



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Estudio Químico y Farmacológico de *Peniocereus greggii* (Engelm.) Britton & Rose**

**(Cactaceae)**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**M. en C. Rosa Jenifer Muñoz Gómez**

**Tutora principal: Dra. Rachel Mata Essayag**

**Facultad de Química, U.N.A.M.**

**Miembros del comité tutorial: Dra. Berenice Ovalle Magallanes**

**Facultad de Química, U.N.A.M.**

**Miembros del comité tutorial: Dr. Ricardo Reyes Chilpa**

**Instituto de Química, U.N.A.M.**

**Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Septiembre 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Dr. Leovigildo Quijano

**Vocal:** Dr. Andrés Navarrete Castro

**Vocal:** Dr. Ricardo Reyes Chilpa

**Vocal:** Dr. Adolfo Andrade Cetto

**Secretario:** Dra. Helgi Helen Francisca Junk Cook

## **LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO DE TESIS:**

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

## **PUBLICACIÓN**

Muñoz-Gómez, R. Jenifer; Rivero-Cruz, Isabel; Ovalle-Magallanes, Berenice; Linares, Edelmira; Bye, Robert; Tovar, Armando R.; Noriega, Lilia G.; Tovar Palacio, Claudia; Mata, Rachel. Antidiabetic sterol from *Peniocereus greggii* roots. ACS omega, **2022**, 7, 15, pág.: 13144–13154.

## **CONGRESOS**

Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Cartel: Antidiabetic sterol from *Peniocereus greggii* roots. Julio **2022**. Charleston, Carolina del Sur, Estados Unidos.

---

M. en C. Rosa Jenifer Muñoz Gómez

Sustentante

---

Dra. Rachel Mata Essayag

Tutora

# DEDICATORIAS

*A mis padres, Raúl y Rosa, por ser un excelente ejemplo de sacrificio y esfuerzo, por su apoyo incondicional a largo de toda mi vida, gracias.*

*A mis hermanos Luis y Raúl, por ser mis cómplices más leales y apoyarme en las buenas y en las malas, por su amor, comprensión y confianza, gracias.*

*A Erika, por ser mi confidente, amiga, madre y cómplice, dankeschön, habe ich dich lieb.*

*A los que están y estuvieron, que me demostraron su apoyo y cariño, muchas gracias.*

**We can be heroes just for one day**

**Bowie, 1977.**



## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que a través de su Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, me proporcionó todos los recursos para continuar y enriquecer mi formación académica y profesional. Gracias por la aventura más grande de mi vida, y por este sitio al cual puedo llamar hogar.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado con el número de becario (735296).
- Al CONACyT y a DGAPA-UNAM por el financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACyT (CY011226) y DGAPA-UNAM (217320).
- A la Dra. Rachel Mata, le agradezco infinitamente por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, gracias por ser una tutora excelente y brindarme su apoyo incondicional, y un ejemplo que seguir.
- A la Dra. Isabel Rivero Cruz, gracias por su valiosa asesoría y ayuda incondicional. Gracias por confiar en mí y darme valiosos consejos que han marcado mi vida académica y personal.
- A la Dra. Berenice Ovalle Magallanes, gracias por ser un pilar en este trabajo de investigación. Gracias por brindarme su valiosa amistad y ayuda incondicional. Gracias por confiar en mí y darme valiosos consejos que han marcado mi vida académica y personal.
- A la Dra. Araceli Pérez Vásquez, por su asesoría técnica relevante durante el desarrollo de este proyecto de investigación.
- Al Dra. Claudia Tovar Palacio, por su invaluable asesoría durante la realización de las pruebas *in vitro* de secreción de insulina.
- A la Dra. Lilia G. Noriega, por su valiosa asesoría en la realización de los experimentos de función mitocondrial.

- A los Dres. Edelmeria Linares y Robert Bye, por la adquisición e identificación del material vegetal utilizado en el presente estudio, y por la información etnobotánica proporcionada.
- A los miembros de mi comité tutorial, por sus valiosos consejos en este proyecto de investigación.
- A los miembros del jurado asignado, por sus valiosos comentarios y acertadas observaciones.
- A mis compañeros del Laboratorio 124 por su apoyo incondicional.

# ÍNDICE

DEDICATORIAS .....	3
AGRADECIMIENTOS .....	4
ÍNDICE.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABLAS.....	17
RESUMEN .....	18
ABSTRACT .....	20
I. ANTECEDENTES.....	21
1.1 Metabolismo energético.....	21
1.2 Regulación del metabolismo de glucosa.....	22
1.2.1 Tras la ingesta de alimentos .....	22
1.2.2 Secreción de insulina.....	24
1.2.3 Translocación de GLUT4 mediada por insulina.....	25
1.2.4 Ayuno y secreción de glucagón .....	27
1.2.5 Función de glucagón .....	29
1.2.6 Producción de ATP .....	30
1.2.7 Glucólisis y ciclo de Krebs.....	31
1.2.8 Fosforilación oxidativa.....	32
1.2.9 Producción anaeróbica de ATP y ciclo de Cori.....	34
1.3 Resistencia a la insulina.....	35
1.3.1 Factores de riesgo que promueven la resistencia a la insulina.....	36
1.3.1.1 Obesidad e inflamación .....	36
1.3.1.2 Interacción hormonal.....	36

1.3.1.3 Disfunción mitocondrial.....	37
1.3.1.4 Estrés del retículo endoplasmático (RE) .....	38
1.3.1.5 Estilo de vida .....	39
1.3.1.6 Embarazo .....	40
1.4 Prediabetes .....	40
1.5 Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).....	41
1.5.1 Complicaciones de la DMT2.....	41
1.5.2 Tratamiento para DMT2.....	43
1.5.2.1 Agentes sensibilizadores de insulina.....	45
1.5.2.1.1 Biguanidas .....	45
1.5.2.1.2 Tiazolidinedionas (TZD) .....	45
1.5.2.2 Secretagogos de insulina.....	46
1.5.2.2.1 Sulfonilureas y meglitinidas.....	46
1.5.2.2.2 Miméticos de incretinas e inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa 4 (IDPP-4) .....	47
1.5.2.3 Inhibidores de las enzimas $\alpha$ -glucosidasas .....	48
1.5.2.4 Bloqueadores el cotransportador de glucosa-sodio tipo 2 (SGLT2) .....	48
1.5 Plantas medicinales para el tratamiento de la DMT2.....	49
1.6 Antecedentes del género <i>Peniocereus</i> .....	50
1.6.1 <i>Peniocereus greggii</i> (Engelm.) Britton & Rose (Cactaceae).....	51
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	54
III. HIPÓTESIS .....	56
IV. OBJETIVO GENERAL.....	56
V. OBJETIVOS PARTICULARES Y METAS.....	57
VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	59
6.1 Material vegetal .....	59

6.2 Preparación de extractos y esencia.....	59
6.3 Estudio químico de <i>P. greggii</i> .....	60
6.3.1 Análisis cromatográficos y caracterización de los productos naturales .....	60
6.3.2 Fraccionamiento de los extractos orgánicos EC1 y EC2.....	62
6.3.3 Aislamiento del $\beta$ -sitosterol, $\beta$ -D-glucositosterol, peniocerol ( <b>2</b> ), viperidinona ( <b>5</b> ) y 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona ( <b>6</b> ) .....	62
6.3.4 Aislamiento de la desoxiviperidona ( <b>3</b> ) y viperidona ( <b>4</b> ).....	63
6.3.5 Rayos X del compuesto <b>2</b> .....	64
6.3.6 Cálculos teóricos.....	64
6.4 Evaluación farmacológica de la DPG y/o compuestos puros en ratones.....	65
6.4.1 Inducción experimental de hiperglucemia y determinación de la glucemia en ensayos de tipo agudo.....	66
6.4.2 Evaluación de la toxicidad aguda.....	67
6.4.3 Efecto hipoglucemiante agudo de la DPG.....	67
6.4.4 Pruebas de tolerancia oral a la glucosa y a la sacarosa .....	68
6.4.5 Prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal.....	69
6.5 Evaluaciones <i>in vitro</i> .....	69
6.5.1 Ensayo en células (C2C12 e INS-1E).....	69
6.5.2 Secreción de insulina en células INS-1E .....	70
6.5.3 Función mitocondrial en células C2C12 .....	70
6.6 Análisis estadístico.....	71
6.7 Pruebas de composición. ....	71
6.7.1 Desarrollo y validación del método analítico .....	71
6.7.1.1 Preparación de la matriz de trabajo.....	71
6.7.1.2 Validación del método analítico .....	72
6.7.1.2.1 Linealidad del sistema .....	72
6.7.1.2.2 Linealidad de método y exactitud.....	72
6.7.1.2.3 Precisión del sistema .....	73

6.7.1.2.4 Límite de detección y límite de cuantificación .....	73
6.7.1.2.5 Cuantificación de la desoxiviperidona ( <b>3</b> ) y la viperidona ( <b>4</b> ).....	74
6.8 Determinación de las propiedades biofarmacéuticas de los componentes mayoritarios.....	74
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	75
7.1 Evaluación de la inocuidad y eficacia preclínica.....	75
7.1.1 Inocuidad .....	75
7.1.2 Evaluación de la eficacia preclínica.....	76
7.1.2.1 Evaluación del potencial antidiabético .....	76
7.1.2.1.1 Evaluación del efecto hipoglucemiante agudo.....	77
7.1.2.1.2 Evaluación del efecto antihiper glucémico .....	78
7.2 Obtención de los metabolitos activos de <i>P. greggii</i> .....	80
7.2.1 Elucidación estructural de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona ( <b>6</b> ).....	81
7.2.2 Caracterización estructural de los compuestos <b>2-5</b> .....	84
7.3 Evaluación farmacológica de los productos aislados .....	88
7.3.1 Evaluación de la actividad antidiabética del compuesto <b>3</b> .....	88
7.3.2 Efecto de los compuestos <b>2, 3 y 6</b> en la secreción de insulina <i>in vitro</i> .....	90
7.3.3 Función mitocondrial de los compuestos <b>2, 3 y 6</b> .....	91
7.4 Establecimiento de las pruebas químicas de identidad y composición .....	95
7.4.1 Composición química del aceite esencial .....	95
7.4.2 Desarrollo del método analítico.....	96
7.4.3 Validación de método analítico para la cuantificación simultánea de <b>3 y 4</b> .....	98
7.4.4 Cuantificación de la desoxiviperidona ( <b>3</b> ) y la viperidona ( <b>4</b> ).....	102
8. Cálculo de los parámetros fisicoquímicos y biofarmacéuticos de los compuestos aislados .....	103
VIII. CONCLUSIONES .....	106
IX. APÉNDICE I.....	108

9.1 Estudio químico de la especie <i>Opuntia sp.</i> .....	108
9.2 Antecedentes de <i>Opuntia sp.</i> .....	108
9.3 Metodología.....	110
9.3.1 Obtención de las fracciones primarias .....	110
9.3.2 Análisis por UPLC-EM-ESI de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH.....	110
9.3.3 Análisis por HRESIMS de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH .....	110
9.2.3 Análisis por IR de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH.....	111
9.2.4 Análisis por <sup>1</sup> H-RMN de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH .....	111
9.2.5 Aislamiento del ácido eucómico ( <b>1</b> ).....	111
9.3 Resultados.....	112
9.3.1 Fraccionamiento primario y análisis por ccd .....	112
9.3.2 Análisis por UPLC-EM-ESI de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH.....	112
9.2 Análisis por HRESIMS de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH .....	115
9.4 Análisis en el infrarrojo (IR) de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH.....	116
9.5 Análisis por RMN de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH .....	118
9.6 Análisis por HPLC-EM de la baba de nopal .....	120
9.4 Conclusiones del estudio químico de <i>Opuntia sp.</i> .....	120
X. ANEXO .....	121
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	137
XII PUBLICACIÓN .....	148

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Area bajo la curva
AC	Adenilato ciclasa
AcOEt	Acetato de etilo
AGIs	Inhibidores de las $\alpha$ -glucosidasas
AGL	Acidos grasos libres
AKT	Cinasa de serina/treonina
AMPK	Cinasa activada por AMP
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ATF-6	Factor activador de la transcripción 6
ATP	Adenosín trifosfato
BuOH	Butanol
cca	Cromatografía en columna abierta
ccd	Cromatografía en capa delgada
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
UPLC	Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia
DG	Diacilglicerol
DMT1	Diabetes Mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
DPG	Decocción de las raíces de <i>P. greggii</i>
DPP4	Enzima dipeptidilpeptidasa 4
EM	Espectrometría de Masas
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Administración de Alimentos y Medicamento de los E.U.A.
FID	Federación Internacional de Diabetes
G6P	Glucosa-6-fosfato



GI	Gastrointestinal
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
GLI	Glibenclamida
GLP -1	Péptido relacionado al glucagón tipo 1
GLUT	Transportadores de glucosa
IDPP4	Inhibidores de las enzimas de la dipeptidilpeptidasa 4
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL	Interleucinas
IR	Espectroscopía en el infrarrojo
IRE-1	Cinasa endorribonucleasa 1 que requiere inositol
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina tipo 1
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LDH	Lactato deshidrogenasa
LKB1	Cinasa hepática
MeOH	Metanol
MTF	Metformina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
PDK1	Proteína cinasa D1
PERK	Cinasa que se activa por el ARN de doble cadena
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa tipo 1
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PPAR	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
PTOG	Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa

PTOS	Prueba de Tolerancia Oral a la Sacarosa
PTII	Prueba de Tolerancia a la Insulina Intraperitoneal
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistencia a la insulina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SGLT	Sistemas de cotransporte de glucosa acoplados a Na <sup>+</sup>
SOCS-3	Supresor de la señalización de citocinas
SUR1	Receptor de sulfonilurea tipo 1
TIC	Cromatograma de corriente iónica total
TNF	Factor de necrosis tumoral
TZD	Tiazolidinedionas
UPR	Respuesta a las proteínas mal plegadas
UV	Espectroscopía en el UV

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1.</b>	Mecanismo de secreción de insulina en las células $\beta$ pancreáticas	25
<b>Figura 2.</b>	Translocación de GLUT4 mediada por insulina en células musculares	26
<b>Figura 3.</b>	Mecanismo de secreción de glucagón mediado por glucosa	29
<b>Figura 4.</b>	Diagrama del efecto de glucagón en el hepatocito	30
<b>Figura 5.</b>	Glucólisis y ciclo de Krebs	32
<b>Figura 6.</b>	Fosforilación oxidativa para la producción de ATP	33
<b>Figura 7.</b>	Ruta anaeróbica para la producción ATP y metabolismo de glucosa	35
<b>Figura 8.</b>	Estrés del retículo y su asociación con el desarrollo a la resistencia a la insulina	39
<b>Figura 9.</b>	Complicaciones micro y macrovasculares de la DMT2	43
<b>Figura 10.</b>	Mecanismos farmacológicos de los antidiabéticos orales más utilizados para la DMT2.	44
<b>Figura 11.</b>	<i>Peniocereus greggii</i> var. <i>greggii</i> (Engelm.) Britton & Rose [Cactacea]	52
<b>Figura 12.</b>	Muestra botánica de <i>Peniocereus greggii</i>	53
<b>Figura 13.</b>	Efecto hipoglucemiante agudo de la decocción de <i>P. greggii</i> (DPG) en ratones normoglucémicos ( <b>Panel A</b> ) e hiperglucémicos de 10 días ( <b>Panel B</b> )	78
<b>Figura 14.</b>	Prueba de tolerancia a la glucosa oral de la decocción de <i>P. greggii</i> (DPG) en ratones normoglucémicos ( <b>Panel A</b> ) e hiperglucémicos de 5 días ( <b>Panel B</b> )	79
<b>Figura 15.</b>	Prueba de tolerancia a la sacarosa oral de la decocción de <i>P. greggii</i> (DPG) en ratones normoglucémicos	80

<b>Figura 16.</b>	Estructuras químicas de los compuestos <b>2 - 6</b> aislados de las raíces de <i>P. greggii</i> , la macedougallina ( <b>1</b> ) compuesto reportado anteriormente para la especie y la calonisterona ( <b>7</b> )	81
<b>Figura 17.</b>	Correlaciones claves de los experimentos HMBC (azul) y NOESY (rojo) para el compuesto <b>6</b>	82
<b>Figura 18.</b>	Espectros de dicroísmo circular electrónico (DCE) experimental del compuesto <b>6</b>	83
<b>Figura 19.</b>	Difracción de rayos X del peniocerol ( <b>2</b> )	85
<b>Figura 20.</b>	Efecto del compuesto <b>3</b> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos ( <b>Panel A</b> ) e hiperglucémicos ( <b>Panel B</b> ) en el modelo de tolerancia a la glucosa oral (PTGO)	88
<b>Figura 21.</b>	Prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal (PTII) de la desoxiviperidona ( <b>3</b> ) en ratones hiperglucémicos de 23 días	89
<b>Figura 22.</b>	Efecto de los compuestos <b>2, 3 y 6</b> en la secreción de insulina <i>in vitro</i> en células INS-1E	90
<b>Figura 23.</b>	Actividad de los compuestos <b>2, 3 y 6</b> en las tasas de consumo de oxígeno ( <b>A, C y E</b> ) y de acidificación extracelular ( <b>B, D y F</b> ) en células de miotubulos de ratón C2C12	93
<b>Figura 24.</b>	Cursos temporales de las tasas de consumo de oxígeno ( <b>A, C y E</b> ) y de acidificación extracelular ( <b>B, D y F</b> ) en células de miotubulos de ratón C2C12 de los compuestos <b>2, 3 y 6</b>	94
<b>Figura 25.</b>	Cromatograma de gases y cromatografía en capa delgada correspondiente al aceite esencial obtenido de las raíces de <i>P.greggii</i> (LOTE 1) analizado en una columna capilar DB-5 y sobre gel de sílice	96
<b>Figura 26.</b>	A) Perfil cromatográfico de la AcOEt-DPG por UPLC-EM-APCI. Picos desoxiviperidona ( <b>3</b> ); viperidona ( <b>4</b> ). B) Cromatograma de corriente iónica total (TIC) en modo de ionización APCI <sup>+</sup> de los compuestos <b>3 y 4</b>	97

<b>Figura 27.</b>	Curvas de calibración de la desoxiviperidona ( <b>3</b> ) y viperidona ( <b>4</b> ) para la evaluación de la linealidad del sistema. ( <b>A</b> y <b>C</b> ) arreglo de diodos; ( <b>B</b> y <b>D</b> ) Corriente iónica total	100
<b>Figura 28.</b>	Radar de biodisponibilidad de los compuestos <b>2-6</b> utilizando la herramienta web gratuita SwissADME	104
<b>Figura 29.</b>	<i>Opuntia sp.</i>	109
<b>Figura 30.</b>	Cromatogramas en capa delgada (ccd) de las fracciones de Hex, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , AcOEt y BuOH	112
<b>Figura 31.</b>	( <b>A</b> ) Perfil cromatográfico por UPLC-PDA ( $\lambda=254$ nm) y cromatograma de corriente iónica total (TIC) de la fracción de AcOEt. ( <b>B</b> ) Principales fragmentos $m/z$ 239.10 [M-H] <sup>-</sup> y 479.29 [M-H] <sup>-</sup> observados para el compuesto <b>1</b> . ( <b>C</b> ) Perfil de UV del pico <b>1</b>	114
<b>Figura 32.</b>	( <b>A</b> ) Perfil cromatográfico por UPLC-PDA ( $\lambda=254$ nm) y cromatograma de corriente iónica total (TIC) de la fracción de BuOH. ( <b>B</b> ) Principales fragmentos $m/z$ 239.10 [M-H] <sup>-</sup> y 479.29 [M-H] <sup>-</sup> observados para el compuesto <b>3</b>	115
<b>Figura 33.</b>	Espectro de masas generados por la técnica de ionización por electrospray en modo negativo de las fracciones de AcOEt ( <b>A</b> ) y BuOH ( <b>B</b> )	116
<b>Figura 34.</b>	Espectro en el IR (ATR) de la fracción de AcOEt	117
<b>Figura 35.</b>	Espectro en el IR (ATR) de la fracción de BuOH	117
<b>Figura 36.</b>	Espectros de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD-d <sub>4</sub> , 25°C) de las fracciones de AcOEt ( <b>A</b> ) y BuOH ( <b>B</b> )	119
<b>Figura 37.</b>	Espectros de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD-d <sub>4</sub> , 25°C) del ácido eucómico ( <b>1</b> ) aislado a partir de la fracción de AcOEtI	119
<b>Figura 38.</b>	Cromatograma por HPLC-EM de <i>Opuntia sp</i> (baba)	120

## LISTA DE TABLAS

		Página
<b>Tabla 1.</b>	Toxicidad aguda de la decocción de <i>P. greggii</i> (DPG)	76
<b>Tabla 2.</b>	Datos espectroscópicos de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona ( <b>6</b> ) en CDCl <sub>3</sub> (700 MHz para <sup>1</sup> H y 175 MHz para <sup>13</sup> C)	84
<b>Tabla 3.</b>	Datos espectroscópicos de los compuestos <b>2</b> – <b>5</b> en CDCl <sub>3</sub> [ <sup>1</sup> H RMN (400 MHz) y <sup>13</sup> C RMN (175 MHz)]	87
<b>Tabla 4.</b>	Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial (Lote 1) de las raíces de <i>P. greggii</i>	95
<b>Tabla 5.</b>	Parámetros de calidad: linealidad, precisión y exactitud de la validación del método analítico desarrollado	101
<b>Tabla 6.</b>	Cuantificación de los compuestos <b>3</b> y <b>4</b> en los lotes (I- IV) de las raíces de <i>P. greggii</i>	102
<b>Tabla 7.</b>	Propiedades fisicoquímicas, predicción metabólica y relación estructura-actividad de los compuestos <b>2</b> – <b>6</b> basados en SwissADME y Molinspiration	105

## RESUMEN

*Peniocereus greggii* (Engelm.) Britton & Rose (Cactaceae) es un cacto que crece favorablemente en el norte de México, en la zona fronteriza con los Estados Unidos. La decocción de sus raíces es muy apreciada por los Pimas para tratar la diabetes y otros malestares, como el dolor de pecho y el resfriado común.

En este trabajo se reporta el efecto hipoglucemiante y antihiper glucémico del preparado tradicional elaborado a partir de las raíces de la planta. Los compuestos activos fueron una serie de esteroides de tipo colestano: peniocerol (**2**), desoxiviperidona (**3**), viperidona (**4**) y viperidinona (**5**). Asimismo, se obtuvo una nueva entidad química a partir de un extracto de cloroformo alcalinizado (EC1). El producto se caracterizó mediante el uso de técnicas espectroscópicas como la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9)-14-trien-7-ona (**6**). La desoxiviperidona (**3**) mostró una acción antihiper glucémica durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral. Este mismo compuesto también fue capaz de disminuir los niveles de glucosa en sangre durante una prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal en ratones hiper glucémicos en combinación con insulina, comportándose así, como un agente sensibilizador de esta hormona. En experimentos de tipo bioenergéticos mitocondriales se encontró que los compuestos **3** y **6** aumentan los parámetros de la respiración basal y la fuga de protones, sin afectar la respiración asociada a la producción de ATP, esto se evaluó en miotúbulos de células C2C12. Finalmente, se desarrolló y validó un método analítico mediante cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas para cuantificar a la desoxiviperidona (**3**) y a la viperidona (**4**), en la droga cruda. En conjunto, estos resultados demuestran que la decocción de *P. greggii* (DPG) posee una acción hipoglucemiante y antihiper glucémica *in vivo*, indicando que los posibles principios activos son los compuestos **2** y **6**, tras demostrarse que promueven la secreción de insulina *in vitro*. Además, la desoxiviperidona (**3**) actúa como un agente

sensibilizador de insulina por un mecanismo que puede implicar la fuga de protones en las mitocondrias.



## ABSTRACT

The roots of *Peniocereus greggii* (Engelm.) Britton & Rose (Cactaceae), which grows in Northern Mexico and in the south of Arizona is highly valued by the Pima to treat diabetes and other illnesses, such as breast pain and common cold. Herein, the hypoglycemic and antihyperglycemic action of a decoction prepared from the roots of the plant is described. The active compounds were a series of cholestane steroids, namely peniocerol (**2**), desoxyviperidone (**3**), viperidone (**4**), and viperidinone (**5**). Also, a new chemical entity was obtained from an alkalized chloroform extract of the roots (CE1), which was characterized as 3,6-dihydroxycholesta-5,8(9)-14-trien-7-one (**6**) by spectroscopic means. Desoxyviperidone (**3**) showed antihyperglycemic action during an oral glucose tolerance test. Compound **3** was also able to decrease blood glucose levels during an intraperitoneal insulin tolerance test in hyperglycemic mice only in combination with insulin, thus behaving as an insulin sensitizer agent. Nevertheless, mitochondrial bioenergetic experiments revealed that compounds **3** and **6** increased basal respiration and proton leak, without affecting the respiration associated to ATP production in C2C12 myotubes. Finally, an ultra-efficiency liquid chromatographic method for quantifying desoxyviperidone (**3**) and viperidone (**4**), in the crude drug was developed and validated. Altogether, our results demonstrate that *P. greggii* decoction (PGD) possesses hypoglycemic and antihyperglycemic actions *in vivo*, that sterols **2** and **6** promoted insulin secretion *in vitro*, and that desoxyviperidone (**3**) physiological behaves as an insulin sensitizer agent by a mechanism that may involve mitochondrial proton leak.

# I. ANTECEDENTES

## 1.1 Metabolismo energético

Los seres vivos, entre ellos el ser humano, necesitan diversas sustancias para construir o reparar sus organismos, energía para hacerlos funcionar y reguladores que controlen todos los procesos involucrados en la preservación y sostenimiento de la vida. La nutrición incluye un conjunto de procesos fisiológicos mediante los cuales los organismos incorporan, transforman y utilizan los nutrientes (contenidos en los alimentos) para mantenerse vivos y realizar todas sus funciones.

En el caso del ser humano las sustancias fundamentales para el sostenimiento de la vida son los carbohidratos, los lípidos, las proteínas y otros elementos esenciales (vitaminas, minerales, agua, etc.). La digestión transforma a los carbohidratos, lípidos y proteínas en compuestos más simples que se absorben fácilmente, incluyendo monosacáridos, ácidos grasos y glicerol, y aminoácidos, respectivamente. El proceso de absorción de los nutrientes comienza en la luz del intestino delgado a través de las vellosidades intestinales, pasan a la linfa o la sangre, y de ahí a los diferentes órganos. Cuando la célula absorbe y distribuye las biomoléculas pequeñas, se inicia el proceso metabólico el cual se puede definir como el conjunto de reacciones químicas que ocurren en el interior de las células para la obtención de energía, o bien, para su almacenamiento. El metabolismo se clasifica en anabólico (reacciones enzimáticas de síntesis y/o almacenaje de biomoléculas en las reservas energéticas para su posterior uso) y catabólico (reacciones enzimáticas de degradación para obtener energía a partir de las reservas energéticas). Estas dos rutas se encuentran en equilibrio y son antagónicas; su regulación está en función de los requerimientos energéticos del individuo. Los sustratos responsables de la regulación energética son principalmente los carbohidratos y lípidos, por lo que, a lo largo de los antecedentes de esta investigación, se hablará de la homeostasis y metabolismo de la glucosa, para poder entender sus implicaciones en las enfermedades metabólicas, principalmente en la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).

## 1.2 Regulación del metabolismo de glucosa

La concentración de glucosa plasmática en personas sanas es menor a 100 mg/dL (OMS 2021, NOM-015-SSA2-2010). Este estado de normoglucemia se mantiene a través de una estricta regulación neuro-endocrina que se activa y desactiva en los periodos de ayuno o bien, tras la ingesta de alimentos (Bano *et al.*, 2013). A continuación, se explicarán ambos procesos detalladamente.

### 1.2.1 Tras la ingesta de alimentos

Los hidratos de carbono que ingresan al organismo mediante la dieta son principalmente los polisacáridos y oligosacáridos, como la sacarosa, lactosa, almidón, glucógeno, entre otros. La digestión de estas sustancias empieza en la cavidad oral o boca, mediante la acción de hidrólisis de las enzimas llamadas ptialinas ( $\alpha$ -amilasas) que se encuentran en la saliva y son secretadas por las glándulas parótidas (Bano *et al.*, 2013; Vélez *et al.*, 2017). Después de la deglución, los hidratos de carbono llegan al estómago, donde se mezclan de manera paulatina con las secreciones gástricas, continuando con el proceso del vaciamiento estomacal, que conlleva al paso del bolo alimenticio hacia el intestino delgado, específicamente hacia el duodeno, donde se incrementa el pH tras la secreción del jugo pancreático que contiene enzimas digestivas como las  $\alpha$ -amilasas pancreáticas y sales de bicarbonato. Tras estos procesos, se obtienen los disacáridos tales como: maltosa, sacarosa y lactosa, principalmente, sobre estos sustratos actuarán las  $\alpha$ -glucosidasas, enzimas intestinales que hidrolizan los enlaces  $\alpha 1 \rightarrow 4$  de la sacarosa, maltosa y lactosa convirtiéndolos en monosacáridos fácilmente absorbibles.

El proceso de absorción se lleva a cabo en el epitelio intestinal usando los sistemas de co-transporte de glucosa acoplados a  $\text{Na}^+$  (Sodium/Glucose Transporters, SGLT, por sus siglas en inglés). Los SGLTs [se conocen seis isoformas (SGLT1-6) y se expresan en el intestino delgado y a nivel tubular renal] aprovechan el transporte del  $\text{Na}^+$  a favor de su gradiente de concentración para generar una corriente electroquímica que produce los cambios conformacionales necesarios para la traslocación de la glucosa a través de la

membrana plasmática y así permite la absorción rápida de esta molécula desde el yeyuno hacia al torrente sanguíneo y se dirigen hacia el hígado, desde donde se distribuyen a los diferentes órganos y tejidos. Cabe mencionar que la glucosa es el monosacárido que más se absorbe (más del 80%) seguida de la galactosa y fructuosa (menos del 10 %) (Bano *et al.*, 2013; Miranda-Garduño *et al.*, 2008; Vélez *et al.*, 2017; Wilcox, 2005).

La mayoría de las células del cuerpo ingresan a la glucosa mediante difusión facilitada a través de los transportadores de glucosa (GLUT), hasta el momento se conocen 13 miembros de esta familia de transportadores que se diferencian por su distribución en los tejidos, características cinéticas y dependencia o no de la hormona insulina (Sandoval-Muñiz *et al.*, 2016; Vélez *et al.*, 2017).

La glucosa es el único sustrato energético para el cerebro y el sistema nervioso central (SNC), no dependen de la función de la insulina para la captura y entrada de la glucosa a la célula, sino que es mediada por los transportadores de glucosa 1 (GLUT1), que transporta a la glucosa a través de la membrana celular del tejido nervioso sin importar su concentración (alta o baja) ni la presencia o ausencia de la insulina. Es por ello, que un estado de hipoglucemia puede desencadenar una disfunción profunda del SNC y la hipoglucemia prolongada puede causar su muerte celular (Bano *et al.*, 2013; Rix *et al.*, 2019; Wilcox, 2005).

En contraste, el músculo esquelético, tejido adiposo e hígado responden a la insulina y pueden usar glucosa, cetonas y ácidos grasos libres como sus principales combustibles metabólicos. La elección del tipo de sustrato que usan las células radica principalmente por la cantidad de insulina unida a su receptor en la superficie celular de los tejidos blancos. Se sabe que, en presencia de concentraciones altas de insulina, hace que la célula preferentemente utilice a la glucosa, capturándola y metabolizándola para la producción de energía o bien, almacenándola en forma de glucógeno en el hígado y músculo o como grasa en el tejido adiposo, permitiendo una disminución significativa en la

concentración de glucosa plasmática posprandial (Bano *et al.*, 2013; Rix *et al.*, 2019; Vélez *et al.*, 2017; Wilcox, 2005).

### 1.2.2 Secreción de insulina

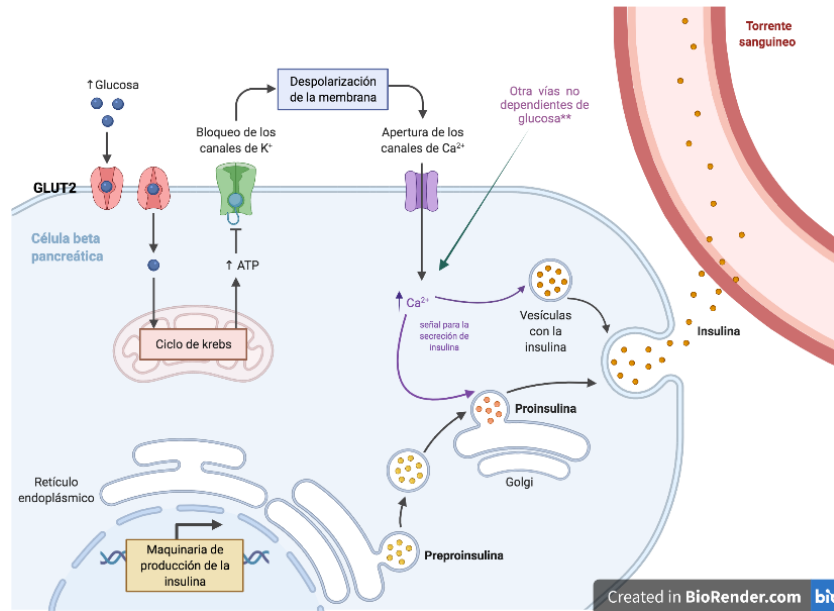
La insulina es una hormona peptídica secretada por las células  $\beta$  pancreáticas específicamente en los islotes de Langerhans y su función principal es mantener los niveles de glucosa normales en sangre, al facilitar la absorción de glucosa y regular el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Su liberación es estrictamente regulada por el sistema endocrino.

Ante la respuesta a un estímulo de la glucosa posprandial, inicia la secreción de insulina mediada por glucosa, que en individuos sanos tiene un comportamiento bifásico, con una fase inicial rápida de secreción de insulina, seguida de una liberación menos intensa pero más sostenida (Bano *et al.*, 2013; Wilcox, 2005).

El proceso inicia con el ingreso de la glucosa a la célula  $\beta$  mediante el transportador de glucosa 2 (GLUT2), posteriormente se fosforila a glucosa-6-fosfato (G6P) por acción de una cinasa, posteriormente la G6P pasa a la glucólisis y el ciclo respiratorio, donde se producen, por oxidación, varias moléculas de ATP. Cuando hay un cambio en la relación ADP/ATP, se bloquean los canales de potasio dependientes de ATP, resultando una despolarización en la membrana, provocando la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, incrementando la concentración de calcio intracelular, promoviendo el movimiento de las vesículas que contienen a la insulina, liberando a la insulina previamente sintetizada a la circulación sanguínea (**Figura 1**) (Bano *et al.*, 2013; Wilcox, 2005).

Existen otros mediadores involucrados en la liberación de insulina, denominados “no nutritivos”, es decir, que no dependen de la glucosa para la liberación de esta hormona y actúan a través de estímulos neurales como las vías colinérgicas (receptor M3-muscarínico) y adrenérgicas (receptor  $\beta$ -adrenérgico), o a través de hormonas peptídicas (incretinas y adiponectina) y aminoácidos catiónicos (arginina, L-ortinina y leucina). Estos

mediadores activan segundos mensajeros que incrementan la concentración de calcio intracelular a las células  $\beta$  pancreáticas, favoreciendo la secreción de insulina (**Figura 1**) (Wilcox, 2005).



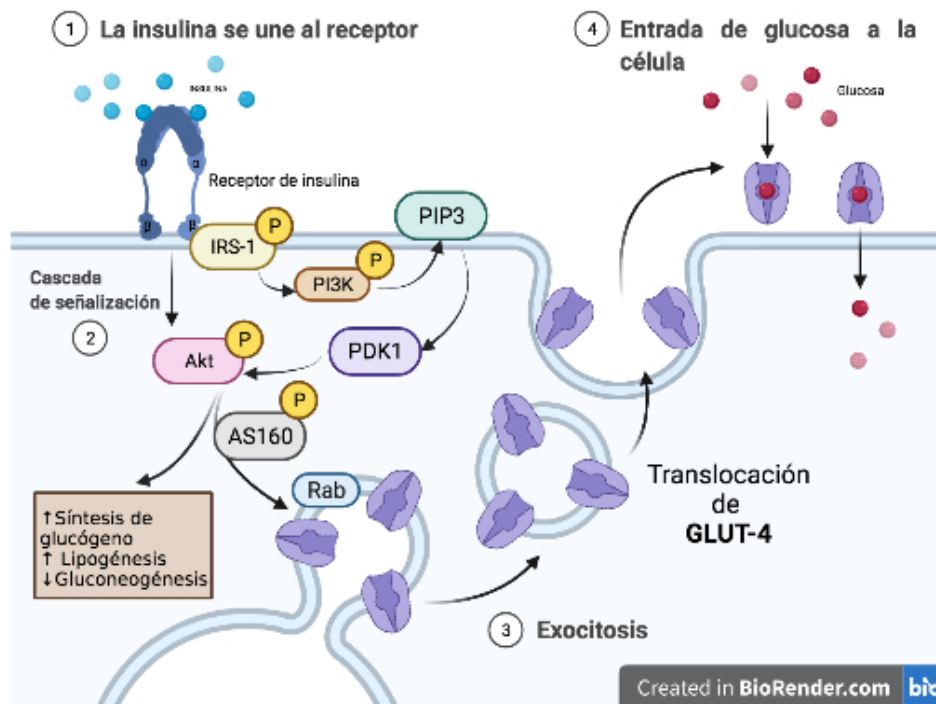
**Figura 1.** Mecanismo de secreción de la insulina por las células  $\beta$  pancreáticas.

### 1.2.3 Translocación de GLUT4 mediada por insulina

La insulina tiene la función de regular el metabolismo anabólico mediante la activación de la lipogénesis y síntesis de glucógeno, la inhibición de la gluconeogénesis, y principalmente, favorecer la incorporación de glucosa plasmática hacia sus tejidos blancos, a través de los transportadores de glucosa 4 (GLUT4). Este GLUT presenta una alta afinidad por la glucosa y se expresa en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético, este último captura el 95 % de la glucosa total (Sandoval-Muñiz *et al.*, 2016). En estos tejidos el transporte de glucosa hacia el interior de la célula se ve incrementado por la acción de GLUT4. Este se localiza en el citoplasma almacenado en forma de vesículas y su translocación del citoplasma hacia la membrana plasmática es regulada por la acción de insulina (Bano *et al.*, 2013; Srivastava *et al.*, 2018; Wilcox, 2005).

En condiciones fisiológicas, la insulina se une con su receptor. El receptor de

insulina es un receptor transmembranal, y está conformado por dos subunidades alfa y dos subunidades beta. Las subunidades alfas se encuentran en el lado extracelular de la membrana y las subunidades beta están insertadas en la membrana celular, ya que poseen la actividad cinasa. Todo el complejo hetero-tetramérico está unido mediante enlaces de disulfuro. La activación de este proceso se logra en el momento en que la insulina se une al receptor, produciendo un cambio conformacional, lo que induce la fosforilación del sustrato del receptor de insulina tipo 1 (IRS-1, por sus siglas en inglés) y este a su vez, activa a PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa, tipo 1), PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), PDK1 (proteína cinasa D1) y AKT (cinasa de serina/treonina), produciendo la translocación de las vesículas de GLUT4 mediante exocitosis y la subsecuente captación de glucosa, además de sus otras acciones anabólicas (**Figura 2**) (Bano *et al.*, 2013; Wilcox, 2005).



**Figura 2.** Mecanismo de translocación de la GLUT4 mediada por insulina en células musculares.

#### 1.2.4 Ayuno y secreción de glucagón

El ayuno es una práctica que implica la restricción de la ingesta de alimentos o bebidas durante un período de tiempo. Fisiológicamente, el ayuno implica una serie de cambios radicales en la fisiología celular y el metabolismo. Estos cambios están encaminados a garantizar el suministro constante de glucosa y otros nutrientes, tanto para el cerebro (en primer orden) como para los demás órganos corporales, de modo que estos puedan desarrollar sus funciones de manera ininterrumpida (Bano *et al.*, 2013; Rix *et al.*, 2021; Sanvictores *et al.*, 2022).

Durante un estado de ayuno, los niveles de glucosa en sangre dependen principalmente de las reservas de glucógeno, que se localizan en el hígado y músculo esquelético. El glucógeno es un polisacárido, formado por cadenas de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 y  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6-glucosídicos. El cuerpo utiliza este carbohidrato ante un estado de falta energética a través de la glucogenólisis (hidrólisis del glucógeno), y así generar glucosa para la producción de energía (Bano *et al.*, 2013; Sanvictores *et al.*, 2022).

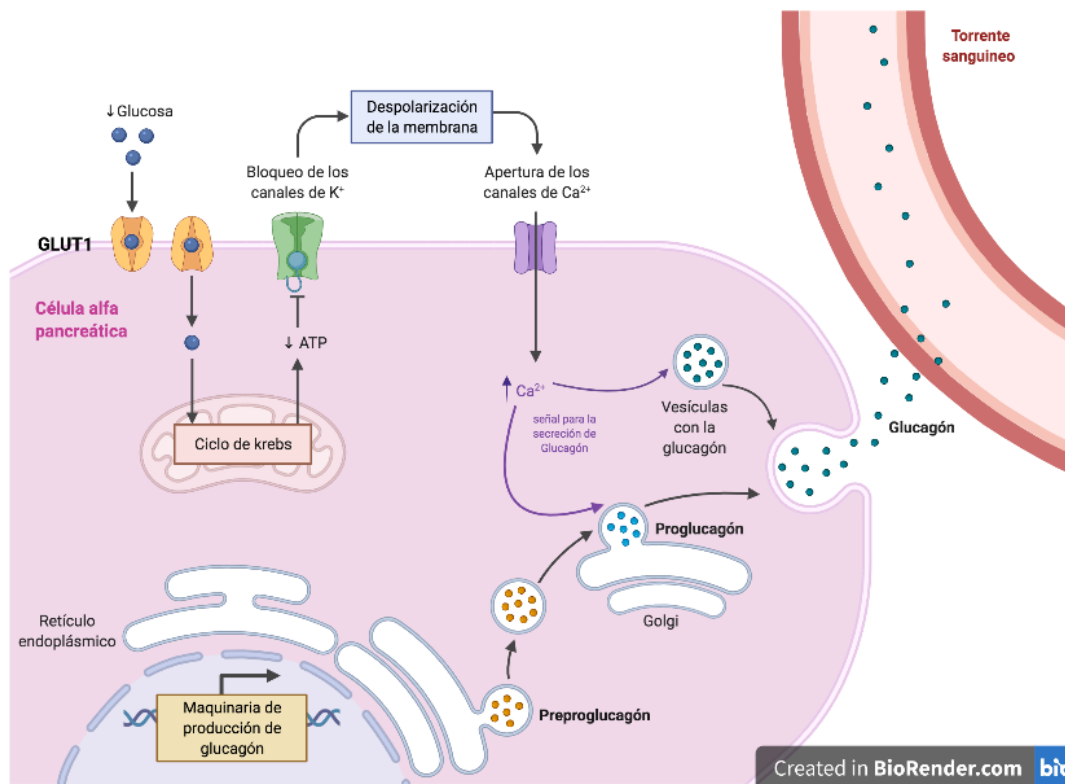
Cuando las reservas de glucógeno se agotan, el cuerpo comienza a utilizar las reservas energéticas del tejido adiposo, es decir, los triglicéridos. Los triglicéridos se hidrolizan en ácidos grasos libres y glicerol (lipólisis). Los ácidos grasos resultantes viajan a través del torrente sanguíneo hasta llegar al hígado, donde son sustrato para la cetogénesis, es decir la formación de cuerpos cetónicos y glucosa, la cual se utiliza en el cerebro y en el SNC. Por otro lado, los cuerpos cetónicos son reconvertidos nuevamente en acetil-CoA para la obtención de energía en los demás tejidos (Bano *et al.*, 2013; Sanvictores *et al.*, 2022).

Cuando el ayuno se extiende, inicia el catabolismo proteico (proteólisis), que consiste en la degradación de proteínas con el objetivo de liberar una gran cantidad de aminoácidos que luego se convierten en glucosa (Bano *et al.*, 2013; Cruz, 2011; Sanvictores *et al.*, 2022).



Los procesos metabólicos anteriormente descritos son regulados a través del sistema neuro-endocrino, siendo glucagón, la hormona responsable. El glucagón, regula la producción de glucosa hepática, por lo tanto, juega un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Esta hormona se secreta cuando hay un estado de hipoglucemia, ayuno prolongado o bien, actividad física excesiva, mientras que un estado de hiperglucemia o la ingesta de alimentos, inhibe su secreción (Bano *et al.*, 2013; Rix *et al.*, 2021; Sanvictores *et al.*, 2022).

El mecanismo celular de la secreción de glucagón dependiente de glucosa implica la captación de esta a las células  $\alpha$  pancreáticas por el transportador de glucosa 1 (GLUT1). La glucosa al ingresar a la célula experimenta los procesos de glucólisis y ciclo de Krebs para generar ATP. La concentración de ATP intracelular refleja los niveles de glucosa en plasma, por lo tanto, en una condición de hipoglucemia disminuye la producción de ATP intracelular; en consecuencia los canales de potasio sensibles al ATP se bloquean provocando una despolarización de la membrana celular, que a su vez, abre los canales de calcio dependientes de voltaje, promoviendo así la entrada calcio a las células; el incremento de los niveles de calcio desencadena la movilización de los gránulos que contienen a glucagón hacia la membrana celular, y por exocitosis glucagón sale a la circulación sanguínea (**Figura 3**) (Quesada *et al.*, 2008; Rix *et al.*, 2021).



**Figura 3.** Mecanismo de secreción de glucagón mediado por glucosa.

### 1.2.5 Función de glucagón

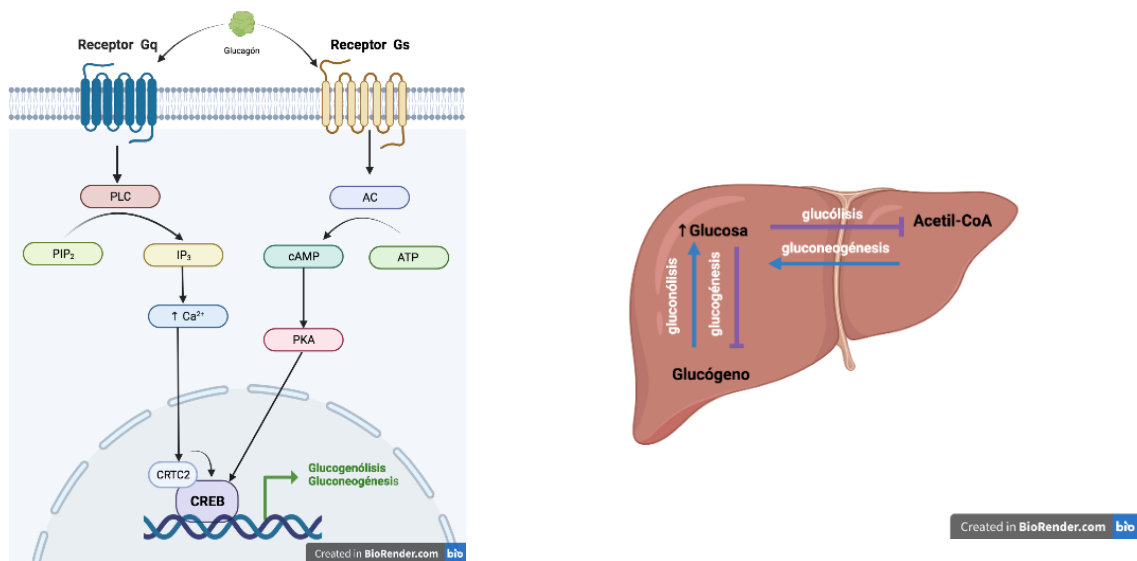
Las acciones del glucagón se llevan a cabo tras su unión con sus receptores, los cuales son de tipo transmembranal con siete dominios y acoplados a proteína G (Gs o Gq). Estos receptores se expresan principalmente en el hígado, pero también se encuentra en los riñones, corazón, las glándulas suprarrenales, tejido adiposo, tracto gastrointestinal y páncreas (Bano *et al.*, 2013; Rix *et al.*, 2021).

El glucagón inicia su señalización al unirse a sus receptores que desencadenan una cascada de señalización que conlleva a la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB). CREB es un factor de transcripción que permite la expresión de genes para la glucogenólisis y gluconeogénesis (**Figura 4**) (Rix *et al.*, 2021).

