



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

Inhibidores de α -glucosidasas de *Vauquelinia corymbosa*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. F. B. Laura Cecilia Flores Bocanegra



TUTOR: Dra. Rachel Mata Essayag
Facultad de Química

diciembre 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

Presidente	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Vocal	Dr. Francisco Hernández Luis
Secretario	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

Congresos.

QUIMIUNAM 2013. Inhibidores de α -glucosidasas de *Vauquelinia corymbosa*. Noviembre 13-15, 2013. Ciudad Universitaria, México D.F.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al financiamiento otorgado a través de los proyectos DGAPA-UNAM (IN-212913) y CONACyT por la beca otorgada para desarrollar mis estudios de maestría (becario 445065).

Especialmente agradezco a la Dra. Rachel Mata Essayag por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y por el apoyo incondicional y gran dedicación para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez por su apoyo técnico y gracias también por la asesoría continúa para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz por el apoyo técnico para el desarrollo de este trabajo.

Al cDr. José Alberto Rivera Chávez por el apoyo en la realización de los ensayos enzimáticos y de acoplamiento molecular.

Al Dr. Robert Bye por proporcionar el material vegetal para la realización del presente proyecto.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química UNAM, por el apoyo brindado para el registro de espectros.

*CON INFINITO AMOR Y AGRADECIMIENTO:
A mis padres por ser mi guía y por apoyarme incondicionalmente en cada paso que doy.
A mi hermana Dulce, por estar siempre conmigo.
A Ale simplemente por todo.*

¡GRACIAS!

RESUMEN

El presente trabajo forma parte de una serie de investigaciones conducentes a establecer el potencial antihiper glucémico y/o hipoglucemiante de especies medicinales selectas de utilidad en el tratamiento de la diabetes en las prácticas médicas populares con la finalidad de generar la información científica que justifique su uso racional. De tal manera, que en esta investigación se describen los estudios de seguridad y eficacia preliminares de la especie *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae).

La evaluación *in vitro* contra la enzima α -glucosidasa de levadura mediante un ensayo espectrofotocolorimétrico de la infusión de las partes aéreas de *V. corymbosa* permitió establecer su actividad antihiper glucémica potencial. El fraccionamiento biodirigido del extracto permitió el aislamiento de tres compuestos: piceina (**42**), prunasina (**43**) y (-)-*epi*-catequina (**44**). La prunasina (**43**) y (-)-*epi*-catequina (**44**) inhibieron la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura con una concentración inhibitoria media (CI₅₀) de 1.6 mM y 0.3 mM, respectivamente, contra 0.5 mM de la acarbosa utilizada como control positivo.

Los estudios de cinética enzimática indicaron que ambos productos **43** y **44** se comportan como inhibidores mixtos de la enzima; las constantes de inhibición (K_i) calculadas fueron de K_{ic} de 1.07, K_{iu} de 0.99 y K_{ic} de 0.30, K_{iu} de 0.72, respectivamente. Por otro lado, los estudios de acoplamiento molecular predicen que la (-)-*epi*-catequina (**44**) se une cerca del sitio activo de la enzima, y en el mismo; en tanto que la prunasina (**43**) se une únicamente en el sitio activo.

El conjunto de resultados, aunque preliminares, sugieren entonces que los preparados de la planta disminuyen los niveles de glucosa postprandial. Sin embargo, la

presencia de prunasina **(43)** en la planta en grandes cantidades debe ser motivo de alerta, ya que el uso continuo de la planta podría conducir a una intoxicación por cianuro. Estos hallazgos deben ser señalados a los consumidores para evitar el uso indebido de la planta y prevenir los efectos indeseables relacionados con su consumo.

ABSTRACT

As a part of our investigation to establish the hypoglycemic and/or antihyperglycemic effects of selected Mexican medicinal plants used in folk medicine for the treatment of diabetes, the present study was undertaken in order to determine the preclinical safety and efficacy of *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae).

The infusion prepared from the aerial parts of *V. corymbosa* induced noted inhibition of yeast α -glucosidase when tested *in vitro* using a well-known spectrophotometric method. Bioassay-guided fractionation led to the isolation of three simple aromatic compounds, namely picein (**42**), prunasin (**43**) and (-)-*epi*-catechin (**44**), which were identified by spectroscopic means. Compounds **43** and **44** inhibited the activity of the enzyme with an IC_{50} of 1.6 and 0.3 mM, respectively vs 0.5 mM for acarbose employed as positive control.

Kinetic analysis revealed that both compounds **43** and **44** behaved as noncompetitive inhibitors. The K_i values were K_{ic} of 1.07, K_{iu} of 0.99 and K_{ic} of 0.30, K_{iu} of 0.72, respectively. Docking analysis using autodock 4.0 predicted that **44** bind both at the active site and close to it. On the other hand, compound **43** was found to bind only at the active center of the enzyme.

Altogether, the results suggest that *V. corymbosa* contains active principles capable of reducing postprandial high glucose levels. However, the high content of prunasin (**43**) makes the plant toxic. Thus, it is important to advise the consumers about the risks implicated with the chronic usage of this medicinal plant.

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	I
INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE ESPECTROS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Generalidades sobre Diabetes Mellitus (DM).	1
1.1.1 Panorama mundial y nacional de la DM.	3
1.1.2 Tratamiento de la Diabetes Mellitus.	4
1.2 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas como agentes potenciales antidiabéticos.	7
1.2.2 Inhibidores de las α -glucosidasas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.	9
1.2.3 Plantas medicinales con actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas.	11
1.2.4 Inhibidores de α -glucosidasas de origen natural.....	15
1.3 Género <i>Vauquelinia</i>	21
1.3.1 <i>Vauquelinia corymbosa</i> Bonlp.....	21
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	24
3. HIPÓTESIS.....	26
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	27
4.1 Adquisición del material vegetal.	27
4.2 Procedimientos generales.	27
4.2.1 Análisis cromatográficos.	27
4.2.2 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	27
4.3 Preparación de los extractos de <i>V. corymbosa</i>	28
4.3.1 Preparación del extracto orgánico de <i>V. corymbosa</i>	28

4.3.2 Preparación del extracto acuoso de <i>V. corymbosa</i>	28
4.3.2.1 Fraccionamiento preliminar de la infusión de <i>V. corymbosa</i>	29
4.4. Determinación de la seguridad y eficacia preclínica de <i>V. corymbosa</i>	29
4.4.1 Determinación de la toxicidad aguda del extracto orgánico y acuoso de <i>V. corymbosa</i>	30
4.4.2 Evaluación del potencial antidiabético de <i>V. corymbosa</i>	30
4.4.2.1 Determinación del potencial hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de <i>V. corymbosa</i>	31
4.4.2.2 Determinación del efecto del extracto acuoso y de sus fracciones primarias sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa.....	32
4.5 Estudio químico de la fracción activa de la infusión de <i>V. corymbosa</i>	33
4.5.1 Fraccionamiento de la fracción orgánica de la infusión de <i>V. corymbosa</i>	33
4.5.1.1 Aislamiento de piceina (42)	33
4.5.1.2 Aislamiento de prunasina (43)	33
4.5.1.3 Aislamiento de (-)- <i>epi</i> -catequina (44)	33
4.6 Evaluación del efecto de piceina (42) , prunasina (43) y (-)- <i>epi</i> -catequina (44) , sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura.....	34
4.6.1 Determinación de los parámetros de inhibición enzimática de prunasina (43) y de (-)- <i>epi</i> -catequina (44)	34
4.7 Acoplamiento molecular.....	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5.1 Toxicidad aguda de los extractos orgánico y acuoso de <i>V. corymbosa</i>	38
5.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de <i>V. corymbosa</i> en ratones normoglucémicos y diabéticos.....	39
5.3 Determinación del efecto del extracto acuoso de <i>V. corymbosa</i> sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura.....	41
5.4 Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos inhibidores de α -glucosidasas.....	43
5.4.1 Piceina (42)	44
5.4.2 Prunasina (43)	45
5.4.3 (-)- <i>Epi</i> -catequina (44)	47

5.5 Evaluación del efecto de los compuestos aislados sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa de levadura.....	60
5.6 Cinética enzimática para la (-)- <i>epi</i> -catequina (44) y prunasina (43).....	61
5.7 Resultados de acoplamiento molecular de los compuestos 43 y 44	63
6. CONCLUSIONES.....	66
7. PERSPECTIVAS.....	68
8. REFERENCIAS.....	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medicamentos más utilizados en la terapia de la DM2.....	6
Tabla 2. Plantas medicinales selectas con actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas.	12
Tabla 3. Especies del género <i>Vauquelinia</i>	21
Tabla 4. Fraccionamiento de la fracción de AcOEt de <i>V. corymbosa</i>	34
Tabla 5. Toxicidad aguda de los extractos de <i>V. corymbosa</i>	39
Tabla 6. Resultados obtenidos en la inhibición de α -glucosidasa de levadura para las fracciones de la infusión.	43
Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y de RMN- ¹³ C para la piceina (42)	49
Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y de RMN- ¹³ C para la prunasina (43) . ..	54
Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y de RMN- ¹³ C para la (-)- <i>epi</i> -catequina (44)	57
Tabla 10. Resultados obtenidos en los ensayos sobre α -glucosidasas.	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. DM2: Representación de la resistencia a la insulina.....	2
Figura 2. Complicaciones reportadas por diabéticos.	4
Figura 3. Mecanismo de la hidrólisis de una α -glucosidasa de las familias GH13 y GH31.	8
Figura 4. Estructuras químicas de los inhibidores de α -glucosidasas más comunes usados en la terapéutica.....	10
Figura 5. Estructuras de algunos productos naturales precursores de fármacos inhibidores de la enzima α -glucosidasa.....	16
Figura 6. Metabolitos selectos inhibidores de la enzima α -glucosidasa.	17
Figura 7. <i>Vauquelinia corymbosa</i>	22
Figura 8. Metabolitos aislados de <i>V. corymbosa</i>	23
Figura 9. Preparación y fraccionamiento del extracto acuoso de la especie vegetal <i>V.</i> <i>corymbosa</i>	36
Figura 10. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de <i>V. corymbosa</i> en ratones normoglucémicos.....	40
Figura 11. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de <i>V. corymbosa</i> en ratones diabéticos.	41
Figura 12. Curva de inhibición enzimática del extracto acuoso de <i>V. corymbosa</i>	42
Figura 13. Metabolitos aislados de la fracción orgánica de la infusión de <i>V. corymbosa</i>	44
Figura 14. Análisis en CCD de los extractos de <i>V. corymbosa</i>	47
Figura 15. Curvas de Lineweaver-Burk del compuesto 44	62
Figura 16. Curvas de Lineweaver-Burk del compuesto 43	63
Figura 17. Resultados del acoplamiento molecular.....	65

INDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) para piceina (42)	52
Espectro 2. Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) para piceina (42)	53
Espectro 3. Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) para prunasina (43)	55
Espectro 4. Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) para prunasina (43)	56
Espectro 5. Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, piridina-d ₅) para (-)- <i>epi</i> -catequina (44)	58
Espectro 6. Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, piridina-d ₅) para (-)- <i>epi</i> -catequina (44)	59

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Amstrong
ABC	Área bajo la curva
AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grados centígrados
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
cm	Centímetros
dd	Doble de dobles
DL ₅₀	Dosis letal media
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EEM	Error estándar de la media
EM-FAB	Espectrometría de masas de bombardeo rápido de átomos
EM-IE	Espectrometría de masa de impacto electrónico
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
g	Gramos
GH	Glucosidasas hidrolasas
h	Horas
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
IR	Espectroscopia de infrarrojo
Kg	Kilogramo
K _{ic}	Constante de inhibición competitiva

K_{iu}	Constante de inhibición no competitiva
L	Litros
m	Multiplete
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Militro
mm	Milimolar
μm	Micromolar
MHz	Megahertz
m/z	Masa/carga
NA	Nicotinamida
OMS	Organización mundial de la salud
ppm	Partes por millón
<i>p</i> -NPG	α -D-glucopiranosido de 4-nitrofenilo
RMN- ^1H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN- ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono
s	Singlete
sa	Singlete ancho
STZ	Estreptozotopcina
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

1. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades sobre Diabetes Mellitus (DM).

La DM es un desorden metabólico que provoca una serie de trastornos crónico-degenerativos en los pacientes que la padecen. La enfermedad es de carácter heterogéneo y poligénica, aunque en su desarrollo participan también factores epigenéticos. Este padecimiento tiene como característica principal la hiperglucemia crónica a consecuencia del déficit en la producción o acción de la insulina, lo cual afecta directamente el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos (NOM-015-SSA2-2010).

Se conocen varios tipos de diabetes, pero los más comunes son la tipo 1 (DM1) y la tipo 2 (DM2). De estas dos, la de menor prevalencia es la DM1, que anteriormente se conocía como diabetes juvenil o insulino-dependiente. La DM1 es un desorden autoinmune que se caracteriza por la destrucción de las células beta del páncreas, y en consecuencia la producción de insulina es muy baja o nula; entonces su tratamiento requiere de la administración diaria de esta hormona. Los síntomas característicos son poliuria, polifagia, polidipsia y una disminución importante de peso (OMS-2012, NOM-015-SSA2-2010 y Amdiabetes.org).

A nivel global el 90% de los individuos con diabetes mellitus padecen la DM2, también llamada no-insulino-dependiente. Los pacientes que padecen DM2 son resistentes a la acción de la insulina y, además en muchos casos producen poca cantidad de la hormona. La falta de sensibilidad a la acción de la insulina principalmente por el tejido adiposo, músculo e hígado origina altos niveles de glucosa en sangre (**Figura 1**). Los factores que desencadenan la aparición de esta enfermedad son el sedentarismo, la mala alimentación, la obesidad y de manera importante, los elementos hereditarios. Los síntomas de la DM2 suelen ser similares a los de la DM1 pero menos intensos, e inclusive en muchos casos es asintomática, por lo tanto; el diagnóstico se hace muy

tarde, cuando ya han comenzado a aparecer las complicaciones de la enfermedad (OMS-2012, NOM-015-SSA2-2010 y Amdiabetes.org).

Las complicaciones de la DM2 aparecen por causa de la continua exposición a los altos niveles de glucosa en sangre que inclusive pueden ser tóxicos (glucotoxicidad). Las complicaciones más comunes son: el daño cardiovascular, desórdenes vasculares periféricos, neuropatía diabética, amputaciones sobre todo en extremidades inferiores, así como también falla renal y ceguera (Israili, 2011). La comorbilidad asociada a desórdenes cardiovasculares se presenta en un 47% de los individuos con DM. La disminución de la visión o la ceguera es también una complicación de alto impacto y se reporta en un 47.6 % de los individuos diagnosticados; en México la DM2 es la primera causa de ceguera adquirida (ENSANUT-2012). En la **Figura 2** se indican las principales complicaciones de la diabetes en México de acuerdo a la ENSANUT 2012.

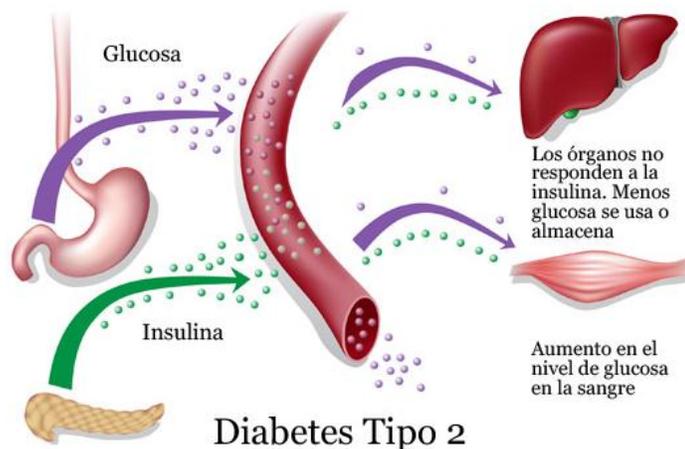


Figura 1. DM2: Representación de la resistencia a la insulina.

Imagen tomada de Amdiabetes.org.

Es importante mencionar que es posible retardar la aparición o detener la progresión de esta enfermedad y sus complicaciones mediante modificaciones en el estilo de vida de los enfermos o individuos susceptibles. Estas modificaciones van

dirigidas a alcanzar y mantener un peso corporal saludable, realizar actividades físicas al menos durante 30 minutos al día, consumir una dieta saludable con cantidades reducidas de azúcares y grasas, así como también evitar el consumo de tabaco (OMS-2012).

1.1.1 Panorama mundial y nacional de la DM.

La diabetes mellitus es un grave problema de salud a nivel mundial, y de hecho actualmente se considera como una epidemia. Según datos de la OMS actualmente existen en el mundo 347 millones de personas diagnosticadas con esta enfermedad, lo cual representa una problemática importante sobre todo por las complicaciones asociadas a este padecimiento; éstas tienen un gran impacto en la esperanza de vida de los pacientes, ya que ésta disminuye de 5 a 10 años. Se calcula que en el año 2004, 3.4 millones de personas murieron a causa de la hiperglucemia y/o sus complicaciones, y se estima que para el año 2030 este número se duplicará (OMS-2012).

La DM2 también tiene importantes implicaciones económicas, ya que las instituciones de salud y los pacientes necesitan altos montos de recursos para realizar un control adecuado, por esta razón la mayor parte de los decesos a causa de esta enfermedad se registra en los países de ingresos medios a bajos, con un 80 % de las muertes totales a nivel mundial (OMS-2012).

En México el panorama es muy similar, en los últimos años esta enfermedad ha ido en aumento y actualmente figura entre las principales causas de defunción a nivel nacional. La prevalencia es del 9.2 % de la población total, con 6.4 millones de mexicanos adultos diagnosticados: sin embargo, se calcula que el número de personas con DM en México sea del doble (ENSANUT-2012). Del total de casos diagnosticados con DM el 14.2%, que son un poco más de 900 mil personas, no han recibido atención médica lo que significa que no llevan un control adecuado de su enfermedad, retrasando la posible prevención de complicaciones asociadas (ENSANUT-2012).

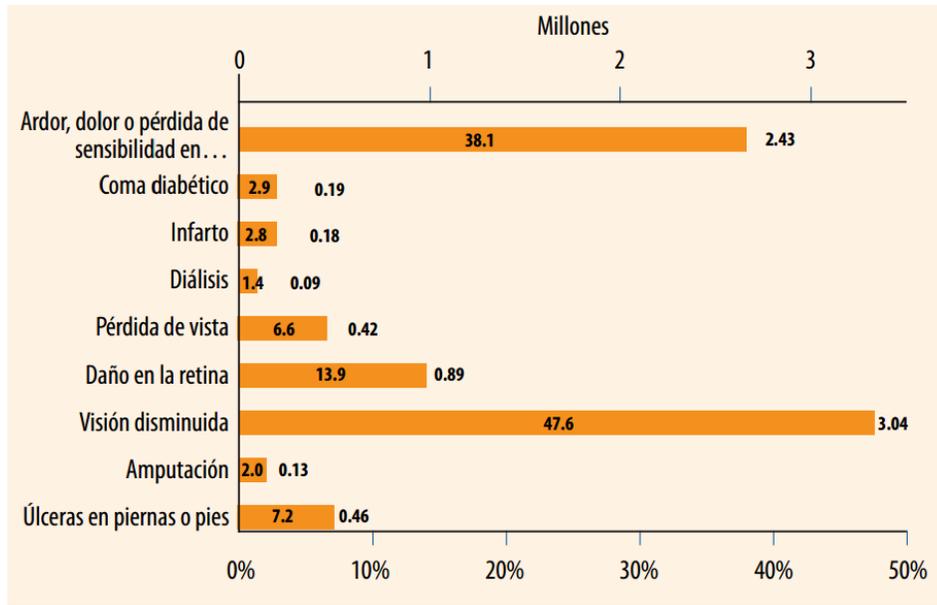


Figura 2. Complicaciones reportadas por diabéticos.

México, ENSANUT 2012.

Por lo tanto es de suma importancia realizar acciones preventivas para evitar la aparición de la enfermedad o bien para retrasar las complicaciones asociadas. Esto es posible llevando un estilo de vida saludable, pero también necesario hacer un diagnóstico oportuno así como seguir una terapia farmacológica que permita el adecuado control de la hiperglucemia y que evite la aparición de complicaciones o efectos adversos.

1.1.2 Tratamiento de la Diabetes Mellitus.

Los tratamientos empleados para controlar este desorden están encaminados a disminuir los niveles de glucosa en sangre y mantenerlos dentro de los parámetros normales, así como también mantener el control metabólico, aliviar los síntomas, prevenir complicaciones agudas o crónicas (desórdenes microvasculares y/o neuropáticos), mejorar la calidad de vida y disminuir la tasa de mortalidad a causa de este padecimiento (Israili, 2011 y NOM-015-SSA2-2010).

Existen diversas terapias farmacológicas que combinadas con el control del peso corporal y actividad física regular, aportan resultados eficaces en el control de este padecimiento. Las terapias utilizadas actualmente para el control de la hiperglucemia se pueden clasificar en tres grandes grupos principales según la respuesta fisiológica por la cual controlan la hiperglucemia (Israili, 2011):

1. Fármacos que aumentan la insulina en sangre. Son agentes orales que promuevan la secreción de insulina; se llaman comúnmente secretagogos (Ej. Las sulfonilureas). Alternativamente se puede administrar insulina.
2. Fármacos sensibilizadores de la insulina. Estos aumentan la sensibilidad a la insulina en sus órganos blanco (Ej. biguanidas y tiazolidinedionas), es decir favorecen la acción de la insulina en músculo, tejido adiposo e hígado.
3. Fármacos inhibidores de α -glucosidasas. Estos disminuyen la absorción intestinal de carbohidratos mediante la inhibición de las enzimas α -glucosidasas (Ej. acarbosa). Este tipo de fármacos son de particular interés para el presente trabajo y posteriormente se discutirán con mayor detalle.

