



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

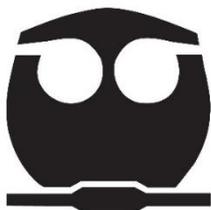
**Compuestos inhibidores de la enzima proteína tirosina  
fosfatasa-1B (PTP-1B) aislados a partir de la especie  
medicinal *Piper auritum* Kunth (Piperaceae).**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

**ROCÍO SANDOVAL AGUILAR**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

**2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

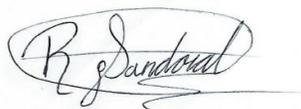
**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Dra. María Isabel Aguilar Laurents  
**VOCAL:** Dra. Rachel Mata Essayag  
**SECRETARIO:** Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz  
**PRIMER SUPLENTE:** Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda  
**SEGUNDO SUPLENTE:** Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio 124, Edificio de Bioquímica y Farmacia, Conjunto E,  
Facultad de Química, UNAM**

**SUSTENTANTE:**



---

**Rocío Sandoval Aguilar**

**ASESOR:**



---

**Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz**

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de adquirir mi formación académica y de pertenecer orgullosamente a esta máxima casa de estudios. A la Facultad de Química por permitirme descubrir todo un mundo dentro de las aulas, compartir historias de vida y conocer a muchas personas que nos han marcado el corazón por darnos cobijo, un temple, una formación y por darnos los conocimientos para afrontar la vida y vivirla con plenitud.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado de la FQ, UNAM, por los apoyos económicos otorgados a través de los financiamientos PAPIIT IN 217320 y PAIP-FQ 5000-9140.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado (A1-S-11226).

A la Dra. Rachel Mata Essayag por creer en mí y brindarme la oportunidad de desarrollar mi tesis profesional, por su respaldo y confianza que me fueron otorgados. Muchas gracias por toda su ayuda y dedicación para la realización de este proyecto.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz por ser mi sostén, por su confianza, enseñanzas, por haberme tenido la paciencia necesaria, por su comprensión, por su esfuerzo y ser mi guía. Por haber compartido conmigo sus conocimientos y sobre todo su inconmensurable amistad.

A las Dras. Araceli Pérez Vásquez, Berenice Ovalle Magallanes y Martha Macías Rubalcava por sus recomendaciones, por los conocimientos que me transmitieron, por su tiempo y ayuda brindada a lo largo del presente trabajo.

Al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar por todas sus enseñanzas, su colaboración, sugerencias, dedicación de tiempo y facilidades recibidas durante la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado que dedicaron su tiempo para leer, revisar y mejorar la versión final del manuscrito.

A todos mis amigos de los laboratorios 124 y 125 por sus aportaciones, amistad, compañerismo y bondad proporcionados durante mi estadía.

## **Dedicatorias**

Dedico con todo mi corazón mi tesis a mi madre, quien me dedicó toda su vida, sin ella no lo habría logrado, gracias por ser mi pilar fundamental y apoyarme en mi formación académica. Tu bendición a diario a lo largo de mi vida me permite seguir adelante, jamás dejaré de amarte y tu recuerdo me acompañará por toda la eternidad.

A mi padre por ser mi soporte y mi pilar en la vida, por forjarme como la persona que soy, por mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, todos ellos otorgados de manera desinteresada y siempre lleno de amor.

A mis hermanos (Eduardo y Daniel) y mejores amigos, por estar siempre conmigo, por su amor y por la interminable alegría que me han brindado, han sido mi motivación y mi lucha para alcanzar mis metas.

A mi abuelita por sus cuidados, afecto, cariño y sus enseñanzas. Te agradezco por ayudarme a encontrar el lado dulce y no amargo de la vida.

LOS AMO MUCHO.

## Índice

	<b>Página</b>
<b>Lista de Figuras</b>	viii
<b>Lista de Esquemas</b>	viii
<b>Lista de Tablas</b>	viii
<b>Lista de Abreviaturas</b>	ix
<b>1. Antecedentes</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes del género <i>Piper</i> .	1
1.2 Antecedentes de la especie <i>Piper auritum</i> Kunth (Piperaceae).	2
1.2.1 Estudios químicos y farmacológicos.	6
1.3 Inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa-1B (PTP-1B) 24 en el tratamiento de la diabetes.	11
1.3.1 Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B).	13
1.3.2 Ejemplos selectos de inhibidores naturales de la PTP-1B.	15
<b>2. Justificación y Objetivos</b>	<b>19</b>
<b>3. Parte Experimental</b>	<b>20</b>
3.1 Ensayos biológicos.	20
3.1.1 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre la enzima proteína tirosina fosfatasa 1 B (PTP-1B).	20
3.2 Estudio químico de la infusión de <i>Piper auritum</i> .	21
3.2.1 Material vegetal.	21
3.2.2 Procedimientos generales de análisis.	21
3.2.2.1 Análisis cromatográficos.	21
3.2.2.2 Caracterización de los productos naturales.	22
3.2.3 Preparación del extracto acuoso.	22
3.2.4 Fraccionamiento de la fracción soluble de acetato de etilo.	23
3.2.4.1 Aislamiento y purificación del metoxi-eugenol (1).	23
3.2.4.2 Aislamiento de los productos 2–5.	24

	<b>Página</b>
<b>4. Resultados y Discusión</b>	26
4.1 Caracterización de los productos aislados.	27
4.1.1 Caracterización del metoxi-eugenol (1).	27
4.1.2 Caracterización de la vitexina (2).	29
4.1.3 Caracterización de la 7-O-metil-vitexina (3) y su isómero estructural (4).	32
4.2 Efecto de los productos naturales sobre las enzimas PTP-1B.	35
<b>5. Conclusiones</b>	37
<b>6. Perspectivas</b>	38
<b>7. Referencias</b>	39

## Lista de Figuras

Figura		Página
1	<i>Piper auritum</i> Kunth (Piperaceae).	3
2	Acueyo ( <i>Piper sactum</i> ) “Historia Natural de la Nueva España”. Hernández F. 1942-1946. Cap. XLI.	4
3	Ensayo de materia médica mexicana (Antonio de la Cal y Bracho), usos “yerba santa”.	5
4	Principales metabolitos aislados de <i>P. auritum</i> Kunth.	7
5	Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B).	14
6	Regulación de la acción de la insulina. A nivel del receptor, se han descrito varios mecanismos de regulación entre los que se incluyen la desfosforilación de residuos de tirosina que participan en la activación del receptor y en su asociación con proteínas adaptadoras, por acción de la PTP-1B (tomado de Gac. Med. Mex. 2017;153, 214-228).	15
7	Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción F <sub>19</sub> . Condiciones de análisis: Columna XBrigde®; Sistema de elución H <sub>2</sub> O (0.1% ácido fórmico) (A)-ACN (B) desde 20% <b>B</b> a 60% <b>B</b> en 20 min; flujo: 17.1 mL/min; Detector UV/visible, I 270 y 285 nm.	25

## Lista de Esquemas

Esquema		Página
1	Extracción y fraccionamiento de la infusión de las hojas de <i>P. auritum</i> .	24

## Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la vitexina ( <b>2</b> ).	30
2	Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 7-O-metil-vitexina ( <b>3</b> ).	34
3	Efecto inhibitorio de los compuestos <b>2–5</b> aislados de <i>P. auritum</i> sobre la actividad de la enzima PTP-1B.	35

## Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo	IR	Espectroscopía en el infrarrojo
ACN	Acetonitrilo	ESI	Técnica de ionización por electrospray
FA	Ácido fórmico	<i>m/z</i>	Relación masa-carga
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos	MHz	Mega Hertz
cm	Centímetro	MeOH	Metanol
<i>J</i>	Constante de acoplamiento	CH <sub>3</sub> OH- <i>d</i> <sub>4</sub>	Metanol deuterado
Cl <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media	μL	Microlitro
CC	Cromatografía en columna abierta	μM	Micrómetro
CCD	Cromatografía en capa fina	mg	Miligramo
CCDP	Cromatografía en capa fina preparativa	mM	Milimolar
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	mL	Mililitro
δ	Desplazamiento químico	Min	Minuto
DM	Diabetes Mellitus	Nm	Nanómetro
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1	λ	Longitud de onda
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2	ppm	Partes por millón
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano	<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenil fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido	PTP-1B	Proteína Tirosina Fosfatasa 1 B
d	Doblete	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
dd	Doble de doble	<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
eV	Electrón volt	<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
°C	Grado Celsius	TMS	Tetrametilsilano
g	Gramo	t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
Hex	Hexano		

## 1. Antecedentes

### 1.1 Antecedentes del género *Piper*.

El género *Piper* L. perteneciente a la familia Piperaceae, agrupa alrededor de 2,000 especies, distribuidas principalmente en América (desde el norte de México hasta Brasil, principalmente en Guatemala, Nicaragua, San Salvador, Jamaica y Belice), Asia (Indonesia, Taiwán, India y China), y África (Ghana). Algunas especies del género son de gran importancia comercial, económica y medicinal, un ejemplo, es la especie *Piper longum* L. la más conocida del género, que llegó a Grecia en el siglo VI o V antes de cristo y fue descrita por Hipócrates como una planta medicinal, para elaborar vinos y digestivos especiados. Otra especie popular es *Piper nigrum* L., descrita por Theophrastus como especia en su primer trabajo de botánica “*Historia plantarum*”.

*Piper methysticum* G. Forst. conocida como “kava kava”, es una especie muy popular cuya raíz es utilizada y comercializada en todo el mundo, en bebidas para el tratamiento de la ansiedad y el estrés.

Finalmente, existen otras especies que son cultivadas como ornamentales, como *P. ornatum* N.E.Br., *P. sylvaticum* L. y *P. crocatum* Ruiz & Pav. Además de las especies *P. capense* L., utilizada como carminativa, *P. guineense* Schum. & Thonn. como agente antibacteriano y *P. umbellatum* L. con propiedades rubefacientes, estimulantes y desinfectantes.

En general las especies del género son plantas herbáceas o leñosas, arbustos y ocasionalmente árboles, con hojas alternas, opuestas o verticiladas; sus flores son unisexuales dispuestas en espigas o amentos delgados; sus frutos presentan semillas y perispermo amiláceo (Pérez, 2003).

En México, se estima que existen alrededor de 200 especies del género, distribuidas en la península de Yucatán, Costa Pacífica Mexicana y al norte en las Sierras Madre Occidental y Madre Oriental, siendo la más importante *Piper auritum* Kunth.

Desde el punto de vista químico y farmacológico, el metabolismo secundario del género se caracteriza por la biosíntesis de compuestos de distinta naturaleza incluyendo alcaloides [tipo aristolactama, 4,5-dioxoaporfina y piperolactama], esteroides, flavonoides, fenilpropanoides, furanólidas, kava lactonas, lignanos,  $\alpha$ -pironas, piperólidas, polifenoles y terpenoides, de estos metabolitos quizás los más representativos del género son las kava-lactonas y las piperólidas.

Todas las especies del género producen aceites esenciales, que les confieren a las plantas sus propiedades aromáticas tan apreciadas en las prácticas culinarias alrededor del mundo, estas esencias además de ser alopáticas cumplen funciones ecológicas como son la atracción de polinizadores.

Finalmente, las especies de *Piper* han sido reportadas con numerosas actividades farmacológicas que incluyen su actividad acaricida e insecticida, antifúngica, antiamebiana, antiasmática, antidiabética, hipocolesterolemia, antioxidante, analgésica, antiinflamatoria, inmunomoduladora, anticancerígena, antidepressiva, antiulcerosa, hepatoprotectora, por mencionar a las más importantes.

## 1.2 Antecedentes de la especie *Piper auritum* Kunth (Piperaceae).

Una de las especies del género que despertó un interés particular en nuestro grupo de trabajo, es la especie *Piper auritum* Kunth que se conoce con una gran variedad de nombres a lo largo del territorio mexicano, dentro de los más importantes en la zona centro destacan: acoyo, acuyo, acueyo, acacotoyol, cordoncillo, cordoncillo blanco, hoja de ajan, hierba de anís, hierba de cáncer, “**hoja santa**”, momo, pimienta sagrada, entre otros.

Esta especie tiene varias sinonimias: *Artanthe aurita* (Kunth) Miq.; *A. sancta* Miq.; *A. seemanniana* Miq.; *Piper alstonii* Trel.; *P. auritilaminum* Trel.; *P. auritilimum* Trel.; *P. heraldi* Trel.; *P. heraldi* var. *amplius* Trel.; *P. heraldii* var. *cocleanum* Trel.; *P. perlongipes* Trel.; *Piper sanctum* (Miq.) Schltdl. ex C. DC.; *Schilleria aurita* (Kunth) Kunth., siendo la más reconocida *P. sanctum* (Miq.) Schltdl. Ex C. DC.