Al expresarse estos genes incrementa la liberación de glucosa hepática a la circulación durante una condición de hipoglucemia. Específicamente, el glucagón

promueve la conversión de glucógeno a glucosa hepática (glucogenólisis), estimula la síntesis de glucosa a partir de otros hidratos de carbono (gluconeogénesis) e inhibe la degradación de glucosa (glucólisis) y la formación de glucógeno (glucogénesis) (**Figura 4**) (Rix *et al.*, 2021).

Esta capacidad contrarreguladora de glucagón es fundamental en la homeostasis de la glucosa y juega un papel muy importante en la DMT2, proceso que explicará más adelante.



**Figura 4.** Diagrama del efecto del glucagón en el hepatocito.

### 1.2.6 Producción de ATP

El ATP (adenosina trifosfato), es una molécula fundamental para diversos procesos vitales, ya que es la mayor fuente de energía para la síntesis de macromoléculas complejas, como el ADN, ARN, o las proteínas, y sus funciones. Específicamente, durante la respiración celular, la glucosa es convertida en ATP para el gasto energético de primera necesidad. Este proceso se explica detalladamente a continuación.

Una vez que la glucosa se encuentra en el citosol, la glucosa se fosforila generando el sustrato glucosa-6-fosfato que ocurre por acción enzimática de la glucoquinasa, enzima

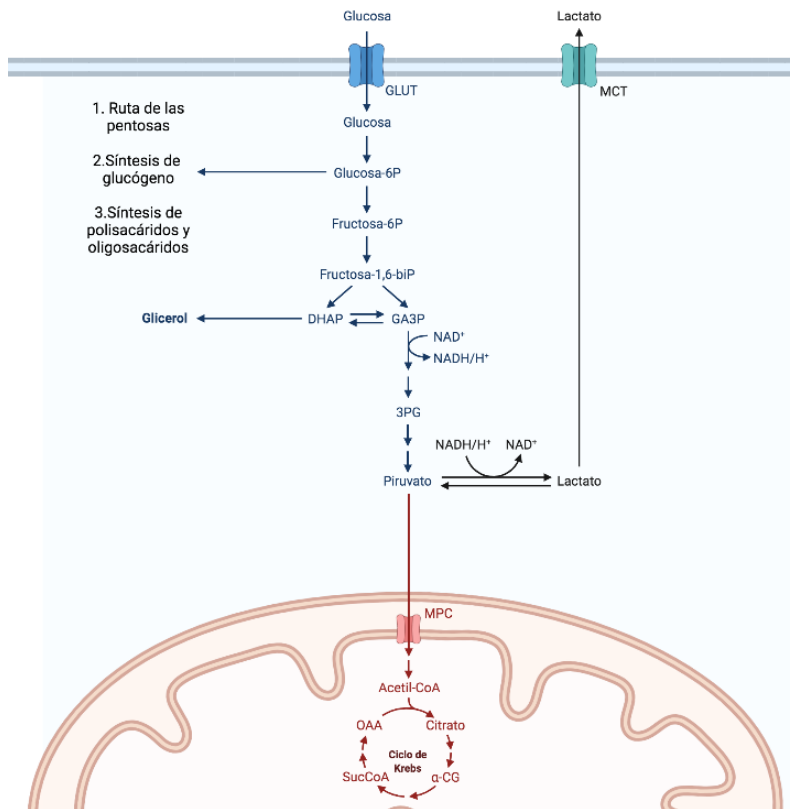
que se expresa específicamente en el hígado y células  $\beta$  pancreáticas, o bien, de la hexoquinasa, que se expresa en los tejidos restantes. Así, la glucosa fosforilada es incapaz de salir de la célula, además de que es direccionada a varias vías metabólicas (síntesis de glucógeno o glucogénesis, ciclo de las pentosas, síntesis de oligo- y polisacáridos o bien, producción de ATP) (Vélez *et al.*, 2017).

En condiciones aeróbicas y de requerimiento energético, la glucosa-6-fosfato pasa a la mitocondria para ser sometida a tres procesos metabólicos que generaran 38 moléculas de ATP. Estos procesos son:

1. Glucólisis
2. Ciclo de Krebs
3. Fosforilación oxidativa

### **1.2.7 Glucólisis y ciclo de Krebs**

La glucólisis es una ruta metabólica, que consta de reacciones enzimáticas secuenciales, donde se obtiene dos moléculas de piruvato, dos moléculas de ATP y cuatro protones. En seguida comienza el proceso de conversión del ácido pirúvico en acetilcoenzima-A, donde se utilizan las dos moléculas de piruvato y se une a la coenzima-A y forma la acetilcoenzima-A (2 moléculas) y cuatro protones. La coenzima-A es el sustrato fundamental para iniciar el ciclo de Krebs. Esta ruta metabólica se lleva a cabo en la membrana externa de la mitocondria donde el ácido oxalacético se combina con el acetil-CoA formando el ácido cítrico y luego, una sucesión de intermediarios (oxalacetato  $\rightarrow$  citrato  $\rightarrow$  cis-aconitato  $\rightarrow$  D-isocitrato  $\rightarrow$   $\alpha$ -cetoglutarato  $\rightarrow$  succinil-CoA  $\rightarrow$  succinato  $\rightarrow$  fumarato  $\rightarrow$  malato  $\rightarrow$  oxalacetato) que termina con la neoformación de oxalacetato y, por lo tanto, el reinicio del ciclo. Lo trascendente de este ciclo es que, aunque se forma poco ATP (2 moléculas: una por cada molécula de piruvato), se generan 16 átomos de hidrógeno que posteriormente servirán para la formación de ATP en la fosforilación oxidativa (Vélez *et al.*, 2017).



**Figura 5.** Glucólisis y ciclo de Krebs.

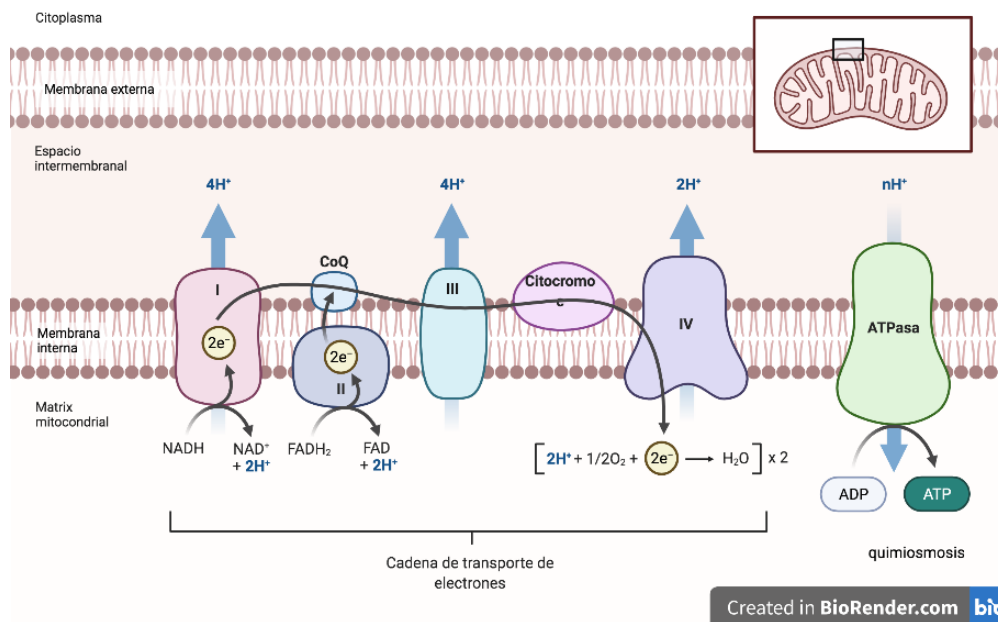
### 1.2.8 Fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa es un proceso de carácter aeróbico y principal mecanismo de la respiración celular, consta de dos componentes estrechamente relacionados: la cadena transportadora de electrones y la quimiósmosis.

La cadena de transporte de electrones es un sistema multi-enzimático incrustado en la membrana interna de la mitocondria, que contiene cuatro complejos proteicos (I-IV) y una ATPasa sintetasa, su función es el transporte de electrones a través de reacciones redox formando un gradiente electroquímico. La quimiósmosis es el proceso donde gradiente electroquímico generado anteriormente se usa para la síntesis de ATP (Vélez *et al.*, 2017).

La fosforilación oxidativa utiliza como sustrato los 24 átomos de hidrógeno que se produjeron en las fases previas (glucólisis y ciclo de Krebs), estos protones ingresan a la cadena de transporte de electrones iniciando con la NADH ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), continuando con el succinato ubiquinona oxidorreductasa (complejo II) y ubiquinol oxidorreductasa citocromo C (complejo III) respectivamente, y finalizando con el citocromo oxidasa (complejo IV). Este proceso consiste en la oxidación de los átomos de hidrógeno, generando un electrón y un hidrogenión por cada átomo de hidrógeno que ingresa a la cadena; los electrones resultantes se combinan con  $O_2$  para formar el radical oxidrilo que se acoplará al hidrogenión y formará agua ( $H_2O$ ).

Todo lo anterior ocasiona la generación de un gradiente electroquímico de gran intensidad, el cual es sometido a la quimiósmosis, cuyo propósito será que los hidrogeniones con carga positiva pasen por la ATPasa y esta energía, hará que el ADP se convierta en ATP que llega al citosol mediante difusión facilitada a través de la membrana mitocondrial interna, y difusión simple a través de la membrana mitocondrial externa (Figura 6) (Vélez *et al.*, 2017).



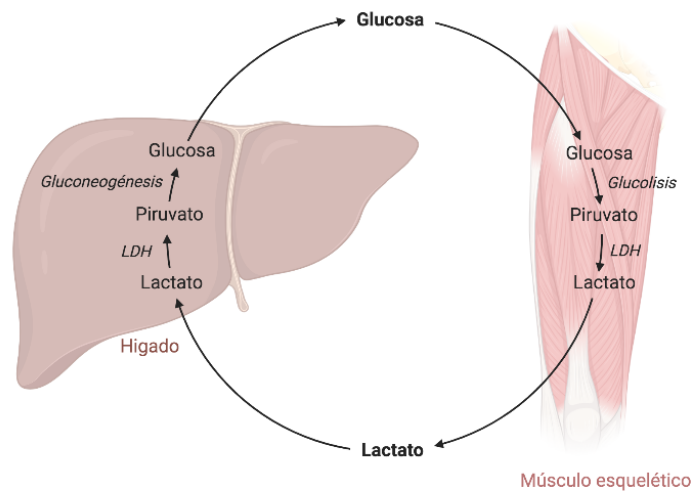
**Figura 6.** Fosforilación oxidativa para la producción de ATP.

### 1.2.9 Producción anaeróbica de ATP y ciclo de Cori

Ante una actividad muscular excesiva, condición de hipoxia o bien, una enfermedad de tipo metabólica, se crea un ambiente anaeróbico, por lo cual, las células musculares utilizan preferentemente a la glucosa proveniente de sus reservas de glucógeno o la producida por el hígado (Cruz, 2011; Soeters *et al.*, 2021; Vélez *et al.*, 2017).

Como hemos mencionado anteriormente, el proceso principal para la producción de ATP es de carácter aeróbico, a través del ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa. Pero en ausencia de oxígeno, estas rutas mitocondriales de generación de energía se vuelven inutilizables. Por ello, solo la glucólisis se desarrolla adecuadamente, ya que no requiere oxígeno. Sin embargo, la cantidad de ATP que se produce por esta ruta no es suficiente para la supervivencia de la célula. Además, la acumulación de piruvato (producto final de la glucólisis), conduce a la parálisis energética que induce la muerte celular. Es por ello, que la célula cataliza la transformación de piruvato a lactato mediante la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Entonces, la producción de lactato (lejos de ser nociva), se vuelve necesaria y permite un desfogue celular que evita la acumulación de piruvato (Cruz, 2011; Soeters *et al.*, 2021; Vélez *et al.*, 2017).

La producción del lactato resultante, se difunde a la sangre para ser llevado al hígado donde es convertido en glucosa nuevamente (a través de la gluconeogénesis), y esta, retorna a la circulación para ser llevada de vuelta al músculo. Este proceso se conoce como el ciclo de Cori, una ruta metabólica que consiste en la circulación cíclica del lactato, piruvato y glucosa entre el músculo y el hígado (**Figura 7**) (Cruz, 2011; Soeters *et al.*, 2021; Vélez *et al.*, 2017).



**Figura 7.** Ruta anaeróbica para la producción de ATP y metabolismo de glucosa.

### 1.3 Resistencia a la insulina

La insulina juega un papel indispensable para la regulación del metabolismo anabólico. Comprender su papel en los procesos fisiológicos, desde su síntesis, secreción y acción a nivel molecular, tiene implicaciones significativas para muchas enfermedades metabólicas, principalmente en la DMT2, una de las primeras causas de muerte en México y otros países (González Chávez *et al.*, 1999; Gutiérrez-Rodelo *et al.*, 2017 FID, 2021; Muñoz-Gómez *et al.*, 2022; Wilcox, 2017).

La resistencia a la insulina (RI), es una condición donde se observa que la acción a nivel celular de la insulina está reducida en sus tejidos blancos, lo que aumenta la secreción de esta, para compensar el defecto en la acción tisular y así mantener la homeostasis glucémica. Este fenómeno da pauta a un estado de hiperinsulinemia, el cual es característico en individuos con RI, particularmente después de ingerir alimentos ricos en carbohidratos (Gutiérrez-Rodelo *et al.*, 2017; Wilcox, 2017).

En años recientes, se han identificado diferentes mecanismos que promueven la resistencia a la insulina, que se discutirán a continuación.



### **1.3.1 Factores de riesgo que promueven la resistencia a la insulina**

#### **1.3.1.1 Obesidad e inflamación**

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa, que se manifiesta por un incremento en el peso corporal (OMS, 2022). La evidencia clínica indica, que los pacientes con un alto contenido de grasa visceral sufren de una inflamación crónica, de bajo grado, en el tejido adiposo, hepático y muscular, lo que contribuye a la resistencia a la insulina y a la disfunción metabólica sistémica. Debido que el estado de obesidad se caracteriza por un incremento en la acumulación de lípidos, particularmente en el tejido adiposo, lo cual, provoca el aumento en el tamaño de los adipocitos (hipertrofia) o bien, el incremento en número de adipocitos (hiperplasia); que ocasionan la expansión del tejido adiposo y la alteración en la secreción de adipocinas y citosinas proinflamatorias, así como la liberación exacerbada de ácidos grasos libres (AGL) a la circulación sanguínea.

Los AGL promueven un estado inflamatorio e incrementan la concentración de citosinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , la IL-6 y la IL-1 $\beta$ , principalmente) que actúan a través de múltiples mecanismos, como la activación de quinasas de serina/treonina, la disminución en la expresión de IRS-1, GLUT4 y los receptores activados por los proliferadores peroxisomales de tipo gamma (PPAR  $\gamma$ ) o bien, la expresión y activación del supresor de la señalización de citocinas (SOCS-3). Estos mecanismos modifican el metabolismo de lípidos y carbohidratos, particularmente en el tejido hepático y muscular, contribuyendo a la RI (Gutiérrez-Rodelo *et al.*, 2017; Jayarathne *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2010).

#### **1.3.1.2 Interacción hormonal**

Fisiológicamente, las acciones de la insulina están influenciadas por su interacción con otras hormonas. Por ejemplo, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), es una hormona estructuralmente similar a la insulina, y desempeña un papel importante en el crecimiento infantil, y en adultos. IGF-1, es secretado en respuesta a la insulina, previniendo

el efecto hipoglucemiante inducido por la hormona (Bano *et al.*, 2013; Carrasco *et al.*, 2013; Rix *et al.*, 2019; Wilcox, 2005).

Existen otras hormonas contrarreguladoras a la acción de la insulina, tales como; los glucocorticoides, las catecolaminas y glucagón. Como se ha mencionado anteriormente, glucagón promueve la producción de la glucosa hepática, observándose un aumento en la glucosa plasmática. La evidencia clínica muestra que pacientes con RI, presentan un aumento en la secreción de glucagón durante el ayuno o ante la ingesta de alimentos (paradójicamente), lo que contribuye al estado de hiperglucemia. Los glucocorticoides y catecolaminas promueven el catabolismo muscular, en especial los procesos de glucogenólisis, gluconeogénesis y la lipólisis. El exceso de estas hormonas en la circulación sanguínea promueve un estado de hiperglucemia constante, lo que contribuye a la RI en los tejidos blancos de la insulina.

### **1.3.1.3 Disfunción mitocondrial**

La mitocondria es el organelo celular que juega un papel fundamental en el metabolismo energético, se encarga de proporcionar la mayor parte de la energía necesaria para formar ATP, a partir de la glucosa y los lípidos.

En los últimos años, se ha propuesto que las alteraciones a nivel mitocondrial se asocian con la resistencia a la insulina, a través de la acumulación intracelular de productos lipídicos y al aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) provocado una disminución de la fosforilación oxidativa. Esta condición promueve la pérdida de la función mitocondrial y la disminución en el número de mitocondrias.

La acumulación de AGL, diacilglicerol (DG) y ceramidas contribuyen a la inhibición de la señalización de la insulina, el DG a través de la activación de la PKC, que fosforila e inhibe al receptor de insulina, las ceramidas inhiben la activación de AKT, y los AGL favorecen el desarrollo de la resistencia a la insulina (Gutiérrez-Rodelo *et al.*, 2017; Jakovljevic *et al.*, 2021).

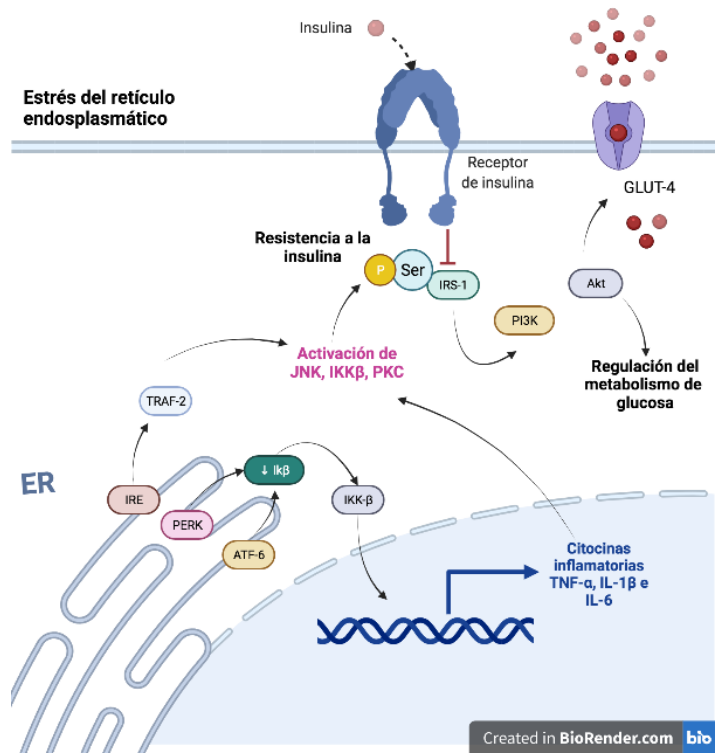
#### 1.3.1.4 Estrés del retículo endoplasmático (RE)

El retículo endoplasmático (RE) es un organelo celular que realiza funciones celulares indispensables, tales como el almacenamiento del calcio intracelular, ensamblaje y plegamiento de proteínas, y modificaciones postraduccionales.

En condiciones de estrés celular, el RE tiene una sobrecarga en su capacidad funcional, generando alteraciones en la expresión de proteínas mal plegadas y la depleción del calcio de este reservorio, que en su conjunto reciben el nombre de “estrés del retículo”.

Como mecanismo compensatorio al estrés del RE y específicamente al mal plegamiento de las proteínas, se activa un mecanismo conocido como: la respuesta a las proteínas mal plegadas “unfolding protein response” (UPR) por sus siglas en inglés, que permite restablecer la homeostasis de las funciones del RE, mediante la inhibición en la síntesis de proteínas, y el aumento tanto de la degradación de las proteínas del RE. Si estos mecanismos de adaptación son insuficientes para restaurar la homeostasis del RE, la célula experimenta la muerte celular programada.

Diversos estudios han demostrado una estrecha asociación entre el estrés del RE y la respuesta inflamatoria que promueven la resistencia a la insulina. En este contexto, la UPR activa a tres cinasas sensoras al estrés, la cinasa de proteína del retículo parecida a la cinasa que se activa por el ARN de doble cadena (PERK), la cinasa endorribonucleasa 1 que requiere inositol (IRE-1) y factor activador de la transcripción 6 (ATF-6). Estas cinasas en conjunto activan una serie de factores de transcripción que promueven la expresión de una variedad de genes involucrados en vías inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y la IL-6), que activan a su vez a la cinasa que fosforila el residuo de la serina del receptor o IRS-1, lo que conlleva a la resistencia a la insulina (**Figura 8**) (Gutiérrez-Rodelo *et al.*, 2017).



**Figura 8.** Estrés del retículo y su asociación con el desarrollo a la resistencia a la insulina.

**1.3.1.5 Estilo de vida**

El estilo de vida se puede entender como el conjunto de comportamientos o actitudes que desarrollan las personas para su bienestar. Estos comportamientos incluyen la alimentación, la actividad física, ciclos de sueño y el consumo de sustancias de abuso, principalmente. Es fácil entender la importancia del ejercicio y una dieta saludable como una herramienta de prevención para la resistencia a la insulina. Debido a que hábitos alimenticios ricos en grasas saturadas y carbohidratos que se consumen de manera constante (periodos de ayunos cortos) aumentan los mecanismos de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina a través de la estimulación exacerbada en la secreción de esta, y la acumulación de grasa en el tejido adiposo disminuyendo la señalización celular de la insulina (Blanco-Naranjo *et al.*, 2021).

Además de la dieta, existen otros factores que contribuyen a la RI, como una actividad física sedentaria, insomnio, consumo desmedido de bebidas alcohólicas y el tabaquismo, siendo los principales responsables de establecer una condición de

hiperglucemia e hiperinsulinemia crónica, además de un estado proinflamatorio constante, que favorece a la RI y posteriormente a la DMT2 (Wilcox, 2017).

### **1.3.1.6 Embarazo**

El embarazo se caracteriza por un estado de RI y este efecto se observa especialmente en el tercer trimestre. Esta condición, aparentemente, se desarrolla ante una respuesta adaptativa, debido a una división del metabolismo de lípidos y carbohidratos, con la finalidad de favorecer el desarrollo del feto, aunado a los efectos del lactógeno placentario, la progesterona, el estradiol y el cortisol, que actúan como hormonas contrarreguladoras de la insulina.

Sí, la resistencia a la insulina persiste, se asocia con diabetes mellitus y la hipertensión gestacional (Wilcox, 2017).

## **1.4 Prediabetes**

La prediabetes es un término de uso frecuente, para referirse a las personas con intolerancia a la glucosa o alteración de glucosa en ayunas. En términos clínicos, la prediabetes se aplica en aquellos casos en los que los niveles de glucemia se encuentran por encima de los valores para un individuo sano (mayor a 100 mg/dL) pero, por debajo de los niveles considerados para la DM (menor a 126 mg/dL) (NOM-015-SSA2-2010; FID, 2021). La prediabetes por lo general es asintomática, lo que aumenta su frecuencia y el riesgo de tener DMT2, así como, de desarrollar complicaciones cardiovasculares. Sin embargo, se ha observado que, al reducir el consumo de alimentos ricos en polisacáridos, aumentar la actividad física y bajar de peso, se puede dar marcha atrás a la prediabetes, y por tal razón, retrasar o prevenir la DMT2. Otras personas podrían presentar algunos síntomas, tales como: fatiga, polifagia, polidipsia, aumento de peso o poliuria, los cuales al detectar dos o más de estos signos, es indispensable acudir con un profesional de la salud para poder tratar (en una etapa temprana) esta precondición diabética, y así evitar el desarrollo de la DMT2 (Díaz-Díaz *et al.*, 2011; Echouffo-Tcheugui *et al.*, 2021; FID, 2021).

## **1.5 Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)**

La diabetes mellitus (DM), es una enfermedad crónica degenerativa, que se caracteriza por un estado de hiperglucemia crónica que surge a consecuencia de una insuficiencia en la producción y secreción de insulina (Diabetes mellitus tipo 1, DMT1), y en caso de la DMT2, una deficiencia en la acción de esta hormona en sus tejidos blancos (RI) además de un incremento en la producción de la glucosa hepática (Cheng *et al.*, 2005; FID, 2021; Muñoz-Gómez *et al.*, 2022; Rix *et al.*, 2021; Wilcox, 2005).

Acorde con la Federación Internacional de Diabetes (FID), aproximadamente existen en el mundo 527 millones de personas con DM, y el 90% de los casos, pertenecen a la DMT2. México se encuentra en el séptimo lugar en prevalencia de DM con 14.1 millones de personas con diabetes.

En las últimas décadas, el número de individuos afectados por la DMT2 se ha incrementado notablemente, provocando que esta enfermedad se encuentre en las primeras causas de muerte en nuestro país (FID, 2021; INEGI, 2021). A pesar de su alta mortalidad y su baja calidad de vida, también tiene un impacto económicamente significativo, a consecuencia de la necesidad que tiene el paciente diabético en tener una atención médica especializada, aunado a su tratamiento farmacológico. Lo que provoca una saturación en los sistemas de salud y el incremento en el prepuesto para el abastecimiento de los medicamentos antidiabéticos (que son de por vida). En México, la mayoría de los pacientes con DMT2, desafortunadamente no cuentan con un seguro social o privado, que les ayude a minimizar los gastos de esta enfermedad, por lo tanto, los costos salen directamente de sus bolsillos (FID 2021; IMSS 2021; INEGI, 2021).

### **1.5.1 Complicaciones de la DMT2**

A nivel mundial se estiman 1,5 millones de fallecimientos anuales por la DM y sus complicaciones. Sin embargo, el monitoreo regular y la intervención temprana del paciente con diabetes dan como resultado la reducción de las complicaciones de la DM y por ende,

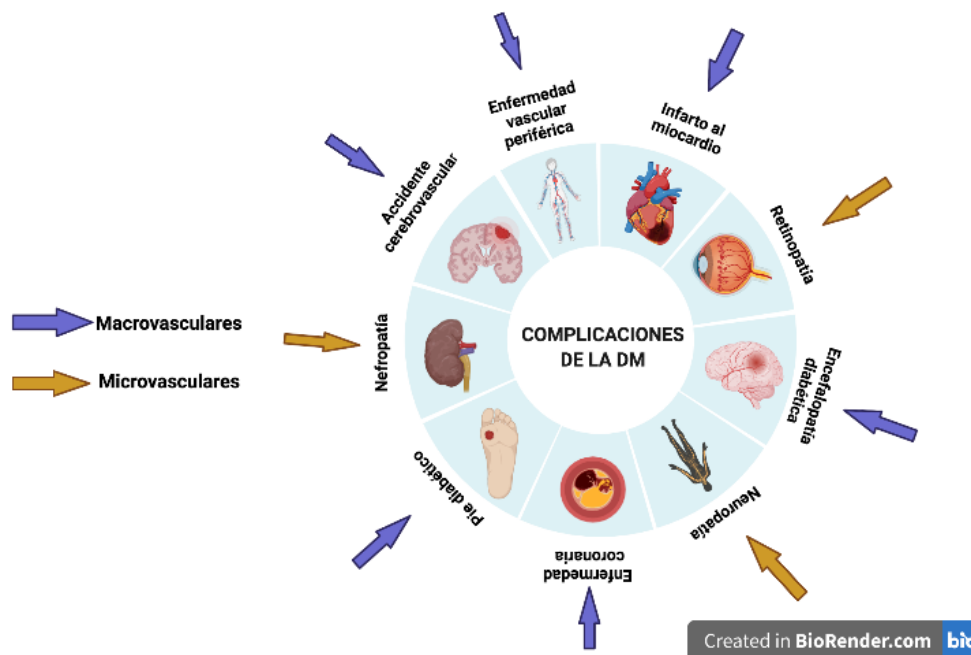
al número de hospitalizaciones y defunciones por esta enfermedad (Bilous y Donnelly, 2010; FID 2021).

Si el estado de hiperglucemia no es controlado adecuadamente, se incrementa el riesgo de padecer las complicaciones de la DM, que se clasifican en micro- y macrovasculares.

Estas complicaciones se desarrollan principalmente en los tejidos donde la captura de glucosa es independiente de insulina, ocasionando la acumulación exacerbada de la glucosa dentro de la célula, provocando la activación de rutas metabólicas que ocasionan la generación de productos nocivos para los tejidos.

Una de estas vías es la de los polioles, donde la glucosa es reducida a sorbitol, el cual induce un estrés osmótico y oxidativo. Otra vía es la síntesis de productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés). Los AGEs, se originan por la reacción de la glucosa con proteínas y con ácidos nucleicos. Estas especies pueden formar enlaces con el colágeno microvascular, provocando el engrosamiento de los vasos, la reducción de la permeabilidad y la elasticidad.

Además, los AGEs se unen a receptores específicos en los monocitos, macrófagos y células endoteliales, produciendo especies reactivas de oxígeno y la liberación de mediadores inflamatorios. Dichos fenómenos conducen a isquemia y a la reducción de los suministros de nutrientes en las arterias y los vasos pequeños, y por ende, a daños en los órganos que irrigan, originando retinopatías, nefropatías y neuropatías (microvasculares) o bien, afectan a las arterias y los vasos grandes provocando enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares y enfermedad arterial periférica (macrovasculares) que al no tratarse adecuadamente pueden evolucionar hasta llegar a incapacitar al paciente o provocarle la muerte (**Figura 9**) (Bilous y Donnelly, 2010; Dahlén *et al.*, 2022).



**Figura 9.** Complicaciones micro- y macro-vasculares de la DMT2.

### 1.5.2 Tratamiento para DMT2

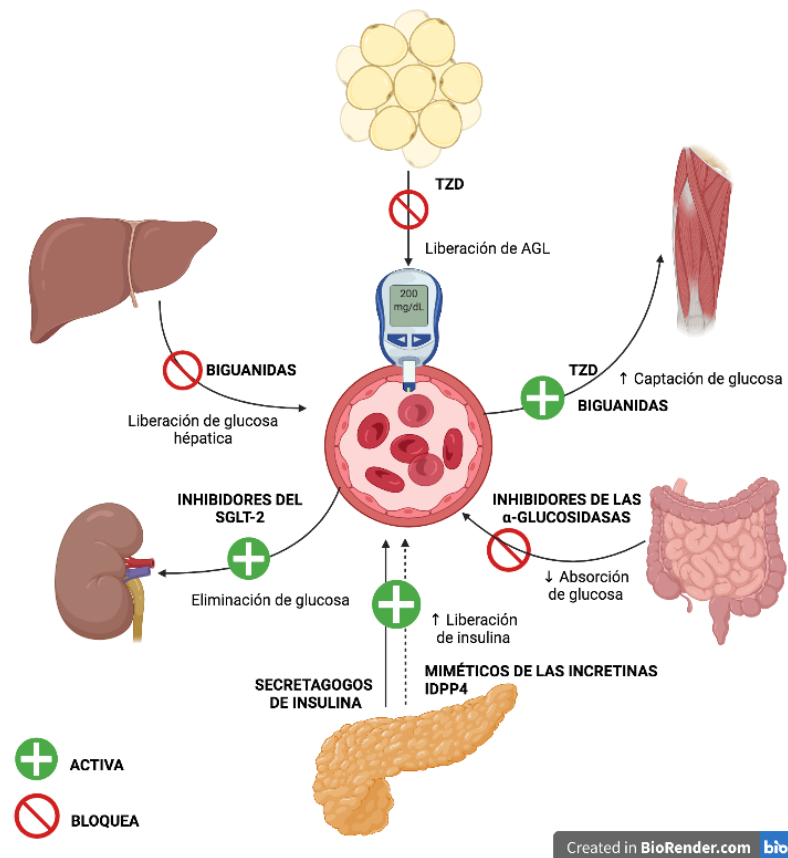
Por la complejidad de la DMT2 es necesario un tratamiento múltiple, planteando en primera instancia cambios en el estilo de vida (que incluya una dieta sana, actividad física regular, reducción o abstinencia en el consumo de sustancias de abuso, y el mantenimiento de un peso corporal saludable), continuando con la administración en forma individual o en combinación de antidiabéticos orales de primera línea, y finalizando, con el monitoreo regular de los niveles de glucosa y atención médica especializada (FID 2021; Dahlén *et al.*, 2022).

Hasta el momento existen 60 antidiabéticos orales aprobados por la FDA para el tratamiento de la DMT2, y esta cifra se incrementará ya que hay 100 agentes antidiabéticos que se encuentran actualmente en fases clínicas (Dahlén *et al.*, 2022). Generalmente, los antidiabéticos se clasifican por su modo de acción, tenemos a los sensibilizadores de insulina (biguanidas y tiazolidinedionas), los secretagogos de insulina (sulfonilureas, meglitinidas, gliptinas y miméticos de las incretinas), los inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -



glucosidasas y los bloqueadores del cotrasportador de glucosa-sodio tipo 2 (SGLT2) (**Figura 10**).

Si la medicación oral no es eficaz, se inicia el tratamiento con insulina (vía subcutánea), sin embargo, se ha observado que la administración continua de esta hormona en etapas tempranas de la DMT2 incrementa la RI. Esto a consecuencia de la presencia de receptores de insulina en la célula  $\beta$ , que al ser activados induce la secreción cíclica de esta hormona, ocasionado el desgaste celular seguido de la apoptosis de la célula, lo que reduce el número de las células  $\beta$  pancreáticas y así, la producción de insulina endógena (FID, 2021; Ganesan *et al.*, 2022; Israili, 2011; Wilcox, 2005).



**Figura 10.** Mecanismos farmacológicos de los antidiabéticos orales más utilizados para la DMT2.

### **1.5.2.1 Agentes sensibilizadores de insulina**

Los agentes sensibilizadores de insulina corrigen el perfil metabólico de los pacientes reduciendo la producción de glucosa y grasa hepática, ya que mejoran la acción de la hormona en sus tejidos blancos. Existen dos clases de agentes sensibilizadores de insulina: las biguanidas y las tiazolidinedionas.

#### **1.5.2.1.1 Biguanidas**

Las biguanidas son un grupo de compuestos similares a la galegina, un metabolito secundario aislado de las hojas de *Galega officinalis*, planta medicinal que se usaba en la Edad Media como agente antidiabético. Con el paso del tiempo, se sintetizaron varias guanidinas como la metformina para su uso como agentes antipalúdicos. Los pacientes que tomaban la metformina sufrían de hipoglucemia. Esta última observación y la similitud del fármaco con la galegina condujo al desarrollo de varias biguanidas, sin embargo, la metformina es el fármaco antihiper glucémico oral más utilizado a nivel mundial (Rena *et al.*, 2017; OMS, 2022).

Se han reportado diversos mecanismos por los cuales la metformina actúa, sin embargo, no están del todo esclarecidos. Se ha demostrado que esta biguanida inhibe al complejo I de la cadena transportadora de electrones, produciendo un incremento en las proporciones ADP/ATP y AMP/ATP, los cuales activan a la AMPK a través de la cinasa hepática LKB1, lo que reduce los procesos de gluconeogénesis y lipogénesis a nivel hepático, además de incrementar la captación de glucosa mediada por insulina en los músculos. También, se han propuesto dos mecanismos indirectos para la activación de AMPK, el primero involucra la señalización de la enzima adenilato ciclasa (AC) y a la proteína quinasa A (PKA) y el segundo mecanismo a través de la participación de los lisosomas (Rena *et al.*, 2017).

#### **1.5.2.1.2 Tiazolidinedionas (TZD)**

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARS) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que forman heterodímeros con el receptor

reitinoide X. Existen tres isoformas de los PPARS;  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La activación de estos receptores a través de sus ligandos naturales (ácidos grasos) o bien, por otros agonistas obtenidos de la dieta, conduce a la transcripción de genes involucrados en la síntesis de varios procesos metabólicos, principalmente de lípidos y carbohidratos (Janani y Kumari, 2005).

La pioglitazona y rosiglitazona, son agonistas de PPAR  $\gamma$ , la cual se expresa de manera abundante en el tejido adiposo, y juega un papel central en el almacenamiento, regulación y transporte de los ácidos grasos. Su activación garantiza la secreción equilibrada de adipocinas (adiponectina y leptina) que favorecen la acción de la insulina en sus tejidos periféricos.

La activación PPAR  $\gamma$ , conlleva también al almacenamiento de los triglicéridos de forma hiperplásica (adipogénesis), lo que disminuye el riesgo de problemas cardiovasculares, o la liberación de los ácidos grasos a la circulación, mejorando el perfil metabólico e incrementando la sensibilidad de la insulina en el músculo esquelético principalmente (Janani y Kumari, 2005).

### **1.5.2.2 Secretagogos de insulina**

Los secretagogos de insulina son fármacos que favorecen la producción y secreción de insulina actuando por mecanismos directos (sulfonilureas y meglitinidas) o indirectos (miméticos de las incretinas e IDPP4).

#### **1.5.2.2.1 Sulfonilureas y meglitinidas**

Las sulfonilureas de primera generación se comercializaron en 1960, a este grupo pertenecían la tolbutamida, la acetohexamida, tolazamida y clorpropamida. Décadas después, se desarrollaron las sulfonilureas de segunda generación que incluye la gliclazida, glipizida, glimepirida y glibenclamida. Actualmente, solo hay tres medicamentos hipoglucemiantes (gliburida, glipizida y glimepirida) aprobados por la FDA y la OMS para su prescripción en el tratamiento de DMT2 (OMS,2022; Dahlén *et al.*, 2022).

El sitio de acción de las sulfonilureas, se denomina receptor sulfonilurea tipo 1

(SUR1). La interacción de estos fármacos con su receptor bloquea los canales de potasio dependiente de ATP ( $K_{ATP}$ ) de las células  $\beta$  pancreáticas, lo que induce la despolarización de la membrana celular, provocando la entrada de calcio intracelular, y así la secreción de insulina. Las sulfonilureas no requieren de glucosa para su efecto, por lo que pueden provocar una hipoglucemia grave, motivo por el cual se ha reducido su prescripción en los pacientes diabéticos.

Las meglitinidas tales como; la repaglinida y la nateglinida son otros fármacos secretagogos y ejercen sus efectos de una manera muy similar a las sulfonilureas (bloqueando los canales de  $K_{ATP}$ ), pero su sitio de unión es distinto y la duración de su efecto es menor (Ganesan *et al.*, 2022; Isaraili, 2011).

#### **1.5.2.2.2 Miméticos de incretinas e inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa 4 (IDPP-4)**

Las incretinas son hormonas intestinales liberadas al torrente circulatorio en respuesta a la ingesta de nutrientes. Se han identificado como el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y péptido relacionado con el glucagón tipo 1 (GLP-1). Estas hormonas ejercen sus efectos a través de receptores acoplados a proteínas G que se expresan en el SNC, cerebro, corazón, riñón, pulmón, tejido adiposo, tracto gastrointestinal y páncreas. La activación del GLP-1 amplifican la secreción de insulina estimulada por glucosa, además suprimen la secreción de glucagón, retrasan el vaciamiento gástrico, reducen la sensación de hambre, y contribuyen a la normalización del funcionamiento de las células (Lazo-Roblejo *et al.*, 2012).

Los miméticos de las incretinas actúan sobre los receptores GLP-1. La exenatida, un análogo semisintético proveniente del péptido exedin-4, aislado de la saliva del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*), fue comercializada en el 2005 como el primer mimético de incretina. La exenatida resiste más tiempo que la incretina GLP-1 a la acción enzimática de la dipeptidilpeptidasa 4 (DPP), enzima que degrada a las incretinas endógenas. Los inconvenientes en el uso de la exenatida es su elevado precio, y los

efectos adversos (náuseas, vómito y diarrea, y en casos aislados, puede producir pancreatitis).

Otra estrategia farmacológica relacionada con las incretinas ha sido la administración de fármacos inhibidores de la DPP-4, los cuales incrementan las concentraciones de GLP-1 y de GIP. La sitagliptina, vidagliptina y saxagliptina son inhibidores de la DPP-4 que se emplean solo en combinación con metformina, una sulfonilurea o una glitazona. Entre los principales efectos secundarios de este tipo de medicamento están la migraña, las infecciones urinarias y faríngeas, así como dolor de espalda y de extremidades (Wilcox, 2005).

### **1.5.2.3 Inhibidores de las enzimas $\alpha$ -glucosidasas**

En la década de los 90, la acarbosa y el miglitol fueron los primeros fármacos inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas (AGIs, por sus siglas en inglés) aprobados por la FDA como agentes antihiper glucémicos. Su mecanismo de acción consiste en el bloqueo de las  $\alpha$ -glucosidasas presentes en las microvellosidades de los enterocitos del intestino delgado, reduciendo la conversión de carbohidratos complejos a monosacáridos, y con ello la hiperglucemia posprandial. Los AGIs, han mostrado un efecto similar a la metformina y se prescriben en combinación con otros antidiabéticos, sin embargo, producen diarrea, efecto secundario que ha limitado su uso en la terapia (Danlén *et al.*, 2022; Israili, 2011).

### **1.5.2.4 Bloqueadores el cotransportador de glucosa-sodio tipo 2 (SGLT2)**

Los inhibidores del cotransportador de glucosa-sodio tipo 2 (SGLT2) son la clase de fármacos orales más modernos y prometedores para el tratamiento de la DMT2. La canagliflozina y dapagliflozina fueron los primeros inhibidores de SGLT2, que fueron aprobados en el 2013, seguido de la empagliflozina y ertugliflozina en el 2014 y 2017, respectivamente. Los inhibidores de SGLT2 reduce los niveles de glucosa tras el bloqueo del SGLT2 disminuyendo la reabsorción de este carbohidrato a nivel renal, lo que conduce a la excreción continua de glucosa por la orina. Los inhibidores de SGLT2 se utilizan en combinación con metformina o TZD e inhibidores de DPP4 (Dahlén *et al.*, 2022).

## 1.5 Plantas medicinales para el tratamiento de la DMT2

Las plantas medicinales han sido consideradas a través de los años como el origen o punto de partida del desarrollo de los medicamentos, ya que han contribuido al descubrimiento de nuevos compuestos con actividad biológica y a la producción estandarizada de fitopreparados para el tratamiento de múltiples enfermedades (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Mata *et al.*, 2019; Escandón-Rivera *et al.*, 2020).

México, al igual que otros países en vías de desarrollo, una proporción importante de la población utiliza terapias a base de plantas para tratar algún padecimiento. Las causas del uso de la herbolaria medicinal son muchas, incluyendo la falta de acceso a la medicación convencional, el costo de los medicamentos alopáticos, la preferencia por “lo natural”, sinónimo de inocuidad o bien, por los efectos adversos de los medicamentos alopáticos. En México, aproximadamente se emplean más de 380 especies vegetales para tratar la diabetes, siendo el nopal (*Opuntia sp.* Cactaceae), la prodigiosa (*Brickellia cavanillesi*, Asteraceae) y la tronadora (*Tecoma stans*, Bignoniaceae) las más utilizadas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Sin embargo, solo pocas especies han sido investigadas científicamente, y la mayoría de las investigaciones se han limitado a la evaluación preclínica de sus extractos o compuestos, y solo unas pocas se han enfocado a la realización de estudios clínicos (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Mata *et al.*, 2019 y referencias citadas ahí; Escandón-Rivera *et al.*, 2020).

Los preparados a base de plantas medicinales tienen algunas ventajas. Quizá las más importantes son los efectos sinérgicos o la polivalencia que ejercen los múltiples componentes presentes en los remedios fitoterápicos. Por lo general, los metabolitos especializados de esos preparados no poseen un único mecanismo de acción, sino que interactúan con más de un blanco molecular. Además, se ha demostrado que el efecto terapéutico de extractos íntegros suele ser superior a dosis equivalentes de compuestos puros, ya que el efecto observado resulta de la sinergia entre sus componentes. Estas propiedades resultan ideales para el tratamiento de enfermedades complejas como la DMT2.

## 1.6 Antecedentes del género *Peniocereus*

*Peniocereus* (A. Berger) Britton & Rose es un género de la familia Cactaceae, descrito por primera vez por Berger en 1905 como un subgénero del género *Cereus*. *Peniocereus* significa "hilos de *Cereus*", refiriéndose a los delgados tallos que caracterizan a los miembros pertenecientes a este género.

El género *Peniocereus* es relativamente pequeño ya que consta de 18 especies que incluyen a; *P. castellae* Sánchez-Mej., *P. chiapensis* (Bravo) Gómez-Hin. & H.M. Hern., *P. cuixmalensis* Sánchez-Mej., *P. fosterianus* Cutak, *P. greggii* variedad *greggii* (Engelm.) Britton & Rose, *P. greggii* variedad *transmontanus* (Engelm) U. Guzmán, *P. hirschtianus* (K. Schum) D.R. Hunt, *P. johnstonii* Britton & Rose, *P. lazaro-cardenasii* (J.L. Contr., J. Jiménez Ram., Sánchez- Mej. & C.A. Toledo) D.R. Hunt, *P. macdougallii* Cutak, *P. maculatus* (Weing.) Cutak, *P. marianus* (Gentry) Sánchez-Mej, *P. oaxacensis* (Britton & Rose) D.R. Hunt, *P. occidentales* Bravo ex S. Arias, U. Guzmán & Gama, *P. rosei* J.G. Ortega, *P. serpentinus* (Lag. & Rodr.) N.P. Taylor, *P. striatus* (Brandege) Buxb, *P. tepalcatepecanus* Sánchez-Mej. y *P. viperinus* (F.A.C Weber) Buxb). Estas se distribuyen desde el suroeste de los Estados Unidos y el norte de México, hasta Honduras y Nicaragua, pero la mayoría de ellas se encuentran en el territorio mexicano (Ariel *et al.*, 2005; Castertter y Underhill, 1937; Cortés-Vega *et al.*, 2008; Trópicos, 2020).

Las especies de *Peniocereus* crecen favorablemente en regiones áridas y bosques tropicales de la vertiente del océano Pacífico; estos cactus son arbustos bajos y semierectos que crecen postrados o trepados sobre otras plantas, tienen tallos delgados y cilíndricos, troncos cortos, pero leñosos, raíces en forma de tubérculos que generalmente se describen como nabos y tienen flores vistosas, voluminosas y aromáticas (Ariel *et al.*, 2005; Castertter y Underhill, 1937; Cortés-Vega *et al.*, 2008; Trópicos, 2020).

Con respecto a los estudios químicos del género se han identificado compuestos de tipo esteroidal, terpenoide, y flavonoides (Noguera-Gutierrez *et al.*, 2014; Knight y Petit, 1969; Knight *et al.*, 1966). Desde el punto de vista biológico, solo se ha comprobado las actividades antibacteriana y antioxidante de extractos de *Peniocereus maculatus*. Finalmente, solo a *P. serpentinus* y *P. greggii* se les ha documentado algún uso medicinal (Ariel *et al.*, 2005; Casterter y Underhill, 1937; Cortés-Vega *et al.*, 2008; Rea, 1997; Standley, 1926; Trópicos, 2020; Wilson *et al.*, 1996).

### **1.6.1 *Peniocereus greggii* (Engelm.) Britton & Rose (Cactaceae)**

*Peniocereus greggii* (Engelm.) Britton & Rose [Cactaceae] comúnmente conocida como la "reina de la noche", "night-blooming cereus", "queen of the night", "saramatracá", "huevo de venado", "asta de venado", "sweet-potato", "ho'ok vaa'o", "ho'o'k iwa" e "izé biné", crece en el norte de México en los estados de Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, así como el sur de los Estados Unidos en especial en Arizona, Nuevo México y Texas. Esta especie tiene dos variedades: *P. greggii transmontanus* y *P. greggii greggii*, esta última, es muy valorada por los Pimas y Pápagos por sus propiedades curativas, comestibles y hasta alucinógenas. Los Pimas y Pápagos le atribuyen a la decocción de la raíz de la planta propiedades medicinales para tratar la diabetes, desórdenes digestivos o genitourinarios, trastornos de la piel, dolor y el resfriado común. Otros nativos americanos utilizan las raíces mezcladas con grasa de venado para formar un bálsamo que usan para sanar las llagas, mientras que, la decocción la utilizan los jóvenes como estimulante cardíaco (Curtin, 1949; Kane, 2006; Kiesling, 2009; Moerman, 1998; Hicks, 1966; Hrdlicka, 1908; Ingram *et al.*, 1996; Muro *et al.*, 2012; Murphey, 1959; Raguso *et al.*, 2003; Sánchez-Salas *et al.*, 2009; White, 1948).