En la **Tabla 1** se resumen los mecanismos y sitios de acción de los principales agentes terapéuticos usados actualmente para el tratamiento clínico de la diabetes. Frecuentemente, estos fármacos son empleados en combinación con la finalidad de mejorar la eficacia de los tratamientos debido a la sinergia entre ellos.

A pesar de la gran variedad de terapias existentes, la comunidad farmacéutica continúa buscando nuevos agentes que permitan tener un mejor control de la hiperglucemia y sus complicaciones crónicas, con la finalidad de mejorar la calidad de vida y disminuir las tasas de mortalidad a razón de este padecimiento.

Tabla 1. Medicamentos más utilizados en la terapia de la DM2

Tipo de Agente	Ejemplo	Sitio de acción	Mecanismo de acción
Sulfonilureas	Glibenclamida	Páncreas	Aumentan la secreción de insulina endógena por el páncreas
Meglitinidas	Repaglinida	Páncreas	Aumentan la secreción de insulina y aportan un mejor control de la glucemia
Biguanidas	Metformina	Hígado	Aumentan la sensibilidad a la insulina e inhiben la gluconeogenesis
Tiazolidinedionas	Pioglitazona Rosiglitazona	Músculo	Aumentan la sensibilidad a la insulina y mejoran el aprovechamiento de glucosa en sangre
Inhibidores de α-Glucosidasas	Acarbosa	Intestino	Evitan o disminuye la absorción de glucosa en el intestino delgado
Análogos de las incretinas	Exenatida (agonista del receptor GLP-1)	Intestino y páncreas	Controlan la liberación de insulina y glucagón por el páncreas en respuesta a los alimentos

1.2 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas como agentes potenciales antidiabéticos.

Como ya se mencionó en el punto 2.1.2 estos agentes se utilizan en la terapéutica de la diabetes porque pueden disminuir la absorción de los carbohidratos provenientes de la dieta, y esto lo logran inhibiendo la actividad de las enzimas α -glucosidasas (EC 3.2.1.20) intestinales que son glucosidasas hidrolasas.

Las enzimas glucosidasas hidrolasas (GH) son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos de carbohidratos complejos como oligosacáridos y polisacáridos, pero también de glicoconjugados. Como resultado de la ruptura del enlace glicosídico se liberan residuos de monómeros de azúcares en forma de hemiacetal y cuando se hidrolizan glicoconjugados se liberan sus correspondientes agliconas. Este tipo de enzimas también puede romper enlaces O-, N- y S-glicosídicos. En esta familia hay enzimas que pueden hidrolizar enlaces α y β y son del tipo glucotransferasas, manosidasas, y galactosidasas, entre otras (Borges de Melo, 2006).

Las α -glucosidasas se encuentran en el contorno del intestino delgado, lugar donde se realiza el último paso de la digestión de los carbohidratos. Estas enzimas hidrolizan oligosacáridos que poseen α -D-glucosa terminal no reductora con enlaces 1 \rightarrow 4-glicosídicos y liberan α -D-glucosa, y con menor afinidad también hidrolizan polisacáridos con enlaces 1 \rightarrow 6 (Borges de Melo, 2006). Estas enzimas pertenecen a varias familias, pero para el presente trabajo las de interés son las enzimas EC 3.2.1.20 de las familias GH 13 y GH 31.

La liberación de α -D-glucosa en el intestino delgado es de vital importancia para continuar con el metabolismo de los carbohidratos. La actividad de estas enzimas intestinales es muy importante para diversos procesos bioquímicos tales como el metabolismo lisosomal de glicoconjugados, el procesamiento de glicoproteínas, así como también la biosíntesis de glicolípidos y glicoproteínas (Moorthy, *et. al.*, 2012).

Existe cierta especificidad de reacción entre las diferentes familias, en el caso de las enzimas de las familias GH13 y GH31 la reacción procede con retención de la configuración del carbono anomérico. Para que la reacción ocurra se necesita de una sustancia con propiedades ácido-base y es asistida por una sustancia nucleofílica, que generalmente es glutamato o aspartato. El mecanismo de reacción (**Figura 3**) de hidrólisis con retención de la configuración neta se lleva a cabo en dos pasos (Chiba, 1997).

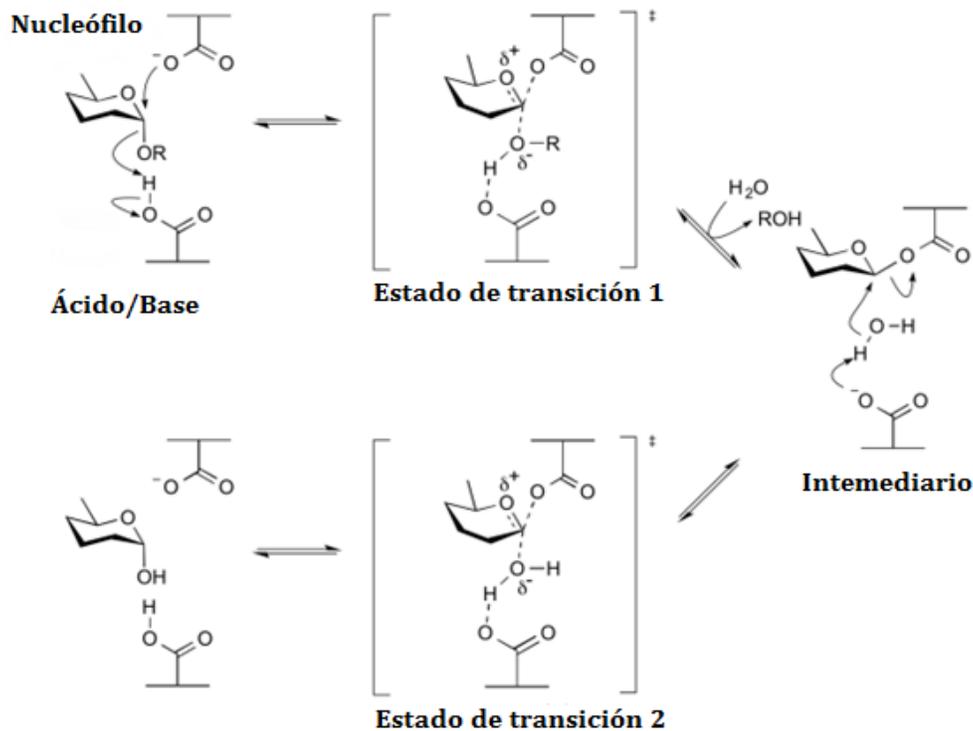


Figura 3. Mecanismo de la hidrólisis de una α -glucosidasa de las familias GH13 y GH31. Imagen tomada de Carbohydrate-active enzymes. (http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolases)

El mecanismo de esta reacción fue propuesto por primera vez por el bioquímico Dan Koshland. En el primer paso de reacción, también llamado la etapa de glicosilación, uno de los nucleófilos ataca el centro anomérico desplazando a la aglicona, al mismo tiempo un ácido cataliza la protonación del oxígeno del enlace glicosídico para formar un intermediario glicosil-enzima. Posteriormente, en el segundo paso, el de la desglicosilación, el intermediario se hidroliza con una molécula de agua; finalmente,

una base cataliza la desprotonación de la molécula de agua, con esto se libera entonces el residuo de azúcar con retención de la configuración en el carbono anomérico (Chiba, 1997).

1.2.2 Inhibidores de las α -glucosidasas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

El uso de fármacos que inhiben la actividad de las α -glucosidasas es útil para retrasar la liberación de glucosa proveniente de la dieta y por ende su absorción a nivel intestinal. En consecuencia se produce una disminución importante del pico postprandial de glucosa en sangre. Éstos fármacos también ofrecen la posibilidad de detener la progresión de esta enfermedad y pueden ser usados para el tratamiento de condiciones prediabéticas (Moorthy, *et. al.*, 2012).

Se han realizado estudios para determinar la relación estructura actividad de estos compuestos y se ha encontrado que todos aquellos que logran inhibir la actividad enzimática tienen características comunes entre sí como son: estructuras similares a azúcares, la capacidad de formar enlaces iónicos con catalizadores de carácter nucleofílico, la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con catalizadores ácidos, la capacidad de tener interacciones iónicas o hidrofóbicas y poder formar enlaces covalentes con enzimas mediante grupos epoxi o aziridina (Moorthy, *et. al.*, 2012).

Los fármacos inhibidores de las α -glucosidasas más conocidos y usados en la terapéutica son la acarbosa **(1)**, el miglitol **(2)** y voglibosa **(3)**, la estructura química de estos compuestos se muestra en la **Figura 4**.

La acarbosa **(1)** es el primer fármaco de este tipo, en 1977 se obtuvo de un extracto de la levadura *Actinoplanes* cepa SE 50, también en este año Schmidt y colaboradores demostraron la eficacia de este fármaco en la inhibición de la enzima intestinal de cerdo ($CI_{50} = 0.5 \mu M$). Puls y colaboradores observaron que en voluntarios sanos la administración de este fármaco reducía la glucemia postprandial e incrementaba la secreción de insulina. Pero no fue hasta el año 1990 en Alemania

cuando comenzó a usarse como agente antidiabético y se introdujo al mercado con el nombre de Glucobay, posteriormente en 1996 se introdujo en el mercado norteamericano con el nombre de Precose (Asano, 2003).

El miglitol (**2**) es un análogo sintético de un producto natural llamado nojirimicina (**4**), que fue aprobado en 1996 por la FDA como agente terapéutico y entró al mercado con el nombre de Glycet. A diferencia de la acarbosa, el miglitol se absorbe en mayor cantidad lo que ofrece efectos a nivel sistémico además de los efectos a nivel del intestino delgado. El fármaco puede utilizarse solo o en combinación con sulfonilureas, metformina o insulina (Asano, 2003; Israili, 2011).

La voglibosa (**3**) también es un derivado de un compuesto de origen natural conocido como valiolamina (**6**). Después de demostrar su eficacia como agente oral antidiabético fue incorporado al mercado en 1994 en Japón con el nombre de Basen (Asano, 2003).

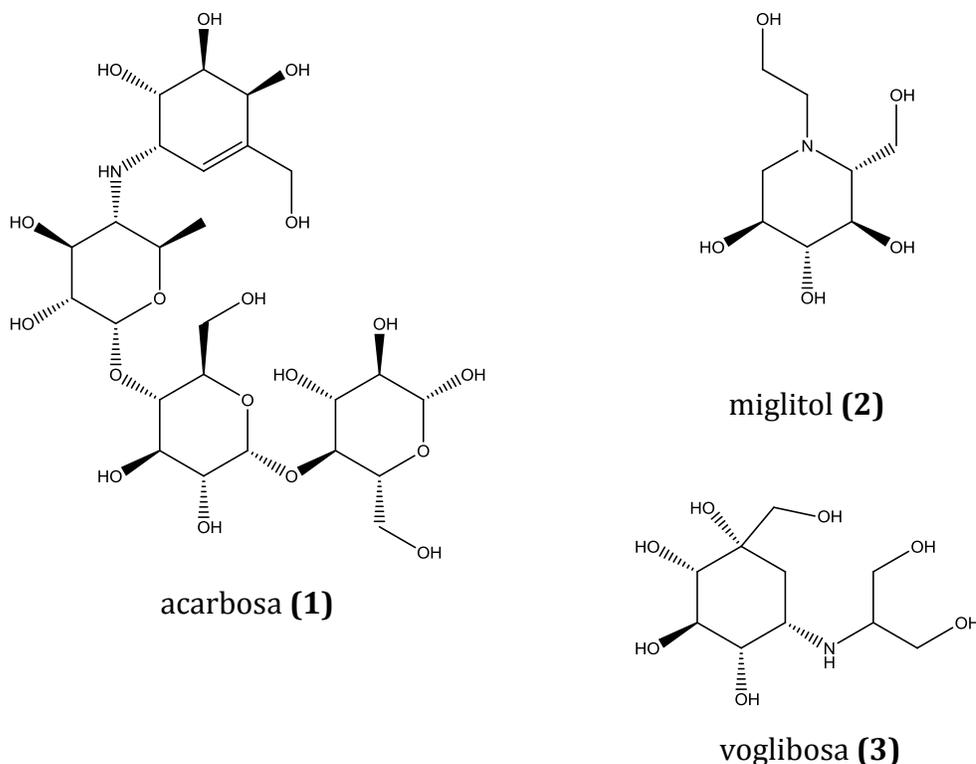


Figura 4. Estructuras químicas de los inhibidores de α -glucosidasas más comunes usados en la terapéutica.

Desafortunadamente estos fármacos producen efectos secundarios no deseables en el tracto gastrointestinal relacionados con el paso de carbohidratos complejos a otras zonas del intestino delgado y colon en donde son degradados por bacterias de la flora normal, y en consecuencia se pueden originar flatulencias, diarrea, dolor y distensión abdominal (Israili, 2011).

1.2.3 Plantas medicinales con actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas.

Debido a la alta incidencia de la DM2 en México y al apego de la población a usar remedios herbolarios con la finalidad de tener tratamientos más seguros y asequibles, una gran parte de la población utiliza plantas medicinales para tratar la diabetes, dejando a un lado los tratamientos alopáticos convencionales (Mata, *et. al.*, 2013).

Datos etnomédicos y etnofarmacológicos sugieren que a nivel mundial el uso de plantas medicinales para el tratamiento de la diabetes es de suma importancia, y se calcula que las plantas utilizadas con este fin son aproximadamente de 800 a 1200 especies; algunas de éstas ya han sido sujeto de estudio mediante modelos farmacológicos en animales y estudios clínicos en humanos (Israili, 2011).

En México se emplea una gran variedad de especies vegetales pertenecientes a diversas familias, para tratar la diabetes, sin embargo; de todas solo 38 especies han sido analizadas para establecer su potencial como agentes inhibidores de las α -glucosidasas (Mata, *et. al.*, 2013). Las especies más estudiadas o de mayor importancia como agentes antidiabéticos pertenecen a las familias Annonaceae, Apiaceae, Asteraceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Myrtaceae y Urticaceae, aunque especies de la familia Rosaceae pertenecientes a los géneros *Prunus* y *Crataegus* también son altamente apreciados. En la **Tabla 2** se resumen las especies vegetales pertenecientes a dichas familias.

Tabla 2. Plantas medicinales selectas con actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas.

Familia	Especie (Droga)	Extracto	Fuente de la enzima	CI ₅₀ o % Inhibición
Annonaceae	<i>Annona squamosa</i> L. (raíces)	Extracto hidroalcohólico	Extracto homogenado de intestino de rata	22.3 ± 1.6 %
	<i>Malmea depressa</i> (Baill) R.E Fr. (raíces y hojas)	Extracto de butanólico	Levadura baker's	21.0 µg/mL
Apiaceae	<i>Ligusticum porteri</i> J.M. Coult. & Rose (rizomas)		Levadura baker's	
	<i>Cuminum cyminum</i> L. (semillas)	Extracto acuoso	Levadura baker's Extracto homogenado de intestino de rata	40.0 ± 2.0 % 24.0 ± 0.13 mg/mL
Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i> L. (partes aéreas)	Extracto hidroalcohólico	Extracto homogenado de intestino de rata	52.3 ± 4.1 %
	<i>Artemisia absinthium</i> L. (partes aéreas)	Extracto hidroalcohólico	Extracto homogenado de intestino de rata	67.7 ± 3.7 %

Tabla 2. Plantas medicinales selectas con actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas (Continuación).

Familia	Especie (Droga)	Extracto	Fuente de la enzima	CI ₅₀ o % Inhibición
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i> L. (partes aéreas)	Extracto hidroalcohólico	Extracto homogenado de intestino de rata	41.8 ± 1.7 %
	<i>Brickellia cavanillesii</i> (Cass.) A. Gray (partes aéreas)	Extracto acuoso	Levadura baker's	0.169 mg/kg
	<i>Calea ternifolia</i> Kunth (partes aéreas)	Extracto hidroalcohólico	Extracto homogenado de intestino de rata	61.1 ± 1.7 %
	<i>Iostephane heterophylla</i> (Cav.) Benth. (partes aéreas)	Extracto hidroalcohólico	Extracto homogenado de intestino de rata	60.6 ± 1.5 %
	<i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg. (toda la planta)	Extracto acuoso	Levadura baker's	2.3 mg /mL
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L. (hojas y frutos)	Extracto metanólico	Levadura baker's	12.75 ± 2.65 μ g/mL

Tabla 2. Plantas medicinales selectas con actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas (Continuación).

Familia	Especie (Droga)	Extracto	Fuente de la enzima	CI ₅₀ o % Inhibición
Fabaceae	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd. (semillas)	Extracto hidroalcohólico	Levadura baker's	21.0 ± 3.1 %
		Extracto hexánico		29.0 ± 14.51 %
		Extracto de diclorometano		33.11 ± 9.61 %
		Extracto etanólico		77.52 ± 8.33 %
	<i>Leptolobium panamense</i> (Benth.)Sch. Rodr. & A.M.G. Azevedo (corteza)	Extracto butanólico	Levadura baker's	109.0 µg/mL
	<i>Tamarindus indica</i> L. (frutos)	Extracto hidroalcohólico	Extracto homogenado de intestino de rata	30.1 ± 2.2 %
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i> L. (hojas y frutos)	Extracto hidroalcohólico	Extracto homogenado de intestino de rata	33.6 ± 3.0%
		Extracto hidroalcohólico	Extracto homogenado de intestino de rata	39.5 ± 3.0 %
	<i>Psidium guajava</i> L. (hojas)	Extracto acuoso	Extracto homogenado de intestino de rata	60.8 ± 2.1 µg/mL

Tabla 2. Plantas medicinales selectas con actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas (Continuación).

Familia	Especie (Droga)	Extracto	Fuente de la enzima	CI ₅₀ o % Inhibición
Urticaceae	<i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol. (hojas)	Extracto butanólico	Levadura baker's	14.0 μ g/mL
	<i>Urtica dioica</i> L. (hojas)	Extracto acuoso	Levadura baker's	3.7 mg/mL
Rosaceae	<i>Crataegus mexicana</i> DC. (raíces, hojas y ramas)	Extracto hidroalcohólico	Extracto homogenado de intestino de rata	38.6 \pm 1.6 %
	<i>Prunus serotina</i> Ehrh. (frutos)	Extracto hidroalcohólico	Intestino de rata	60.0 \pm 5.0 %

*Tabla modificada de Mata, *et. al.*, 2013.

1.2.4 Inhibidores de α -glucosidasas de origen natural.

Los estudios farmacológicos de diversas plantas medicinales antidiabéticas o de algunas otras fuentes naturales han conducido al descubrimiento de una gran variedad de moléculas potencialmente activas. El descubrimiento de estos compuestos ha sido de vital importancia, ya que algunos de ellos han servido como precursores para la obtención de fármacos muy efectivos usados en la terapéutica actual. En la **Figura 5**, se muestran los ejemplos más importantes.

El miglitol (**2**) y la voglibosa (**3**) se desarrollaron a partir de productos naturales. En 1966 se descubrió el primer compuesto análogo de la glucosa inhibidor de las α -glucosidasas, la nojirimicina (**4**); Este compuesto es producido por *Streptomyces*

roseochromogenes cepa R-468 y *S. lavendulae* cepa SF-425. La nojirimicina (**4**) es susceptible a diversas modificaciones químicas sobre el grupo hidroxilo del C-1, y gracias a varias modificaciones se logró obtener un derivado llamado 1-desoxinojirimicina (**5**), que posteriormente se aisló de las raíces de los árboles de morera y varias especies de *Bacillus* y *Streptomyces*. Al hacer pruebas *in vivo* de este compuesto se observó que su actividad inhibitoria de α -glucosidasas era moderada, entonces, tras varias modificaciones del compuesto **5**, se logró desarrollar el miglitol (**2**) como fármaco de elección para el tratamiento de la diabetes (Asano, 2003).

De igual forma el descubrimiento de la voglibosa (**3**) se hizo a partir de compuestos de actinomicetos. En 1984 se descubrió que el organismo *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* es productor de la valiolumina (**6**), un potente inhibidor de enzimas glucosidasas intestinales de cerdo. Tras hacer diversos derivados sintéticos N-sustituidos se descubrió a la voglibosa (**3**), que se obtuvo mediante una aminación reductiva del compuesto (**6**) (Asano, 2003).