*Piper auritum* es un arbusto perenne, que mide entre 0.5 y 5 m de altura, sus hojas son grandes, alternas y pecioladas, tienen forma acorazonada, miden de 20

a 25 cm de largo por 18 cm de ancho; son aromáticas, de sabor dulce y picante; sus tallos son lisos, sin espinas o pelos y sus ramas son frágiles. Las inflorescencias se presentan en espigas cilíndricas muy densas semejantes a un cordón o cola de ratón blancas a amarillo claro; sus frutos son carnosos y contienen una semilla (**Figura 1**). La especie es originaria de México y Guatemala, crece favorablemente en climas semicálidos y templados a una altitud entre 740 y 2,600 msnm, y florece entre los meses de septiembre y octubre. En México, esta especie se encuentra distribuida en los estados de Sonora, Michoacán, Morelos, Puebla, Oaxaca, Veracruz y San Luis Potosí.

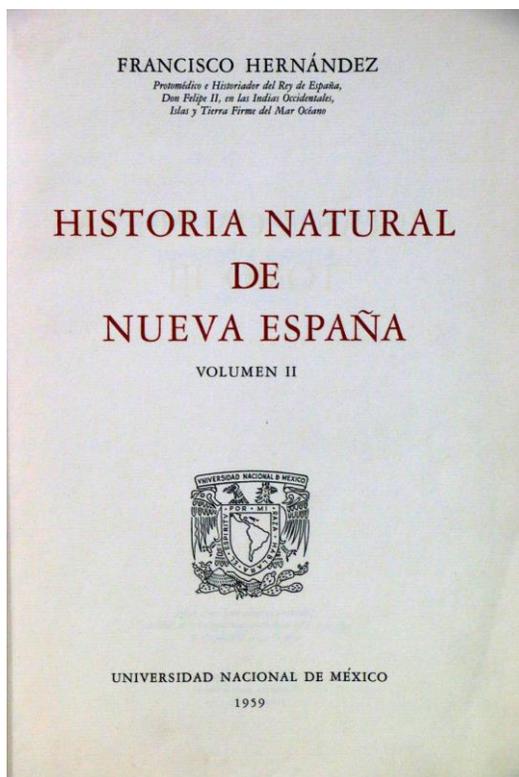


**Figura 1.** *Piper auritum* Kunth (Piperaceae).

Uno de los principales usos referidos de la hoja santa en México, es en la culinaria para la preparación de una gran variedad de platillos típicos en diversas regiones del país, como el Tapixte, en la cuenca del Papaloapan, Veracruz; el pilte de Tabasco, platillo elaborado con carne de pollo. En los tamales envueltos en hoja santa típicos del centro y sur de la República; el pescado y otros tipos de carnes

preparadas como mixiotes; el mole verde de Oaxaca o las bolitas de masa en caldillo de jitomate. La hoja santa también se utiliza para aromatizar platillos a base de frijol o para facilitar la elaboración de los chiles rellenos.

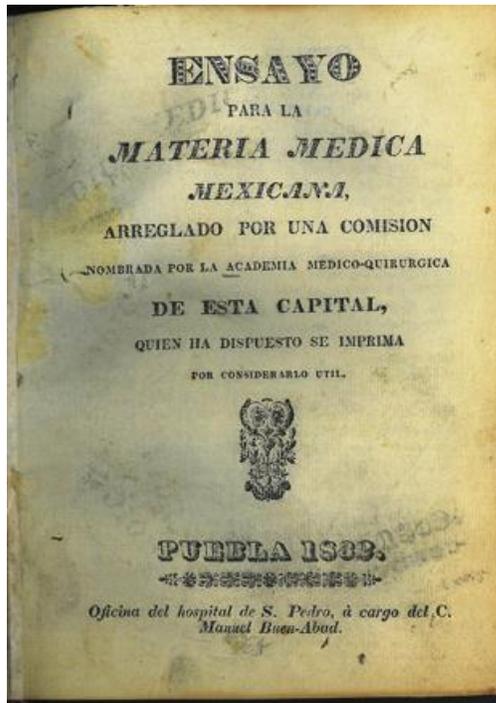
En cuanto a sus usos medicinales, en el siglo XVI, Francisco Hernández describe en su obra "*Historia Natural de la Nueva España*" que "el cocimiento de las hojas de *acueyo* (*Piper sanctum*) mitiga la flatulencia o los dolores que causa, arroja el frío, abre las obstrucciones, calienta las entrañas enfriadas, provoca la orina, limpia los riñones y la vejiga, purifica el útero, inhibe el apetito venéreo, provoca las reglas, adelgaza y cuece los humores espesos y crudos, produce sudor y hace que el cuerpo entero transpire por todas partes. Los tallos se aderezan y se guardan para tales usos durante el año" (**Figura 2**).



AOCOXÓCHITL

**Figura 2.** Acueyo (*Piper sanctum*) "*Historia Natural de la Nueva España*". Hernández F. 1942–1946. Cap. XLI.

En el ensayo de la materia médica mexicana de Antonio de la Cal y Bracho, publicado en 1832, se describe a la planta como “aromática, estimulante, estomática y odontálgica” (Figura 3).



54  
**Yerba Santa ó Tlanepaquequite.**  
(*Piper Sanctum*, F. M. J.)

Nace en Orizava, y climas análogos de la República.  
Parece ser el *piper obliquum* de Ruiz y Pavon, y el *Tlanecpatli* de Hern. Este dice que los antiguos mexicanos lo usaban en sus alimentos, y en el día lo hacen con el *Tlanepaquequite* en varias partes, mezclándolo en algunos guisados.  
Es aromática, estimulante, estomática y odontálgica, y se usa para los flatos. Por la destilacion da un aceite volátil mas pesado que el agua, y muy parecido al de sasafrás, por el que puede sustituirse.

**Figura 3.** Ensayo de materia médica mexicana (Antonio de la Cal y Bracho), usos “yerba santa”.

A finales del siglo XIX e inicios del siglo XX, el Instituto Médico Nacional cita a la especie como antipalúdica, antipirética, emenagoga, vulneraria y antiblenorrágica, y la Sociedad Farmacéutica de México en el año de 1952 reporta su uso como balsámico, eupéptico, para la gastralgia y como analgésico.

Maximino Martínez en su obra “*Las Plantas Medicinales de México*” documenta el uso de la planta para “anestesia local, antiblenorrágico, asma, bronquitis, disnea, estimulante, eupéptico, laringitis y analgésico”.

En 1985, Browner reporta a la hoja santa “como un remedio efectivo para asegurar un parto exitoso y se aplica de manera tópica para calentar las piernas, caderas, abdomen y espalda del parto”.

Otros autores le atribuyen propiedades diaforéticas, diuréticas, antirreumáticas, antipiréticas, y anti-gotosas (Martínez, 1979; Márquez, 1999).

Argueta y colaboradores en el año de 1994 en su obra "*Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*" señalan que, en Oaxaca, Quintana Roo y Veracruz el uso más común de la hierba santa es para curar los granos en la piel, y su empleo para tratar padecimientos propios de la mujer como inflamación de la vagina, infección de la matriz, para después del parto (para ayudar a la recién parida), como galactógeno y para acelerar el parto.

Recientemente, en las prácticas médicas alternativas de México se reporta el uso terapéutico de la hoja santa para el tratamiento de la diabetes (Palapa, 2019).

La forma de preparación tradicional que reportan para el tratamiento de estas afecciones es la infusión de las hojas y/o tallos tiernos, como agua de tiempo por un período mínimo de 15 días. Para dolores estomacales la infusión se prepara utilizando 3 o 4 hojas en un litro de agua y se bebe la cantidad de tres tazas por día, o más, si es necesario; esto también ayuda a la digestión. Para otro tipo de trastornos estomacales se usan las hojas con manteca y bicarbonato y se aplican tópicamente.

Para tratar dolores externos, se machacan las hojas, formando una pasta que se aplica en la zona afectada. Para la urticaria o inflamación se soasa la hoja y se frota en la parte afectada, la inflamación también se trata aplicando la hoja tibia, previamente expuesta al agua caliente por unos segundos. Para tratar el dolor de muelas, se corta un pedazo de la raíz (10 a 20 cm), se lava y se mastica.

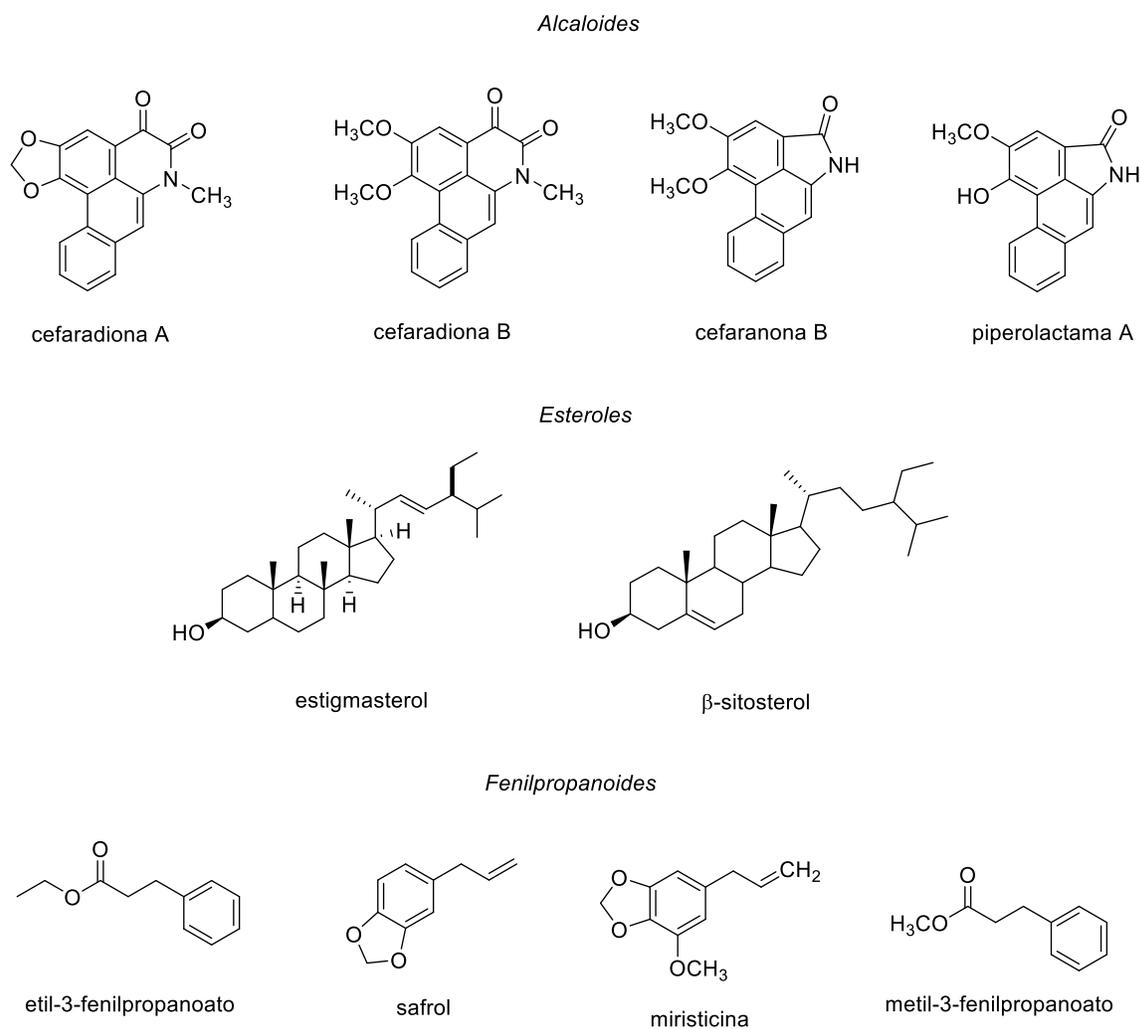
Por último, para tratar las afecciones de la mujer las hojas se remojan en aguardiente o mezcal.

### **1.2.1 Estudios químicos y farmacológicos.**

Desde el punto de vista químico y farmacológico, las hojas y los tallos de la especie *P. auritum* han sido objeto de numerosas investigaciones. Los metabolitos secundarios aislados y caracterizados en estos estudios pertenecen a las categorías de los alcaloides, los fenilpropanoides, los lignanos, neolignanos,

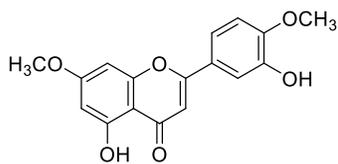
terpenoides, esteroides,  $\alpha$ -pironas, alcaloides, furanólicas y flavonoides (Torres, 2001). En la **Figura 4** se ilustran algunos ejemplos de los metabolitos aislados de *P. auritum*.

Por otra parte, el aceite esencial de la planta contiene safrol, como componente mayoritario, al que se le atribuye la actividad antibacteriana.