*Peniocereus greggii* variedad *greggii* tiene tallos delgados y extensos que emergen de una gran raíz en forma de tubérculo, además, este cactus produce esporádicamente entre los meses de junio y julio hermosas flores blancas que florecen solo en la noche, con



una intensa fragancia que atrae a sus polinizadores (**Figura 11-12**). Lamentablemente, por la belleza sus flores, este cactus está en la lista de especies en peligro de extinción (NOM-059-SEMARNAT-2010) por su uso ornamental en los mercados nacionales e internacionales. Afortunadamente, en la actualidad existen programas de carácter institucional para la conservación de la especie a través de técnicas de propagación, micropropagación y trasplante *in vitro* (Ingram *et al.*, 1996; Muro *et al.*, 2012; Murphey, 1959; Muñoz-Gómez *et al.*, 2022; Raguso *et al.*, 2003; Sánchez-Salas *et al.*, 2009; White, 1948).

A finales de la década de los 60, Knight y Pettit (1969) aislaron y caracterizaron esteroides de tipo colestano: macdougallina (**1**), peniocerol (**2**), desoxiviperidona (**3**), viperidona (**4**), y viperidinona (**5**) (Kane, 2006; Knight y Pettit, 1969).



**Figura 11.** *Peniocereus greggii* var. *greggii* (Engelm.) Britton & Rose [Cactaceas] (Fotos tomadas de Jaime Sánchez y Gisela Muro, 2009).



**Figura 12.** Muestra botánica de las raíces de *Peniocereus greggii*. Fotografía tomada por el Dr. Robert Bye.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento en la incidencia de la DMT2 a nivel mundial ha impactado negativamente en los sistemas de salud de la mayoría de los países y, en particular, en aquellos en vías de desarrollo. De acuerdo con el último reporte de la FID (2021), México ocupa el séptimo lugar en prevalencia de DMT2, además, la enfermedad constituye una de las primeras causas de muerte en nuestro país (INEGI, 2021). Para el tratamiento de la DMT2 se emplean numerosos agentes farmacológicos que se administran generalmente en forma combinada. Sin embargo, un gran sector de la población mexicana que padece diabetes utiliza la medicina tradicional de forma paralela con sus terapias alopáticas e incluso, en algunos casos, los pacientes abandonan el tratamiento alópata, sustituyéndolo totalmente por el uso de plantas medicinales (Escandón-Rivera *et al.*, 2020). Esta práctica ha adquirido un gran auge con el paso del tiempo, apoyándose en múltiples argumentos, entre los que destacan: la firme creencia de que lo natural es sinónimo de inocuidad, la carencia en la atención médica especializada, los altos costos de los medicamentos alopáticos y, en muchas regiones de la República Mexicana, simplemente por el apego a sus creencias y tradiciones.

Se estima que los mexicanos emplean varias especies vegetales para tratar la diabetes. Sin embargo, pocas han sido sujeto de estudios preclínicos o clínicos para respaldar su uso racional (Mata-Torres *et al.*, 2021; Escandon-Rivera *et al.*, 2020; Mata *et al.*, 2019).

En este marco de referencia, surge el presente trabajo de investigación que se desarrolló como parte de un proyecto multidisciplinario enfocado al estudio de especies vegetales selectas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la DMT2 (Flores-Bocanegra, *et al.*, 2019; Mata *et al.*, 2019; Muñoz-Gómez *et al.*, 2022; Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015). El estudio integral de estas especies permite generar no solo la información científica relacionada con su seguridad, eficacia, sino también algunos parámetros de calidad que permitan la integración de sus monografías tipo OMS y/o

farmacopéicas. En este trabajo se aborda la especie *Peniocereus greggii* var. *greggii* (Engelm.) Britton & Rose (Cactaceae) comúnmente conocida como la reina de la noche. La decocción de las raíces de esta cactácea es usada por los Pimas para tratar la diabetes y otros padecimientos (**Figuras S23-S24, ANEXO**) (Kane, 2006; Kiesling, 2009; Moerman, 1998). Desde el punto de vista químico se demostró que la raíz del cacto contiene 6-oxoesteroles con un núcleo colestano (Knight y Pettit, 1969).

Con base en lo anterior, este proyecto pretende establecer el potencial antidiabético de la reina de la noche con el propósito de generar la información científica necesaria que garantice su uso racional en las prácticas médicas alternativas.

### **III. HIPÓTESIS**

“El uso popular documentado de la decocción de las raíces de la especie medicinal *P. greggii* sugiere la presencia en la especie de principios antidiabéticos, los cuales pueden ser obtenidos y valorados utilizando la experimentación fitoquímica y farmacológica apropiada”.

### **IV. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo primordial del presente trabajo consiste en establecer la eficacia preclínica, la inocuidad y los parámetros de calidad relacionados con las pruebas de identidad química y valoración, de la especie medicinal *Peniocereus greggii* var. *greggii* con la finalidad de contribuir al uso racional de la especie en las prácticas médicas alternativas de México y al descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de la diabetes.

## V. OBJETIVOS PARTICULARES Y METAS

Para el cumplimiento del objetivo principal propuesto, se formularon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer de manera preliminar la inocuidad de la especie medicinal *P. greggii* var. *greggii* evaluando su toxicidad aguda utilizando el método de Lorke.
2. Evaluar el potencial hipoglucemiante *in vivo* del preparado tradicional utilizando un ensayo de tipo agudo en ratones.
3. Determinar el potencial antihiper glucémico de la decocción de droga cruda mediante las pruebas de la tolerancia oral a la glucosa y a la sacarosa en ratones.
4. Aislar y caracterizar a los principios activos presentes en la especie medicinal objeto de estudio utilizando procedimientos cromatográficos convencionales para el fraccionamiento y separación de los compuestos de interés.
5. Determinar la naturaleza y estructura molecular de los compuestos activos de *P. greggii* var. *greggii* mediante la aplicación de técnicas espectrométricas y espectroscópicas convencionales.
6. Evaluar a los productos mayoritarios obtenidos utilizando los mismos ensayos farmacológicos indicados en los objetivos 2 y 3.
7. Establecer los posibles mecanismos de acción de al menos uno los productos aislados. Este objetivo está en función de la actividad farmacológica que se logre demostrar.
8. Establecer los parámetros de identidad química de la droga cruda mediante el establecimiento de los perfiles cromatográficos aplicando las técnicas de cromatografía en capa delgada, cromatografía de gases y de líquidos de ultra eficiencia. El establecimiento de estas pruebas será de utilidad para generar los protocolos de calidad de la especie.
9. Desarrollar y validar un método analítico apropiado para cuantificar a los principios activos y/o compuestos marcadores de los preparados tradicionales. Este objetivo

permitirá complementar las pruebas de control de calidad y a futuro facilitar el desarrollo de productos estandarizados a base de las plantas medicinales.

## VI. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1 Material vegetal

Las raíces de la especie medicinal *P. greggii* var. *greggii* fueron recolectadas en el estado de Chihuahua, México, en agosto del 2018 (Lote 1), abril del 2019 (Lote 2), junio del 2019 (Lote 3) y marzo del 2020 (Lote 4). La autenticación de la planta fue realizada por el Dres. Robert Bye y Eldelmira Linares (Instituto de Biología, UNAM). Las muestras de referencia correspondientes fueron depositadas en el Herbario Nacional (MEXU) con el número de voucher (Bye & Linares 39908). El material vegetal seco se fragmentó (2 mm) en un molino de cuchillas Thomas Wiley Model 4 (Thomas Scientific, E.U.A.).

### 6.2 Preparación de extractos y esencia

La preparación de los extractos orgánicos en mediana escala se realizó a partir de la droga cruda molida, siguiendo dos diferentes técnicas experimentales.

El primer extracto de cloroformo (EC1) (200 g/1L  $\text{CHCl}_3$ ) se preparó previa basificación del material vegetal con KOH (10%) utilizando la técnica de maceración durante una semana. Al término de la extracción, el extracto resultante se filtró y se concentró a presión reducida obteniéndose 6.4 g de extracto.

El otro extracto orgánico (EC2) se preparó a partir del material vegetal seco y molido (2 kg), utilizando la técnica de maceración a temperatura ambiente y como disolventes una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1, 4 L), durante 21 días. El extracto resultante se filtró y concentró, obteniéndose 182 g, respectivamente de un residuo café.

La preparación del extracto acuoso se realizó a partir del material vegetal seco y molido (5 g) y 250 mL de agua destilada mediante la técnica de decocción. El extracto acuoso obtenido se filtró para separar el material vegetal y se concentró a sequedad en un evaporador equipado con una bomba de alto vacío, obteniéndose 1.03 g de un residuo café oscuro. Este proceso se repitió las veces que fueran necesarias hasta obtener 4.73 g de muestra (DPG).



De manera adicional se generó un preparado que consistió en la fracción de AcOEt derivada de la decocción (AcOEt-DPG); para ello el extracto acuoso resultante de la filtración se sometió a un proceso de reparto con 100 mL de AcOEt, este procedimiento se realizó por triplicado. Posteriormente, la fracción de AcOEt obtenida se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio. Este proceso se repitió las veces que fueran necesarias hasta obtener 37.6 mg de muestra.

Finalmente, el aceite esencial se obtuvo mediante la técnica de hidrodestilación durante 3 horas a partir de 120 g de la droga cruda (raíces) y 1.0 L de agua destilada. Al término de la extracción, la esencia se separó del destilado, mediante un proceso de reparto con diclorometano (3 × 100 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron al vacío. El aceite esencial se almacenó en viales ámbar a 4°C hasta su análisis por CG-EM. Esta metodología se realizó por triplicado (67.03 ± 7.81) utilizando el material vegetal identificado como Lote 1.

### **6.3 Estudio químico de *P. greggii***

#### **6.3.1 Análisis cromatográficos y caracterización de los productos naturales**

La cromatografía en columna abierta (cca) se realizó utilizando gel de sílice como adsorbente (Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 µm, malla de 70-230 mm ASTM). Los análisis cromatográficos cualitativos en capa fina (ccf) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de aluminio de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla de 3.5-7.0 mm ASTM) de diferentes dimensiones y empleando diversos sistemas de elución (Muñoz *et al.*, 2022). Como agente cromógeno se empleó una solución de sulfato de cerio amoniacal y/o reactivo de Dragendorff.

Los análisis por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas de baja resolución (UPLC-EM) se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia Acquity UPLC-H Class® marca Waters equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) acoplado a un detector de masas SQD2 utilizando

la técnica de ionización química a presión atmosférica (UPLC-EM-APCI) en los modos positivo (APCI<sup>+</sup>) y negativo (APCI<sup>-</sup>). Las muestras se analizaron en el sistema cromatográfico utilizando una columna fase reversa Acquity® BEH Shield RP18 (1.7 µm; 2.1 × 100 mm), y como fase móvil una mezcla binaria de CH<sub>3</sub>OH (**A**) y H<sub>2</sub>O (**B**; 0.1% ácido fórmico) en un gradiente de elución lineal: 0 min 50% **A**; 1.0 min 50% **A**; 3.0 min 85% **A**; 5.0 min 90% **A**; 7.0 min 100% **A**; 9.0 min 100% **A**; 9.1 min 50% **A** y 11.0 min 50% **A**; flujo: 0.3 mL/min, volumen de inyección: 3 µL. Las condiciones de análisis del detector SQD2 fueron las siguientes: voltaje corona: 0.3 µA; voltaje cono: 50 V; temperatura de solvatación: 500°C; gas de solvatación: nitrógeno (N<sub>2</sub>) 250 L/h; PDA: 200-400 nm con una resolución de 4 nm. El control del equipo, adquisición y procesamiento de los datos se realizaron utilizando el programa MassLynk 3.0 (Waters Corporation, Milford, MA, E.U.A.).

La cromatografía de gases (CG) se realizó en un cromatógrafo Agilent® 6890N (Agilent Technology, Palo Alto, CA., E.U.A.) equipado con un detector de masas (LECO-TOF). Todos los análisis se realizaron en una columna capilar DB-5 (Supelco®) [0.18 µm, 0.18 mm × 10 m] utilizando un gradiente de temperatura desde 40 hasta 340°C (4°C/min; 40 minutos). El helio se utilizó como gas acarreador (1 mL/min). La identificación de los componentes presentes en las muestras analizadas se realizó mediante el cálculo de los índices de retención aplicando la metodología desarrollada por Kováts que describe el uso de una serie homóloga de *n*-alcanos (C8-C20) (Van Del Dool y Kratz, 1963; NIST; Diciembre, 2005).

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corrección. Para la adquisición de los espectros de infrarrojo (película o pastilla) se utilizó un espectrofotómetro de FTIR/FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer, rango 4000-400 cm<sup>-1</sup> y de 600-50 cm<sup>-1</sup>.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC, HSQC, COSY y NOESY) se registraron en un espectrómetro Bruker III HD o Bruker BioSpin (Billerica, MA)

de 700 o 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 175 o 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno. En todos los casos se utilizó  $\text{CDCl}_3$  como disolvente. El registro de los espectros fue realizado por personal de Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Las FIDs se exportaron al programa MestReNova versión 12.0.0-20080 © 2017 Mestrelab Research S.L., donde se procesaron mediante transformada de Fourier, apodización por función exponencial utilizando un ancho de línea de 0.3 Hz, ajuste manual de fase y corrección de línea base con ajuste polinomial. Los espectros se referenciaron a la señal del TMS (0 ppm).

Los análisis de rotación óptica se registraron en un polarímetro Jasco P-1030 a  $25^\circ\text{C}$ , a la longitud de onda de 589 nm en  $\text{CHCl}_3$ , y aquellos de difracción de rayos X se realizaron en un difractómetro Bruker, estos análisis se realizaron en el Instituto de Química, UNAM.

### **6.3.2 Fraccionamiento de los extractos orgánicos EC1 y EC2**

Los extractos orgánicos EC1 y EC2 fueron independientemente sometidos a un proceso de fraccionamiento utilizando una cromatografía en columna abierta (cca) sobre gel de sílice (240 g y 3 kg, respectivamente) empleando como fase móvil mezclas en orden creciente de polaridad entre hexano-AcOEt (9:1 a 0:1, v/v) y AcOEt-MeOH (1:0 a 8:2; v/v). Estos procesos cromatográficos generaron un conjunto de 15 fracciones primarias en el caso de la muestra EC1 (EC1<sub>I</sub>-EC1<sub>XV</sub>) y 6 conjuntos de fracciones primarias del EC2 (EC2<sub>I</sub>-EC2<sub>VI</sub>).

### **6.3.3 Aislamiento del $\beta$ -sitosterol, $\beta$ -D-glucositosterol, peniocerol (2), viperidinona (5) y 3,6-dihidrocolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (6)**

La resolución cromatográfica de las fracciones secundarias EC1<sub>V</sub> [fase móvil: Hex-AcOEt (7:3)], EC1<sub>IX</sub> [fase móvil: Hex-AcOEt (5:5)], EC1<sub>XIII</sub> [fase móvil: Hex-AcOEt (2:8)] y EC1<sub>XIV</sub> [fase móvil: Hex-AcOEt (1:9)] utilizando a la cca sobre gel de sílice, permitió el

aislamiento y la purificación del  $\beta$ -sitosterol (67 mg),  $\beta$ -D-glucositolsterol (87 mg), peniocerol (**2**, 100 mg), viperidinona (**5**, 89 mg) y 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**, 100 mg).

**Peniocerol (2)**: Cristal translucido; *p.f.*: 173-174°C; UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 247.5 nm; FTIR  $\nu_{m\acute{a}x}$ : 3273.25, 2929.23, 2865.37, 1654.59, 1465.11 y 1376.18 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C [**Tabla 2**; **Figuras S8-S12**; **Tabla S1**]; EM-ESI-AR *m/z* 402.3497 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>.

**Viperidinona (5)**: Sólido blanco; *p.f.*: 178-180°C; UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 226.3 nm; FTIR  $\nu_{m\acute{a}x}$ : 3370.83, 2950.02, 2868.23, 1681.56, 1664.34 y 1466.74 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C [**Tabla 2**; **Figuras S18-S22**]; EM-ESI-AR *m/z* 433.3275 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>.

**3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (6)**: Sólido amarillo; *p.f.*: 172-173°C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 7.909 (c 1.1, CHCl<sub>3</sub>); UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 223 nm; FTIR  $\nu_{m\acute{a}x}$ : 3440.15, 3391.65, 2929.95, 2948.50, 2867.97, 1632.81 y 1612.83 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C [**Tabla 1**; **Figuras S1-S7**]; HRESIMS *m/z* 413.2881 [M+H]<sup>+</sup> (calculado para 413.2849, C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>). Cabe señalar que el error calculado fue  $\Delta_{ppm}$  7.7.

### 6.3.4 Aislamiento de la desoxiviperidona (3) y viperidona (4)

La resolución cromatográfica de 389 mg de un sólido blanco, que cristalizó de manera espontánea de la fracción EC2<sub>IV</sub> por cca [fase móvil: sistema isocrático Hex-AcOEt (3:7)] permitió el aislamiento de la desoxiviperidona (**3**, 234 mg).

Por otra parte, la fracción primaria EC2<sub>V</sub> (325 mg) fue recromatografiada por cca sobre gel de sílice [fase móvil: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:0 a 8:2)]. Este proceso generó un conjunto de siete fracciones secundarias (EC2<sub>V-1</sub>-EC2<sub>V-7</sub>). La resolución cromatográfica por cca sobre gel de sílice [fase móvil: sistema isocrático Hex-AcOEt (3:7)] de la fracción EC2<sub>V-2</sub> (114 mg) permitió el aislamiento de 52 mg de la viperidona (**4**).

**Desoxiviperidona (3)**: Sólido blanco; *p.f.*: 173°C; UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 240.4 nm; FTIR  $\nu_{m\acute{a}x}$ : 3506.86, 2942.81, 2863.80, 2843.14, 1665.20 y 1621.78 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C [Tabla 2; Figuras S13-S15]; EM-ESI-AR *m/z* 401.342 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>.

**Viperidona (4)**: Sólido blanco; *p.f.*: 172-173°C; UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 238.1 nm; FTIR  $\nu_{m\acute{a}x}$ : 3506.86, 2942.81, 2863.80, 2843.14, 1665.20 y 1621.78 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C [Tabla 2; Figuras S16-S17]; EM-ESI-AR *m/z* 417.3358 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>.

### 6.3.5 Rayos X del compuesto 2

El compuesto **2** fue recristalizado utilizando una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1); y el cristal obtenido tuvo las dimensiones de 0.362 × 0.240 × 0.088 mm<sup>3</sup>. Para el análisis por difracción de rayos X del producto **2**, todas las mediciones se realizaron en un difractómetro Bruker Smart Apex CCD equipado con grafito-monocromato y una radiación Mo K $\alpha$  ( $\lambda = 0.710\ 73\ \text{\AA}$ ) a 150 K. La estructura fue resuelta por el método SHELXS-2013 y refinada usando una matriz de mínimos cuadrados (Flack, 1983). Los datos cristalográficos se depositaron en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge (CCDC) con el número de acceso 2129283 (Tabla S1: Anexo). Estos datos son de acceso libre a través del enlace: [http://www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

### 6.3.6 Cálculos teóricos

Los cálculos teóricos de dicroísmo circular se realizaron para establecer la configuración absoluta de los centros estereogénicos presentes en el nuevo producto natural, el compuesto **6**. La búsqueda de los confórmeros de mínima energía se realizó con base en la configuración relativa previamente establecida para los enantiómeros 3*S*,10*R*,13*R*,17*R*-**6** y 3*R*,10*S*,13*S*,17*S*-**6**. Este análisis se realizó con el programa Spartan 08 (Wavefunction, Inc.) utilizando el método de Monte Carlo con el campo de fuerza de mecánica molecular MMFF (Molecular Mechanics Force Field). La optimización geométrica se realizó con el programa Gaussian 09 (Gaussian, Inc.) utilizando el funcional

de teoría DFT con el nivel B3LYP/DGTZVP y como disolvente  $\text{CHCl}_3$ . Posteriormente, los espectros de dicroísmo circular se calcularon a partir de la fuerza de rotación (R) en formas de velocidad dipolar ( $R_{vel}$ ) y longitud dipolo ( $R_{len}$ ) y la energía de excitación calculada (nm) de los 17 conformeros seleccionados. La predicción de los espectros se realizó utilizando los funcionales de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) con los conformeros minimizados por DFT. La energía de excitación calculada (nm) y la fuerza rotatoria (R) se simularon en una curva ECD utilizando SpecDis 1.71. Una vez obtenidos los espectros teóricos, se realizó un análisis comparativo de estos con aquellos obtenidos experimentalmente. El grado de concordancia del resultado de este análisis se fundamentó en la inspección visual para establecer la similitud entre los espectros analizados (Brunh *et al.*, 2017).

#### **6.4 Evaluación farmacológica de la DPG y/o compuestos puros en ratones**

Las evaluaciones farmacológicas preclínicas fueron realizadas de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manipulación de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999) y las guías internacionales para reducir el número de animales empleados en cada evaluación y así, refinar los procedimientos experimentales. Además, el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, aprobó los protocolos experimentales FQ/CICUAL/439/21 y FQ/CICUAL/440/21. Para estos experimentos, se utilizaron ratones macho de las cepas ICR y/o CD1 de aproximadamente ocho semanas de crecimiento (25-36 g). Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, además de tener acceso libre a alimento estándar (LabDiet 5001, MO) y agua purificada *ad libitum*.

Para la administración por vía intragástrica (*p.o.*) se utilizaron cánulas de acero inoxidable ( $3.0 \times 0.3$ ). Los extractos y compuestos puros, así como los controles positivos (glibenclamida, metformina y acarbosa) se suspendieron en una solución salina isotónica (SSI; NaCl 0.9%-Tween 80<sup>®</sup> 0.05%) a razón de 0.2 mL/10 g de peso ratón. Cada grupo

experimental se formó aleatoriamente con  $n = 6$ , y previo a cada evaluación fueron privados de alimento entre 0 a 4 horas y durante el desarrollo del protocolo experimental no recibieron agua. Al concluir los experimentos, todos los animales fueron sacrificados mediante hipoxia en una cámara de  $\text{CO}_2$ . Las pruebas se realizaron en animales tanto normoglucémicos como hiperglucémicos.

#### **6.4.1 Inducción experimental de hiperglucemia y determinación de la glucemia en ensayos de tipo agudo**

Los ratones macho de la cepa ICR fueron inducidos a un estado de hiperglucemia mediante la administración vía intraperitoneal (*i.p.*; 0.1 mL/10 g de peso) de una dosis única de estreptozotocina (STZ; 130 mg/kg; Sigma-Aldrich, E.U.A.) disuelta en una solución amortiguadora de citratos 0.1 M (pH = 4.5) previa administración de la nicotinamida (NA) disuelta en solución salina isotónica (NA; 50 mg/kg) utilizando la misma vía de administración. Para los ratones CD1 el estado de hiperglucemia fue inducido a través de la administración de tres dosis consecutivas de STZ (40 mg/kg, *i.p.*), y a los 7 o 21 días después, del tratamiento con la STZ los experimentos se llevaron a cabo (Garza-Rodea *et al.*, 2020; Nakurama *et al.*, 2006; Tahara *et al.*; 2011; Ventura-Sobrevilla *et al.*, 2011).

La toma de muestra para la determinación de la glucemia en los ensayos farmacológicos se realizó mediante una pequeña incisión en la cola de los animales para la recolección de la muestra sanguínea en la vena caudal. Los valores de glucemia (mg/dL) se registraron en un glucómetro comercial (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, E.U.A.) a los diferentes tiempos señalados en cada protocolo (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015). Los datos experimentales de los niveles de glucosa sanguínea se procesaron para obtener los porcentajes de variación de glucemia con respecto al nivel inicial, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Variación de glucosa} = \left( \frac{G_t - G_i}{G_i} \right) \times 100$$

**Ecuación 1.** % de variación de la glucemia donde  $G_i$  es el valor de la glucemia inicial;  $G_t$  es el valor de la glucemia al tiempo de determinación (minutos o horas) posterior a la administración de los tratamientos.

#### **6.4.2 Evaluación de la toxicidad aguda**

La determinación de la toxicidad aguda del extracto acuoso de las raíces de *P. greggii* (DPG) se basó en el método descrito por Lorke (1983). Los tratamientos se administraron por vía intragástrica (*p.o.*) en dos etapas independientes; en ambas fases se usaron doce ratones divididos en cuatro grupos ( $n = 3$ ). En la primera etapa, las dosis administradas fueron 10, 100 y 1000 mg/kg; en la segunda, 1600, 2900 y 5000 mg/kg. El grupo control sólo recibió el vehículo (SSI). En las dos fases, los animales se observaron durante 1 h posterior a la administración del tratamiento para identificar efectos tóxicos agudos, cambios conductuales o muerte. Durante catorce días, el peso de los animales se registró diariamente. Transcurrido este tiempo, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se procedió a la disección del animal para extraer sus órganos vitales (corazón, hígado, pulmones y riñones), y realizar el análisis macroscópico correspondiente en busca de lesiones. El protocolo de Lorke establece el cálculo de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) como la media geométrica entre la dosis donde se presente el deceso de algún animal y la dosis donde no haya muerte alguna de los roedores. En caso de no existir mortalidad se estima que la  $DL_{50}$  del preparado evaluado es mayor a 5 g/kg de peso (Lorke, 1983).

#### **6.4.3 Efecto hipoglucemiante agudo de la DPG**

La decocción de las raíces de *P. greggii* (DPG) se evaluó en un modelo hipoglucemiante empleando ratones normoglucémicos e hiperglucémicos (21 días). Previo al experimento, todos los animales se sometieron a un ayuno de 4 horas, los animales tanto normoglucémicos como hiperglucémicos se dividieron en grupos iguales ( $n = 6$ ). A



continuación, los niveles de glucosa sanguínea se midieron a diferentes tiempos 0, 1.5, 3.0, 5.0 y 7.0 horas posteriores a la administración oral del tratamiento. Como control positivo se utilizó a la glibenclamida (GLI, 10 mg/kg). Una vez obtenidos los valores de las lecturas de glucosa sanguínea (mg/dL), se calculó el área bajo la curva (ABC) de cada tratamiento utilizando la siguiente ecuación:

$$ABC [mg \times h/dL] = \sum_{t_0}^{t_n} \left( \frac{G_0 + G_i}{2} \right) (t_i - t_0) + \left( \frac{G_i + G_j}{2} \right) (t_j - t_i) + \dots$$

**Ecuación 2.** Cálculo de área bajo la curva (ABC) empleando el método de los trapezoides. Donde los subíndices 0, i, j, n, etc., representan los valores de glucemia [G] a las 0, 1.5, 3, n horas de medición [t].

#### 6.4.4 Pruebas de tolerancia oral a la glucosa y a la sacarosa

La muestra de DGP, y el compuesto **3** se evaluaron de manera independiente en una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos (NA-STZ de 7 días para la DPG y STZ de 21 días para el compuesto **3**). Previo a los experimentos, los animales fueron privados de alimento durante 4 horas. Enseguida, se obtuvieron los valores de glucemia basal. La DPG se administró a las dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg ( $n = 6$ ). El compuesto **3** se evaluó a las dosis de 10, 31.6 y 56 mg/kg ( $n = 6$ ). El grupo control solo recibió el vehículo (SSI) y como control positivo se administró metformina (MTF, 200 mg/kg). Después de treinta minutos de la administración de los tratamientos, todos los ratones fueron administrados con una carga oral de glucosa (1 g/kg). Los niveles de glucemia (mg/dL) se midieron a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración del carbohidrato. Con los datos obtenidos se realizó el cálculo del porcentaje de variación de la glucemia para cada tiempo de medición (**Ecuación 1**) y se realizó la gráfica correspondiente (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2019).

Por otra parte, con el preparado de la DPG se realizó de manera complementaria una prueba de tolerancia oral a la sacarosa (PTOS) en ratones normoglucémicos, para este

experimento se siguió el mismo protocolo descrito en el párrafo anterior, utilizando como control positivo a la acarbosa (ACA, 5 mg/kg) y como carbohidrato a la sacarosa (2 g/kg).

#### **6.4.5 Prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal**

La evaluación de la tolerancia a la insulina intraperitoneal (PTII) de la desoxiviperidona (**3**) se realizó en ratones hiperglucémicos con ayuno de 4 horas. Para ello, en primer lugar, se hizo la medición de la glucemia basal previo a la administración de todos los tratamientos [desoxiviperidona (**3**): 31.6 mg/kg; SSI y MET: 200 mg/kg]. Treinta minutos después los animales recibieron una dosis única de insulina mediante una administración *i.p.* (Humulin®, Lilly, E.U.A.; 0.5 U/kg). Posteriormente, se midió la glucemia a los tiempos de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos luego de la administración de la insulina y se realizó el cálculo del ABC como se describe en la **Ecuación 2** (Lozano-González *et al.*, 2019).

### **6.5 Evaluaciones *in vitro***

#### **6.5.1 Ensayo en células (C2C12 e INS-1E)**

Las evaluaciones *in vitro* se realizaron empleando a las líneas celulares C2C12 (miotúbulos de ratón) e INS-1E (insulinoma de rata). Las células C2C12 fueron adquiridas en la colección de la American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, VA, E.U.A.) y se cultivaron en placas de 12 o 24 pozos con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con los antibióticos [penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 µg/mL)], suero fetal bovino (FBS, 10%) y suero de caballo (HS, 10%), incubando a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células INS-1E (insulinoma de rata) fueron donadas por los Profesores C. B. Wollhein y Pierre Maechler de la Universidad de Ginebra (Suiza), y se cultivaron en medio de RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), piruvato de sodio (1 mM), 2-mercaptoetanol (50 µM), glutamina (2 mM), HEPES (10 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 µg/mL) en condiciones estándar de incubación. Las células que

alcanzaron entre un 70 y 90% de confluencia se utilizaron para los experimentos correspondientes.

### **6.5.2 Secreción de insulina en células INS-1E**

Para promover la secreción de insulina en las células pancreáticas, se sembraron células INS-1E en placas de 24 pozos y después de 48 h se trataron con los compuestos **2**, **3** y **6** a la concentración final de 10  $\mu\text{g/mL}$  durante 2 h. Posteriormente, las células INS-1E se lavaron con bicarbonato de Krebs-Ringer (KRBB), y se dividieron en dos grupos, el primer grupo fue tratado con el medio KRBB enriquecido con glucosa a una concentración de 2.5 mM y el segundo grupo con el mismo medio y una concentración final de glucosa de 8.3 mM. Ambos grupos se incubaron durante 90 minutos; al cabo de este tiempo, el medio se separó y congeló para determinar la concentración de insulina utilizando un kit de ELISA para rata/ratón de 96 pozos (EDM, Millipore) siguiendo las especificaciones del proveedor (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2019). Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Claudia Tovar (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, INCMNSZ).

### **6.5.3 Función mitocondrial en células C2C12**

Para determinar la función mitocondrial en células musculares de ratón C2C12 se utilizó el equipo Seahorse Extracellular Flux (XF) 96 Analyzer (Seahorse Bioscience, Inc., North Billerica, MA, E.U.A.) que mide los flujos de oxígeno [OCR, proporcional a la respiración mitocondrial] y de protones [ECAR, proporcional a la glucólisis]. Los miotúbulos de ratón C2C12 previamente diferenciados, se expusieron durante 12 horas a tres diferentes concentraciones [5, 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ] de los compuestos **2**, **3** y **6** a evaluar. Posteriormente, las células se lavaron e incubaron (1 hora a 37°C sin  $\text{CO}_2$ ) con un medio suplementado con glucosa (10 mM), glutamina (2 mM) y piruvato (1 mM) (pH = 7.4). Enseguida, estas células fueron sembradas en la microplaca de 96 pozos e incubadas a 37°C. Después de 10 minutos de calibración se inició la adición secuencial de la oligomicina (2 M), FCCP (0.5 M) y una mezcla de rotenona plus y antimicina A (0.5 M)

(Palacios-González *et al.*, 2014). Los experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Lilia Noriega (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, INCMNSZ).

## **6.6 Análisis estadístico**

Los resultados de porcentaje de variación de glucemia, o del ABC se expresaron como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). En todos los casos se analizaron los datos experimentales mediante un análisis de varianza (ANADEVA) de una o dos vías con diferentes valores de significancia (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) utilizando el programa estadístico GraphPad Prism (Versión 8.0; GraphPad Inc., LA Jolla, CA, E.U.A.), y se realizó una prueba *post hoc* de Dunnet o Bonferroni o Tukey para encontrar las diferencias verdaderamente significativas entre los grupos de prueba y control.

## **6.7 Pruebas de composición**

### **6.7.1 Desarrollo y validación del método analítico**

Con el propósito de establecer la composición de la droga cruda de *P. greggii*, y de cuantificar de manera simultánea a los principios marcadores se desarrolló y validó un método cromatográfico por la técnica de UPLC-EM-APCI. Estos análisis se realizaron utilizando las condiciones cromatográficas indicadas en el inciso **6.3.1** de esta sección experimental.

#### **6.7.1.1 Preparación de la matriz de trabajo**

La fracción soluble en AcOEt (AcOEt-DPG) (75  $\mu\text{g/mL}$ ) de *P. greggii* se preparó utilizando una mezcla de dioxano-metanol (1:1). La solución resultante se filtró a través de membranas de nylon Acrodisc® 0.20  $\mu\text{m}$  de 13 mm de diámetro y se analizaron por UPLC-EM-APCI.

Los análisis cromatográficos realizados, permitieron identificar a la desoxiviperidona (**3**) y a la viperidona (**4**) como los compuestos marcadores presentes en la fracción de AcOEt-DPG. La identificación de los productos de interés se realizó mediante el análisis de sus tiempos de retención y de los espectros de masas generados.

#### **6.7.1.2 Validación del método analítico**

Las condiciones utilizadas para la validación del método analítico por UPLC-EM-APCI para la cuantificación simultánea de los compuestos **3** y **4**, se realizó de acuerdo con los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos de la Internacional Conference on Harmonisation (ICH; Q2 (R1) 2005). Los parámetros de calidad evaluados son: linealidad del sistema y del método, precisión, exactitud y límites de detección y de cuantificación.

##### **6.7.1.2.1 Linealidad del sistema**

La linealidad del sistema se estableció construyendo seis diferentes curvas de calibración (concentración vs respuesta) para los productos **3** (1.0 mg/mL) y **4** (1.0 mg/mL). A partir de las soluciones anteriores, se prepararon las diluciones necesarias para obtener las concentraciones finales de las referencias **3** o **4** en un rango entre 5-75  $\mu\text{g/mL}$ . El área bajo la curva (ABC) correspondiente al pico de la referencia a cuantificar, se graficó con respecto a la concentración de cada referencia (**3** o **4**). Con los datos obtenidos se calculó la ordenada al origen ( $b_0$ ), la pendiente de la recta ( $b_1$ ), el coeficiente de determinación ( $R$ ) y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Los criterios aceptados para la linealidad del sistema son:  $R^2 > 0.98$ ;  $R > 0.999$ .

##### **6.7.1.2.2 Linealidad de método y exactitud**

La evaluación de la exactitud del método se realizó mediante la adición de tres diferentes concentraciones de los estándares **3** y **4** (5, 25 y 75  $\mu\text{g/mL}$ ) a la matriz de trabajo. Se evaluaron seis réplicas por concentración para así obtener los valores correspondientes de ABC. La respuesta de la cantidad recuperada para cada estándar

se realizó considerando el valor de la respuesta de la matriz de trabajo sin adición de ningún estándar. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de regresión lineal a partir de la gráfica de la cantidad adicionada ( $x$ ) contra la cantidad recuperada ( $y$ ), además se calcularon los parámetros estadísticos de  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $R$ , y  $R^2$ . Posteriormente, con los mismos resultados obtenidos se calculó el porcentaje de recobro utilizando la siguiente ecuación:

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

**Ecuación 3.** Cálculo del porcentaje de recobro.

Con estos resultados se calculó el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la pendiente de los porcentajes de recobro. Un método analítico es exacto si los porcentajes de recobro están en un rango de 98-102% con un  $CV \leq 2.0\%$ .

#### **6.7.1.2.3 Precisión del sistema**

La precisión del sistema se evaluó en términos de repetibilidad mediante el análisis por sextuplicado de la misma muestra y la precisión intermedia se evaluó con diferentes diluciones realizadas a partir de una solución de referencia (1 mg/mL). Las soluciones fueron preparadas en diferentes días por dos analistas diferentes. Ambos experimentos se realizaron a una concentración de los estándares de 20  $\mu\text{g/mL}$  para el compuesto **3** y de 50  $\mu\text{g/mL}$  para **4**. Con los datos obtenidos se calculó la desviación estándar (DE) y el CV de las respuestas analíticas observadas, para cada uno de los estándares. El criterio de aceptación establece que para que un método tenga repetibilidad el CV no debe ser mayor a 2.0 %.

#### **6.7.1.2.4 Límite de detección y límite de cuantificación**

Para determinar los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se construyeron curvas de calibración con una serie de diluciones a partir de una solución estándar de **3** y **4** con una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Las diluciones contenían

concentraciones en el rango de 1-50 µg/mL de la referencia a cuantificar. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal para cada estándar, y se calcularon los parámetros de  $b_0$ ,  $b_1$ , R y  $R^2$ . Así, los LD y LC fueron determinados de acuerdo con las expresiones matemáticas que se indican a continuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$$

**Ecuación 4.** Límite de detección.

$$LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

**Ecuación 5.** Límite de cuantificación.

#### **6.7.1.2.5 Cuantificación de la desoxiviperidona (3) y la viperidona (4)**

La cuantificación de los estándares **3** y **4** se realizó utilizando diferentes muestras de la droga cruda provenientes de cuatro diferentes lotes de la especie (Lotes 1-4) a una concentración de 75 µg/mL, por triplicado.

### **6.8 Determinación de las propiedades biofarmacéuticas de los componentes mayoritarios**

Considerando la relevante actividad biológica observada en los estudios *in vitro* de los compuestos bioactivos **2-6**, por último, se realizaron estudios de “drug-likeness” utilizando las plataformas computacionales de SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, (<http://www.swissadme.ch/>) y Molinspiration (<https://www.molinspiration.com>) y los protocolos ampliamente descritos en la literatura especializada (Daina *et al.*, 2017; Rashid, 2020).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolló como parte de un proyecto multidisciplinario enfocado al estudio de especies vegetales selectas utilizadas en la medicina popular de México para el tratamiento de la diabetes (Flores-Bocanegra, *et al.*, 2019; Mata *et al.*, 2019; Muñoz-Gómez *et al.*, 2022; Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015). El estudio integral de las especies incluidas en el proyecto permite generar la información científica relacionada con su seguridad, eficacia y parámetros de calidad, cumpliendo así con la propuesta de desarrollo de la medicina tradicional propuesto por la OMS para el período 2014-2023 (OMS, 2013). En este caso la especie seleccionada fue el cacto *P. greggii* var *greggii* conocido popularmente como reina de la noche, que de acuerdo a reportes etnobotánicos (Kane, 2006; Kiesling, 2009; Moerman, 1998) y entrevistas realizadas por el Dr. Robert Bye y colaboradores (2018) la raíz del cacto es valorada actualmente para el tratamiento de la diabetes y el dolor (**Figuras S23-S24, ANEXO**).

Para abordar la presente investigación se comprobó inicialmente la eficacia y seguridad preclínicas en roedores del preparado tradicional. Posteriormente se estableció la composición química del cacto y se determinaron algunos de los productos bioactivos mediante pruebas *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. Finalmente, se establecieron las pruebas para el control de calidad de la droga cruda de *P. greggii* var *greggii*.

### 7.1 Evaluación de la inocuidad y eficacia preclínica

#### 7.1.1 Inocuidad

Las pruebas de inocuidad se realizan con el propósito de documentar los posibles efectos tóxicos o reacciones adversas, que pudiera presentar la especie vegetal objeto de este estudio. Aunque de acuerdo con la OMS las plantas con un uso mayor a cien años pueden considerarse no tóxicas (OMS, 2013).



En este caso se analizó el efecto del preparado tradicional (DPG) tras un tratamiento agudo de acuerdo con el método de Lorke en ratones (Lorke, 1983). En este método se utilizan dosis logarítmicas de los tratamientos, y tiene la ventaja de que requieren pocos animales de experimentación, y el análisis global se realiza en un periodo corto de tiempo (Lorke, 1983).

La DPG no provocó efectos tóxicos en las dos fases del experimento. La DL<sub>50</sub> estimada fue mayor a 5 g/kg en roedores (**Tabla 1**). La necropsia realizada a los animales al cabo del ensayo indicó que el preparado no afecta órganos vitales. Estos resultados nos permiten inferir que los compuestos presentes en el extracto no son tóxicos tras una única exposición de DPG, además nos dio la pauta para la elección del rango de dosis a utilizar en los experimentos de las evaluaciones de eficacia realizadas.

**Tabla 1.** Toxicidad aguda de la decocción de las raíces de *P. greggii* (DPG).

<b>DPG</b>			
Fase 1		Fase 2	
Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad
10	0/3	1600	0/3
100	0/3	2900	0/3
1000	0/3	5000	0/3

### 7.1.2 Evaluación de la eficacia preclínica

Los estudios de eficacia, en este caso preclínica, se efectúan con el objetivo de validar experimentalmente los usos mejor documentados de la planta en las prácticas médicas alternativas (OMS, 2013). Cabe mencionar que las dosis de los extractos y compuestos puros se seleccionaron a través de un diseño farmacológico que prueba la eficacia preclínica. En una posterior etapa, se relacionará con las dosis del uso del preparado tradicional.

#### 7.1.2.1 Evaluación del potencial antidiabético

En el norte de México, la reina de la noche se utiliza para el tratamiento de la diabetes, siendo este uno de sus usos mejor establecidos (Curtin, 1949; Kane, 2006;

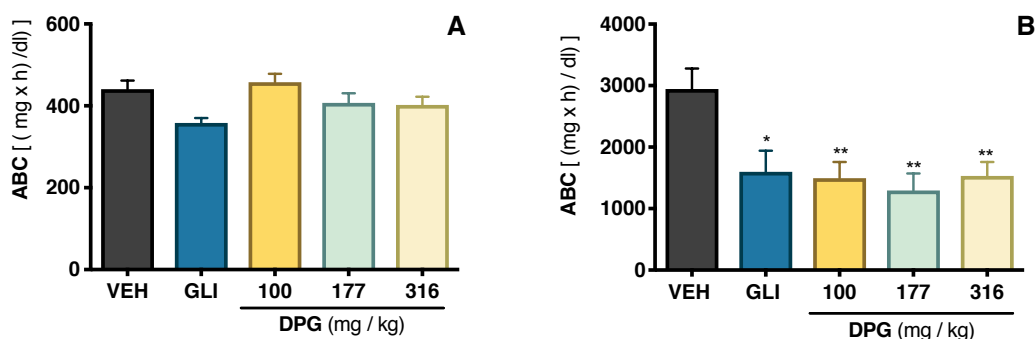
Kiesling, 2009; Moerman, 1998; Hicks, 1966; Hrdlicka, 1908; Ingram *et al.*, 1996; Muro *et al.*, 2012; Murphey, 1959; Raguso *et al.*, 2003; Sánchez-Salas *et al.*, 2009; White, 1948). De tal forma, que los estudios de eficacia se enfocaron a la evaluación *in vivo* de sus posibles efectos antihiper glucemiante e hipogluce miente, tanto en ratones normoglu cémicos como hiper glucémicos. El estado hiper glucémico en ratones se puede lograr mediante la administración de tres dosis subsecuentes de estreptozotocina (STZ) (ratones de la cepa CD1), o bien mediante una única administración de nicotinamida y estreptozotocina (NA-STZ) para los ratones de la cepa ICR. La diferencia entre los modelos es la sensibilidad de la cepa, sin embargo en ambos casos se generó una hiper glucemia leve (250-450 mg/dL), similar a la DMT2. (Garza-Rodea *et al.*, 2020; Nakurama *et al.*, 2006; Szkudelski T., 2001; Tahara *et al.*; 2011; Ventura-Sobrevilla *et al.*, 2011). Estos tratamientos provocan una hiper glucemia crónica e intolerancia a la glucosa, como se observa en la DMT2. En las células  $\beta$  pancreáticas la STZ provoca la alquilación del ADN; este daño conlleva a la necrosis de las células  $\beta$  pancreáticas, y por ende la reducción en la síntesis de insulina. La nicotinamida se administra para disminuir los efectos tóxicos de la STZ actuando como un protector en las células  $\beta$  pancreáticas (Garza-Rodea *et al.*, 2020; Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015; Nakurama *et al.*, 2006; Szkudelski T., 2001; Tahara *et al.*; 2011; Ventura-Sobrevilla *et al.*, 2011).

De acuerdo con lo anterior, la DPG y algunos productos se evaluaron en dos modelos farmacológicos ampliamente descritos en la literatura, el hipogluce miente agudo, y las pruebas de la tolerancia oral a carbohidratos (glucosa y sacarosa) (Fröde y Medeiro, 2008; Verspohl, 2002).

#### **7.1.2.1.1 Evaluación del efecto hipogluce miente agudo**

El modelo de evaluación del efecto hipogluce miente agudo en roedores permite evaluar sí un extracto o producto puro reduce los niveles de glucemia en ayuno (Fröde y Medeiro, 2008; Verspohl, 2002). Como fármaco de referencia se utilizó la glibenclamida. La decocción de las raíces de *P. greggii* (DPG), no presentó un efecto hipogluce miente

significativo en animales normoglucémicos a las dosis ensayadas (100-316 mg/kg) (**Figura 13, Panel A**). Sin embargo, la evaluación de DPG en ratones hiperglucémicos (**Figura 13, Panel B**) mostró que los tres tratamientos administrados presentan un efecto hipoglucemiante significativo, el mejor efecto se observó a la dosis de 177 mg/kg.



**Figura 13.** Efecto agudo de la decocción de *P. greggii* (DPG) en ratones normoglucémicos (**Panel A**) e hiperglucémicos (**Panel B**). VEH (vehículo: SSI); GLI (glibenclamida, 10 mg/kg). Cada barra representa el ABC  $\pm$  EEM (n = 6). La diferencia estadísticamente significativa se determinó mediante un ANADEVIA de 1 vía seguido de una prueba *post hoc* Dunnett (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

#### 7.1.2.1.2 Evaluación del efecto antihyperglucémico

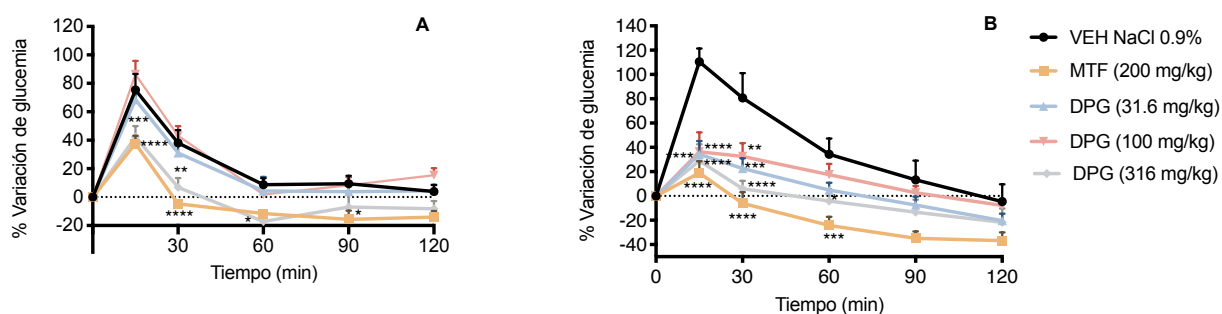
Para evaluar el potencial antihyperglucémico de la DPG se utilizaron las pruebas de tolerancia a la glucosa (PTGO) y a la sacarosa (PTSO) orales. La metformina y la acarbosa se utilizaron como controles positivos, respectivamente. Estos ensayos permiten detectar el efecto del preparado tradicional en hiperglucemias posprandiales. La PTGO mide la capacidad de los roedores, en este caso, para utilizar la glucosa. Los resultados se suelen representar como cursos temporales, es decir variación de la glucemia con respecto al tiempo, generalmente 120 minutos (Fröde y Medeiro, 2008).

Los efectos de la DPG en la PTGO en ratones normoglucémicos se representan en la **Figura 14, Panel A**. A la dosis de 316 mg/kg la DPG provocó una disminución significativa del pico posprandrial con respecto al control (**Figura 14, Panel A**). Por otra

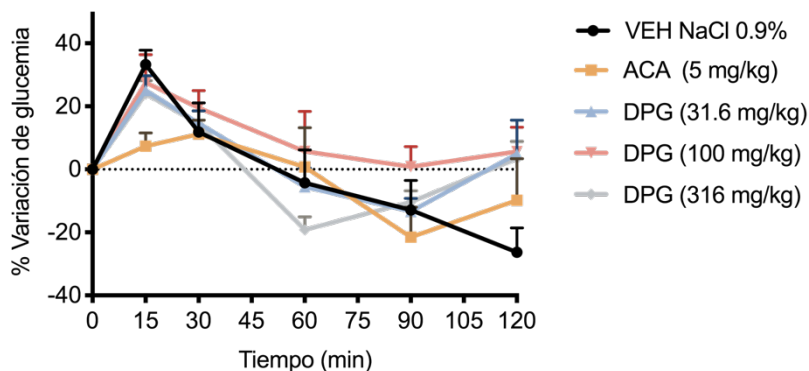
parte, todas las dosis de la DPG administradas (31.6, 100 y 316 mg/kg) a animales hiperglucémicos indujeron una reducción del pico pospandrial significativa (**Figura 14, Panel B**). Este efecto fue menor al observado para la MTF (200 mg/kg).

