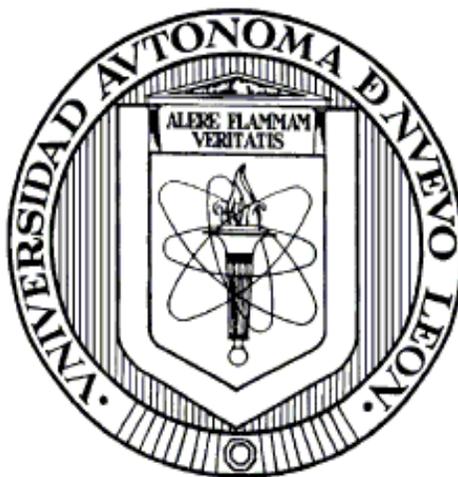


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Aislamiento y caracterización estructural de nuevos Inhibidores de
 α -glucosidasa a partir de las raíces de *Smilax sp.*

Por

Q.F.B ADRIANA ROMO PÉREZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA

ABRIL 2013

Aislamiento y caracterización estructural de nuevos Inhibidores de
 α -glucosidasa a partir de las raíces de *Smilax sp.*

Aprobación de la tesis:

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Presidente

Secretario

Vocal

Dra. María Teresa González Garza

Subdirectora de Estudios de Posgrado

Aislamiento y caracterización estructural de nuevos Inhibidores de
 α -glucosidasa a partir de las raíces de *Smilax sp.*

Revisión de la tesis

Comité tutorial

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas

M.C. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez

Dr. Víctor Manuel Rosas García

Dra. María Teresa González Garza

Subdirectora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Adriana Romo Pérez

Fecha de Graduación: Abril 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Aislamiento y caracterización estructural de nuevos Inhibidores de α -glucosidasa a partir de las raíces de *Smilax sp.*

Número de páginas: 91

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia.

Área de Estudio: Química y Farmacología de productos naturales

Propósito y Método del Estudio: La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por la incapacidad del organismo para biotransformar la glucosa sanguínea. Actualmente es la segunda causa de muerte a nivel nacional. El objetivo de la terapia antidiabética es normalizar los niveles de glucosa en sangre, por lo cual se prescriben los inhibidores de α -glucosidasa, enzimas encargadas de la hidrólisis de oligosacáridos ingeridos en di- y monosacáridos que posteriormente son absorbidos en el intestino. Los inhibidores de α -glucosidasa prescritos hoy en día son compuestos naturales o sus derivados, lo cual da evidencia de lo promisorio que ha resultado la prospección químico-biológica de productos naturales. En el presente proyecto de investigación se propuso la búsqueda de nuevos inhibidores de α -glucosidasa a partir de tres especies de plantas seleccionadas mediante criterio etnomédico y quimiotaxonómico. Así, se realizó un estudio biodirigido para encontrar la especie vegetal con mayor actividad inhibitoria de α -glucosidasa, para posteriormente someterla a un estudio fitoquímico que permitiera el aislamiento y la caracterización estructural de productos naturales, mediante

diversas técnicas cromatográficas y espectroscópicas, a partir de las fracciones con mayor actividad inhibitoria de α -glucosidasa

Contribuciones y Conclusiones: Se determinó la actividad enzimática de los extractos orgánicos demostrando que *Smilax sp.* resultó diez veces más potente ($CI_{50} = 0.49 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$) que el control positivo quercetina ($CI_{50} = 5.28 \pm 0.57 \mu\text{g/mL}$), razón por la cual se realizó el fraccionamiento del extracto crudo. Se ponderó la actividad inhibitoria enzimática de las 18 fracciones obtenidas (A-S), observándose que las fracciones K-R resultaron muy activas (Rango de $CI_{50} = 0.097-0.92 \mu\text{g/mL}$). A partir de algunas fracciones activas se aislaron tres esteroides y un flavonoide, los cuales fueron caracterizados como 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona, β -sitosterol, β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido y palmitato de β -sitosterilo, mediante el análisis de sus datos espectroscópicos. De los compuestos evaluados, el β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido presentó mayor magnitud inhibitoria de la α -glucosidasa.

FIRMA DEL ASESOR: _____
Dr. Edgar Abraham García Zepeda

AGRADECIMIENTOS

Facultad de Ciencias Químicas de la UANL

Por las facilidades otorgadas durante el presente proyecto de investigación.

CONACYT

Por la beca provista durante la realización de este proyecto de investigación

MC. Antonio Nieto Camacho

Por la realización de los ensayos biológicos del presente proyecto y por las facilidades otorgadas durante la estancia realizada en el Laboratorio de Ensayos biológicos, UNAM.

Facultad de Química de la UNAM

Por la realización de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear para la terminación de este proyecto.

Comité tutorial

Por la ayuda brindada durante todo el proyecto para el mejoramiento de este trabajo de investigación.

Ma. Del Rayo Camacho Corona

Por todas las facilidades otorgadas para poder realizar la parte fitoquímica de este proyecto en el Laboratorio de Química de Productos Naturales.

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada:

A Dios por darme la oportunidad de existir, de terminar este proyecto y por todas las cosas buenas que me ha dado.

A mis padres Ignacio Romo Perea y Rosaura Pérez Cruz por todo su apoyo, su amor, su comprensión, y por todo lo que soy.

A mis hermanos Mariel, José, Isabel y Andrés, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

A mis hermanos que conocí aquí en Monterrey: Paola, Pablo, Wendy, Joel, Perla, Mariel, Emily, Josué, Ramiro, Anahí, Joana, Mirna, Mariana, Melisa, Fabiola Che, por estar siempre pendiente de mí y de mi estado emocional 😊.

A Miguel, por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A gente que considero mis amigos, los cual conocí durante mi estancia en el Posgrado: Olivia, Ivette, Eder, Panchito, Margatita, Ali, Daniela Xulu, Erick, Mayra, Pane, Héctor, Adri Hdez., Enrique, Eduardo Ramírez por todos los momentos y pláticas que pase con ustedes.

A todos los mis amigos que conocí durante mi estancia en el laboratorio de QPN: Nallely, Juan Manuel, Paty Guerrero, Iris Larissa, Eunice, Rodrigo, Esther, Fernando, Aldo, Cristal, Santos, Ceci, Yolanda, Nancy, a la MC Chayito y a la Maestra Paty, gracias por estar apoyándome y alentándome siempre para seguir adelante, por todos los chistes buenos y malos, por todos los abrazos y momentos chuscos, de verdad muchas gracias.

A mis amigos de Álamo: Claudia, Laura, Fabiola, Feliciano, Sharo, gracias por todo su apoyo y comprensión.

No podían faltar mis amigas y amigos del fútbol, las cuales siempre he querido y apreciado mucho: Magda Rostro, Tania Salas, Arlet Tepexpa, Karen Ontiveros, Kathy, Pamela, Fátima, Daniel, Luis, Dimas por aguantar mis arranques, por hacer más divertido el juego.