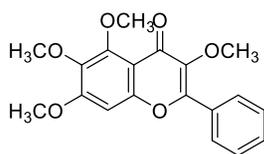


**Figura 4.** Principales metabolitos aislados de *P. auritum* Kunth.

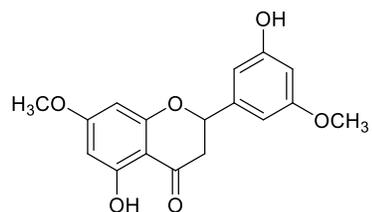
Flavonoides



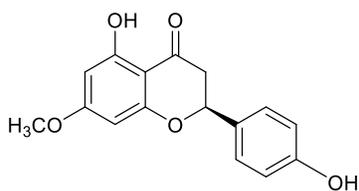
7,4'-dimetoxi-3'-dihidroxi-5'-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona



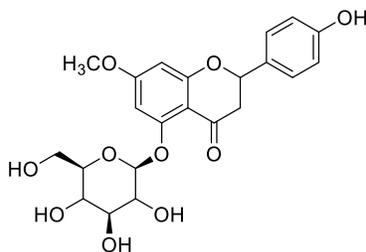
3,5,6,7-tetrametoxiflavona



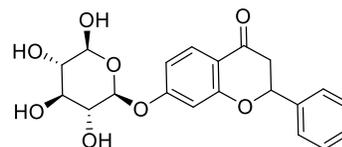
5,3'-dihidroxi-7,5'-dimetoxiflavanona



sakuranetina

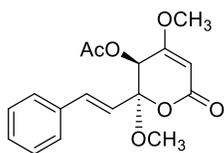


sakuranina

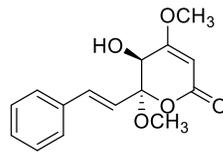


7-O-β-D-glucósido de la 7-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona

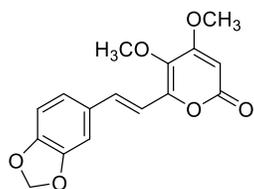
Kavapironas



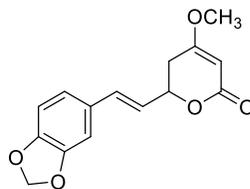
(+)-(5S,6S)-5-acetoxi-4,6-dimetoxi-6-estiril-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona



(+)-(5S,6S)-5-hidroxi-4,6-dimetoxi-6-estiril-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona



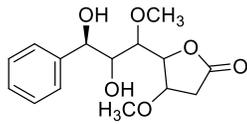
5-metoxi-5,6-deshidrometisticina



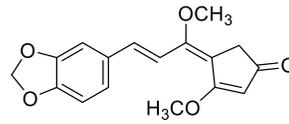
metisticina

Figura 4. Principales metabolitos aislados de *P. auritum* Kunth -continuación-.

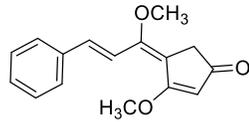
Piperólidas



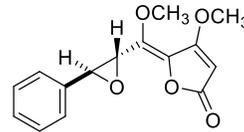
(-)-treo-(3Z)-5-(2,3-dihidroxi-1-metoxi-3-fenilpropilideno)-4-metoxi-2-(5H)-furanona



metilendioxiopiperólida

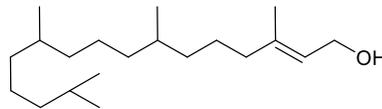


Z-piperólida



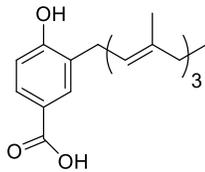
7,8-epoxi-piperólida

Terpenoides

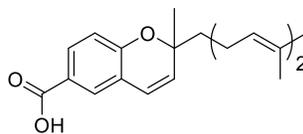


trans-fitol

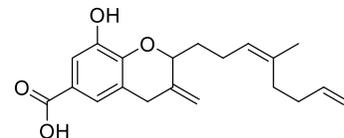
Otros compuestos



ácido 3-farnesil-4-hidroxi benzoico



ácido piper Cromenóico



ácido piper Cromanóico

**Figura 4.** Principales metabolitos aislados de *P. auritum* Kunth -continuación-.

Desde el punto de vista farmacológico, esta especie ha sido objeto de muchas investigaciones conducentes a establecer su eficacia y validar sus usos medicinales. Así, en el año de 1999, Montalvo y colaboradores establecieron el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico en el modelo de edema inducido por carragenina en ratas. Los resultados obtenidos indican que el preparado presenta un efecto antiinflamatorio importante, este efecto fue comparable al de la indometacina, con un máximo de inhibición en la formación del edema del 49.5% (Montalvo *et al.*, 1999).

Mata y colaboradores (2004) evaluaron el potencial antibacteriano de la especie contra la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados obtenidos permitieron establecer que el extracto elaborado a partir de las hojas inhibe en un 99% el crecimiento de *M. tuberculosis* a una concentración de 100 µg/mL, mientras que el extracto orgánico preparado con los tallos a la misma concentración de prueba inhibió en un 95% el crecimiento del microorganismo (Mata *et al.*, 2004).

Posteriormente, en el año 2007, Déciga-Campos y colaboradores comprobaron la inocuidad del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1), evaluando su toxicidad aguda mediante el método de Lorke y su genotoxicidad en el ensayo de Ames (Déciga-Campos *et al.*, 2007).

En 2012, Pineda y colaboradores reportaron la actividad antifúngica de varios extractos orgánicos y el aceite esencial de la planta contra tres hongos fitopatógenos de frutas [*Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, y *Botryodiplodia theobromae*] encontrando que el safrol componente mayoritario presente en la esencia, es también el compuesto activo (Pineda *et al.*, 2012).

También la actividad antibacteriana de varios extractos de la planta contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella newport*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhi* ha sido reportada (Kunth *et al.*, 2018).

Por otra parte, Neira-González *et al.* (2014) demostró las propiedades hipoglucemiantes del extracto de hexano preparado a partir de las hojas de la planta en un estudio de tipo subcrónico utilizando ratas normoglucémicas (Neira-González *et al.*, 2014).

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se determinó que la administración oral de la infusión de *P. auritum* en un modelo hipoglucemiante agudo, a las dosis de 31.6, 100 y 316.2 mg/kg, disminuye los niveles de glucosa en sangre en ratones normoglucémicos; sin embargo, estos resultados no fueron significativos, con respecto a los controles. En el caso de los ratones hiperglucémicos (NA-STZ, 50-130 mg/kg, *i.p.*), la administración del preparado tampoco provocó un efecto hipoglucemiante significativo (Palapa, 2019).

La evaluación del efecto del extracto acuoso en experimentos de tolerancia oral a la glucosa y a la sacarosa permitió evidenciar, en la primera serie de experimentos, un efecto antihiper glucémico significativo. En animales hiper glucémicos, a la dosis de 316.2 mg/kg el pico posprandial se disminuyó notablemente, 30 min posterior a la administración del carbohidrato; mientras que en animales sanos no se observó un efecto importante. Por otro lado, en los ensayos de tolerancia a la sacarosa el extracto acuoso no presentó actividad. Este último efecto permitió establecer que la actividad del preparado no está relacionada con una inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales, y que posiblemente involucra a otros blancos terapéuticos (Palapa, 2019).

Este preparado a las dosis de 31.6, 100 y 316.2 mg/kg mostró un efecto antinociceptivo importante, al disminuir el tiempo de respuesta que el animal invertía en lamerse la extremidad administrada con formalina, durante la segunda fase de esta prueba, siendo la dosis más alta la que presentó el mejor efecto al ser comparado con el control (Palapa, 2019).

En ratones hiper glucémicos (NA-STZ) e hiper algésicos la infusión (31.6, 100 y 316.2 mg/kg) disminuye considerablemente el tiempo de lamida durante la prueba de la formalina en ambas fases y con todas las dosis administradas, este efecto fue comparable al de la gabapentina (31.6 mg/kg) (Palapa, 2019).

En conjunto estos resultados, permitieron establecer que la infusión de *P. auritum* ejerce un efecto antihiper glucémico, antinociceptivo, antiinflamatorio y antihiper algésico en distintos modelos con ratones, estas propiedades podrían estar relacionadas con los diferentes reportes del uso tradicional de la planta para el tratamiento de la diabetes y padecimientos dolorosos (Palapa, 2019).

### **1.3 Inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) en el tratamiento de la diabetes.**

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica multifactorial resultante de la deficiencia o resistencia a la insulina, esta enfermedad se considera una de las principales amenazas para la salud humana en el siglo XXI, debido al desarrollo

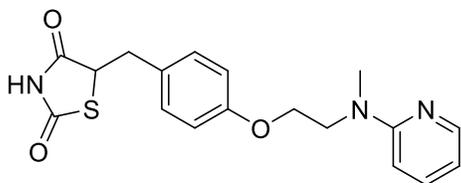
de graves complicaciones, que incluyen aterosclerosis, microangiopatías, disfunción e insuficiencia renales, anomalías cardíacas, retinopatías diabéticas y trastornos oculares. Con el aumento de la obesidad en la población en general, especialmente en adultos jóvenes, la prevalencia de la diabetes también se ha incrementado, redefiniendo a la enfermedad como "diabetes" u "obesidad" diabetes mellitus dependiente. Las incidencias de la enfermedad aumentan día a día y se estima que alcancen los 300 millones de casos a nivel mundial para el año 2025 (Thareja *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, la diabetes mellitus se clasifica como diabetes tipo 1 o diabetes mellitus insulino dependiente (DMT1), enfermedad resultante de una deficiencia absoluta de insulina debido a la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina, y que solo se controla mediante inyecciones subcutáneas diarias de insulina; y la diabetes tipo 2 (DMT2) también conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente que se caracteriza por presentar elevados niveles de glucosa en sangre, o una acción alterada de la insulina. Esta es la forma más común de DM y se asocia predominantemente con antecedentes familiares de diabetes, la edad, la obesidad y la falta de ejercicio, siendo más común en mujeres, especialmente en aquellas con antecedentes de diabetes gestacional.

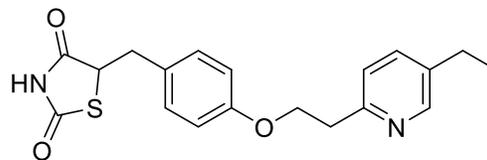
De los diferentes factores que pueden causar el desarrollo de la DMT2 la resistencia a la insulina es un factor fisiopatológico que considerar y ocurre en los músculos, los tejidos adiposos y el hígado, conduciendo a una reducción en la absorción y utilización de la glucosa y/o a un aumento en la producción de la glucosa. Por lo que esta resistencia a la insulina se asocia no solo con la hiperinsulinemia e hiperglucemia, sino también con otros trastornos, como aterosclerosis, hipertensión y perfil lipídico anormal, que son denominados en conjunto, como síndrome metabólico o asociados a la resistencia a la insulina. Por lo que, una mejora del organismo frente a la resistencia a la insulina tanto en los tejidos periféricos como en el hígado es uno de los tratamientos prometedores de la DMT2.

Entre los tratamientos disponibles para mejorar la sensibilidad a la insulina se encuentran los fármacos, rosiglitazona y pioglitazona, que disminuyen la

resistencia a la insulina y por lo tanto normalizan los niveles elevados de glucosa en sangre, aunque son asociados con hepatotoxicidad, aumento de peso y edemas.



rosiglitazona



pioglitazona

En este escenario, el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos orales para la DMT2 que disminuyan esta resistencia a la insulina involucra a los inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B).

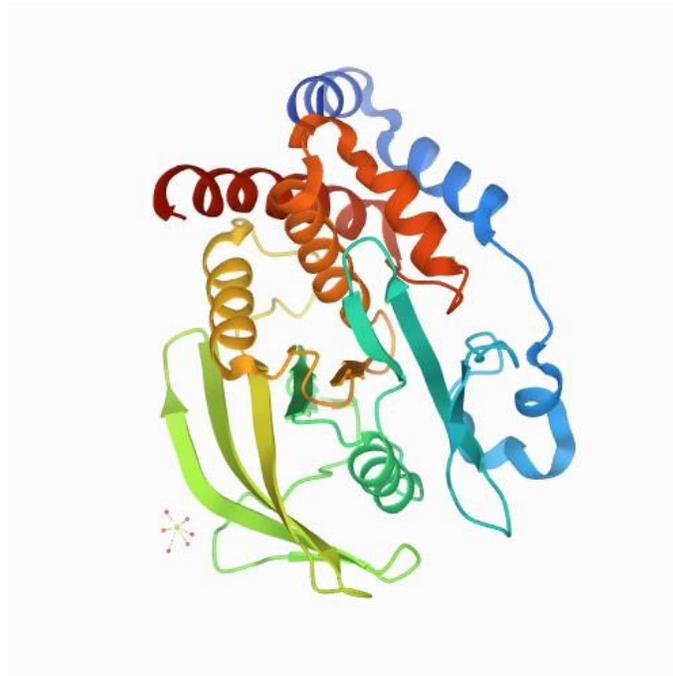
Las fosfatasa son un grupo de enzimas que eliminan el grupo fosfato del sustrato, proceso conocido como desfosforilación del receptor de tirosina cinasa (PTP). Por otra parte, la fosforilación de proteínas de tirosina es un proceso reversible regulado por las proteínas tirosina cinasas (PTK).