El conjunto de los resultados recién descritos indica que la DPG provoca un efecto antihyperglucémico por un mecanismo que podría involucrar la secreción y/o una modulación en los procesos de señalización de la insulina, la producción de glucosa hepática y/o la captación de ésta en el músculo esquelético.

En la PTGO, los resultados indicaron que la DPG, en contraste con la acarbosa, no afectaba el pico pospandrial con respecto al vehículo en ratones normoglucémicos (**Figura 15**). Estos resultados permitirían descartar a priori una inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas presentes en las vellosidades intestinales.



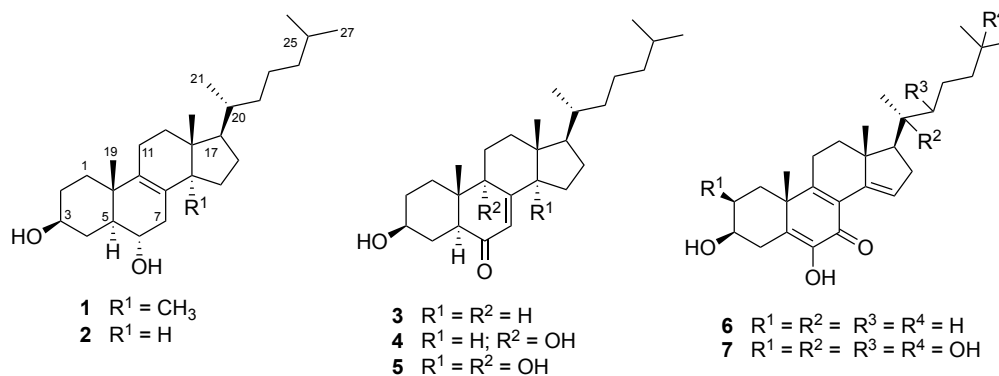
**Figura 14.** Efecto de la DPG en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos (**A**) e hiperglucémicos (**B**) en el modelo de tolerancia a la glucosa oral (PTGO). VEH (vehículo: SSI); MET (metformina, 200 mg/kg). Cada punto representa el promedio del % de variación de la glucemia  $\pm$  EEM ( $n = 6$ ). La diferencia estadísticamente significativa se determinó mediante un ANADEVa de dos vías seguido de una prueba *post hoc* Dunnett ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  y  $****p < 0.0001$ ).



**Figura 15.** Efecto de la DPG en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos en el modelo de tolerancia a la sacarosa oral (PTSO). VEH (vehículo: SSI); ACA (acarbose, 5 mg/kg). Cada punto representa el promedio del % de variación de la glucemia  $\pm$  EEM ( $n = 6$ ). La diferencia estadísticamente significativa se determinó mediante un ANADEVA de 1 vía seguido de una prueba *post hoc* Dunnett ( $*p < 0.05$ ).

## 7.2 Obtención de los metabolitos activos de *P. greggii*

Para separar y purificar a los constituyentes activos presentes en la droga cruda, se realizó el estudio químico. Tras demostrar que el perfil cromatográfico de la DPG contenía los metabolitos presentes en los extractos EC1 y EC2, se decidió trabajar con ellos. El extracto EC1 se preparó previa alcalinización del material con el propósito de obtener un crudo alcaloideo, considerando que las cactáceas son ricas en alcaloides (Cassels, 2018). EC1 y EC2 resultaron muy similares, sin embargo, EC1 contenía un metabolito no detectado en EC2 ni en la DPG. Tanto EC1 como EC2 se sometieron a sucesivos fraccionamientos cromatográficos mediante cca utilizando gel de sílice como fase estacionaria. Estos procesos cromatográficos permitieron el aislamiento y la caracterización de un nuevo producto natural, el compuesto 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**), presente solo en EC1. De manera adicional, se aislaron y caracterizaron al peniocerol (**2**), la desoxiviperidona (**3**), la viperidona (**4**), y la viperidinona (**5**), que se identificaron mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas reportadas en la literatura (Knight y Pettit, 1969; Issaadi *et al.*, 2019; Jayasuriya *et al.*, 2005; Suttiarporn *et al.*, 2015; Wilson *et al.*, 1996) (**Figura 16**).



**Figura 16.** Estructuras químicas de los compuesto **2 – 6** aislados de las raíces de *P. greggii* en este estudio, la macdougallina (**1**) compuesto reportado anteriormente para la especie y la calonisterona (**7**).

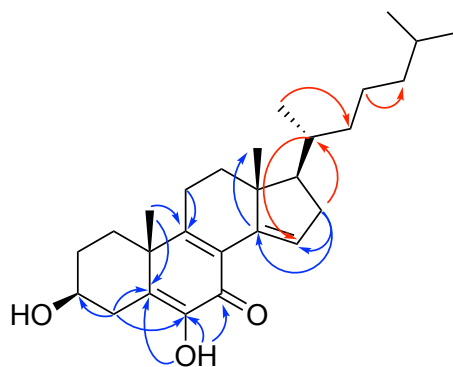
### 7.2.1 Elucidación estructural de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**)

El compuesto **6** se aisló como un sólido amarillo (100 mg, *p.f.* 172-173°C), ópticamente activo. El espectro de masas de alta resolución permitió establecer su fórmula molecular como C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub> y un índice de deficiencia de hidrógenos de ocho. Los espectros en el IR mostraron absorciones características para grupos hidroxilo (3440 y 3391 cm<sup>-1</sup>), dobles enlaces (2948 y 2929 cm<sup>-1</sup>), y un grupo cetona conjugado (1632 y 1612 cm<sup>-1</sup>) (**Figura S1, ANEXO**).

El análisis detallado de los espectros de RMN unidimensionales y bidimensionales [**Tabla 2, Figuras S2-S7, ANEXO**] permitió establecer que **6** presenta un núcleo similar al de la calonisterona (**7**), compuesto aislado previamente por Canonica y colaboradores (1973) a partir de *Ipomoea* sp. Como la calonisterona (**7**), el compuesto **6** tiene en su estructura un grupo  $\alpha$ -dicetona formado por los carbono C-5, C-6 y C-7, que forma un sistema hiperconjugado con los dos dobles enlaces ( $\Delta^{8-9}$  y  $\Delta^{14-15}$ ) que se encuentran en los anillos B y D, respectivamente. Las principales diferencias observadas en el espectro del compuesto **6** respecto al de **7** radica en las absorciones de los núcleos en las posiciones C-2, C-20, C-22 y C-25 del núcleo base; las cuales se observan en el espectro de **6** en  $\delta_H/\delta_C$

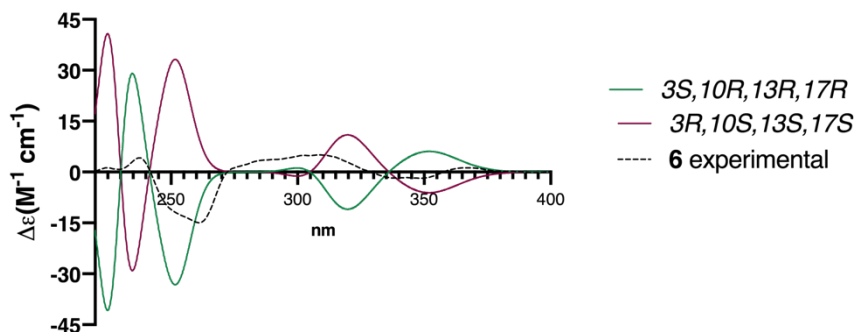
1.73, 1.98/30.7; 1.64/34.1; 1.08, 2.15/36.2; y 1.54/28.2. El desplazamiento químico de este conjunto de señales permite establecer que el compuesto **6** es el derivado no hidroxilado de **7**, que no presenta grupos hidroxilo en C-2, C-22, C-20 y C-25 presentes en **7** (Issaadi *et al.*, 2019; Jayasuriya *et al.*, 2005; Suttiarporn *et al.*, 2015; Wilson *et al.*, 1996).

De manera adicional, el análisis detallado de los espectros bidimensionales NOESY y HMBC (**Figura 17**) permitió corroborar de manera inequívoca la ubicación de los sustituyentes en C-3 y C-6 en el núcleo base del compuesto **6** además de confirmar la estructura propuesta. El análisis del experimento NOESY fue crucial para establecer la configuración relativa de los centros estereogénicos.



**Figura 17.** Correlaciones HMBC (azul) y NOESY (rojo) más importantes mostradas en la estructura del compuesto **6**.

El siguiente paso en la elucidación estructural del compuesto **6**, fue la determinación de la configuración absoluta en C-3, C-10, C-13 y C-17. Para ello se hizo un análisis comparativo del dicroísmo circular (DCE) obtenido experimentalmente con los calculados para los dos posibles enantiómeros de **6** [*3S*, *10R*, *13R*, *17R*-**6** y *3R*, *10S*, *13S*, *17S*-**6**] utilizando un nivel de teoría DFT B3LYP (**Figura 18**).



**Figura 18.** Espectros de dicroísmo circular electrónico (DCE) experimental del compuesto **6** (línea punteada negra) y de los enantiómeros *3S,10R,13R,17R-6* (verde) y *3R,10S,13S,17S-6*.

Los resultados del cálculo teórico y el experimental se encuentran en armonía con las consideraciones de tipo biogénico para este tipo de colestanos que generalmente tienen una configuración absoluta *S, R, R* y *R* en los centros C-3, C-10, C-13 y C-17, respectivamente. Con base en las evidencias antes descritas la estructura del compuesto novedoso **6** se designó con el nombre de 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**).



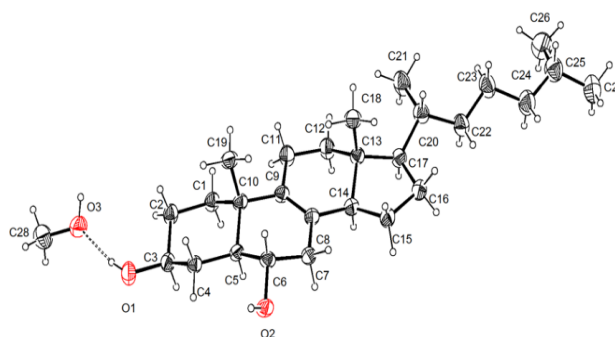
**Tabla 2.** Datos espectroscópicos de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**) en CDCl<sub>3</sub> (700 MHz para <sup>1</sup>H y 175 MHz para <sup>13</sup>C).

3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona ( <b>6</b> )		
No.	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J en Hz)
1	35.9	1.25 m
2	30.7	1.73 m; 1.98 m
3	71.3	3.66 m
4	33.1	2.16 m; 3.36 dd (13.0, 2.2)
5	130.0	
6	142.9	
7	180.2	
8	124.5	
9	163.9	
10	41.2	
11	24.6	2.56 m
12	35.9	1.50 m
13	46.0	
14	141.7	
15	127.8	6.89 s
16	37.1	2.21 m; 2.50 m
17	56.1	1.54 m
18	15.7	0.87 s
19	23.7	1.33 s
20	34.1	1.64 m
21	19.1	0.97 d (6.5)
22	36.2	1.08 m; 2.15 m
23	23.9	1.20 m; 1.38 m
24	39.6	1.15 m
25	28.2	1.54 m
26	22.7	0.87 d (6.5)
27	23.0	0.87 d (6.5)
OH		6.81 (s)

### 7.2.2 Caracterización estructural de los compuestos 2-5

De las fracciones primarias EC1<sub>xiii</sub>, EC1<sub>xiv</sub>, EC2<sub>iv</sub> y EC2<sub>v</sub> se aislaron los productos conocidos **2** – **5**. Las constantes espectroscópicas de estos productos se resumen en la **Tabla 3**. El análisis comparativo de los espectros de RMN (**Figuras S8-S22, ANEXO, Tabla 3**), de los compuestos **2** – **5**, con aquellos descritos previamente permitió su caracterización estructural (Djerassi *et al.*, 1963; Knight y Pettit, 1969; Knight *et al.*, 1966).

El compuesto **2** fue caracterizado inequívocamente mediante un análisis por difracción de rayos X. Esta técnica permitió confirmar su estructura como peniocerol (**2**) (**Figura 19**). Los desplazamientos de los experimentos resonancia magnética nuclear (RMN) se muestran en la **Tabla 3** y **Figuras S8-S12 (ANEXO)**. El compuesto **2**, mostró señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  característico de un colestano  $\text{C}_{27}$ , con un arreglo  $5\alpha,6\alpha$ -colest-8-ene- $3\beta$ -no, muy similar al de la macdougallina (**1**), compuesto reportado previamente para la especie por Knight & Pettit (1969). La diferencia entre **1** y **2** radica en la ausencia de un grupo metilo en C-14 en **2** (**Figura S10**) (Djerassi *et al.*, 1963; Knight & Pettit, 1969; Knight *et al.*, 1966).



**Figura 19.** Difracción por rayos X del peniocerol (**2**).

Los compuestos **3**, **4** y **5**, (desoxiviperidona, viperidona y viperidinona, respectivamente) corresponden a la categoría de los fitoecdiesteroides, estructuras muy similares a las hormonas que producen los insectos (Csábia *et al.*, 2015). Desde el punto de vista químico son esteroides  $\text{C}_{27}$  polihidroxilados. Estos compuestos poseen un grupo hidroxilo  $\beta$  en el C-3, señal característica de los esteroides, un grupo cromóforo con un sistema 7-en-6-ona en el anillo B, una cadena lateral  $\beta$  en el C-17 y una fusión *trans* de los anillos A/B, B/C y C/D (Canonca *et al.*, 1973; Csábia *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2021; Dinan *et al.*, 2021; Issaadi *et al.*, 2017). Sus desplazamientos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se muestran en la **Tabla 3**

y **Figuras S13-S22 (ANEXO)**. Las diferencias estructurales entre **3**, **4** y **5**, es la secuencia de hidroxilaciones en las posiciones C-9 y C-14. La viperidinona (**5**) es un esteroide con un sistema conjugado  $9\alpha$ - $14\alpha$ -dihidroxi-7-en-6-ona, los grupos hidroxilo dieron señales de 74.3 y 86.8 ppm, pertenecientes a los carbonos C-9 y C14, respectivamente (**Figura S20, ANEXO**). La viperidona (**4**) sólo tiene la señal en 74.0 ppm perteneciente al C-9 (**Figura S17, ANEXO**); finalmente la desoxiviperidona (**3**) no muestra estas señales en sus espectros de RMN (**Figura S14, ANEXO**).

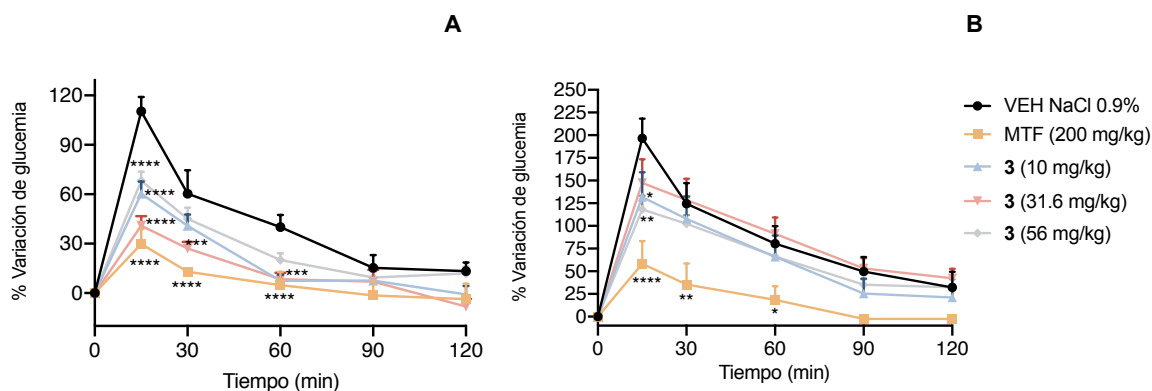
**Tabla 3.** Datos espectroscópicos de los compuestos **2-5** en CDCl<sub>3</sub> [<sup>1</sup>H RMN (400 MHz) y <sup>13</sup>C RMN (100 MHz)].

No.	<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>		<b>5</b>	
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (J en Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (J en Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (J en Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (J en Hz)
1	35.4	1.73 m	36.8	1.33 m; 1.83 m	30.3	1.95 m; 2.15 m	28.9	2.01 m
2	31.0	1.83 m	30.4	1.84 m; 2.20 m	30.7	1.30 m; 1.82 m	30.3	1.88 m
3	71.2	3.58 dd (10.6, 4.8)	70.8	3.61 d (10.8, 4.1)	70.3	3.63 d (11.2, 4.4)	70.2	3.63 d (11.2, 5.6)
4	32.0	2.20 m	30.9	1.41 m	29.7	1.35 m; 2.05 m	30.2	1.39 m; 2.23 m
5	47.8	1.35 m	53.3	2.23 m	44.7	2.82 d (12.3, 3.8)	46.8	3.13 d (12.3, 3.8)
6	67.6	3.71 m	199.7	/	199.2	/	201.5	/
7	37.8	2.45 dd (17.1, 6.6)	123.1	5.73 s	123.9	5.67 s	124.1	5.87 s
8	126.6	/	163.9	/	160.9	/	158.1	/
9	135.2	/	50.1	2.13 m	74.0	/	74.3	/
10	37.7	/	38.2	/	41.9	/	42.5	/
11	22.8	2.07 m	21.9	1.64 m; 1.78 m	28.0	1.40 m; 2.05 m	28.0	1.74 m; 1.99 m
12	36.0	1.32 m	30.3	1.41 m; 1.83 m	28.0	1.70 m; 1.99 m	27.8	2.12 m
13	42.1	/	44.5	/	46.5	/	46.5	/
14	51.6	2.06 m	55.6	2.0 dd (12.0, 4.1)	51.9	2.5 ddd (11.7, 6.8, 2.2)	86.8	/
15	23.8	1.13 m	22.6	1.48 m; 1.61 m	23.8	1.52 m; 1.64 m	26.3	1.43 m; 2.01 m
16	28.9	1.29 m	38.8	1.30 m; 2.13 m	35.3	1.40 m	31.7	1.58 m; 1.96 m
17	54.9	1.14 m	56.2	1.29 m	56.2	1.40 m	50.4	1.93 m
18	11.3	0.59 s	12.2	0.58 s	11.8	0.62 s	16.1	0.71 s
19	18.9	0.96 s	13.2	0.96 s	16.8	0.98 s	16.6	0.95 s
20	36.7	1.38 m	35.9	1.38 m	35.9	1.42 m	35.6	1.44 m
21	18.7	0.90 d (6.5)	18.8	0.94 d (6.5)	18.8	0.94 d (5.6)	18.9	0.95 d (6.0)
22	36.2	0.98 m	35.9	1.01 m; 1.35 m	35.9	1.35 m; 1.50 m	36.2	1.06 m; 1.38 m
23	23.8	1.58 m	23.8	1.32 m	22.8	1.20 m; 1.40 m	23.9	1.06 m; 1.38 m
24	39.6	1.11 m	39.4	1.11 m	39.4	1.16 m	39.4	1.13 m
25	28.1	1.49 m	27.9	1.50 m	28.6	1.54 m	28.0	1.52 m
26	22.7	0.84 d (6.5)	22.5	0.84 d (6.5)	22.5	0.86 d (6.5)	22.5	0.81 d (6.5)
27	23.0	0.85 d (6.5)	22.8	0.86 d (6.5)	22.6	0.88 d (6.5)	22.8	0.88 d (6.5)

## 7.3 Evaluación farmacológica de los productos aislados

### 7.3.1 Evaluación de la actividad antidiabética del compuesto 3

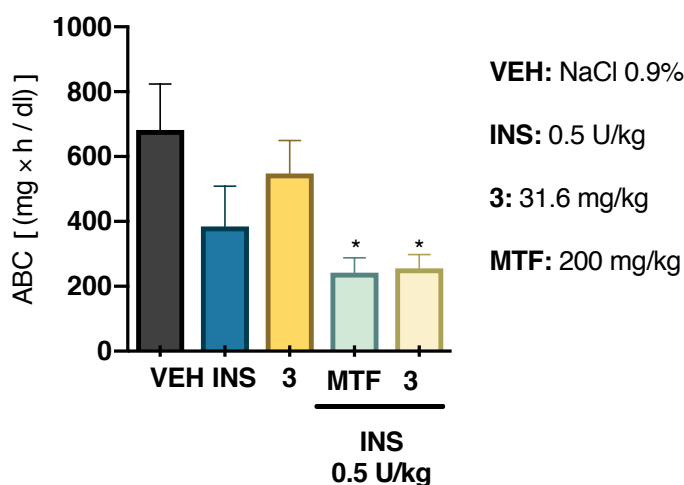
El producto **3**, mayoritario en la fracción soluble de AcOEt obtenida a partir de la DPG (AcOEt-DPG), se evaluó en una PTGO (**Figura 20**). Los resultados obtenidos indican que **3** presenta una acción antihiper glucémica importante en ratones tanto normoglucémicos ( $****p < 0.0001$ ) como hiper glucémicos ( $**p < 0.01$ ) a las tres dosis ensayadas (10, 31.6 y 56 mg/kg).



**Figura 20.** Efecto del compuesto **3** en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos (**A**) e hiper glucémicos (**B**) en el modelo de tolerancia a la glucosa oral (PTGO). VEH (vehículo: SSI); MET (metformina, 200 mg/kg). Cada punto representa el promedio del % de variación de la glucemia  $\pm$  EEM ( $n = 6$ ). La diferencia estadísticamente significativa se determinó mediante un ANADEVa de dos vías seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $*** p < 0.001$  y  $****p < 0.0001$ ).

El análisis de los cursos temporales (**Figura 20**) permitió establecer que la desoxiviperidona (**3**) podría actuar como un sensibilizador de insulina, a través del aumento en la captación de glucosa en sus tejidos blancos, o bien, mediante el incremento en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Para comprobar cualquiera de estas dos hipótesis, se realizó la prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal (PTII) en ratones hiper glucémicos (**Figura 21**). El compuesto **3** no presentó ningún efecto hipoglucemiante;

sin embargo, en coadministración con una dosis baja de insulina produjo una disminución estadísticamente significativa de la glucemia plasmática. Este mismo efecto se observó con la combinación de la insulina con metformina, que es un agente sensibilizador de la insulina. Estos resultados preliminares permiten inferir que el compuesto **3** actúa como un sensibilizador de la insulina. Cabe destacar que otros esteroides como el ergosterol, el dehidrocolesterol y el 7-dehidrocolesterol son agentes sensibilizadores de insulina debido a que promueven la autofosforilación del receptor de insulina; esto a su vez implica la continua translocación de GLUT-4, y por lo tanto la reducción de la glucemia. También la calonisterona (**7**) activa la enzima cinasa AKT, que participa en la regulación de diferentes vías metabólicas, siendo una de sus funciones más importantes la regulación del metabolismo de glucosa en el músculo esquelético (Das *et al.*, 2021; Suttiarporn *et al.*, 2015; Muñoz-Gómez *et al.*, 2022).

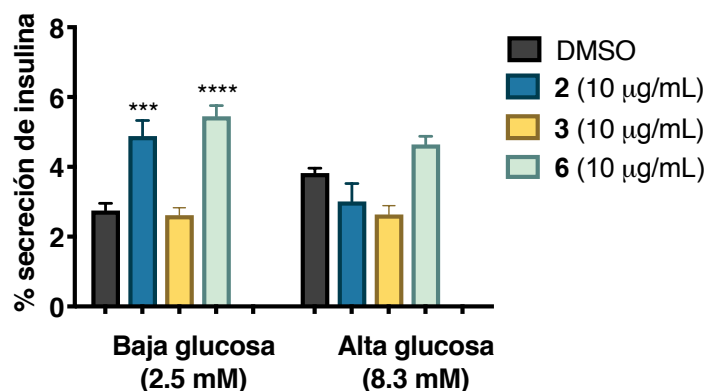


**Figura 21.** Prueba de la tolerancia a la insulina intraperitoneal (PTII) de la desoxiviperidona (**3**) en ratones hiperglucémicos de 23 días. VEH (vehículo: SSI); MET (metformina, 200 mg/kg); INS (0.5 U/kg). Cada barra representa el ABC  $\pm$  EEM (n = 6). La diferencia estadísticamente significativa se determinó mediante un ANADEVIA de una vía seguida de una prueba *post hoc* Dunnet (\* $p < 0.05$ ).

### 7.3.2 Efecto de los compuestos **2**, **3** y **6** en la secreción de insulina *in vitro*

Para evaluar la función de los compuestos **2**, **3** y **6** en la secreción de insulina, se realizó un experimento *in vitro* utilizando células INS-1E, simulando una condición de ayuno (bajas concentraciones de glucosa, 2.5 mM), y otra posprandial (altas concentraciones de glucosa, 8.3 mM). En la **Figura 22** se puede observar que el compuesto **2** solo produce un incremento significativo en la secreción de insulina a bajas concentraciones de glucosa comparado con el control ( $*p < 0.0001$ ). En cambio, el producto **6** promueve la secreción de insulina en las dos condiciones. En conjunto estos resultados confirman que el compuesto **2** promueve la secreción de insulina en condiciones de ayuno, lo cual podría explicar el efecto hipoglucemiante provocado por la DPG.

Finalmente, el compuesto **3** no presenta actividad, lo que confirma que su efecto antihiper glucémico podría deberse por un proceso de sensibilización a la insulina; este resultado es congruente con la actividad *in vivo* observada en el ensayo de PTII.



**Figura 22.** Efecto de los compuestos **2**, **3** y **6** en la secreción de insulina *in vitro* en células INS-1E. Cada barra representa el ABC  $\pm$  EEM (n = 3). La diferencia estadísticamente significativa se determinó mediante un ANADEVIA de una vía seguida de una prueba *post hoc* Tukey ( $***p < 0.01$  y  $****p < 0.0001$ ).

### 7.3.3 Función mitocondrial de los compuestos 2, 3 y 6

La importancia de evaluar la función mitocondrial radica en que dicha actividad está relacionada con la producción energía, así como los metabolismos de carbohidratos y lípidos (Harper *et al.*, 2008; Jakovljevic *et al.*, 2021). En los últimos años diversos estudios realizados indican que la disfunción mitocondrial juega un papel fundamental en el desarrollo de la resistencia a la insulina en el músculo esquelético y de la intolerancia a la glucosa.

De tal manera que, con la finalidad de poder complementar los estudios farmacológicos *in vitro*, se evaluó el efecto de **2**, **3** y **6** en la función mitocondrial mediante un análisis bioenergético en células de miotúbulos de ratón C2C12. Para ello, se utilizó el aparato Seahorse Extracellular Flux, este instrumento mide el flujo de oxígeno (OCR, proporcional a la respiración mitocondrial) y protones (ECAR, proporcional a la glucólisis) después de la adición en secuencia de algunos inhibidores de la fosforilación oxidativa. Así, para la realización de los experimentos se añade primero, oligomicina (2 mM, un inhibidor de la ATPasa), luego FCCP (0.5 mM, un agente desacoplante), y finalmente una mezcla de rotenona y antimicina A (0.5 mM, inhibidores del complejo I y III, respectivamente de la cadena respiratoria) (Schmidt *et al.*, 2021).

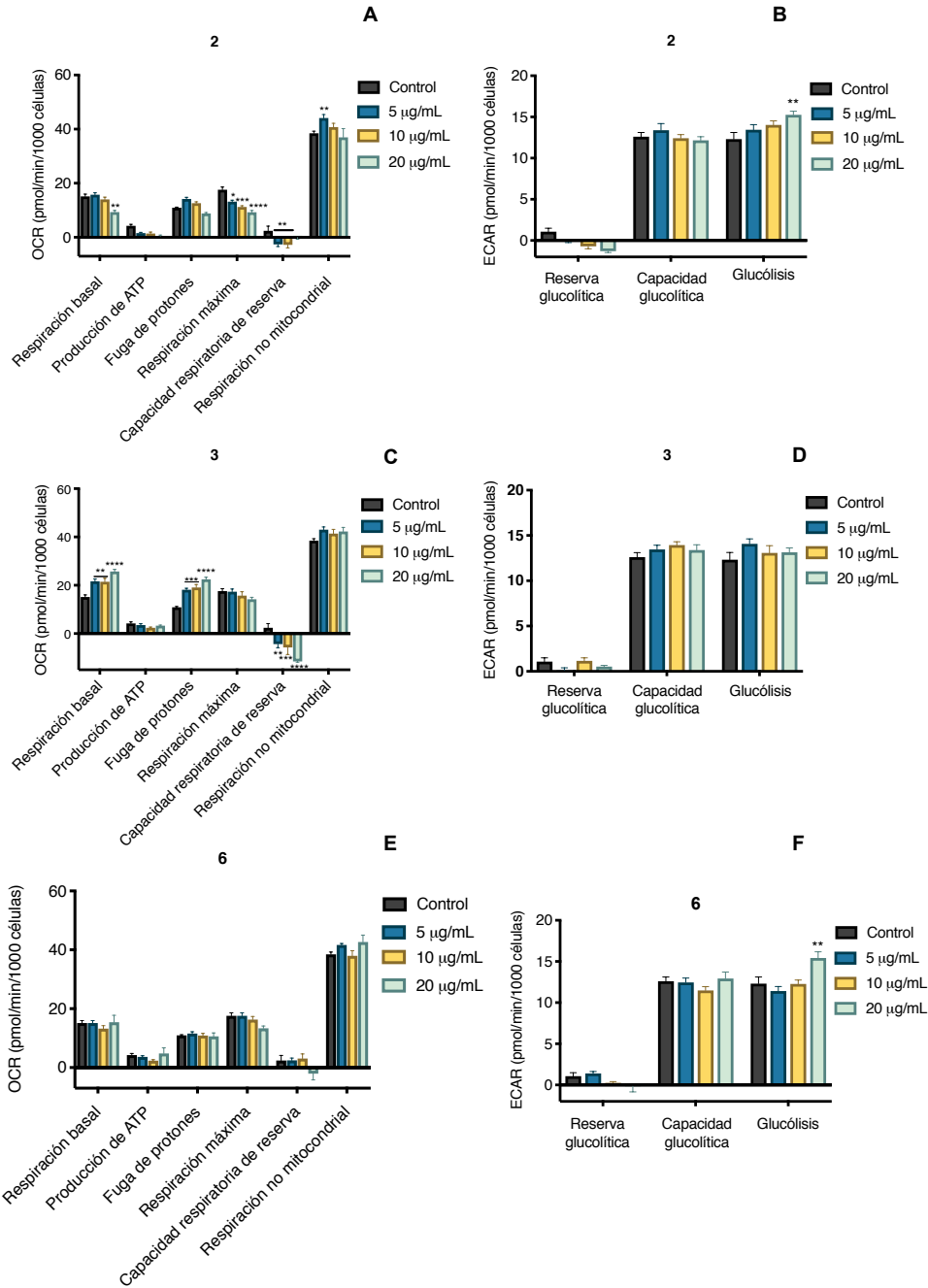
Los resultados obtenidos a partir de esta evaluación se muestran en las **Figuras 23** y **24**. El compuesto **3** incrementa de manera dependiente de la concentración la respiración basal y la fuga de protones. Por otra parte, ninguno de los compuestos evaluados afecta la producción de ATP, y solo el compuesto **2** en la respiración máxima disminuye de manera significativa esta producción.

Por otra parte, los compuestos **2** y **3** disminuyen la capacidad respiratoria de reserva mientras que **6** la incrementa a bajas concentraciones. Por último, el compuesto **6** aumenta significativamente la respiración no mitocondrial, y el producto **2** la disminuye (**Figuras 23** y **24; Panel A, C y E**).

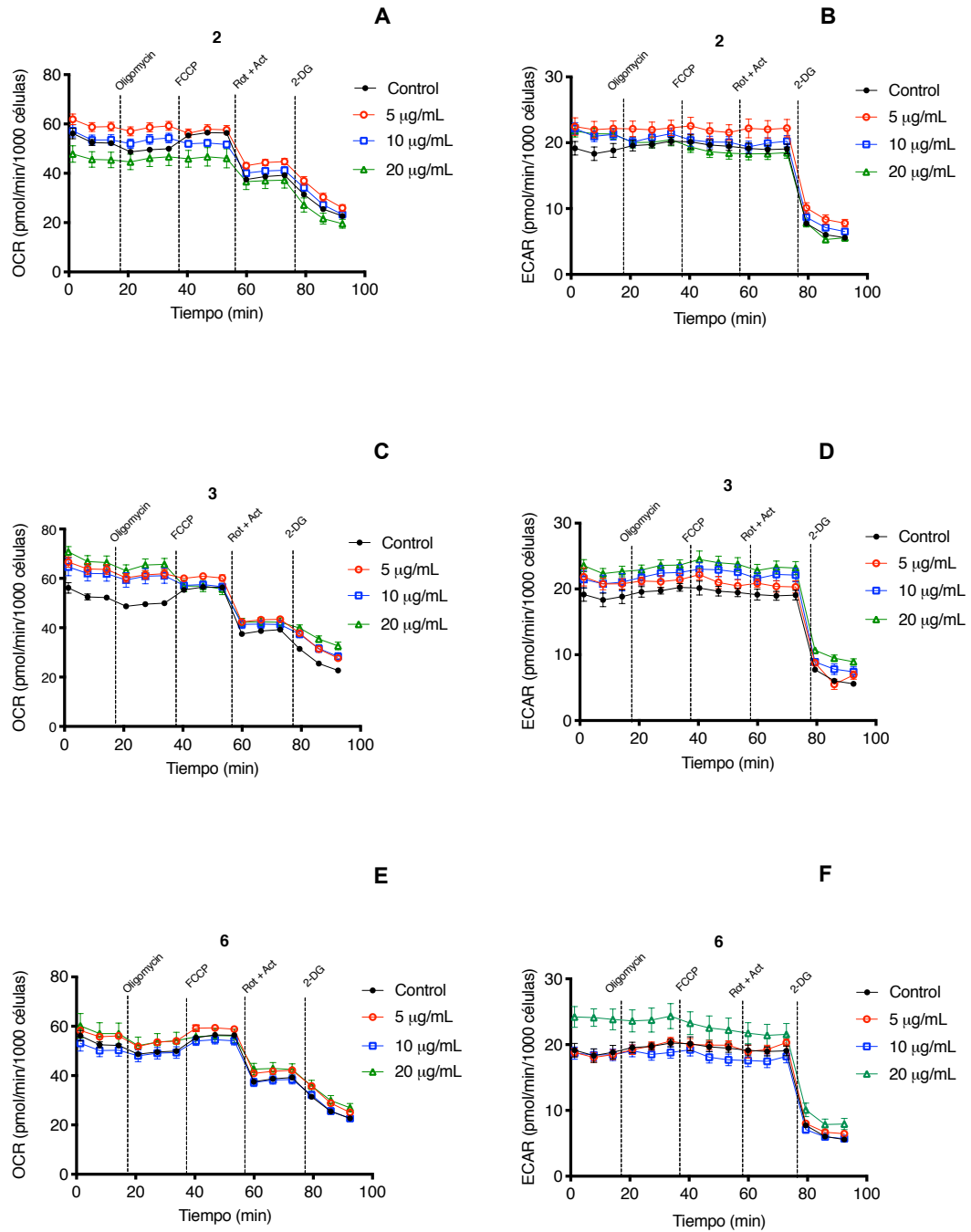


La fuga de protones es un parámetro fundamental en el análisis bioenergético de la mitocondria, ya que representa la conductancia de los protones a través de la fosforilación oxidativa. El incremento de este parámetro, nos indica la existencia de proteínas desacopladas, que desencadenan mecanismos de termogénesis para mantener el uso constante de los hidratos de carbono en la célula muscular, mejorando así, el perfil metabólico y en consecuencia, la sensibilidad de la insulina (Jastronch *et al.*, 2010), estos resultados indican que el compuesto **3** podría estar actuando a través de este mecanismo.

Las gráficas de ECAR nos indican la producción de ATP (vía glucólisis) y el metabolismo de glucosa en condiciones anaeróbicas, situación que predomina en la DMT2. Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas; **B**, **D** y **F**, de las **Figuras 23** y **24**, en donde podemos observar que todos los compuestos evaluados, a la mayor concentración ensayada (20  $\mu\text{g/mL}$ ), incrementan la glucólisis. Con base en estos resultados se puede concluir que los compuestos **3** y **6** actúan de forma favorable en el funcionamiento mitocondrial en caso de prevalecer un desequilibrio metabólico.



**Figura 23.** Actividad de los compuestos **2**, **3** y **6** en las tasas de consumo de oxígeno (**A**, **C** y **E**) y de acidificación extracelular (**B**, **D** y **F**) en células de miotúbulos de ratón C2C12. Cada barra representa el ABC  $\pm$  EEM (n = 3). La diferencia estadísticamente significativa se determinó mediante un ANADEVa de una vía seguida de una prueba *post hoc* Tukey (\*\*\*)  $p < 0.01$  y \*\*\*\*)  $p < 0.0001$ ).



**Figura 24.** Cursos temporales de las tasas de consumo de oxígeno (**A**, **C** y **E**) y de acidificación extracelular (**B**, **D** y **F**) en células de miotúbulos de ratón C2C12 de los compuestos **2**, **3** y **6**. Cada punto representa el % de  $O_2$  o  $H^+$   $\pm$  EEM ( $n = 3$ ). La diferencia estadísticamente significativa se determinó mediante un ANADEVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* Tukey (\*\* $p < 0.01$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## 7.4 Establecimiento de las pruebas químicas de identidad y composición

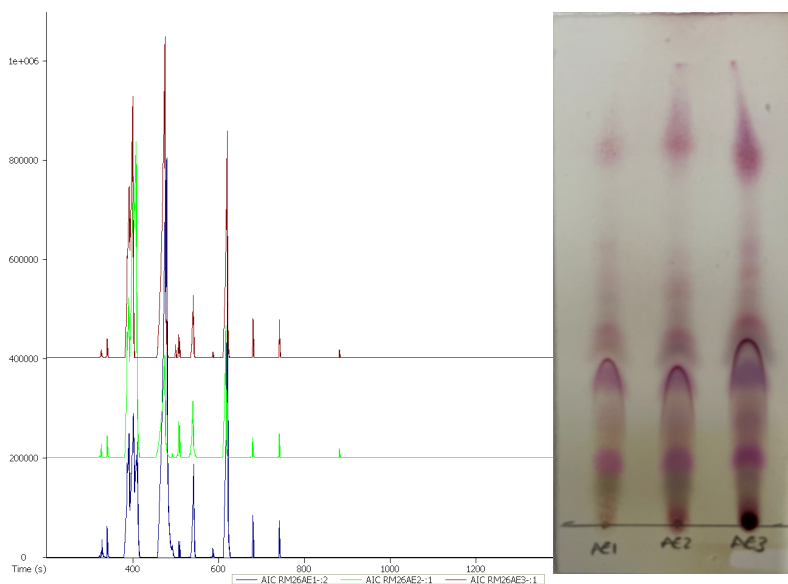
### 7.4.1 Composición química del aceite esencial

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial se realizó por la técnica de cromatografía de gases (CG) acoplada a la espectrometría de masas (EM). La CG-EM es el método de elección para realizar el análisis de la composición de los aceites esenciales debido a la volatilidad de los constituyentes presentes, y a la sensibilidad y la eficiencia de la técnica cromatográfica (Adams, 2007).

Los resultados derivados de estos análisis se resumen en la **Tabla 4** y en la **Figura 25**. El rendimiento obtenido fue de  $67.03 \pm 7.81$  mg. El análisis por triplicado de la esencia proveniente del Lote 1 reveló la presencia de los derivados de ácidos carboxílicos: octanoico (17.9%), dodecanoico (8.3%) y pentanoico (6.8%), además de la isoserina (13.5%) como los constituyentes mayoritarios presentes. Esta composición representa el ~66% de la composición total de la esencia.

**Tabla 4.** Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial (Lote 1) de las raíces de *P. greggii*

Compuesto	% Área	Fórmula	Peso molecular	Similitud	Índice de retención experimental (DB5)	Índice de retención teórico (DB5)
Ac. octanoico	$17.88 \pm 7.89$	$C_8H_{16}O_2$	144	927	$1210.35 \pm 6.71$	1182
No identificado	$18.09 \pm 1.86$	-	-	-	$1064.7 \pm 0.01$	-
Isoserina	$13.54 \pm 2.06$	$C_3H_7NO_3$	105	999	$1044.6 \pm 0.98$	-
Ac. dodecanoico	$8.305 \pm 3.79$	$C_{12}H_{24}O_2$	200	926	$1560.03 \pm 5.37$	1567
Ac. pentanoico	$6.806 \pm 2.63$	$C_5H_{10}O_2$	102	917	$1081 \pm 2.68$	933
6-metil-2-heptanona	$0.2708 \pm 0.102$	$C_8H_{16}O$	128	941	$941.68 \pm 0.05$	956
5-etildihidro 2-(3H)-furanona	$1.401 \pm 0.176$	$C_3H_{10}O_2$	114	942	$1037.06 \pm 0.152$	1047



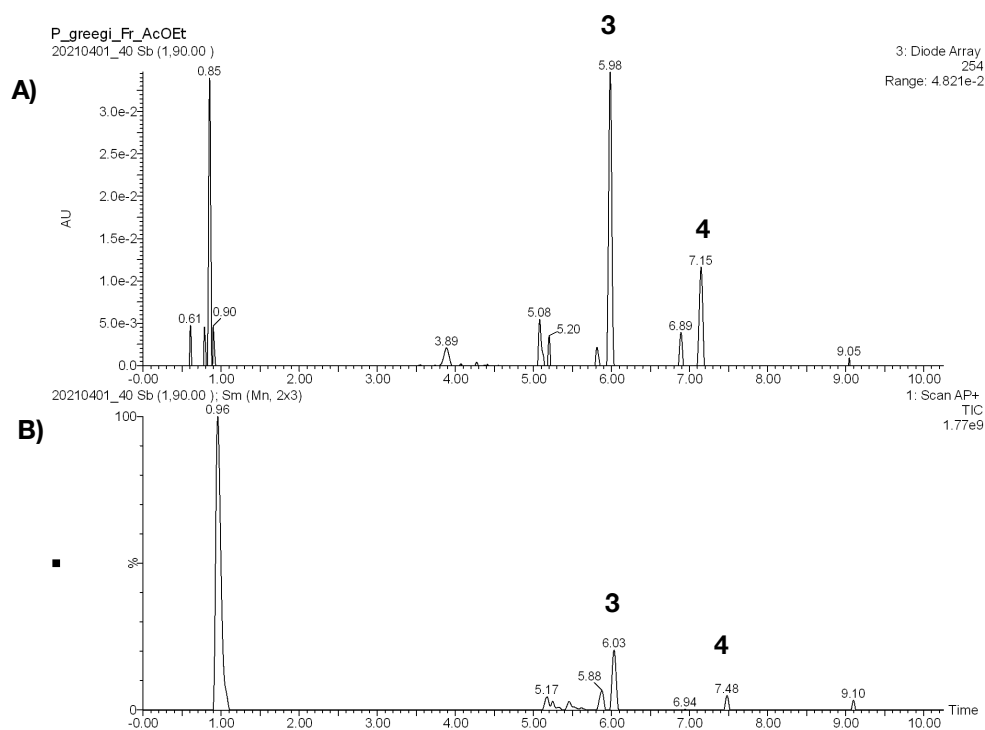
**Figura 25.** Cromatograma de gases y cromatografía en capa delgada correspondiente al aceite esencial obtenido de las raíces de *P. greggii* (Lote 1) analizado en una columna capilar DB-5 y sobre gel de sílice.

#### 7.4.2 Desarrollo del método analítico

Con el objetivo de completar las pruebas de identidad química mediante el establecimiento de perfiles cromatográficos, así como desarrollar un método apropiado para establecer la composición de la droga cruda y cuantificar el contenido de los principios activos y/o marcadores, se utilizó la técnica de UPLC-EM-APCI. Esta técnica acoplada se seleccionó debido a su gran selectividad para la detección de todos los componentes presentes en matrices de naturaleza química compleja, al utilizar de manera simultánea a los detectores de UV (PDA) y de masas (SQD2) (Engström *et al.*, 2015; Nordtröm *et al.*, 2006).

El desarrollo del método analítico apropiado para la detección de los compuestos marcadores presentes en las raíces de la droga cruda de *P. greggii* se realizó por ensayo y error. Este análisis permitió establecer que la desoxiviperidona (**3**), y la viperidona (**4**) constituyen los compuestos marcadores para la identificación de la especie. Las condiciones óptimas de separación fueron obtenidas en una columna fase reversa Acquity® BEH Shield RP18 (1.7  $\mu\text{m}$ ; 2.1  $\times$  100 mm), utilizando como fase móvil una mezcla

binaria de CH<sub>3</sub>OH (**A**) y H<sub>2</sub>O (**B**; 0.1% ácido fórmico) en un gradiente de elución lineal: 0 min 50% **A**; 1.0 min 50% **A**; 3.0 min 85% **A**; 5.0 min 90% **A**; 7.0 min 100% **A**; 9.0 min 100% **A**; 9.1 min 50% **A** y 11.0 min 50% **A**; flujo: 0.3 mL/min, volumen de inyección: 3 μL. El análisis de la AcOEt-DPG mediante la aplicación de estas condiciones analíticas generó el cromatograma que se ilustra en la **Figura 26**, donde los picos correspondientes a la desoxiviperidona (**3**; *t<sub>R</sub>* 5.98 min) y la viperidona (**4**; *t<sub>R</sub>* 7.15 min) representan el ~21% y ~32%, respectivamente del total del área cuantificada en el cromatograma.



**Figura 26.** **A)** Perfil cromatográfico de la AcOEt-DPG por UPLC-EM-APCI. Picos: desoxiviperidona (**3**); viperidona (**4**). **B)** Cromatograma de corriente iónica total (TIC) en modo de ionización APCI<sup>+</sup> de los compuestos **3** y **4**. Fase estacionaria: Acquity® BEH Shield RP18 (1.7 μm; 2.1 × 100 mm); fase móvil: gradiente mezcla binaria de CH<sub>3</sub>OH (**A**) y H<sub>2</sub>O (**B**; 0.1% ácido fórmico); flujo: 0.3 μL/min; detección: 254 nm.

### 7.4.3 Validación de método analítico para la cuantificación simultánea de 3 y

#### 4

Una vez establecido el perfil cromatográfico inciso **7.4.2** se procedió a realizar la validación del método analítico para la cuantificación de la desoxiviperidona (**3**) y la viperidona (**4**) presentes en diferentes Lotes (1-4) de *P. greggii*.

La validación tiene como objetivo demostrar que la estrategia experimental desarrollada es adecuada para un propósito específico. De esta manera, el proceso de validación consiste en generar la información que demuestre desde un punto de vista analítico, que un método cumple con las características de desempeño aprobadas por las Guías de Validación de la FDA [ICH Q2 (R1), 2005].

Los parámetros de calidad que se evaluaron para el desarrollo del presente protocolo de validación son: linealidad del sistema y del método, exactitud, límites de detección y cuantificación, y precisión. Los resultados globales experimentales de la validación se resumen en la **Tabla 5**.

La linealidad se define como la capacidad de un método para obtener respuestas analíticas directamente proporcionales a la concentración de un analito. La linealidad del sistema se determinó preparando seis curvas de calibración de la desoxiviperidona (**3**) (5, 7.5, 20, 50 y 75  $\mu\text{g/mL}$ ) y de la viperidona (**4**) (5, 7.5, 25, 50 y 75  $\mu\text{g/mL}$ ), y se construyeron las gráficas de concentración vs respuesta correspondientes (**Figura 27**). El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple y permitieron establecer la linealidad del sistema cromatográfico en el intervalo de concentraciones analizadas [ $R^2=0.9935$  (UV)/ $0.9915$  (EM) (**3**) y  $0.9963$  (UV)/ $0.9950$  (EM)  $0.999$  (**4**)].