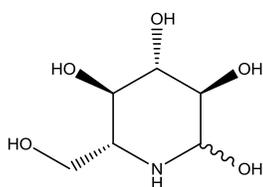
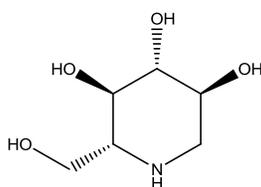
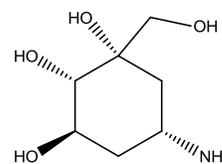
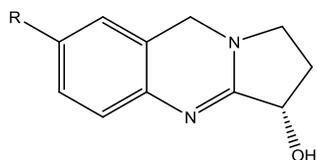
Nojirimicina (**4**)1-Desoxinojirimicina (**5**)Valiolamina (**6**)

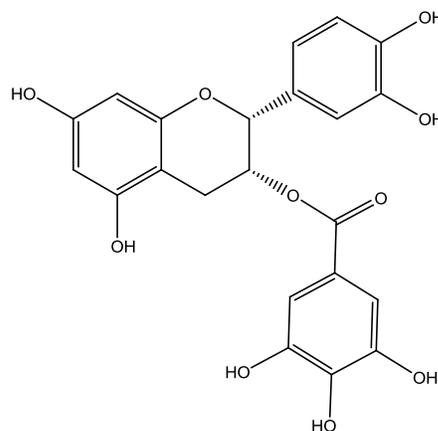
Figura 5. Estructuras de algunos productos naturales precursores de fármacos inhibidores de la enzima α -glucosidasa.

Es evidente que la investigación farmacológica de compuestos naturales es muy importante porque puede conducir al descubrimiento de fármacos más efectivos, por esta razón la comunidad farmacéutica ha hecho un gran trabajo buscando nuevos inhibidores de α -glucosidasas, y como resultado de este trabajo se han logrado identificar a un gran número de compuestos naturales potencialmente activos contra estas enzimas. Los compuestos activos encontrados son de naturaleza química muy

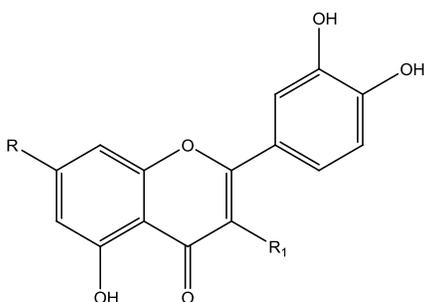
variada, entre ellos destacan flavonoides, alcaloides, triterpenoides, antocianidinas, compuestos glicosídicos y compuestos fenólicos, entre otros (Benalla, *et. al.*, 2010). En la **Figura 6**, se muestran ejemplos de algunos metabolitos de origen natural inhibidores de las α -glucosidasas (Borges de Melo, *et. al.*, 2006; Kang, *et. al.*, 2012; Kumar, *et. al.*, 2011; Mohamed, *et. al.*, 2009 y Mata, *et. al.*, 2013).



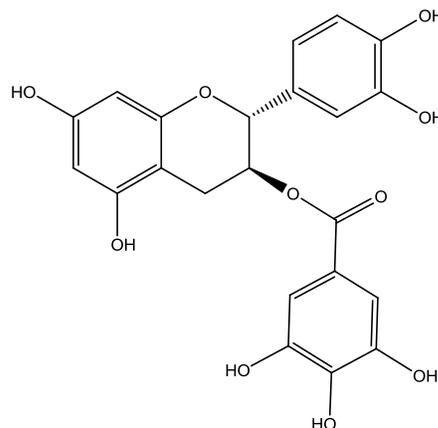
Vacisina (**7**) R=H $CI_{50}=125\mu M$
 Vacisicinol (**8**) R=OH $CI_{50}=250\mu M$
Adhatoda vasica (Acanthaceae)



(-)-3-O-Galoilepicatequina (**9**)
 $CI_{50}=560\mu M$
Bergenia ciliate (Saxifragaceae)

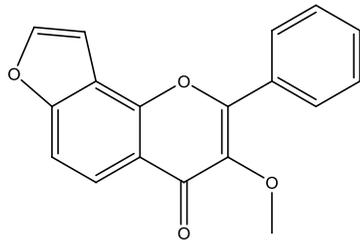


Isoquercitrina (**10**) R=OH, R₁=O- β -D-glu $CI_{50}=240\mu M$
 Glucoluteolina (**11**) R= β -D-glu, R₁=H $CI_{50}\geq 1000\mu M$
 Luteolina (**12**) R=H, R₁=H $CI_{50}=13,07\mu M$
Commelina communis (Commelinaceae)
Crataegus oxyacantha (Rosaceae)

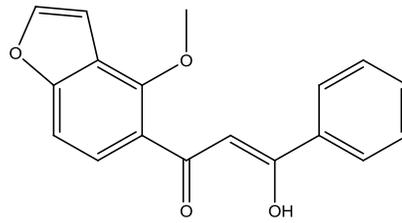


(-)-3-O-Galoilcatequina (**13**)
 $CI_{50}=297\mu M$
Bergenia ciliate (Saxifragaceae)

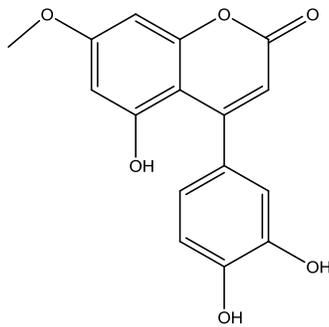
Figura 6. Metabolitos selectos inhibidores de la enzima α -glucosidasa.



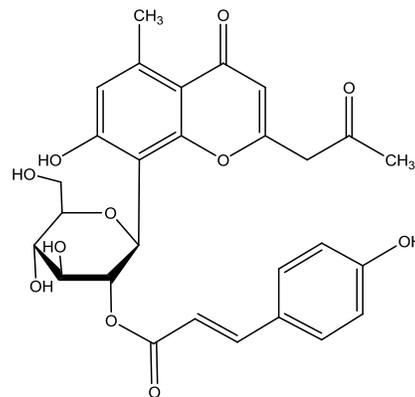
Kiranjina (**14**) $CI_{50}=26.3 \mu M$
Derris indica (Fabaceae)



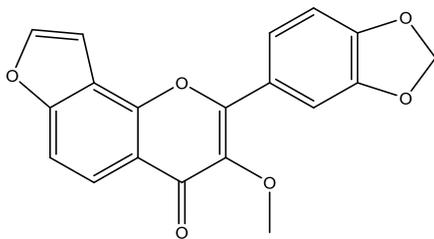
Pongamol (**15**) $CI_{50}=58.2 \mu M$
Derris indica (Fabaceae)



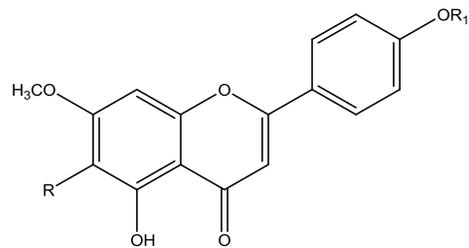
7-Metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**16**) $CI_{50}=62 \mu M$
Hintonia latiflora (Rubiaceae)



Aloesina A (**17**) $CI_{50}=11.9 \text{ mM}$
Chinese aloe (Asphodelaceae)

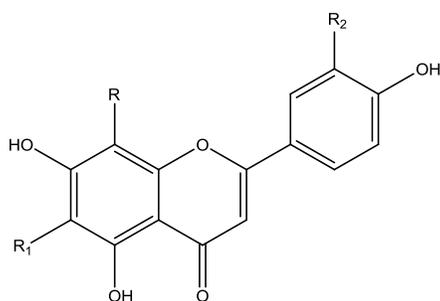


Pongapina (**18**) $CI_{50}=21.4 \mu M$
Derris indica (Fabaceae)



Swertisina (**19**) $R=\text{Glu}$, $R_1=\text{H}$
 $CI_{50}=370 \mu M$
Flavoccommelina (**20**) $R=\text{H}$, $R_1=\text{Glu}$
 $CI_{50} \geq 1000 \mu M$
Commelina communis (Commelinaceae)

Figura 6. Metabolitos selectos inhibidores de la enzima α -glucosidasa (Continuación).



Vitexina (**21**) R=Glu, R₁=H, R₂=H
CI₅₀=25.11 μM

Orientina (**22**) R= Glu, R₁=H, R₂=OH
CI₅₀=23.30 μM

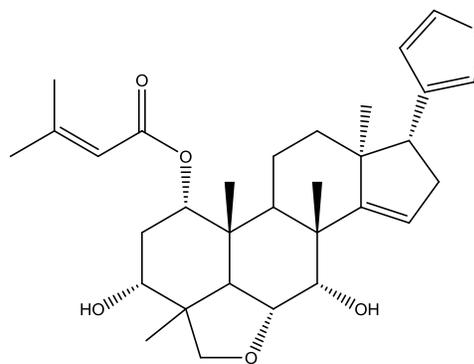
Isovitexina (**23**) R=H, R₁=Glu, R₂=H
CI₅₀=23.26 μM

Isoorientina (**24**) R=H, R₁=Glu, R₂=OH
CI₅₀=19.68 μM

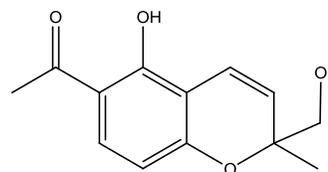
Apigenina (**25**) R=H, R₁=H, R₂=H
CI₅₀=21.85 μM

Commelina communis
(Commelinaceae)

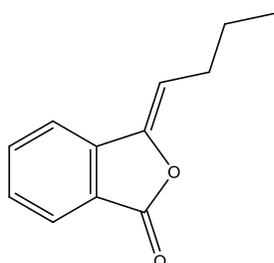
Crataegus oxyacantha (Rosaceae)



Meliacinolina (**26**) CI₅₀=2.35 mM
Azadirachta indica (Meliaceae)

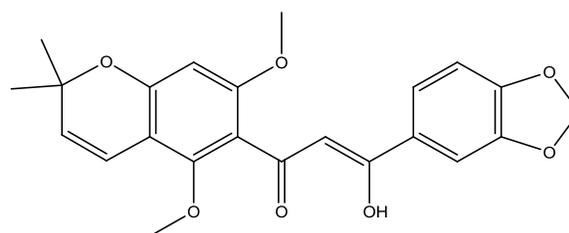


6-Hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (**27**) CI₅₀=0.42 mM
Brickellia cavanillesii (Asteraceae)



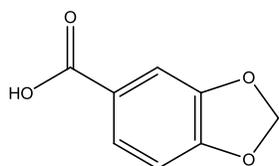
(Z)-3-Butildeneftalida (**28**)
CI₅₀=2.35 mM

Ligusticum porteri (Apiaceae)



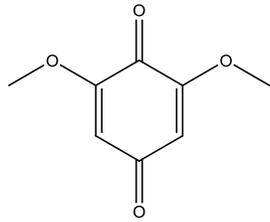
Ponganona B (**29**) CI₅₀=1.2 μM

Derris indica (Fabaceae)

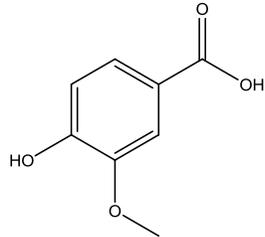


Ácido piperonílico (**30**) CI₅₀=18.4 μM
Derris indica (Fabaceae)

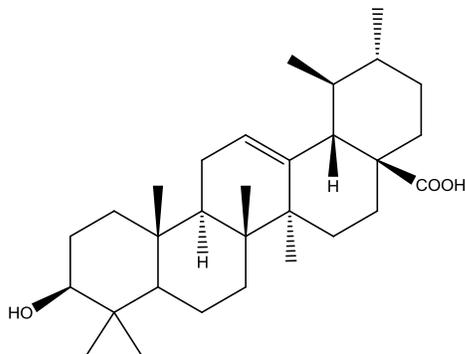
Figura 6. Metabolitos selectos inhibidores de la enzima α-glucosidasa (Continuación).



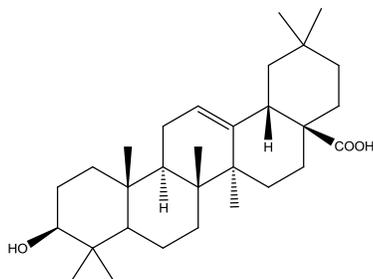
2,4-dimetoxi-1,4-benzoquinona (**31**)
 $CI_{50}=900 \mu\text{M}$
Fagara tessmenii (Rutaceae)



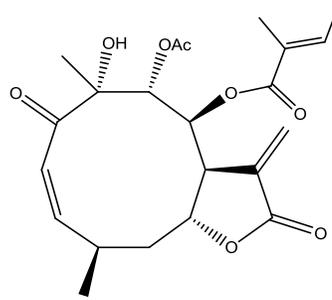
Ácido vainílico (**33**) $CI_{50}=69.4 \mu\text{M}$
Fagara tessmenii (Rutaceae)



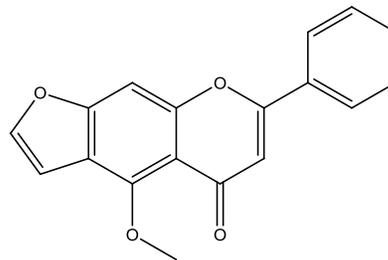
Ácido ursólico (**35**) $CI_{50}=12.5 \mu\text{M}$
Luculia pinceana (Rutaceae)



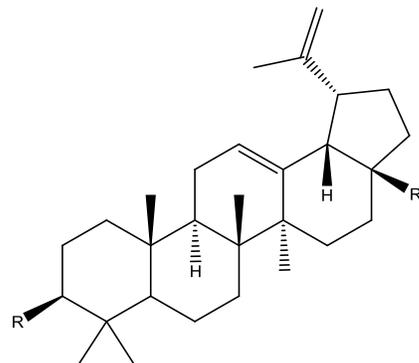
Ácido oleanoico (**39**) $CI_{50}=3.3 \mu\text{M}$
Luculia pinceana (Rutaceae)



Caleína C (**32**) $CI_{50}=0.28 \text{ mM}$
Brickellia cavanillesii (Asteraceae)



Pinnatina (**34**) $CI_{50}=56.5 \mu\text{M}$
Derris indica (Fabaceae)



Lupeol (**36**) $R=\text{OH}$, $R_1=\text{CH}_3$
 $CI_{50}=2.0 \mu\text{M}$

Betulina (**37**) $R=\text{OH}$, $R_1=\text{CH}_2\text{OH}$
 $CI_{50}=460 \mu\text{M}$

Lupenona (**38**) $R=\text{O}$, $R_1=\text{CH}_3$
 $CI_{50}=62.4 \mu\text{M}$

Diospyros mespiliformis (Ebenaceae)

Figura 6. Metabolitos selectos inhibidores de la enzima α -glucosidasa (Continuación).

1.3 Género *Vauquelinia*.

Vauquelinia es un género formado por once especies pertenecientes a la familia de las rosáceas (**Tabla 3**). Las especies de *Vauquelinia* se localizan en algunos estados de México y Estados Unidos. Este género fue descrito por Curt Polycarp Joachim quien lo nombró en honor al químico francés Louis Nicolas Vauquelin (Tropicos.org).

Tabla 3. Especies del género *Vauquelinia*.

Género	Especies
<i>Vauquelinia</i>	<i>Vauquelinia angustifolia</i> Rydb.
	<i>Vauquelinia australis</i> Standl.
	<i>Vauquelinia californica</i> (Torr.) Sarg.
	<i>Vauquelinia corymbosa</i> Bonlp.
	<i>Vauquelinia heterodon</i> I.M. Johnst.
	<i>Vauquelinia karwinskyi</i> Maxim.
	<i>Vauquelinia latiflora</i> Standl.
	<i>Vauquelinia pauciflora</i> Standl.
	<i>Vauquelinia potosina</i> Painter ex Standl.
	<i>Vauquelinia retherfordii</i> I.M. Johnst.
	<i>Vauquelinia torreyi</i> S. Watson.

*Tabla tomada de Tropicos.org

1.3.1 *Vauquelinia corymbosa* Bonlp.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Género: *Vauquelinia*

Especie: *Vauquelinia corymbosa*

Vauquelinia corymbosa es una especie calcifílica que habita frecuentemente en matorrales xerófilos y en bosques de Querétaro, Guanajuato e Hidalgo; también habita algunas zonas de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas (Rzedowshi, *et. al.*,

2005). Popularmente se designa con los nombres de palo alto, laurel, serrucho y lamprisco o lantrisco (Rzedowshi, *et. al.*, 2005 y Tropicos.org).

No se cuentan con registros sobre su uso como planta medicinal, pero según una investigación realizada por el Dr. Robert Bye, en la localidad de San Borja en el estado de Chihuahua, recientemente la población utiliza la especie como agua de uso con la finalidad de tratar la diabetes.

1.3.1.1 Descripción macroscópica de *V. corymbosa*.

Es un árbol o arbusto de copa redondeada, tiene ramas jóvenes tomentulosas; peciolo de 2.5-5.5 cm de largo, lámina foliar oblongo-lanceolada o angostamente lanceolada elíptica, oblonga o anchamente ovalada, de 6-10 cm de largo margen agudamente serrado, a veces doblemente serrado, con 6 a 10 dientes por 5 cm de textura coriácea. Es un taxón muy variable en cuanto a la forma y tamaño de las hojas. En la **Figura 7**, se muestra detalladamente la descripción macroscópica de la planta. (Rzedowshi, *et. al.*, 2005).

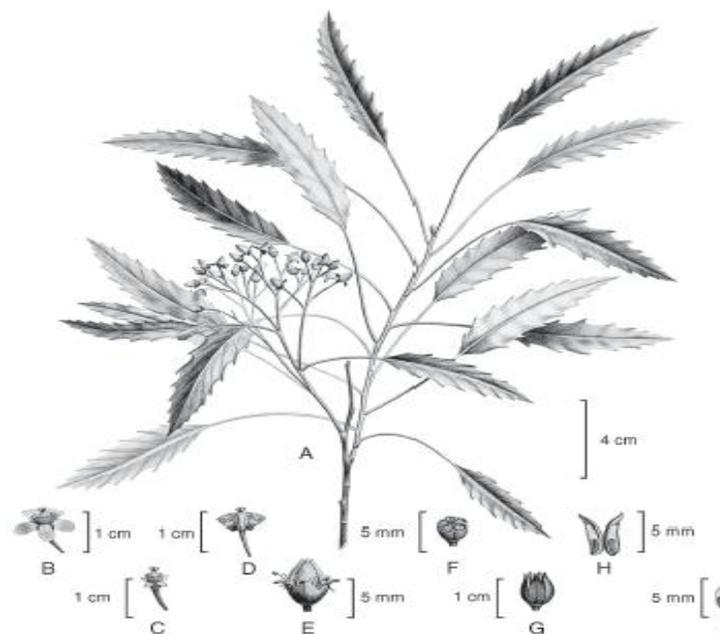


Figura 7. *Vauquelinia corymbosa*. A. Rama con hojas, flores y frutos jóvenes; B. flor; C. flor desprovista de pétalos; D. androceo y gineceo; E. fruto joven; F. corte transversal de un fruto; G. fruto dehiscencia; H. valvas del fruto; I. semilla. Imagen tomada de Rzedowski, *et. al.*, 2005.

1.3.1.2 Estudios químicos y farmacológicos de *V. corymbosa*.

Hasta la fecha sólo se cuenta con un reporte sobre la investigación química y farmacológica de esta especie. Tras el estudio químico de un extracto de alcohol etílico obtenido a partir de las partes aéreas de la planta, Trumbull y colaboradores (1975), lograron aislar e identificar tres triterpenoides pentacíclicos; sus estructuras se muestran en la **Figura 8**.

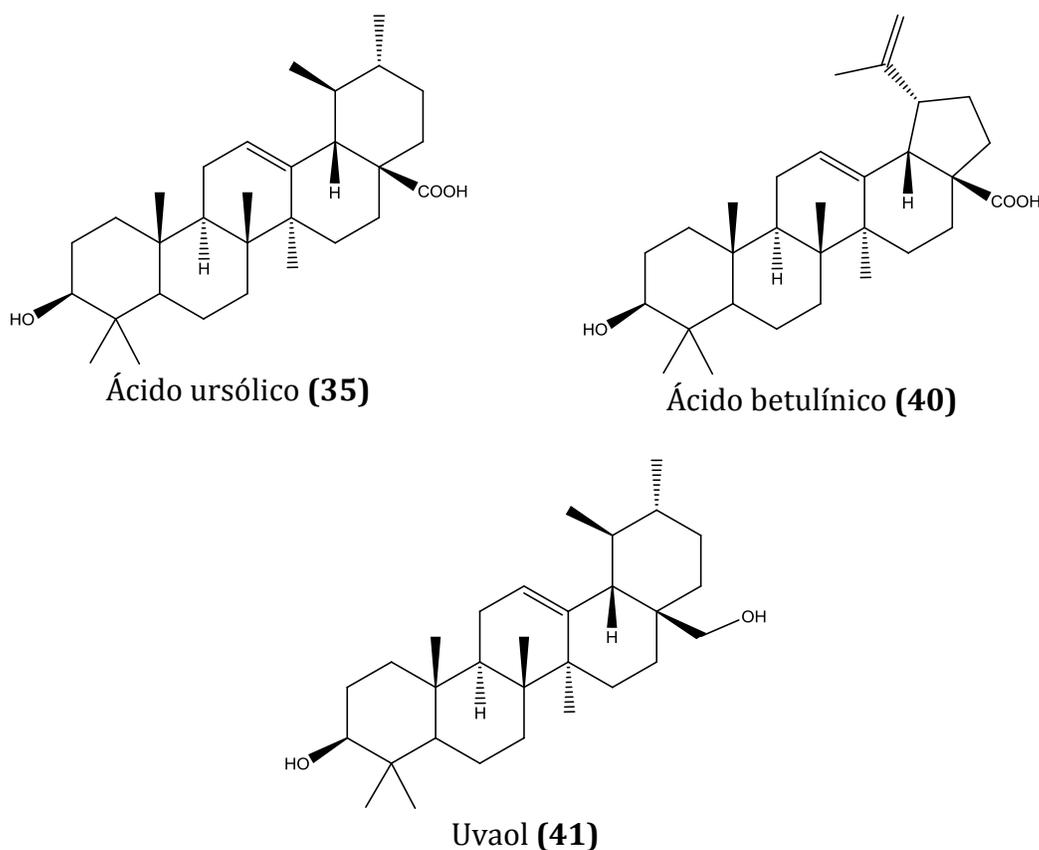


Figura 8. Metabolitos aislados de *V. corymbosa*.