Así, las PTP, PTK y sus sustratos tejen una elaborada red que mantiene una buena señalización, así, el funcionamiento defectuoso o inadecuado de este complejo conduce a señales de fosforilación y/o desfosforilaciones aberrantes que contribuyen al desarrollo de muchas enfermedades como el cáncer, los trastornos inflamatorios y la diabetes. De tal manera que, las PTP son las enzimas que desempeñan un papel importante en la señalización celular regulando el estado de fosforilación y son consideradas como las dianas para el diseño de nuevas terapias que sean capaces de inhibir o modular las actividades de otras enzimas cruciales.

### 1.3.1 Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B).

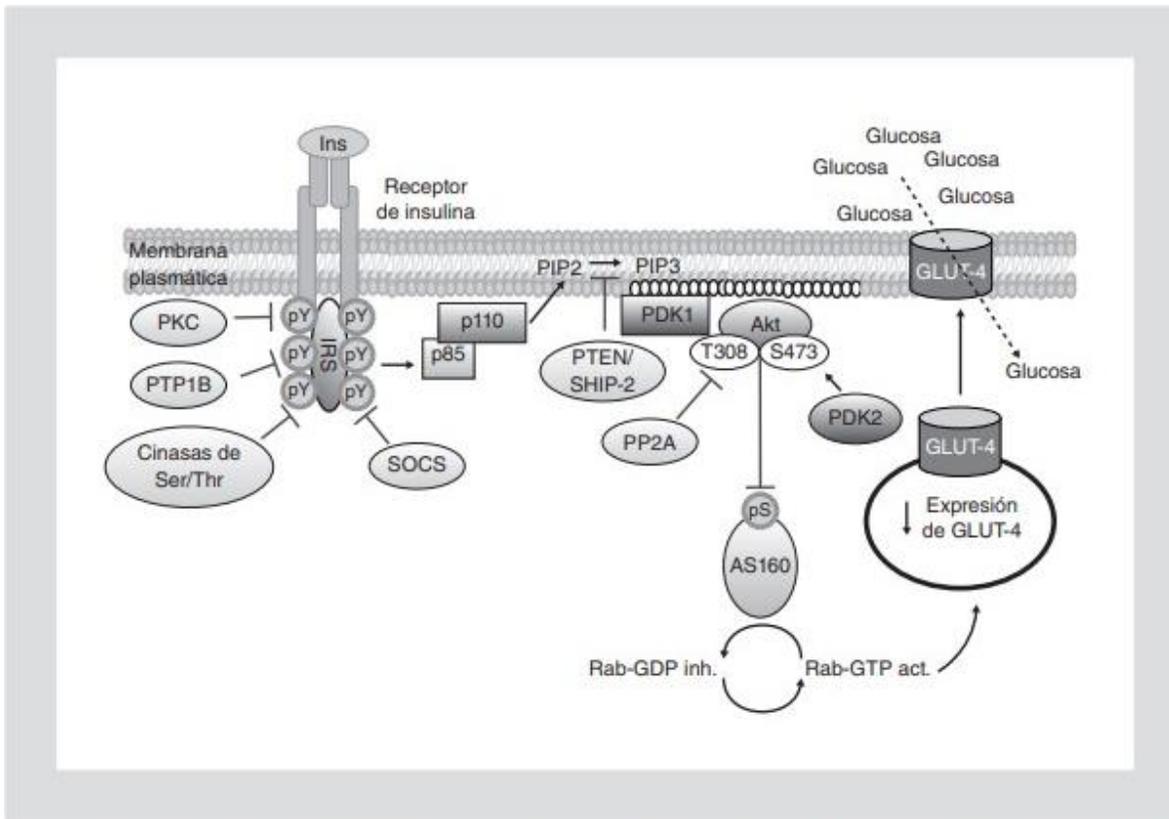
La proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B), pertenece a la familia de enzimas de las PTP, ésta es una enzima monomérica expresada ubicuamente, con un peso molecular de 50 kDa compuesta por 435 residuos de aminoácidos, estructuralmente organizados en un dominio N-terminal formado por dos sitios de unión de arilfosfato,

un sitio catalítico de alta afinidad que contiene el residuo de cisteína nucleófilo y otro sitio no catalítico de baja afinidad que contiene los residuos Arg24 y Arg254. Por otra parte, el dominio C-terminal incluye residuos de prolina y residuos de aminoácidos hidrófobos 400–435, responsables de ubicar a la PTP-1B en el citoplasma (**Figura 5**). En la vía de señalización de la insulina, la PTP-1B desfosforila varios sustratos de tirosina, lo que provoca la terminación posterior de la cascada del receptor tirosina cinasa.



**Figura 5.** Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B).

La unión de la insulina a su receptor (IR) fosforila la subunidad 1 del IR y provoca la regulación negativa de esta vía de señalización. Además, la PTB-1B controla la interacción entre los receptores IRS1 e IRS2, que modulan la acción de la insulina hepática y la sensibilidad a la insulina. Por lo tanto, PTB-1B regula mediante el mecanismo de desfosforilación, importantes eventos de señalización celular durante el crecimiento celular, la diferenciación y apoptosis (**Figura 6**).

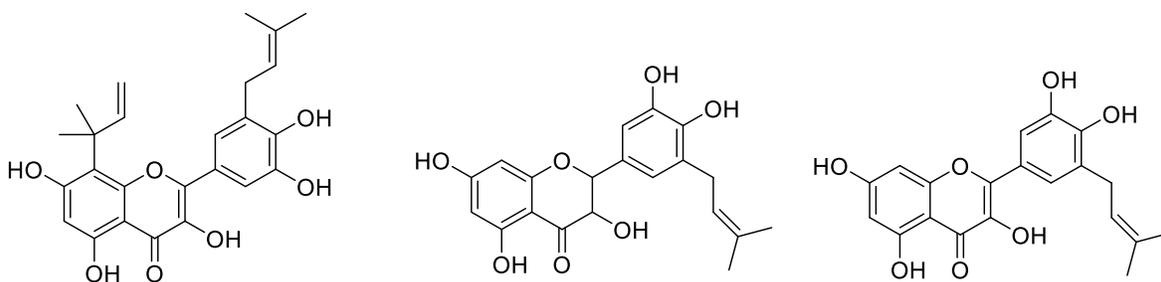


**Figura 6.** Regulación de la acción de la insulina. A nivel del receptor, se han descrito varios mecanismos de regulación entre los que se incluyen la desfosforilación de residuos de tirosina que participan en la activación del receptor y en su asociación con proteínas adaptadoras, por acción de la PTP-1B (tomado de *Gac. Med. Mex.* **2017**;153, 214-228).

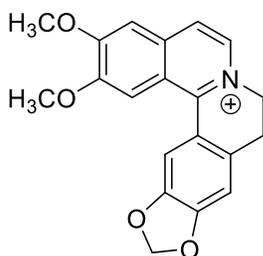
### 1.3.2 Ejemplos selectos de inhibidores naturales de la PTP-1B.

Los productos inhibidores de la PTP-1B de origen natural pertenecen a diversas categorías, y en la literatura científica se han descrito numerosos ejemplos aislados a partir de diversas fuentes naturales que incluyen plantas y microorganismos.

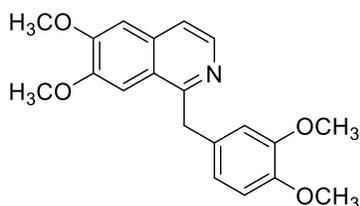
A partir de la especie *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. fueron aislados varios derivados de flavonoides como importantes inhibidores de la PTP-1B (Chen *et al.*, 2002).



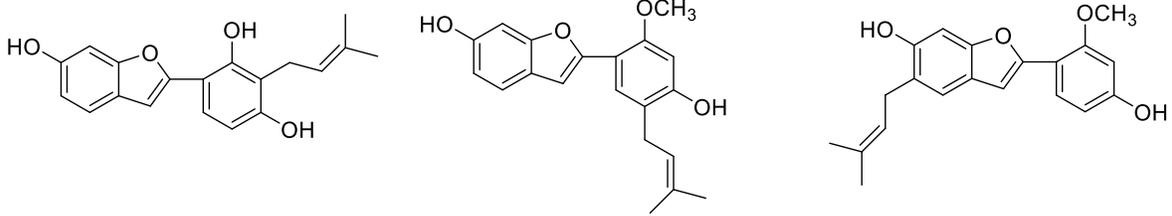
El alcaloide isoquinolínico, berberina, es un inhibidor competitivo de la PTP-1B recombinante *in vitro* (valor de  $K_i = 91.3 \text{ nM}$ ) (Bustanji *et al.*, 2006).



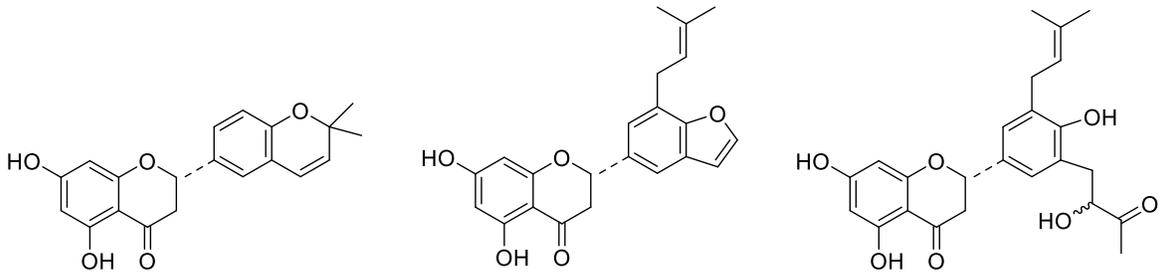
La papaverina, es otro alcaloide derivado de isoquinolina con un importante efecto inhibitorio de la *h*PTP-1B recombinante ( $CI_{50} \sim 1.20 \mu\text{M}$ ) que además disminuye de manera significativa los niveles de glucosa en sangre en experimentos *in vivo* (Bustanji *et al.*, 2009).



Otro grupo de compuestos que inhiben a la enzima PTP-1B con valores de  $CI_{50}$  en el rango de  $13.6$  a  $17.5 \mu\text{M}$  (Na *et al.*, 2007) y  $14.2$  a  $26.7 \mu\text{M}$ , respectivamente son derivados de 2-arilbenzofuranos y flavanonas aislados del género *Erythrina* (Cui *et al.*, 2007).



2-arylbenzofuranos

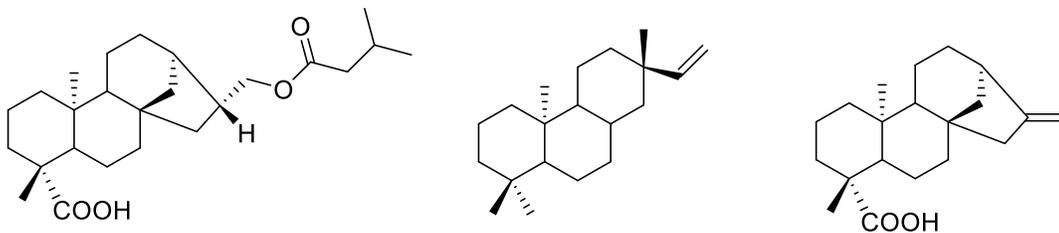


flavanonas preniladas

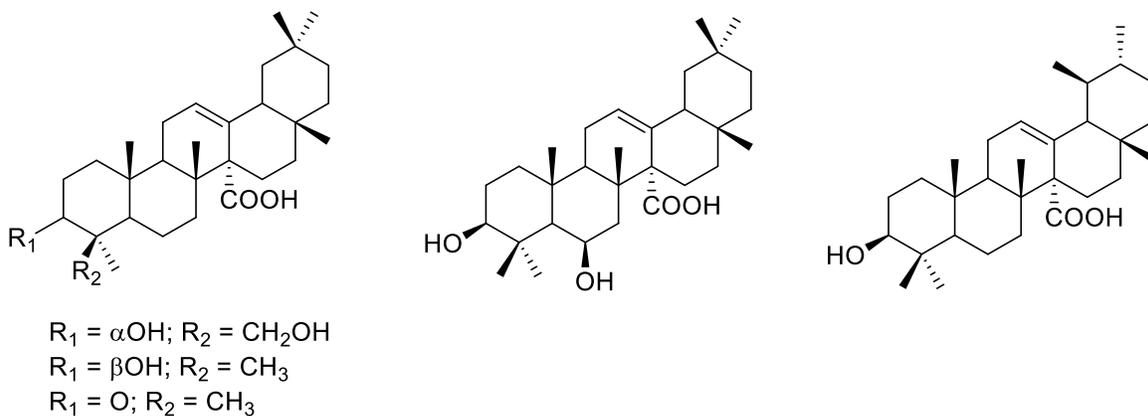
Compuestos aromáticos simples derivados del ácido cinámico también presentan un importante efecto inhibitorio sobre la PTP-1B (Lakshmi *et al.*, 2009).