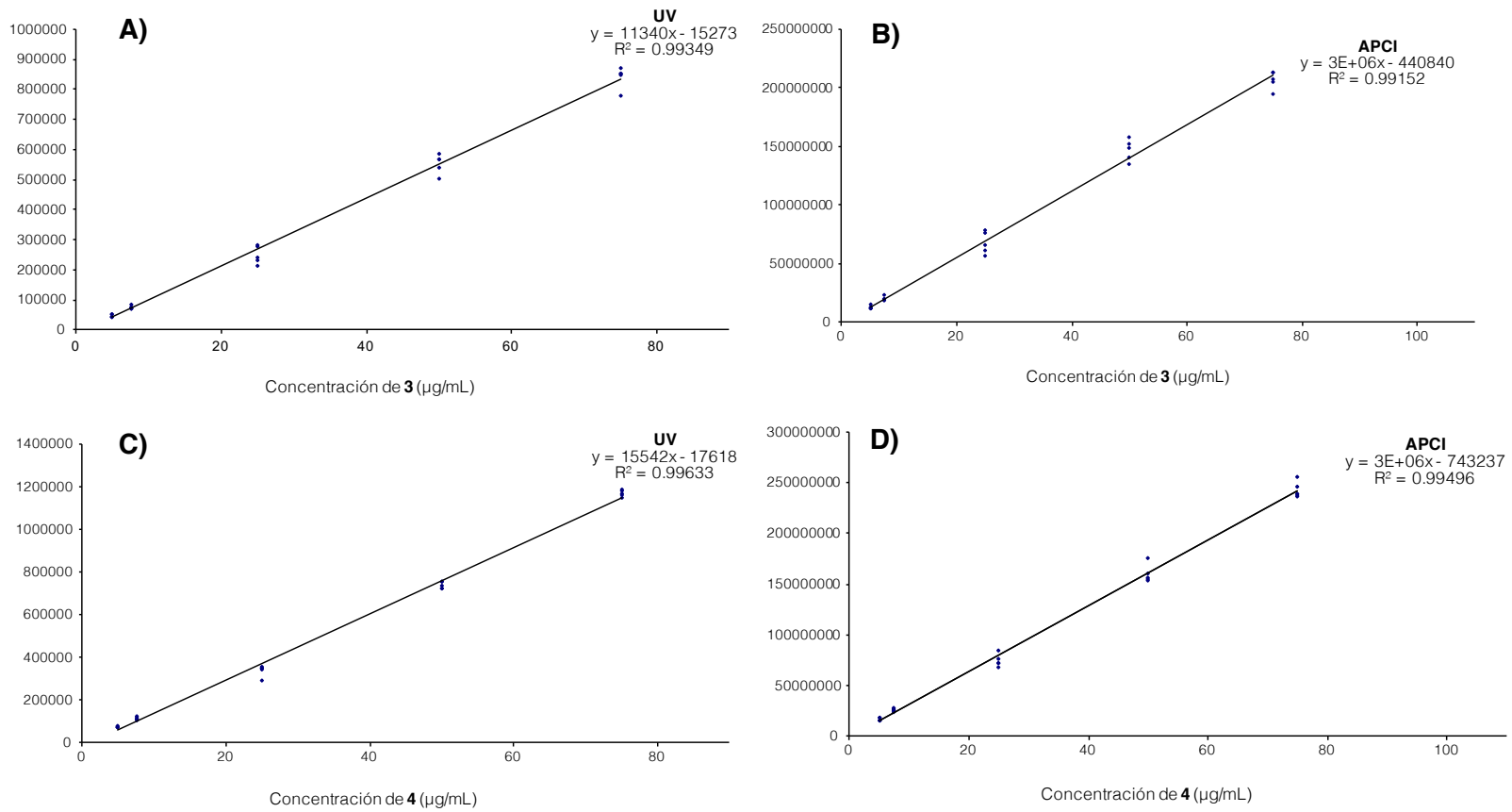
Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LD) de un método se refieren el primero a la concentración mínima de un analito presente en una muestra que puede ser detectada, y no necesariamente cuantificada; en tanto, que el segundo parámetro a la cantidad mínima de un analito presente en una muestra que puede determinarse con

precisión y exactitud. Para establecer ambos límites se realizaron cuatro curvas de calibración de cada estándar en un intervalo de concentraciones de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ , y ambos parámetros se determinaron a partir del análisis por regresión lineal de las curvas correspondientes. Los valores de LD y LC calculados se indican en la **Tabla 5**. El LD obtenido por el detector de masas fue mayor al obtenido por el detector de PDA, a pesar de que el primero es más sensible. Esto, podría deberse al modo de ionización utilizado.

La linealidad del método se evaluó a partir de las curvas de calibración construidas con tres diferentes concentraciones de los estándares (5, 25, y 75  $\mu\text{g/mL}$ ) adicionadas a la matriz de trabajo. Por otra parte, la exactitud se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro para los estándares **3** y **4** (**Tabla 5**). Estos resultados para la desoxiviperidona (**3**) y la viperidona (**4**) se encuentran dentro de los límites establecidos por las guías de la ICH para métodos cromatográficos (98-102%). Por lo tanto, el método es lineal dentro del rango de concentraciones analizadas para los compuestos **3** y **4**. La pendiente calculada en los dos casos es diferente de cero y los coeficientes de determinación indican que el 99.8 y 99.0% de los datos, respectivamente, se encuentran explicados por el modelo de regresión lineal.

La precisión del sistema se evaluó en términos de repetibilidad mediante el análisis de seis réplicas de la misma muestra y de la precisión intermedia evaluada con diferentes diluciones realizadas a partir de una solución de referencia (1 mg/mL). Estos experimentos se realizaron con una concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$  para **3** y de 50  $\mu\text{g/mL}$  para **4**. Los valores de CV calculados para **3** y **4** se resumen en la **Tabla 5**, todos los resultados son menores que 2.0%, por lo tanto, el sistema es preciso.





**Figura 27.** Curvas de calibración de la desoxiviperidona (**3**) y viperidona (**4**) para la evaluación de la linealidad del sistema. (**A y C**) arreglo de diodos; (**B y D**) Corriente iónica total.

**Tabla 5.** Parámetros de calidad: linealidad, precisión y exactitud de la validación del método analítico desarrollado.

	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Ecuaciones de las curvas de calibración</b>		
Detector de UV	$y = 11339.72x - 15272.90$	$y = 151541.56x - 17617.53$
Detector de masas	$y = 2811132.97x - 440840.39$	$y = 3229290.07x - 743236.71$
<b>Coefficiente de correlación (R<sup>2</sup>)</b>		
Detector de UV	0.9935	0.9963
Detector de masas	0.9915	0.9950
<b>Límite de detección (µg/mL)</b>		
Detector de UV	0.6	1.81
Detector de masas	1.18	3.60
<b>Límite de cuantificación (µg/mL)</b>		
Detector de UV	1.03	3.13
Detector de masas	1.17	3.53
<b>Precisión (CV %)</b>		
<i>Sistema</i>		
Detector de UV	1.9	0.4
Detector de masas	1.1	0.3
<i>Intermedia</i>		
Detector de UV	0.5	0.9
Detector de masas	1.1	0.7
<b>Exactitud (% recobro)</b>		
Detector de UV	98.8-101.1	100.3-100.4
Detector de masas	99.5-100.4	100.4-100.6

#### 7.4.4 Cuantificación de la desoxiviperidona (3) y la viperidona (4)

Una vez validado el método analítico desarrollado, se realizó la cuantificación de los dos metabolitos **3** y **4** presentes en la AcOEt-DPG obtenida de la droga cruda a partir de los diferentes lotes del material vegetal (Lotes 1-4).

En general, la relación **3** y **4** en el Lote 1 fue de (1:3) en tanto que en los Lotes 2-4 esta relación cambio a (1:5), estos resultados se resumen en la **Tabla 6**. Las diferencias encontradas en la composición de las muestras analizadas pueden deberse a variaciones estacionales ya que las muestras fueron recolectadas en diferentes épocas, pero en la misma localidad.

**Tabla 6.** Cuantificación de los compuestos **3** y **4** en los Lotes (1- 4) en las raíces de *P. greggii*.

LOTE	Contenido (mg/g)			
	<b>3</b>		<b>4</b>	
	Detector de UV	Detector de masas	Detector de UV	Detector de masas
1	68.0 ± 1.5	52.0 ± 0.4	225.3 ± 1.2	248.0 ± 0.7
2	21.3 ± 1.4	12.0 ± 0.2	128.0 ± 1.1	116.0 ± 0.3
3	33.3 ± 1.6	21.3 ± 0.2	168.0 ± 1.2	153.3 ± 0.4
4	36.0 ± 1.4	22.7 ± 0.3	177.3 ± 1.2	170.1 ± 0.3

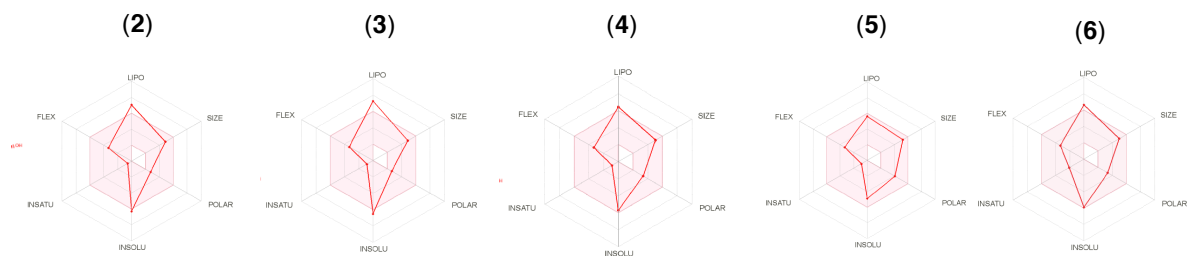
## 8. Cálculo de los parámetros fisicoquímicos y biofarmacéuticos de los compuestos aislados

Los parámetros fisicoquímicos y biofarmacéuticos proporcionados por las plataformas computacionales SwissADME y Molinspiration, nos permitieron realizar una estimación del perfil farmacocinético de los metabolitos aislados (**Tabla 7**).

La plataforma SwissADME nos brinda el radar de biodisponibilidad, el área rosa de este gráfico representa el rango óptimo de las propiedades fisicoquímicas (lipofilicidad, tamaño, polaridad, insaturación, insolubilidad y flexibilidad) que favorecen la biodisponibilidad de un fármaco, y la línea roja representa los valores de las seis propiedades calculadas que afectan la biodisponibilidad oral del compuesto analizado (Rebollar-Ramos *et al.*, 2021). De acuerdo con los resultados obtenidos, todos los compuestos (**2-6**) tienen propiedades fisicoquímicas similares (**Figura 28**), además, de que se absorben fácilmente por vía oral. El compuesto **6** puede inhibir a CYP4502C9 y CYP450A4, enzimas que participan en el metabolismo de varios grupos de fármacos, incluyendo a los antiepilépticos, inmunosupresores, sulfonilureas y antiinflamatorios no esteroideos. En cambio, las predicciones para el esteroide **5** indican podría ser sustrato de la glicoproteína P.

En relación con el pronóstico de actividad de los esteroides obtenidos, la inhibición enzimática y la unión a receptores nucleares resultaron los blancos moleculares con mayor índice (**Tabla 8**). Recientemente, Salazar y colaboradores (2020) reportaron que la desoxiviperidona (**3**) es un activador de los PPARs *in silico*. Cabe mencionar, que la activación de estos receptores corrigen el perfil metabólico de los pacientes con diabetes reduciendo la producción de glucosa y grasa hepática, ya que mejoran la acción de la insulina en sus tejidos blancos (Janani y Kumari, 2005).

En conjunto, los resultados *in vivo*, *in vitro* y computacionales obtenidos, permiten validar el efecto antidiabético de la decocción de *P. greggii* además de establecer a los componentes de naturaleza esteroidea aislados, como los principios activos responsables de la actividad farmacológica.



**Figura 28.** Radar de biodisponibilidad de los compuestos 2-6 utilizando la herramienta SwissADME.

**Tabla 7.** Propiedades fisicoquímicas, predicción metabólica y relación estructura-actividad de los compuestos **2-6** basados en SwissADME y Molinspiration.

Compuesto	Propiedades fisicoquímicas								
	Log P	PM (g/mol)	TPSA (Å) <sup>1</sup>	Aceptor de H	Donador de H	No de enlaces rotables	Fsp <sup>3</sup>		
<b>2</b>	4.71	402.65	40.46	2	2	5	0.93		
<b>3</b>	4.38	400.64	37.30	2	1	5	0.89		
<b>4</b>	4.08	416.64	57.53	3	2	5	0.89		
<b>5</b>	4.05	432.64	77.76	4	3	5	0.89		
<b>6</b>	4.27	412.60	57.53	3	2	5	0.74		
P.F. compuesto	Predicción metabólica								
	CYP450 1A2	CYP450 2C19	CYP450 2C9	CYP450 2D6	CYP450 3A4	gp-P	Absorción GI	Atraviesa BHE	Biodisponibilidad
<b>2</b>	---	---	---	---	---	---	ALTO	NO	0.55
<b>3</b>	---	---	---	---	---	---	ALTO	NO	0.55
<b>4</b>	---	---	---	---	---	---	ALTO	NO	0.55
<b>5</b>	---	---	---	---	---	SUSTRATO	ALTO	NO	0.55
<b>6</b>	---	---	INHIBIDOR	---	INHIBIDOR	----	ALTO	NO	0.55
Blancos terapéuticos del compuesto	Relación estructura – actividad								
	Ligando GPCR	Modulador del canal iónico	Inhibidor de cinasa	Ligando de receptor nuclear	Inhibidor de proteasa	Inhibidor enzimático			
<b>2</b>	0.17	0.01	-0.32	0.93	0.07	0.66			
<b>3</b>	0.14		-0.52	0.72	0.13	0.56			
<b>4</b>	0.14	0.28	-0.53	0.93	0.19	0.62			
<b>5</b>	0.11	0.23	-0.50	0.87	0.22	0.52			
<b>6</b>	-0.03	-0.09	-0.56	0.62	0.08	0.73			

TPSA: Área de superficie polar topológica, Fsp3: Fracción de átomos de carbonos con hibridación sp<sup>3</sup>. P.F: Perfil farmacocinético; CYP450: Enzima citocromo P-450; gp: Glicoproteína P; GI: Gastrointestinal; BHE: Barrera hematoencefálica. **Inactivo**, **moderadamente activo** y **activo**

## VIII. CONCLUSIONES

- Los estudios preliminares de inocuidad del preparado tradicional en la prueba de toxicidad aguda de acuerdo con los criterios de Lorke, permitieron establecer que el preparado es inocuo para roedores.
- Los experimentos farmacológicos realizados a lo largo del proyecto permitieron validar la eficacia preclínica de la decocción de las raíces de *P. greggii* var. *greggii* como agente hipoglucemiante y antihiper glucémico.
- El estudio químico de las raíces de la especie *P. greggii* var. *greggii* condujo al aislamiento y caracterización de cinco esteroides: peniocerol (**2**), la desoxiviperidona (**3**), la viperidona (**4**), la viperidinona (**5**) y una nueva entidad química, la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**).
- Los esteroides aislados fueron caracterizados como los principios activos de la especie, en particular, la desoxiviperidona (**3**) compuesto mayoritario presente en el preparado tradicional. Este producto fue caracterizado como un agente sensibilizador de la insulina. Su modo de acción puede involucrar un efecto sobre la respiración mitocondrial a través de la fuga de protones. Los compuestos **2** y **6** promueven la secreción de insulina a bajas concentraciones de glucosa, esta actividad podría estar relacionada con el efecto hipoglucemiante de la decocción.
- La desoxiviperidona (**3**) y el nuevo producto natural (**6**) son moléculas que actúan favorablemente en una condición de disfunción mitocondrial, esto se demostró en experimentos de tipo bioenergético; ambos esteroides aumentan los parámetros de la respiración basal y la fuga de protones, sin afectar la respiración asociada a la producción de ATP. Además, incrementan la glucólisis en condiciones anaerobias en células musculares C2C12.

- El análisis de los componentes volátiles del aceite esencial permitió la detección de tres derivados de ácidos carboxílicos de cadena lineal como los componentes más abundantes.
- Se desarrolló y validó un método analítico por UPLC-EM-APCI para la cuantificación de los metabolitos **3** y **4** presentes en la fracción de AcOEt obtenida a partir de la decocción de las raíces de *P. greggii* var. *greggii*. Este método fue lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones evaluadas. La cantidad de **3** en los cuatro Lotes (1-4) analizados se encontró en el rango de 12 - 68 mg/g y las de **4** entre 116 - 248 mg/g de raíz. Este método podría ser de utilidad para la formulación de extractos estandarizados de la especie.
- Los estudios computacionales indicaron que todos los compuestos **2-6** se absorben fácilmente por vía oral y sus actividades farmacológicas con mayor índice de predicción son la inhibición enzimática y la unión a receptores nucleares. Esta última actividad nos dio pauta a suponer que el mecanismo de acción antidiabético de los componentes de *P. greggii* var. *greggii* podría ser mediante la activación de los PPARs. Cuestión que tendría que comprobarse experimentalmente.
- Todos estos resultados obtenidos en este trabajo de investigación constituyen una aportación original al conocimiento químico y a la eficacia de las raíces de *P. greggii* var. *greggii* en la medicina popular mexicana para el tratamiento de la diabetes; siendo los principios activos una serie esteroideos de tipo colestano, que actúan de forma sinérgica y polifarmacológica para tratar la DMT2.



## IX. APÉNDICE I

### 9.1 Estudio químico de la especie *Opuntia sp.*

### 9.2 Antecedentes de *Opuntia sp.*

Los nopales, pertenecientes al género *Opuntia spp* (Cactaceae) (**Figura 29**) son los cactus característicos y más abundantes de nuestro país, además de ser un importante símbolo de identidad para los mexicanos. El uso de *Opuntia sp* en México, comienza desde épocas prehispánicas, donde jugó un importante papel en la economía agrícola del Imperio Azteca. El maíz (*Zea mays*), el agave (*Agave spp.*) y el nopal (*Opuntia, spp*) son las plantas cultivadas más antiguas de México que formaron parte del alimento básico de la dieta de los mexicanos en el centro y norte del país (Torres-Maravilla *et al.*, 2022).

Desde el punto de vista químico, *Opuntia sp.* ha sido estudiada por diversos grupos de investigación. Su composición es particular, pues más de 80% de su contenido es agua y el resto se compone de azúcares provenientes del metabolismo primario (por ejemplo, sacarosa, glucosa, fructosa, y galactosa) y, también contiene metabolitos del metabolismo secundario que incluyen: flavonoides, fenilpropanoides (derivados del ácido clorogénico, principalmente) y polifenoles. (Ávila-Nava *et al.*, 2014; López-Romero *et al.*, 2014; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2015).

Además de considerarse un alimento funcional, es decir, que contiene nutrimentos que les pueden proporcionar propiedades funcionales, (muchos de éstos con mecanismo establecidos por la nutrigenómica), al nopal se le han atribuido propiedades benéficas para tratar la hipertensión, hipercolesterolemia, dolor reumático, enfermedades de la mucosa gástrica, asma, síndrome metabólico y DMT2, principalmente (Ávila-Nava *et al.*, 2014; López-Romero *et al.*, 2014; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2015). De acuerdo con varios reportes descritos en la literatura especializada, el nopal tiene una participación importante en la conservación de la homeostasis de la glucosa en pacientes con DMT2,

mediante la disminución de la glucosa posprandial. Otros estudios de nutrigenómica en animales de experimentación muestran que, a pesar de una dieta alta en grasas, la adición del nopal en su dieta mantiene una sensibilidad adecuada a la insulina. Asimismo, se ha demostrado que el nopal reduce la expresión del factor de transcripción SREBP-1 e incrementa la expresión del factor PPAR  $\alpha$  en el hígado. En consecuencia, se produce una disminución de la lipogénesis hepática, asociada con un incremento en la oxidación de ácidos grasos lo que evita el desarrollo del hígado graso (Madriral-Santillán *et al.*, 2022; Tovar-Palacio *et al* 2020).

Durante la realización del proyecto de tesis que involucraba el estudio químico y farmacológico de una cactácea utilizada como un agente antidiabético, surgió la oportunidad de formar parte de un estudio multidisciplinario realizado en colaboración con el grupo de trabajo de la Dra. Nimbe Torres (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán). Este estudio consistió en el análisis químico de la “baba de nopal”, exudado obtenido bajo un proceso no revelado a partir del asado de las pencas de *Opuntia sp.* utilizada previamente en un estudio piloto en pacientes con DMT2 (López-Romero *et al.*, 2014).



**Figura 29.** *Opuntia sp.* (Foto tomada de <https://gardenatlas.net/garden/jardin-cosmopolita/species/opuntia/?filter=all>).

## 9.3 Metodología

### 9.3.1 Obtención de las fracciones primarias

La baba de nopal (500 mL) proporcionada se fraccionó preliminarmente mediante la técnica de reparto entre hexano (Hex) (3 × 50 mL), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (3 × 50 mL), acetato de etilo (AcOEt) (3 × 50 mL) y butanol (BuOH) (3 × 50 mL). Las fracciones orgánicas resultantes se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y concentradas por separado a sequedad, obteniéndose 0.5 mg, 2.0 mg, 11.1 mg y 45.6 mg, de cada fracción orgánica, respectivamente.

### 9.3.2 Análisis por UPLC-EM-ESI de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH

La resolución cromatográfica de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH se realizó mediante la técnica de UPLC-EM-ESI en una columna BEH C<sub>18</sub> (1.7 μm, 2.1 × 100 mm), utilizando como fase móvil una mezcla binaria compuesta de H<sub>2</sub>O (**A**; 0.1% de ácido fórmico) y CH<sub>3</sub>CN (**B**; 0.1% de ácido fórmico) y un flujo de 0.4 mL/min. El gradiente de elución utilizado fue: 0-2 min 5% **B**, 3-20 min 95% **B** y 20-25 min 5% **B**. La detección se realizó a una longitud de onda de 254 nm en el UV y se utilizó la técnica de ionización por electrospray en modo negativo en el EM.

### 9.3.3 Análisis por HRESIMS de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH

La preparación se llevaron a cabo, pesando aproximadamente 2 mg de las fracciones AcOEt y BuOH, enseguida se disolvieron con MeOH. De estas soluciones se tomó una alícuota de 10 μL y se colocó en una malla de acero inoxidable de aproximadamente 8 mm de diámetro y posteriormente se introdujeron en el aditamento Direct Sample Analysis™ (DSA™) (PerkinElmer, Waltham, MA). Las muestras en la malla se ionizaron desde la pantalla con el sistema DSA™ en un equipo AxiON TOF 2, PerkinElmer. El espectrómetro de masas se generó en un modo de trampa de iones negativo. Los resultados fueron procesados mediante el software AxiON 2 TOF MS (USB) Driver 6.2.

### 9.2.3 Análisis por IR de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH

Para la adquisición de los espectros de infrarrojo (película o pastilla) de las fracciones primarias, se utilizaron 2 mg de cada muestra y los espectros se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro de FTIR/FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer, rango 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  y de 600-50  $\text{cm}^{-1}$ .

### 9.2.4 Análisis por $^1\text{H}$ -RMN de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH

Para determinar los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH, se disolvieron 10 mg de cada muestra en  $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$  que tras su disolución se transfirieron a tubo de RMN. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica ( $^1\text{H}$ -RMN) se registraron en equipo Bruker AVANCE III (600 MHz para  $^1\text{H}$ ). Las FIDs se exportaron al programa MestReNova versión 12.0.0-20080 © 2017 Mestrelab Research S.L., donde se procesaron mediante transformada de Fourier, apodización por función exponencial utilizando un ancho de línea de 0.3 Hz, ajuste manual de fase y corrección de línea base con ajuste polinomial. Los espectros se referenciaron a la señal del disolvente utilizado (4.84 ppm).

### 9.2.5 Aislamiento del ácido eucómico (1)

La fracción primaria de AcOEt (111.6 mg) se sometió a un fraccionamiento mediante una cca utilizando como adsorbente Sephadex LH20. El proceso de elución se efectuó de modo isocrático utilizando MeOH acidificado al 0.1 de ácido acético glacial. Este proceso cromatográfico generó un conjunto de cinco fracciones secundarias ( $F_1$ - $F_5$ ) en la  $F_3$  precipitó un sólido blanco (55.4 mg) el cual se identificó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como ácido eucómico.

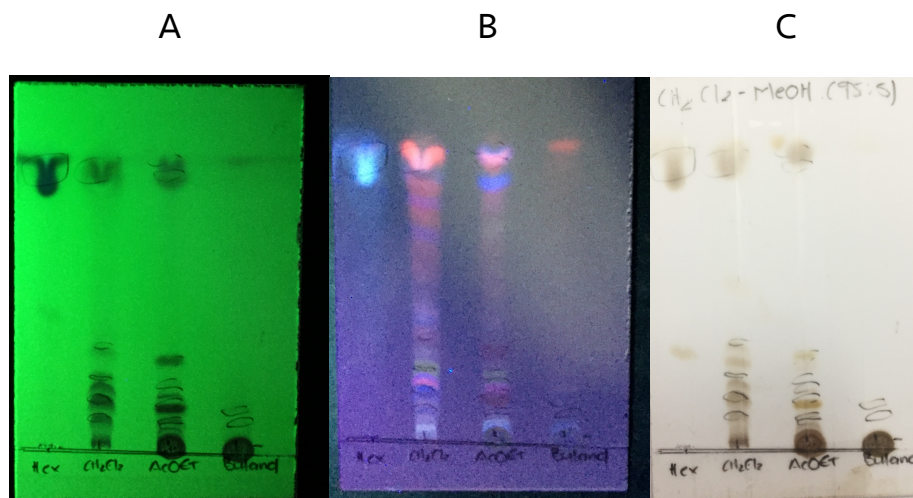
**Ácido eucómico (1):** Sólido blanco; IR (FITR)  $\text{cm}^{-1}$   $\nu_{\text{máx}}$  3316.49 (OH), 1717.03 (C=O), 1515.02 (Ar) y 1171.94; HRESIMS  $m/z$  239.0653 [M-H] $^-$ ;  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ ):  $\delta_{\text{H}}$ : 7.06 (2H, d,  $J=8.5$  Hz, H-2', H-6'), 6.69 (2H, d,  $J=8.5$  Hz, H-3', H-5'), 2.95 (1H, d,  $J$

= 13.4 Hz, H-5b), 2.94 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-3b) 2.86 (1H, d,  $J = 13.4$  Hz, H-5a), 2.57 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-3a).

### 9.3 Resultados

#### 9.3.1 Fraccionamiento primario y análisis por ccd

El análisis comparativo por ccd de las cuatro muestras obtenidas se ilustra en la **Figura 30**. Este análisis cromatográfico permitió establecer que las fracciones de AcOEt (11.1 mg) y de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  presentan la misma complejidad cromatográfica, en tanto que, la fracción de BuOH (45.6 mg) concentra a un producto mayoritario. Con base en estas observaciones aunado al rendimiento obtenido se seleccionaron a las fracciones de AcOEt y BuOH para su posterior estudio químico.

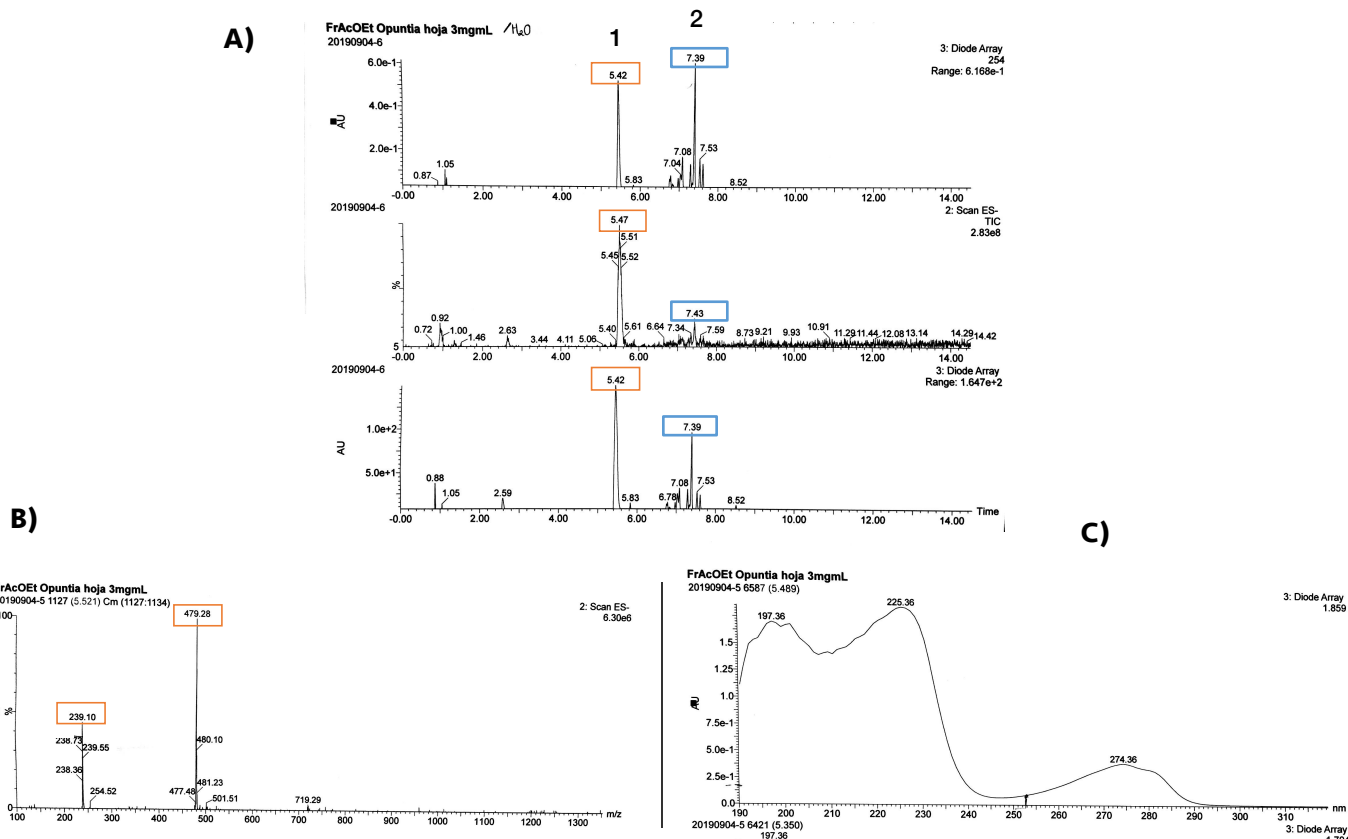


**Figura 30.** Cromatogramas en capa delgada (ccd) de las fracciones de Hex,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt y BuOH. **(A)**  $\lambda = 254$  nm, **(B)**  $\lambda = 365$  nm y **(C)** sulfato cérico. Fase móvil:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (95:5).

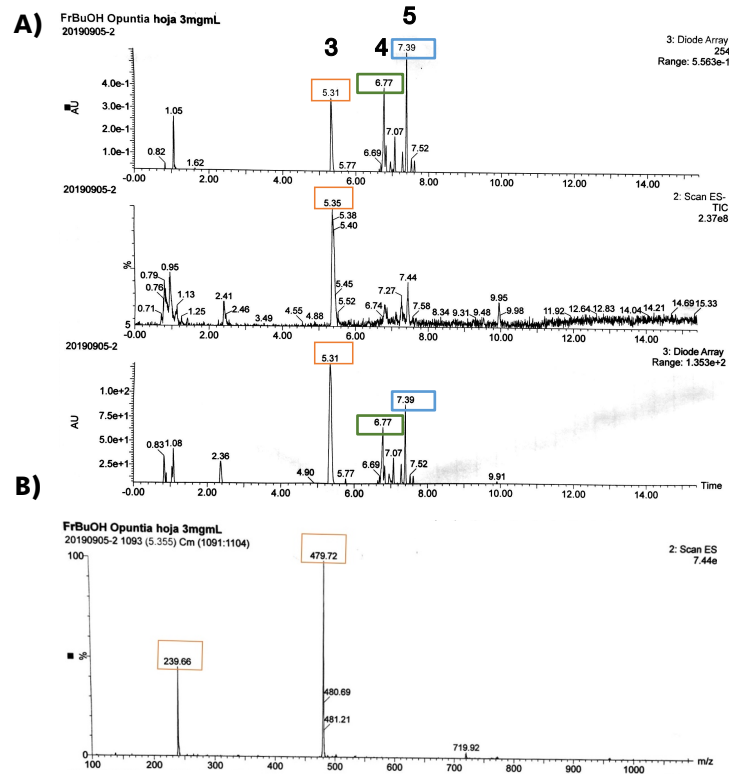
#### 9.3.2 Análisis por UPLC-EM-ESI de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH

Como podemos observar en la **Figura 31** la fracción de AcOEt presenta dos componentes mayoritarios (**1** y **2**) con tiempos de retención ( $t_R$ ) de 5.45 y 7.39 min, respectivamente. El compuesto **1** presentó un perfil típico en el UV diagnóstico para un

derivado aromático simple ( $\lambda_{m\acute{a}x} = 225.36$  nm), que además en el espectro de masas generó dos fragmentos importantes uno en una relación masa-carga ( $m/z$ ) de 239.10 [M-H]<sup>-</sup> y el otro en 479.28 [M-H]<sup>-</sup>. Por otra parte, el análisis de la fracción de BuOH permitió observar la presencia de tres componentes mayoritarios (**3-5**) en los  $t_R = 5.31$ , 6.77 y 7.39 min. Es importante mencionar que el producto **3** con el  $t_R = 5.31$  min presenta el mismo perfil en el UV y de masas que el producto **1** identificado en la fracción de AcOEt (**Figura 32**).



**Figura 31.** (A) Perfil cromatográfico por UPLC-PDA ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) y cromatograma de corriente iónica total (TIC) de la fracción de AcOEt. (B) Principales fragmentos observados:  $m/z$  239.10  $[M-H]^-$  y 479.29  $[M-H]^-$  para el compuesto **1**. (C) Perfil en el UV del pico **1**.

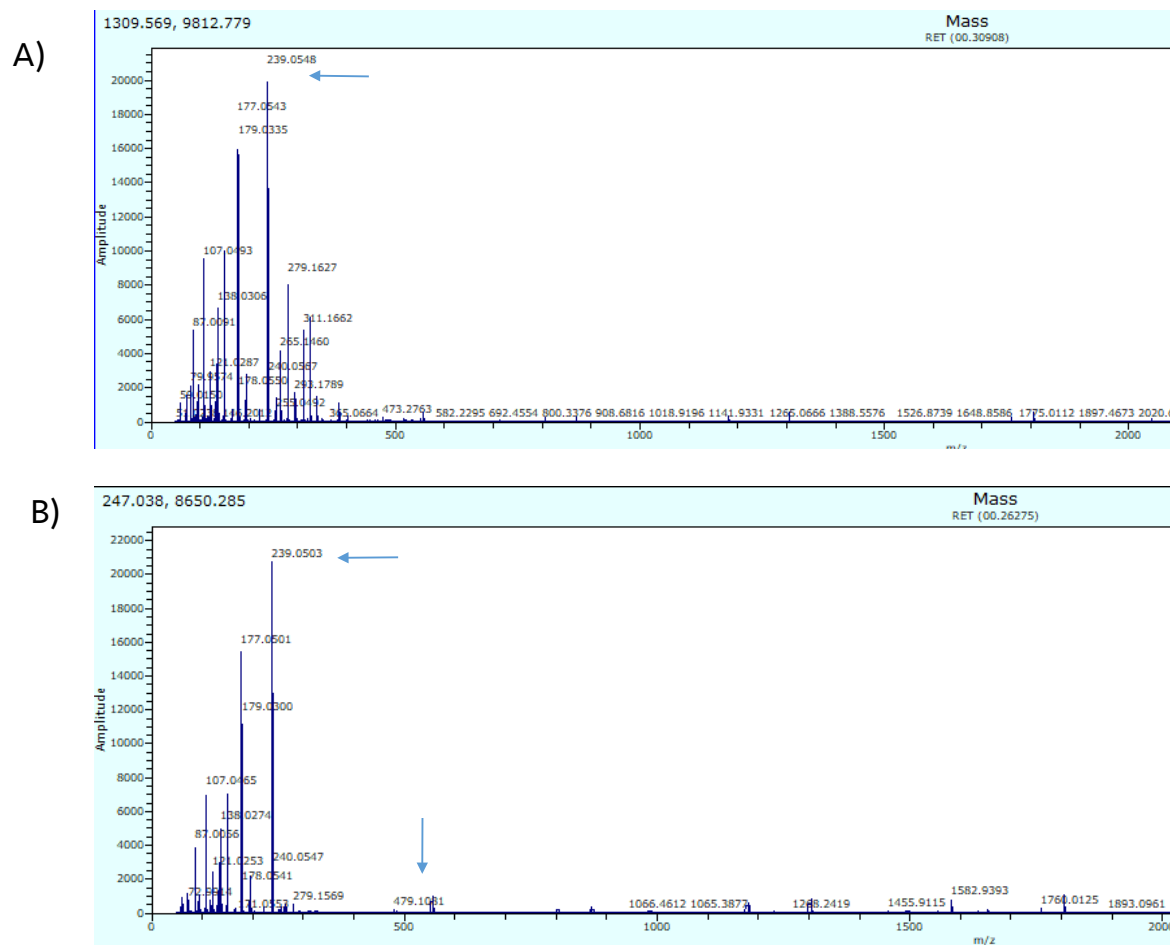


**Figura 32.** (A) Perfil cromatográfico por UPLC-PDA ( $\lambda = 254$  nm) y cromatograma de corriente iónica total (TIC) de la fracción de BuOH. (B) Principales fragmentos  $m/z$  239.10  $[M-H]^-$  y 479.29  $[M-H]^-$  observados para el compuesto **3**.

## 9.2 Análisis por HRESIMS de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH

Los análisis por HRESIMS de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH (**Figura 33**) confirman la presencia de un componente mayoritario en una relación  $m/z$  de 239.0548 en ambas muestras analizadas.





**Figura 33.** Espectros de masas generados por la técnica de ionización por electrospray en modo negativo de las fracciones de AcOEt (**A**) y BuOH (**B**).

#### 9.4 Análisis en el infrarrojo (IR) de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH

Por otra parte, el análisis comparativo de los espectros en el IR de las fracciones de AcOEt y BuOH (**Figuras 34** y **35**) indicaron la presencia de bandas de absorción en  $\sim 2900$ ,  $\sim 1700$ ,  $\sim 1200$  y  $\sim 1100$   $\text{cm}^{-1}$ , características para los grupos funcionales de hidroxilo y carbonilo de derivados de ácido carboxílicos. La principal diferencia observada entre los espectros es la intensidad de la banda en  $3353.49$   $\text{cm}^{-1}$  en la fracción de BuOH, esto debido a la presencia de residuos de carbohidratos que se extraen debido a la polaridad del disolvente de extracción.

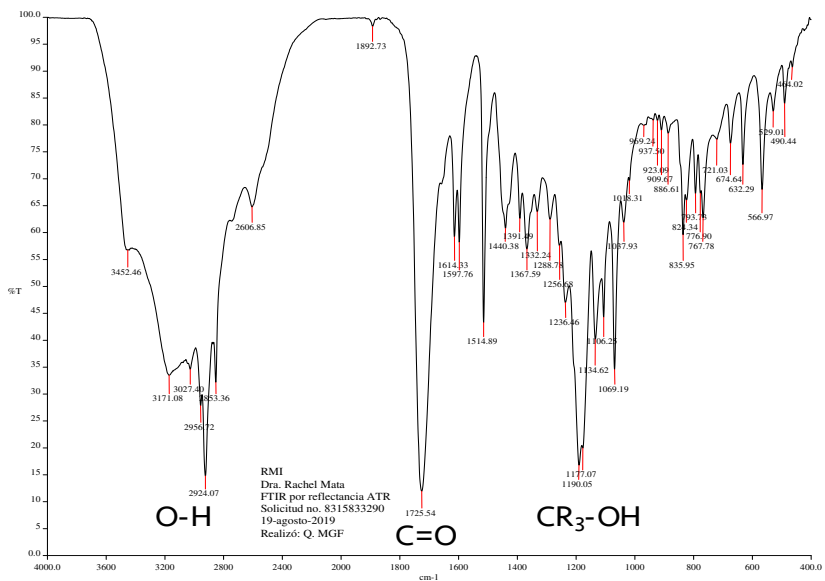


Figura 34. Espectro en el IR (ATR) de la fracción de AcOEt.

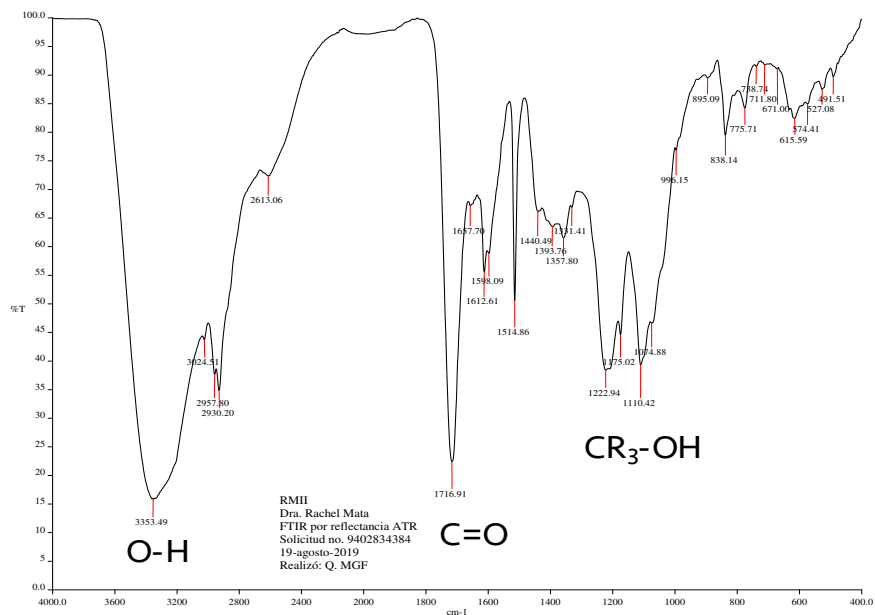
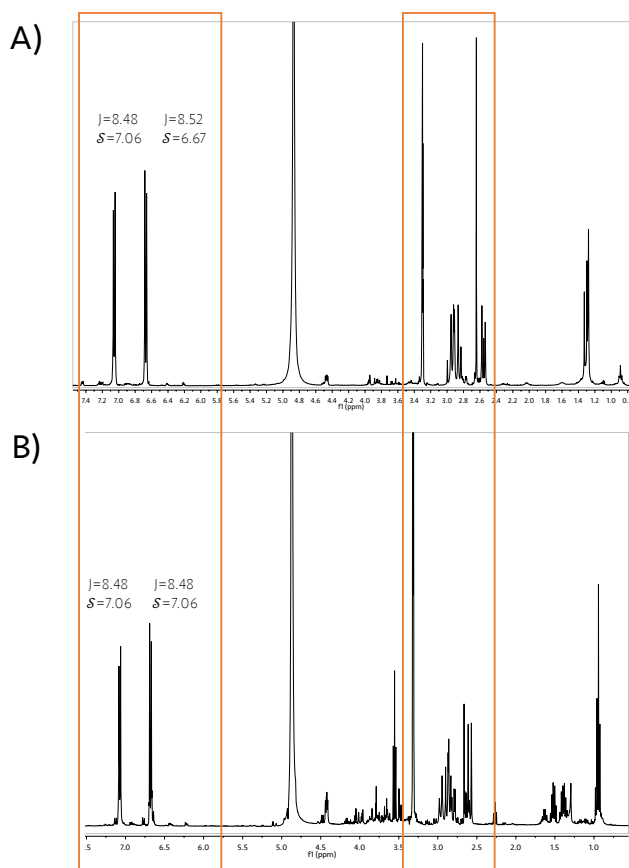


Figura 35. Espectro en el IR (ATR) de la fracción de BuOH.

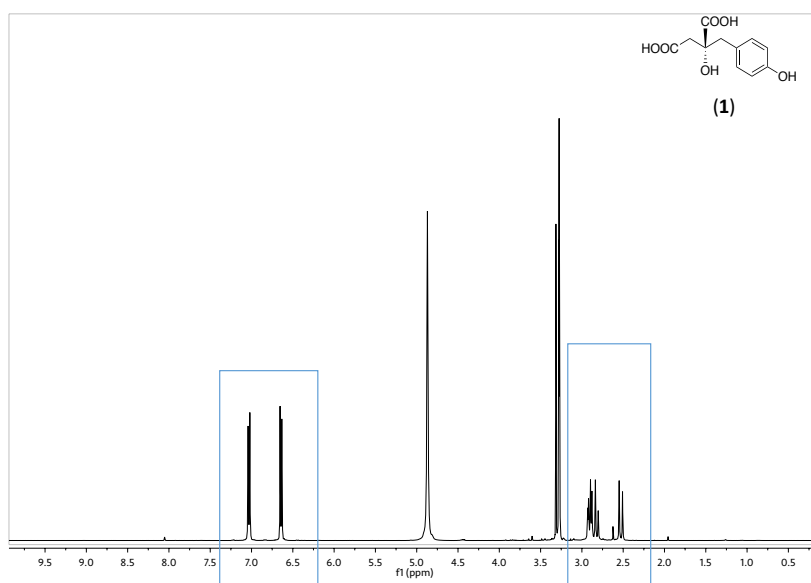
## 9.5 Análisis por RMN de las fracciones primarias de AcOEt y BuOH

Con la finalidad de realizar la caracterización del producto mayoritario presente en las fracciones de AcOEt y BuOH (**Figura 36**) se procedió al registro de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. El análisis detallado de los espectros mostró un perfil muy similar, evidenciando dos conjuntos de señales, el primero en la región comprendida entre  $\delta_{\text{H}}$  6.6-7.2 ppm (d,  $J = 8.5$ ) diagnóstica con la presencia de protones aromáticos. El segundo comprendido entre  $\delta_{\text{H}}$  2.4-3.5 ppm asignable a protones de carácter alifático unidos a base de oxígeno y/o grupos carbonilo de una función acetato. En conjunto estas observaciones, nos permitió establecer la naturaleza química del producto de interés como el ácido eucómico (**1**).

Esta propuesta fue confirmada al realizar el aislamiento del producto de interés a partir de la fracción de AcOEt utilizando una columna de Sephadex LH20 (MeOH 0.1% ácido acético glacial). Este proceso cromatográfico permitió el aislamiento de 55.4 mg de un producto mayoritario idéntico en todas sus propiedades espectroscópicas con aquellas reportadas en la literatura para ácido eucómico (**1**) (**Figura 37**) (Hernández *et al.*, 2022).



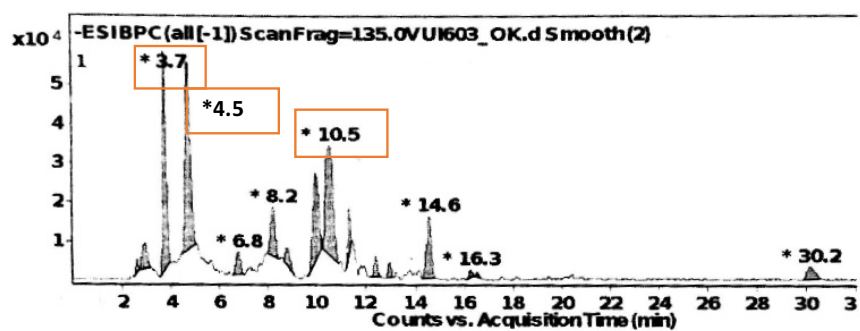
**Figura 36.** Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>, 25°C) de las fracciones de AcOEt (A) y BuOH (B).



**Figura 37.** Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>, 25°C) del ácido eucómico (1) aislado a partir de la fracción de AcOEt.

## 9.6 Análisis por HPLC-EM de la baba de nopal

Finalmente, el análisis por la técnica de HPLC-EM permitió identificar en las fracciones objeto de estudio además del producto **1**, al ácido piscídico (**2**) y un derivado glucosilado de la isoramnetina (**3**), cuyo aislamiento y caracterización se encuentran en proceso (**Figura 38**) (Hernández *et al.*, 2022; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2015).