En el mismo estudio se evaluó la actividad antitumoral de esta especie y de los metabolitos aislados. La actividad se evaluó con un modelo de leucemia basado en la inhibición de los linfocitos P-388. El extracto de cloroformo mostró actividad citotóxica sobre estas células, así también los tres metabolitos evaluados fueron activos (Trumbull, *et. al.*, 1975).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En México, desde tiempos inmemoriales, el uso de la medicina tradicional ha jugado un papel muy importante en el tratamiento de diversas enfermedades, y principalmente en las comunidades indígenas existe la tradición del uso de plantas medicinales con fines curativos. Recientemente, se ha retomado el uso de las plantas medicinales, entre otras cosas, por la creencia de que lo natural es sinónimo de inocuo. Paralelamente a esto; en México, en las últimas dos décadas ha aumentado considerablemente el número de personas diagnosticadas con DM2, que como se indicó anteriormente es la segunda causa de mortalidad en el país. Estos factores han provocado la reciente aparición de tratamientos basados en el uso de numerosas plantas medicinales con la finalidad de controlar la DM2, sin embargo, los estudios sobre la seguridad y eficacia de estas plantas es limitado. De allí la necesidad de investigar multidisciplinariamente estas especies vegetales, con la finalidad de establecer las bases científicas que sustenten su uso racional.

De esta manera, el presente trabajo tiene como objetivos primordiales: (i) Establecer el potencial antihiper glucémico y/o hipoglucemiante de la especie vegetal *Vauquelinia corymbosa* con la finalidad de generar la información científica que justifique su uso para el tratamiento de la diabetes en las prácticas médicas populares; (ii) Iniciar el estudio químico con la finalidad de establecer la naturaleza de sus principios activos.

Los objetivos particulares contemplados para el desarrollo del proyecto son los siguientes:

- Determinar la toxicidad aguda en ratones, de varios preparados obtenidos a partir de la droga cruda, de acuerdo al modelo descrito por Lorke.

- Determinar el potencial hipoglucemiante agudo de los extractos obtenidos a partir de la droga cruda, mediante la evaluación de niveles de glucemia en ratones normoglucémicos y diabéticos.
- Establecer el efecto de los extractos obtenidos a partir de la droga cruda sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura mediante un ensayo espectrofotométrico *in vitro*.
- Obtener los principios activos mayoritarios del preparado más activo de *V. corymbosa*, aplicando los procedimientos químicos convencionales.
- Establecer el efecto de los metabolitos aislados sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura mediante un ensayo espectrofotométrico *in vitro*, y determinar los parámetros cinéticos de la inhibición. También se realizarán los estudios de acoplamiento molecular para predecir el modo de interacción de la enzima con al menos uno de los compuestos evaluados.

3. HIPÓTESIS

El uso popular de la *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae) sugiere que sus preparados pueden inducir efectos hipoglucemiantes y/o antihiperglucémicos demostrables mediante ensayos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*. Los preparados que resultasen activos deben contener agentes hipoglucemiantes y/o antihiperglucémicos susceptibles de separarse mediante la aplicación de técnicas fitoquímicas convencionales.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Adquisición del material vegetal.

El material vegetal formado por las ramas y hojas de la especie *Vauquelinia corymbosa* Bonpl. fue recolectado en la localidad de San Borja, Chihuahua, México en Febrero del 2012. El material vegetal fue proporcionado por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología, UNAM. Una muestra de referencia (Robert Bye 36951 y Edelmira Linares) se depositó en el Herbario Nacional (MEXU).

4.2 Procedimientos generales.

4.2.1 Análisis cromatográficos.

Los análisis de cromatografía en capa delgada modalidad analítica fueron realizados sobre placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas con sílice (Gel de Sílice 60 F254 Merk de 0.25 mm de espesor), usando distintas mezclas de elución. La visualización de las placas se realizó con una lámpara de luz UV a dos longitudes de onda (254 y 365 nm) y como agente revelador se utilizó una solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico (12 g sulfato cérico amoniacal con 22.5 mL de H₂SO₄ en 350 mL de agua), para desarrollar el color fue necesario calentar a 110 °C aproximadamente por un minuto. Los análisis de cromatografía en columna abierta (CCA) se realizaron en columnas de vidrio empaquetadas con Sephadex® (LH-20), siguiendo las técnicas convencionales.

4.2.2 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los puntos de fusión se determinaron con un aparato Fisher-Jonhs y se reportan sin corregir. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H, 400 Hz) y resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN-¹³C, 100 Hz) se registraron en

aparatos Varian Unity Inova empleando DMSO- d_6 y piridina- d_5 como disolventes y tretamilsilano (TMS) como referencia interna de los desplazamientos químicos expresados en ppm. Para procesar los espectros de RMN unidimensionales y bidimensionales se utilizó el programa MestreNova® versión 7. Los espectros de masas se registraron en los equipos JEOL SX 102 y LTQ Orbitrab XL system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA), utilizando como método de ionización el bombardeo de átomos acelerados (MS-FAB) en modo positivo con alcohol nitrobenílico como matriz y también se empleó la ionización por impacto electrónico e introducción directa (EM-IE). Todos los espectros se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM. Los análisis de rotación óptica se realizaron en un polarímetro Perkin Elmer 343 operando a 589 nm, utilizando CH_3OH como disolvente.

4.3 Preparación de los extractos de *V. corymbosa*.

4.3.1 Preparación del extracto orgánico de *V. corymbosa*.

El material vegetal se desecó a temperatura ambiente y al aire libre durante un periodo de 15 días, posteriormente se fragmentó utilizando un molino de cuchillas Thomas Wiley Modelo 4.

El extracto orgánico se preparó a partir de 500 g del material vegetal previamente molido, la extracción se realizó mediante el método de maceración exhaustiva, para ello se utilizó como disolvente una mezcla de CH_2Cl_2 - CH_3OH en proporción 1:1. Al cabo de 15 días la mezcla se filtró y se concentró a presión reducida obteniendo finalmente 107 g de extracto orgánico seco de color café oscuro.

4.3.2 Preparación del extracto acuoso de *V. corymbosa*.

El extracto acuoso se preparó a partir de 500 g de material vegetal previamente molido, la extracción fue vía infusión tratando el material vegetal con agua a ebullición ($90\text{ }^\circ\text{C}$), la mezcla se dejó reposar durante treinta minutos y transcurrido este tiempo

se filtró y concentró a presión reducida. Este proceso nos permitió obtener 11 g del extracto acuoso seco de color ámbar.

4.3.2.1 Fraccionamiento preliminar de la infusión de *V. corymbosa*.

Una vez obtenida la infusión a partir de 500 g de material vegetal que se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el punto **4.3.2**, antes de concentrar a presión reducida, la infusión se sometió a un proceso de partición mediante la técnica de reparto de manera exhaustiva, utilizando como disolvente AcOEt. La fracción orgánica se filtró sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Todo el proceso se repitió tantas veces como fue necesario para obtener finalmente 5 g de la fracción color ámbar. La fracción acuosa también se concentró a presión reducida, para obtener 7 g de la misma.

4.4. Determinación de la seguridad y eficacia preclínica de *V. corymbosa*.

Los ensayos biológicos *in vivo* se realizaron en ratones macho de la cepa ICR, los cuales fueron proporcionados por Harlan México S.A. de C.V. Los animales usados tenían entre 20-30 g de masa corporal. Las condiciones ambientales a las que se sometieron fueron: Temperatura de 21 ± 2 °C, humedad relativa entre 70-80 %, ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, alimento y agua *ab libitum*. Las muestras administradas fueron disueltas o suspendidas en solución salina isotónica y en caso de ser necesario se utilizó 0.01% de Tween 80® como agente suspensor.

Para los ensayos *in vitro* se utilizó enzima α -glucosidasa tipo 1 de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, lote 1001350725), preparada en una solución de 1 U/mL. Como sustrato para la reacción enzimática se utilizó α -D-glucopiranosido de 4-nitrofenilo (*p*-NPG, Sigma-Aldrich, lote 101052975), preparado en una solución de 5 mM. Para realizar el ensayo todas las muestras fueron disueltas en un buffer de fosfato de sodio 100 mM a pH de 7.

4.4.1 Determinación de la toxicidad aguda del extracto orgánico y acuoso de *V. corymbosa*.

Para establecer la seguridad preliminar de esta especie vegetal se aplicó el protocolo descrito por Lorke (1983). La metodología consta de dos etapas experimentales, en cada etapa se usaron 12 ratones macho de 20-22 g, divididos en grupos de 4, a tres de estos grupos se les administró una dosis fija y el cuarto grupo se usó como control de vehículo. Las administraciones se realizaron por vía oral a razón de 0.02 mL/1 g de peso. Para la primera fase se emplearon dosis de 10, 100 y 1000 mg/Kg. Para la segunda, dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/Kg. Posterior a la administración los animales permanecieron en observación por un periodo de una hora, y durante los catorce días subsecuentes se registraron los pesos o muertes de todos los animales en experimentación. Al cabo de estos catorce días los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y se examinaron macroscópicamente sus órganos internos para detectar algún tipo de lesión en estómago, hígado, riñón, corazón y pulmón.

El cálculo de la dosis letal media (DL₅₀), se realizó según lo describe el método, haciendo una media aritmética entre la dosis en la que no hubo ninguna muerte y la inmediata en donde se presentó al menos una muerte.

4.4.2 Evaluación del potencial antidiabético de *V. corymbosa*.

La determinación del potencial antidiabético del extracto orgánico y acuoso de *V. corymbosa* se determinó siguiendo los procedimientos previamente descritos en la literatura, empleando animales normoglucémicos y diabéticos (Guerrero-Analco, 2007). Para cada ensayo realizado se utilizaron 40 ratones de 20-30 g, divididos en grupos de 8 cada uno.

Los niveles de glucosa en sangre se determinaron tomando muestras sanguíneas de la vena caudal, haciendo una incisión en la cola de los animales. La glucosa en sangre

se mide mediante un método enzimático con glucosa oxidasa, utilizando un glucómetro comercial One Touch Ultra 2™ (Johnson-Johnson, USA).

La inducción de diabetes mellitus se realizó utilizando estreptozotocina como agente inductor del daño de las células beta del páncreas. Primero se realizó una administración vía intraperitoneal (*i.p.*) de β -nicotinamida (β -NA) a una dosis de 30 mg/Kg. Después de quince minutos se administró por vía *i.p.* estreptozotocina a una dosis de 100 mg/Kg, disuelta en un buffer de citratos 0.1 M con un pH de 4.5. Ambas administraciones se hicieron a razón de 0.01 ml/1 g de peso. Después de ocho días se midieron los niveles de glucemia, y aquellos animales con valores mayores a 140 mg/dL fueron incluidos en los experimentos por considerarse positivos a la diabetes mellitus tipo 2.

4.4.2.1 Determinación del potencial hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de *V. corymbosa*.

Se utilizaron cuarenta animales divididos en 5 grupos de ocho unidades experimentales cada uno (n=8). El extracto acuoso se evaluó a las dosis fijas de 31.6, 100.0 y 316.0 mg/Kg, en animales normoglucémicos y diabéticos. Se utilizaron dos grupos de animales control, para el grupo control positivo se administraron a los animales con una dosis de 10 mg/Kg de glibenclamida, y el grupo blanco se administró solo con el vehículo. Todas las administraciones se realizaron por vía oral a una razón de 0.02 mL/1 g de peso. El extracto acuoso se disolvió en solución salina isotónica. Se realizó la medición de la glucosa basal al tiempo cero antes de la administración. El resto de las mediciones se realizaron a 1.5, 3.0, 5.0 y 7.0 horas después de la administración.

Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de variación de glucosa en sangre, esto se realizó con base en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Variación de glucosa} = \left[\frac{G_t - G_i}{G_i} \right] \cdot 100$$

En donde el valor de G_i corresponde al valor medido de glucosa al tiempo cero o antes de la administración, y el valor G_t son los diferentes valores de glucosa determinados en los tiempos 1.5, 3.0, 5 y 7.0 después de la administración. Posteriormente se realizó el cálculo de área para cada uno de los tratamientos administrados y para los controles.

Este mismo ensayo y tratamiento de datos se aplicó en animales normoglucémicos y en animales diabéticos.

4.4.2.2 Determinación del efecto del extracto acuoso y de sus fracciones primarias sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa.

El ensayo *in vitro* de inhibición de la actividad de la α -glucosidasa de levadura se realizó siguiendo la metodología descrita por Brindis y colaboradores (2011). Como control positivo se utilizó acarbosa partiendo de una solución stock de 30 mM, disuelta en buffer de fosfatos. Todas las muestras ensayadas se disolvieron en el buffer de fosfatos a pH de 7 y se prepararon en soluciones de 2,000 ppm. La determinación se realizó espectrofotométricamente en cajas de 96 pozos a una temperatura de 37°C con un equipo iMark (BioRad®) a una longitud de onda de 415 nm. Se utilizó una alícuota de 10 μ L de la solución 5 mM de sustrato (p-NPG) en cada pozo, y de las muestras se tomaron alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 μ L. Después de colocar el buffer, el inhibidor y 5 μ L de la enzima 1 U/mL, se incubó durante 5 minutos a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo, se adicionó el sustrato e inmediatamente después se realizó la primera lectura. Posteriormente, la placa se mantuvo en incubación a la misma temperatura por 30 min, al término de este tiempo se realizó la segunda lectura. Los valores de las absorbencias se obtuvieron mediante el programa Microplate Manager 6, con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente relación matemática:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \frac{A_t - A_i}{A_b} \right] \cdot 100$$

En donde A_t corresponde al valor de absorbancia medida a los 30 minutos, el valor A_i es la absorbancia al tiempo cero de cada muestra y el valor A_b es la absorbancia del blanco (pozo sin inhibidor). Los datos obtenidos de esta ecuación fueron procesados con Origin 9 para el cálculo de la CI_{50} .

4.5 Estudio químico de la fracción activa de la infusión de *V. corymbosa*.

4.5.1 Fraccionamiento de la fracción orgánica de la infusión de *V. corymbosa*.

La fracción orgánica de AcOEt obtenida a partir de la infusión de *V. corymbosa* se sometió a un proceso de fraccionamiento usando la técnica de cromatografía en columna abierta, empleando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y CH_3OH como fase móvil. Se colectaron 36 fracciones las cuales se analizaron por CCD y se combinaron para dar 10 fracciones primarias (**Tabla 4**). El procedimiento se esquematiza en la **Figura 9**.

4.5.1.1 Aislamiento de piceina (42).

A partir de la fracción F2 precipitó un sólido que tras ser lavado consecutivamente con una mezcla de CH_2Cl_2 - CH_3OH (1:1) generó 100 mg de un polvo puro con punto de fusión 188-190 °C. Este sólido se identificó como piceina (**42**).

4.5.1.2 Aislamiento de prunasina (43).

La fracción F3 fue reconstituida en CH_3OH , posteriormente precipitó un sólido que tras consecutivos lavados con CH_3OH generó 760 mg de cristales de un polvo crema con punto de fusión de 152-154 °C, este compuesto se identificó como prunasina (**43**).

4.5.1.3 Aislamiento de (-)-*epi*-catequina (44).

De la fracción primaria F7 precipitaron espontáneamente 210 mg de un sólido amarillo que presentó un punto de fusión de 221-222°C, posteriormente fue identificado como (-)-*epi*-catequina (**44**).

Tabla 4. Fraccionamiento de la fracción de AcOEt de *V. corymbosa*.

Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
1-5	F1	49.3
6-7	F2	139.0
8	F3	863.3
9-11	F4	3.7
12-15	F5	396.6
16-18	F6	287.3
19-29	F7	248.0
30	F8	222.0
31	F9	14.0
32-35	F10	20.4

4.6 Evaluación del efecto de piceina (42), prunasina (43) y (-)-*epi*-catequina (44), sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura.

Para realizar los experimentos se prepararon soluciones patrón de los compuestos a distintas concentraciones: 25 mM de piceina (42), 100 mM de prunasina (43) y 20 mM de (-)-*epi*-catequina (44), y de igual forma para la construcción de las curvas se tomaron alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 μ L de cada solución patrón. El resto de la determinación del efecto de estos compuestos sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el punto 4.4.2.2.

4.6.1 Determinación de los parámetros de inhibición enzimática de prunasina (43) y de (-)-*epi*-catequina (44).

Para determinar el tipo de inhibición de los compuestos 43 y 44 se realizó un ensayo *in vitro* en placa de 96 pozos. Para este experimento se utilizaron concentraciones crecientes de p-NPG por pozo (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mM), y concentraciones crecientes de los compuestos 43 y 44 (0, 0.5, 1.0, 2.0 mM y 0.2, 0.4, 0.6,

0.8, 1.0 mM, respectivamente). El resto del experimento se realizó siguiendo el protocolo descrito en el inciso 4.4.2.2. Después de obtener los valores experimentales se construyeron gráficas de cinética enzimática graficando el recíproco de la velocidad de reacción (mM/min) en función del inverso de la concentración de sustrato para determinar si la inhibición es de tipo competitiva o no competitiva y mediante los cálculos de Dixon se determinaron los parámetros cinéticos.

4.7 Acoplamiento molecular.

Como blanco molecular se utilizó la isomaltasa de *Saccharomyces cerevisiae* (código PDB: 3A4A). La adición de átomos de hidrógeno polares a la proteína, cargas de Kollman y los parámetros de solvatación se realizaron con el programa Spartan2.0. La conformación de cada ligando fue construida y optimizada energéticamente utilizando el programa Hyperchem8.0. Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron con el programa AutoDock4.0 (<http://autodock.scripps.edu/>) y consistió en la generación de mapas electrostáticos para cada tipo de átomo participante en el acoplamiento, en una caja de $126 \times 126 \times 126 \text{ \AA}$ en los ejes X, Y, Z, con el centro de la cuadrícula centrado en la proteína a través de un método semiempírico (PM3).

Los resultados obtenidos de los cálculos de acoplamiento molecular fueron analizados utilizando los siguientes programas: AutoDockTools versión 1.5.0 y PyMol sobre el sistema operativo LINUX.

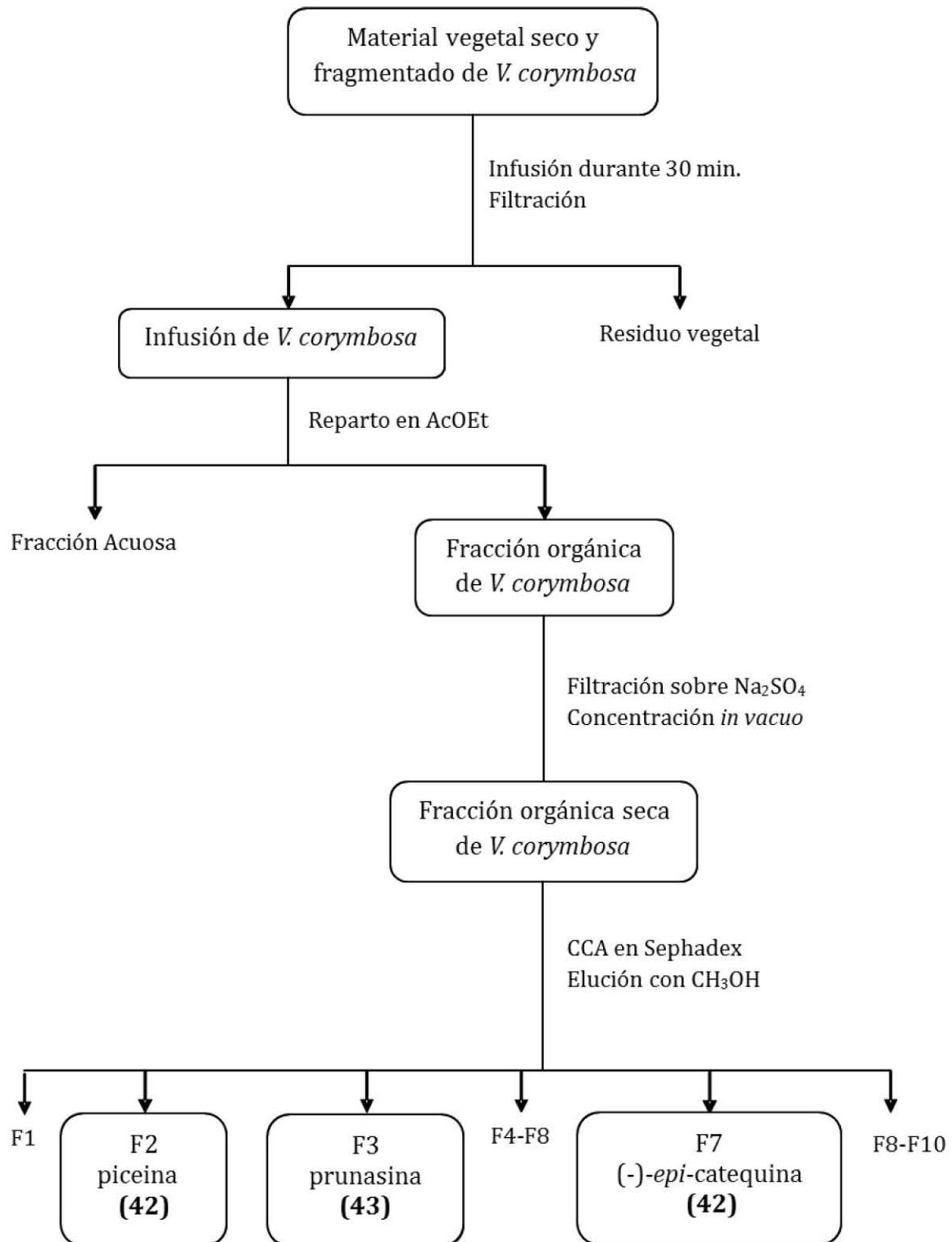


Figura 9. Preparación y fraccionamiento del extracto acuoso de *V. corymbosa*.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En México un gran sector de la población que padece diabetes utiliza para su tratamiento tanto la medicina convencional como la popular a base de hierbas. Normalmente, los pacientes son diagnosticados en algún centro de salud donde los médicos prescriben el tratamiento alopático apropiado. Sin embargo, con mucha frecuencia los pacientes abandonan el tratamiento y recurren a los remedios derivados de plantas, ello por razones socio-económicas, culturales, y la falsa premisa de que por ser naturales son inocuos (Andrade-Cetto, 2010 y Heinrich, 2005). En la mayoría de los casos, la información acerca de la eficacia y seguridad de estas plantas no se conoce, circunstancia que podría poner en riesgo la salud, de por sí deteriorada, del paciente. De allí el interés de realizar el estudio de esas especies para determinar, en primera instancia, su seguridad preclínica y potencial antidiabéticos.

