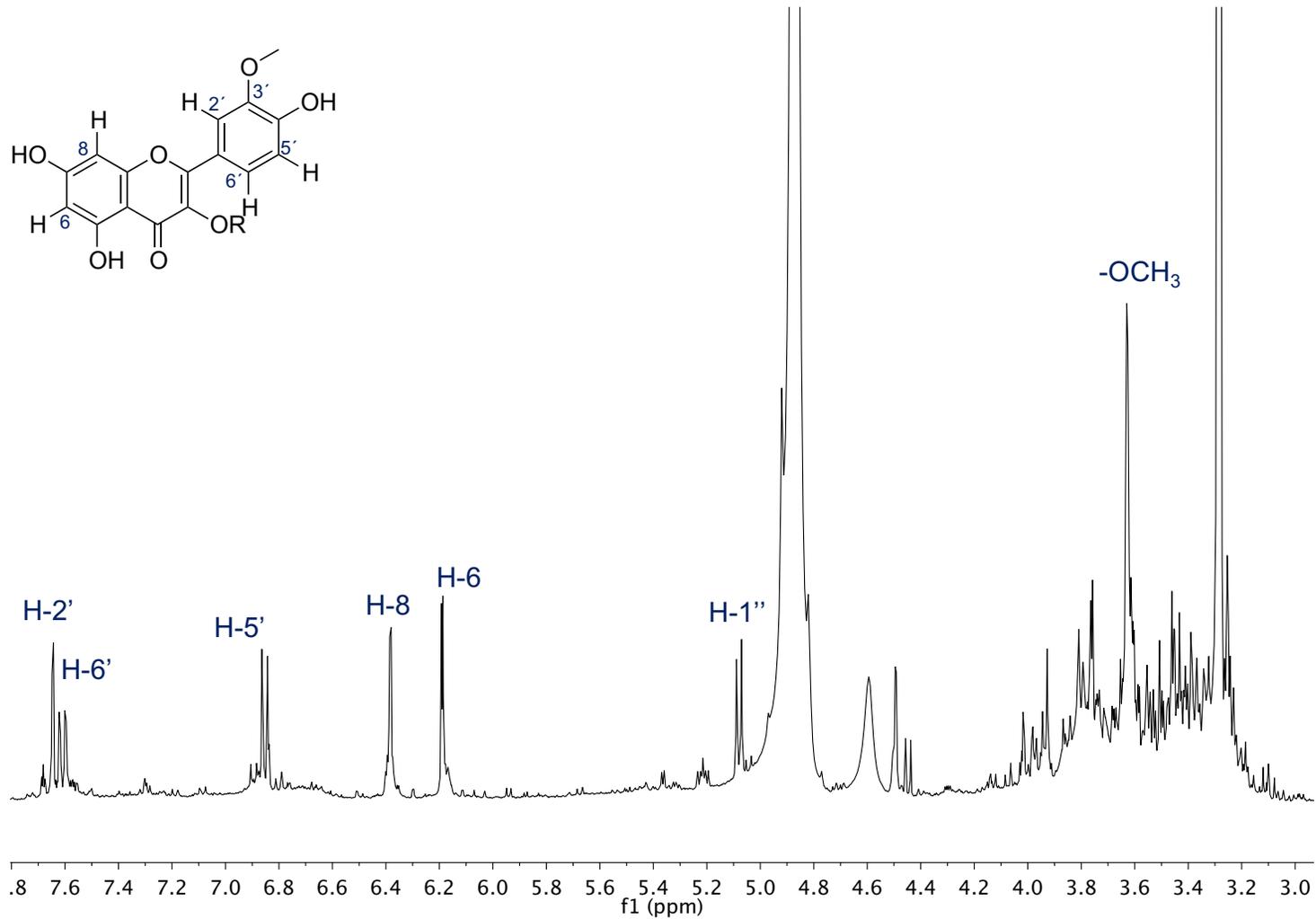


Figura 19. Espectro ¹H-RMN de la fracción A3 en CH₃OH-*d* (400 MHz)

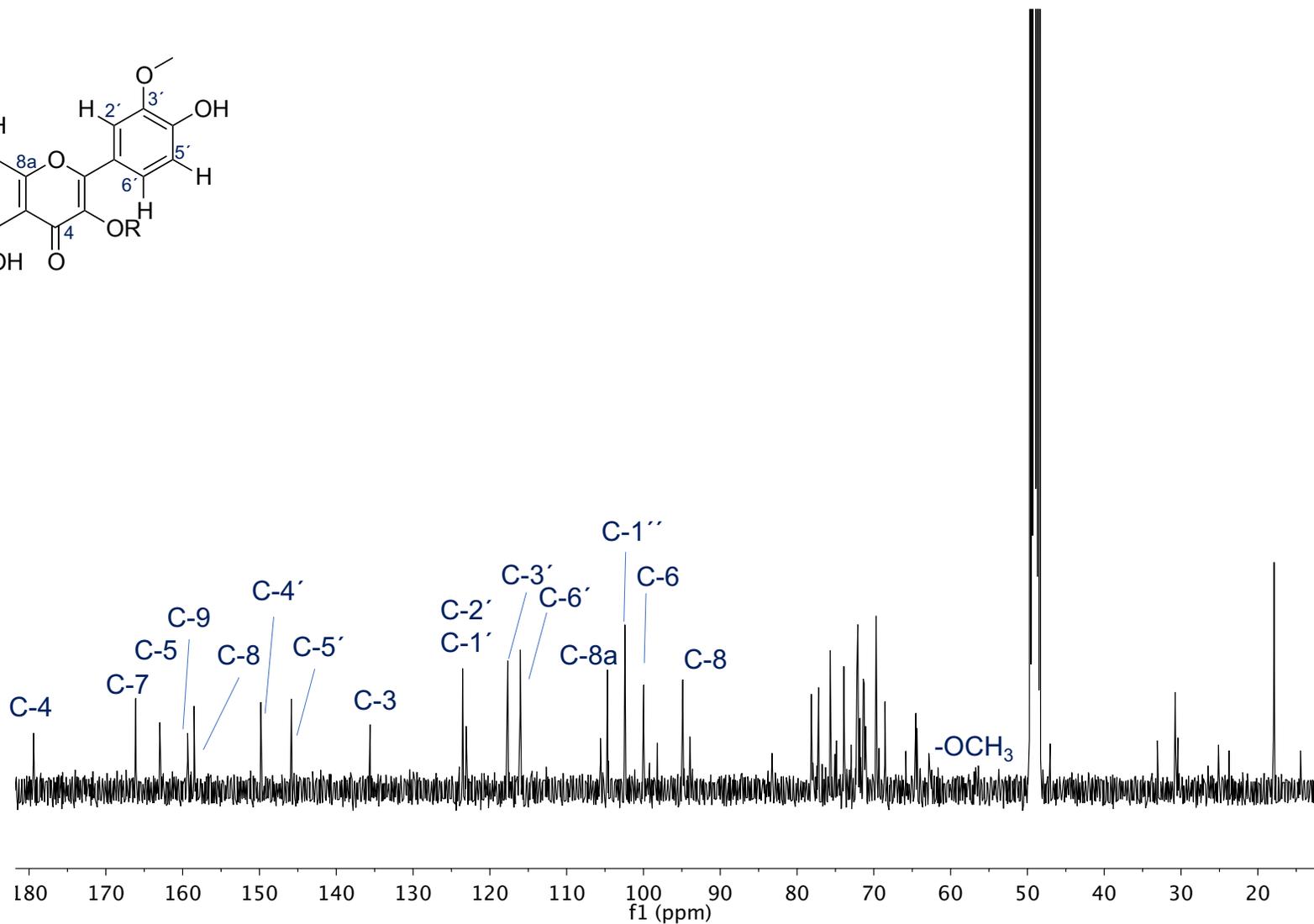
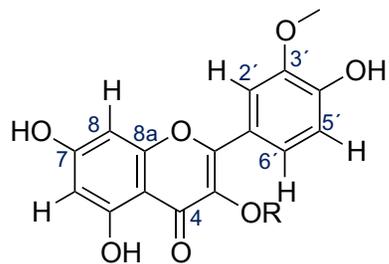


Figura 20. Espectro ^{13}C -RMN de la fracción A3 en $\text{CH}_3\text{OH-d}$ (100 MHz)

Resultó entonces de interés aislar los componentes de la fracción solubilizada en MeOH. Para ello se aplicó la técnica de cromatografía en columna abierta usando como soporte Sephadex LH-20, de acuerdo con lo resumido en la **Diagrama 4**.