Pico	$t_R$	Área	Área (%)	$m/z$
ácido piscídico ( <b>2</b> )	3.7	566003	78.7	255
<b>1</b>	4.7	719208	100	239
der. la isoramnetina ( <b>3</b> )	10.5	610455	84.9	623

**Figura 38.** Cromatograma por HPLC-EM de *Opuntia* sp. (baba).

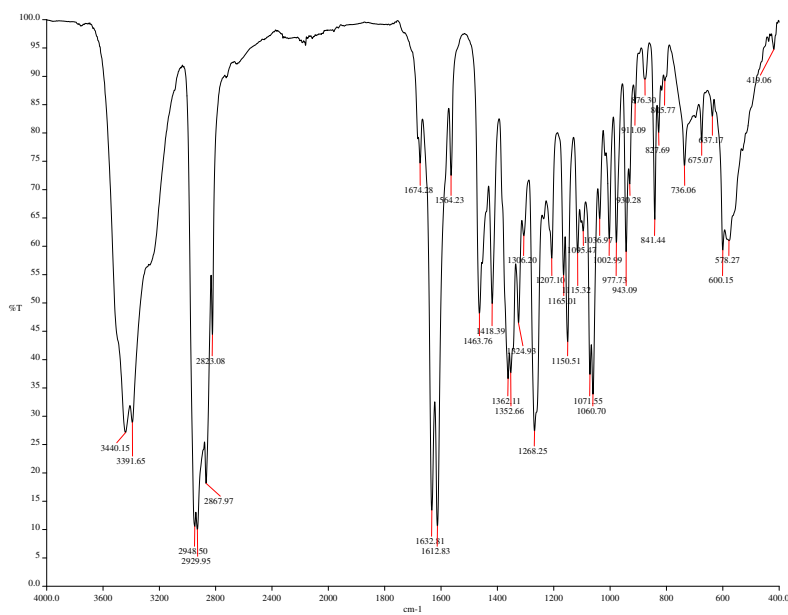
## 9.4 Conclusiones del estudio químico de *Opuntia* sp.

El estudio químico de la baba de nopal (*Opuntia* sp.), permitió el aislamiento del ácido eucómico (**1**) como el constituyente mayoritario presente. Además, se identificaron al ácido piscídico (**2**) y un derivado glucosilado de la isoramnetina (**3**). La presencia del compuesto **1** podría estar relacionada con las propiedades antidiabéticas reportadas para el exudado analizado. El ácido eucómico (**1**) es inhibidor de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales, además de ser un excelente agente antioxidante. (De santiago *et al.*, 2019).

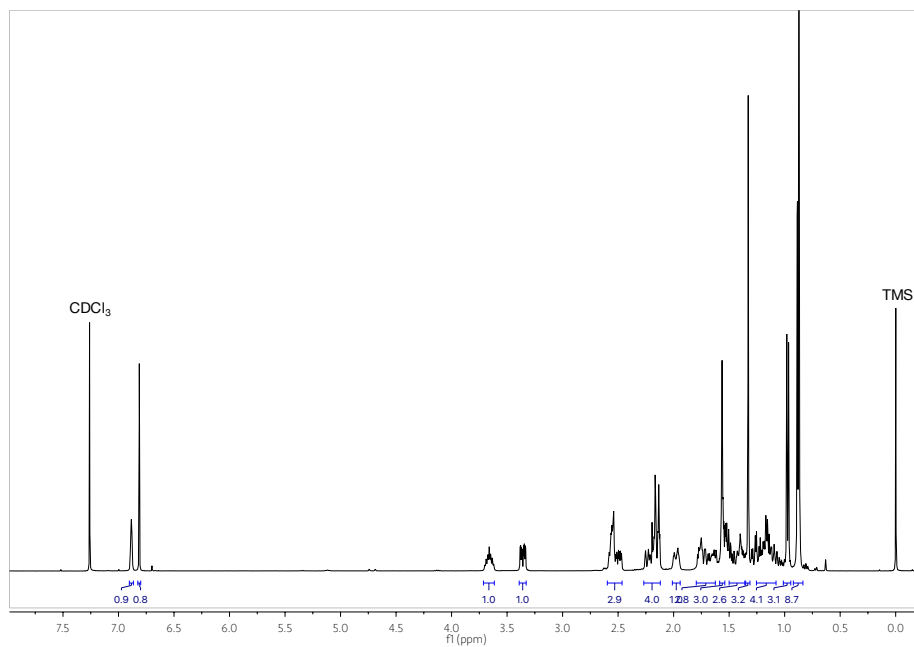
## X. ANEXO

	Contenido	Página
<b>Figura S1.</b>	Espectro en el IR por la técnica de ATR de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona ( <b>6</b> )	123
<b>Figura S2.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ RMN de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona ( <b>6</b> ) en $\text{CDCl}_3$	123
<b>Figura S3.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona ( <b>6</b> ) en $\text{CDCl}_3$	124
<b>Figura S4.</b>	Espectro COSY de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona ( <b>6</b> ) $\text{CDCl}_3$	124
<b>Figura S5.</b>	Espectro HSQC de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona ( <b>6</b> ) en $\text{CDCl}_3$	125
<b>Figura S6.</b>	Espectro HMBC de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona ( <b>6</b> ) en $\text{CDCl}_3$	125
<b>Figura S7.</b>	Espectro NOESY de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona ( <b>6</b> ) en $\text{CDCl}_3$	126
<b>Figura S8.</b>	Espectro en el IR por la técnica de ATR del peniocerol ( <b>2</b> )	126
<b>Figura S9.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ RMN del peniocerol ( <b>2</b> ) en $\text{CDCl}_3$	127
<b>Figura S10.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN del peniocerol ( <b>2</b> ) en $\text{CDCl}_3$	127
<b>Figura S11.</b>	Espectro COSY del peniocerol ( <b>2</b> ) en $\text{CDCl}_3$	128
<b>Figura S12.</b>	Espectro HSQC del peniocerol ( <b>2</b> ) en $\text{CDCl}_3$	128
<b>Figura S13.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ RMN de la desoxiviperidona ( <b>3</b> ) en $\text{CDCl}_3$	129
<b>Figura S14.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN de la desoxiviperidona ( <b>3</b> ) en $\text{CDCl}_3$	129
<b>Figura S15.</b>	Espectro HSQC de la desoxiviperidona ( <b>3</b> ) en $\text{CDCl}_3$	130
<b>Figura S16.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ RMN de la viperidona ( <b>4</b> ) en $\text{CDCl}_3$	130

<b>Figura S17.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ NMR de la viperidona ( <b>4</b> ) en $\text{CDCl}_3$	131
<b>Figura S18.</b>	Espectro en el IR por la técnica de ATR de la viperidinona ( <b>5</b> )	131
<b>Figura S19.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ RMN de la viperidinona ( <b>5</b> ) en $\text{CDCl}_3$	132
<b>Figura S20.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN de la viperidinona ( <b>5</b> ) en $\text{CDCl}_3$	132
<b>Figura S21.</b>	Espectro COSY de la viperidinona ( <b>5</b> ) en $\text{CDCl}_3$	133
<b>Figura S22.</b>	Espectro HSQC de la viperidinona ( <b>5</b> ) en $\text{CDCl}_3$	133
<b>Tabla S1.</b>	Crystal data and structure refinement for peniocerol ( <b>2</b> )	134
<b>Figura S23.</b>	Fuentes etnobotánicas que avalan el uso tradicional de las raíces de <i>P. greggii</i> var <i>greggii</i> como agente antidiabético (Kane, 2006; Kiesling, 2009; Moerman, 1998).	135
<b>Figura S24.</b>	Fuentes etnobotánicas que avalan el uso tradicional de las raíces de <i>P. greggii</i> var <i>greggii</i> como agente antidiabético (Kane, 2006; Kiesling, 2009; Moerman, 1998).	136

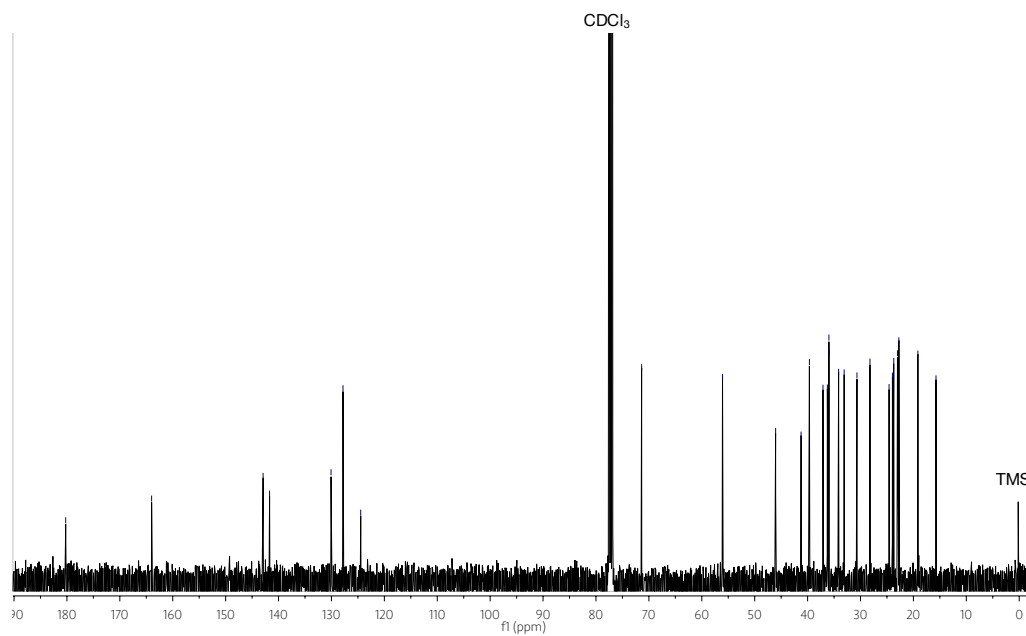


**Figura S1.** Espectro en el IR por la técnica de ATR de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**).

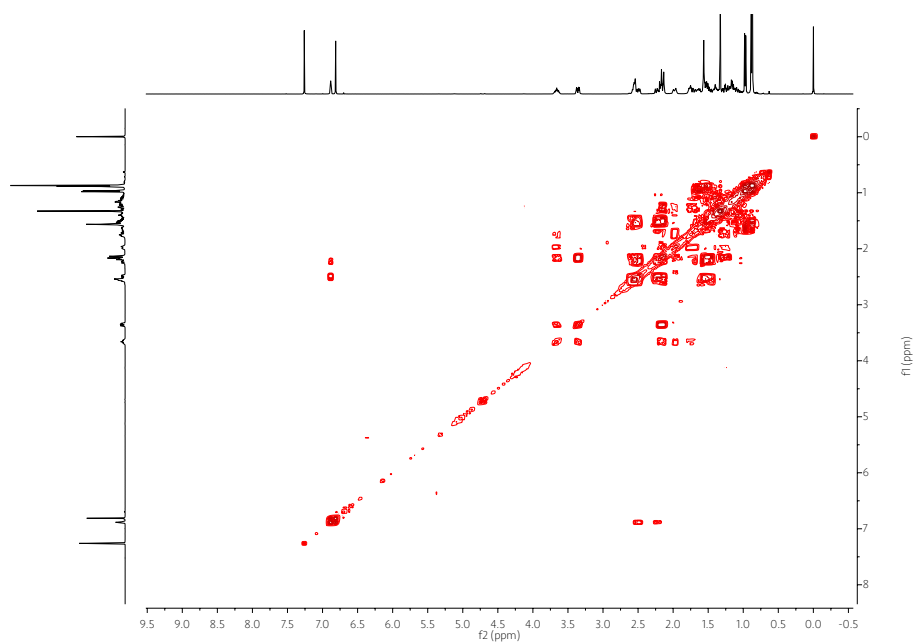


**Figura S2.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**) en  $\text{CDCl}_3$ .

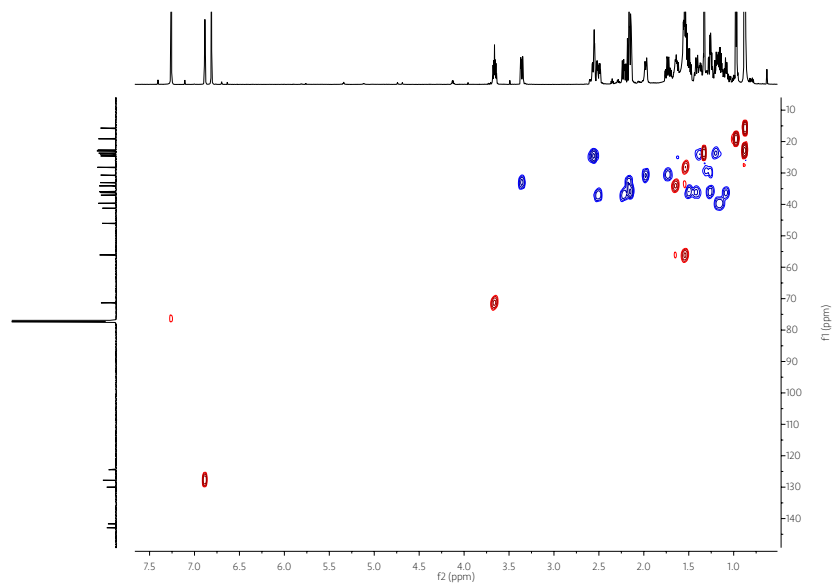




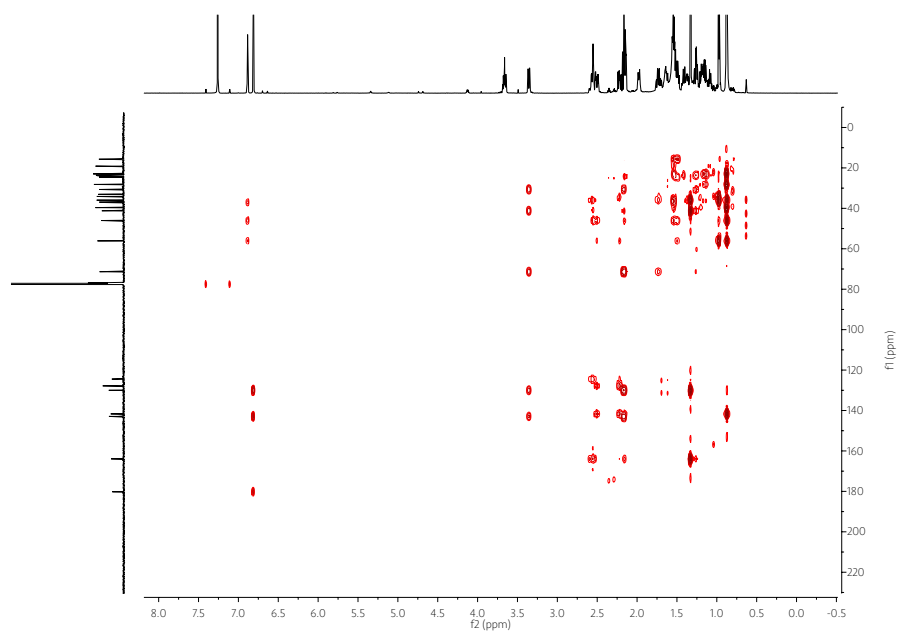
**Figura S3.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**) en  $\text{CDCl}_3$ .



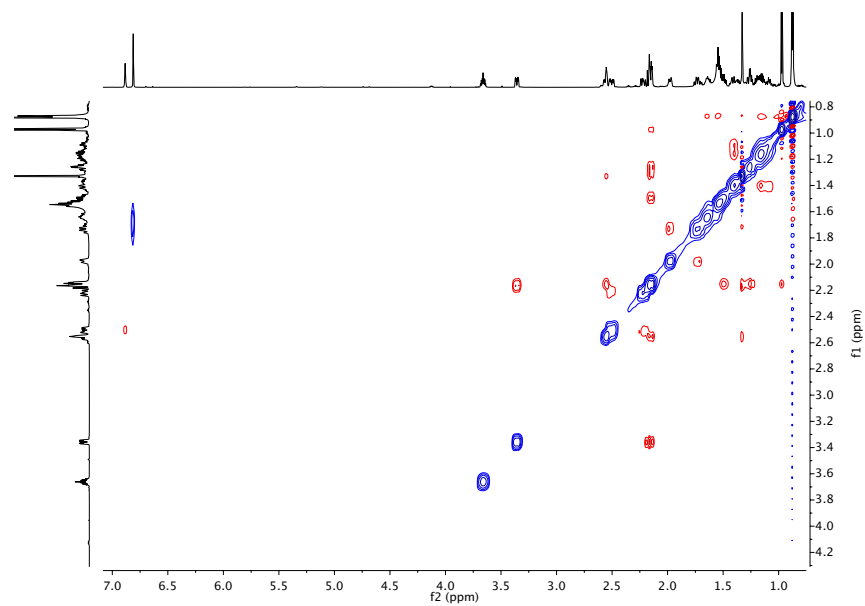
**Figura S4.** Espectro COSY de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**) en  $\text{CDCl}_3$ .



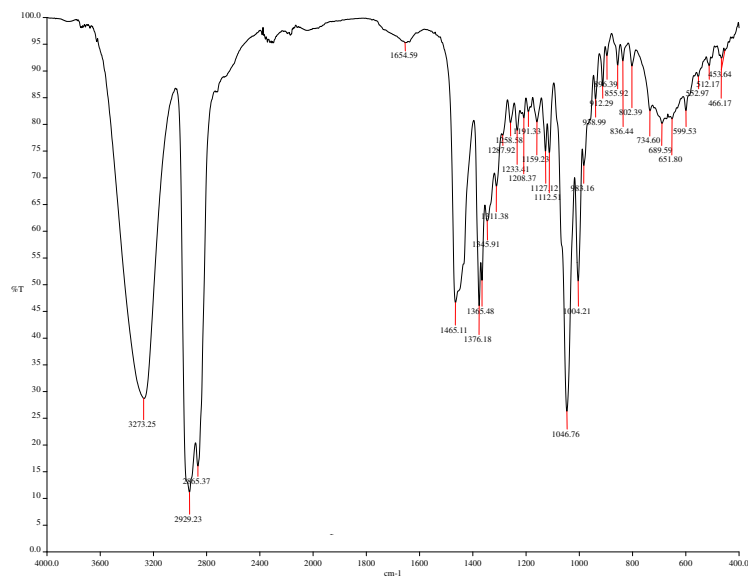
**Figura S5.** Espectro HSQC de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**) en  $\text{CDCl}_3$ .



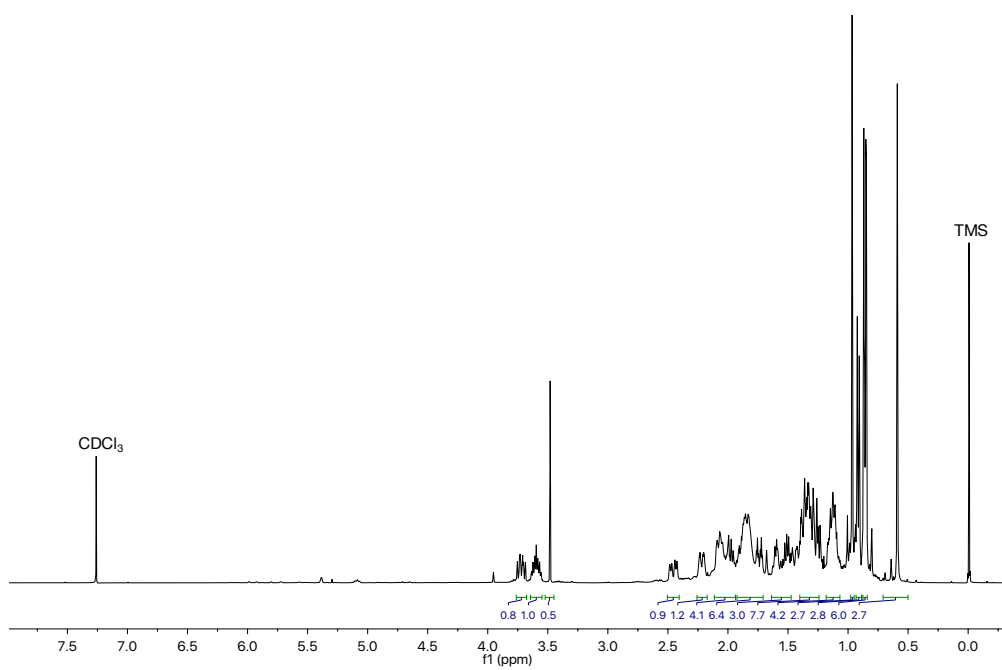
**Figura S6.** Espectro HMBC de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**) en  $\text{CDCl}_3$ .



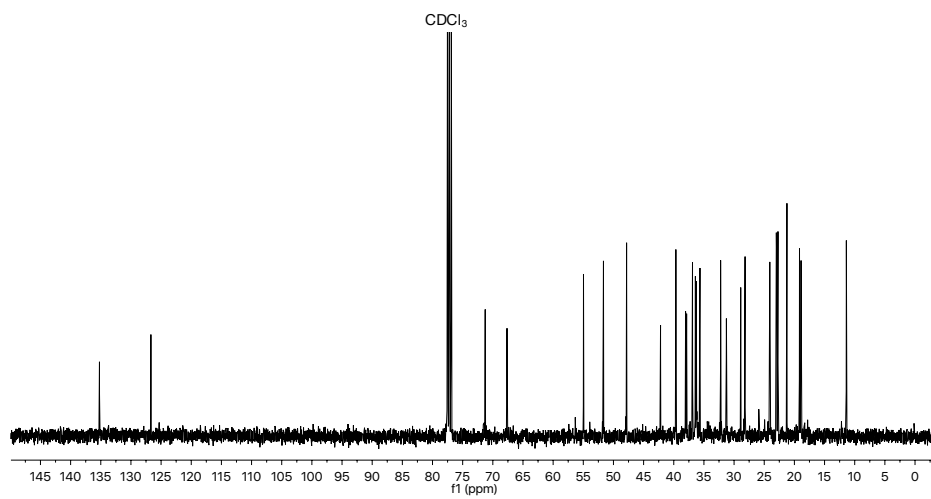
**Figura S7.** Espectro NOESY de la 3,6-dihidroxicolesta-5,8(9),14-trien-7-ona (**6**) en  $\text{CDCl}_3$ .



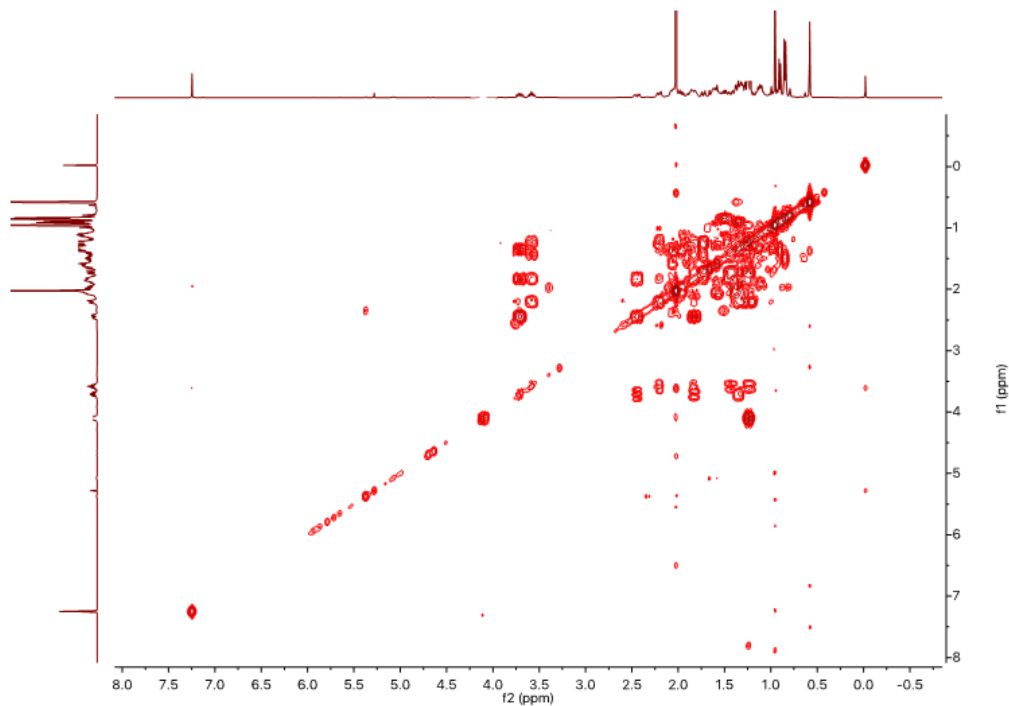
**Figura S8.** Espectro en el IR por la técnica de ATR del peniocerol (**2**).



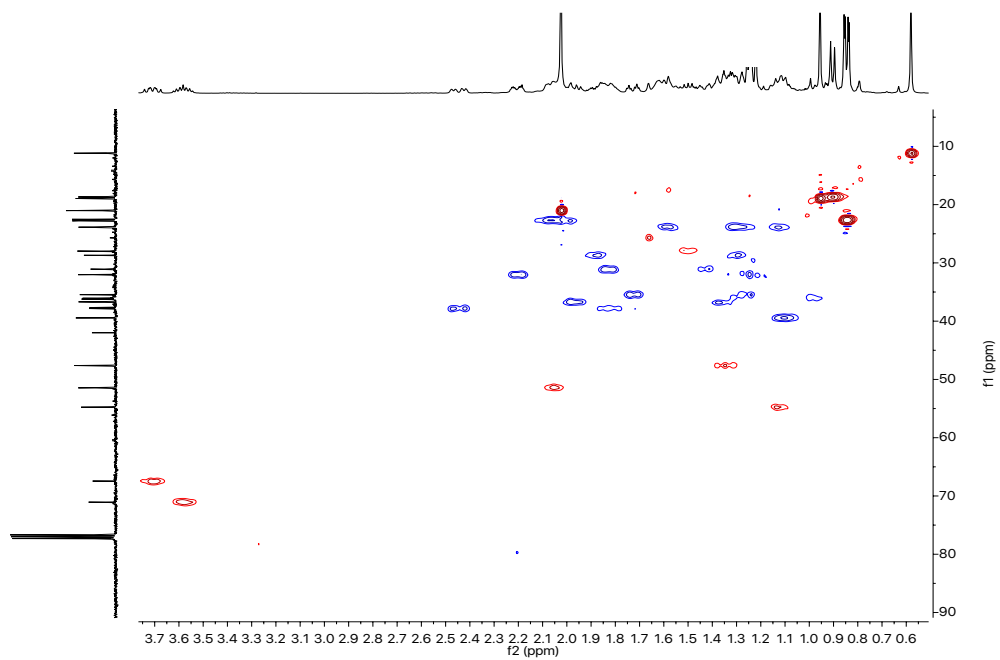
**Figura S9.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del peniocerol (**2**) en  $\text{CDCl}_3$ .



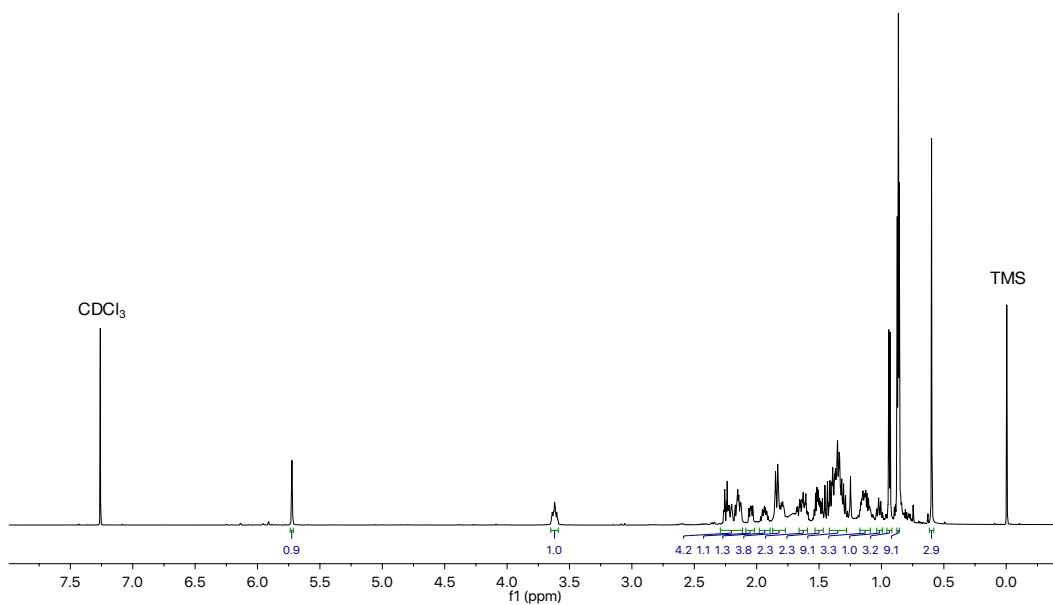
**Figura S10.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del peniocerol (**2**) en  $\text{CDCl}_3$ .



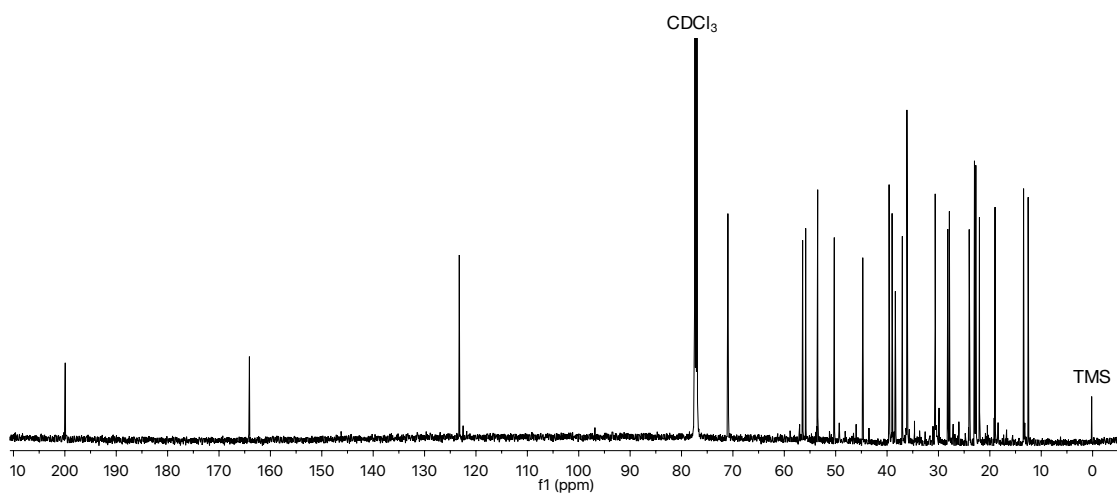
**Figura S11.** Espectro COSY del peniocerol (**2**) en  $\text{CDCl}_3$ .



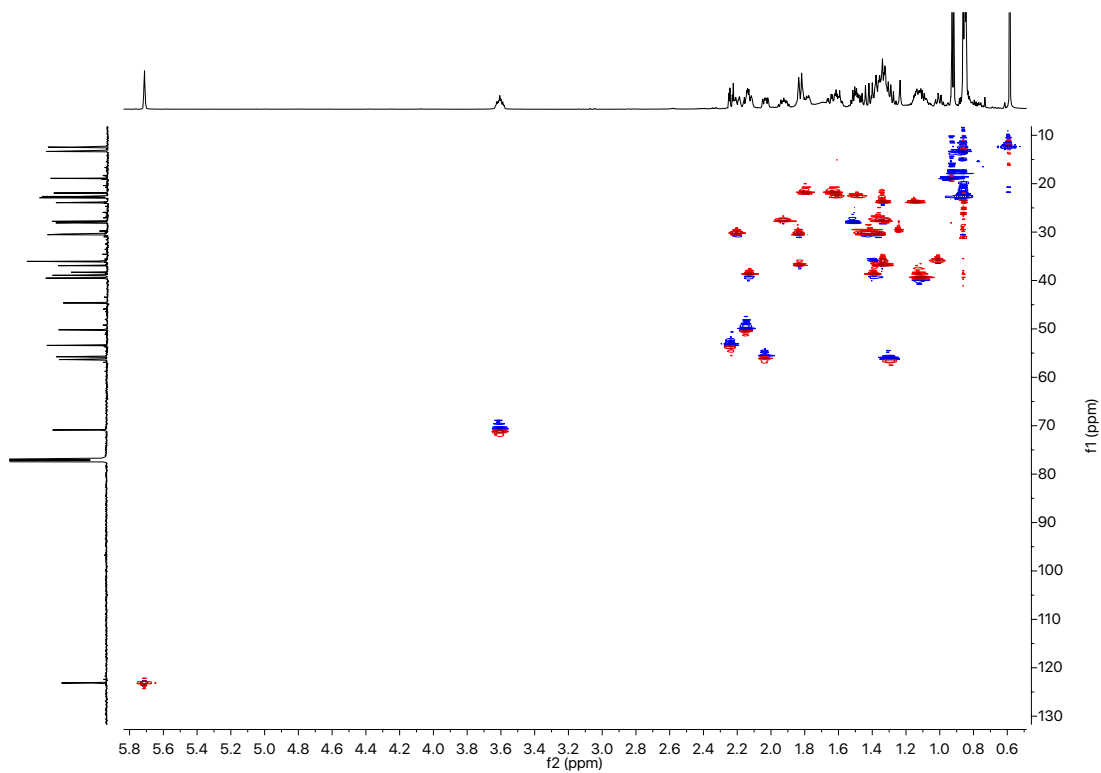
**Figura S12.** Espectro HSQC del peniocerol (**2**) en  $\text{CDCl}_3$ .



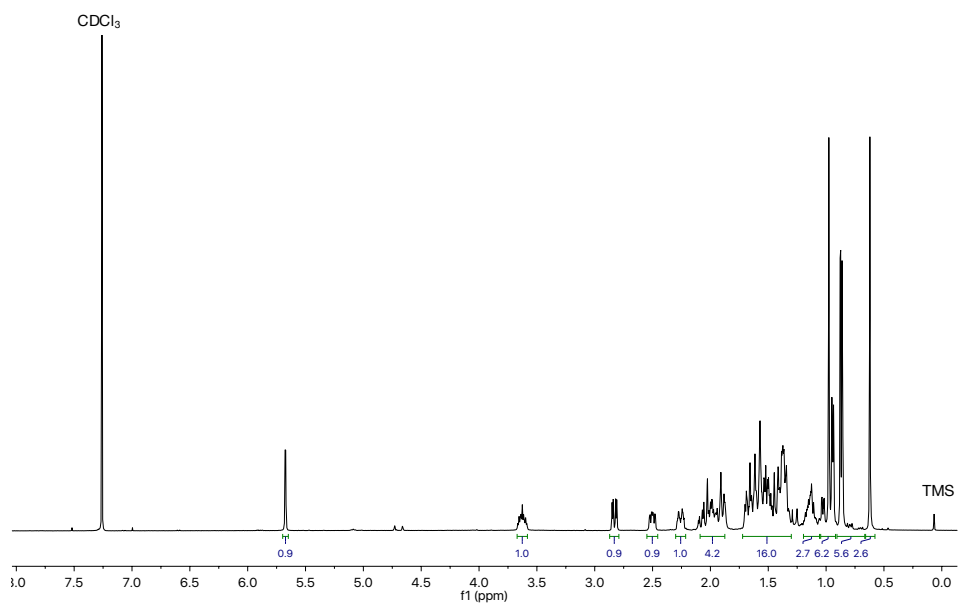
**Figura S13.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la desoxiviperidona (**3**) en  $\text{CDCl}_3$ .



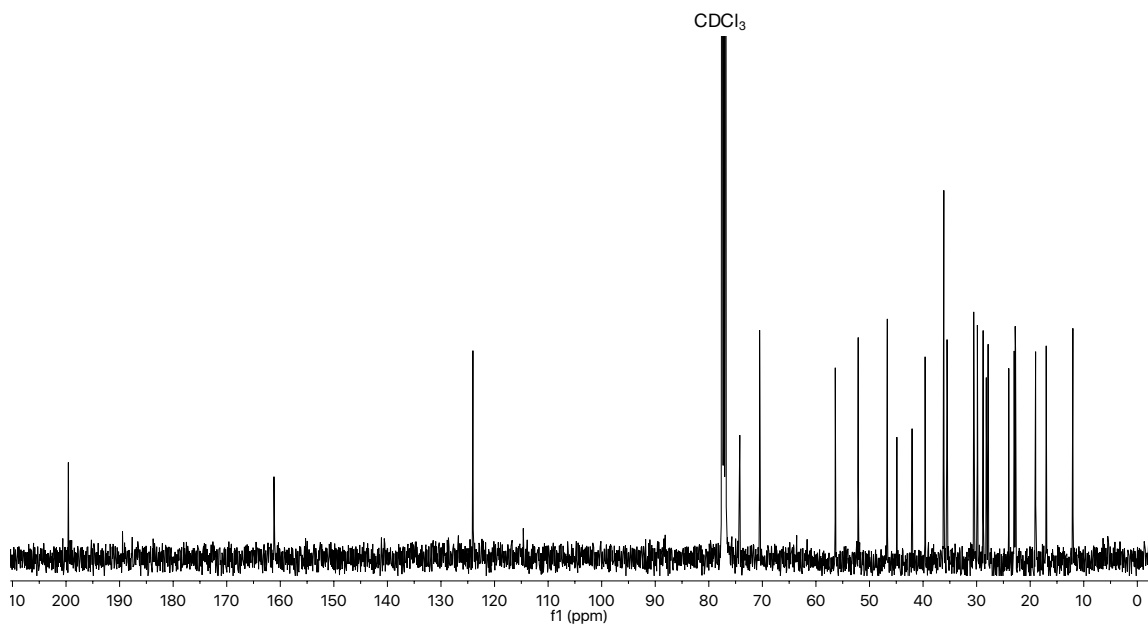
**Figura S14.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la desoxiviperidona (**3**) en  $\text{CDCl}_3$ .



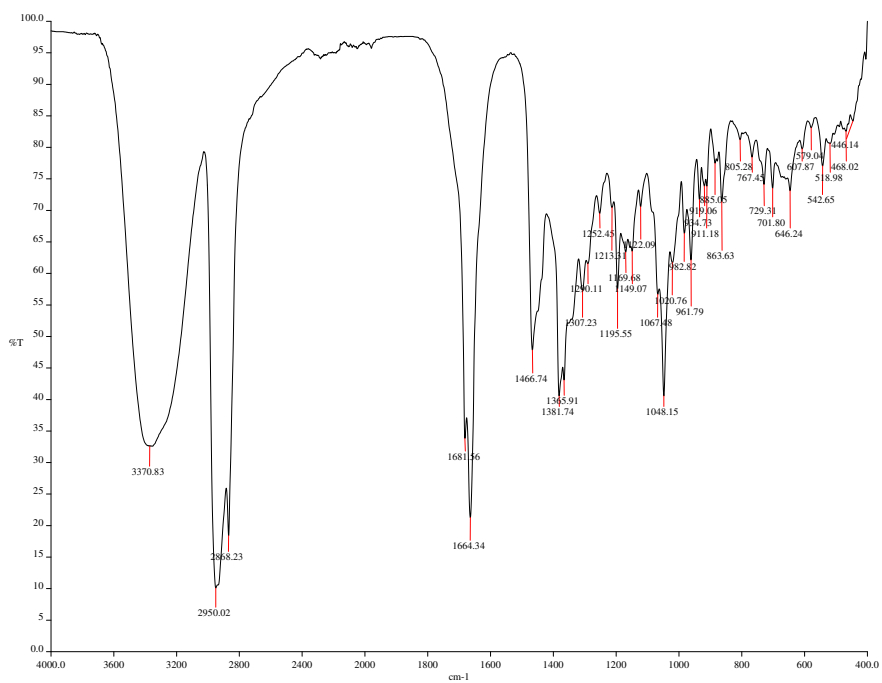
**Figura S15.** Espectro HSQC de la desoxiviperidona (**3**) en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura S16.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la viperidona (**4**) en  $\text{CDCl}_3$ .

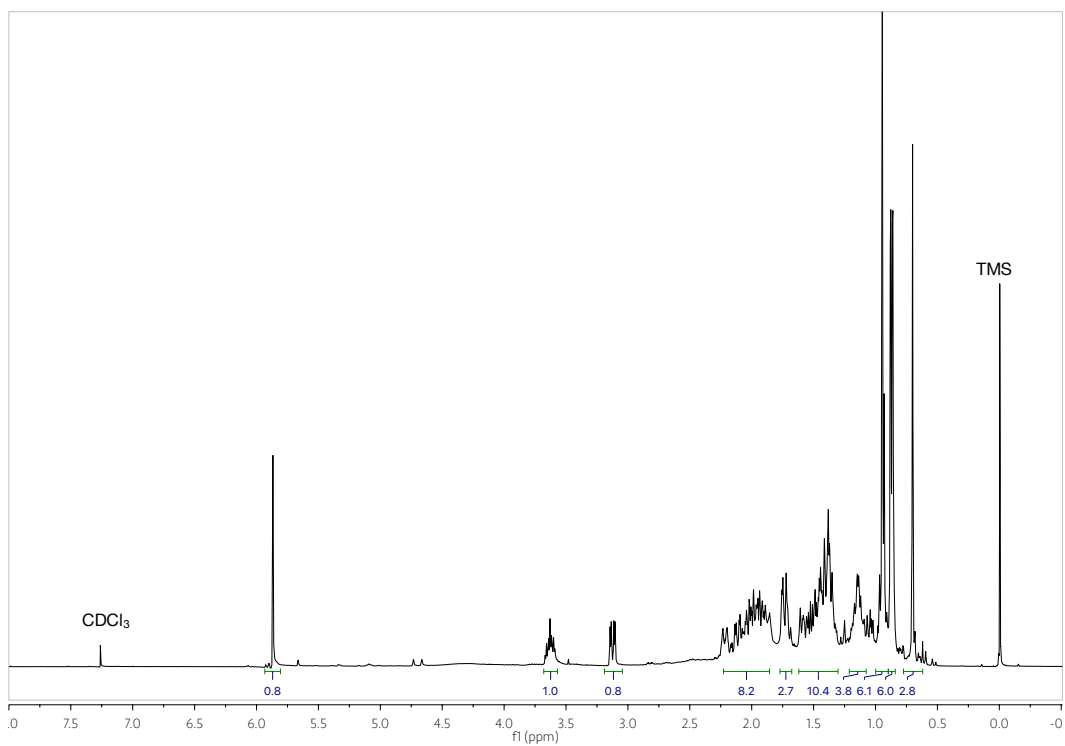


**Figura S17.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR de la viperidona (**4**) en  $\text{CDCl}_3$ .

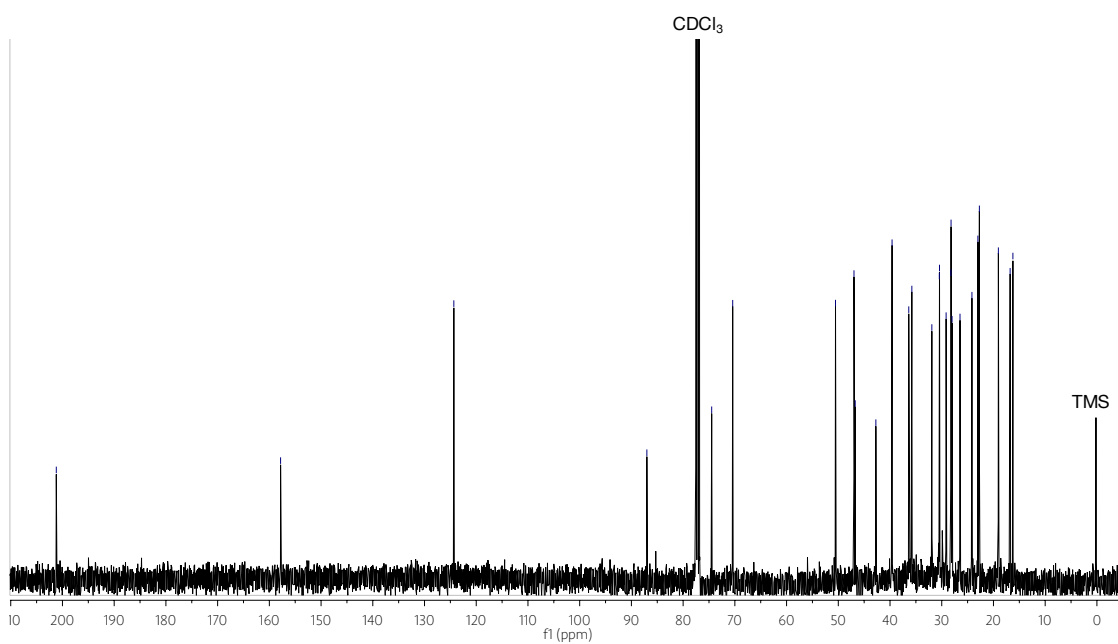


**Figura S18.** Espectro en el IR por la técnica de ATR de la viperidinona (**5**).

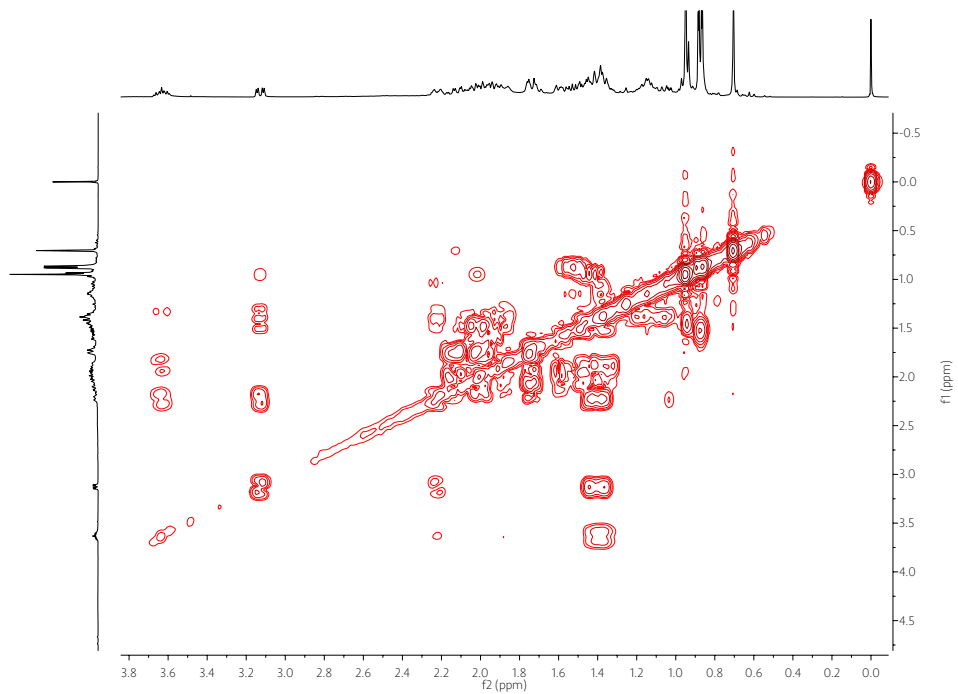




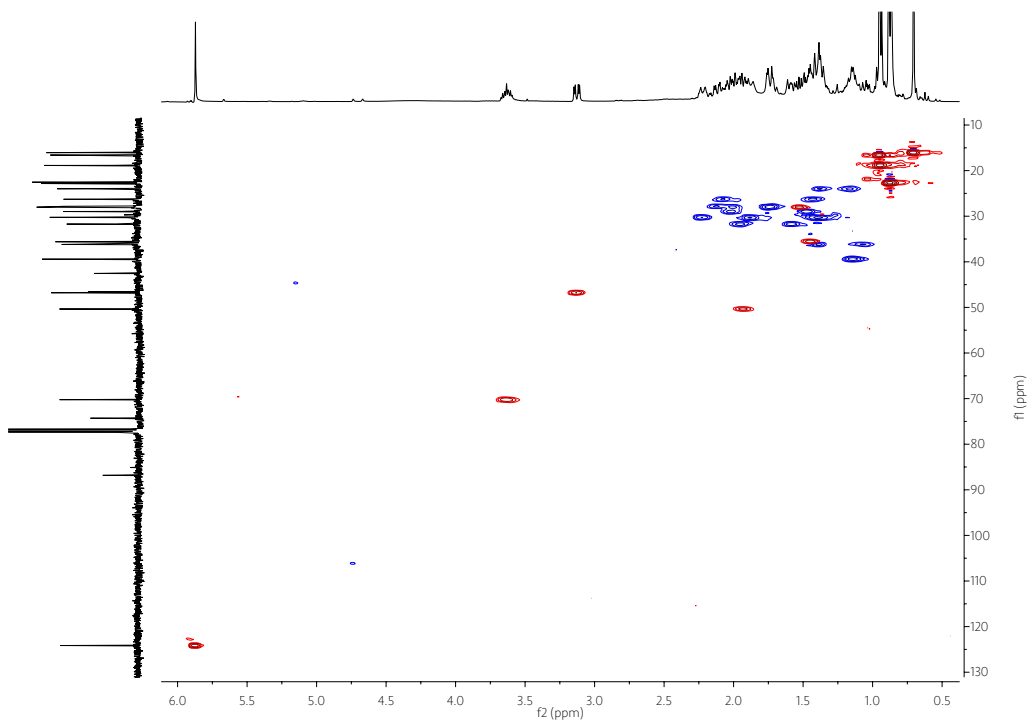
**Figura S19.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la viperidinona (**5**) en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura S20.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de la viperidinona (**5**) en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura S21.** Espectro COSY de la viperidinona (**5**) en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura S22.** Espectro HSQC de la viperidinona (**5**) en  $\text{CDCl}_3$ .