También quiero dedicar esta tesis a todos los profesores que me transmitieron parte de sus conocimientos y por todo el apoyo que me ofrecieron, en especial a: Dra. Ma. Del Rayo Camacho, Dr. Isaías Balderas, Dra. Lucía Gpe. Cantú y Dr. Edgar García.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. DIABETES	1
1.1. Introducción	1
1.2. Generalidades	2
1.3. Sintomatología	2
1.4. Etiología	3
1.4.1. Diabetes mellitus tipo 1	3
1.4.2. Diabetes mellitus tipo 2	3
1.5. Epidemiología	4
1.6. Diabetes mellitus tipo 2	5
1.6.1. Fisiopatología	6
1.7. Tratamiento	7
1.7.1. Tratamiento no farmacológico	7
1.7.2. Tratamiento farmacológico	8
1.7.3. Productos naturales antidiabéticos	10
1.7.4. Inhibidores de α -glucosidasa	12
1.8. Problemática actual	16
2. JUSTIFICACIÓN, OBJETO DE ESTUDIO, HIPÓTESIS y OBJETIVOS	18
2.1. Justificación del proyecto	18
2.2. Objeto de estudio	18
2.2.1. <i>Ibervillea sonorae</i>	19
2.2.2. <i>Smilax sp.</i>	19
2.2.3. <i>Senecio angulifolius</i>	20
2.3. Hipótesis	21
2.4. Objetivos	21
2.4.1. Objetivo general	21
2.4.2. Objetivo específicos	21
3. ANTECEDENTES	22
3.1. Generalidades	22
3.2. Perfil fitoquímico	23

3.3. Importancia farmacológica del género <i>Smilax</i>	25
4. MATERIALES y MÉTODOS	28
4.1. Material y equipo	28
4.2. Material vegetal	29
4.3. Obtención de los extractos orgánicos a microescala	30
4.4. Estudio fitoquímico	31
4.4.1. Obtención del extracto orgánico a macroescala	31
4.4.2. Maceración del extracto vegetal	31
4.4.3. Fraccionamiento del extracto orgánico	32
4.5. Ensayo enzimático	32
4.5.1. Ensayo de inhibición de α -glucosidasa.	32
4.5.2. Metodología	32
4.5.3. Análisis estadístico	33
4.6. Estudio biodirigido	33
4.7. Aislamiento de compuestos	34
4.8. Identificación de compuestos	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
5.1. Rastreo primario de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa	36
5.2. Estudio fitoquímico de <i>Smilax</i>	39
5.3. Determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de las fracciones obtenidas del extracto crudo de <i>Smilax sp.</i>	40
5.4. Aislamiento y caracterización estructural de compuestos	43
5.4.1. Fracción Q	43
5.4.2. Fracción P	44
5.4.2.1. Elucidación estructural de β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido	45
5.4.3. Fracción K	51
5.4.3.1. Elucidación estructural de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- β -D-glucopiranososa	53
5.4.4. Fracción G	58
5.4.4.1. Elucidación estructural de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona	60
5.4.5. Fracción B	66
5.4.5.1. Elucidación estructural de palmitato de β -sitosterilo	67
5.4.6. Fracción C	71

5.4.6.1. Elucidación estructural de β -sitosterol	72
5.5. Determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de las subfracciones obtenidas	76
5.5.1. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de la fracción Q	76
5.5.2. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de la fracción P	76
5.5.3. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de la fracción K	77
5.5.4. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de la fracción G	78
5.6. Determinación de la actividad inhibitoria de los compuestos obtenidos	79
6. CONCLUSIONES	82
7. PERSPECTIVAS	84
8. REFERENCIAS	85

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Factores relacionados con la ocurrencia de DMT2	3
2. Principales causas de mortalidad en México	5
3. Complicaciones de la DMT2	7
4. Agentes hipoglucemiantes.	12
5. Mecanismo con inversión de la estereoquímica	15
6. Mecanismo con retención de la estereoquímica	16
7. Distribución de especies del género <i>Smilax</i> en el mundo	23
8. Metabolitos aislados de especies del género <i>Smilax</i> .	24
9. Algunas especies del género <i>Smilax</i>	27
10. Especies utilizadas para la selección del objeto de estudio	30
11. Hidrólisis de <i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucopiranosido con la enzima α -glucosidasa.	32
12. Rastreo primario de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa a 1 ppm.	36
13. Rastreo primario de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa a 10 ppm.	37
14. Rastreo primario de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa a 100 ppm.	37
15. Rastreo primario de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa a 1000 ppm.	37
16. Esquema de fraccionamiento de Q.	43
17. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido.	47
18. Espectro de RMN- ^{13}C (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido.	48
19. Experimento DEPT-135 de β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido	49
20. Esquema de fraccionamiento de K.	52

21. Ampliación del espectro de RMN- ¹ H de la 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-β-D-glucopiranososa	55
22. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-β-D-glucopiranososa.	56
23. Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-β-D-glucopiranososa.	57
24. Esquema de fraccionamiento de G.	58
25. Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CD ₃ COCD ₃) de los sólidos AR5 .	59
26. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona.	63
27. Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona	64
28. Experimentos DEPT-135 del 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona.	65
29. Espectro de RMN- ¹ H (400MHz, CDCl ₃) del palmitato de β-sitosterilo.	69
30. Espectro de RMN- ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) del palmitato de β-sitosterilo.	70
31. Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del β-sitosterol.	74
32. Espectro de RMN- ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) del β-sitosterol	75
33. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de la fracción Q.	76
34. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de la fracción P.	77
35. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de la fracción K.	78
36. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de la fracción G.	79

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Principales fármacos utilizados en el tratamiento de la diabetes.	8
2. Inhibidores de α -glucosidasa en investigación y/o en el mercado.	12
3. Códigos utilizados para la identificación de los extractos orgánicos.	36
4. Concentración Inhibitoria Media de los extractos orgánicos y quercetina.	38
5. Fracciones obtenidas del extracto <i>Smilax sp.</i>	40
6. Porcentajes de inhibición de α -glucosidasa a tres concentraciones.	40
7. Concentración Inhibitoria Media de las fracciones más potentes	42
8. Datos espectroscópicos de β -sitosteril-3-O-D-glucopiranosido	50
9. Datos espectroscópicos de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona	61
10. Datos espectroscópicos del palmitato de β -sitosterilo	68
11. Comparación de los datos espectroscópicos del β -sitosterol	73

NOMENCLATURA

ATP	Adenosina trifosfato
a. de C.	antes de Cristo
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
Cm	Centímetro
Cols.	Colaboradores
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DL ₅₀ :	Dosis letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP-IV	Dipeptidilpeptidasa-IV
ECV	Enfermedad cardiovascular
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
GLP-1	Glucagon like peptide-1
G	Gramos
°C	Grados Celsius
H	Hora
Hz	Hertz

IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
L	Litro
m	Metro
MHz	Megahertz
Min	Minutos
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
msnm	Metro sobre el nivel del mar
NF	Factor nuclear
nm	Nanómetros
%	Porcentaje
Pf	Punto de fusión
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso Molecular

Ppm	Partes por millón
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SSa	Secretaria de Salud
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta
UV	Ultravioleta
Λ	Longitud de onda

CAPÍTULO 1

DIABETES

1.1 Introducción

Desde la antigüedad, los productos naturales, en especial las plantas, han sido una fuente importante de medicamentos. Éstas han sido la base de los sistemas de medicina tradicional en todo el mundo y siguen proporcionando a la humanidad nuevos remedios para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como la diabetes y el cáncer [1-2].