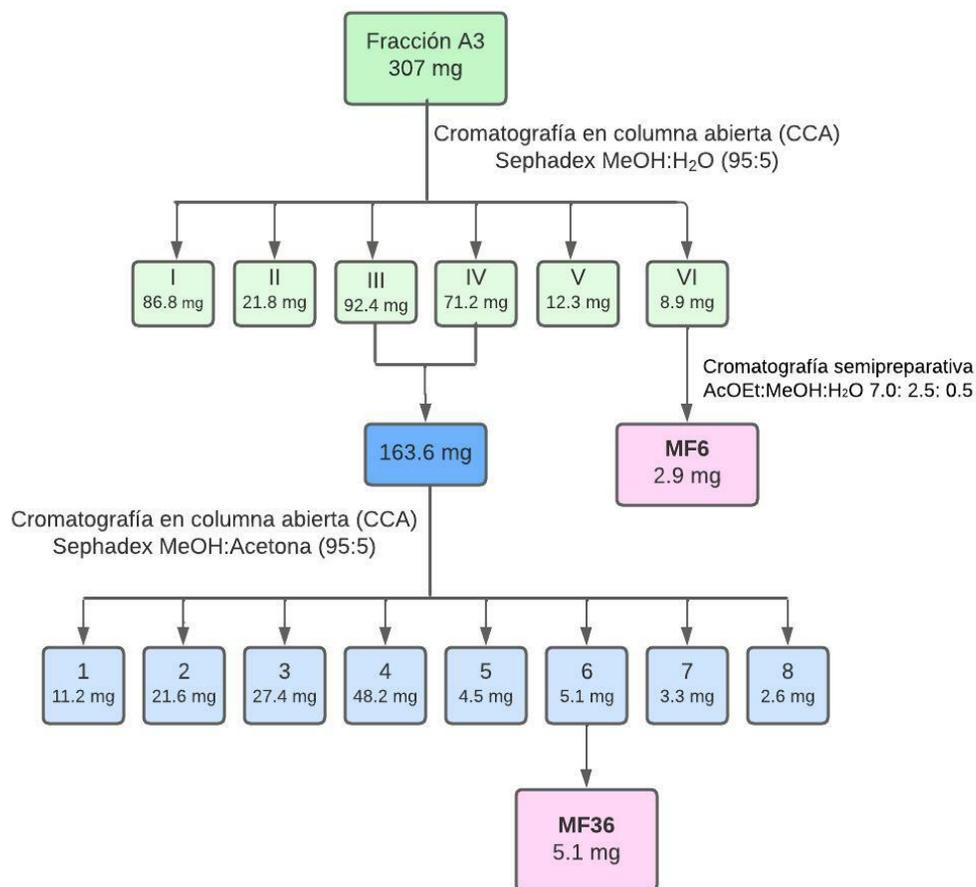


Diagrama 4. Separación de los componentes bioactivos de A3.

Desafortunadamente, los espectros de ^1H y ^{13}C de las muestras etiquetadas como MF6 y MF36 no fueron adecuados para proponer las estructuras de los compuestos. El espectro de ^1H (**Figura 21**) mostraba múltiples señales que no se pudieron asignar a algún núcleo conocido; el espectro de ^{13}C no mostró señales suficientes que correlacionaran con el número de hidrógenos observados (**Figura 22**). En el caso de la muestra etiquetada como MF36, el análisis de los espectros de ^1H y ^{13}C (**Figuras 23 y 24**) sugirió la presencia de más de un compuesto. Sin embargo, no fue posible asignar una estructura congruente con las señales observadas. Queda como trabajo pendiente volver a aislar estos compuestos y analizarlos empleando otros disolventes, como DMSO deuterado.

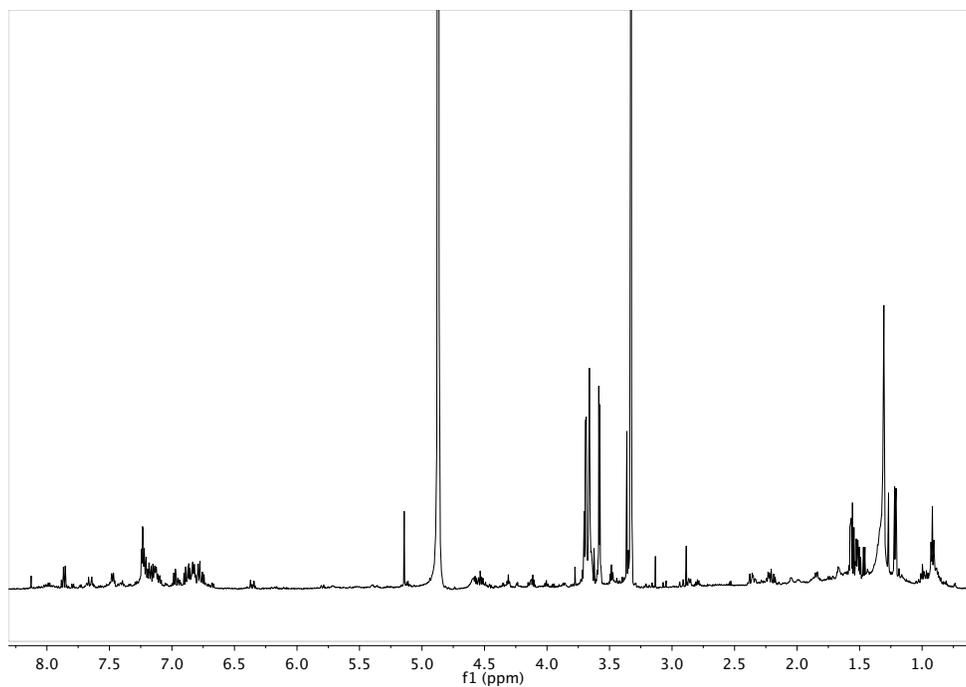


Figura 21. Espectro ^1H -RMN de la muestra MF6 en $\text{CH}_3\text{OH}-d$ (400 MHz).

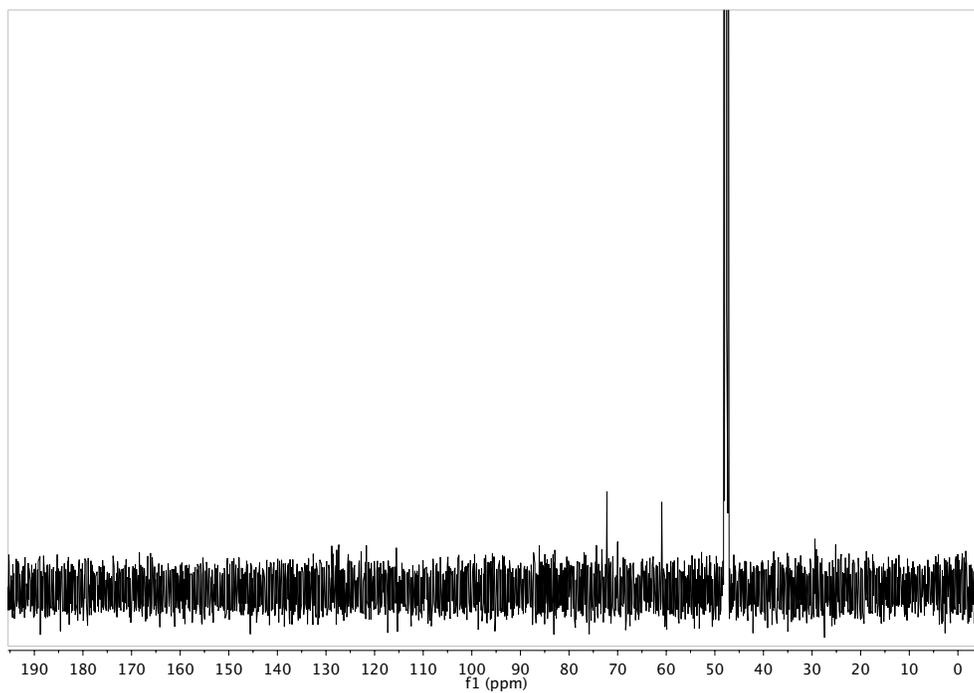


Figura 22. Espectro ^{13}C -RMN de la muestra MF6 en $\text{CH}_3\text{OH}-d$ (100 MHz).