**Table S1.** Crystal data and structure refinement for peniocerol (**2**)

Identification code	047XYZ20	
Empirical formula	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>	
Formula weight	434.68	
Temperature	298(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	
Unit cell dimensions	a = 8.13190(10) Å	α = 90°.
	b = 9.08460(10) Å	β = 90°.
	c = 36.6785(5) Å	γ = 90°.
Volume	2709.63(6) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	1.066 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.511 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	968	
Crystal size	0.368 x 0.240 x 0.088 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	2.409 to 68.226°.	
Index ranges	-9<=h<=8, -10<=k<=10, -43<=l<=44	
Reflections collected	17434	
Independent reflections	4900 [R(int) = 0.0635]	
Completeness to theta = 67.679°	99.8 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7531 and 0.6890	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	4900 / 3 / 295	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.149	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0802, wR2 = 0.1349	
R indices (all data)	R1 = 0.1118, wR2 = 0.1497	
Absolute structure parameter	-0.16(15)	
Largest diff. peak and hole	0.187 and -0.166 e.Å <sup>-3</sup>	

(Castetter and Underhill 1935). They also baked the whole roots in ashes, then peeled and ate them. The Tohono O'odham boiled pieces of root and drank the liquid for use as a medicine, because it had long been considered an aid to digestion and respiratory ailments and headaches (Nabhan et al. 1991).

Chico Shuni, a Hiá ced O'odham, related that his people dug up and boiled the roots, gave the liquid to children to drink, or put the roots on the soft spot of a child's head to treat dehydration and fallen fontanel (Nabhan 1989b). They also ate pieces of root to aid digestion and to treat respiratory ailments and headaches.

The use of the roots for controlling Type II diabetes has become increasingly important in this century because the frequency of this disease has rapidly increased among the Pima, Tohono O'odham, other desert Native Americans, and Mexican-Americans (Nabhan et al. 1988, 1991). Historically, Type II diabetes was far less common before these groups began to include a large proportion of store-bought foods in their diets. Traditional Pima foods were digested much more slowly than Western staples such as bread, potatoes, and corn (Brand et al. 1990). Ingesting traditional foods protected desert peoples who were genetically predisposed to developing Type II diabetes—their



FIGURE 94. *Peniocereus greggii* (Engelm.) Britton & Rose var. *transmontanus* (Engelm.) Backeberg. a. (top left) Stems with flower bud growing among creosote bush, Desert Botanical Garden, Phoenix, Arizona, June 1988; b. (top right) submature fruit, Desert Botanical Garden, August 1988.

FIGURE 95. (bottom) *Peniocereus greggii* var. *transmontanus*. These roots weighed 135 pounds. Photograph by Rodney Engard, courtesy of Desert Botanical Garden, Phoenix, Arizona.

TABLE 8.2 (CONTINUED)

Plants Used by Native Americans for the Treatment of Diabetes in North America<sup>a</sup>

Plant	Common Name	Part Used	Cultural Affiliation	Ref.
<i>Euphorbia</i> sp. (Euphorbiaceae)	Spurge	Infusion of leaves	Algonquin	23
<i>Juniperus scopulorum</i> Sarg. (Cupressaceae)	Juniper, Rocky Mountain juniper	Infusion of unspecified part	Kutenai	32
<i>Lewisia rediviva</i> Pursh. (Portulacaceae)	Bitter-root, Oregon bitterroot	Eat dried or fresh roots	Okanagan-Colville	33
<i>Oplopanax horridus</i> (J. E. Smith) Miq. (Araliaceae)	Devil's club	Infusion of roots, bark used in unspecified manner	Gitksan, Haisla, Thompson, and Wet'suwet'en	34, 35
<i>Opuntia</i> spp. (Cactaceae)	Beavertail cactus, nopal, prickly pear, tuna	Juice of stems, fresh or cooked stems and fruits	Various groups throughout southwestern North America	36, 37
<i>Peniocereus greggii</i> var. <i>greggii</i> (Engelmann) Britton & Rose (Cactaceae)	Chaparral cactus, deer-horn cactus, night-blooming cereus, queen of the night, sweet potato cactus	Decoction of roots	Pima	38

**reina de la noche n. f. (traditional medicinal) queen of the night, *Peniocereus greggii*, columnar cactus that blooms only one night. Los Pimas usan la raíz de reina de la noche para curar la diabetes y otras enfermedades. The Pima use the root of night blooming cereus to treat diabetes and other illnesses. (syn.: saramatraca)**

TABLE 15.1 (Continued)

Plant Species	Family	Traditional Uses
<i>Lithospermum occidentale</i> (Mack.) Weak., Wits. & D. Estes	Boraginaceae	Foot numbness/sores
<i>Oplopanax horridus</i> (Sm.) Miq.	Araliaceae	Diabetes
<i>Peniocereus greggii</i> var. <i>greggii</i> (Engelm.) Britton & Rose	Cactaceae	Diabetes
<i>Persea borbonia</i> (L.) Spreng.	Lauraceae	Foot numbness/sores; increased urination

**Figura S23.** Fuentes etnobotánicas que avalan el uso tradicional de las raíces de *P. greggii* var *greggii* como agente antidiabético (Kane, 2006; Kiesling, 2009; Moerman, 1998).

*Peniocereus greggii* (Engelm.) Britton & Rose  
Desert Night-blooming Cereus,  
Reina-de-la-noche  
Cactaceae  
**Ho'ok vaa'o**

The tubers of this sparse cactus were formerly used in the treatment of diabetes and were once in considerable demand by Mexican herbalists.

One afternoon I took George Kyiitan and Sylvester Matthias out to the Desert Botanical Garden in Phoenix. Gary Nabhan met us at the herbarium before we toured the new ethnobotany trail. Gary had long been intrigued by stories I had related from Sylvester about the use of *Ho'ok vaa'o* for controlling blood-sugar levels in diabetics. He produced a half-gallon potted *Peniocereus greggii* and put it on the patio before the two elderly Pima men. They knew it, of course.

"Is this a medicine?" he prompted.

"The *bulb*," responded Sylvester without further coaxing, "for diabetes. Cut it up and dry it, and make a tea out of it and drink for diabetes. It's the *Mexicans*. My father used to get it for them."

"How often do you use it?" asked Gary.

"Not all the time," said Sylvester.

"Just once in a while," added George.

"Just for diabetes," said Sylvester. "I never heard of it used for anything else."

"For gonorrhhea," George said.

Gary showed the men a potted specimen of *Peniocereus striatus*, a smaller, multiple-tubered species that just crosses the border into Tohono O'odham country. Both men were curious, but neither recognized it.

One day I asked Ruth Giff if she had heard of Mormon Tea (*Ephedra aspera*) being used for venereal disease. She had not, but she added, "You know, I heard they used the *Ho'ok vaa'o* for that, for the syphilis."

"The tuber?"

traits are pervasively Piman, while others, such as the use of several herbal remedies, seem to have been acquired late from surrounding cultures; the use of Reina-de-la-noche in controlling diabetes seems to be one of the more recent acquisitions.

Occasionally *Ho'ok vaa'o* is grown in Pima yards because of its beautiful flowers. I went to visit Helen Allison in Komatke because I remembered that years earlier she had had one that her father had planted. It was still there.

No one recalls ever eating the fruits.

digestive and endocrine systems having evolved in a "feast-or-famine" environment. Although there is no reference regarding the use of the night-blooming cereus roots to control diabetes in Mexican herbals, it seems likely that the Tohono O'odham learned of the plant's benefits for this purpose from Mexicans who paid them to gather the roots for market (Rea 1997). Amadeo Rea suggested that the River Pima's use of queen-of-the-night in controlling the disease may have been learned more recently from surrounding cultures, including the Tohono O'odham and Arizona Yaqui.

Specialty collectors of *P. greggii* had depleted populations in the Gila River region by 1930, and commercial use had apparently waned (Nabhan et al. 1991). Since that time, conversion of land for modern agriculture and housing subdivisions has had a more extensive and lasting impact on the plant populations in the region (Nabhan et al. 1988, 1991). Several Tohono O'odham families cultivate the plant in dooryard gardens for its historic significance and for the quality of its floral fragrance. The plant is exceedingly rare on the Gila River Pima Reservation, but is occasionally found growing in Pima yards because of its flowers (Rea 1997). Here, the community protects this species and other desert plants with an ordinance, which prohibits their destruction or removal by outsiders, and a committee must approve any collection. This is the first native plant law of its kind enacted by a reservation community.

376 PHYTOTHERAPIES FOR THE MANAGEMENT OF OBESITY AND DIABETES

TABLE 15.1 (Continued)

Plant Species	Family	Traditional Uses
<i>Lithospermum occidentale</i> (Mack.) Weak., Wits. & D. Estes	Boraginaceae	Foot numbness/sores
<i>Opiopanax horridus</i> (Sm.) Miq.	Araliaceae	Diabetes
<i>Peniocereus greggii</i> var. <i>greggii</i> (Engelm.) Britton & Rose	Cactaceae	Diabetes
<i>Persea borbonia</i> (L.) Spreng.	Lauraceae	Foot numbness/sores; increased urination
<i>Phoradendron serotinum</i> ssp. <i>serotinum</i> (Raf.) M.C. Johnst.	Santalaceae	Foot numbness/sores

**Figura S24.** Fuentes etnobotánicas que avalan el uso tradicional de las raíces de *P. greggii* var *greggii* como agente antidiabético (Kane, 2006; Kiesling, 2009; Moerman, 1998).

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, **2007**. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation Ed: 4º 456.
2. Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. Mexican plants with hypoglycemic properties of some preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt. *J. Ethnopharmacol.* **2005**. 155, 416-425.
3. Arias, S.; Terrazas T.; Arreola-Nava, H. J.; Vázquez- Sánchez, M.; Cameron, M. K. Phylogenetic relationships in *Peniocereus* (Cactaceae) inferred from plastid DNA sequence data. *J. Plant. Res.* **2005**. 118: 317-328. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2013**, 27, 715-726.
4. Ávila-Nava, A.; Calderón-Oliver, M.; Medina-Campos, O. N.; Zou, T.; Gu, L.; Torres, N.; Tovar, A. R.; Pedraza-Chaverri, J. Extract of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes scavenges reactive oxygen species *in vitro* and enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J. Funct. Foods* **2014**, 10, 13-24.
5. Banno, G.; MDDS; MD; FRCP. Glucose homeostasis, obesity and diabetes.
6. Bilous, R.; Donnelly R.; Handbook of Diabetes, **2010**, Handbook of Diabetes.
7. Blanco-Naranjo, E. G.; Chavarría- Campos, G. F.; Garita-Fallas, Y. M.; Estilo de vida saludable en diabetes mellitus tipo 2: beneficios en el manejo crónico. *Rev. Méd. Sinergia* **2021**, 6,2, 1-10.
8. Carrasco, N. F.; Galgani, F. J. E.; Reyes, M. Síndrome de resistencia a la insulina. Estudio y manejo. *Rev. Med. Clin. Condes.* **2013**, 25,4, 827-837
9. Cheng, A.Y.Y.; Fantus, G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* **2005**, 172, 213-226.

10. Echouffo-Tcheugui, J. B.; Selvin, E. Prediabetes and what it means: the epidemiological evidence. *Annu. Rev. Public Health* **2021**, *42*, 59-77.
11. Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes, INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía. **2021**, Mexico.
12. Federación Internacional de Diabetes. *IDF Diabetes Atlas*, Ed: 10<sup>o</sup>.; Federación Internacional de Diabetes: Bruselas, Bélgica, **2021**.
13. Bruhn, T.; Schaumlöffel, A.; Hemberger, Y.; Pescitelli, G. *SpecDis*, version 1.71; JIMDO: Berlin, Germany, <http://specdissoftware.jimdo.com>, 2017.
14. Canonica, L.; Danieli, B.; Ferrari, G.; Krepinsky, J.; Rainoldi, G. Structure of calonysterone, an unusually modified phytoecdysone. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, *19*, 737-738.
15. Castetter, E.F.; Underhill, R.M. *The ethnobiology of the Papago Indians. Ethnobiological studies in the American Southwest*, 2nd ed.; University of New Mexico Press, Nuevo Mexico, **1935**, pp 1-84.
16. Cassels B.K. Alkaloids of the Cactaceae- The Classics. *Nat. Prod. Comm.* **2019**, *14* (1) 85-90.
17. Cortés-Vega, C.M.; Sánchez-Pérez, J.C.; Alvarado-Rodríguez, M. Establecimiento de un sistema de micropropagación de *Peniocereus greggii* (Engelm) Britton & Rose, especie cactácea en peligro de extinción. *Revista Investigación Científica.* **2008**, *4*, 1-7.
18. Cruz, R. Respuesta metabólica al ayuno, *Renut.* **2011**, *5*, 17, 883-899.
19. Csábia, J.; Hsieh, T.J.; Hasanpour, F.; Martins, A.; Kele, Z.; Gátic, T.; Simon, A.; Tóth, G.; Hunyadi, A. Oxidized metabolites of 20-hydroxyecdysone and their activity on skeletal muscle cells: preparation of a pair of desmotropes with opposite bioactivities. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2339-2345.

20. Curtin, L.S.M. *By the prophet of the earth*, 1st ed.; San Vicente Foundation, Rydal Press, Santa Fe **1949**, pp 158.
21. Dahlén, A. D.; Dashi, G.; Maslov, I.; Attwood, M. M.; Jonsson, J.; Trukhan, V.; Schiöth, H. B. Trends in antidiabetic drug discovery: FDA approved drugs, new drugs in clinical trials and global sales. *Frontiers in Pharmacology* **2022**, *12*, 1-16.
22. De la Garza R., A.;Knaan-Shanzer, S.; Den Hartigh-Bekum, J.; PL-Verhaegen, A.; W van, B. Anomer-equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (*Mus musculus*). *JAALS*, **2010**, *49*, 1, 40-44.
23. Delle, R.J.B.; Kim, J.; Suresh, P.; London, E.; Miller, W.T. Sterol structure dependence of insulin receptor and insulin-like growth factor 1 receptor activation. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2019**, *1861*, 819-826.
24. De Snatiago, E.; R. Gill I. G.; Carafa I.; Tuohy, K.; De Peña, M.-P, Cid, C. Digestion and Colonic Fermentation of Raw and Cooked *Opuntia ficus-indica* Cladodes Impacts Bioaccessibility and Bioactivity. **2019**, *6*; *67* (9), 2490-2499.
25. Díaz-Díaz, O.; Cabrera-Rode, E.; Orlandi-González, N.; Araña- Rosaínz M. J.; Díaz-Horta, O. Aspectos epidemiológicos de la prediabetes, diagnóstico y clasificación. *Rev. Cubana Endricología* **2011**, *22*, 1, 3-10.
26. Das, N.; Kumar, M. S.; Bishayee, A., Ali, E. S.; Bishayee, A. The phytochemical, biological, and medicinal attributes of phytoecdysteroids: An updated review. *Acta Pharm. Sin. B.* **2021**, *11*, 7, 1740-1766.
27. Dinan, L. Review phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 325-339.
28. Escandón, S.M.; Mata, R.; Andrade-Cetto, A. Molecules isolated from Mexican hypoglycemic plants. *Molecules* **2020**, *25*, 4145.
29. Engström, M., Plijrvi, M., Salminen, J. Rapid fingerprint analysis of plant extracts for ellagitannins, gallic acid, and quinic acid derivatives and



- quercetin, kaempferol and myricetin-based flavonol glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS. *J. of Agric. and Food Chem.* **2015**, 63, 4068-4070.
30. Flack, H.D. On enantiomorph -polarity estimation. *Acta Cryst.* **1983**, **A39**, 867-881.
31. Flores-Bocanegra, L.; González-Andrade, M.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R.  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*. *J. Nat. Prod.* **2017**, 80, 5, 1584-1593.
32. Fröde, T.S., Medeiros, Y.S. Animals models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, 115, 173-183
33. Ganesan, K.; Majeed, R. M. B.; Sultan, S. Oral hypoglycemic medications. *NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health.* **2022**.
34. Gutiérrez- Rodelo, C.; Roura-Guiberna, A.; Olivares-Reyes, J. A. Mecanismo moleculares de la resistencia a la insulina: una actualización. *Gac. Med. Méx.* **2017** 153, 214-228.
35. Harper, M.E.; Green, K.; Brand, M. D.; The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity. *Annu. Rev. Nutr.* **2008**, **28**, 13-33.
36. Hernández, F.; Andreu-Coll, L.; Bento-Silva, A.; Serra, A. T.; Mena, P.; Legua, P.; Bronze, M. R. Phytochemical profile of *opuntia ficus-indica* (l.) mill fruits (cv. 'orito') stored at different conditions. *Foods* **2022**, 8,11,2, 1-9.
37. Hicks, S. *Desert plants and people*, 1st ed.; Naylor Company Press, San Antonio, TX, **1966**, pp 75.
38. Hrdlicka, A. *Physiological and medical observations among the Indians of Southwestern United States and Northern Mexico*. Smithsonian Institution, Bureau of American Ethnology Bulletin, Washington Government Press, Virginia, **1908**, pp 1- 460.

39. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Diagnóstico y tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2 en el primer nivel de atención. Guía de referencia rápida. **2018**, México.
40. Ingram, M.; Nabhan, G.; Buchmann, S. Our forgotten pollinators: protecting the birds and bees. *Pesticide impacts on beneficial organisms* **1996**, *6*, 1-12.
41. International Council for Harmonisation (ICH). Harmonised tripartite guideline. **2015**. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Step 4 version, 1-13.
42. Israili, Z.H. **2011**. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Ther.* *18*, 117-152.
43. Issaadi, H.M.; Csábia, J.; Hsieh, T.J.; Gátic, T.; Tóth, G.; Hunyadi, A. Side-chains cleaved phytoecdysteroid metabolites as activators of protein kinase B. *Bioorg. Chem.* **2019**, *82*, 405-413.
44. Issaadi, H.M.; Tsai, Y.C.; Chang, F.R.; Hunyadi, A. Centrifugal partition chromatography in the isolation of minor ecdysteroids from *Cyanotis arachnoidea*. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1054*, 44-49.
45. Janani, C. B.D.; Kumari, R. PPAR gamma gene – A review. *Diabetes Metab. Syndr.* **2015**, *9*, 46-50.
46. Jakovljevic, N.K.; Pavlovic, K.; Jotic, A.; Lalic, K.; Stoiljkovic, M.; Lukic, L.; Milicic, T.; Macesic, M.; Stanarcic-Gajovic, J.; Lalic, N.M. Targeting mitochondria in diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6642.
47. Jastronch, M.; Divakaruni, A.S.; Mookerjee, S.; Treberg, J.R.; Brand, M.D. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* **2010**, *47*, 53-67.
48. Jayasuriya, H.; Herath, K.B.; Ondeyka, J.G.; Guan, Z.; Borris, R.P.; Tiwari, S.; de Jong, W.; Chavez, F.; Moss, J.; Stevenson, D.W.; Beck, H.T.; Slattery, M.; Schulman, N.Z.M.; Ali, A.; Sharma, N.; MacNaul, K.; Hayes, N.; Menke, J.G.;

- Singh, S.B. Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver x receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1247-1252.
49. Jayarathne, S.; Kobozev, L.; Park, O.-H; Oldewage -Theron, W.; Shen, C-L.; Moustaid-Moussa, N. Anti-inflammatory and anti-obesity properties of the food bioactive components: effects on adipose tissue. *Prev. Nutr. Food Sci.* **2017**, *22*, 4, 251-262.
50. Kane, C. Herbal Medicine of the American Southwest: A Guide to the Medicinal and Edible Plants of the Southwestern United State, United State of America. **2006**. p 140 -141.
51. Kiesling Roberto, Las cactáceas y sus amenazas: Otra perspectiva. *Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc.* **2009**. 6 (1), 21-22.
52. Knight, J.C.; Pettit, G.R. Arizona flora: The sterols of *Peniocereus greggii*. *Phytochemistry* **1969**, *8*, 447-482.
53. Knight, J.C.; Wilkinson, D.J.; Djerassi, C. The structure of the cactus sterol maddockallin (14a-Methyl-D<sup>8</sup>-cholestene-3b,6a-diol). A novel link in sterol biogenesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 790-798.
54. Lazo-Roblejo, Y.; Lores-Delgado, D. Las incretinas: nueva alternativa terapéutica para el control glucometabólico de la diabetes mellitus de tipo 2. *Medisan* **2012**, *16*, 3, 445-451.
55. López-Romero, P.; Pichardo-Otiveros, E.; Avila-Nava, A.; Vázquez-Manjarrez, N.; Tovar, A. R.; Pedraza-Chaverri, J.; Torres, N. The effect of nopal (*Opuntia ficus indica*) on postprandial blood glucose, incretins, and antioxidant activity in mexican patients with type 2 diabetes after consumption of two different composition breakfasts. *J. Acad. Nutr. Diet.* **2014**, *114*, 1811-1818.
56. Lorke, D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **1983**, *54*, 275-287.

57. Lozano-González, M.; Ovalle-Magallanes, B.; Rangel-Grimaldo, M.; Torre-Zavala S.; Noriega, L.G.; Tovar-Palacio, C.; Tovar, A.R.; Mata, R. Antidiabetic *in vitro* and *in vivo* evaluation of cyclodipeptides isolated from *Pseudomonas fluorescens* IB-MR-66e. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 7756-7762.
58. Madrigal-Santillán, E.; Portillo-Reyes, J.; Madrigal-Bujaidar, E.; Sánchez-Gutiérrez, M.; Mercado-Gonzalez, P.E.; Izquierdo-Vega, J.A.; Vargas-Mendoza, N.; Álvarez-González, I.; Fregoso-Aguilar, T.; Delgado-Olivares, L.; Morales-González, A.; Anguiano-Robledo, L.; Morales-González J.A. *Horticulturae* **2022**, *8*, 88, 1-28.
59. Mata, R.; Figueroa, M.; Navarrete, A.; Rivero-Cruz, I. Chemistry and biology of selected Mexican medicinal plants. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **2019**, *108*, 1-142.
60. Mata-Torres, G.; Agrade-Cetto, A.; Espinoza-Hernández, F. Approaches to decrease hyperglycemia by targeting impaired hepatic glucose homeostasis using medicinal plants. *Frontiers in Pharm.* **2021**, *12*, 1-26.
61. Miranda-Garduño, L. M.; Reza-Alvarrán, A. Obesidad, inflamación y diabetes. *Gac. Méd. Méx.* **2008**, *1*, 144, 39-46.
62. Muñoz-Gómez, R. Jenifer; Rivero-Cruz, Isabel; Ovalle-Magallanes, Berenice; Linares, Edelmira; Bye, Robert; Tovar, Armando R.; Noriega, Lilia G.; Tovar Palacio, Claudia; Mata, Rachel. *Antidiabetic sterol from Peniocereus greggii roots.* *ACS omega* **2022**, *7*, 15, 13144–13154.
63. Muro, P.G.; Sánchez, S.J.; Estrada, C.E.; García, P.M. *Peniocereus greggii* variety *greggii* (Cactaceae) in Durango, Mexico. *The Southwestern Naturalist* **2012**, *57*, 337-338.
64. Murphey, E.V.A. *Indian uses of native plants.* Fort Bragg, Mendocino County Historical Society, California: **1959**, pp 72.

65. Moerman, D.E. 1998. *Native American ethnobotany*. Timber Press, Portland, OR. p. 927.
66. Nakamura, T.; Terajima, T.; Ogata, T.; Ueno, K.; Hashimoto, N.; Ono, K.; Yano, S. Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse produced by streptozotocin and nicotinamide. *Biol. Pharm. Bull* **2006**, 29, 6,1167-1174.
67. Noguera-Gutiérrez, I.B., Salazar, J.R., Cerón-Nava, A., Ramírez-Ponce, A.L., Torres-Olvera, M., Soto-Cabrera, D., Ciprés-Meixueiro, A. Quantification of flavonoids and antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Peniocereus maculatus* [Cuantificación de flavonoides y actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto *Peniocereus maculatus*]. *Vitae* **2014**, 21, S112-S113.
68. Nordtröm A., Omaille G., Qin C., Siuzdak G. Nonlinear data alignment for ULPC-MS and HPLC-MS based metabolomics: Quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3289-3295.
69. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-015-SSA2-2010, PARA LA PREVENCIÓN, TRATAMIENTO Y CONTROL DE LA DIABETES MELLITU
70. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
71. Organización de Mundial de la Salud (OMS), **2021**. *Obesidad*. WHO Press, Geneva.
72. Organización de Mundial de la Salud (OMS), **2013**. *Estrategía de la OMS sobre la medicina tradicional 2014-2013*.

73. Organización de Mundial de la Salud (OMS), **2011**. Quality control methods for herbal materials. Updated edition of Quality control methods for medicinal plant materials, 1998. WHO Press, Geneva, p 187.
74. Ovalle-Magallanes, B.; Medina-Campos, O.; Pedraza-Chaverri, J.; Mata, R. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry* **2015**, *110*, 111-119.
75. Ovalle-Magallanes, B.; Navarrete, A.; Haddad, P.S.; Tovar, A.; Noriega, L.G.; Tovar-Palacios, C.; Mata, R. Multi-target antidiabetic of mexicanolides from *Swietenia humilis*. *Phytomedicine* **2019**, *58*, 152891.
76. Palacio-González, B.; Zarain-Herzberg, A.; Flores-Galicia, I.; Noriega, L.G.; Alemán-Escondrillas, G.; Zariñan T.; Ulloa-Aguirre, A.; Torres, N.; Tovar, A.R. Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *BBA* **2014**, 1841, 132-140.
77. Quesada, I.; Tudurí, E.; Ripoll, C.; Nadal, A. Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J. Endocrinol.* **2008**, 199, 5-19.
78. Raguso, R.A.; Henzel, C.; Buchmann, S.L.; Nabhan, G.P. Trumpet flowers of the Sonoran Desert: floral biology of *Peniocereus greggii* cacti and sacred *Datura*. *Int. J. Plant Sci.* **2003**, *164*, 877-892.
79. Rebollar-Ramos, D.; Ovalle-Magallanes, B.; Palacios-Espinosa, J.F; Macias-Rubalcava, M.L.; Raja, H.A.; González-Andrade, M.; Mata, R.  $\alpha$ -glucosidase and PTP-1B Inhibitors from *Malbranchea dendritica*. *ACS OMEGA*. **2021**, *6*, 35, 22969-22981.
80. Rodríguez-Rodríguez, C.; Torres, N.; Guitérrez-Urbe, J.A.; Noriega, L. G.; Torres-Villalvazo, I.; Leal-Díaz, A. M.; Antunes-Ricardo, M.; Márquez-Mota, C.; Ordaz, G.; Chavez-Santoscoy, R. A.; Serna-Saldivar, S. O.; Tovar, A.R. The

- effect of isorhamnetin glycosides extracted from *Opuntia ficus-indica* in a mouse model of diet induced obesity. *Food & Funct.* **2015**, 6, 805-815.
81. Rea, A.M. *At the desert's green edge – An ethnobotany of the Gila River Pima*. University of Arizona Press, Arizona, **1997**, pp 430.
82. Rena, G.; Hardie, D.G.; Pearson, E.R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* **2017**, 60, 1577-1585.
83. Rix, I.; Nexoe-Larse, C.; Bergmann, N.; Lund, A.; Knop, F. Glucagon physiology. *NCBI Bookshelf. A service of National Library of Medicine, National Institutes of Health.* **2019**, 1-15.
84. Salazar, J. R.; Loza-Mejía, M. A.; Soto-Cabrera, D. Chemistry, biological activities and in silico bioprospection of sterols and triterpenes from Mexican columnar cactaceae. *Molecules* **2020**, 25, 1649, 1-34.
85. Sánchez, N. J. C.; López, Z. D.F.; Pinzón, D. O. A.; Sepúlveda, A. MD. Adipocinas y síndrome metabólico: múltiples facetas de un proceso fisiopatológico complejo. *Rev. Colombiana Card.* **2010** 17,4, 167-176.
86. Sánchez-Salas, J.; Flores-Rivas, J.; Muro-Pérez G.; Martínez-Adriano, C. El reinado desconocido de *Peniocereus greggii*. *Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc.* **2009**, 6, 21-24.
87. Sandoval- Muñiz, R. J.; Vargas-Guerrero, B.; Flores-Alvarado, L. J. Glucotransportadores (GLUT): Aspectos clínicos, moleculares y genéticos. *Gac. Med. Méx.* **2016**, 152, 547-557.
88. Sanvictores, T.; Casale, J.; Huecker, M. R. Physiology, Fasting. *NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health.* **2021**. Nevada. U.S.A.

89. Soeters, P. B.; Shenkin, A.; Sobotka, L.; Soeters, M. R.; Leeuw, P. W.; Wolfe, R.R. The anabolic role of the Warburg, Cori-cycle and Crabtree effects in health and disease. *Clin. Nut.* **2021**, *40*, 2988-2998.
90. Schmidt, C.A.; Fisher-Wellman, K. H.; Darrell, N.P. Review: From OCR and ECAR to energy: Perspectives on the design and interpretation of bioenergetics studies. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 1-22.
91. Srivastava, A.K.; Bajpai, P.; Jain, A. Insulin action; post-receptor mechanisms. **2018**, Encyclopedia of endocrine diseases, Ed: 2<sup>o</sup>., Volumen 1. 100-104.
92. Standley, P.C. *Trees and shrubs of Mexico. Contributions from the United States National Herbarium.* Washington Government Press, Washington, **1920-1926**; pp 1-1721.
93. Suttiarporn, P.; Chumpolsri, W.; Mahatheeranont, S.; Luangkamin, S.; Teepsawang, S.; Leardkamolkarn V. Structures of phytosterols and triterpenoids with potential anti-cancer activity in bran of black non-glutinous rice. *Nutrients* **2015**, *7*, 1672-1687.
94. Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat páncreas *Physiol. Res.* (**2001**) *50*: 536-546.
95. Tahara, A.; Matsuyama-Yokono, A.; Shibasaki, M. Effects of antidiabetic drugs in high-fat diet and streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *655*, 108-116.
96. Tahara, A.; Matsuyama-Yokono, A.; Shibasaki, M. Effects of antidiabetic drugs on glucose tolerance in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic mice. *Animal, clinical* **2008**, *40*, 880-886.
97. Torres-Maravilla, E.; Méndez-Trujillo, V.; Hernández-Delgado, N.C.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Reyes-Pavón, D. Looking inside mexican



- traditional food as sources of synbiotics for developing novel functional products. *Fermentation*, **2022**, 8, 123, 1-24.
98. Torres-Palacio, A. R.; Tovar-Torres, M.; Torres-Torres, N.; La nutrigenómica y las enfermedades crónicas degenerativas. *Novedades científicas*. **2020**, 71, 2, 69-77
99. Tropicos, 2020, <http://legacy.tropicos.org/Name/40003482>
100. Vélez, J. L.; Montalvo, M.; Velarde, G. Fisiología, bioquímica y metabolismo del ácido láctico: revisión de la literatura. *Metro ciencia* **2017**.25 (2), 27-31
101. Ventura-Sobrevilla, J.; Boone-Villa, V.D.; Aguilar, C.N.; Román-Ramos, R.; Vega-Ávila, E.; Campos-Sepúlveda, E.; Alarcón-Aguilar, F. Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **2011**, 54, 5-9.
102. White, S.S. *The vegetation and flora of the region of the Río de Bavispe in northeastern Sonora, Mexico*. *Lloydia J. Biol. Sci.* **1948**, 23, 1-1721.
103. Wilcox, G. A Review: Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem. Rev.* **2005**, 26, 19-37.
104. Wilson, W.K.; Stumpter, R.M.; Warren, J. J.; Rogers, P. S.; Ruan, B.; Schroepfer, J. Jr. Analysis of unsaturated C<sub>27</sub> sterols by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Lipid Res.* **1996**, 37, 1529-1555.

Antidiabetic Sterols from *Peniocereus greggii* Roots

R. Jenifer Muñoz-Gómez, Isabel Rivero-Cruz, Berenice Ovalle-Magallanes,\* Edelmira Linares, Robert Bye, Armando R. Tovar, Lilia G. Noriega, Claudia Tovar-Palacio, and Rachel Mata\*

Cite This: *ACS Omega* 2022, 7, 13144–13154

Read Online

ACCESS |



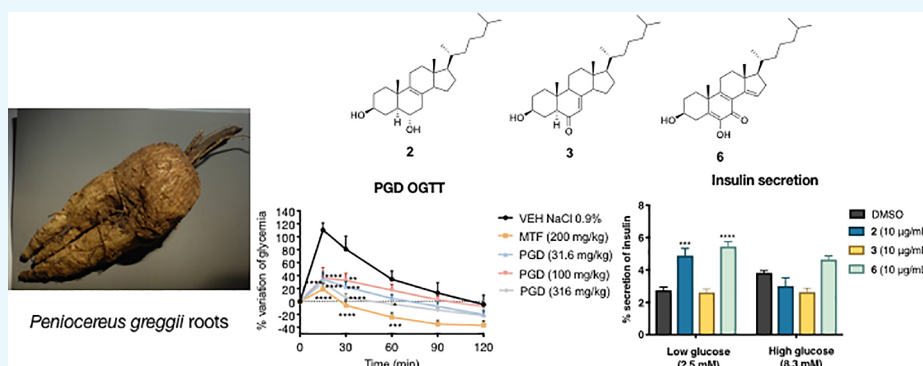
Metrics &amp; More



Article Recommendations



Supporting Information



**ABSTRACT:** The roots of the cactus *Peniocereus greggii*, which grows in Northern Mexico and in the south of Arizona, are highly valued by the Pima to treat diabetes and other illnesses, such as breast pain and common cold. As part of our chemical and pharmacological investigation on medicinal plants used for treating diabetes, herein we report the hypoglycemic and antihyperglycemic action of a decoction prepared from the roots of the plant. The active compounds were a series of cholestane steroids, namely, peniocerol (2), desoxyviperidone (3), viperidone (4), and viperidinone (5). Also, a new chemical entity was obtained from an alkalized chloroform extract (CE1), which was characterized as 3,6-dihydroxycholesta-5,8(9),14-trien-7-one (6) by spectroscopic means. Desoxyviperidone (3) showed an antihyperglycemic action during an oral glucose tolerance test. Compound 3 was also able to decrease blood glucose levels during an intraperitoneal insulin tolerance test in hyperglycemic mice only in combination with insulin, thus behaving as an insulin sensitizer agent. Nevertheless, mitochondrial bioenergetic experiments revealed that compounds 3 and 6 increased basal respiration and proton leak, without affecting the respiration associated with ATP production in C2C12 myotubes. Finally, an ultraefficiency liquid chromatographic method for quantifying desoxyviperidone (3) and viperidone (4) in the crude drug was developed and validated. Altogether, our results demonstrate that *Peniocereus greggii* decoction possesses a hypoglycemic and antihyperglycemic action in vivo, that sterols 2 and 6 promotes insulin secretion in vitro, and that desoxyviperidone (3) physiologically behaves as an insulin sensitizer agent by a mechanism that may involve mitochondrial proton leak.

## INTRODUCTION

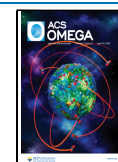
Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease characterized by insufficient insulin production and secretion and in the case of type 2 diabetes (T2DM) also by the inability of tissues to respond to insulin adequately.<sup>1</sup> According to the International Diabetes Federation (IDF), approximately 527 million people live with diabetes worldwide, and 90 to 95% of those cases belong to T2DM.<sup>2</sup> If the chronic hyperglycemia, typical of this disorder, is not adequately controlled, it increases the risk of microvascular damage (retinopathy, nephropathy, and neuropathy) and macrovascular complications (ischemic heart disease, stroke, and peripheral vascular disease).<sup>2</sup> Treatment of T2DM primarily involves lifestyle changes and antidiabetic medications, such as metformin, rosiglitazone, glibenclamide, and dapagliflozin.<sup>3</sup>

Mexico ranks seventh in prevalence in the world with 14.1 million diabetic people.<sup>2</sup> In recent decades, the number of individuals affected by T2DM has increased notably, this disease being one of the country's leading causes of morbidity and mortality.<sup>4</sup> It is estimated that Mexico has 6.7 million people with undiagnosed diabetes.<sup>2</sup> The use of herbal drugs (alone or in combination with allopathic medications) to treat the symptoms of T2DM is common in Mexico. Unfortunately,

Received: January 28, 2022

Accepted: March 18, 2022

Published: April 8, 2022



only a few of these species have been analyzed to confirm their efficacy as antidiabetic agents.<sup>5,6</sup>

One highly valued species on Mexico's northern border with the United States is *Peniocereus greggii* (Engelm.) Britton & Rose [Cactaceae]. It grows in the states of Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, and Tamaulipas as well as southern of Arizona, New Mexico, and Texas. The plant is known as “queen of the night,” “night-blooming cereus,” “reina de la noche,” “saramatracá,” “huevo de venado,” “asta de venado,” or “ho'ok vaa'o,” “ho'o'k iwa,” and “izé biné.”<sup>7</sup> The sprawling, usually inconspicuous, stems emerge from a large tuberous root and produces sporadically beautiful white flowers that bloom only one night with a heavy fragrance that attracts their shared pollinators from long distances. The Pima and Papago people from other indigenous and Mexican communities in southwestern United States and northern Mexico use a decoction of the roots to treat diabetes, digestive, genitourinary, and skin system disorders and to alleviate pains and the common cold, as well as a cardiac stimulant.<sup>8–15</sup> Regrettably, this cactus is on the list of endangered species due to its use in ornamental markets at the local, national, and international levels, while its trade as a medicinal plant is only significant at the local level. Fortunately, there are institutional programs for conservation actions, including conventional propagation and transplanting programs throughout its geographic range from Durango to Arizona and in vitro propagation techniques for ex situ conservation.<sup>16–19</sup>

Previous chemical work on *P. greggii* resulted in the isolation and characterization of the steroids macdougallin (1), peniocerol (2), desoxyviperidone (3), viperidone (4), and viperidinone (5).<sup>20</sup>

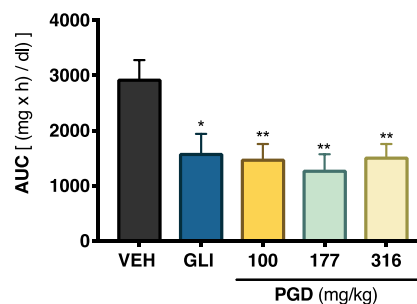
As part of our chemical and pharmacological investigation on medicinal plants used for treating diabetes, herein we report (i) the antidiabetic potential of *P. greggii* decoction and some of its constituents using in vivo and in vitro pharmacological assays and (ii) the development and validation of an analytical procedure applicable as a pharmacopeic composition test for the quality control procedures of this valuable plant.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Acute Toxicity Assay.** Acute toxicity analysis in animals is the first stage in assessing the innocuousness of herbal preparations. In this study, the Lorke method was selected to estimate the acute toxicity of the decoction from the roots of *P. greggii* (PGD) using ICR strain mice.<sup>21</sup> This procedure is appropriate for testing herbal drugs and their preparations as it requires minimal use of animals. In addition, the results of this assay serve as a guide in dose selection for other pharmacological and toxicological studies involving animals. After oral administration of PGD (first phase 10–1000 mg/kg; second phase 2600–5000 mg/kg) and observing the animals for 2 weeks, no mortality was recorded; thus, the dose of PGD that kills 50% of the tested animal population (LD<sub>50</sub>) was estimated to be higher than 5 g/kg. Also, no change in behavior or signs of acute toxicity were observed, and after necropsy and macroscopical examination of vital organs, there were no differences between control and tested animals.

**Hypoglycemic and Antihyperglycemic Potential of *P. greggii* Decoction (PGD) in Mice.** The pathogenesis of T2DM leads to a chronic state of hyperglycemia, which might be due to a decrement in insulin secretion by the pancreas,

increased hepatic glucose production, and reduced muscle glucose uptake.<sup>22</sup> Accordingly, to establish the antidiabetic potential of PGD, several in vivo tests were performed. The first experiment was an acute hypoglycemic test, which evaluated the ability of PGD to reduce blood glucose under controlled fasting conditions; we used glibenclamide (10 mg/kg) as the positive control and isotonic saline solution (NaCl 0.9%) as the vehicle. The results showed that none of the assessed traditional preparation doses decreased the glycemia in normoglycemic animals (Figure S1). However, when evaluated in the hyperglycemic mice, all doses (Figure 1) reduced blood glucose levels significantly ( $p < 0.05$ ).



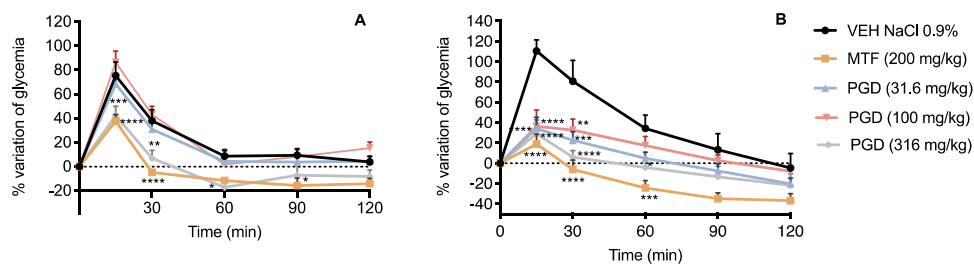
**Figure 1.** Hypoglycemic action of PGD from *P. greggii* in NA-STZ-hyperglycemic mice. AUC: area under the curve; VEH: vehicle; GLI: glibenclamide (10 mg/kg). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  significantly different. ANOVA followed by the Dunnett post hoc test for comparison with respect to vehicle control.

Next, the antihyperglycemic potential of PGD was tested using both oral glucose (OGTT) and sucrose (OSTT) tolerance tests; metformin (200 mg/kg) and acarbose (5 mg/kg) were the reference drugs, respectively. The results obtained in the OGTT for PGD in normoglycemic and hyperglycemic mice are depicted in Figure 2. In normoglycemic mice, only the dose of 316 mg/kg caused a significant decrease in the postprandial peak compared to the group treated with the vehicle (Panel A). In hyperglycemic mice, all the evaluated doses significantly reduced the postprandial peak (Panel B).

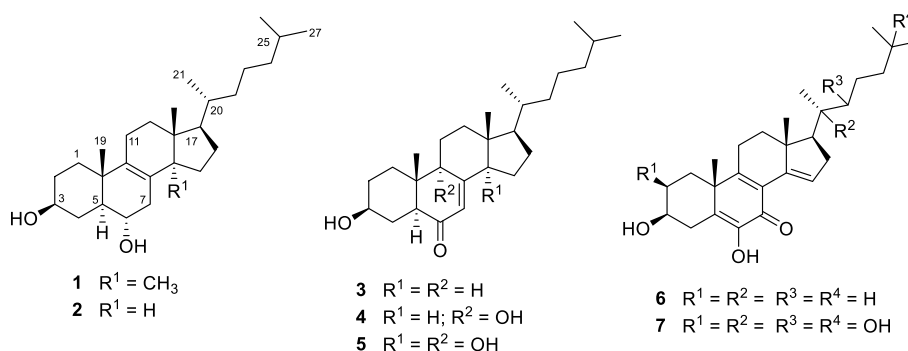
On the other hand, PGD had no significant antihyperglycemic effect in normoglycemic mice during an OSTT (Figure S1), ruling out the inhibition of intestinal  $\alpha$ -glucosidase enzymes in the mode of action of the traditional preparation.

Altogether, these results suggested that, since PGD was a mixture of components, various mechanisms could be triggered to regulate insulin secretion/signaling, skeletal glucose uptake, glucose hepatic production, or mitochondrial function.<sup>1,22</sup>

**Isolation of the Active Compounds.** TLC comparative analysis of an organic soluble fraction of EtOAc obtained by partitioning PGD (PGDE) revealed that most of its constituents were also present in the two CHCl<sub>3</sub> extracts (CE1 and CE2). The first CHCl<sub>3</sub> extract (CE1) was prepared after basifying the vegetal material with KOH to detect the potential presence of alkaloids, so common in the Cactaceae family. CE1 was devoid of alkaloids but contained all steroid compounds detected in the PGDE soluble fraction, in addition to compound 6 (Figure S2). Therefore, CE1 was further fractionated by column chromatography to isolate some of the potential active components; this process yielded



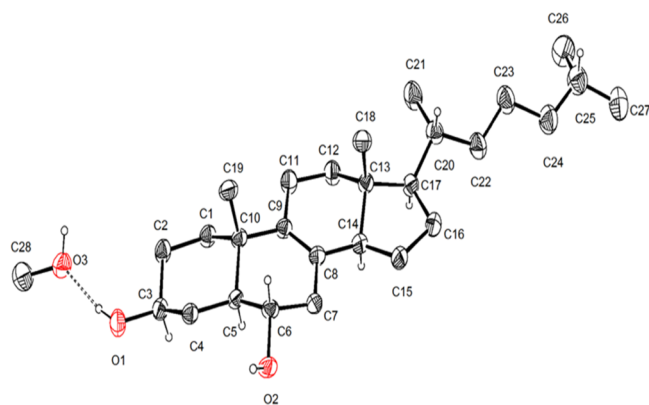
**Figure 2.** Effect of PGD on blood glucose levels in (A) normoglycemic and (B) NA-STZ-hyperglycemic mice during an OGTT. VEH: vehicle; MTF: metformin (200 mg/kg). Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , and \*\*\*\* $p < 0.0001$  significantly different. ANOVA followed by the Dunnett post hoc test for comparison with respect to vehicle control.



**Figure 3.** Chemical structures of compounds 2–6 isolated from the roots of *P. greggii* in this study and calonysterone (7).

3,6-dihydroxycholesta-5,8(9),14-trien-7-one (6), peniocerol (2), and viperidinone (5). On the other hand, extensive fractionation of CE2 afforded compounds 2–5 (Figure 3) along with  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol glucoside. This fact raised the question of whether the new chemical entity is an artifact of a nonisolated steroid.

Compound 2 was characterized by X-ray analysis (Figure 4), not previously reported. The absolute configuration was



**Figure 4.** X-ray structure of peniocerol (2).

established according to the Flack parameter.<sup>23</sup> The NMR data of peniocerol (2) are included in Table S1 and Figures S10–S15. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shift values agree with the information reported for other cholestane analogues possessing  $5\alpha,6\alpha$ -cholest-8-ene- $3\beta$ -ol.<sup>24</sup>

Compound 6 is a new chemical entity obtained as a white, optically active powder. Its molecular formula was determined to be  $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_3$  based on the NMR and HRESIMS data corresponding to eight indices of hydrogen deficiency and revealing a highly conjugated sterol. The IR spectrum (Figure

S3) displayed characteristic signals for hydroxyl ( $3440$  and  $3391\text{ cm}^{-1}$ ) and conjugated ketone ( $2948$ ,  $2929$ ,  $1632$ , and  $1612\text{ cm}^{-1}$ ).

The NMR data (Table 1) also showed characteristic signals for a cholestane type of steroid, like 2–5 and calonysterone (7),<sup>25–29</sup> a highly unsaturated natural product from the seeds of *Ipomea* sp. As calonysterone (7), the structure has an  $\alpha$ -diketone grouping at C-5, C-6, and C-7, conjugated with two additional double bonds ( $\Delta^{8-9}$  and  $\Delta^{14-15}$ ). The main differences between 6 and 7 were the absence of the signals for the carbinols grouping at C-2, C-20, C-22, and C-25 in the spectra of 6. The only alcohol functionality in compound 6 was at C-3. This assignment as well as those of the remaining substituents along the cholestane core was confirmed by the analysis of the NOESY and HMBC experiments (Figure 5).

The absolute configuration at the stereogenic centers was determined to be  $3S,10R,13R,17R$  by comparing the experimental electronic circular dichroism (ECD) of 6, with those calculated for the enantiomers  $3S,10R,13R,17R$  and  $3R,10S,13S,17S$  using the DFT B3LYP level of theory (Figure 6).

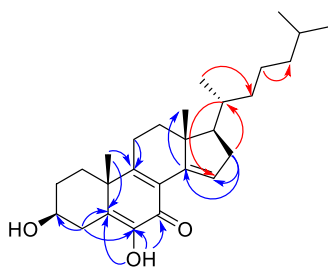
### In Vivo Antidiabetic Potential of Compound 3.

Desoxyviperidone (3), the most abundant compound of PGDE, was selected to pursue in vivo studies. When compound 3 was subjected to an OGTT (Figure 7), it significantly decreased the postprandial peak in normoglycemic ( $p < 0.0001$ ) and hyperglycemic ( $p < 0.01$ ) mice.