En este escenario surgió el presente proyecto sobre *Vauquelinia corymbosa* y para su desarrollo se implementó la estrategia metodológica que se describe a continuación. En primer lugar se realizó la determinación de la toxicidad aguda de los extractos orgánico y acuoso elaborados mediante técnicas convencionales; posteriormente se estableció el efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso en ratones normoglucémicos y diabéticos. También se realizó un ensayo *in vitro* para determinar el efecto de los dos preparados sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura. De esta manera, se contaría con un procedimiento sencillo para el seguimiento de esta actividad y así obtener los principios activos potencialmente antihiperoglucémicos. Finalmente, los principios activos fueron sujetos de estudios adicionales *in vitro* e *in silico* de cinética enzimática y de acoplamiento molecular. A continuación se presentarán los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.

5.1 Toxicidad aguda de los extractos orgánico y acuoso de *V. corymbosa*.

El estudio realizado para establecer la inocuidad preliminar de los extractos acuoso y orgánico preparados a partir la droga cruda de *V. corymbosa*, consistió en la evaluación de la toxicidad aguda en ratones, de acuerdo al procedimiento descrito por Lorke (1983); este método ofrece una serie de ventajas que consisten en la rapidez del estudio y el empleo de un menor número de animales durante el proceso experimental; esto último, además, permite el cumplimiento de las normas vigentes sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Los resultados se expresan en términos de la dosis letal media (DL₅₀) que se obtiene calculando la media aritmética entre la dosis que no provocó mortalidad alguna en los animales y en la que se presentó al menos la muerte de un animal.

De acuerdo a los resultados que se muestran en la **Tabla 5**, el extracto acuoso no es tóxico para ratones, ya que a ninguna de las dosis ensayadas se observó mortalidad alguna en los animales. Ello indica también que su DL₅₀ es mayor a 5000 mg/Kg. El análisis detallado del comportamiento de los animales durante el periodo de experimentación permitió evidenciar que los tratamientos no provocaron alteración conductual. Finalmente, la inspección macroscópica de sus principales órganos internos reveló que no existen daños orgánicos de tipo agudo tras los tratamientos.

En el caso del extracto orgánico la DL₅₀ calculada de 2154 mg/Kg indicó un efecto tóxico agudo leve. Todos los animales presentaron convulsiones tónicas antes de morir, y posterior a la muerte se observó una coloración morada en extremidades, nariz y orejas típica de cianosis. Estos resultados permiten inferir la presencia de algunos componentes tóxicos en el extracto orgánico y permiten recomendar el estudio de toxicidad crónica en ratones y otros animales.

Tabla 5. Toxicidad aguda de los extractos de *V. corymbosa*.

Extracto evaluado	Primera fase		Segunda fase		DL ₅₀ (mg/Kg)
	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	
Extracto acuoso	10	0/3	1600	0/3	>5000
	100	0/3	2900	0/3	
	1000	0/3	5000	0/3	
Extracto orgánico	10	0/3	1600	0/3	2154
	100	0/3	2900	3/3	
	1000	0/3	5000	3/3	

5.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *V. corymbosa* en ratones normoglucémicos y diabéticos

Para el establecimiento del efecto hipoglucemiante de *V. corymbosa* se utilizó un modelo experimental bien establecido (Escandón-Rivera *et al.*, 2013); el procedimiento permite valorar el efecto de un tratamiento en los niveles de glucosa sanguínea en ayuno en roedores normoglucémicos y diabéticos. Para la inducción de la diabetes se administró una dosis fija de estreptozotocina (STZ, 100 mg/kg) previa administración de nicotinamida (NA, 100 mg/kg). La STZ daña selectivamente las células beta del páncreas mediante la alquilación de su ADN, de tal forma que el consecuente estrés oxidante conlleva a su destrucción por necrosis provocando a la postre un daño similar al observado en una diabetes tipo II. Por ello, los animales se protegen inicialmente con NA para disminuir el efecto citotóxico de la STZ y garantizar así un estado de diabetes tipo 2 (Szkudelski, 2001). Como control positivo se utilizó la glibenclamida, un fármaco del tipo de las sulfonilureas que promueve la liberación de insulina de las células beta-pancreáticas a través del bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP (Linn, *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos de los distintos tratamientos, los cuales se compararon con los de los animales de los grupos control, se muestran en la **Figuras 10 y 11** como gráficas de área bajo la curva. Ninguno de los tratamientos provocó una disminución significativa de la glucemia, a las dosis ensayadas, tanto en animales normoglucémicos como diabéticos.

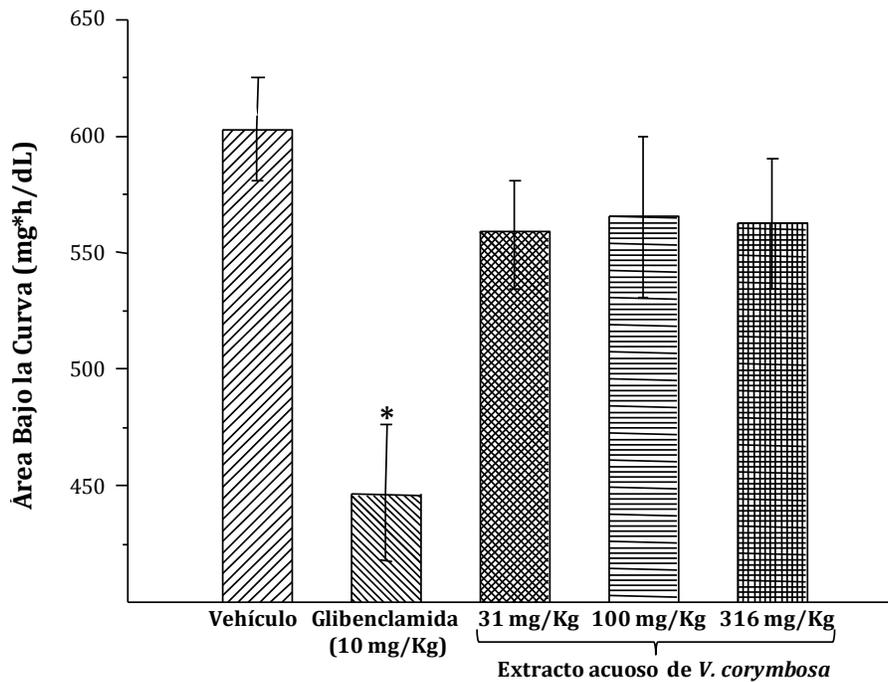


Figura 9. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de *V. corymbosa* en ratones normoglucémicos. Vehículo: solución salina isotónica (NaCl 0.9%). Cada barra representa la media \pm EEM para $n=8$. * $p<0.05$

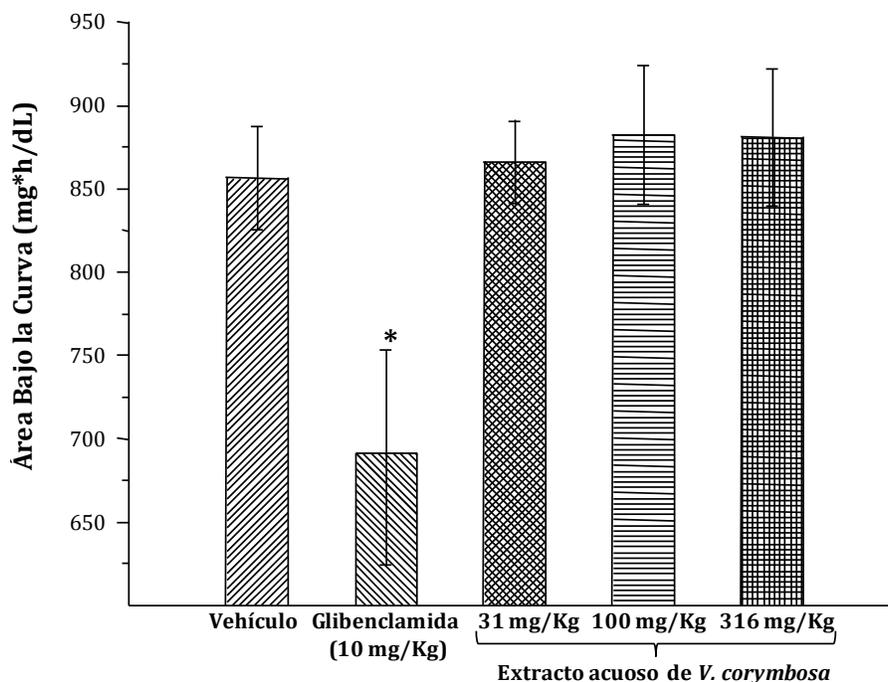


Figura 10. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de *V. corymbosa* en ratones diabéticos. Vehículo: solución salina isotónica (NaCl 0.9%). Cada barra representa la media \pm EEM para $n=7$. * $p<0.05$

Aunque de acuerdo a los estudios previos (Trumbull, 1975), la planta contiene grandes cantidades de ácido ursólico (35), uvaol (41) y ácido betulínico (40), que poseen propiedades hipoglucemiantes bien establecidas (Saeidnia, *et. al.*, 2012; Wójciak-Kosior, *et. al.*, 2013), no fue posible detectar su presencia en la infusión. Entonces, el conjunto de hallazgos experimentales presentados sugieren que la infusión de *V. corymbosa* carece de efectos hipoglucemiantes.

5.3 Determinación del efecto del extracto acuoso de *V. corymbosa* sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura.

Tras descartar un efecto hipoglucemiante de los extractos de *V. corymbosa*, se determinó su potencial antihiper glucémico mediante la determinación del efecto del extracto acuoso sobre las enzimas α -glucosidasas utilizando un ensayo espectrofotocolorimétrico. Este método se basa en la cuantificación del *p*-nitrofenol generado por la hidrólisis enzimática del piranosido de *p*-nitrofenilo (*p*-NPG). La

actividad de la enzima α -glucosidasa es directamente proporcional a la cantidad del fenol libre generado (Oki, *et. al.*, 1999).

El extracto acuoso (**Figura 12**) mostró una inhibición significativa de la α -glucosidasa de la levadura de cerveza con una concentración inhibitoria media (CI₅₀) de 28.56 ppm alcanzando un porcentaje de inhibición de 99.50%.

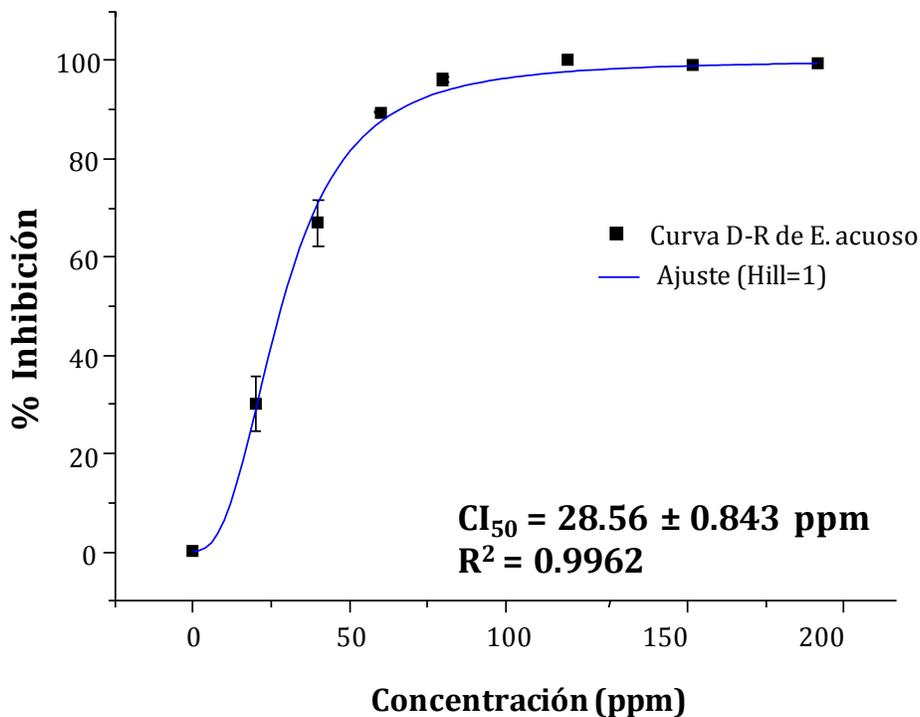


Figura 11. Curva de inhibición enzimática del extracto acuoso de *V. corymbosa*. Cada punto representa el porcentaje de inhibición \pm desviación estándar con n=3.

La evaluación del extracto orgánico no generó resultados confiables debido a la interferencia ocasionada por su intenso color en la determinación espectrofotométrica.

Los resultados sugieren entonces la presencia en el extracto acuoso de *V. corymbosa* de metabolitos inhibidores de las enzimas α -glucosidasas de las vellosidades intestinales. Estos metabolitos podrían provocar un efecto antihiper glucémico

postprandial de los preparados de la planta al disminuir la absorción intestinal de carbohidratos.

5.4 Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos inhibidores de α -glucosidasas.

Con la finalidad de obtener los principios inhibidores de las α -glucosidasas, se realizó el fraccionamiento preliminar de la infusión de *V. corymbosa* mediante un proceso de reparto entre acetato de etilo y agua. Tras la evaluación del efecto sobre la actividad enzimática de las fracciones orgánica y acuosa se determinó que la fracción orgánica (CI_{50} = 39.12 μ M) era la más activa (**Tabla 6**) con un porcentaje de inhibición del 92.50 %.

Tabla 6. Resultados obtenidos en la inhibición de α -glucosidasa de levadura para las fracciones de la infusión.

Muestra	CI_{50} (μ M ó ppm)	% Inhibición	R^2
Acarbosa	530 \pm 23 μ M	89.74 \pm 0.365	0.9986
Extracto acuoso	28.56 \pm 0.843 ppm	99.50 \pm 0.267	0.9962
Fracción orgánica de infusión	39.12 \pm 2.404 ppm	92.00 \pm 4.624	0.9955
Fracción acuosa de infusión	75.54 \pm 2.097 ppm	85.57 \pm 4.625	0.9970

Con la finalidad de obtener algunos de los compuestos inhibidores de α -glucosidasas presentes en la fracción orgánica de la infusión, se prosiguió con su fraccionamiento aplicando procesos cromatográficos convencionales. Este análisis condujo al aislamiento de los tres productos mayoritarios de la fracción los cuales se identificaron como piceina (**42**), prunasina (**43**) y (-)-*epi*-catequina (**44**), sus estructuras se muestran en la **Figura 13**. Los tres compuestos son novedosos para la especie.

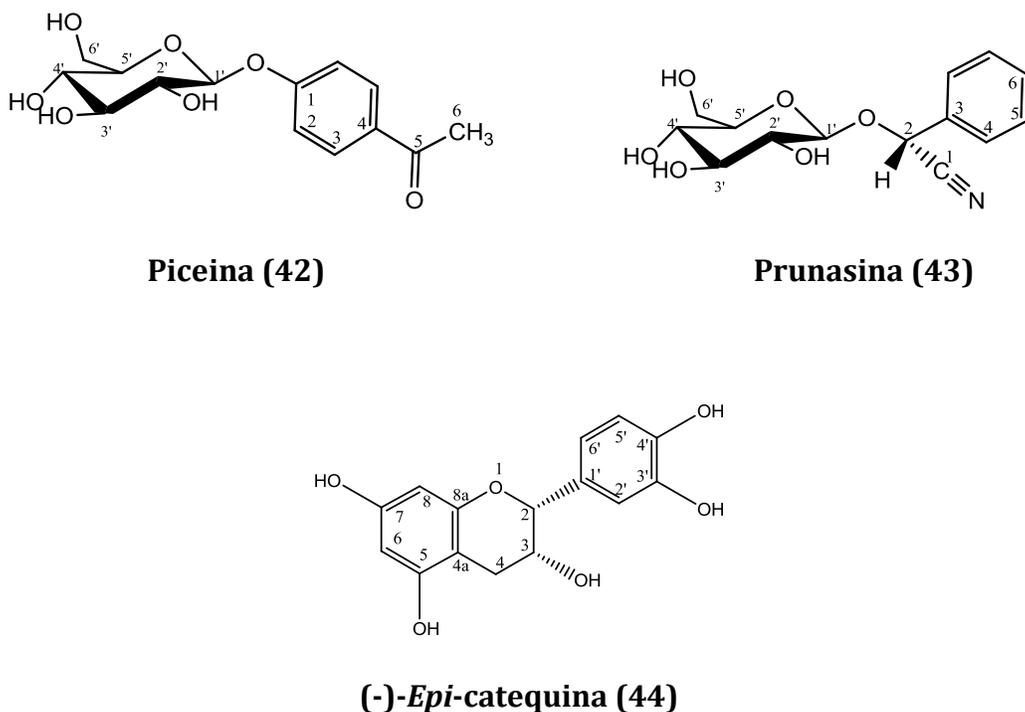


Figura 12. Metabolitos aislados de la fracción orgánica de la infusión de *V. corymbosa*.

5.4.1 Piceina (42).

El compuesto **42** se aisló como un polvo crema. Su fórmula molecular se determinó con espectrometría de masas como C₁₄H₁₈O₇; el espectro de masas obtenido por FAB+ muestra el ion *quasimolecular* [M+H]⁺ en una relación *m/z* de 299, congruente con la fórmula molecular. En el espectro de IR se logran observar las bandas características de: hidroxilos (3349 cm⁻¹) y carbonilo de cetona conjugada (1661 cm⁻¹).

Las señales presentes en los espectros de RMN-¹H y de RMN-¹³C se muestran en la **Tabla 7**. En el espectro de RMN-¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) se observaron señales para 12 carbonos, incluyendo los carbonos de una cetona conjugada (δ_c 196.5) unida a un grupo metilo, un anillo aromático disustituido, y una unidad de D-glucosa. El espectro de RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) presenta en la región aromática un sistema A₂X₂ en δ_H 7.13 (dd, *J*= 9.0 y 2 Hz) y δ_H 7.93 (dd, *J*= 8.9 y 2 Hz) típico de un benceno 1,4 di-sustituido;

las señales de estos hidrógenos correlacionan con las señales de cuatro de los carbonos aromáticos en el espectro HSQC. En la zona comprendida entre δ_H 3.20 y 5.1 se aprecian las señales típicas de una unidad de β -D-glucosa, en particular el hidrógeno anomérico aparece como un doblete ($J = 7.1$ Hz) en δ_H 5.02. Los demás hidrógenos se asignaron con base en las correlaciones observadas en los espectros HSQC y COSY como se indica en la **Tabla 7**. Por último, el espectro presenta una señal simple en δ_H 2.54 correspondiente al metilo de la metilcetona detectada en el espectro de RMN- ^{13}C . La integración de los elementos estructurales detectados con los diferentes espectros permitió determinar la estructura del producto como la de la piceina, compuesto aromático simple de tipo C₆-C₂ (Dommissie, *et al.*, 1986).

5.4.2 Prunasina (43).

El compuesto **43** se aisló bajo la forma de un polvo crema ópticamente activo $\{[\alpha]_D: -55.1 (c 0.15, MeOH)\}$. En el espectro de masas obtenidos por FAB+ se observan picos en una relación m/z de 318 $[M+Na]^+$, 296 $[M+H]^+$, 268 $[M-HCN]^+$, 163 $[M-C_6H_5CHCN-H_2O+H]^+$. La fórmula molecular se estableció como C₁₄H₁₇O₆N, la cual permite un índice de deficiencia de hidrógenos de siete. En el IR se aprecian bandas características para grupos hidroxilo (3349 cm⁻¹) y ciano (2260 cm⁻¹); la presencia de esta banda de absorción se encuentra en armonía con la pérdida de HCN a partir del ion molecular en el espectro de masas (Myoung-Chong, *et al.*, 2008).