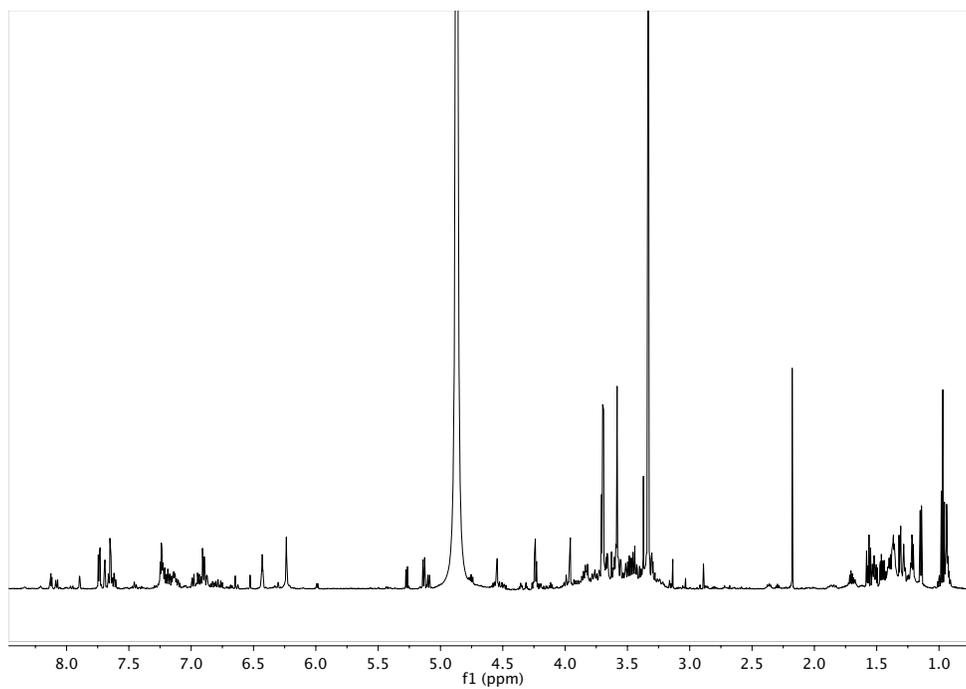


Figura 23. Espectro ^1H -RMN de la muestra MF36 en $\text{CH}_3\text{OH-}d$ (400 MHz).

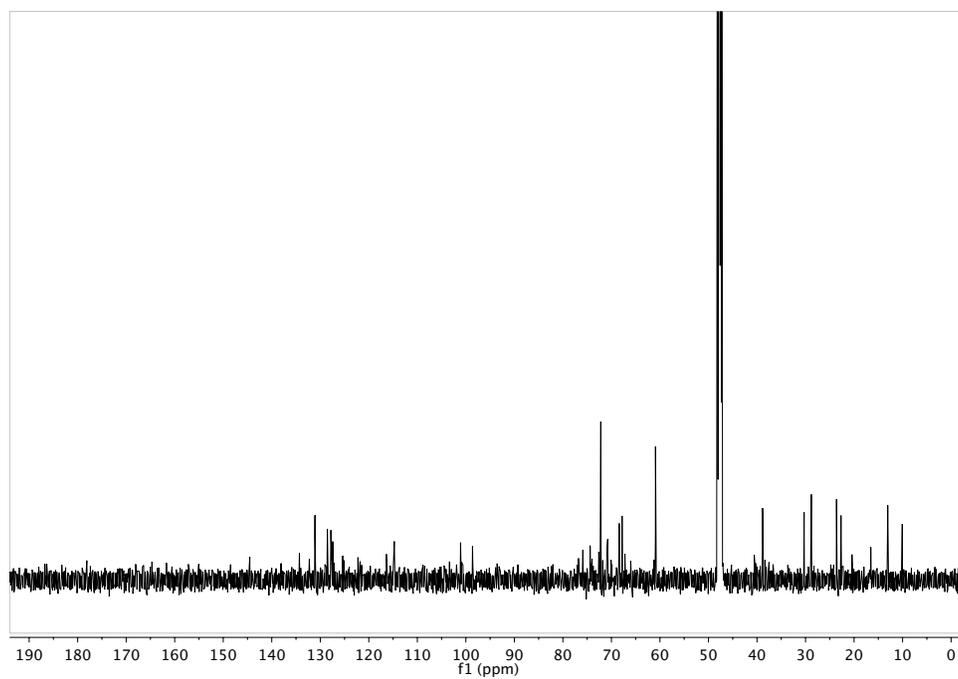


Figura 24. Espectro ^{13}C -RMN de la muestra MF36 en $\text{CH}_3\text{OH-}d$ (100 MHz).

6.2 Evaluación farmacológica

Las evaluaciones farmacológicas que se describen a continuación se realizaron considerando dos aspectos de la homeostasis de la glucosa: 1) la absorción de carbohidratos a nivel intestinal y 2) la regulación de las acciones metabólicas de la insulina (a nivel del receptor y a nivel hepático), partiendo de la premisa que hay más de un compuesto activo responsable de la actividad antidiabética de la especie, y que mediante el fraccionamiento biodirigido se puede detectar a los compuestos responsables de dichas acciones.

6.2.1 Ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa (α GHY) *in vitro*

Las enzimas α -glucosidasas intestinales son las encargadas de hidrolizar los carbohidratos complejos a unidades sencillas que se pueden absorber y utilizar en los procesos metabólicos. Estas enzimas contribuyen a la elevación de la glucemia postprandial y son uno de los blancos farmacológicos de primera línea para el tratamiento de la prediabetes, la resistencia a la insulina y la obesidad (Reyes Olivares & Arellano Plancarte, 2008). Las fracciones orgánicas derivadas de la decocción, A1 (CH_2Cl_2), A2 (AcOEt) y A3 (MeOH) inhibieron a la enzima α -glucosidasa de levadura a dos concentraciones. Por su parte, la fracción A1 inhibió $60.24 \pm 5.60\%$ y $57.28 \pm 4.60\%$ (200 y 1000 ppm, respectivamente) a la enzima; A2 la inhibió en un $79.86 \pm 3.20\%$ y $111.03 \pm 7.75\%$ (200 y 1000 ppm, respectivamente); y la fracción A3, en un $107.5 \pm 25.50\%$ y $131.7 \pm 20.40\%$ (200 y 1000 ppm, respectivamente). En este ensayo se usó acarbosa 30 mM como control positivo (inhibición $86.97 \pm 1.56\%$). Estos resultados explican los hallazgos previos *in vivo*: el efecto antihiper glucémico en una prueba de tolerancia a la sacarosa oral (Juárez-Reyes et al., 2015) se debe a la inhibición de las enzimas α -glucosidasas intestinales, por lo que los componentes de la especie retrasan la absorción intestinal de glucosa. Aunque las tres fracciones fueron activas, la de AcOEt (A2) tuvo el mejor perfil de actividad. De acuerdo con la revisión bibliográfica efectuada, ninguna otra especie del género *Anoda* ha sido evaluada como inhibidora de estas enzimas. Del análisis CLUE-EM se puede atribuir parte de esta actividad a la acetina (1) y a la diosmetina (2), que fueron identificadas en las fracciones A1 y A2.

Tabla 3. Resultados del ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa de levadura (α GHY)

	Porcentaje de inhibición	
	200 ppm	1000 ppm
Acarbosa, control positivo 30 mM	86.97 \pm 1.56	
Fracción A1 (CH_2Cl_2)	60.24 \pm 5.60	57.28 \pm 4.60
Fracción A2 (AcOEt)	79.86 \pm 3.20	111.03 \pm 7.75
Fracción A3 (MeOH)	107.5 \pm 25.50	131.7 \pm 20.40

Se ha descrito en la literatura que la acacetina (**1**) es un inhibidor de tipo mixto que es más potente que la acarbosa, pero los valores de CI_{50} reportados en la literatura difieren entre sí. Un reporte indica que la CI_{50} de esta flavona es $0.16 \mu M$ (respecto a $1.7 \mu M$ de la acarbosa) (Yin et al., 2014) y otro reporte muestra que su CI_{50} es mayor a $100 \mu M$ (respecto a la acarbosa $CI_{50} = 236.5 \pm 10.72 \mu M$) (Chen et al., 2019). Este también es el caso de la diosmetina (**2**) para la cual hay dos valores de CI_{50} reportados. Un artículo indica que la CI_{50} es igual a $22.764 \mu M$ (Cheng et al., 2014) y otro que la CI_{50} es $46.45 \pm 6.81 \mu M$ (M. Chen et al., 2019)]. Sin embargo, ambos reportes coinciden en que la diosmetina es un inhibidor más potente que la acarbosa (CI_{50} de la acarbosa = $563.601 \mu M$ (Cheng et al., 2014) y CI_{50} de la acarbosa = $236.5 \pm 10.72 \mu M$) (Chen et al., 2019). Estas diferencias pueden atribuirse a posibles variaciones en la experimentación, en particular, en la actividad catalítica alcanzada por la solución de enzima empleada en tales ensayos. No obstante, es evidente que ambas metoxiflavonas, contenidas en la fracción orgánica de AcOEt de la decocción de *A. cristata* son potentes inhibidoras de las enzimas α -glucosidasas, lo cual explica su efecto antihiper glucémico *in vivo* y el potencial que tiene la decocción de la especie (en su forma de quelite) para reducir la glucemia postprandial asociada a las dietas altas en carbohidratos, como es en el caso de México. Resta por aislar y evaluar al componente mayoritario de esta fracción para verificar su contribución al efecto inhibitorio demostrado.