Analysis of the OGTT time-course curves built for desoxyviperidone (3) indicated that its mode of action could involve (i) an insulin sensitizer action, which leads to an increment in the glucose uptake in peripheral tissues or (ii) a mechanism related to glucose-stimulated insulin secretion.<sup>1,33</sup> In order to gain further information on the insulin sensitizer mechanism of action of 3, an intraperitoneal insulin tolerance test (ITT) in hyperglycemic mice was conducted.

**Table 1.** Spectroscopic Data (700 MHz for  $^1\text{H}$  and 175 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) of Compound **6** in  $\text{CDCl}_3$ 

6		
no.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	35.9	1.25 m
2	30.7	1.73 m; 1.98 m
3	71.3	3.66 m
4	33.1	2.16 m; 3.36 dd (13.0, 2.2)
5	130.0	
6	142.9	
7	180.2	
8	124.5	
9	163.9	
10	41.2	
11	24.6	2.56 m
12	35.9	1.50 m
13	46.0	
14	141.7	
15	127.8	6.89 s
16	37.1	2.21 m; 2.50 m
17	56.1	1.54 m
18	15.7	0.87 s
19	23.7	1.33 s
20	34.1	1.64 m
21	19.1	0.97 d (6.5)
22	36.2	1.08 m; 2.15 m
23	23.9	1.20 m; 1.38 m
24	39.6	1.15 m
25	28.2	1.54 m
26	22.7	0.87 d (6.5)
27	23.0	0.87 d (6.5)
OH		6.81 (s)

**Figure 5.** Key HMBC (blue) and NOESY (red) correlations for compound **6**.

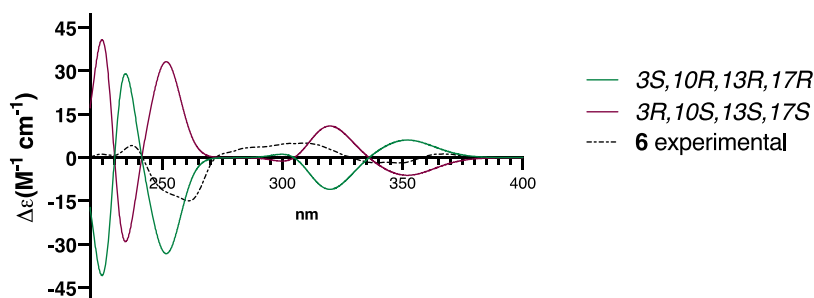
Compound **3** by itself did not have a hypoglycemic effect; however, in combination with a low dose of insulin, it

produced a statistically significant decrease of blood glucose in the same way that the combination of insulin and metformin, a well-known insulin sensitizer, did (Figure 8).<sup>34</sup> Thus, it is likely that compound **3** increased insulin actions. It has been previously demonstrated that other sterols, such as ergosterol, dehydrocholesterol, and 7-dehydrocholesterol, can support insulin receptor autophosphorylation, thus stimulating its downstream signaling, which includes GLUT4 translocation and the consequent glycemia reduction.<sup>35</sup>

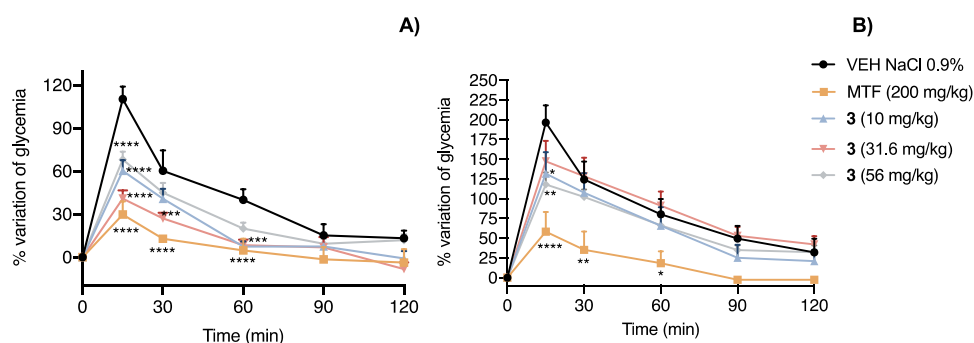
**Effect of Compounds 2, 3, and 6 on Insulin Secretion.** To evaluate the effect of compounds **2**, **3**, and **6** on insulin secretion, we performed an in vitro experiment using rat insulinoma INS-1E cells. Compounds **2** and **6** promoted insulin secretion in pancreatic cells (Figure 9). Specifically, at low glucose concentrations, compounds **2** and **6** produced a significant increase in insulin secretion compared to the control ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.01$ , respectively). In contrast, only compound **6** tended to increase insulin secretion in cells exposed to high glucose concentrations. These results confirmed that compound **2** promotes insulin secretion, which might partly explain the decoction's hypoglycemic effect. However, **3** did not promote insulin secretion, which suggests that its hypoglycemic effect may be attributed to an insulin sensitizer effect as suggested by the ITT. To our knowledge, this is the first report on the insulin secretion potential of sterols and further research should be conducted to gain a better understanding of the hypoglycemic potential of these compounds.

Compounds **2** and **6** have in common the presence of  $\Delta^{8-9}$  and hydroxyl groups at C-6 and C-3. There are not enough data to make a clear conclusion regarding the structure–activity relationship.

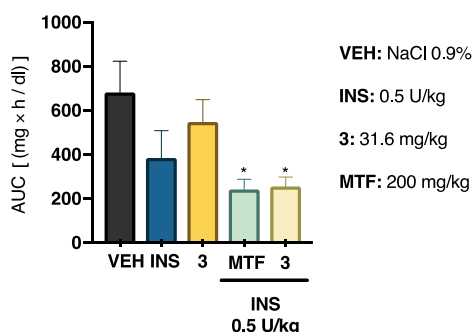
**Effect of Compounds 2, 3, and 6 on the Mitochondrial Function.** The significance of estimating the mitochondrial function is associated with energy production and has an important role in carbohydrate and lipid metabolism homeostasis. Mitochondrial bioenergetics analyses often recognize the role of mitochondrial dysfunction in the etiology of skeletal muscle insulin resistance and glucose intolerance that results from obesity and T2DM.<sup>36</sup> Thus, the effect of **2**, **3**, and **6** on mitochondrial bioenergetics was analyzed in C2C12 mouse myotubes using the Seahorse Extracellular Flux apparatus. This device measures the oxygen consumption rate (OCR, proportional to mitochondrial respiration) and extracellular acidification rate (ECAR, proportional to proton flux attributed to glycolysis) after adding some inhibitors of the respiratory chain in the following order: oligomycin (2 mM, an ATPase inhibitor), FCCP (0.5 mM, a decoupling

**Figure 6.** Comparison of the experimental ECD spectrum of compound **6** (black dotted line) with calculated spectra for the enantiomers 3S,10R,13R,17R (green) and 3R,10S,13S,17S (purple).

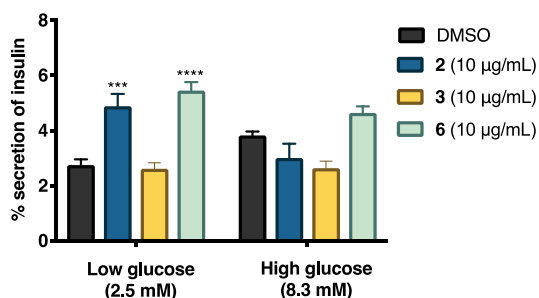




**Figure 7.** Effect of compound 3 on blood glucose levels in (A) normoglycemic and (B) STZ-hyperglycemic mice during an OGTT. VEH: vehicle; MTF: metformin (200 mg/kg). Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , and \*\*\*\* $p < 0.0001$  significantly different. ANOVA followed by the Dunnett post hoc test for comparison with respect to vehicle control.



**Figure 8.** Effect of compound 3 on the intraperitoneal insulin tolerance test (ITT) in NA-STZ-hyperglycemic mice. AUC: area under the curve; VEH: vehicle; INS: insulin (0.5 U/kg); MTF: metformin (200 mg/kg). Each bar represents the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \* $p < 0.05$  significantly different. ANOVA followed by the Dunnett post hoc test for comparison with respect to vehicle control.



**Figure 9.** Effect of compounds 2, 3, and 6 on insulin secretion in rat insulinoma. AUC: area under the curve; control: DMSO. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0.01$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  significantly different. ANOVA followed by the Tukey post hoc test for comparison with respect to vehicle control.

agent), and a mixture of rotenone and antimycin A (0.5 mM, complex I and III inhibitors, respectively). From the OCR graphs (panels A and B, Figure 10), several parameters (basal, ATP production,  $H^+$ -leak, maximal respiration, spare respiratory capacity, and nonmitochondrial respiration) are calculated, which in turn measure the ability of the tested compounds to modify a dysfunction of mitochondrial function. The ECAR graphs (panels C and D, Figure 10) indicate anaerobic energy production, a pathway that prevails in T2DM.<sup>37</sup>

The results obtained from mitochondrial respiration and glycolysis are shown in Figures 10 and S26. Compound 3

increased the basal respiration and proton leak in a concentration-dependent fashion. On the other hand, none of the compounds affected ATP production, and only compound 2 decreased the maximum respiration in proportion to sterol concentration. Compounds 2 and 3 reduced the spare respiratory capacity, but 6 incremented it at low concentrations. Finally, compound 6 increased the nonmitochondrial respiration, compound 3 did not affect it, and 2 slightly diminished it.

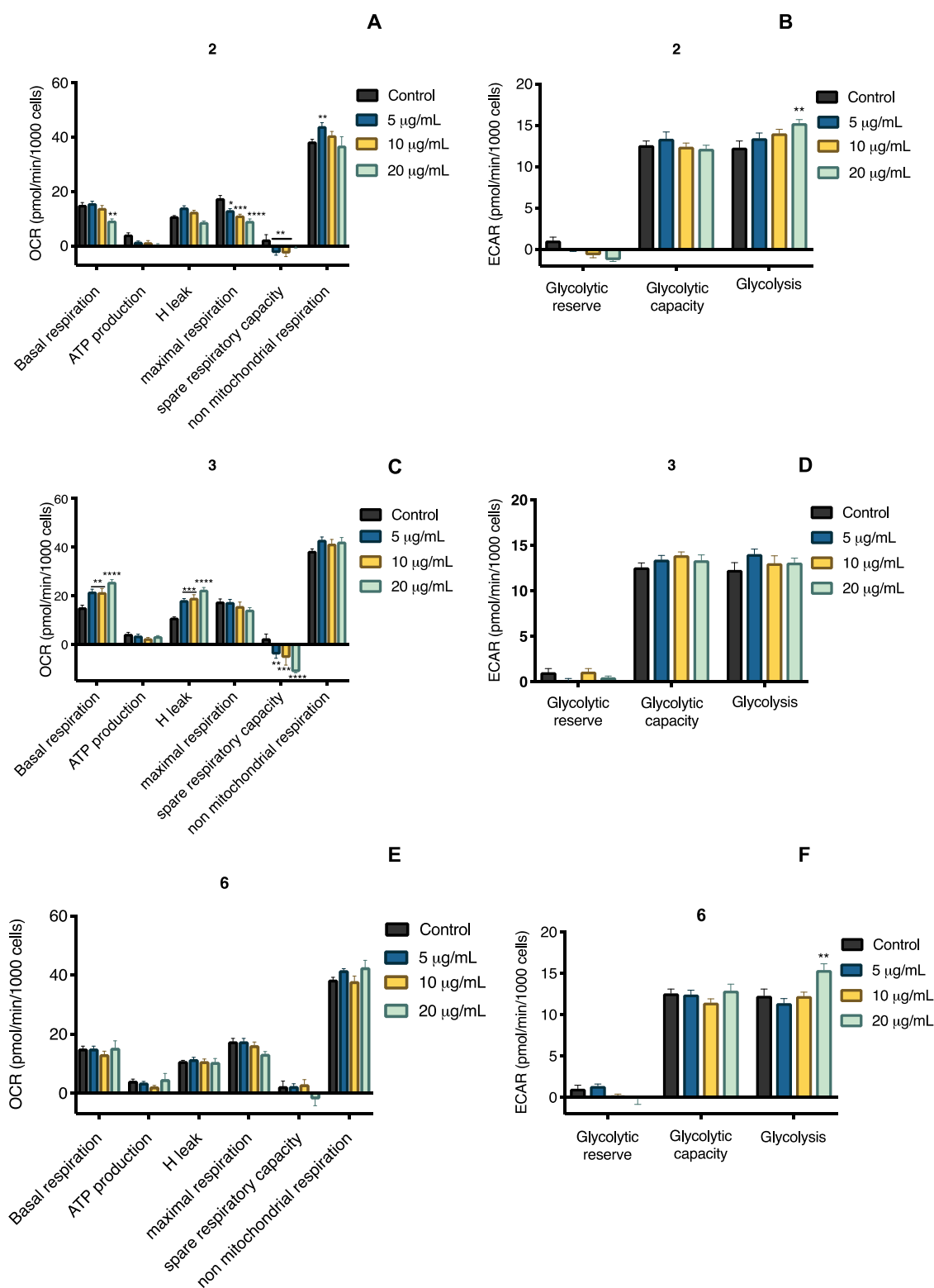
Proton leak can be classified in a constitutive, which is the basal proton conductance of mitochondria, and regulated way, that is, induced through uncoupling proteins.<sup>38</sup> Proton leak through uncoupling proteins modulates thermogenesis and maintains carbon flux despite the low ATP demand. Increasing these two mechanisms would improve insulin sensitivity.<sup>39</sup> Thus, our results display the therapeutic potential of compound 3 through modulation of proton leak.

According to the ECAR graphs, compounds 2 and 6 at the highest concentration tested increased the glycolysis (Figure 10). Based on these results, it can be concluded that 3 and 6 are compounds that act favorably to increase glucose utilization, which could have a positive impact on muscle cells of subjects with T2DM.

**UPLC-APCI-MS Method for the Identification of 3 and 4 in PGDE.** A suitable method was developed and validated to quantify simultaneously two components in PGDE. The major components were sterols 3 and 4, which were selectively extracted and identified using an UPLC-APCI-MS method (Figure 11). The validation of the method for quantitative analysis was carried out according to the ICH guidelines (2015) by determining different quality parameters, such as linearity, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), accuracy, and precision (Table S2).<sup>40</sup> Finally, the developed UPLC-APCI-MS method was applied for quantitative analysis in four different samples (Batches I–IV). The amounts of 3 were in the range of 12 to 68 mg/g, while in 4, they were in the range of 116 to 248 mg/g, showing a higher variability between the four samples (Table S3).

## CONCLUSIONS

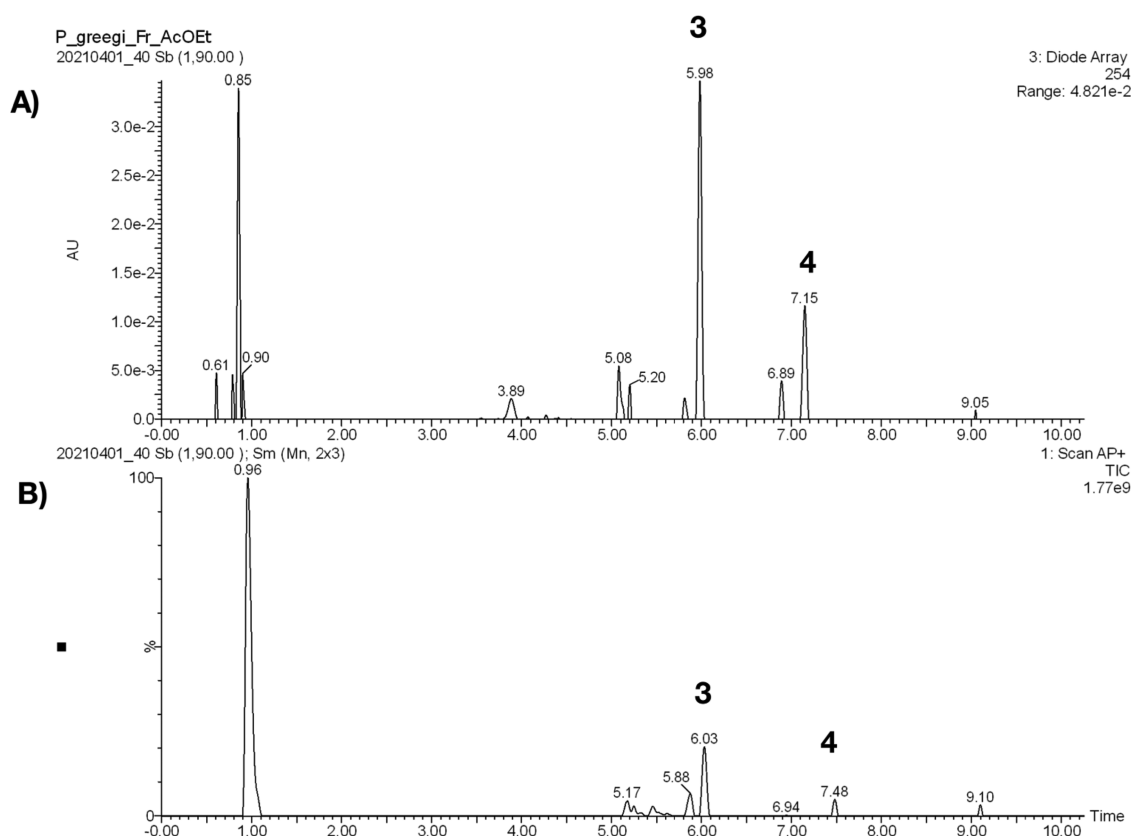
In summary, PGD possesses a hypoglycemic and antihyperglycemic action in vivo, supporting the medicinal use of *P. greggii* for treating diabetes in Mexican folk medicine. The active principles were cholestane sterols. The major compound of CE2, desoxyviperidone (3), physiologically behaves as an insulin sensitizer agent by a mechanism that



**Figure 10.** (A, C, and E) Oxygen consumption rate and (B, D, and F) extracellular acidification rate in C2C12 mouse myoblast cells of compounds 2, 3, and 6. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0.01$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  significantly different. ANOVA followed by the Tukey post hoc test for comparison with respect to control.

may involve mitochondrial proton leak. Sterol 2 and a new chemical entity (6) promoted insulin secretion in vitro. Compound 3 improved the mitochondrial function, impaired in the diabetic condition. Thus, the efficacy of PGD is related to the mixtures of compounds in the preparation, which might be acting by synergistic multitarget effects or other

mechanisms yet to be elucidated. Finally, to estimate the amount of the major class of active constituents, a precise, reliable, and accurate UPLC method was developed for quantifying desoxyviperidone (3) and viperidone (4) in PGDE. The method was validated and selective, linear, precise, and accurate in the range of concentrations evaluated.



**Figure 11.** (A) LC chromatogram of PGDE. The elution program was as follows: 0 min, 50% A; 1.0 min 50% A; 3.0 min 85% A; 5.0 min 90% A; 7.0 min 100% A; 9.0 min 100% A; 9.10 min 50% A; 11.0 min 50% A (mobile phase consisting of 50% methanol (A) and water adjusted to pH 2.8 with formic acid (FA); B). Flow rate: 0.3 mL/min; injection volume: 3  $\mu$ L. Peaks: desoxyviperidone (3); viperidone (4). (B) Typical total ion chromatogram in positive-ion APCI-MS mode for compounds 3 and 4.

This procedure will be suitable for formulating standardized preparations of this species.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** NMR spectra, including bidimensional, were recorded in  $\text{CDCl}_3$  solution on a Bruker Avance III HD or Bruker BioSpin (Billerica, MA) spectrometer at either 700 or 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) and 175 or 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), using tetramethylsilane (TMS) as the internal standard. Mass spectra of the isolates were obtained with an Acquity UHPLC-H Class system (Waters, Milford, MA). Optical rotation was obtained with an Anton Para MCP 150 polarimeter. Column chromatography (CC) was carried out on silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany).

**Reagents.** Analytical grade solvents ( $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, and *n*-hexane) and high-performance liquid chromatography (HPLC) grade solvents (MeOH and  $\text{H}_2\text{O}$ ) were purchased from J.T. Baker (Avantor, Radnor, PA). Analytical reagents [glibenclamide (GLI), metformin (MTF), glucose, nicotinamide (NA), streptozotocin (STZ), and Tween 80] were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

**Plant Materials and Preparation of the Extracts.** *Peniocereus greggii* roots were obtained from northern Chihuahua, Mexico, on August 2018 (Batch I), April 2019 (Batch II), June 2019 (Batch III), and March 2020 (Batch IV). Authentication of the plant was carried out by Dr. Robert Bye and Edelmira Linares [voucher specimens: 39908 were deposited at National Herbarium (MEXU)], who also provided the picture. The image is available, free of charge.

For biological testing, an aqueous extract was prepared using the decoction technique, by boiling 5 g of ground and dried roots in distilled water (250 mL) for 5 min. The extract (PGD) was filtered and concentrated in vacuo to yield a brownish residue (4.73 g), and this process was repeated as needed.

**Compound Isolation.** Comparative chromatographic analysis of an EtOAc soluble fraction (PGDE) obtained by partitioning of PGD revealed that most of its constituents were also present in two  $\text{CHCl}_3$  extracts (CE1 and CE2) prepared under different conditions (Figure S2). The first  $\text{CHCl}_3$  extract (CE1) was prepared after basifying the vegetal material with KOH (200 g of plant material was wetted with 200 mL of KOH 10% and allowed to dry at room temperature) with the purpose of detecting the presence of alkaloids. However, the presence of alkaloids in CE1 was not detected. CE2 was prepared with powdered plant material (2 kg of roots). The extraction process was carried out using the technique of maceration with chloroform (1 and 4 L, respectively) for 21 days. The extracts were filtered, and the solvent was evaporated in a rotary evaporator under reduced pressure at 40  $^\circ\text{C}$  to yield a brown residue (6.0 and 182 g, respectively). CE1 and CE2 were independently fractionated by open CC on silica gel (240 g and 3.0 kg, respectively) eluted with a gradient of hexane–EtOAc (90:10 to 0:100, v/v) and EtOAc–MeOH (100:0 to 80:20, v/v). Peniocerol (2, 153 mg), viperidinone (5, 89 mg), and 3,6-dihydroxycholesta-5,8(9),14-trien-7-one (6, 100 mg) were obtained from CE1, while CE2 yielded six primary fractions ( $\text{F}_\text{I}$ – $\text{F}_\text{VI}$ ). From



fraction F<sub>IV</sub> (389 mg) precipitated, a white solid was purified by CC on silica gel eluted with an isocratic system (hexane–EtOAc, 30:70) to yield desoxyviperidone (**3**, 234 mg). Fraction F<sub>V</sub> (325 mg) was fractionated by CC on silica gel eluted with a gradient of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH to obtain seven secondary fractions (F<sub>V-1</sub>–F<sub>V-7</sub>). Fraction F<sub>V-2</sub> (114 mg) was purified using CC on silica gel [hexane–EtOAc, 30:70] to yield 52 mg of viperidone (**4**). The structures of the isolates were characterized by spectroscopic and spectrometric analyses and by comparison with literature data (Figures S3–S25).<sup>24–32</sup> Compounds **2–5** were identified in ethyl acetate soluble fraction derived from the decoction of the roots of *P. greggii*.

**Compound 6.** Yellowish solid; mp: 172–173 °C;  $[\alpha]_D^{20} + 7.909$  (*c* 1.1, CHCl<sub>3</sub>); UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{\max}$ : 223 nm; FT-IR  $\nu_{\max}$ : 3440.15, 3391.65, 2929.95, 2948.50, 2867.97, 1632.81, and 1612.83 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C see Table 1; HRESIMS *m/z* 413.2881 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for 413.2849, C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>).

**X-Ray Crystal Structure Analysis of Compound 2.** Single crystals suitable for X-ray analysis were obtained by recrystallization from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (1:1). A crystal having approximate dimensions of 0.368 × 0.240 × 0.088 mm<sup>3</sup> was mounted on a glass fiber. All measurements were made using a Bruker Smart Apex CCD diffractometer equipped with graphite-monochromate Mo K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.71073$  Å) at 150 K. The structure was solved by the SHELXS-2013 method and refined using full-matrix least-squares on *F*<sup>2</sup>. Crystallographic data for **2** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) with the accession no. 2129283. These data are available, free of charge, from the CCDC via [http://www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

**Crystal Data for 2.** C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub>, MW 434.68, orthorhombic, space group *P*2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> with unit cell parameters *a* = 8.13190(10) Å, *b* = 9.08460(10) Å, *c* = 36.6785(5) Å,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ , *Z* = 4, *T* = 298(2) K, volume 2709.63(6) Å<sup>3</sup>, *F*(000) 968, density (calcd) 1.066 Mg/m<sup>3</sup>. Intensity data were collected in the range of 2.409° to 68.226° using a  $\omega$  scan; 17.434 reflections were collected, and 4900 [*R*(int) = 0.0635] were considered, observed, and used in the calculations. The final *R*<sub>1</sub> values were 0.0802 [*I* > 2 $\sigma$ (*I*)]. The final *wR*<sub>2</sub>(*F*<sub>2</sub>) values were 0.1118 [*I* > 2 $\sigma$ (*I*)], with a data–restraint–parameter ratio of 4900/3/295. The final *R*<sub>1</sub> values were 0.1118 (all data). The final *wR*<sub>2</sub>(*F*<sub>2</sub>) values were 0.1497 (all data). The absolute structure parameter was –016 (1.5).

**ECD Calculations.** Minimum energy structures from **6** were built using Spartan' 08 software (Wavefunction Inc., Irvine, CA). Conformational analysis was carried out with the Monte Carlo search protocol under MMFF molecular mechanics approximation. Conformers with relative energy under 5 kcal/mol were submitted to Gaussian 09 program (Gaussian Inc., Wallingford, CT) calculation for geometry optimization using the DFT B3LYP/DGTPZVP level of theory and the default model for CHCl<sub>3</sub> as the solvent. The same DFT method in CHCl<sub>3</sub> was employed for ECD calculations using the DFT-minimized conformers. The calculated excitation energy (nm) and rotatory strength (*R*) in dipole velocity (*Rvel*) and dipole length (*Rlen*) forms were simulated into an ECD curve. The calculated and weighted ECD curves were all generated using SpecDis 1.71.<sup>41</sup>

**In Vivo Assay with PGD or Compounds.** Preclinical evaluations were performed in accordance with the Mexican Official Norm for Laboratory Animal Care and Use (NOM-

062-ZOO-1999) and with internationally accepted principles for laboratory animal use and care and were approved by the Institutional Committee for Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL-FQ), Facultad de Química, UNAM (FQ/CICUAL/403/20). Eight-week-old male ICR or CD1 mice (25–36 g) were used. The animals were acclimatized under controlled temperature (22 ± 2 °C) on a light/dark (12 h/12 h) cycle, with standard rodent diet (LabDiet 5001, MO) and purified water ad libitum before experiments for 3 days. For ICR mice, chemical hyperglycemia was induced as previously described by i.p. injection of a single dose of nicotinamide (NA; 50 mg/kg) dissolved in isotonic saline solution and streptozotocin (STZ; 130 mg/kg) solubilized in citrate buffer (pH 4.5).<sup>42,43</sup> For CD1 mice, the state of hyperglycemia was induced by three subsequent doses of STZ (40 mg/kg, i.p.); 21 days after the first dose, the experiments were carried out.<sup>32</sup> Blood glucose levels were measured using a commercial glucometer (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, NJ). Blood samples were collected by means of a small incision at the end of the tail, and mice that had glycemic values greater than 200 mg/dL were used. The percentage variation of glycemia for each animal was calculated with respect to its basal level as follows: % variation of glycemia =  $[(G_t - G_i) / G_i] \times 100$ , where *G*<sub>i</sub> is basal glycemia and *G*<sub>t</sub> are the different glycemia values after treatment administration. Euthanasia of mice was set at the end of the experiments by hypoxia in a CO<sub>2</sub> chamber.<sup>42</sup>

**Acute Oral Toxicity in Mice.** PGD was assessed for potential acute toxicity according to the Lorke procedure.<sup>21</sup> Briefly, the samples were administered by an intragastric route in two independent phases: in both, twelve mice were divided into four groups (*n* = 3). Doses administered in the first phase were 10, 100, and 1000 mg/kg. In the second phase, the doses were 1600, 2900, and 5000 mg/kg. Control animals received 0.05% Tween 80 in saline solution. In both phases, the animals were observed to identify acute toxic effects, changes in the behavior pattern, or mortality. Mice weight was registered daily for 14 days. At the end of the experiments, all animals were sacrificed by cervical dislocation to obtain the heart, lungs, liver, and kidneys to detect macroscopic organ damage.

**Acute Hypoglycemic Assay in Normoglycemic and Hyperglycemic Mice.** Normal and hyperglycemic mice were randomly divided in five groups (*n* = 6) and deprived of food before testing with access to purified water ad libitum. PGD was tested using doses of 31.6, 100, and 316 mg/kg; glibenclamide (GLI; 10 mg/kg) was used as a positive control and saline solution as a vehicle (NaCl 0.9%). Blood samples were collected at 0, 0.5, 1.5, 3, 5, and 7 h after treatment administration. Percentage variation of glycemia was calculated as stated before. Area under the curve (mg × h dL<sup>-1</sup>) was obtained with the trapezoidal method.<sup>42</sup>

**Oral Glucose and Sucrose Tolerance Tests (OGTT and OSTT) in Normoglycemic and Hyperglycemic Mice.** OGTT and OSTT were conducted in both normoglycemic and hyperglycemic mice. Animals were deprived of food 4 h before the experiment with free access to drinking water. PGD was tested at the doses of 31.6, 100, and 316 mg/kg and compound **3** at three doses (10, 31.6, and 56 mg/kg). The vehicle group received saline solution. The positive controls were metformin (MTF; 200 mg/kg) in the case of OGTT or acarbose (ACA; 5 mg/kg) in the case of OSTT. Basal glycemia was recorded as previously stated, before intragastric

administration of treatments. Thirty minutes later, all animals received an oral glucose (1 g/kg) or sucrose (2 g/kg) load. Blood samples were collected at 30, 60, 90, and 120 min after the administration of the carbohydrate. Percentage variation of glycemia was calculated as previously described.<sup>42</sup>

**Insulin Tolerance Test.** Hyperglycemic CD1 mice were deprived of food for 4 h before the experiment. After this, basal glycemia was measured, and the mice received either the vehicle or a single dose of compound 3 (31.6 mg/kg) or MTF (200 mg/kg). Thirty minutes after treatment, the mice received an intraperitoneal dose of 0.5 U/kg of insulin. Glycemia was measured at 15, 30, 60, 90, and 120 min following insulin administration. Percentage variation of glycemia and AUC was calculated as previously described.<sup>44</sup>

**Statistics.** The results are expressed as mean  $\pm$  standard error mean (SEM) of glycemia variation or AUC. Statistical significance ( $p < 0.05$ ) was assessed with the GraphPad Prims software (version 8.0; GraphPad Inc., LA Jolla, CA) using one-way or two-way ANOVA tests followed by an appropriate post hoc test.

**In Vitro Assay with Compounds.** Muscle cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) and were grown in an incubator under a 5% CO<sub>2</sub>-humidified atmosphere at 37 °C. C2C12 mouse myotubes were differentiated and treated overnight with the indicated concentrations of the compounds. INS-1E cells (rat insulinoma) were kindly donated by Profs. C. B. Wollhein and Pierre Maechler of the University of Geneva (Switzerland). INS-1E cells were cultured in the RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 2 mM glutamine, 10 mM HEPES, 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin under standard incubator conditions.<sup>44–46</sup>

**INS-1E Cell Culture and Insulin Secretion Assays.** For insulin secretion assays, INS-1E cells were seeded on 24-well plates and after 48 h treated with 5, 10, or 20  $\mu$ g/mL of compounds 2, 3, and 6 for 2 h as previously reported. The insulin secretion was expressed as the percentage of insulin secreted into the media with respect to the sum of the secreted and total insulin content.<sup>44–46</sup>

**Mitochondrial Respiration.** A Seahorse Extracellular Flux (XF) 96 Analyzer (Seahorse Bioscience, Inc., North Billerica, MA) was used to measure the oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) in C2C12 mouse myotubes. The OCR and ECAR were measured after the cells were incubated for 18 h with compounds 2, 3, and 6 (5, 10, and 20  $\mu$ g/mL), and the cells were washed with an XF base medium supplemented with 10 mM glucose, 2 mM glutamine, and 1 mM pyruvate (pH = 7.4) and were then incubated in this medium for 1 h at 37 °C in a non-CO<sub>2</sub> incubator. The plates were put in a Seahorse XF96 at 37 °C for 10 min calibration and 3 measurement cycles to record basal cellular respiration. Oligomycin (2  $\mu$ M), FCCP (0.5  $\mu$ M), and a mixture of rotenone plus antimycin A (0.5  $\mu$ M) were added sequentially, and three measurements were performed after the addition of each concentration of the compounds.<sup>44–46</sup>

**UPLC-APCI-MS Method.** Acetonitrile and water of LC-MS grade and formic acid (FA) of HPLC-grade were purchased from J.T. Baker (Avantor, Radnor, PA). Desoxyviperidone (3) and viperidone (4) (purities  $\geq 98\%$ ) used as standards were isolated from the CE2 extract of *P. greggii*.

The stock standard solutions for LC analysis of 3 and 4 were prepared at a final concentration of 1 mg/mL. Working solutions for the standards were prepared by diluting the stock solution in dioxane–methanol (1:1). Sample solutions of each extract (75  $\mu$ g/mL) were prepared following the same procedure as the stock standard solutions. Before analysis, the solutions were filtrated using 0.20  $\mu$ m GHP membranes.

An Acquity UHPLC-H Class system from Waters corporation (Milford, MA) was used as a liquid chromatographic system. The instrument consists of a quaternary pump, an autosampler, an UV–visible diode array, and a single quadrupole (SQD2) detector. The column temperature was controlled with a column oven at 40 °C. The samples were separated using an Acquity UPLC BEH Shield RP18 column (1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  100 mm) with a guard column (Waters). A binary mobile phase consisting of 50% methanol (A) and water adjusted to pH 2.8 with formic acid (FA; B) was found to be the most appropriate. A flow rate of 0.3 mL/min with an injection volume of 3  $\mu$ L was used. Elution was carried out according to the following gradient program: 0 min, 50% A; 1.0 min 50% A; 3.0 min 85% A; 5.0 min 90% A; 7.0 min 100% A; 9.0 min 100% A; 9.10 min 50% A; and 11.0 min 50% A. Detection was carried out at 254 nm. An APCI source was used under the following conditions: probe temperature: 550 °C, gas flow: 250 (L/h), capillary voltage: 50 V, and corona current: 0.3  $\mu$ A. Under the conditions described above, the retention times ( $R_T$ ) of desoxyviperidone (3) and viperidone (4) were found to be 5.98 and 7.15 min, respectively. MassLynk software version 4.1 was used to control the UPLC-APCI-MS system and for data acquisition and processing. The concentrations were calculated using peak area ratios, and the linearity of the calibration curve was determined using least squares regression analysis. All statistical calculations relative to quantitative analysis were performed using Origin 8.0 software (Origin Labs, MA).

The proposed UPLC-APCI-MS method for quantitative analysis was validated based on linearity, LOD, LOQ, intraday and interday precisions, and accuracy.

For linearity, LOD, and LOQ, standard calibration curves for quantifying 3 and 4 were obtained by plotting concentration ( $\mu$ g/mL) against response. Six different concentrations for each of the two standards in the range of 5–75  $\mu$ g/mL were prepared in sextuplicate. All dilutions were made in dioxane–methanol (1:1). LOQ were determined through the analysis of solutions containing decreasing concentrations of each analyte, to achieve the lowest determinable level with acceptable precision and accuracy under the established conditions. The LOD was estimated based on the relation between the standard deviation ( $S_{y/x}$ ) of the standard intercept ( $b_0$ ) and the slope ( $b_1$ ) of the analytical curve (eq 1).<sup>40</sup>

$$LD = S_{y/x} \times 3.3 (b_1) \quad (1)$$

The repeatability and the intermediate precision of six identical samples were analyzed according to the method described above on two different days and by two different analysts in triplicate. The standard deviation and coefficient of variation were calculated for each day. Finally, method accuracy was tested by recovery, assaying three different concentrations of six samples (5, 25, and 75  $\mu$ g/mL) in triplicate. All compounds were added simultaneously to ethyl acetate soluble fraction and analyzed according to the method previously described. The mean percentage recoveries for 3

and 4 were found to be between 98 and 102% by means of Fisher's *F*-test.<sup>40</sup>

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c00595>.

Graphics of the hypoglycemic test and OSTT of PGD; LC chromatograms of the CHCl<sub>3</sub> extracts (CE1; A) and (CE2; B); NMR spectra for compounds 2–6; graphics of OCR and ECAR for compounds 2, 3, and 6; and results of the UPLC-APCI-MS method validation (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

**Berenice Ovalle-Magallanes** – *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México*; Email: [ovalle.magallanes@quimica.unam.mx](mailto:ovalle.magallanes@quimica.unam.mx)

**Rachel Mata** – *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México*; [orcid.org/0000-0002-2861-2768](https://orcid.org/0000-0002-2861-2768); Email: [rachel@unam.mx](mailto:rachel@unam.mx)

### Authors

**R. Jenifer Muñoz-Gómez** – *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México*

**Isabel Rivero-Cruz** – *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México*

**Edelmira Linares** – *Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México*

**Robert Bye** – *Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México*

**Armando R. Tovar** – *Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México 14080, México*

**Lilia G. Noriega** – *Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México 14080, México*

**Claudia Tovar-Palacio** – *Dirección de Nutrición, Instituto Nacional Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México 14080, México*

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c00595>

### Author Contributions

This work was taken from the PhD thesis of R.J.M.-G. submitted to Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM. R.J.M.-G. carried out most of the experimental work, participated in valuable discussions, and contributed to the writing of the manuscript. R.M. and B.O. conceived the study, participated in its design and coordination, and helped in a great deal to draft the manuscript. R.B. and E.L. participated in the project's initial planning, conducted field and ethnobotanical research, contributed to the botanical literature review and photographs, and wrote the ethnobotanical text. I.R.-C. designed and directed the validation procedures. L.N. carried

out and interpreted the bioenergetic experiments and contributed to the writing of this part of the manuscript. C.T.-P. performed the insulin secretion experiments and participated in the corresponding discussion. All authors read and approved the final manuscript.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CONACyT CB A1-S-11226 and DGAPA IN 217320 awarded to R.M. R.J. M.-G. acknowledges fellowship from CONACyT to pursue graduate studies (no. 735296). The authors also recognize the valuable support of A. Pérez-Vásquez, Marisela Gutierrez, Rosa Isela del Villar, Nayeli López Balbiaux, Ramiro del Carmen, and Georgina Duarte from Facultad de Química. We are indebted to Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for the resources to carry out computational calculations through the Miztli supercomputing system (LANCAD-UNAM-DGTIC-313). R.B. and E.L. thank our collaborators in the field who consented to share their experiences as well as Laura Cortés Zarraga, Andrea Martínez Balleste, and Georgina Ortega Leite who provided access to the BADEPLAM data base and the digital resources of the Library of the Instituto de Biología.

## ■ REFERENCES

- (1) Wilcox, G. A Review: Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem. Rev.* **2005**, *26*, 19–37.
- (2) International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 10th ed.; International Federation of Diabetes: Brussels, Belgium, 2021.
- (3) Cheng, A. Y. Y.; Fantus, G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* **2005**, *172*, 213–226.
- (4) Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes, INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Mexico, 2021.
- (5) Escandón, S. M.; Mata, R.; Andrade-Cetto, A. Molecules isolated from Mexican hypoglycemic plants. *Molecules* **2020**, *25*, 4145.
- (6) Mata, R.; Figueroa, M.; Navarrete, A.; Rivero-Cruz, I. Chemistry and biology of selected Mexican medicinal plants. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **2019**, *108*, 1–142.
- (7) Sánchez-Salas, J.; Flores-Rivas, J.; Muro-Pérez, G.; Martínez-Adriano, C. El reinado desconocido de *Peniocereus greggii*. *Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc.* **2009**, *6*, 21–24.
- (8) Castetter, E. F.; Underhill, R. M. *The ethnobiology of the Papago Indians. Ethnobiological studies in the American Southwest*, 2nd ed.; University of New Mexico Press: Nuevo Mexico, 1935; pp 1–84.
- (9) Curtin, L. S. M. *By the prophet of the earth*, 1st ed.; San Vicente Foundation, Rydal Press: Santa Fe, 1949; p 158.
- (10) Hicks, S. *Desert plants and people*, 1st ed.; Naylor Company Press: San Antonio, TX, 1966; p 75.
- (11) Hrdlicka, A. *Physiological and medical observations among the Indians of Southwestern United States and Northern Mexico*; Smithsonian Institution, Bureau of American Ethnology Bulletin, Washington Government Press: Virginia, 1908; pp 1–460.
- (12) Murphey, E. V. A. *Indian uses of native plants*; Fort Bragg, Mendocino County Historical Society: California, 1959; p 72.
- (13) Rea, A. M. *At the desert's green edge – An ethnobotany of the Gila River Pima*; University of Arizona Press: Arizona, 1997; p 430.
- (14) Standley, P. C. *Trees and shrubs of Mexico. Contributions from the United States National Herbarium*; Washington Government Press: Washington, 1920–1926; pp 1–1721.
- (15) White, S. S. The vegetation and flora of the region of the Río de Bavispe in northeastern Sonora, Mexico. *Lloydia J. Biol. Sci.* **1948**, *23*, 1–1721.



- (16) Ingram, M.; Nabhan, G.; Buchmann, S. Our forgotten pollinators: protecting the birds and bees. *Pesticide impacts on beneficial organisms*; 1996, 6, 1–12.
- (17) Cortés-Vega, C. M.; Sánchez-Pérez, J. C.; Alvarado-Rodríguez, M. Establecimiento de un sistema de micropropagación de *Peniocereus greggii* (Engelml) Britton & Rose, especie cactácea en peligro de extinción. *Revista Investigación Científica* 2008, 4, 1–7.
- (18) Muro, P. G.; Sánchez, S. J.; Estrada, C. E.; García, P. M. *Peniocereus greggii* variety *greggii* (Cactaceae) in Durango, Mexico. *Southwest. Nat.* 2012, 57, 337–338.
- (19) Raguso, R. A.; Henzel, C.; Buchmann, S. L.; Nabhan, G. P. Trumpet flowers of the Sonoran Desert: floral biology of *Peniocereus* cacti and sacred *Datura*. *Int. J. Plant Sci.* 2003, 164, 877–892.
- (20) Knight, J. C.; Pettit, G. R. Arizona flora: The sterols of *Peniocereus greggii*. *Phytochemistry* 1969, 8, 447–482.
- (21) Lorke, D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 1983, 54, 275–287.
- (22) Rix, I.; Nexoe-Larse, C.; Bergmann, N.; Lund, A.; Knop, F. *Glucagon physiology*. NCBI Bookshelf. A service of National Library of Medicine; National Institutes of Health, 2019, pp 1–15.
- (23) Flack, H. D. On enantiomorph -polarity estimation. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* 1983, A39, 867–881.
- (24) Knight, J. C.; Wilkinson, D. J.; Djerassi, C. The structure of the cactus sterol macdougallin ( $14\alpha$ -Methyl- $\Delta^8$ -cholestene- $3\beta,6\alpha$ -diol). A novel link in sterol biogenesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88, 790–798.
- (25) Csábia, J.; Hsiehb, T. J.; Hasanpour, F.; Martins, A.; Kele, Z.; Gátic, T.; Simon, A.; Tóth, G.; Hunyadi, A. Oxidized metabolites of 20-hydroxyecdysone and their activity on skeletal muscle cells: preparation of a pair of desmotropes with opposite bioactivities. *J. Nat. Prod.* 2015, 78, 2339–2345.
- (26) Issaadi, H. M.; Tsai, Y. C.; Chang, F. R.; Hunyadi, A. Centrifugal partition chromatography in the isolation of minor ecdysteroids from *Cyanotis arachnoidea*. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2017, 1054, 44–49.
- (27) Canonica, L.; Danieli, B.; Ferrari, G.; Krepinsky, J.; Rainoldi, G. Structure of calonysterone, an unusually modified phytoecdysone. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1973, 19, 737–738.
- (28) Issaadi, H. M.; Csábia, J.; Hsiehb, T. J.; Gátic, T.; Tóth, G.; Hunyadi, A. Side-chains cleaved phytoecdysteroid metabolites as activators of protein kinase B. *Bioorg. Chem.* 2019, 82, 405–413.
- (29) Wilson, W. K.; Stumpter, R. M.; Warren, J. J.; Rogers, P. S.; Ruan, B.; Schroepfer, J., Jr. Analysis of unsaturated  $C_{27}$  sterols by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Lipid Res.* 1996, 37, 1529–1555.
- (30) Jayasuriya, H.; Herath, K. B.; Ondeyka, J. G.; Guan, Z.; Borris, R. P.; Tiwari, S.; de Jong, W.; Chavez, F.; Moss, J.; Stevenson, D. W.; Beck, H. T.; Slattey, M.; Schulman, N. Z. M.; Ali, A.; Sharma, N.; MacNaul, K.; Hayes, N.; Menke, J. G.; Singh, S. B. Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver x receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 1247–1252.
- (31) Dinan, L. Review phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 2001, 57, 325–339.
- (32) Suttiarporn, P.; Chumpolsri, W.; Mahatheerant, S.; Luangkamin, S.; Teepsawang, S.; Leardkamolkarn, V. Structures of phytosterols and triterpenoids with potential anti-cancer activity in bran of black non-glutinous rice. *Nutrients* 2015, 7, 1672–1687.
- (33) Srivastava, A. K.; Bajpai, P.; Jain, A. *Insulin action; post-receptor mechanisms*. *Encyclopedia of endocrine diseases*, 2nd ed., vol 1; pp 100–104.
- (34) Rena, G.; Hardie, D. G.; Pearson, E. R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 2017, 60, 1577–1585.
- (35) Delle, R. J. B.; Kim, J.; Suresh, P.; London, E.; Miller, W. T. Sterol structure dependence of insulin receptor and insulin-like growth factor 1 receptor activation. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2019, 1861, 819–826.
- (36) Jakovljevic, N. K.; Pavlovic, K.; Jotic, A.; Lalic, K.; Stoilkovic, M.; Lukic, L.; Milicic, T.; Macesic, M.; Stanarcic-Gajovic, J.; Lalic, N. M. Targeting mitochondria in diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6642.
- (37) Schmidt, C. A.; Fisher-Wellman, K. H.; Darrell, N. P. Review: From OCR and ECAR to energy: Perspectives on the design and interpretation of bioenergetics studies. *J. Biol. Chem.* 2021, 297, 1–22.
- (38) Jastronch, M.; Divakaruni, A. S.; Mookerjee, S.; Treberg, J. R.; Brand, M. D. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 2010, 47, 53–67.
- (39) Harper, M. E.; Green, K.; Brand, M. D. The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity. *Annu. Rev. Nutr.* 2008, 28, 13–33.
- (40) International Council for Harmonisation (ICH). Harmonised tripartite guideline. 2015. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Step 4 version, 1–13.
- (41) Bruhn, T.; Schaumlöffel, A.; Hemberger, Y.; Pescitelli, G. *SpecDis, version 1.71*; JIMDO: Berlin, Germany, 2017, <http://specdissoftware.jimdo.com>.
- (42) Ovalle-Magallanes, B.; Medina-Campos, O.; Pedraza-Chaverri, J.; Mata, R. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry* 2015, 110, 111–119.
- (43) Ventura-Sobrevilla, J.; Boone-Villa, V. D.; Aguilar, C. N.; Román-Ramos, R.; Vega-Avila, E.; Campos-Sepúlveda, E.; Alarcón-Aguilar, F. Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proc. West Pharmacol. Soc.* 2011, 54, 5–9.
- (44) Lozano-González, M.; Ovalle-Magallanes, B.; Rangel-Grimaldo, M.; Torre-Zavala, S.; Noriega, L. G.; Tovar-Palacio, C.; Tovar, A. R.; Mata, R. Antidiabetic *in vitro* and *in vivo* evaluation of cyclodipeptides isolated from *Pseudomonas fluorescens* IB-MR-66e. *New J. Chem.* 2019, 43, 7756–7762.
- (45) Ovalle-Magallanes, B.; Navarrete, A.; Haddad, P. S.; Tovar, A.; Noriega, L. G.; Tovar-Palacios, C.; Mata, R. Multi-target antidiabetic of mexicanolides from *Swietenia humilis*. *Phytomedicine* 2019, 58, No. 152891.
- (46) Palacio-González, B.; Zarain-Herzberg, A.; Flores-Galicia, I.; Noriega, L. G.; Alemán-Escondrillas, G.; Zariñan, T.; Ulloa-Aguirre, A.; Torres, N.; Tovar, A. R. Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1841, 132–140.