La investigación química y farmacológica de las plantas medicinales ha provisto de nuevos compuestos para el tratamiento de la diabetes, entre los que se destacan la metformina, el miglitol y la exenatida [2-3].

La diabetes es un desorden endócrino que conlleva a complicaciones de salud graves como la insuficiencia renal, la catarata diabética, la ceguera, las enfermedades cardiovasculares (ateroesclerosis), las cuales pueden culminar en una muerte prematura [1]. A nivel nacional, la diabetes constituye la segunda causa de muerte y su frecuencia actual esta evidenciada por más de 347 millones de personas diabéticas en el mundo [4].

A pesar de la diversidad de estrategias disponibles para el tratamiento de la diabetes, no se ha logrado la normalización eficiente de la glucosa de los pacientes diabéticos y por tanto, no se ha logrado evitar la progresión

(complicaciones) de la enfermedad, por lo cual, algunas de las investigaciones más recientes están orientadas al descubrimiento de nuevos fármacos que disminuyan los niveles de glucosa en sangre. Así, la estrategia para reducir los niveles anormales de glucemia consiste en la inhibición de las enzimas responsables de la digestión de carbohidratos a nivel del intestino delgado [5].

1.2 Generalidades

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por hiperglucemia (aumento de glucosa sanguínea) que surge como consecuencia de una absoluta o relativa deficiencia de secreción de insulina, resistencia a la acción de la insulina, o ambas [6-7].

Existen tres tipos de diabetes: diabetes mellitus tipo 1 (DMT1, también llamada insulino dependiente), diabetes mellitus tipo 2 (DMT2, también llamada no insulino dependiente) y diabetes gestacional. La diabetes mellitus tipo 1 se considera una enfermedad autoinmune debido a que el sistema inmunitario ataca las células- β del páncreas y las destruye [4,7]. La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad multifactorial caracterizada por una alteración en la secreción de insulina y resistencia a la insulina [8]. La diabetes mellitus gestacional se desarrolla durante el embarazo y desaparece cuando el embarazo es terminado [9]. De los tres tipos de diabetes, la DMT2 es la de mayor importancia por su incidencia e implicaciones a nivel socioeconómico y de salud.

1.3 Sintomatología

La diabetes es caracterizada por tres conocidos síntomas: polidipsia (sed excesiva), polifagia (hambre excesiva) y poliuria (micción excesiva), además de pérdida de peso, somnolencia, fatiga, trastornos de visión, infecciones en la piel, parestesia en manos o pies [9].

1.4 Etiología

1.4.1 Diabetes mellitus tipo 1(DMT1)

La DMT1 se describe como una enfermedad autoinmune en la que se incorpora una proteína extraña en las células- β de los islotes pancreáticos, quizá a través de una infección viral. En respuesta, los linfocitos del paciente atacan a la proteína extraña y, de manera colateral, destruyen la célula- β . Esto lleva a un estado de deficiencia absoluta de insulina [10].

1.4.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

Diversas investigaciones han evidenciado la posible etiología de la DMT2. La mayoría de las ideas predominantes se pueden clasificar en alguna de las siguientes categorías: predisposición genética, desequilibrio endocrino, dieta hipercalórica, sedentarismo, obesidad, hipertensión, inflamación crónica y estrés oxidativo (Figura 1) [8, 9].

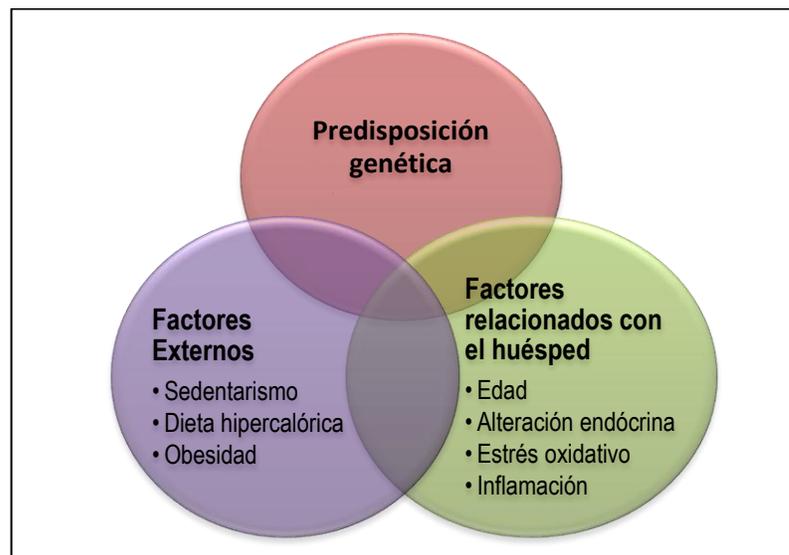


Figura 1. Factores relacionados con la ocurrencia de DMT2

Existen evidencias de que la respuesta inmune innata anormal e inflamación crónica están relacionadas con el desarrollo de la DMT2. La inflamación desempeña un papel en la prevención del daño tisular, el restablecimiento de la homeostasis del tejido y la destrucción de agentes infecciosos. Sin embargo, ésta es originada como respuesta a la activación del sistema inmune innato al detectar de manera no específica agentes externos, tales como patógenos, sustancias químicas (glucosa) o lesión física. Durante este proceso, varias citoquinas pro-inflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucinas IL-1 β e IL-6, son liberadas por los macrófagos. Estas citoquinas pueden incrementar la resistencia a la insulina directamente en los adipocitos, músculo esquelético y células hepáticas, así como un daño en la células- β del páncreas, lo que conduce a una disrupción sistémica de sensibilidad a la insulina y a la alteración en la homeostasis de la glucosa [8,10].

Las citoquinas están asociadas con la generación de radicales libres que contienen carbono, oxígeno y nitrógeno [10]. Estos radicales libres son especies moleculares muy reactivas, que ocasionan estrés oxidativo, ya sea por el incremento de los mismos o por la disminución de la concentración de antioxidantes endógenos, lo que en consecuencia puede ocasionar un daño tisular [11].

La obesidad y el síndrome metabólico son condiciones asociadas al estrés oxidativo e inflamación que pueden favorecer la progresión de la resistencia a la insulina en DMT2 [8].