Los datos obtenidos de los espectros de RMN para el compuesto **43** se muestran en la **Tabla 8**. En el espectro de RMN- ^{13}C se observan las señales para 12 carbonos, de las cuales cinco aparecen en la región de los carbonos insaturados y siete en la región de carbonos unidos a oxígenos. Del primer grupo de señales, el carbono cuaternario en δ_C 119.0 corresponde a un grupo ciano, en tanto que los cuatro restantes se asignaron a un anillo aromático mono sustituido. La existencia de este último grupo en la molécula se apoyó también en la presencia de señales múltiples para cinco hidrógenos aromáticos en la región entre δ_H 7.54 y δ_H 7.46 del espectro de RMN- 1H . De los siete carbonos restantes seis se asignaron a una unidad de β -D-glucosa (δ_C en 101.4, 73.4, 77.5, 70.1, 76.7 y 61.3 ppm), y el último a un metino bencílico unido a oxígeno (δ_C 101.4)

que mostró una clara correlación con el singulete en δ_H 6.01 en el espectro HSQC. Al igual que en el compuesto de **42**, el patrón de acoplamiento del hidrógeno anomérico permitió corroborar la naturaleza β del azúcar. Las evidencias presentadas sugieren claramente que la estructura del producto **43** corresponde a la prunasina, un glucósido cianogénico (Myoung-Chong, *et. al.*, 2008).

Un análisis cromatográfico (**Figura 14**) cualitativo del extracto orgánico permitió evidenciar la presencia de la prunasina (**43**) en el mismo. Aunque no se cuantificó con precisión la cantidad de **43** en ninguno de los extractos, las cromatoplasmas resultantes de aplicar iguales cantidades de extracto orgánico e infusión indicaron una mayor cantidad del glucósido en el extracto orgánico elaborado con metanol-CH₂Cl₂ 1:1. Es posible que la menor cantidad de **43** en la infusión se deba a la hidrólisis del glucósido durante su preparación que requiere el uso de calor. Evidentemente, sería necesario desarrollar un método analítico apropiado para cuantificar el glucósido en los dos extractos y confirmar la aseveración anterior.

La presencia de una mayor cantidad de **43** en el extracto orgánico podría explicar los efectos tóxicos observados para el extracto orgánico durante la realización de los estudios de toxicidad aguda. Es bien conocido que tras la liberación de HCN, éste actúa sobre el sistema respiratorio impidiendo el uso del oxígeno mediante la inhibición de la citocromo oxidasa. La hipoxia y la acumulación de ácido láctico resultantes promueven la depresión del sistema nervioso central que lleva a un paro respiratorio e inclusive puede causar la muerte. De manera adicional, si la concentración de cianuro en sangre es muy elevada se pueden provocar otros efectos como son: convulsiones, disminución de presión sanguínea y ritmo cardiaco, pérdida de la conciencia y lesión pulmonar (Guerrero, 2003). También se sabe que los glucósidos cianogénicos pueden provocar efectos tóxicos severos en el humano a causa de la hipoxia celular tales como alteraciones en el sistema nervioso central, tiroides y riñones. Por esta razón se han encontrado hallazgos de bocio, neuropatía atáxica, ambliopía y otros desórdenes neurológicos en humanos que consumen de manera habitual alimentos que contienen glucósidos cianogénicos (Ramírez, 2010).



Figura 13. Análisis en CCD de los extractos de *V. corymbosa*. A: Extracto orgánico; B: Extracto acuoso; R: Compuesto **43**. Sistema de elución AcOEt-CH₃OH (9:1)

5.4.3 (-)-*Epi*-catequina (**44**).

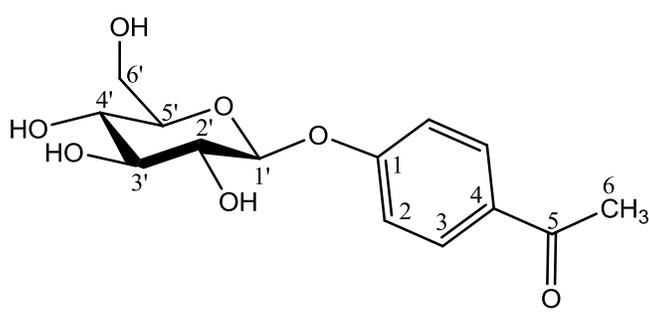
El compuesto **44** se obtuvo como un polvo amarillo ópticamente activo $\{[\alpha]_D: -36.5 (c\ 0.15, \text{MeOH})\}$. La fórmula molecular se estableció como C₁₅H₁₄O₆ mediante espectrometría de masas. El ion molecular [M]⁺ aparece en una relación m/z de 290. En el espectro de IR se observan bandas intensas para grupos hidroxilos (3451 cm⁻¹) y aromaticidad.

Los datos espectroscópicos de RMN obtenidos para el compuesto (**44**) se muestran en la **Tabla 9**. En el espectro de RMN-¹³C (100 MHz, Piridina-d₅) se observan las señales de 15 carbonos y resultó similar a la de compuestos de tipo flavanoles.

En la región aromática del espectro de RMN-¹H se observan, un sistema AB [dos dobletes ($J= 2$ Hz en δ_H 6.70 y δ_H 6.68)] característico del anillo A, sustituido en C-5 y C-7 del núcleo flavano; y otro ABX [dos dobletes ($J= 8$ Hz en δ_H 7.29 y δ_H 7.36)] asignable al anillo B con sustituyentes en las posiciones C-3' y C-4'. En la zona comprendida entre δ_H 3.2 y 5.0 se observan tres conjuntos de señales, dos singuletes anchos en δ_H 4.74 y

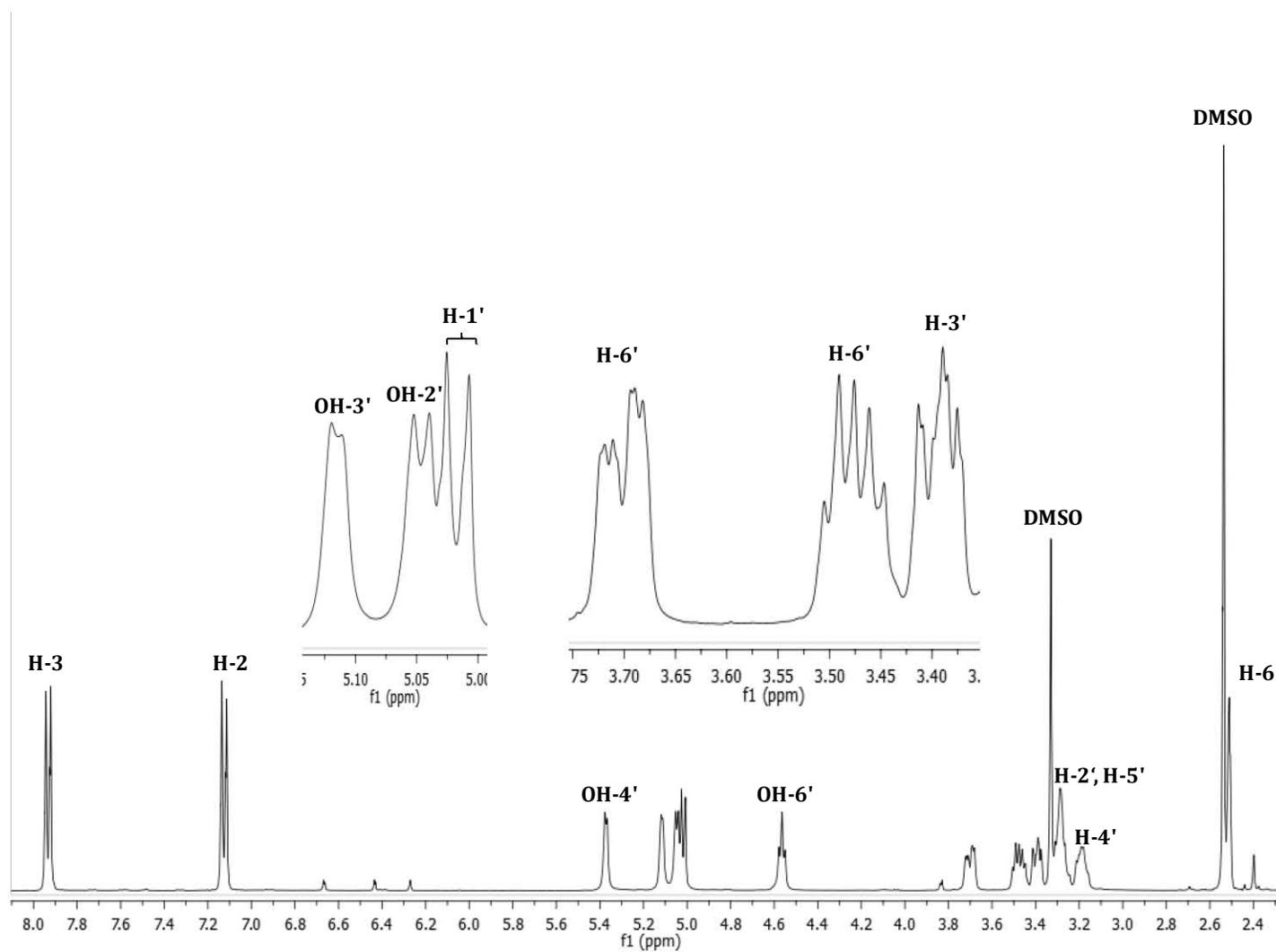
5.02, y dos dobles de dobles en δ_{H} 3.43 ($J_1=4.6, J_2=16.4$) y 3.56 ($J_1=4.6, J_2=16.4$), atribuibles a los hidrógenos de las posiciones C-2, C-3 y C-4, respectivamente. La apariencia de las señales de H-2 y H-3, con un ancho menor a 4 Hz, sugiere que la disposición relativa de estos hidrógenos es *cis* como en el caso de la (-)-*epi*-catequina (Cai, *et al.*, 1991). La comparación del espectro de RMN- ^{13}C de **44** con la de varios flavanoles permitió establecer que el compuesto es la (-)-*epi*-catequina con base en el valor negativo registrado para su rotación óptica (Cai, *et al.*, 1991; Davis, *et al.*, 1996; Takagaki, *et al.*, 2010; Zeng, *et al.*, 2011).

Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para la piceína (42).

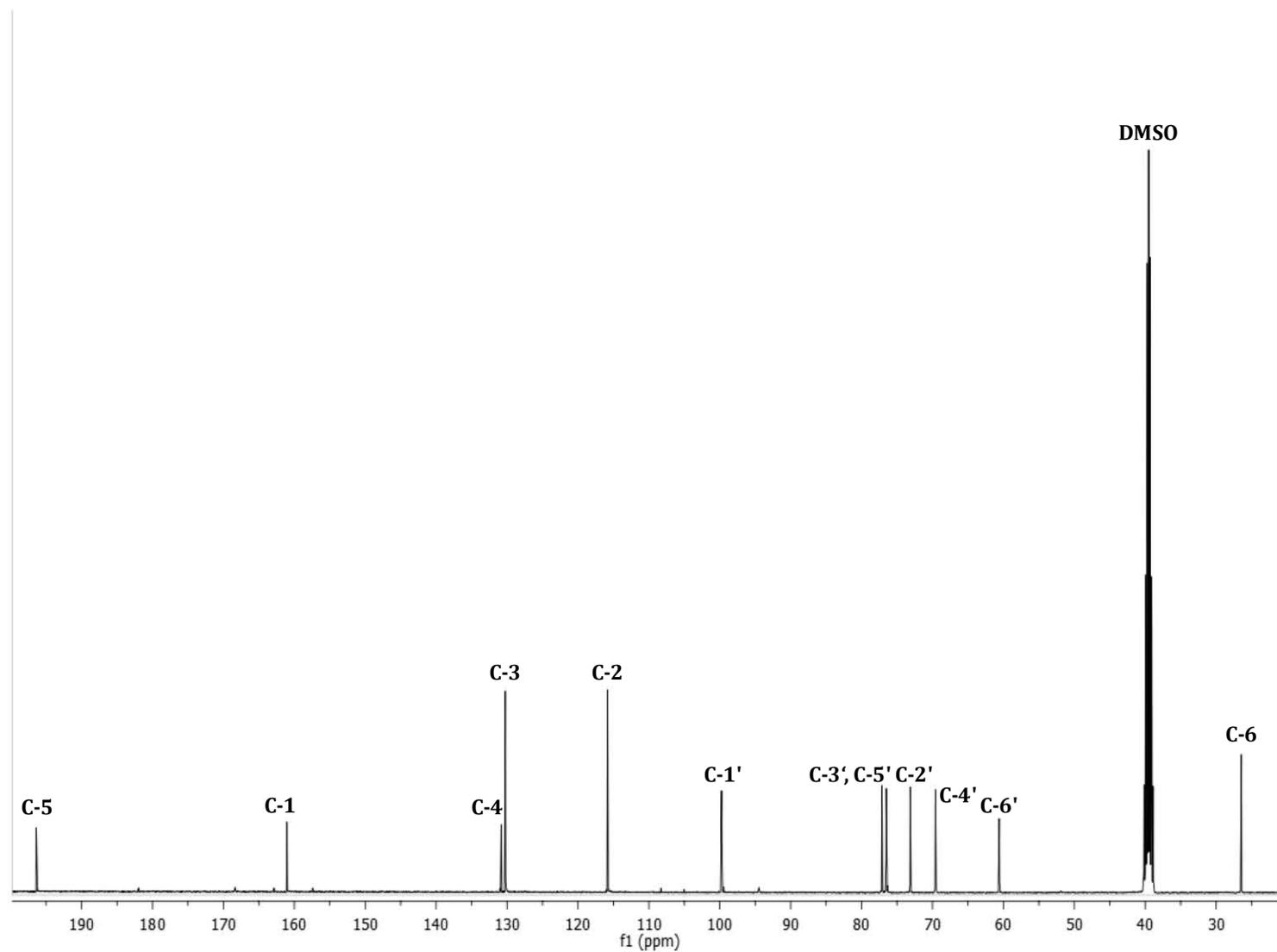


Compuesto 42

C	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) mult (<i>J</i> en Hz)	Correlaciones COSY	Correlaciones HMBC
1	161.0	-	-	-
2	115.8	7.13 dd (<i>J</i> ₁ =2.1, <i>J</i> ₂ =9.0)	H-3	C-1, C-4,
3	130.2	7.93 dd (<i>J</i> ₁ =2.1, <i>J</i> ₂ =8.9)	H-2	C-1, C-2, C-4, C-5
4	130.8	-	-	-
5	196.5	-	-	-
6	26.5	2.54 s	-	C-4, C-5
1'	99.8	5.02 d (<i>J</i> =7.1)	H-2'	C-1, C-4', C-5'
2'	73.1	3.29 m	H-1'	-
3'	77.1	3.39 m	H-4'	C-4', C-5', C-6'
4'	69.6	3.20 m	H-3'	C-1', C-2', C-5'
5'	76.5	3.29 m	-	-
6'	60.6	3.48 m, 3.70 m	-	C-4'

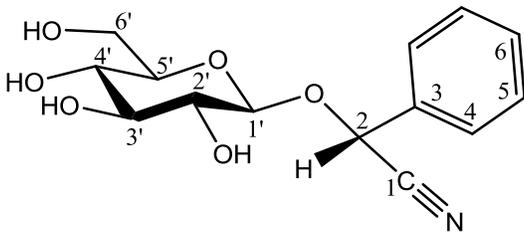


Espectro 1. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) para piceina (42).

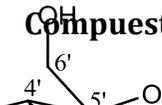


Espectro 2. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) para piceina (42)

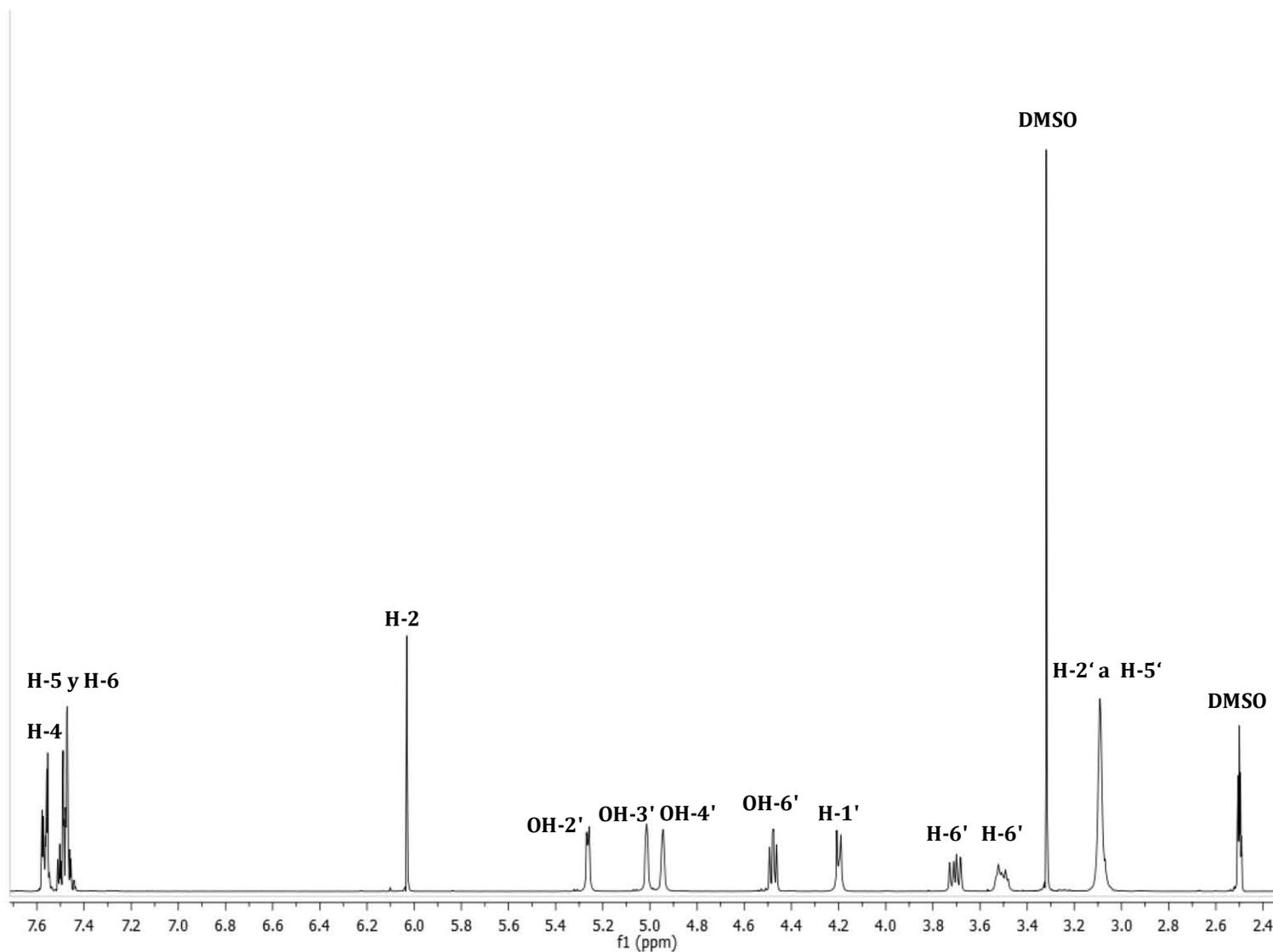
Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para la prunasina (43).