6.2.2 Ensayo de inhibición de la enzima proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) *in vitro*

Tras la absorción de glucosa a nivel intestinal y su distribución en los tejidos, las células beta pancreáticas sienten el incremento en la glucemia, y el ATP, producto de la glucólisis, induce la secreción de insulina. Esta hormona es liberada al torrente sanguíneo y desencadena sus acciones metabólicas al unirse a su receptor que es de tipo tirosina-cinasa. El receptor se autofosforila y da lugar a múltiples eventos de fosforilación sucesivos, que culminan en varias acciones metabólicas, como lo son el transporte de glucosa, la síntesis de glucógeno y la síntesis de proteínas. La DM2 se caracteriza por resistencia a la insulina, y muchas de las estrategias farmacológicas antidiabéticas más utilizadas están encaminadas a incrementar los niveles de insulina para reducir la hiperglucemia basal y postprandial, pero este mecanismo puede estresar a las células beta pancreáticas y producir citotoxicidad. Por ello, los fármacos que reducen la resistencia a la insulina suelen ser más eficaces en el control glucémico a largo plazo que los secretagogos. Puesto que la inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) reduce la resistencia a la insulina al inactivar la defosforilación del receptor de insulina e incrementar sus acciones metabólicas, se le considera uno blanco terapéutico de interés para tratar la obesidad y la diabetes (Montalibet & Kennedy, 2005).

La evidencia experimental previa para *A. cristata* demostraba que los extractos acuosos (con y sin mucílago) eran antihiper glucémicos en una prueba de tolerancia oral a la glucosa en ratones normoglucémicos e hiper glucémicos (nicotinamida-estreptozotocina) y en ratas con síndrome metabólico inducido con fructosa (Juárez-Reyes et al., 2015). En la presente investigación se buscó contestar si dichos efectos de reducción del pico

postprandial pudieran explicarse con la inhibición de la PTP1B, lo cual daría lugar a acciones aumentadas de la insulina, entre ellas, un aumento en la captación de glucosa con la consecuente hipoglucemia. Bajo las condiciones experimentales que se llevaron a cabo (descritas en la sección experimental 5.3.2), las fracciones A2 (AcOEt) y A3 (MeOH) precipitaron en la mezcla de reacción (buffer Tris y DMSO), por lo que sólo se obtuvieron resultados para la fracción A1 (CH₂Cl₂). Esta fracción orgánica fue muy activa: a 200 ppm se alcanzó una inhibición de 99.8 ± 1.6 % y a 1000 ppm, 112.6 ± 8.4%. En este ensayo se usó control positivo ácido ursólico 1 mM (Cl₅₀ 0.038 mM). Una vez más, el análisis CLUE-EM dio cuenta de la presencia de acacetina (**1**) y diosmetina (**2**) como componentes minoritarios de dicha fracción, los cuales tienen reportes como inhibidores de PTP1B, aunque los valores descritos en la literatura difieren entre sí.

Tabla 4. Resultados del ensayo de inhibición de PTP1B

	Porcentaje de inhibición (%)	
Ácido ursólico, control positivo 1 mM	89.6 ± 0.3	
	200 ppm	1000 ppm
Fracción A1(CH₂Cl₂)	99.8 ± 1.6	112.6 ± 8.4

Por ejemplo, un reporte de Proença et al. (2018) demostró que la acacetina (**1**) es un inhibidor de la enzima PTP1B, su Cl₅₀ fue de 91 ± 7 µM. Comparado con el ácido ursólico (Cl₅₀ = 7.1 ± 0.9 µM, control positivo), la acacetina es un inhibidor menos potente (Proença et al., 2018). Por otra parte, y según el reporte de Chen et al. (2019), la acacetina sí inhibe a la PTP1B, pero no alcanza el 50% de dicha inhibición; las concentraciones de 1, 5 y 20 µM de acacetina apenas alcanzan un 30% de inhibición. La diosmetina (**2**) también muestra una inhibición menor al 30%, independientemente de la concentración evaluada (1,5 y 20 µM) (Chen et al., 2019). Por tanto, es muy probable que el metabolito más activo de la fracción A1 sea también otra metoxiflavona, pues en su perfil cromatográfico por UPLC hay un compuesto en tiempo de retención 6.28 min que tiene un espectro UV muy similar al de las metoxiflavonas **1** y **2** (Figura 25).

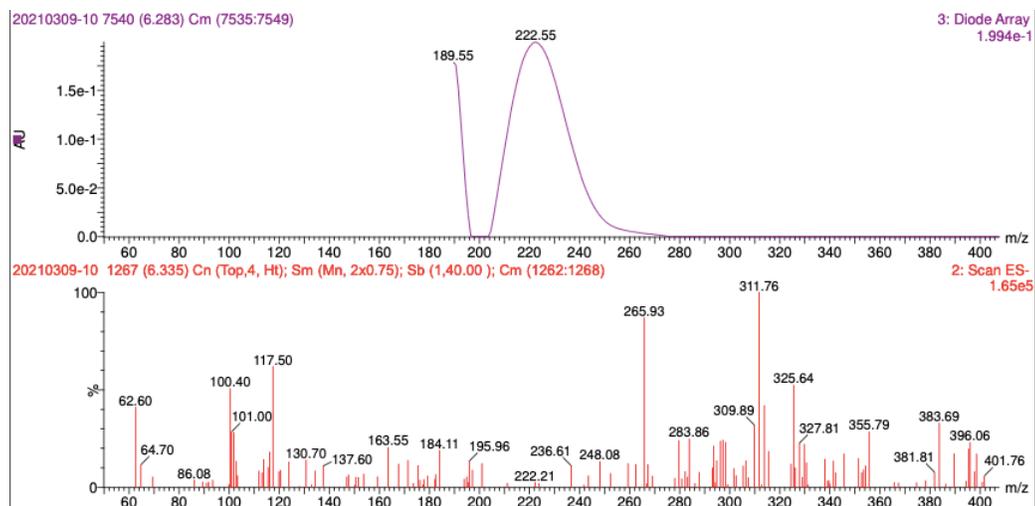


Figura 25. Espectro UV (panel superior) y de masas (ionización en modo negativo, panel inferior) del compuesto en tiempo de retención 6.28 minutos.

Puesto que ninguna otra especie del género *Anoda* tiene investigaciones similares, resulta pertinente continuar con la investigación química de dicha fracción, orientada exclusivamente al descubrimiento de moléculas inhibitoras de PTP1B.

6.2.3 Ensayos basados en células

Los ensayos basados en células que se realizaron en esta re-investigación constituyen un aporte inédito al descubrimiento de moléculas antidiabéticas que actúan a través de dianas moleculares novedosas, como lo es la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), que controla la salida de glucosa del hígado en condiciones normales y en estados patológicos como la obesidad y la diabetes. El primer paso que se llevó a cabo fue la determinación de la toxicidad de las fracciones orgánicas derivadas de la decocción de *A. cristata* en la línea celular H4IIE (hepatoma de rata), utilizando el método de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

6.2.3.1 Determinación del potencial citotóxico de las fracciones orgánicas de la decocción en hepatocitos

La citotoxicidad es una manifestación del daño que provoca una sustancia a las células a distintos niveles (nuclear, mitocondrial o membranar), que puede derivar en la muerte celular. Uno de los parámetros relacionados con la muerte celular es la integridad de la membrana celular, la cual puede determinarse midiendo la presencia de enzimas citoplasmáticas en los medios de cultivo; éste es el caso de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), que se libera al medio extracelular cuando existe un daño en la membrana celular (Weyermann et al., 2005). El ensayo enzimático que se usó en este trabajo se basa en dos etapas. En la primera, la LDH cataliza la conversión de lactato a piruvato mediante la reducción de NAD^+ a NADH/H^+ . En la segunda, el catalizador

(diaforasa) transfiere H/H^+ del $NADH/H^+$ al cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT, sal de tetrazolio), que es reducido a formazán rojo, y que se cuantifica espectrofotométricamente a 492 nm. Por lo tanto, a mayor cantidad de LDH cuantificada, mayor daño membranal y mayor citotoxicidad.