1.5 Epidemiología

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta más de 347 millones de personas con diabetes en el mundo y prevé que las muertes por diabetes se duplicarán entre 2015 y 2030 [4]. De acuerdo a los datos de la Secretaría de Salud, la diabetes ocupó la segunda posición de las principales

causas de muerte en México en 2008 (Figura 2) [12]. En el 2010, el número de defunciones se incrementó de 77,699 a 82,964, de las cuales, el 43.2% se atribuyeron a complicaciones renales o cardíacas [12-13]. La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa, con pronóstico poco favorable entre la población mexicana, pues en ella influyen factores asociados a los malos hábitos alimenticios, sedentarismo y sobrepeso [4, 14]. De los tres tipos de diabetes, la DMT2 es responsable del 90-95 % de todos los casos de diabetes [1, 15].

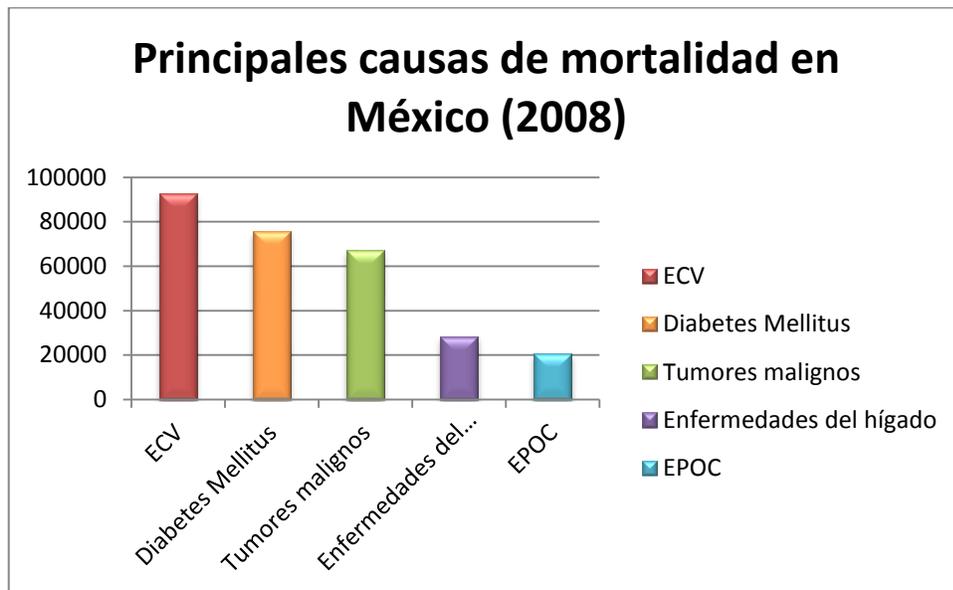


Figura 2. Principales causas de mortalidad en México

1.6 Diabetes Mellitus Tipo 2

La DMT2 es una condición heterogénea resultante de la disfunción de la célula β -pancreática y/o de la resistencia a la insulina, debido a la interacción de factores genéticos y ambientales (edad, dieta hipercalórica, sedentarismo, obesidad, historia familiar) [6, 15-16]. La hiperglucemia se considera el primer factor de riesgo en el desarrollo de la diabetes y sus complicaciones. Una exposición por años a altos niveles de glucosa en sangre causa efectos tóxicos en la estructura y función de los órganos, incluyendo el islote pancreático [10].

Debido a que la hiperglucemia en la diabetes se hace crónica, la glucosa que normalmente sirve como sustrato, señal y combustible, se convierte en toxina. A medida que persiste la hiperglucemia, la célula- β del páncreas sufre deterioro, cada vez segrega menos insulina lo que conlleva a la pérdida de su función [11]. Otras de las complicaciones que se presentan durante la hiperglucemia es la resistencia a la insulina que se define como un estado en el que la capacidad de las células diana para responder a niveles normales de insulina se reduce [15]. Por tanto, defectos en la acción y secreción de la insulina traen como consecuencia un déficit de insulina en el músculo esquelético, hígado y tejido adiposo [5, 8], lo cual conduce a una disminución en la eficacia para llevar a cabo sus funciones metabólicas [10].

1.6.1 Fisiopatología

La manifestación de la DMT2 suele ser un proceso continuo de resistencia a la insulina que culmina en el fracaso de la secreción de insulina aumentada para compensar la resistencia a la insulina. Inicialmente, en la DMT2, la insulina que estimula el transporte de la glucosa en el músculo esquelético se ve afectada y como compensación, las células del páncreas presentan una secreción aumentada de insulina, ocasionando hiperinsulinemia. La resistencia a la insulina periférica, en combinación con un deterioro en la fase temprana de la secreción de insulina, da como resultado la hiperglucemia [15,6].

En fase terminal de la DMT2, los cambios en la señalización de la insulina, como la incapacidad de la insulina para inhibir la gluconeogénesis hepática, se acompañan de un deterioro de la función de la célula pancreática. En esencia, la progresión a la DMT2 está totalmente declarada cuando la hipersecreción de insulina de una célula- β no compensa la resistencia a la insulina [6].

Las complicaciones de la DMT2 incluyen enfermedades microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y complicaciones macrovasculares (infarto

al miocardio, enfermedad vascular periférica, enfermedad cerebrovascular) (Figura 3). Las complicaciones macrovasculares son consideradas la primera causa de mortalidad en los pacientes diabéticos [6, 8].

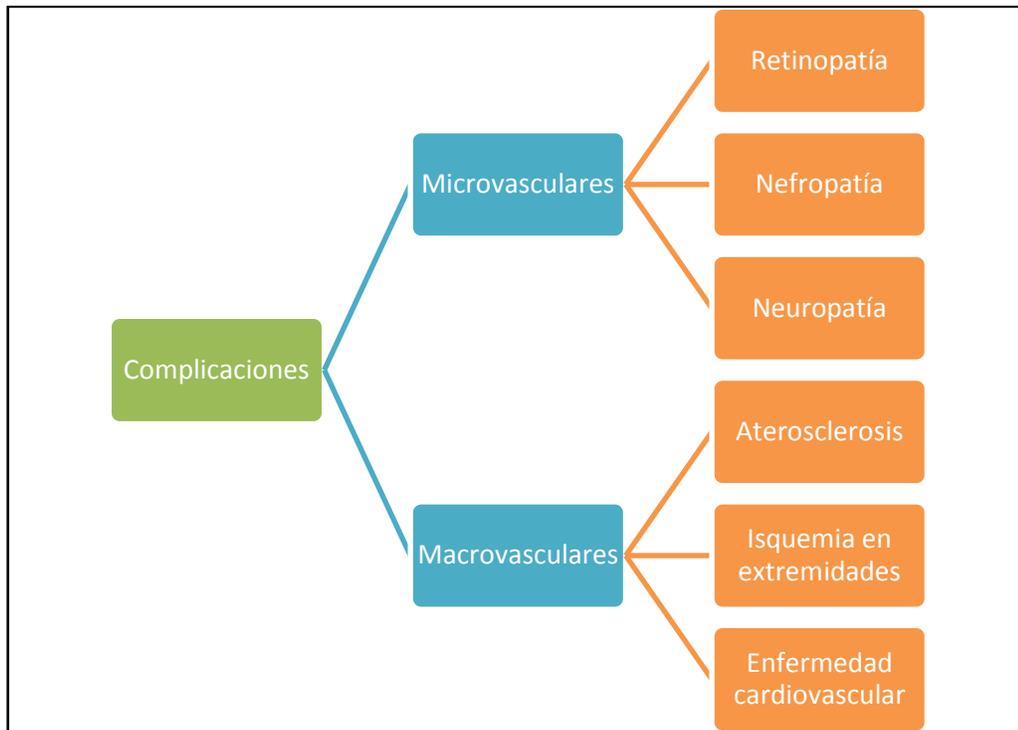


Figura 3. Complicaciones de la DMT2.