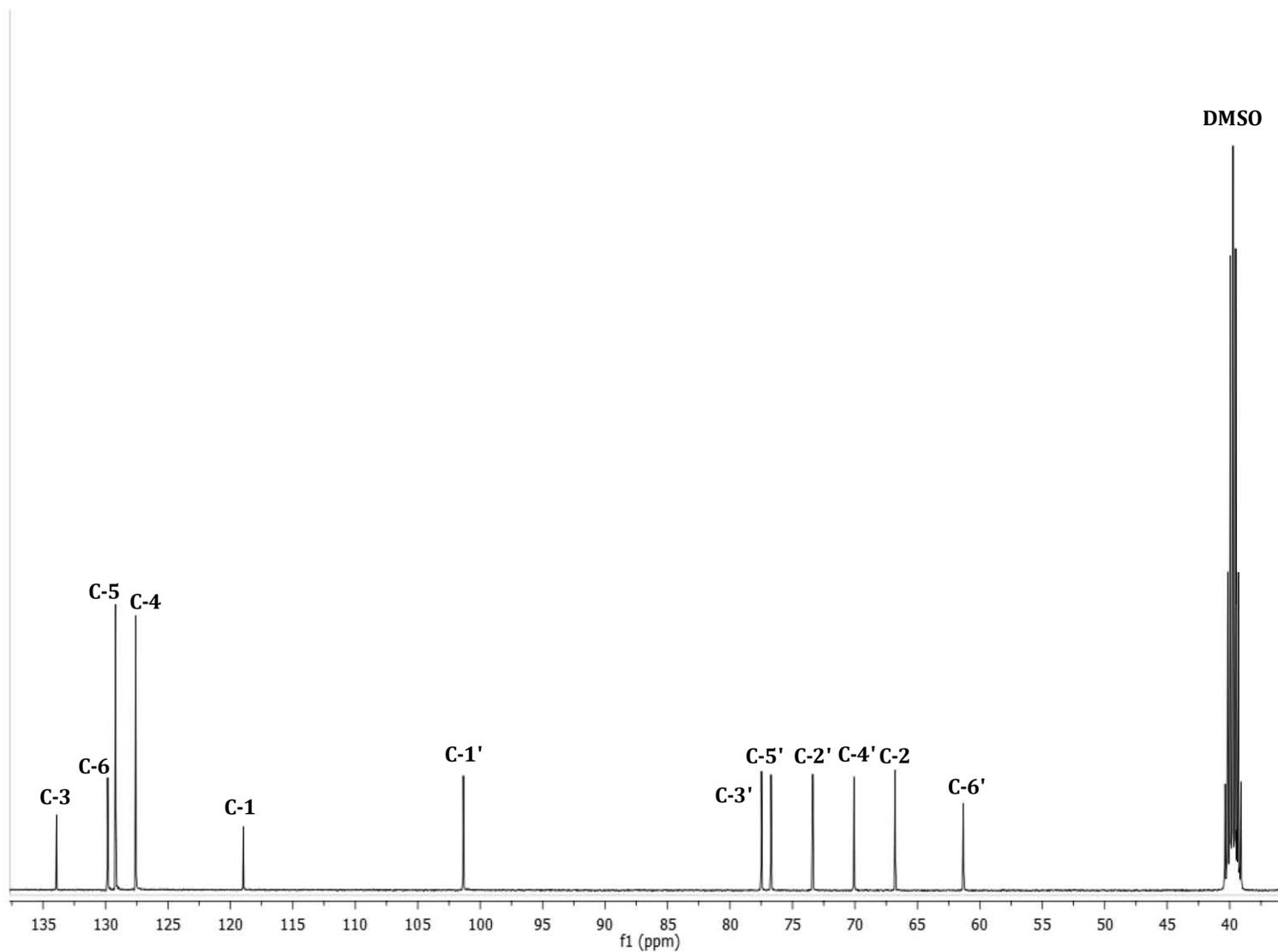
Compuesto 43



C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) mult (<i>J</i> en Hz)	Correlaciones COSY	Correlaciones HMBC
1	119.0	-	-	-
2	66.8	6.01 s	H-4	C-1, C-3, C-4, C-1'
3	133.9	-	-	-
4	127.6	7.54 m	H-2, H-5	C-2, C-6
5	129.2	7.46 m	H-4	C-3
6	129.8	7.46 m	-	C-4
1'	101.4	4.18 d (<i>J</i> =7.1)	H-2'	C-2, C-3', C-5'
2'	73.4	3.07 m	H-1'	C-4'
3'	77.5	3.07 m	-	C-5'
4'	70.1	3.07 m	-	C-2'
5'	76.7	3.07 m	H ^s -6	-
6'	61.3	3.64 m, 3.48 m	H-5'	C-3', C-4'

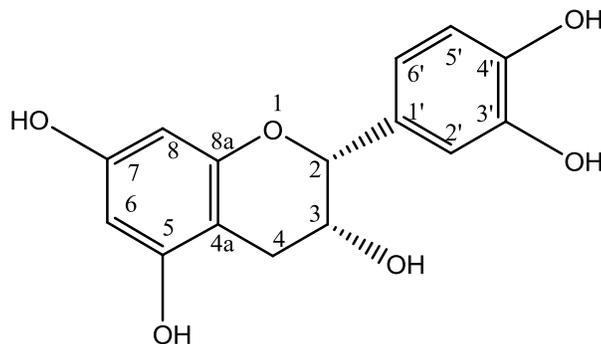


Espectro 3. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO-d_6) para prunasina (43).



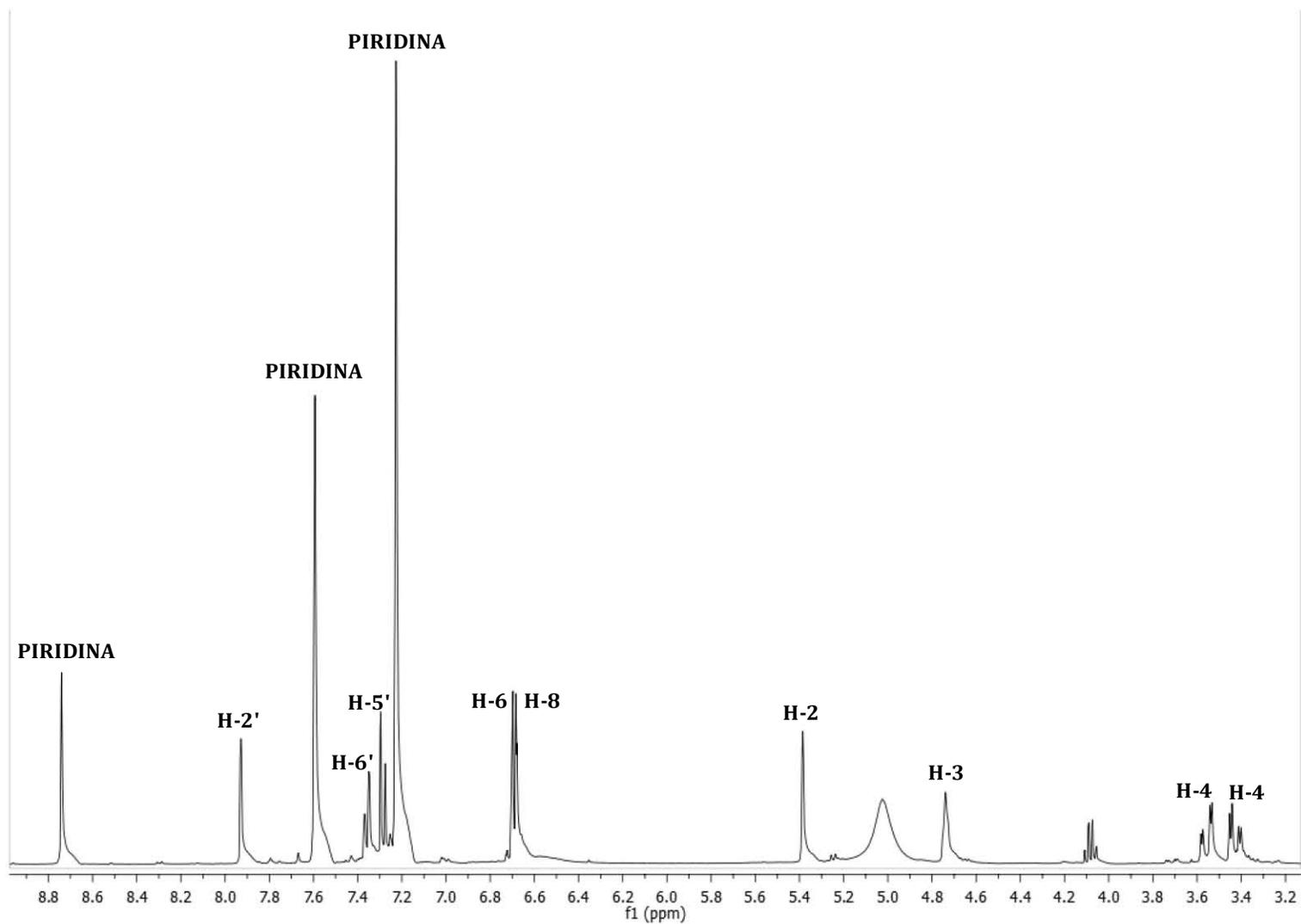
Espectro 4. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) para prunasina (43).

Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y de RMN-¹³C para la (-)-*epi*-catequina (44).

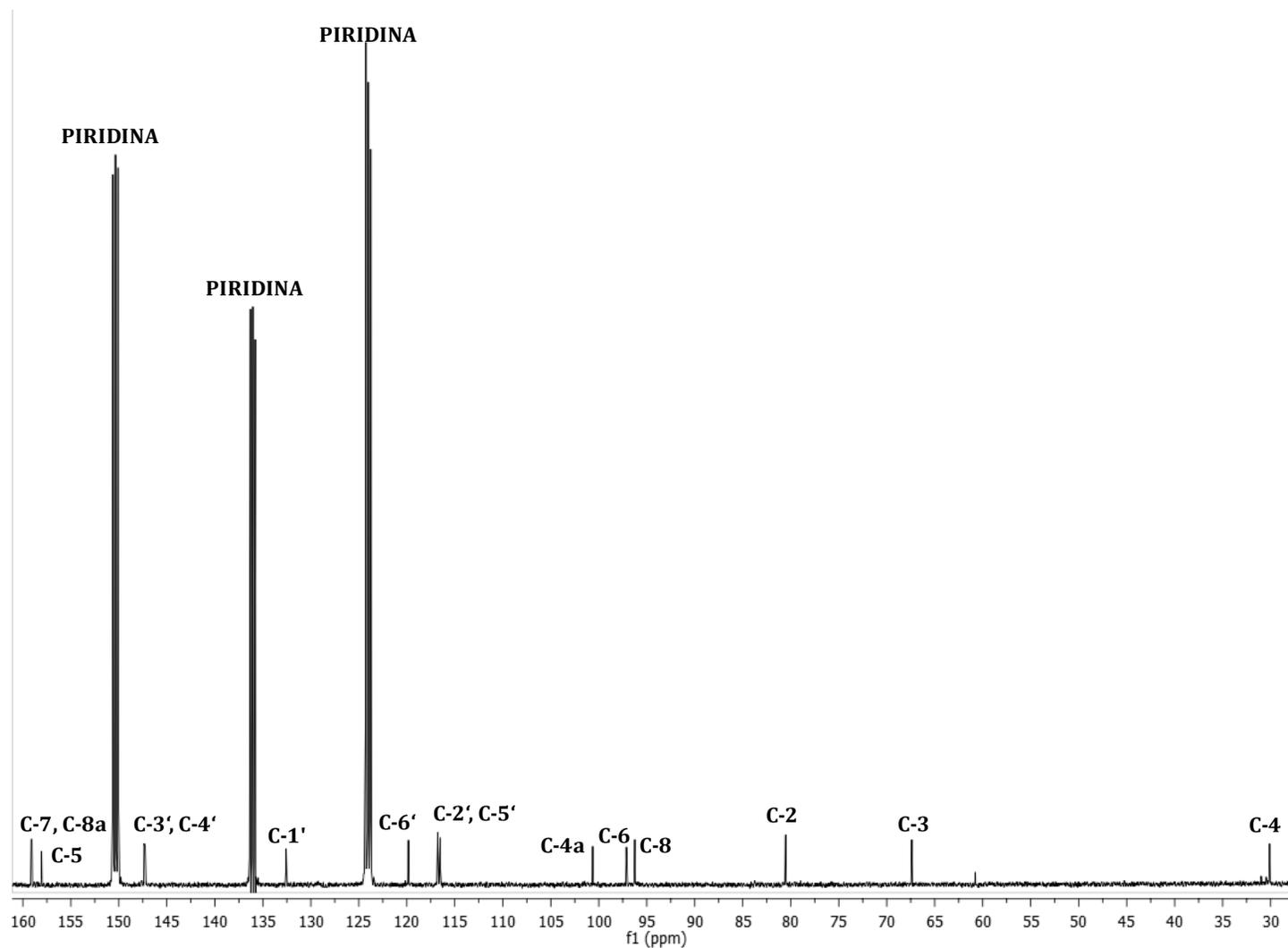


Compuesto 44

C	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) mult (<i>J</i> en Hz)	Correlaciones COSY	Correlaciones HMBC
2	80.5	5.40 sa	H-2', H-6', H-3	C-4, C-1', C-2', C-6'
3	67.4	4.74 sa	H-2, H ^S -4	C-4aC
4	30.1	3.43 dd (<i>J</i> ₁ =4.6, <i>J</i> ₂ =16.4) 3.56 dd (<i>J</i> ₁ =4.6, <i>J</i> ₂ =16.4)	H-3	C-2, C-3, C-4a, C-8a
4a	100.6	-	-	-
5	158.6	-	-	-
6	97.1	6.70 dd (<i>J</i> ₁ =1.0, <i>J</i> ₂ =2.3)	-	C-8, C-4a, C-8a
7	159.1	-	-	-
8	96.2	6.68 dd (<i>J</i> ₁ =1.0, <i>J</i> ₂ =2.2)	-	C-4a, C-8a
8a	159.0	-	-	-
1'	132.6	-	-	-
2'	116.8	7.93 m	H-6'	C-2, C-3, C-6', C-4'
3'	147.4	-	-	-
4'	147.3	-	-	-
5'	116.5	7.29 dd (<i>J</i> ₁ =1.0, <i>J</i> ₂ =8.1)	H-6'	C-1', C-3'
6'	119.7	7.36 dd (<i>J</i> ₁ =0.8, <i>J</i> ₂ =7.8)	H-2, H-2', H-5'	C-2, C-1', C-2', C-4'



Espectro 5. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, piridina-d₅) para (-)-*epi*-catequina (44).



Espectro 6. Espectro de RMN- ^{13}C (400 MHz, piridina- d_5) para (-)-*epi*-catequina (44).

5.5 Evaluación del efecto de los compuestos aislados sobre la inhibición de la enzima α -glucosidasa de levadura.

Los compuestos **42-44** fueron evaluados en el ensayo *in vitro* de inhibición de las enzimas α -glucosidasas; el compuesto **44** ya ha sido evaluado previamente y se ha reportado como un importante inhibidor de la enzima α -glucosidasa de levadura (Schmidt, *et al.*, 2012), por esta razón se consideró como un segundo control positivo. En la **Tabla 10** se muestran los valores obtenidos de CI_{50} y el porcentaje de inhibición de los compuestos evaluados.

Tabla 10. Resultados obtenidos en los ensayos sobre α -glucosidasas.

Muestra	CI_{50} (μ M ó ppm)	% Inhibición	R^2
Acarbosa (1)	$530 \pm 23.0 \mu$ M	89.74 ± 0.365	0.9986
Extracto acuoso	28.56 ± 0.843 ppm	99.50 ± 0.267	0.9962
Fracción orgánica de infusión	39.12 ± 2.404 ppm	92.00 ± 4.624	0.9955
Fracción acuosa de infusión	75.54 ± 2.097 ppm	85.57 ± 4.625	0.9970
Prunasina (43)	$1600 \pm 73 \mu$ M	98.15 ± 0.401	0.9998
(-)-Epi-catequina (44)	$332 \pm 20.0 \mu$ M	99.62 ± 0.988	0.9877
Piceina (42)	ND ($\gg \gg 40$ mM)	35.08 ± 0.728	-

ND= Valor no determinado

El efecto inhibitorio de la α -glucosidasa de levadura por parte de la prunasina (**43**) es novedoso y sugiere un efecto antihiper glucémico del producto natural. Es importante destacar que muchas especies que contienen glucósidos cianogénicos como la amigdalina y la prunasina se emplean como antidiabéticos en las prácticas médicas populares de muchos países orientales. Así por ejemplo, a partir de la especie *Eriobotrya japonica* que contiene amigdalina se elaboran varios preparados antihiper glucémicos (Xiangchi *et al.*, 2008; Kotowaroo *et al.*, 2008). Sin embargo, Tanaka y colaboradores demostraron que la amigdalina es poco efectiva como agente

hipoglucemiante; estos mismos autores consideran que los principios activos de *Eriobotrya japonica* son sus catequinas, ácido clorogénico y sus triterpenoides. A partir de la almendra amarga del *Prunus amygdalis*, rica en amigdalina, y de otras fuentes naturales con glicósidos cianogénicos se han patentado formulaciones para combatir el estado de hiperglucemia en pacientes con diabetes tipo 2 (Khayat y Sinai, 2006). De acuerdo a los autores la presencia del glicósido cianogénico es indispensable para la eficacia del preparado; además en Japón este compuesto se ha considerado tradicionalmente efectivo para tratar la diabetes. Otro ejemplo importante lo constituye la especie *Rhodiola rosea* (Crassulaceae) que contiene glicósidos cianogénicos con una aglicona de carácter alifático; esta especie es altamente apreciada por sus propiedades adaptógenas, antidepresivas y para el tratamiento de la diabetes (Panossian *et al.*, 2010). Por último, cabe destacar que también algunos productos sintéticos análogos al 4'-amino-4''-metoxi-6'-metilsulfanil-[1,1';2',1'']terfenil-3',5'-dicarbonitrilo ejercen efectos antihiperoglucémicos *in vivo* e inhiben las enzimas α -glucosidasas en un rango de concentraciones comprendido entre 5.70 y 25.9 μM (Singh *et al.*, 2009).

5.6. Cinética enzimática para la (-)-*epi*-catequina (44) y prunasina (43).

Considerando que el tipo de inhibición de la (-)-*epi*-catequina (44) aún no se ha caracterizado se realizó un estudio de cinética enzimática. El método para realizar estos ensayos fue el descrito por Oki y colaboradores (1999). Los datos generados se graficaron como el recíproco de la respuesta obtenida *vs* el recíproco de la concentración del sustrato utilizado. Como resultado, se obtuvieron una serie de rectas que pueden intersectarse o no en un mismo punto; ya sea el punto en el eje de las abscisas, en el eje de las ordenadas, o entre éstas. Para calcular las constantes inhibitorias (K_i) de cada compuesto se utilizó la ecuación de Dixon. Con las curva de las dobles recíprocos se puede determinar entonces de manera sencilla sí la inhibición de un producto es competitiva, no competitiva o acompetitiva (Kim *et al.*, 1999).

De acuerdo a la gráfica de Lineweaver-Burk (**Figura 15**) el producto 44 se comporta como un inhibidor no competitivo mixto al igual que la mayoría de los flavonoides (Tadera, *et al.*, 2006), ya que al aumentar su concentración se obtienen una

serie de rectas que se cortan por debajo del eje de las abscisas. Esto indica que puede haber una unión entre el producto **44** y la enzima tanto en el sitio activo, como cerca del mismo, así como entre el producto **44** y el complejo enzima sustrato (enzima-*p*-NPG), (Copeland, 2000). En este último caso la unión del inhibidor no afecto la unión con el sustrato. El ajuste ($r^2=0.9934$) permitió calcular los valores de la constante de inhibición competitiva (K_{ic}) y de la constante de inhibición no competitiva (K_{iu}), resultando una K_{ic} de 0.30 ± 0.114 y una K_{iu} de 0.08 ± 0.038 , resultados que concuerdan con lo observado en la gráfica para una inhibición mixta.

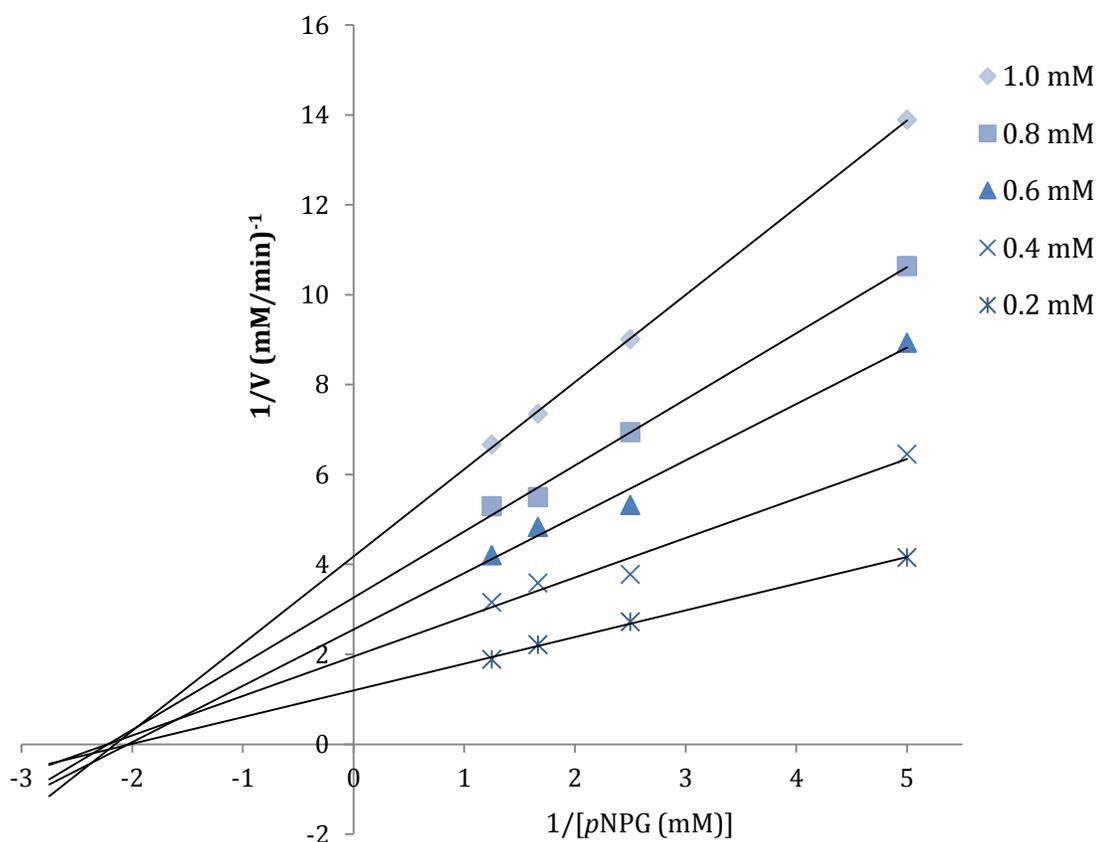


Figura 14. Curvas de Lineweaver-Burk del compuesto 44.