Se determinó que la fracción A1 (CH_2Cl_2) fue tóxica en todas las concentraciones evaluadas (10-562 $\mu g/mL$), que la toxicidad de la fracción A2 (AcOEt) fue concentración-dependiente (10-562 $\mu g/mL$), y que la fracción A3 (MeOH) inducía entre 11.1 y 50 % de muerte celular también de modo concentración-dependiente (**Figura 26**).

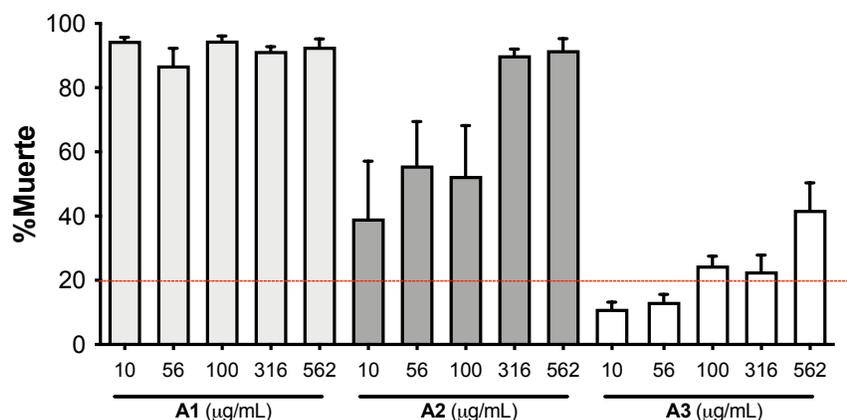


Figura 26. Determinación del potencial citotóxico en hepatocitos H4IIE.

A1: fracción de CH_2Cl_2 ; A2: fracción de AcOEt; A3: fracción solubilizada en MeOH. Cada barra es el promedio de $n \pm EEM$ de tres pases independientes con duplicados.

Los análisis cromatográficos realizados para las fracciones A1 (CH_2Cl_2) y A2 (AcOEt) permitieron identificar la presencia de las metoxiflavonas acacetina (**1**) y diosmetina (**2**) como compuestos minoritarios de las mismas; en la fracción A3 (MeOH) no se detectó la presencia de estas metoxiflavonas. Los mecanismos de citotoxicidad observada en las fracciones A1, A2 y A3 deberán asociarse con los metabolitos presentes en ellas, una vez que éstos sean aislados e identificados.

Por otra parte, y debido a que se contaba con cantidad suficiente de las metoxiflavonas (**1**) y (**2**) para su evaluación en los modelos celulares, se realizó la curva concentración-respuesta de ambas (5.62 - 56.2 μM) y se determinó su citotoxicidad relacionada con la liberación de LDH. Fue muy interesante observar que la viabilidad celular no se redujo más de 80% en ninguna de las concentraciones evaluadas, el límite máximo establecido por nuestro grupo de trabajo (**Figura 27**). Por tanto, la CI_{50} de las flavonas en este modelo de células H4IIE es superior a 56.2 μM .

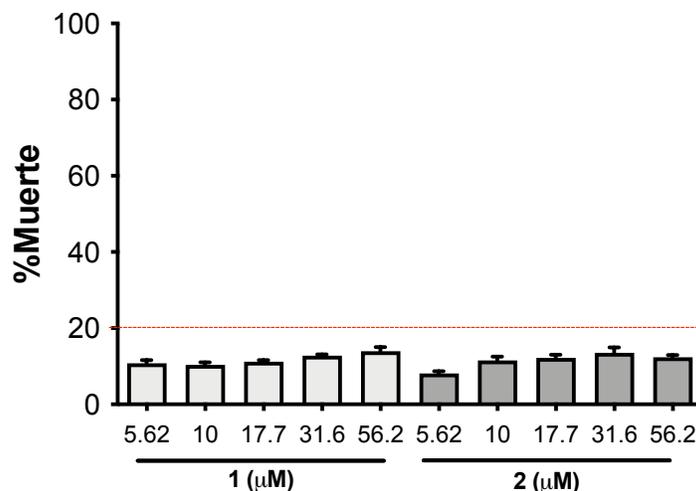


Figura 27. Determinación del potencial citotóxico de la acacetina (1) y de la diosmetina (2) en hepatocitos H4IIE.

Cada barra es el promedio de $n \pm$ EEM de tres pases independientes con duplicados.

Sin embargo, hay múltiples reportes de la citotoxicidad de estas metoxiflavonas en líneas celulares de cáncer, cuyos valores de inhibición media dependen del tipo de célula y del tiempo de exposición. Por ejemplo, se ha determinado citotoxicidad moderada de la acacetina (1) en las líneas celulares humanas hepáticas (HepG2, $CI_{50} = 89.22 \mu M$), de carcinoma renal (A498, $CI_{50} > 200 \mu M$), carcinoma escamoso oral (HSC-3, $CI_{50} = 25 \mu M$), cáncer cervical (HeLa, $CI_{50} = 174 \mu M$), y en líneas de ratón (B16, piel $CI_{50} < 50 \mu M$; Lewis, pulmón $CI_{50} < 50 \mu M$) (Semwal et al., 2019). Por su parte, se ha determinado que la diosmetina (2) también es citotóxica en las líneas celulares MG-63 (osteosarcoma humano, $CI_{50} > 100 \mu M$) y HepG2 ($CI_{50} = 30 \mu M$) (V. P. Androutsopoulos & Spandidos, 2013; Martins et al., 2016), pero en otros modelos, como en cultivos de hepatocitos primarios, (2) tiene un efecto citoprotector frente al daño inducido por el estolato de eritromicina (daño a nivel membranal) y el daño oxidativo causado por *tert*-butil-hidroperóxido (Villa et al., 1992). Estos resultados opuestos se explican con el efecto de hormesis antioxidante-prooxidante inducido por los flavonoides (Calabrese et al., 2021), de manera que a ciertas concentraciones puede observarse un efecto citoprotector y a otras, citotóxico.

6.2.3.2 Ensayo de inhibición de la enzima glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) en hepatocitos

La hiperglucemia característica de la DM2 se explica en gran medida por un incremento en la producción de glucosa hepática; por lo tanto, los inhibidores de enzimas involucradas en la glucogenólisis o en la gluconeogénesis son blancos terapéuticos potenciales para el desarrollo de alternativas farmacológicas para el tratamiento de esta enfermedad. La diana en la que se centra esta parte de la investigación es la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), una enzima de distribución principalmente hepática que cataliza el paso final de la

glucogenólisis y la gluconeogénesis, ya que convierte glucosa-6-fosfato (G6P) en glucosa. Se ha descrito que la velocidad de hidrólisis de G6P y la consecuente salida de glucosa del hígado está incrementada en la DM2 (McCormack et al., 2001), por lo que la estrategia farmacológica de reducir la liberación hepática de glucosa resultó de interés, para lo cual se seleccionó un ensayo basado en células hepáticas H4IIE previamente estandarizado (Nachar et al., 2017; Naz et al., 2020; Ovalle-Magallanes et al., 2019). En la metodología que se siguió, las células tratadas con los extractos y/o compuestos reciben glucosa-6-fosfato (200 mM) de manera exógena en un medio libre de glucosa; posteriormente se cuantifica la glucosa presente en el medio empleando el método de glucosa oxidasa, y determinando la concentración de glucosa a 505 nm. Por lo tanto, a mayor inhibición enzimática, la glucosa cuantificada será menor.