1.7 Tratamiento

1.7.1 Tratamiento no farmacológico

La primera línea de tratamiento para la DMT2 son los cambios en la dieta y el ejercicio. Las dietas hipocalóricas inducen la pérdida de peso, la disminución e incluso, la normalización de la glucosa en plasma. El mecanismo de la pérdida de peso, mejora la homeostasis de la glucosa seguido de una mejoría de la función hepática y la resistencia periférica a la insulina. La pérdida de peso y el ejercicio aumentan la sensibilidad a la insulina, la utilización de

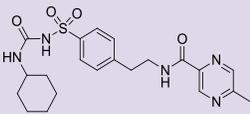
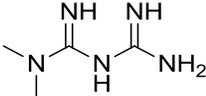
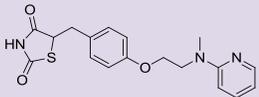
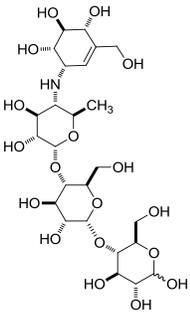
glucosa y mejora los perfiles de lípidos y lipoproteínas. Sin embargo, el cumplimiento de muchos pacientes es un problema significativo [6].

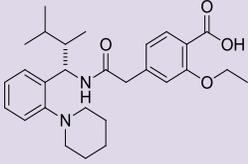
1.7.2 Tratamiento farmacológico

La terapia farmacológica se inicia cuando el tratamiento no farmacológico no permitió controlar adecuadamente los niveles de azúcar en la sangre. A la fecha, la meta de toda estrategia para el tratamiento de la DMT2 es disminuir las concentraciones de glucosa en sangre, a niveles que representen el rango normal [16], por lo que se recurre a medicamentos antidiabéticos como la propia insulina, las sulfonilureas [17] y meglitinidas [18] (promotores de la secreción de insulina), biguanidas (hipoglucemiantes) [17], tiazolidinodionas o glitazonas (disminuyen la resistencia a las funciones de la insulina) [19], inhibidores de la α -glucosidasa (alteran la velocidad de hidrólisis y absorción de oligosacáridos) [9], miméticos de incretina GLP-1 (mimetizan al péptido 1 tipo glucagón), inhibidores de la dipeptidilpeptidasa IV (aumentan la concentración de GLP-1) (Tabla 1) [20].

La combinación de la terapia para el tratamiento de la DMT2 se ha vuelto muy frecuente [9,17].

Tabla 1. Principales fármacos utilizados en el tratamiento de la diabetes.

GRUPO	MECANISMO DE ACCIÓN	EFFECTOS SECUNDARIOS	EJEMPLO
Sulfonilureas	Estimula la secreción de insulina por la célula β pancreática, a través de su unión a un canal de potasio-dependiente de ATP.	Hipoglucemia, alergia en piel, dolor de cabeza, aumento de peso, fatiga, náuseas, vómitos y daño hepático [9].	 <p>Glipizida</p>
Biguanidas	Actúan a dos niveles: 1) en el músculo, aumentando la entrada de glucosa a las células y, 2) en el hígado, disminuyendo la liberación de glucosa.	Mayor frecuencia: diarrea, dolor abdominal, náuseas y vómitos; con menor frecuencia: alteraciones del gusto o mal absorción de la vitamina B12 [9].	 <p>Metformina</p>
Glitazonas	Actúan a nivel muscular y hepático disminuyendo la resistencia a la insulina y, en menor medida, disminuye la producción hepática de glucosa.	Aumento de peso, hepatotoxicidad, edemas, incremento de la incidencia de insuficiencia cardíaca, aumento de fracturas [17, 19].	 <p>Pioglitazona</p>
Inhibidores de α-glucosidasa	Actúan inhibiendo las enzimas que hidrolizan los oligosacáridos a di- y monosacáridos, cual limita su absorción.	Los efectos secundarios se producen a nivel gastrointestinal: dolor abdominal, meteorismo y diarrea [9].	 <p>Acarbosa</p>

<p>Meglitinidas</p>	<p>Estimulan la secreción pancreática al cerrar canales de K dependientes de ATP en la célula β del páncreas actuando sobre una proteína distinta a la diana de las Sulfonilureas.</p>	<p>Trastornos visuales, alteraciones gastrointestinales, rinitis, bronquitis, dolor de espalda, aumento de peso [18].</p>	 <p>Repaglinida</p>
<p>Miméticos de incretina</p>	<p>Actúan sobre receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G.</p>	<p>Hipoglucemia, alteraciones gastrointestinales [20].</p>	<p>H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂</p> <p>Exenatida</p>
<p>Inhibidores de dipeptidil-peptidasa-IV (DPP-IV)</p>	<p>Aumentan la concentración de la incretina GLP-1 al inhibir la DPP-IV, encargada de la descomposición de la GLP-1.</p>	<p>Congestión nasal, secreción nasal, dolor de garganta, dolor de cabeza, náusea, vómito, pérdida de apetito, diarrea. Puede causar pancreatitis [20].</p>	 <p>Sitagliptina</p>

1.7.3 Productos naturales antidiabéticos: una alternativa para el tratamiento de diabetes

Las plantas medicinales juegan un papel importante en el manejo de la diabetes mellitus, especialmente en países en desarrollo donde los recursos son escasos [2]. Las plantas medicinales usadas para tratar condiciones de

hiperglucemia son de considerable interés para la comunidad etnobotánica ya que se ha evidenciado que las plantas han mostrado diversos grados de actividad hipoglucemiante y anti-hiperglucémica [2].

Las familias de plantas que han exhibido igual o mayor actividad hipoglucemiante que los fármacos comerciales comprenden la familia Lamiaceae, Leguminosae, Liliaceae, Cucurbitaceae, Asteraceae, Moraceae, Rosaceae, Euphorbiaceae y Araliaceae [2]. Se ha reportado que ciertas especies de plantas de dichas familias fueron evaluadas en pruebas clínicas con pacientes diabéticos tipo 1 y 2 demostrando su eficacia en reducir los niveles de glucosa en sangre. Así, el control de la glucosa sanguínea en pacientes con DMT2 se logró con la administración de extractos de: *Momordica charantia*, *Gymnema sylvestre*, *Vaccinium myrtillus*, *Allium sativum*, *Aloe vera*, *Asteracanthus longifolia*, *Bauhinia forticate*, *Atriplex halium*, *Polygala senega*, *Panax quinquefolius*, *Myrcia uniflora*, *Ocimum sanctum*, *Opuntia streptacantha*, *Trigonella foenum*, *Hordeum vulgare*, *Ginkgo biloba*, *Withania somnifera*, etcétera [1-2, 21-22].