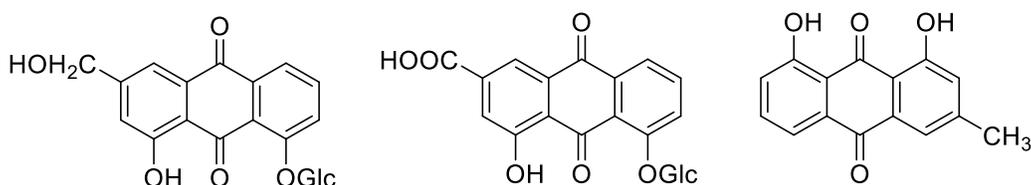
Diterpenos de núcleo *ent*-kaurano aislados de *Acanthopanax koreanum*, también han sido caracterizados por su importante actividad inhibitoria contra la PTP-1B (Na *et al.*, 2006).



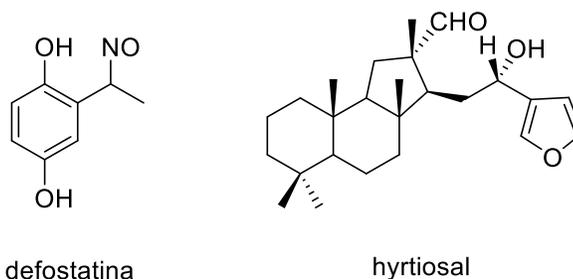
Triterpenos derivados del ácido oleanólico inhiben a la PTP-1B con valores de  $Cl_{50}$  en el rango entre 6.8 y 12.8  $\mu\text{M}$  (Na *et al.*, 2006).



Los derivados de antraquinona aislados de las raíces de la especie medicinal china *Saussureae radix* presentan una actividad moderada como inhibidores de la hPTP-1B recombinante (Li *et al.*, 2006).



Finalmente, otros ejemplos importantes de mencionar son los compuestos defostatina (*Streptomyces* sp) e hyrtiosal (*Hyrtios erectus*, esponja marina), este último compuesto merece particular atención porque además de actuar como un inhibidor no competitivo de la PTP-1B ( $\text{CI}_{50} = 4.2 \mu\text{M}$ ), actúa sobre la activación del complejo PI3K/AKT, en el transporte de glucosa y en la señalización de TGF/Smad2 (Imoto *et al.*, 1993).



## 2. Justificación y Objetivos

El presente trabajo de investigación forma parte de un proyecto enfocado en la búsqueda de metabolitos secundarios de origen vegetal, con un efecto sobre la enzima proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) con un posible uso en la terapéutica para el tratamiento de la diabetes (Rangel-Grimaldo *et al.*, 2020; Salinas-Arellano *et al.*, 2020; Díaz-Rojas *et al.*, 2021 y referencias ahí citadas).

En este contexto, el objetivo general es realizar la investigación química de la fracción soluble de acetato de etilo de la infusión de las hojas de *Piper auritum* Kunth (Piperaceae) con la finalidad de aislar e identificar a los compuestos con actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B.

Para el cumplimiento de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- a) Realizar la preparación del extracto acuoso a partir de las hojas de *P. auritum* mediante la técnica de infusión.
- b) Realizar el fraccionamiento preliminar del extracto acuoso mediante la técnica de reparto utilizando acetato de etilo como disolvente.
- c) Realizar el estudio químico de la fracción soluble de acetato de etilo utilizando métodos cromatográficos convencionales (CC, CCDP y/o HPLC).
- d) Establecer la naturaleza química de los principios aislados aplicando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- e) Realizar la evaluación de la actividad inhibitoria de los metabolitos puros aislados contra la enzima PTP-1B.

### 3. Parte experimental

#### 3.1 Ensayos biológicos.

##### 3.1.1 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre la enzima proteína tirosina fosfatasa 1 B (PTP-1B).

La evaluación de la actividad sobre la enzima proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) se realizó utilizando a la enzima *h*PTP-1B recombinante expresada en el gen PTPN1 (proteína no tirosina fosfatasa no receptora tipo 1 de *Homo sapiens*, ID gen: 5770) (Rangel, 2020 y referencias ahí citadas).

*Procedimiento.* Brevemente, todas las muestras y controles a ensayar se disolvieron en DMSO, MeOH o solución amortiguadora Tris-HCl (20 mM, pH 7). El ensayo se realizó en placas de Elisa de 96 pozos (250  $\mu$ L de capacidad), cada muestra de prueba en alícuotas entre 1-10  $\mu$ L, por triplicado, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con 5  $\mu$ L de la solución enzimática (1.56  $\mu$ g/mL). A continuación, se adicionaron 10  $\mu$ L del sustrato *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP; 30 mM); enseguida se determinó la absorbancia de las muestras, a tiempo cero, utilizando un lector de placas de ELISA, marca BIORAD modelo 680 a 415 nm. Posteriormente, la placa se incubó durante 15 min a 25°C; transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia con la finalidad de estimar el contenido de *p*-nitrofenol. La actividad de la enzima se determinó como el porcentaje de inhibición en comparación con el blanco (Tris-HCl) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% PTP-1B = 1 - (A_{415t} - A_{415c}) \times 100$$

Donde:  $\%PTP-1B$  es el porcentaje de inhibición,  $A_{415t}$  es la absorbancia corregida (final  $A_{415}$  - inicial  $A_{415}$ ), y  $A_{415c}$  es la absorbancia del blanco (final  $A_{415}$  - inicial  $A_{415}$ ).

Los valores de  $CI_{50}$  (concentración requerida para inhibir en un 50% la actividad de la enzima) se calcularon a partir del ajuste de las curvas obtenidas del porcentaje de inhibición vs concentración, utilizando el programa Origin 8.0.

## **3.2 Estudio químico de la infusión de *Piper auritum*.**

### **3.2.1 Material vegetal.**

Las hojas de la especie medicinal *Piper auritum* Kunth (Piperaceae) se adquirieron comercialmente en el mercado de Sonora, en la Ciudad de México, en Julio del 2019. La planta adquirida es cultivada en la comunidad de Ayala en el municipio de Huautla, en el estado de Morelos, para su comercialización en diferentes mercados de la zona centro del país. La identidad y la clasificación de la especie la realizó el M. en C. Sergio Palapa, una muestra de referencia (Voucher: 1457311) se depositó en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

### **3.2.2 Procedimientos generales de análisis.**

#### **3.2.2.1 Análisis cromatográficos.**

La cromatografía en columna abierta (CC) se realizó en columnas de vidrio sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula 0.063–0.200 mm, malla 70–230  $\mu\text{m}$  ASTM), utilizando diferentes sistemas de elución.

Los análisis cromatográficos por cromatografía en capa fina de tipo analítico (CCD) y preparativo (CCDP) se realizaron sobre placas de aluminio y/o de vidrio de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla 3.5–7.0  $\mu\text{m}$  ASTM) de diferentes dimensiones; estos análisis se realizaron de acuerdo con las técnicas convencionales y empleando diversos sistemas de elución (Spangenberg *et al.*, 2011). Como agente revelador se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal. Para desarrollar el color fue necesario calentar a 110°C las cromatoplacas durante un minuto.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters) equipado con los detectores PDA (arreglo de fotodiodos) y ELSD (evaporativo de dispersión de luz), una bomba cuaternaria, un sistema de inyección automático y/o manual, y un recolector de

fracciones automático. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower 3 (Waters). Los análisis a nivel analítico se realizaron a una temperatura de 40°C y a nivel preparativo a temperatura ambiente. La purificación de los compuestos se realizó empleando una columna empacada con gel de sílice (XBrigde® sílice gel) con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , con un diámetro interno de 19 mm y una longitud de 250 mm. La elución se realizó en un sistema gradiente con una mezcla binaria constituida por H<sub>2</sub>O (0.1% FA) (**A**)-ACN (**B**). Gradiente de elución: 0 min; 20% **B** a 60% **B** en 20 minutos con un flujo de 17.1 mL/min. Las longitudes de onda ( $\lambda$ ) utilizadas para la detección de los compuestos fueron 254 y 285 nm.

### **3.2.2.2 Caracterización de los productos naturales.**

De manera general la caracterización de los productos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. El registro de los espectros se efectuó en el Instituto de Química, UNAM.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de 400 MHz (<sup>1</sup>H) / 100 MHz (<sup>13</sup>C) se registraron en un equipo Varian Innova 400. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS), utilizado como estándar interno, utilizando CDCl<sub>3</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub> o CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> como disolventes.

Los espectros de masas generados por la técnica de ionización por electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo se registraron en un espectrómetro de masas SQD2 con un barrido de 100 a 1000 unidades de masa-carga (*m/z*) por segundo.

### **3.2.3 Preparación del extracto acuoso.**

La preparación del extracto acuoso se realizó a partir del material vegetal seco y molido (hojas, 5.0 g), mediante la técnica de infusión, empleando 250 mL de agua hirviendo. Posteriormente, este extracto, se dejó reposar a temperatura

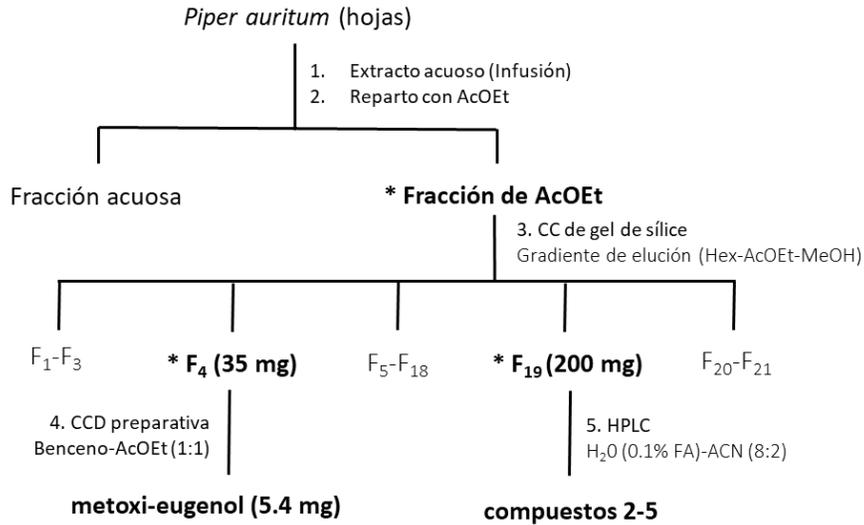
ambiente durante 20 minutos y se filtró. Al cabo de la filtración, el extracto acuoso se sometió a un proceso de reparto utilizando AcOEt como disolvente (2 × 250 mL). Las fases orgánicas resultantes se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. Este proceso se repitió cuantas veces fue necesario hasta obtener la cantidad de 1.4 g de un residuo café para la realización del estudio químico.

### **3.2.4 Fraccionamiento de la fracción soluble de acetato de etilo.**

La fracción soluble de acetato de etilo (1.3 g) se sometió a un fraccionamiento mediante una CC utilizando como adsorbente gel de sílice (225 g). El proceso de elución se efectuó utilizando hexano, mezclas de Hex-AcOEt, AcOEt y mezclas de AcOEt-MeOH en orden creciente de polaridad. Este proceso cromatográfico generó un total de 280 fracciones, de 75 mL cada una, que fueron reunidas de acuerdo con su similitud cromatográfica en un conjunto de 21 fracciones primarias (**F<sub>1</sub>-F<sub>21</sub>**). En el **Esquema 1** se resumen los procesos de extracción y fraccionamiento de las hojas de *P. auritum*.

#### **3.2.4.1 Aislamiento y purificación del metoxi-eugenol (1).**

El aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales presentes en la fracción **F<sub>4</sub>** [35 mg; Hex-AcOEt (9:1)] se realizó mediante una CCDP utilizando como sistema de elución una mezcla de benceno-AcOEt (1:1). Este proceso permitió la obtención de 5.4 mg de un aceite amarillo caracterizado como el metoxi-eugenol (**1**).