Como se describió anteriormente, las fracciones A1 (CH₂Cl₂) y A2 (AcOEt) resultaron ser citotóxicas en las concentraciones evaluadas; en la experiencia de nuestro grupo de trabajo, el estudio de sustancias que inducen más del 20% de muerte celular puede dar un resultado falso positivo en el ensayo de inhibición de G6Pasa. Por ello sólo se evaluó la fracción A3 (MeOH). Se construyó la curva concentración-respuesta de A3 entre 10 y 100 µg/mL. Por la citotoxicidad exhibida, las fracciones A1 y A2 no fueron evaluadas. Todas las concentraciones evaluadas de la fracción soluble en MeOH (A3) (**Figura 28**) redujeron significativamente ($p < 0.05$) la actividad de la enzima G6Pasa de modo similar a como lo hizo el control positivo insulina (100 nM). Por lo tanto, es probable que el responsable de dicha actividad sea el compuesto mayoritario identificado como un derivado glicosilado de la 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona.

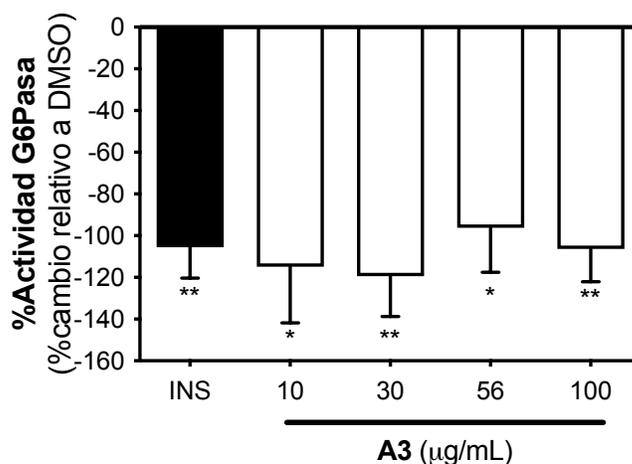


Figura 28. Determinación de la actividad G6Pasa en hepatocitos H4IIE.

INS: insulina 100 nM, A3: fracción solubilizada en MeOH. Cada barra es el promedio de $n \pm$ EEM de tres pases independientes con duplicados normalizados al grupo de DMSO. ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$).

Por su disponibilidad, se procedió a evaluar a las metoxiflavonas **1** y **2** en el ensayo de inhibición de glucosa-6-fosfatasa. Se construyeron las curvas concentración-respuesta de **1** y **2** comprendidas entre 5.62 y 56.2 μM , incubadas durante 18 h. Bajo estas condiciones, se observó que **1** era inactiva y que **2** alcanzaba una respuesta máxima en 10 μM , y luego, perdía la actividad (**Figura 29**).

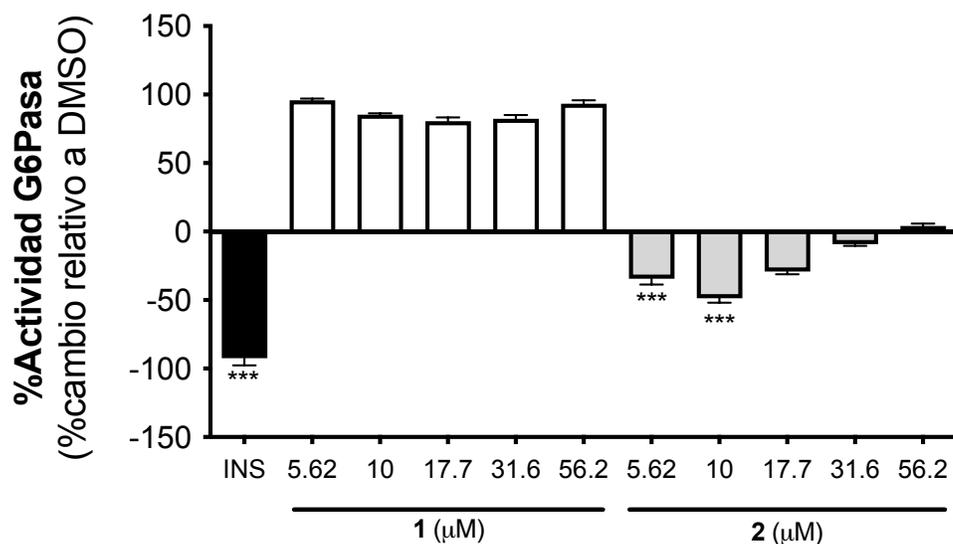


Figura 29. Determinación de la actividad G6Pasa de la acetina (**1**) y de la diosmetina (**2**) en hepatocitos H4IIE.

INS: insulina 100 nM. Cada barra es el promedio de $n \pm \text{EEM}$ de tres pases independientes con duplicados normalizados al grupo de DMSO. ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (***) $p < 0.001$.

Por lo tanto, se realizaron nuevas curvas concentración-respuesta en los intervalos de concentración de 1 a 10 μM para **1** y 1.78 a 17.7 μM para **2**. Una vez más, la acetina (**1**) fue inactiva, pero la diosmetina (**2**) sí fue activa (**Figura 30**), aunque el efecto no fue concentración-dependiente. Este resultado no era el esperado, ya que la acetina (**1**) y la diosmetina (**2**) son muy parecidas estructuralmente, sólo difieren en que la diosmetina tiene un grupo hidroxilo en la posición 5'.

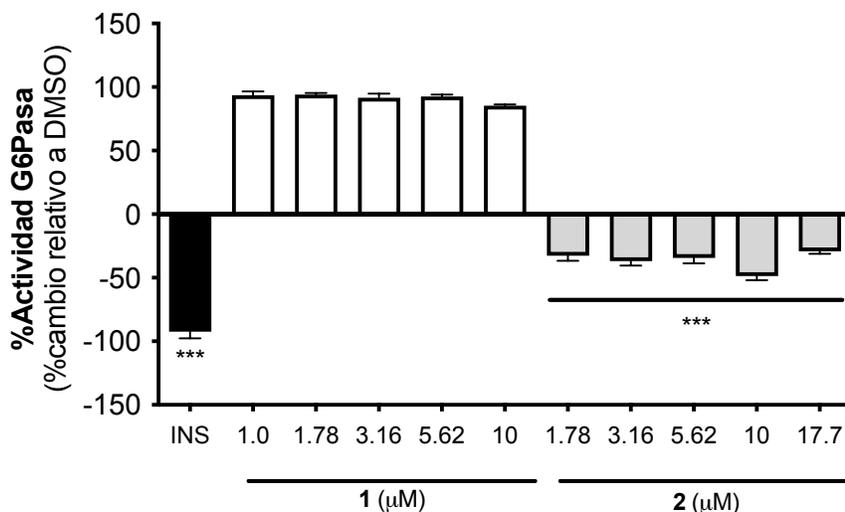


Figura 30. Determinación de la actividad G6Pasa de la acacetina (**1**) y de la diosmetina (**2**) en hepatocitos H4IIE.

INS: insulina 100 nM. Cada barra es el promedio de $n \pm$ EEM de tres pases independientes con duplicados normalizados al grupo de DMSO. ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett (***) $p < 0.001$.

En la revisión bibliográfica efectuada se detectaron tres artículos de investigación que reportan este mismo fenómeno de inactividad-actividad. Según Poór et al. (2014), cuando se incubó a la acacetina (**1**), diosmetina (**2**), luteolina (**3**) y apigenina (**4**) (10 μ M) durante 12 h en células MDCK (células de riñón canino, Madin-Darby Canine Kidney), se observó que sólo **2** provocaba una elevación significativa de las concentraciones de ATP. Estas flavonas no fueron citotóxicas en las concentraciones evaluadas. Posteriormente, el tiempo de incubación se cambió a 24 h, manteniendo la concentración en 10 μ M. En ese ensayo, sólo la luteolina (**3**) incrementó de forma significativa los niveles de ATP. El efecto de actividad-inactividad de la diosmetina (**2**) se evaluó entonces a tres tiempos y tres concentraciones: 5, 10 y 15 μ M y a las 6 h, 12 h, y 24 h. Se corroboró un efecto concentración dependiente a las 6 h, actividad a concentraciones altas a las 12 h, y la inactividad de la diosmetina a las 24 h, independientemente de su concentración. Este efecto también se observó en células HepG2 (hepatoma humano), pues la incubación de **2** durante 12 h a concentraciones entre 5 y 10 μ M elevó los niveles de ATP, mostrando una ligera reducción de la viabilidad celular (Poór et al., 2014). Los autores atribuyeron la actividad de la diosmetina (**2**) en ambas líneas celulares a un fenómeno de biotransformación: dependiendo del tiempo de incubación, la diosmetina se convierte en luteolina (la cual es inactiva) por acción de la CYP1A (V. Androutsopoulos et al., 2009; V. P. Androutsopoulos & Spandidos, 2013; Z. Chen et al., 2012). La evidencia experimental que generamos demuestra que, a 18 h de incubación, la diosmetina es activa a concentraciones bajas, pero la acacetina no lo es. Por tanto, la metoxilación en 5' y la hidroxilación en 4' son indispensables para la actividad biológica. Con la información bibliográfica disponible podemos proponer que la diosmetina se biotransforma a luteolina (una flavona inactiva) por acción de CYP1A de modo concentración-dependiente a partir de la concentración de 17.7 μ M y hasta 56.2 μ M (**Figura 31**).