Algunos compuestos obtenidos de productos naturales que han mostrado actividad antidiabética importante son: radicamina A (1), schulzeina A (2), el ácido deshidrotetrametenólico (3), la β -homofuconojirimicina (4), el ácido corosólico (Glucosol[®]) (5), ácido 4-(α -rahmnopiranosil)-elágico, mirciacitrina IV, acarbosa, etcétera [21] (Figura 4).

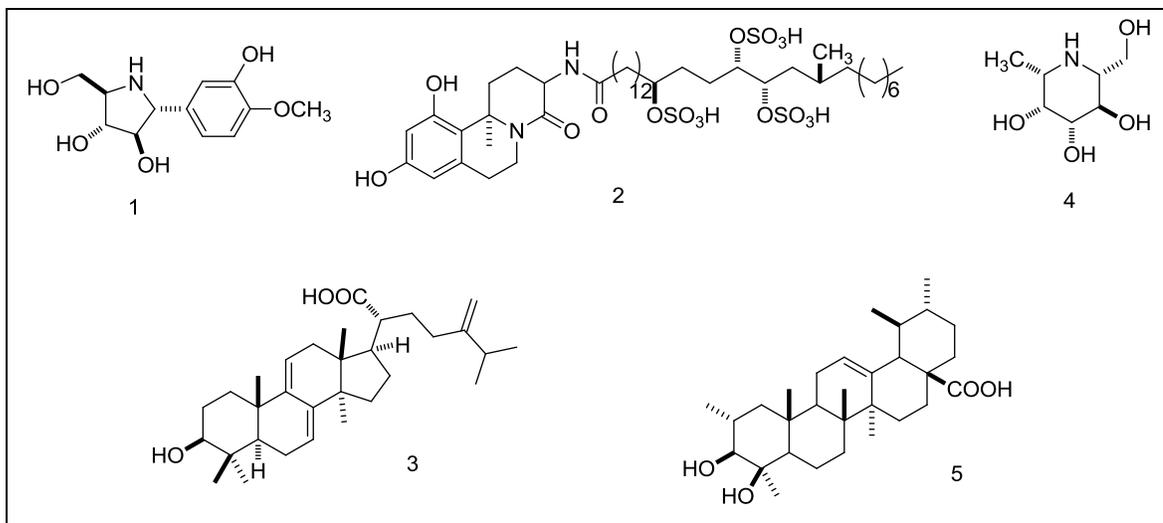


Figura 4. Agentes hipoglucemiantes.

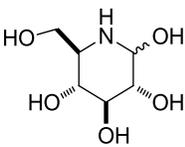
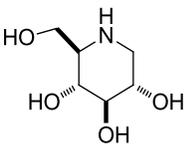
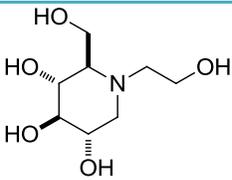
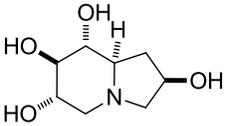
1.7.4 Inhibidores de α -glucosidasa

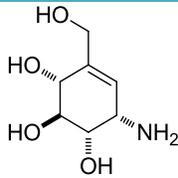
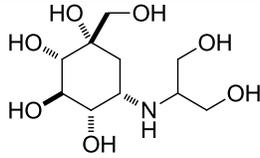
La hiperglicemia postprandial es conocida como el primer desorden metabólico observado en la DMT2 y un factor importante que contribuye al desarrollo de complicaciones asociadas a enfermedades micro- y macrovasculares. Una alternativa para reducir la captación de carbohidratos a través del intestino es mediante el uso de inhibidores de α -glucosidasa [23-24].

Los inhibidores de α -glucosidasas son una clase de fármacos no sistémicos que no se dirigen a un determinado efecto fisiopatológico de la DMT2. Estos fármacos inhiben de manera competitiva y reversible a las α -glucosidasas [24], enzimas que se encuentran en los bordes de las microvellosidades de los enterocitos del intestino delgado y que catalizan el paso final en el proceso de digestión de carbohidratos [25]. Las α -glucosidasas se encargan de hidrolizar los oligosacáridos de la dieta en disacáridos y monosacáridos, los que posteriormente son absorbidos en el intestino hacia el torrente sanguíneo. Al inhibir estas enzimas, se retarda pero no se impide la absorción de los carbohidratos ingeridos, se reducen los niveles de insulina y de glucosa postprandial, y por lo tanto, se controlan y/o retardan las complicaciones debidas a la hiperglicemia [25-26].

Las moléculas inhibitoras de α -glucosidasa disponibles en las terapias antidiabéticas han sido obtenidas a partir de productos naturales o mediante derivatización química de los productos naturales con mayor potencial farmacológico (Tabla 2) [14].

Tabla 2. Inhibidores de α -glucosidasa en investigación y/o en el mercado.

NOMBRE DE COMPUESTO	ESTRUCTURA QUÍMICA	GLICOSIDASA BLANCO	COMENTARIOS
Nojirimicina		α - y β -glucosidasas	Fue el primer sacárido mimético natural aislado de una cepa de <i>Streptomyces</i> en 1966 [14]. Potente inhibidor del virus del SIDA.
Desoxinojirimicina		α - glucosidasa	Se obtiene a partir de Nojirimicina y de <i>Bacillus</i> o <i>Streptomyces</i> . Sirve de molde para la síntesis de análogos más potentes (miglitol) [14].
Miglitol		α - amilasa	Es un derivado de la Desoxinojirimicina, desarrollado con el fin de potenciar su efecto <i>in vivo</i> [14].
Castanospermina		α - y β -glucosidasas.	Aislada de la leguminosa <i>Australe castanospermum</i> en 1981. Además, es un potente inhibidor del virus del dengue [14,27].

Valienamina		α -glucosidasa	Producida por <i>Pseudomonas denitrificans</i> [14]. Potente inhibidor enzimático.
Voglibosa		α -glucosidasa	Disponible sólo en Japón, China y Korea. Derivado del producto natural Valiolamina obtenido del microorganismo <i>Streptomyces hygroscopicus</i> [5].
Acarbosa	Véase Tabla 1	α -glucosidasa	Aislada de <i>Actinoplanes utahensis</i> por investigadores de Bayer [14]. Actualmente es el más estudiado y utilizado en el tratamiento de DMT2 [5].

Gloster y Gideon mencionan que para obtener potentes y específicos inhibidores de glucosidasas, se deben de diseñar moléculas que imitan el estado de transición que se forma durante la hidrólisis de los oligosacáridos por las glucosidasas [14].

1.7.4.1 Mecanismo de hidrólisis de las glucosidasas

Tradicionalmente, las glucosidasas clásicas contienen dos residuos carboxilatos proporcionados por el ácido aspártico, los cuales son responsables de la hidrólisis [28].