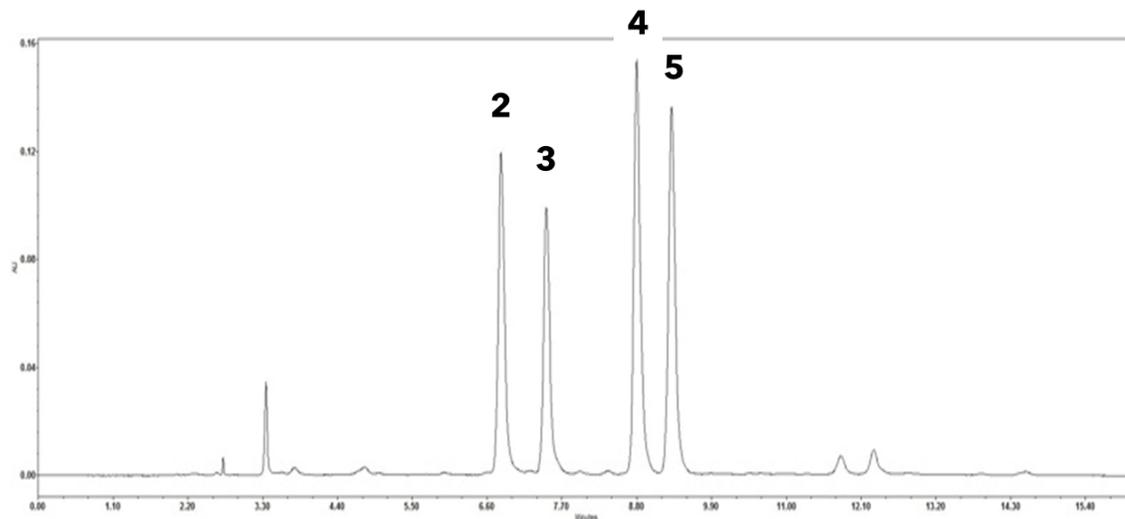


\* muestras activas contra la enzima PTP-1B

**Esquema 1.** Extracción y fraccionamiento de la infusión de las hojas de *P. auritum*.

### 3.2.4.2 Aislamiento de los productos 2–5.

Con la finalidad de obtener los principios mayoritarios presentes en la fracción primaria activa **F<sub>19</sub>** (100 mg), se realizó una separación mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). El cromatograma resultante se ilustra en la **Figura 7** y como se puede observar, la fracción contenía cuatro picos mayoritarios identificados como **2** (2.6 mg;  $t_R$  6.2 min), **3** (2.5 mg;  $t_R$  6.9 min), **4** (3.5 mg;  $t_R$  8.0 min) y **5** (5.6 mg;  $t_R$  8.5 min).



**Figura 7.** Cromatograma obtenido a nivel preparativo de la fracción **F**<sub>19</sub>. Condiciones de análisis: Columna XBrigde®; Sistema de elución H<sub>2</sub>O (0.1% FA) (**A**)-ACN (**B**) desde 20% **B** a 60% **B** en 20 min; flujo: 17.1 mL/min; Detector UV/visible,  $\lambda$  270 y 285 nm.

#### 4. Resultados y Discusión

La selección de la especie *P. auritum* se realizó con base en los trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación, con la finalidad de completar el estudio químico de la infusión, el preparado más utilizado en las prácticas médicas populares (Palapa, 2019). Los extractos orgánico y acuoso de la especie objeto de estudio fueron evaluados previamente para establecer su potencial anti diabético, antiinflamatorio y analgésico, en estas evaluaciones se pudo establecer que la planta ejerce un efecto antihiper glucémico, antinociceptivo, antiinflamatorio y antihiperalgésico en distintos modelos con ratones, validando el uso tradicional de la planta para el tratamiento de la diabetes y padecimientos dolorosos (Palapa, 2019).

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se siguió el siguiente protocolo:

- 1.- Preparación y fraccionamiento del extracto acuoso mediante las técnicas de infusión y de reparto con AcOEt, respectivamente.
- 2.- Evaluación *in vitro* del potencial inhibitorio de la fracción soluble de AcOEt sobre la enzima PTP-1B.
- 3.- Realización del fraccionamiento de la fracción soluble de AcOEt mediante CC.
- 4.- Aislamiento y purificación de los constituyentes mayoritarios presentes utilizando procesos cromatográficos convencionales.
- 5.- Caracterización de la estructura química de los constituyentes activos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- 6.- Evaluación de los compuestos puros aislados sobre la enzima PTP-1B.

La evaluación de la fracción soluble de AcOEt utilizando el ensayo descrito en el inciso **3.1.1** permitió establecer que la muestra presenta una excelente actividad inhibitoria contra la enzima PTP-1B (90% de inhibición). Como control positivo se empleó al ácido ursólico (1 mM). Con base en este resultado se estableció que la muestra posee principios activos inhibidores de la enzima PTP-1B.

Posteriormente, con la finalidad de separar y purificar a los constituyentes activos presentes en la fracción soluble de AcOEt, se realizó su fraccionamiento. Para ello, 1.3 g de la muestra se sometieron a un fraccionamiento primario mediante una CC utilizando gel de sílice como fase estacionaria. Este proceso generó 21 fracciones primarias.

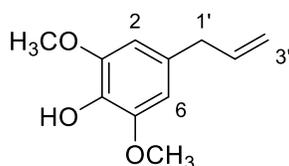
A partir de la fracción **F<sub>4</sub>** se purificó, mediante sucesivas CCDP, al metoxi-eugenol (**1**; 0.028%). Por otra parte, la resolución por HPLC (**Esquema 1** y **Figura 7**; parte experimental) de la fracción primaria **F<sub>19</sub>** (100 mg) condujo al aislamiento de los compuestos **2–5** con un rendimiento, relacionado al peso seco del material vegetal de 0.013, 0.012, 0.017 y 0.028%, respectivamente. Los compuestos **2–3** se identificaron mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas registradas para muestras auténticas (Girish *et al.*, 2016). En tanto que los productos **4–5** se encuentran en proceso de caracterización.

En consecuencia, en la presente sección se discutirán los aspectos más relevantes de la elucidación estructural de los productos caracterizados inequívocamente, así como los resultados preliminares obtenidos de la evaluación *in vitro* realizada.

#### 4.1 Caracterización de los productos aislados.

De manera general, la elucidación estructural de los compuestos obtenidos en el presente estudio se realizó mediante la aplicación de métodos modernos de espectroscopía y de espectrometría.

##### 4.1.1 Caracterización del metoxi-eugenol (**1**).



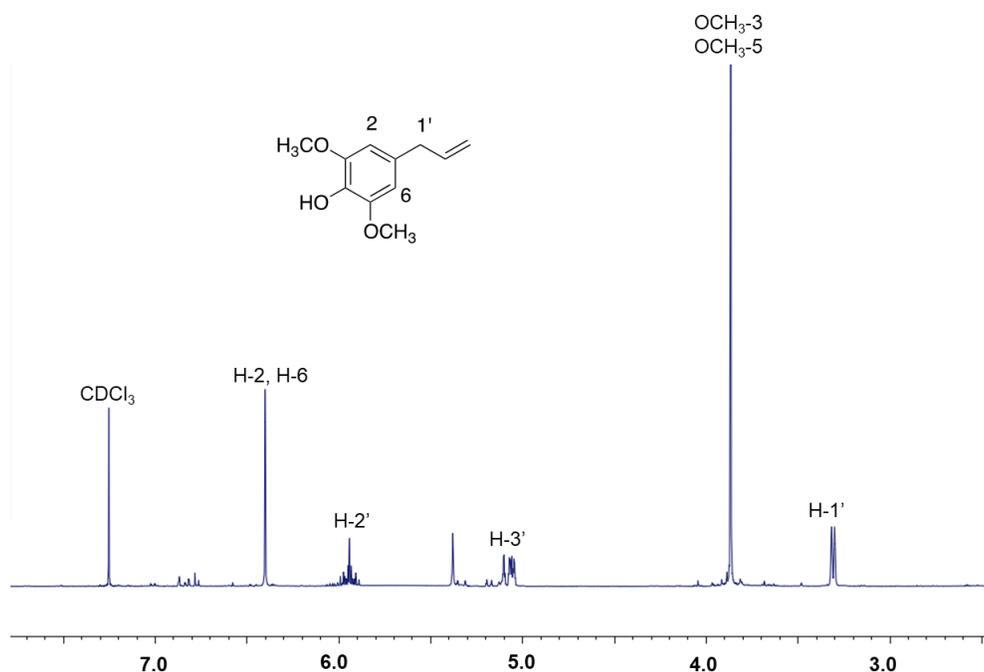
metoxi-eugenol (**1**)

El metoxi-eugenol (**1**) fue aislado como un residuo aceitoso. La información proporcionada por los espectros de RMN permitieron comprobar que el producto **1** presenta el perfil típico de un fenilpropanoide (Bohlmann *et al.*, 1983, 1985; Fuzzati *et al.*, 1995; Sugimoto *et al.*, 1995, *inter alia*). Las características más importantes observadas en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se resumen a continuación:

1.- En  $\delta_{\text{H}}$  6.4 (s, H-2 y H-6) se observan dos señales simples asignables a dos protones del anillo aromático del núcleo base, diagnósticos con la presencia de un anillo aromático trisustituido.

2.- En  $\delta_{\text{H}}$  3.88 se aprecian dos singuletes correspondientes a la presencia de dos grupos metoxilo.

3.- Finalmente, los espectros contienen señales diagnósticas para la cadena propanoide del núcleo base las cuales se observan como sistema ABCX. La parte ABC corresponde a los hidrógenos de una doble ligadura terminal y las absorciones correspondientes aparecen en:  $\delta_{\text{H}}$  5.08 (m, H-3a'), 5.39 (d,  $J = 17.0$ , H-3b') y 5.95 (td,  $J = 6.9$  y  $17.1$  Hz, H-2') en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 1). La parte X del sistema se asigna a los protones bencílicos presentes de la cadena lateral ( $\delta_{\text{H}}$  3.32, d, H-1'). Con base en las evidencias presentadas el producto natural fue caracterizado como el 1-(2'-propeno)-3,5-dimetoxi-4-hidroxi-benceno, y designado con el nombre trivial de metoxi-eugenol (**1**). El eugenol es un principio ampliamente utilizado en la industria perfumera, en la industria alimenticia (como agente de sabor), en la industria agrícola (como insecticida) y en la medicina (en la preparación de cemento dental y como anestésico local) (Houghton; 2001), y su derivado metilado **1** fue aislado por primera vez de la especie relacionada *Piper divaricatum* G. Mey, y a la fecha este es el segundo reporte de su aislamiento como producto natural.



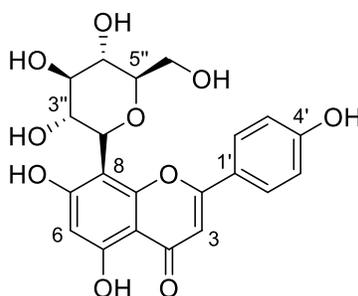
**Espectro 1.** <sup>1</sup>H-RMN del metoxi-eugenol (**1**) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

#### 4.1.2 Caracterización de la vitexina (**2**).

La vitexina (**2**), fue aislada como sólido amarillo. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del producto se resumen en la **Tabla 1**. Las constantes antes mencionadas, así como consideraciones de tipo quimiotaxonómico, permitieron sugerir la naturaleza flavonoide del compuesto (Girish *et al.*, 2016).

El espectro de masas generado por la técnica de electrospray, del compuesto **2** permitió establecer un ion molecular en una relación masa-carga ( $m/z$ ) en los modos positivo y negativo de  $[M + H]^+$  433.23 y  $[M - H]^-$  431.21 uma, el cual corresponde a la fórmula C<sub>21</sub>O<sub>10</sub>H<sub>20</sub>.

**Tabla 1.** Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la vitexina (2).



Fórmula molecular	C <sub>21</sub> O <sub>10</sub> H <sub>20</sub>
EM-ESI <i>m/z</i>	[M + H] <sup>+</sup> 433.23 [M - H] <sup>-</sup> 431.21
RMN- <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) 400 MHz (Espectro 2)	13.17 (s, 5-OH), 8.03 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, H-2', H-6'), 6.89 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, H-3', H-5'), 6.79 (s, H-3), 6.27 (s, H-6), 5.02 (sa, H-1''), 4.68 (m, H-2''), 3.84-3.24 (H-3''-H-6'').
RMN- <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) 100 MHz (Espectro 3)	182.1 (C-4), 164.0 (C-2), 162.7 (C-7), 161.2 (C-4'), 160.4 (C-5), 156.0 (C-9), 129.0 (C-2', C-6'), 121.6 (C-1'), 115.9 (C-3', C-5'), 104.6 (C-8), 104.1 (C-10), 102.5 (C-3), 98.2 (C-6), 81.9 (C-5''), 78.7 (C-3''), 73.4 (C-1''), 70.9 (C-2''), 70.5 (C-4''), 61.3 (C-6'').