Queda como perspectiva determinar la influencia del tiempo de incubación en el efecto inhibitorio de la diosmetina, y aceptar o rechazar la hipótesis de la biotransformación (diosmetina → luteolina) descrita por otros y que también proponemos.

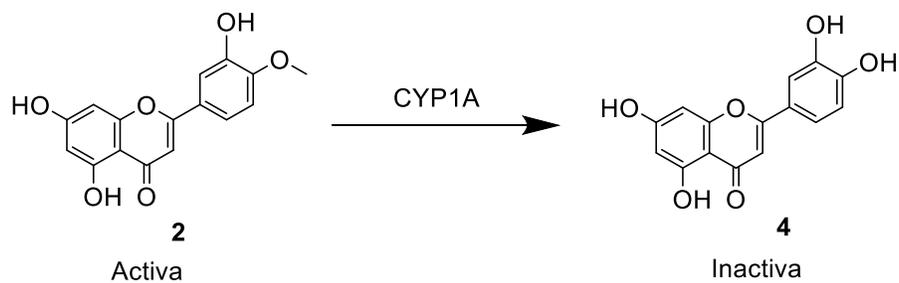


Figura 31. Propuesta de inactivación metabólica de la diosmetina (**2**) a luteolina (**4**) en hepatocitos H4IIE.

7. CONCLUSIONES

La evidencia experimental recabada en esta re-investigación da cuenta de tres posibles mecanismos de acción del quelite medicinal *A. cristata* como inhibidor de enzimas de interés farmacológico para tratar la DM2: α -glucosidasa, proteína tirosina fosfatasa 1B y glucosa-6-fosfatasa. Los distintos ensayos enzimáticos realizados con las fracciones derivadas de la decocción y compuestos puros permitieron establecer que:

- Las fracciones orgánicas que contienen acacetina (**1**) y diosmetina (**2**), además de posibles derivados glicosilados de la 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona, son inhibidores de las enzimas α -glucosidasas y de la proteína tirosina fosfatasa 1B. Este resultado es consistente con la actividad antihiper glucémica demostrada previamente para la especie en roedores.
- La fracción solubilizada en MeOH y que contiene como compuesto mayoritario un derivado glicosilado de la 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona inhibió a la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) expresada en hepatocitos H4IIE.
- La diosmetina (**2**) inhibe a la enzima G6Pasa; la acacetina (**1**), no.

La polivalencia farmacológica demostrada para los metabolitos secundarios del alache identificados en esta re-investigación: acacetina (**1**), diosmetina (**2**) y un derivado glicosilado de la 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona permite asignar un valor agregado a esta especie de quelite para regular los mecanismos homeostáticos de la glucosa, que se encuentran perturbados en el caso de la diabetes mellitus. Por otra parte, el hallazgo de actividad inhibitoria sobre la enzima glucosa 6-fosfatasa de la diosmetina (**2**) y de la fracción que contiene al derivado glicosilado de la 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona es inédita para la especie.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar el estudio químico de las fracciones orgánicas derivadas de la decocción con la finalidad de contribuir al conocimiento químico de la especie y encontrar los compuestos bioactivos responsables de la inhibición de las enzimas proteína tirosina fosfatasa 1B, α -glucosidasas y glucosa-6-fosfatasa.
- Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos para comprobar la hipótesis de la biotransformación de las metoxiflavonas en los ensayos basados en células que se usaron en esta investigación.

9. REFERENCIAS

- Androutsopoulos, V. P., & Spandidos, D. A. (2013). The flavonoids diosmetin and luteolin exert synergistic cytostatic effects in human hepatoma HepG2 cells via CYP1A-catalyzed metabolism, activation of JNK and ERK and P53/P21 up-regulation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(2), 496–504. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2012.01.012>
- Androutsopoulos, V., Wilsher, N., Arroyo, R. R. J., & Potter, G. A. (2009). Bioactivation of the phytoestrogen diosmetin by CYP1 cytochromes P450. *Cancer Letters*, 274(1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2008.08.032>
- Brindis, H. F. (2011). *Evaluación de la eficacia antihiperlipidémica de Ligusticum porteri Coult., Hydrangea seemannii L. Riley y Anoda cristata (L.) Schltdl.* Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bueno, P. C. P., Passareli, F., Anhesine, N. B., Torres, R. B., & Cavalheiro, A. J. (2016). Flavonoids from *Casearia sylvestris* Swartz variety lingua (Salicaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 68, 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.06.002>
- Calabrese, E. J., Agathokleous, E., Kapoor, R., Dhawan, G., & Calabrese, V. (2021). Luteolin and hormesis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 199, 111559. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2021.111559>
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., & Romero, I. (2009). Anti-Helicobacter pylori activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 402–405. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.021>
- Chen, M., Wang, K., Zhang, Y., Zhang, M., Ma, Y., Sun, H., Jin, Z., Zheng, H., Jiang, H., Yu, P., Zhang, Y., & Sun, H. (2019). New insights into the biological activities of *Chrysanthemum morifolium*: Natural flavonoids alleviate diabetes by targeting α -glucosidase and the PTP-1B signaling pathway. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 108–115. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.05.083>
- Chen, Z., Kong, S., Song, F., Li, L., & Jiang, H. (2012). Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos *Chrysanthemi* extract in rats. *Fitoterapia*, 83(8), 1616–1622. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2012.09.011>
- Cheng, N., Yi, W. bin, Wang, Q. Q., Peng, S. M., & Zou, X. Q. (2014). Synthesis and α -glucosidase inhibitory activity of chrysin, diosmetin, apigenin, and luteolin derivatives. *Chinese Chemical Letters*, 25(7), 1094–1098. <https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2014.05.021>
- Claxton, D. P., Overway, E. M., Oeser, J. K., O'Brien, R. M., & McHaourab, H. S. (2022). Biophysical and functional properties of purified glucose-6-phosphatase catalytic subunit 1. *Journal of Biological Chemistry*, 298(1). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101520>
- Comisión Interinstitucional del Cuadro Básico y Catálogo de Insumos del Sector Salud. (2016). *CUADRO BÁSICO Y CATÁLOGO DE MEDICAMENTOS CONSEJO DE*

SALUBRIDAD GENERAL COMISIÓN INTERINSTITUCIONAL DEL CUADRO BÁSICO Y CATÁLOGO DE INSUMOS DEL SECTOR SALUD CENTENARIO DEL CONSEJO DE SALUBRIDAD GENERAL.
http://www.csg.gob.mx/descargas/pdf/priorizacion/cuadro-basico/med/catalogo/2016/EDICION_2016_MEDICAMENTOS.pdf