Inversión de la estereoquímica es un mecanismo de un solo paso, el cual permite que el sustrato y una molécula de agua se unan de manera simultánea.

Uno de los residuos catalíticos (carboxilato) actúa generalmente como ácido y el otro generalmente como una base. La protonación del oxígeno glicosídico por el carboxilato ácido y la salida del grupo saliente está acompañada de manera concomitante con el ataque nucleofílico por una molécula de agua que ha sido desprotonada por el ion carboxilato que actúa como base (Figura 5) [14, 28].

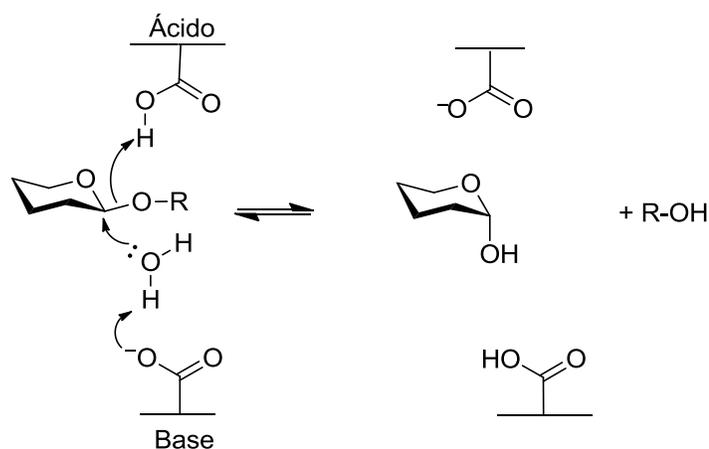


Figura 5. Mecanismo con inversión de la estereoquímica

Retención de la estereoquímica es un mecanismo de doble desplazamiento que consiste en dos pasos de inversión: uno de los residuos catalíticos actúa como ácido/base y el otro actúa como nucleófilo. Durante el primer paso de la reacción (glicosilación), el residuo ácido/base protona el oxígeno glicosídico para ayudar a salir al grupo saliente después de que el nucleófilo ataque el carbono anomérico formándose un intermediario covalente glucósido-enzima. En el segundo paso (desglicosilación), el residuo ácido/base desprotona a la molécula de agua después de que efectúa un ataque nucleofílico al carbono anomérico y desplaza el glucósido (Figura 6) [14, 28].

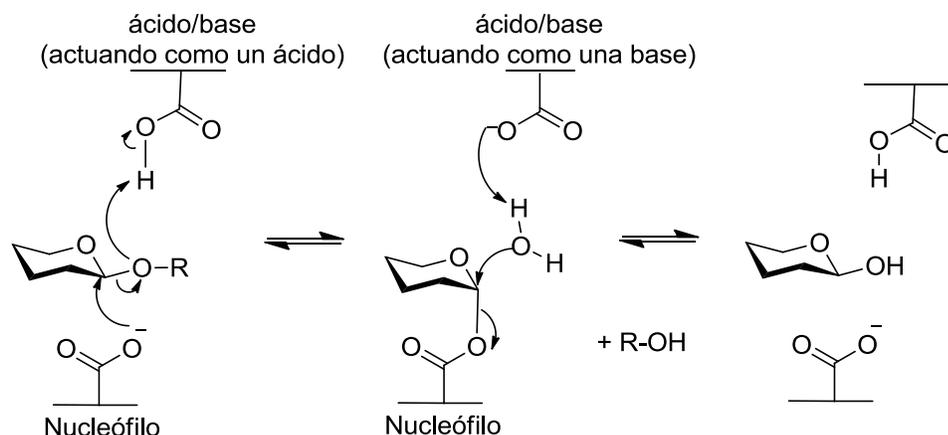


Figura 6. Mecanismo con retención de la esteoquímica

Sin duda, la elucidación del mecanismo de acción de las α -glucosidasas permite diseñar nuevos inhibidores que eventualmente serán prescritos en pacientes diabéticos. No obstante la importancia de la Química Medicinal en el diseño de fármacos para el tratamiento de la DMT2, la Farmacognosia también ha provisto de productos naturales bioactivos que han sido patentados como fármacos o que han servido como moldes para la síntesis o el diseño de fármacos análogos.

1.8 Problemática actual

La diabetes mellitus es un grave problema de salud asociado con altos índices de morbilidad y mortalidad. Se estima que para el 2030 se duplicará la cantidad de personas con esta enfermedad [4]. La diabetes es la principal causa de ceguera, amputación de miembros y fallo renal, debido a las complicaciones micro y macrovasculares que se presentan en los pacientes con esta enfermedad.

A medida que la prevalencia de este trastorno metabólico aumenta rápidamente y que el tratamiento actual no logra estabilizar la enfermedad en la mayoría de

los pacientes, la prevención debe ser considerada como un objetivo clave en el futuro cercano [6,11].

El Instituto Nacional de Salud Pública reportó que en el 2010 se destinaron 778,427,475 dólares para atender los costos directos e indirectos de pacientes diabéticos en diversas instituciones de salud en México (SS, IMSS, ISSSTE, Seguros privados de Salud) [29]. Los recursos destinados a la diabetes en México dan evidencia del impacto económico que ésta enfermedad tendrá para nuestro país en el corto y largo plazo si no se toman las medidas pertinentes que permitan reducir dichos costos.

Los fármacos que actualmente se utilizan para el tratamiento de la diabetes no son tan eficaces además de que presentan muchos efectos adversos como hipoglucemia, hepatotoxicidad, acidosis láctica, que traen como consecuencia daños en órganos y tejidos que primeramente no fueron afectados por la enfermedad conduciendo a una progresión acelerada de la enfermedad, y por ende, a una muerte prematura [30].

CAPITULO 2

JUSTIFICACIÓN, OBJETO DE ESTUDIO, HIPÓTESIS y OBJETIVOS

2.1 Justificación del proyecto

Los altos índices de mortalidad por diabetes, los altos costos requeridos para el tratamiento de un paciente diabético y los efectos secundarios que causan los medicamentos prescritos hoy en día (véanse Figura 1 y 3 y Tabla 1) [17], son factores suficientes a considerar para proponer proyectos de investigación dirigidos a la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos que impidan la progresión de la enfermedad, o bien, que la retarden. Así, algunas propuestas científicas pueden fundamentarse en el potencial que han mostrado las plantas medicinales como una fuente importante de nuevos agentes antidiabéticos (véase Figura 4) [30], en el conocimiento etnomédico y las relaciones quimiotaxonómicas de las plantas.

Partiendo de la premisa de que la inhibición de α -glucosidasa es una estrategia relevante que puede prevenir niveles altos de glucosa en sangre y en consecuencia puede prevenir complicaciones micro- y macrovasculares, el presente proyecto de investigación se plantea la prospección química y farmacológica de algunas plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diabetes, con la finalidad de encontrar nuevos inhibidores de α -glucosidasa que impidan la progresión de la enfermedad.