En el caso del compuesto **43**, las rectas tienen su punto de intersección por arriba del eje de las abscisas, por lo tanto se comporta también como un inhibidor de tipo mixto (Copeland, 2000). Con el ajuste ($r^2=0.9884$) se calcularon las constantes de inhibición, obteniendo los valores de 1.07 ± 0.312 para la K_{ic} y de 0.99 ± 0.0512 para la K_{iu} .

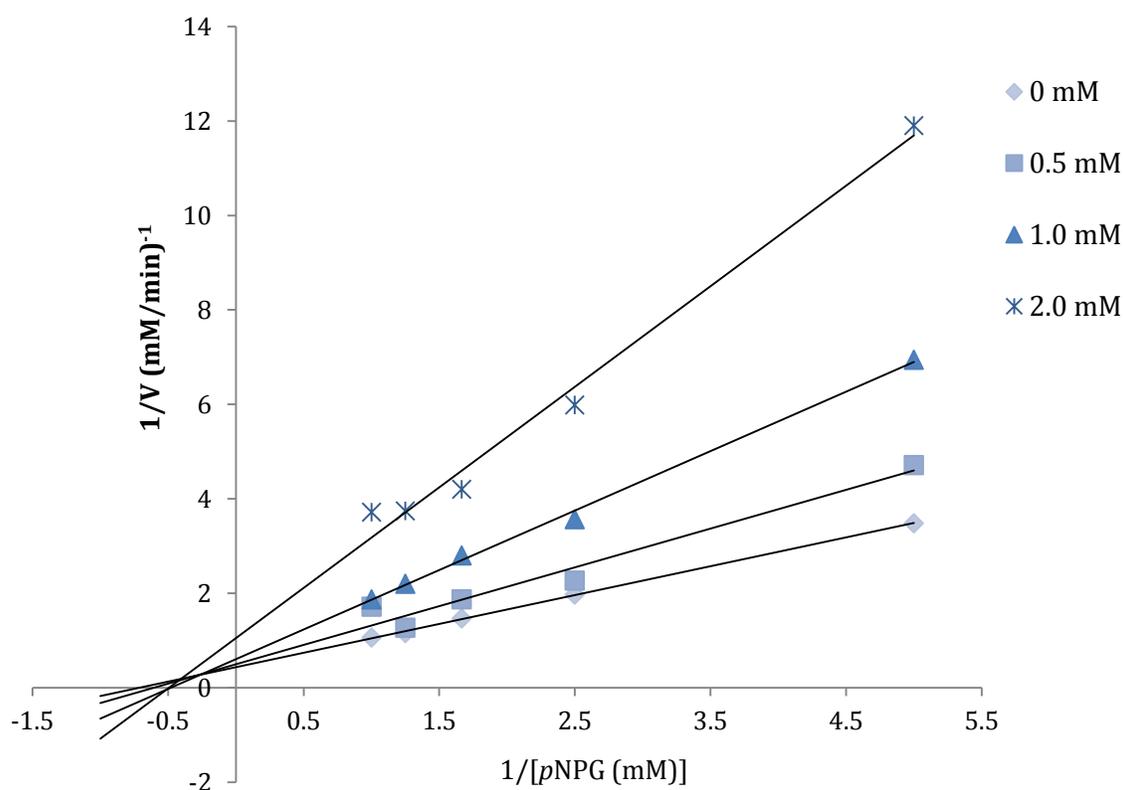


Figura 15. Curvas de Lineweaver-Burk del compuesto 43.

5.7 Resultados de acoplamiento molecular de los compuestos 43 y 44.

En los últimos años, el creciente interés en las herramientas computacionales para el estudio de los productos biodinámicos es un hecho bien documentado. De tal forma que la información estructural obtenida es invaluable en el descubrimiento de nuevas moléculas, o bien, en la modificación de moléculas conocidas con efectos

adversos indeseables. Además permiten predecir y establecer la naturaleza de las interacciones proteína-ligando y los grupos funcionales involucrados en las mismas mediante métodos de acoplamiento molecular (AM). Esta técnica involucra el uso de uno o más algoritmos de búsqueda específica, basados en simulaciones moleculares complejas para obtener la conformación optimizada de la proteína con su ligando que presente la menor energía libre total. En este contexto, se realizó la evaluación de los compuestos **43** y **44** mediante un estudio de acoplamiento molecular con el programa AutoDock 4.0. La enzima MAL12, perteneciente a la familia GH13, se utilizó para llevar a cabo los análisis de acoplamiento molecular; la enzima está formada por una cadena polipeptídica de 576 residuos. Los residuos catalíticos (Asp214, Glu276 y Asp349) se encuentran en el dominio N-terminal, como en todas las α -glucosidasas de la familia GH13 (Ferreira et al., 2010).

El análisis de la prunasina (**43**) sugiere que este compuesto puede unirse al sitio catalítico de la enzima α -glucosidasa formando puentes de hidrógeno con Leu-313, dos con Lys-156, dos con Asn-415, Tyr-158 y dos con Phe-314 (**Figura 17-c**). Por otro lado, el estudio de acoplamiento molecular para la (-)-*epi*-catequina (**44**) reveló que este compuesto puede unirse al sitio activo formando enlaces de hidrógeno con los aminoácidos Asn-415, Lys-156, Asp-233 y dos con Ile-419 de la enzima, pero también se une en otro sitio para formar el complejo ESI formando puentes de hidrógeno con Tyr-158, dos con Asn-415, Lys-156, Ser-241 y Asp-242 (**Figura 17-d y e**). Estos resultados concuerdan con los de la cinética enzimática, ya que como se dijo anteriormente en la inhibición mixta, el inhibidor se puede unir a la enzima en el sitio catalítico como se ha descrito en los casos de la quercetina, miricetina y luteolina (Xu, 2010).

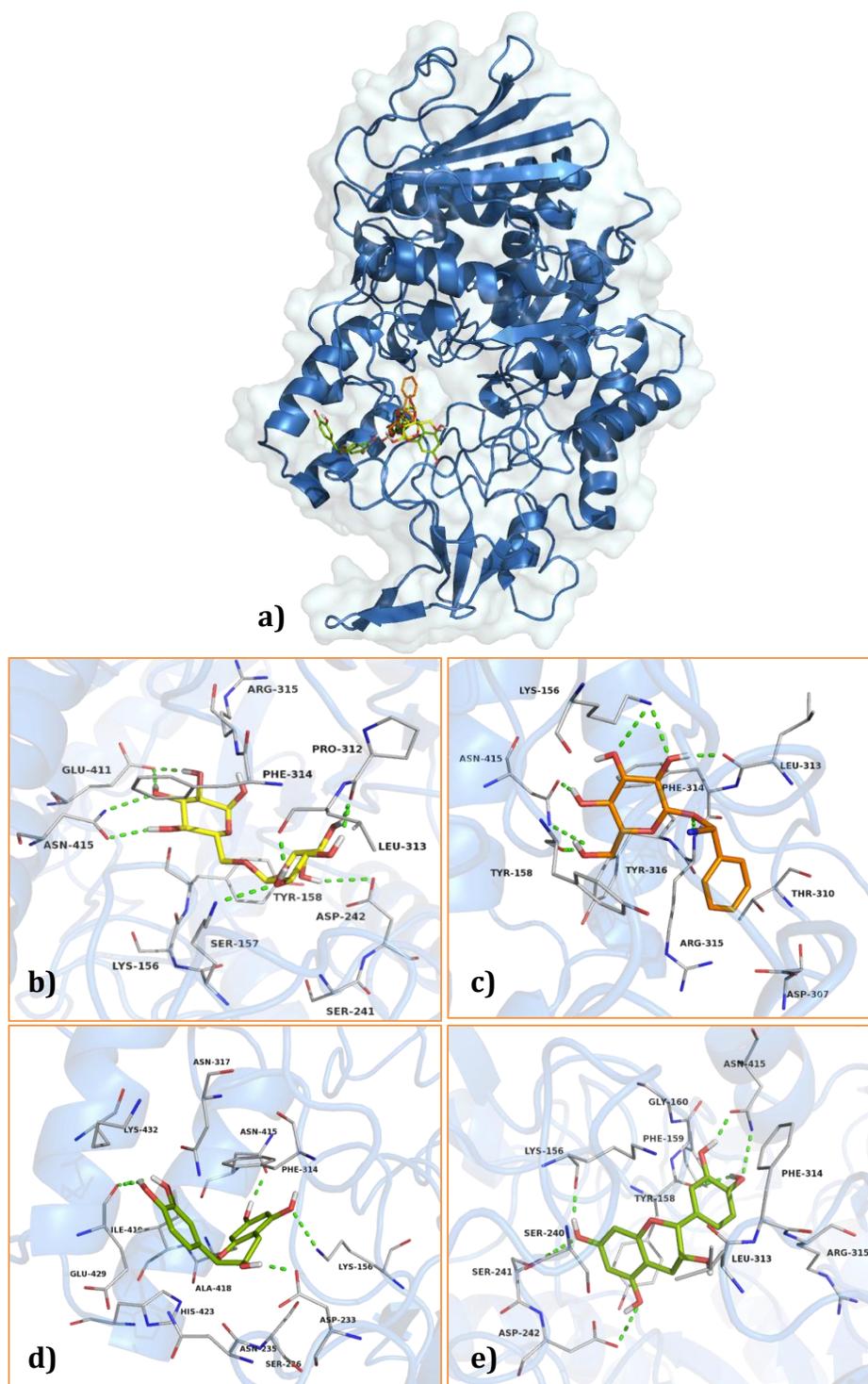


Figura 16. Resultados del acoplamiento molecular: a) Maltosa, compuesto 43 y 44 unidos a la proteína; **b)** Sitio catalítico de la maltosa; **c)** Sitio de unión para el compuesto 43; **d)** y **e)** Sitios de unión para el compuesto 44.

6. CONCLUSIONES.

a. Los estudios iniciales de toxicidad aguda de los extractos de *V. corymbosa* permitieron detectar que el extracto orgánico es tóxico para roedores, debido a la presencia de altas cantidades de prunasina en el mismo. En el caso de la infusión, los resultados indicaron que el preparado podría ser inocuo; sin embargo, la naturaleza del estudio y la presencia de prunasina no permiten predecir los efectos por el uso crónico de la infusión.

b. Se comprobó mediante ensayos *in vivo* que los extractos orgánico y acuoso de la especie *V. corymbosa* no poseen actividad hipoglucemiante en ratones a las dosis ensayadas. Sin embargo, se logró comprobar que el extracto acuoso posee actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasas lo que permitió detectar su efecto antihiper glucémico potencial. Esta información es consistente con el empleo de esta especie bajo la forma de “agua de uso” como auxiliar en el tratamiento de la DM2.

c. El estudio biodirigido del extracto acuoso de *V. corymbosa* mediante la aplicación del ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa de levadura permitió el aislamiento y caracterización de tres compuestos la piceina (**42**) y prunasina (**43**), este último de naturaleza cianogénica, y la (-)-*epi*-catequina (**44**). Todos se reportan por vez primera en la planta.

d. Los compuestos **43** y **44** fueron caracterizados como inhibidores mixtos de la enzima α -glucosidasa de levadura. La piceina en cambio fue inactiva. En consecuencia, los compuestos **43** y **44** son los principios activos mayoritarios de la infusión. Por lo anterior es importante corroborar con estudios posteriores la actividad *in vivo* del preparado.

e. La presencia de prunasina (**43**) en la planta en grandes cantidades debe ser motivo de alerta, ya que el uso continuo de la planta podría conducir a una

intoxicación por cianuro. Estos hallazgos deben ser señalados a los consumidores para evitar el uso indebido de la planta y prevenir los efectos indeseables relacionados con su consumo.

7. PERSPECTIVAS

- a. Continuar con los estudios químicos de la especie *V. corymbosa* con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios minoritarios y analizar las variaciones del contenido metabólico en función del método de extracción.
- b. Corroborar la actividad antihiper glucémica *in vivo* mediante ensayos de tolerancia a la sacarosa, maltosa y almidón.
- c. Realizar estudios de toxicidad crónica de la infusión en roedores con la finalidad de obtener una mayor información sobre la conveniencia de utilizar la especie en las prácticas médicas populares.

8. REFERENCIAS.

- Andrade-Cetto, A. (2010). "Mexican plants traditionally used in the treatment of type 2 diabetes". *Advances in Obesity. Diabetes Research UNAM*. Capitulo 12: 191-200.
- Asano, N. (2003). "Glucosidase inhibitors: update and perspectives on practical use." *Glycobiology* 13(10): 93R-104R.
- Asano, N. (2009). "Sugar-mimicking glycosidase inhibitors: bioactivity and application." *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 1479-1492.
- Asociación Mexicana de Diabetes. Página web <http://www.amdiabetes.org/medicamentos_para_tratamiento_diabetes.php>. (Acceso Sep-2013).
- Benalla, W., Bellahcen, S., Bnouhnam, M. (2010). "Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors". *Current Diabetes Review* 6(4): 247-254.
- Borges de Melo, E., Silveira, G. A., Carvalho, I. (2006). "α- and β-glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity." *Tetrahedron* 62: 10277-10302.
- Cai, T., Evans, M. F., Roberts, J. D., Phillipson, M. H., Gleba. (1991). "Polyphenolic compounds from *Croton Lechleri*." *Phytochemistry* 30(6): 2033-2040.
- Carbohydrate-active enzymes (Cazypedia.org). Pagina web <http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolases>. (Acceso Sep-2013).
- Chiba, S. (1997). "Molecular mechanism in α-glucosidase and glucoamylase." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61(8): 1233-1239.
- Copeland, R. A. (2000). "Enzymes, A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis." Segunda edición; Wiley-VCH, 129-135.
- Davis, L. A., Cai, Y., Davies, P. A., Lewis, J. R. (1996). "1H and 13C NMR Assignments of some green tea polyphenols." *Magnetic Resonance in Chemistry* 34: 887-890.

- Dommissie, A. R., Van Hoof, L., Vlietinck, J. A. **(1986)**. "Structural analysis of phenolic glucosides from Salicaceae by NMR spectroscopy." *Phytochemistry* 25(5): 1201-1204.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición **2012**. Diabetes mellitus: la urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., Mata, R. **(2013)**. "α-Glucosidase Inhibitors from *Brickellia cavanillesii*." *Journal of Natural Products* 75(5): 968-974.
- Ferreira, S. B., Sodero, A. C. R., Cardoso, M. F. C., Lima, E. S., Kaiser, C. R., Silva, F.P., Ferreira, V. F. **(2010)**. "Synthesis, Biological activity, and molecular modeling studies of 1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates as α-glucosidases Inhibitors." *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 2364-2375.
- Guerrero-Analco, J., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R. **(2007)**. "Antidiabetics properties of selected mexican copalchis of the rubiaceae family." *Phytochemistry* 68: 2087-2095.
- Hakamata, W., Kurihara M., Okuda, H., Nishio, T., Oku, T. **(2009)**. "Design and screening strategies for α-glucosidase inhibitors based on enzymological information." *Current Topic Medicinal Chemistry* 9: 3-12.
- Israili, H. Z. **(2011)**. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus." *American Journal of Therapeutics* 18: 117-152.
- Kang, W., Song, Y., Gu, X. **(2012)**. "α-glucosidase inhibitory *in vitro* and antidiabetic activity *in vivo* of *Osmanthus fragrans*." *Journal of Medicinal Plants Research* 6(14): 2850-2856.
- Khayat, E., Sinai, Y. M. **(2006)**. "Pharmaceutical compositions for alleviating excess levels of sugar in diabetic in diabetic patients." Patente Estadounidense US 2006/0257508 A1.
- Kim, M. J., Lee, S. B., Lee, H. S., Lee, S. Y., Baek, J. S., Kim, D., Moon, T. W., Robyt, J. F., Park, K. H. **(1999)**. "Comparative study of the inhibition of alpha-glucosidase, alpha-amylase, and cyclomaltodextrin glucoamyltransferase by acarbose,

isoaccharose, and acarviosine-glucose." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 371: 277-283.

- Kotowaroo, M. I., Mahomoodally, M. F., Gurib-Fakim, A., Subratty, A. H. **(2006)**. "Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible alpha-amylase inhibitory effects *in vitro*." *Phytotherapy Research* 20:228-231
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O. **(2011)**. "α-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes." *Pharmacognosy Review* 5(9): 19-29.
- Linn, W., Wofford, M., Elizabeth, M., Posey, M. **(2009)**. "Pharmacotherapy in Primary Care." *Mc Graw Hill, USA*, 279-288.
- Lorke, D. **(1983)**. "A new approach to practical acute toxicity testing." *Archives of Toxicology* 54: 275-287.
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I. **(2013)**. "Mexican antidiabetic herbs: valuable source of inhibitors of α-glucosidases." *Journal of Natural Products* 76: 468-483.
- Matsui, T., Tanaka, T., Tamura, S., Toshima, A., Tamaya, K., Miyata, Y., Tanaka, K., Matsumoto, K. **(2007)**. "α-glucosidase inhibitory profile of catechins and teaflavins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 99-105.
- Mohamed E. I., Bushra, E., Nur, E., Choudhary, M. I., Khan, S. N. **(2009)**. "Bioactive natural products from two sudanese medicinal plants *Doispyros mespiliformis* and *Croton zambesicus*." *Records of Natural Products* 3(4): 198-203.
- Moorthy, N. S. H. N., Ramos, M. J., Fernandes, P. A. **(2012)**. "Studies on α-glucosidase inhibitors development: Magic molecules for the treatment of carbohydrate mediated diseases." *Mini-reviews in Medicinal Chemistry* 12(8): 1-8.
- Myoung-Chong, S., Hye-Joung, Y., Tae-Sook, J., Kyong-Tai, K., Nam-In, B. **(2008)**. "Heterocyclic compounds from *Chrysanthemum coronarium* L. and their inhibitory activity on hACAT-1, hACAT-2, and LDL-oxidation." *Archives of Pharmacol Research* 31(5): 573-578.

- Norma Oficial Mexicana **NOM-062-ZOO-1999**, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Norma Oficial Mexicana. **NOM-015-SSA2-2010**, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
- Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y. (1999). "Inhibitory effect of α -glucosidase, inhibitors varies according to its origin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 550-553.
- Organización Mundial de la Salud, 2012. Pagina web <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>> (Acceso 14-Sep-2013).
- Panossian, A., Wikmana, G., Sarris, J. (2010). "Rosenroot (*Rhodiola rosea*): Traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy." *Phytomedicine* 17: 481-493.
- Ramírez, V. A. (2010). "Toxicidad del cianuro. Investigación bibliográfica de sus efectos en animales y en el hombre." *Anales de la Facultad de Medicina*. 71(1): 54-61.
- Rzedowski, J., Calderón, G. (2005). "Flora del bajío y de regiones adyacentes". *Instituto de Ecología* 135: 1-163.
- Saeidnia, S., Ghamarinia, M., Gohari, A. R., Shakeri, A. (2012). "Terpenes from the root of *Salvia hypoleuca* Benth." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 66: 2012-2020.
- Schmidt, S. J., Lauridsen, B. M., Dragsted, O. L., Nielsen, J., Staerk, D. (2012). "Development of a bioassay-coupled HPLC-SE-ttNMR platform for identification of α -glucosidase inhibitors in apple peel (*Malus x domestica* Borkh.)." *Food Chemistry* 135: 1692-1699.
- Singh, F. V., Parihar, A., Chaurasia, S., Singh, A. B., Singh, S. P., Tamrakar, A. K., Srivastava, A. K., Goel, A. (2009). "4.5,6-Diarylanthranilo-1,3-dinitriles as a new class of antihyperglycemic agents." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 2158-2161.

- Szkudelski, T. (2010). "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas." *Physiological Research*. 50: 536-546.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatzu, K., Matsuoka, T. (2006). "inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids." *Journal of Nutritional Science and Vitaminol* 52: 149-153.
- Takagaki, A., Nanjo, F. (2010). "Metabolism of (-)-epigallocatechin gallate by rat intestinal flora." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 1313-1321.
- Tanaka, K., Nishizono, S., Makino, N., Tamaru, S., Terai, O., Ikeda, I. (2008). "Hypoglycemic activity of *Eriobotrya japonica* seeds in type 2 diabetic rats and mice." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72(3): 686-693.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 22 Sep 2013 <<http://www.tropicos.org/Name/40023411>>.
- Trumbull, E. R., Bianchi, E., Eckert, D. J., Wiedhopf, R. M., Cole, J. R. (1975). "Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae)." *Stanford Research Institute* 64(9): 1976-1975.
- Wojciak-Kosiora, M., Sowaa, I., Kocjana, R., Nowakb, R. (2013). "Effect of different extraction techniques on quantification of oleanolic and ursolic acid in *Lamii albi flos*." *Industrial Crops and Products* 44: 373- 377.
- Xiangchi, Z., Biqian, L., Ling, L., Yongjiang, L., Junming, G., Jianguo, Y. (2008). "Manufacture of vinegar containing *Eriobotrya japonica* extract. " Patente 2008 CN101096629 A 20080102.
- Xu, H. (2010). "Inhibition Kinetics of Flavonoids on Yeast α -Glucosidase Merged with Docking Simulations." *Protein & Peptide Letters* 17: 1270-1279.
- Zeng, X., Qiu, Q., Jiang, C., Jing, Y., Qiu, G., He, X. (2011). "Antioxidant flavanes from *Livistona chinensis*." *Fitoterapia* 82: 609-614.