- Dash, S., Crisp, S., Hartnell, S., Donald, S., Davenport, K., Simmons, D., & Evans, M. (2012). Successful use of acarbose to manage post-prandial glycaemia in two patients with type 1 diabetes on continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *95*(3). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.11.008>
- Efferth, T., & Koch, E. (2010). Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. *Current Drug Targets*, *12*(1), 122–132. <https://doi.org/10.2174/138945011793591626>
- Fujimura, H., Murakami, N., Miwa, S., Aruga, C., & Toriumi, W. (2012). The suitability of rat hepatoma cell line H4IIE for evaluating the potentials of compounds to induce CYP3A23 expression. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *64*(5), 527–533. <https://doi.org/10.1016/J.ETP.2010.11.010>
- Garg, M., Chaudhary, S. K., Goyal, A., Sarup, P., Kumari, S., Garg, N., Vaid, L., & Shiveena, B. (2022). Comprehensive review on therapeutic and phytochemical exploration of diosmetin: A promising moiety. *Phytomedicine Plus*, *2*(1), 100179. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100179>
- GraphPad Prism 9 User Guide - What's new? Multiple comparisons.* (n.d.). Retrieved June 15, 2022, from https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/user-guide/new_multiple_comparisons.htm?q=anova
- Hassan, A. R., Amer, K. F., El-Toumy, S. A., Nielsen, J., & Christensen, S. B. (2019). A new flavonol glycoside and other flavonoids from the aerial parts of *Taverniera aegyptiaca*. *Natural Product Research*, *33*(8), 1135–1139. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1460834>
- Hossain, U., Das, A. K., Ghosh, S., & Sil, P. C. (2020). An overview on the role of bioactive α -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications. In *Food and Chemical Toxicology* (Vol. 145). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111738>
- IDF Diabetes Atlas, 10th Edition Commite. (2021). IDF Diabetes Atlas 10th edition. In *International Diabetes Federation* (Vol. 10). www.diabetesatlas.org
- INPI. (2009). *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- Johnson, T. O., Ermolieff, J., & Jirousek, M. R. (2002). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 1, Issue 9, pp. 696–709). <https://doi.org/10.1038/nrd895>
- Juárez-Reyes, K. (2016). *Estudio de la especie Anoda cristata (L.) SCHLTDL. (Malvaceae) como fuente potencial de agentes útiles para el tratamiento de la Diabetes Mellitus y sus complicaciones*. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Juárez-Reyes, K., Brindis, F., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. (2015). Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of Ethnopharmacology*, *161*, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.052>
- Khursheed, R., Singh, S. K., Wadhwa, S., Kapoor, B., Gulati, M., Kumar, R., Ramanunny, A. K., Awasthi, A., & Dua, K. (2019). Treatment strategies against diabetes: Success so far and challenges ahead. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 862). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172625>
- Kim, M. K., Suk, J. H., Kwon, M. J., Chung, H. S., Yoon, C. S., Jun, H. J., Ko, J. H., Kim, T. K., Lee, S. H., Oh, M. K., Rhee, B. D., & Park, J. H. (2011). Nateglinide and acarbose for postprandial glucose control after optimizing fasting glucose with insulin glargine in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *92*(3), 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.01.022>
- Martins, M. A., Marques, R. M., Oliveira, H., Almeida, L., Pimentel, F., Santos, C., & Ferreira De Oliveira, J. P. (2016). Cytotoxic activity of the flavonoid diosmetin against the MG-63 osteosarcoma cell line. *Toxicology Letters*, *258*, S125. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2016.06.1501>
- Mata, R., Figueroa, M., Navarrete, A., & Rivero-Cruz, I. (2019). Chemistry and Biology of Selected Mexican Medicinal Plants. In A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, J. Kobayashi, Y. Asakawa, & J.-K. Liu (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 108* (pp. 1–142). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01099-7_1
- Mccormack, J. G., Westergaard, N., Kristiansen, M., Brand, C. L., & Lau, J. (2001). Pharmacological Approaches to Inhibit Endogenous Glucose Production as a Means of Anti-diabetic Therapy. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 7).
- Mondragón, J., & Vibrans, H. (2009). *Anoda cristata*. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/malvaceae/anoda-cristata/fichas/ficha.htm>
- Montalibet, J., & Kennedy, B. P. (2005). Therapeutic strategies for targeting PTP1B in diabetes. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, *2*(2), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2005.05.002>
- Nachar, A., Eid, H. M., Vinqvist-Tymchuk, M., Vuong, T., Kalt, W., Matar, C., & Haddad, P. S. (2017). Phenolic compounds isolated from fermented blueberry juice decrease hepatocellular glucose output and enhance muscle glucose uptake in cultured murine and human cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1650-2>
- Naz, S., Zahoor, M., Umar, M. N., AlQahtany, F. S., Elnahas, Y. M., & Ullah, R. (2020). In vivo glucose-6-phosphatase inhibitory, toxicity and antidiabetic potentials of 2-picolylamine thioureas in Swiss albino mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(12), 3267–3273. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.048>

- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. In *Journal of Natural Products* (Vol. 83, Issue 3, pp. 770–803). <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Ovalle-Magallanes, B., Navarrete, A., Haddad, P. S., Tovar, A. R., Noriega, L. G., Tovar-Palacio, C., & Mata, R. (2019). Multi-target antidiabetic mechanisms of mexicanolides from *Swietenia humilis*. *Phytomedicine*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152891>
- Poór, M., Veres, B., Jakus, P. B., Antus, C., Montskó, G., Zrínyi, Z., Vladimir-Knežević, S., Petrik, J., & Köszegi, T. (2014). Flavonoid diosmetin increases ATP levels in kidney cells and relieves ATP depleting effect of ochratoxin A. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 132, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2014.01.016>
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Sousa, J. L. C., Carvalho, F., Silva, A. M. S., Fernandes, P. A., & Fernandes, E. (2018). Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by flavonoids: A structure - activity relationship study. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 474–481. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.11.039>
- Rahim, M., Nakhe, A. Y., Banerjee, D. R., Overway, E. M., Bosma, K. J., Rosch, J. C., Oeser, J. K., Wang, B., Lippmann, E. S., Jacobson, D. A., O'Brien, R. M., & Young, J. D. (2022). Glucose-6-phosphatase catalytic subunit 2 negatively regulates glucose oxidation and insulin secretion in pancreatic β -cells. *Journal of Biological Chemistry*, 298(4), 101729. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2022.101729>
- Rangel-Grimaldo, M., Macías-Rubalcava, M. L., González-Andrade, M., Raja, H., Figueroa, M., & Mata, R. (2020). α -Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors from *Malbranchea circinata*. *Journal of Natural Products*, 83(3), 675–683. <https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.9B01108>
- Reyes Olivares, J. A., & Arellano Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), 9–18. <http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2008/reb081c.pdf>
- Saadeldeen, F. S. A., Niu, Y., Wang, H., Zhou, L., Meng, L., Chen, S., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G. I. N., Liu, Z., & Kang, W. (2020). Natural products: Regulating glucose metabolism and improving insulin resistance. In *Food Science and Human Wellness* (Vol. 9, Issue 3, pp. 214–228). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.04.005>
- Seibert, H., Maser, E., Schweda, K., Seibert, S., & Gülden, M. (2011). Cytoprotective activity against peroxide-induced oxidative damage and cytotoxicity of flavonoids in C6 rat glioma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2398–2407. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2011.06.055>
- Semwal, R. B., Semwal, D. K., Combrinck, S., Trill, J., Gibbons, S., & Viljoen, A. (2019). Acacetin—A simple flavone exhibiting diverse pharmacological activities. *Phytochemistry Letters*, 32(March), 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.04.021>

- Sharabi, K., Tavares, C. D. J., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2015). Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Molecular Aspects of Medicine*, *46*, 21–33. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2015.09.003>
- Shieh, J. J., Pan, C. J., Mansfield, B. C., & Chou, J. Y. (2004). The islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein, implicated in diabetes, is a glycoprotein embedded in the endoplasmic reticulum membrane. *FEBS Letters*, *562*(1–3), 160–164. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00223-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00223-6)
- Venkateswaran, M. R., Vadivel, T. E., Jayabal, S., Murugesan, S., Rajasekaran, S., & Periyasamy, S. (2021). A review on network pharmacology based phytotherapy in treating diabetes- An environmental perspective. *Environmental Research*, *202*. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111656>
- Villa, P., Covaa, D., de Francescob, L., Guaitanib, A., Palladini, G., & Peregoa, R. (1992). Protective effect of diosmetin on in vitro cell membrane damage and oxidative stress in cultured rat hepatocytes. In *Toxicology* (Vol. 13).
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, *16*(2–3), 97–110. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2008.12.018>
- Wang, D. M., Pu, W. J., Wang, Y. H., Zhang, Y. J., & Wang, S. S. (2012). A new isorhamnetin glycoside and other phenolic compounds from *Callianthemum taipaicum*. *Molecules*, *17*(4), 4595–4603. <https://doi.org/10.3390/molecules17044595>
- Wätjen, W., Weber, N., Lou, Y. j., Wang, Z. q., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Kahl, R., & Proksch, P. (2007). Prenylation enhances cytotoxicity of apigenin and liquiritigenin in rat H4IIE hepatoma and C6 glioma cells. *Food and Chemical Toxicology*, *45*(1), 119–124. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2006.08.008>
- Weyermann, J., Lochmann, D., & Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, *288*(2), 369–376. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2004.09.018>
- Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., & Kang, W. (2014). α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, *3*(3–4), 136–174. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003>