El análisis detallado de los espectros de RMN (**Espectros 2 y 3**) permitieron evidenciar que el producto es un C-glucósido de flavona. Las características más relevantes observadas en los espectros se indican a continuación:

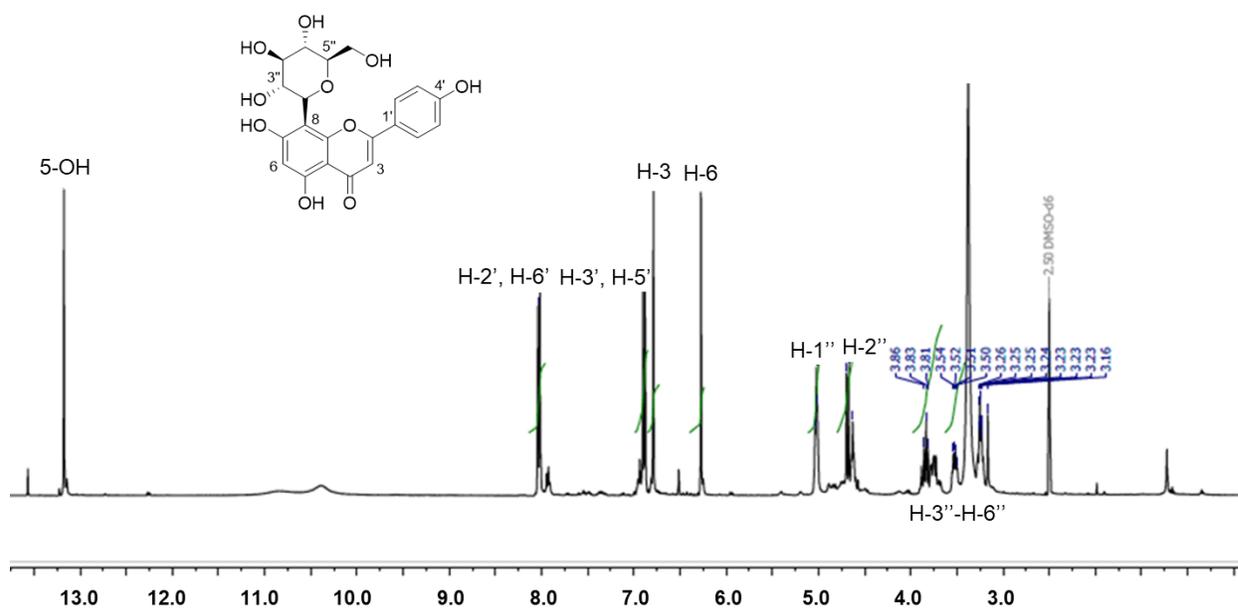
1.- En  $\delta_H$  13.17 (s) se observa una señal asignable para un grupo hidroxilo. El desplazamiento químico observado para esta señal sugirió que el hidroxilo se encuentra quelatado con un grupo carbonilo.

2.- En  $\delta_H$  8.03 (d, *J* = 9.0 Hz) y 6.89 (d, *J* = 9.0 Hz) se observa un sistema A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> congruente con la presencia de un anillo aromático *para* sustituido. Este anillo es asignable al anillo B ubicado en la posición C-2 del núcleo flavonoide, con la presencia de un grupo hidroxilo en C-4'.

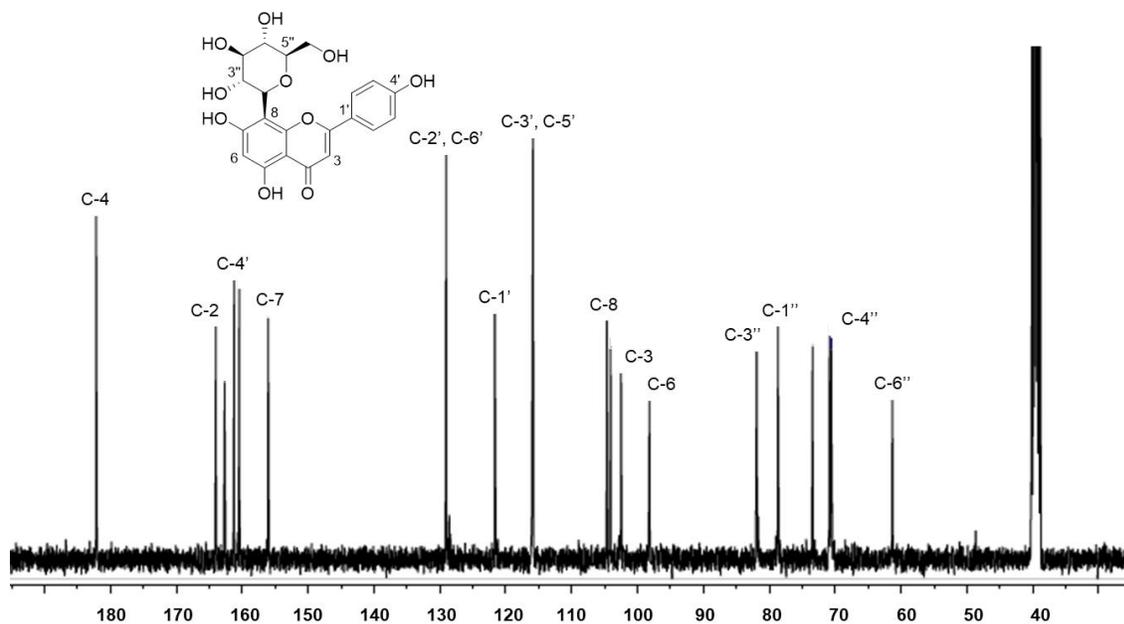
3.- De manera adicional, en la región aromática se aprecia una señal simple en  $\delta_H$  6.27 (s, H-6).

4.- En  $\delta_H$  6.79 (s, H-3) se observa un singulete asignable al protón H-3 de la flavona.

5.- Finalmente, en  $\delta_H$  3.16-4.67, se aprecian un conjunto de señales características con la presencia de un residuo de  $\beta$ -D-glucosa. Con base en las evidencias presentadas, el compuesto **2** se identificó como la vitexina, flavona previamente descrita en la especie *Piper marginatum* Jacq. (Parmar *et al.*, 1997). Cabe destacar que el aislamiento de este metabolito a partir de *P. auritum* constituye el primer reporte de su presencia en esta especie.



**Espectro 2.**  $^1\text{H}$ -RMN de la vitexina (**2**) (DMSO- $d_6$ , 400 MHz).



**Espectro 3.**  $^{13}\text{C}$ -RMN de la vitexina (**2**) ( $\text{DMSO-}d_6$ , 100 MHz).

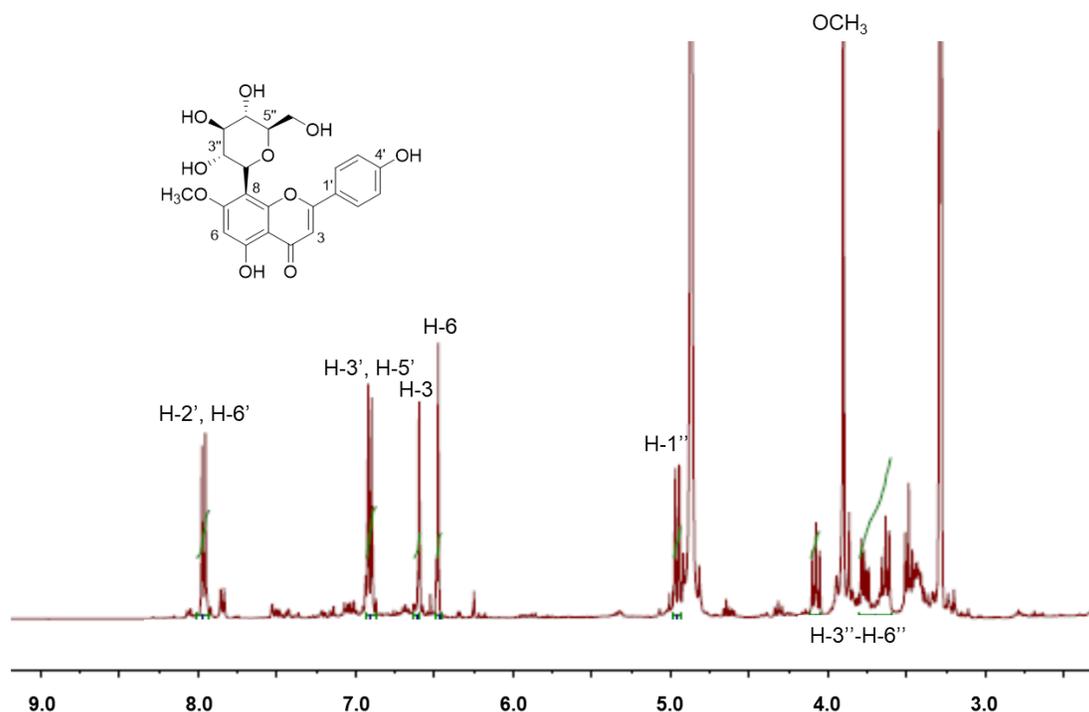
#### 4.1.3 Caracterización de la 7-O-metil-vitexina (**3**) y su isómero estructural (**4**).

El producto **3** se aisló como un líquido aceitoso amarillo. El análisis detallado de los espectros de RMN resultaron muy similares a los de la vitexina (**2**) en ambos casos permitieron evidenciar que ambos productos son derivados de flavona. La EM-ESI del producto natural permitió determinar la fórmula molecular del compuesto como  $\text{C}_{22}\text{O}_{10}\text{H}_{22}$  que permite doce grados de insaturación. El ion molecular fue observado en una relación de masa-carga ( $m/z$ ) en los modos positivo y negativo de  $[\text{M} + \text{H}]^+$  447.27 y  $[\text{M} - \text{H}]^-$  445.25 uma. Los espectros de RMN (**Tabla 2**; **Espectro 4**) de **3** presentaron el perfil característico de un C-glicósido de flavona (Girish *et al.*, 2016), observándose las siguientes señales en el producto **3**:

- En la región aromática del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se aprecian un conjunto de señales para un sistema  $\text{A}_2\text{B}_2$  *para* sustituido [ $\delta_{\text{H}}$  7.96 (H-2', H-6'), 6.91 (H-3', H-5')] y dos señales simples en [ $\delta_{\text{H}}$  6.59 (H-3) y 6.47 (H-6)].
- En la región comprendida en el intervalo  $\delta_{\text{H}}$  4.9-3.4 en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se aprecian señales para un residuo de  $\beta$ -D-glucosa. Así, la principal diferencia entre los espectros de RMN de los productos **2** y **3** radica en el desplazamiento a campos

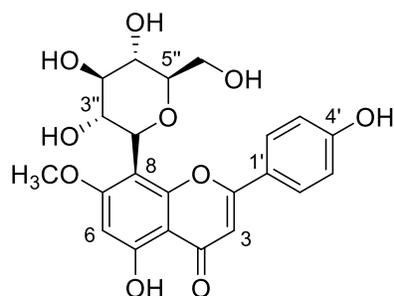
bajos de la señal simple en ( $\delta_H$  6.47, H-6) en **3**. Estas observaciones, aunadas a la diferencia de 14 unidades de masa en el EM permitieron establecer que el producto **3** es el 7-O-metil derivado de la vitexina designada con el nombre trivial de isoswertisina (**3**). Este producto fue aislado previamente de la especie *Peperomia obtusifolia* L. (Mota *et al.*, 2011) y las constantes espectroscópicas y espectrométricas se encuentran en perfecta armonía con las descritas en la literatura.

En el caso de los productos **4** y **5**, los iones moleculares observados en los espectros de masas en los modos positivo y negativo fueron  $[M + H]^+$  447.27 y  $[M - H]^-$  445.25 uma y  $[M + H]^+$  461.30 y  $[M - H]^-$  459.28 uma, respectivamente. Los datos espectrométricos del producto **4** permiten establecer que este compuesto es un isómero estructural del compuesto **3**. Sin embargo, a la fecha la caracterización estructural de estos productos se encuentra en proceso.



**Espectro 4.** <sup>1</sup>H-RMN de la 7-O-metil-vitexina (**3**) (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>, 400 MHz).

**Tabla 2.** Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 7-O-metil-vitexina (3).



Fórmula molecular	C <sub>22</sub> O <sub>10</sub> H <sub>22</sub>
EM-ESI <i>m/z</i>	[M + H] <sup>+</sup> 447.27 [M - H] <sup>-</sup> 445.25
RMN- <sup>1</sup> H (CH <sub>3</sub> OH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) 400 MHz (Espectro 4)	7.96 (2H, H-2', H-6'), 6.91 (2H, H-3', H-5'), 6.59 (1H, s, H-3), 6.47 (1H, s, H-6), 3.90 (s, OCH <sub>3</sub> ), 4.9-3.4 (β-D-glucosa).

## 4.2 Efecto de los productos naturales sobre la enzima PTP-1B.

Para determinar el efecto de los compuestos aislados sobre la enzima proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) se utilizó un ensayo espectrofotocolorimétrico utilizando como sustrato *p*-nitrofenil fosfato (*p*-NPP) (Rangel, 2020 y referencias ahí citadas). Este método se basa en la cuantificación del *p*-nitrofenol generado a partir de la hidrólisis del sustrato *p*-NPP en presencia de la PTP-1B. La cantidad de *p*-nitrofenol cuantificado correlaciona directamente con la actividad de la enzima.

Los resultados de las determinaciones (**Tabla 3**) indican que todos los productos evaluados **2–5** inhiben la actividad de la enzima PTP-1B de manera dependiente de la concentración. El compuesto **5** presentó la mayor actividad con un valor de  $CI_{50} = 0.31 \pm 0.16$  mM, comparado con el ácido ursólico ( $CI_{50} = 0.012 \pm 0.0037$  mM), conocido inhibidor de la PTP-1B empleado como control positivo (Jiménez *et al.*, 2020).

En conjunto estos resultados indican que estos productos al igual que otros flavonoides reportados en la literatura presentaron una actividad significativa contra la enzima PTP-1B.

**Tabla 3.** Efecto inhibitorio de los compuestos **2–5** aislados de *P. auritum* sobre la actividad de la enzima PTP-1B.

Muestra	Actividad (% de inhibición)		CI <sub>50</sub> (mM)
	200 ppm	1000 ppm	
Vitexina (2)	43.8	86.8	
7-O-metil-vitexina (3)	92.2	98.6	
Compuesto 4	88.6	100	
Compuesto 5			0.31 ± 0.16

Las flavonas caracterizadas como los componentes mayoritarios en la infusión de la planta podrían contribuir de manera importante con los efectos

antihiper glucémico, antinociceptivo, antiinflamatorio y antihiperalgésico relacionados con los diferentes reportes del uso tradicional de la planta para el tratamiento de la diabetes y padecimientos dolorosos (Palapa, 2019).

En numerosos estudios farmacológicos reportados en la literatura se ha demostrado el potencial terapéutico de la vitexina (**2**) como un importante agente antioxidante, antimicrobiano, antiviral, antinociceptivo, con propiedades antiinflamatorias. Otros estudios describen su efecto antineoplásico, antidiabético, y para tratar déficits cognitivos, depresores y trastornos metabólicos. Así como su efecto protector contra algunas enfermedades cardiovasculares y el Alzheimer (Miao *et al.*, 2016).

Otros reportes describen el potencial de la 7-O-metil-vitexina (**3**) como agente antiinflamatorio, antioxidante, antidiabético, hepatoprotector y antidepresivo. Además, se reporta su actividad contra el virus respiratorio sincitial (VRS), inhibidor de la enzima ureasa, de interés en el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer y otros padecimientos endócrinos (Peng *et al.*, 2013).

## 5. Conclusiones

- a) La especie medicinal *Piper auritum* es una fuente potencial de compuestos activos, de interés en la terapéutica para el tratamiento de la diabetes.
  
- b) El fraccionamiento de la infusión obtenida a partir de las hojas de *P. auritum* permitió el aislamiento y la caracterización de un fenilpropanoide (metoxi-eugenol, **1**) y de cuatro metabolitos pertenecientes a la categoría de los flavonoides, dos de ellos caracterizados como la vitexina (**2**) y la 7-O-metil-vitexina (**3**), y los productos **4** y **5** se encuentran en proceso de caracterización. Los compuestos **2–5** presentan una importante actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B.
  
- c) Finalmente, el presente trabajo constituye una aportación original al conocimiento químico y a la actividad biológica como inhibidores de la enzima PTP-1B de los compuestos aislados a partir de la especie objeto de estudio.

## 6. Perspectivas

- a) Finalizar la caracterización de los productos **4** y **5** aislados en el presente estudio. Es importante destacar que el compuesto **5** presentó la mejor actividad contra la enzima PTP-1B con un valor de  $CI_{50}$  de 0.31 mM.
  
- b) Realizar el cálculo de las concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$ ) de los productos **2-4** evaluados contra la enzima PTP-1B.
  
- c) Completar el perfil cromatográfico por HPLC de la fracción soluble de AcOEt para identificar a los demás componentes presentes en el preparado analizado.
  
- d) Finalizar el estudio químico de la fracción soluble de AcOEt.

## 7. Referencias

- Bohlmann, F., Ahmend, M., Grenz, M., King, R., Robison, H. **1983**. Bisabolene derivatives and other constituents from *Coreopsis* species. *Phytochemistry* 22, 2858–2859.
- Bohlmann, F., Banerjee, S., Jakupovic, J., King, R., Robison, H. **1985**. Bisabolene derivatives and acetylenic compounds from Peruvian *Coreopsis* species. *Phytochemistry* 24, 1295–1297.
- Burchell, A., Cain, D.I. **1985**. Rat hepatic microsomal glucose-6-phosphatase protein levels are increased in streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 28, 852–856.
- Bustanji, Y., Taha, M.O., Al-Masri, I.M., Mohammad, M.K. **2009**. Docking simulations and *in vitro* assay unveil potent inhibitory action of papaverine against protein tyrosine phosphatase 1B. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32(4), 640–645.
- Bustanji, Y., Taha, M.O., Yousef, A.M., Bakri, A.G.A. **2006**. Berberine potently inhibits protein tyrosine phosphatase 1B: Investigation by docking simulation and experimental validation. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 21(2), 163–171.
- Chen, R.M., Hu, L.H., An, T.Y., Li, J., Shen, Q. **2002**. Natural PTP1B Inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12(23), 3387–3390.
- Cui, L., Ndinteh, D.T., Na, M., Thuong, P.T., Silike-Muruumu, J., Njamien, D., Mbafor, J.T., Fomum, Z.T., Ahn, J.S., Oh, W.K. **2007**. Isoprenylated flavonoids from the stem bark of *Erythrina abyssinica*. *Journal of Natural Products* 70(6), 1039–1042.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Ángeles-López, G., Navarrete, A., Mata, R. **2007**. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 110(2), 334–342.

- Díaz-Rojas, M., González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J., Rangel-Grimaldo, M., Rivero-Cruz, I., Mata, R. **2021**. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the fungus *Malbranchea albolutea*. *Phytochemistry* 184, 112664.
- Estrada-Reyes, R., Dorantes-Barrón, A.M., Arrieta-Báez, D., Gómez-Patiño, M.B., Bernal-Trujillo, A., Castro-García, M., Carro-Juárez, M., Martínez-Mota, L. **2019**. *Piper auritum* Kunth (Piperaceae) improves the sexual performance of sluggish male rats through enhancing ejaculation. *Journal of Ethnopharmacology* 231, 453–463.
- Fuzzatti, N., Sutarjadi, W., Dyatmiko, W., Rahman, A., Hostettmann, K. **1995**. Phenylpropane derivatives from roots of *Cosmos caudatus*. *Phytochemistry* 39, 409–412.
- Girish, T.K., Kumar, K.A., Prasada-Rao, U.J.S. **2016**. C-Glycosylated flavonoids from black gram husk: Protection against DNA and erythrocytes from oxidative damage and their cytotoxic effect on HeLa cells. *Toxicology Reports* 3, 652–663.
- Houghton, P. **2001**. Old yet New Pharmaceuticals from Plants. *Journal of Chemical education* 78, 175–184.
- Imoto, M., Kakeya, H., Sawa, T., Chigusa, H., Hamada, M., Takeuchi, T., Umezawa, K. **1993**. Dephostatin, a novel proteintyrosine phosphatase inhibitor produced by *Streptomyces*. *Journal of Antibiotics* 46(9), 1342–1346.
- Jiménez-Arreola, B.S., Aguilar-Ramírez, E., Cano-Sánchez, P., Morales-Jiménez, J., González-Andrade, M., Medina-Franco, J.L., Rivera Chávez, J. **2020**. Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: Insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chemistry* 101, 103893.
- Kunth, D., Campos, C., Maure, O.B.T., Madyu, M. **2018**. Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de *Piper auritum* Kunth. *Journal of Agriculture Research* 22(1), 77–90.
- Lakshmi, B.S., Sujatha, S., Anand, S., Sangeetha, K.N., Narayanan, R.B., Katiyar, C., Kanaujia, A., Duggar, R., Singh, Y., Srinivas, K., Bansal, V., Sarin, S., Tandon, R., Sharma, S., Singh, S. **2009**. Cinnamic acid, from the bark of

*Cinnamomum cassia*, regulates glucose transport via activation of GLUT4 on L6 myotubes in a phosphatidylinositol 3-kinase-independent manner. *Journal of Diabetes* 1(2), 99–106.

- Li, S., An, T.Y., Li, J., Shen, Q., Lou, F.C., Hu, L.H. **2006**. PTP1B inhibitors from *Saussurea lappa*. *Journal of Asian Natural Products Research* 8(3), 281–286.
- Mata, R., Morales, I., Pérez, O., Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Enríquez-Mendoza, I., Bye, R., Franzblau, S., Timmermann, B. **2004**. Antimycobacterial Compounds from *Piper sanctum*. *Journal of Natural Products* 67(12), 1961–1968.
- Márquez, C., Lara Ovjoa, F., Esquivel, R., Mata, R. **1999**. Plantas Medicinales de México II. UNAM, México. pp. 61, 99.
- Martínez, **1979**. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. pp 446, 875, 1081, 1150.
- Miao, H., Jia-Wei, M., Wei-Lin, K., Xiao-Hua, H., Jun-Xu, L., Bi-Wen, P. **2016**. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Phytotherapy* 115, 74–85.
- Montalvo, V.R., Lagarto, P.A. **1999**. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto de *Piper auritum* H.B.K. y toxicidad aguda oral. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1(4), 11–14.
- Mota, J.S., Leite, A.C., Kato, M.J., Young, M.C.M., Bolzani, V.S., Furlan, M. **2011**. Isoswertisin flavones and other constituents from *Peperomia obtusifolia*. *Research of natural products* 25(1), 1–7.
- Na, M., Cui, L., Min, B.S., Bae, K., Yoo, J.K., Kim, B.Y., Oh, W.K., Ahn, J.S. **2006**. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of triterpenes isolated from *Astilbe koreana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16(12), 3273–3276.
- Na, M., Hoang, D.M., Njamen, D., Mbafor, J.T., Fomum, Z.T., Thuong, P.T., Ahn, J.S., Oh, W.K. **2007**. Inhibitory effect of 2-arylbenzofurans from *Erythrina addisoniae* on protein tyrosine phosphatase-1B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17(14), 3868–3871.

- Na, M., Oh, W.K., Kim, Y.H., Cai, X.F., Kim, S., Kim, B.Y., Ahn, J.S. **2006**. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by diterpenoids isolated from *Acanthopanax koreanum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16(11), 3061–3064.
- Neira-González, A.M., Gutiérrez-Pérez, R.M., Cotera-Flores, L.B. **2014**. Antidiabetic activity of *Piper auritum* leaves in streptozotocin-induced diabetic rat, beneficial effect on advanced glycation and product. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 1–10.
- Ong, K.W., Hsu, A., Song, L., Huang, D., Tan, B.K.H. **2011**. Polyphenols-rich *Vernonia amigdalina* shows anti-diabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 133(2), 598–607.
- Palapa, S. **2019**. Potencial hipoglucemiante, antinociceptivo y antiinflamatorio de *Piper auritum* Kunth. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (<http://132.248.9.195/ptd2018/octubre/0781446/Index.html>).
- Parmar, V., Jain, S., Subhash, C., Bisht, K., Jain, S.J., Taneja, R., Jha, P., Tyagi, A., Prasad, O.D., Wengel, A.K., Olsern, J., Boll, C.E., Per, M. **1997**. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46(4), 597–673.
- Peng, Z., Yong, Z., Chen, P., Qi, J., Fujiang, G., Yiming, L., Weiliang, Z., Kaixian, C. **2013**. Advances in studying of the pharmacological activities and structure-activity relationships of natural C-glycosylflavonoids. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 3(3), 154–162.
- Pérez, N. **2003**. Compuestos biodinámicos de *Flourensia cernua* (Asteraceae) y de los tallos de *Piper sactum* (Piperaceae). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (<http://132.248.9.195/ppt2002/0315265/0315265.pdf>).
- Pineda, R., Vizcaíno, S., García, C., Gi, J., Durango, D. **2012**. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonij* D.C. against phytopatogenic fungi. *Chilean Journal of Agriculture Research* 72(4), 507–515.

- Rangel, M. **2020**. Especies selectas de ascomicetos como una fuente de inhibidores de las enzimas alfa-glucosidasas y proteína tirosina fosfatasa 1B. Tesis de doctorado. Posgrado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (<http://132.248.9.195/ptd2020/junio/0802086/Index.html>).
- Rangel-Grimaldo, M., Macías-Rubalcava, M., González-Andrade, M., Raja, H., Figueroa, M., Mata R. **2020**.  $\alpha$ -Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors from *Malbranchea circinata*. *Journal of Natural Products* 83(3), 675–683.
- Salinas-Arellano, E., Pérez-Vásquez, A., Rivero-Cruz, I., Torres-Colín, R., González-Andrade, M., Rangel-Grimaldo, M., Mata R. **2020**. Flavonoids and terpenoids with PTP-1B inhibitory properties from the infusion of *Salvia amarissima* Ortega. *Molecules* 25(15), 3530.
- Spangenberg, B., Poole, C.F., Weins, C. **2011**. Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey. 5th edition, London New York: Springer.
- Sugimoto, N., Goto, Y., Akao, N., Kiuchi, F., Kondo, K., Tsuda, Y. **1995**. Mobility Inhibition and Nematocidal Activity of Asarone and Related Phenylpropanoids on Second-Stage Larvae of *Toxocara canis*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 40(6), 1569–1572.
- Tanaka, T., Asai, F., Linuma, M. **1998**. Phenolic from *Peperomia obtusifolia*. *Phytochemistry* 49(1), 229–232.
- Thareja, S., Agarwal, S., Bhardwaj, T.R., Kumar, M. **2012**. Protein Tyrosine Phosphatase 1B inhibitors: A molecular level legitimate approach for the management of diabetes mellitus. *Medicinal Research Reviews* 32(3), 459–517.
- Torres, M. **2001**. Compuestos aromáticos simples de *Piper sanctum* (Miq.) Schl. (Piperaceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (<http://132.248.9.195/ppt2002/0317460/Index.html>).