2.2 Objeto de estudio

La selección de las especies de plantas superiores presentes en este proyecto de investigación, fue realizada previamente en base al *criterio etnomédico* (uso popular para tratar la diabetes) y en base al *criterio quimiotaxonómico*, es decir,

con especies de plantas reportadas en la literatura por contener productos naturales de estructura similar a los inhibidores de α -glucosidasa listados en la Tabla 2.

2.2.1 *Ibervillea sonorae*

Ibervillea es un sinónimo adoptado posteriormente al de *Maximowiczia sonorae*. *Ibervillea sonorae* es una planta trepadora bisexual conocida como wereke. La hembra tiene forma de camote blanco-cenizo con cinco hojitas, flor color beige y fruto parecido a una sandía pequeña y pinta. El macho se presenta como un camote ovalado blanco-cenizo con barbitas enredadas. Se localiza en Sonora y Sinaloa (México). Tanto la raíz como las ramas se usan para curar la diabetes, las reumas, las llagas, las úlceras y las fístulas; de tal forma que, se le pueden atribuir propiedades antiséptica, cicatrizante, antirreumática e hipoglucémica [31-32].

2.2.2 *Smilax* sp.

Es una planta trepadora que brota de un rizoma leñoso hemisférico de cinco metros o más de largo. Los tallos poseen espinas, hojas cordiformes y de puntas angostas, flores pequeñas unisexuales, frutos negros y globosos. Esta especie es originaria de México y distribuida en los estados de Guerrero, Veracruz, Oaxaca, Colima y Tabasco. Habita en climas cálidos y semicálidos hasta 700 msnm. Se encuentra asociada a bosques tropicales subcaducifolios. Conocida vulgarmente como Cocolmecha e identificada con varios nombres científicos: *Smilax cordifolia*, *Smilax acutifolia*, *Smilax invenusta* y *Smilax schiedeana*, por lo cual se ha establecido que el producto comercial denominado Cocolmecha es una mezcla de dos o más especies de *Smilax*. Se ha reportado que la raíz de la Cocolmecha es usada en la medicina tradicional para el tratamiento de la obesidad, celulitis, diabetes ligera, úlceras, parasitosis y sífilis [33-34].

2.2.3 *Senecio angulifolius*

Es una hierba que puede medir de 0.4 a 1.20 metros de altura y que se conoce comúnmente como guardalobo en Durango y otros estados de la República Mexicana. Crece a orillas de caminos a 1000 msnm. Posee cabezuelas de 7 cm de diámetro rodeadas de pétalos amarillos, hojas alternadas y ovaladas. Crece como una maleza en algunas regiones de Durango y Querétaro. Es notoria y vigorosa durante el verano y se seca en el mes de noviembre. Las cabezuelas de la planta son usadas para cicatrizar heridas, para tratar várices y para prevenir o curar el pie diabético [35]. Se ha reportado en la literatura que las especies del género *Senecio* contienen alcaloides pirrolizidínicos, los cuales exhiben similitudes estructurales a los inhibidores de α -glucosidasa prescritos hoy en día (véase Tabla 2) [36], por consiguiente, *S. angulifolius* fue seleccionada por la aproximación quimiotaxonómica que guarda esta especie con otras del mismo género.

Para seleccionar el objeto de estudio de este proyecto de investigación, las 3 especies de plantas fueron sometidas a un criterio adicional, el *criterio farmacológico* mediante la ponderación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de las 3 especies con el fin de conocer que especie posee este efecto. Los resultados de esta evaluación se muestran en la Tabla 4 (véase sección de resultados), en la cual se observa que los extractos orgánicos que corresponden a la especie *Smilax* exhiben una potente actividad 10 veces mayor con respecto a la actividad mostrada por el control positivo (Quercetina).

De acuerdo a lo anterior, se eligió *Smilax sp.* como el objeto de estudio de este proyecto.

2.3 HIPÓTESIS

Las raíces de *Smilax sp.* contienen nuevos productos naturales con propiedades inhibitorias de α -glucosidasa en igual o mayor magnitud que la Quercetina.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo general

Realizar la detección de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa del extracto orgánico de *Smilax sp.*; así como, el aislamiento biodirigido, la caracterización estructural y las evaluaciones biológicas de los metabolitos secundarios obtenidos del extracto orgánico.

2.4.2 Objetivos específicos

- 1.- Compilar información bibliográfica.
- 2.- Realizar la extracción orgánica a macroescala de *Smilax sp.*
- 4.- Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico de *Smilax sp.*
- 5.-Elucidar y caracterizar la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones más activas.
- 6.- Evaluar la actividad inhibidora de la α -glucosidasa de los compuestos puros.
- 7.-Analizar los resultados farmacológicos para identificar prototipos moleculares.

CAPITULO 3

ANTECEDENTES

3.1 Generalidades

Desde tiempos antiguos, las plantas se han utilizado para tratar muchas enfermedades y está evidenciada por documentos sobre el uso de plantas medicinales provenientes de China que se remontan a 2,800 a. de C. [40].

Se reporta que en el mundo se utilizan aproximadamente 80,000 especies de plantas [40] y en México se usan 2,000 especies, de las cuales, el 78% son utilizadas para el tratamiento de infecciones de tipo digestivo, respiratorio y cutáneo [41].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 4 mil millones de personas, el 80% de la población mundial, utilizan las plantas medicinales durante algún aspecto de atención primaria de salud [40].

Los productos naturales han proporcionado destacada contribución a la terapia moderna como por ejemplo, los anticancerígenos vincristina, vinblastina, polidofilotoxina [40]; los antimicrobianos doripenem, tigeciclina [3]; los antidiabéticos exenatida y metformina [2]; por lo que la naturaleza sigue ofreciendo moléculas que sirven como base para la obtención de nuevos agentes farmacológicos [2].

Considerando que el objeto de estudio de este proyecto es la especie *Smilax* sp., se realizó una compilación bibliográfica sobre el tipo de metabolitos secundarios más representativos que estuvieran presentes en las especies del género *Smilax*, así como las actividades farmacológicas más sobresalientes de las mismas.

3.2 Perfil fitoquímico del género *Smilax*

El género *Smilax* pertenece a la familia Smilacaceae y ésta es una familia de arbustos trepadores que comprende aproximadamente 260 especies que se encuentran distribuidas en mayor proporción en Asia y América (Figura 7) [42, 43].



Figura 7. Distribución de especies del género *Smilax* en el mundo [44].

Las raíces de numerosas especies de *Smilax* son comúnmente conocidas como sarsaparilla [42].

En diversos estudios realizados a este género, se han reportado saponinas o sapogeninas esteroidales de tipo furostano y espirostano: diosgenina (6), esmilagenina, sarsasapogenina (7), parillina (8); estilbenos: *trans*-resveratrol (9), 3β -(3',5'-dihidroxifenil)-2 α -(4''-hidroxifenil)-dihidrobenzofuran-5-

Las saponinas esteroidales y agliconas, obtenidas de algunas especies como *S. medica* (Figura 9), *S. officinalis* y *S. ripax*, han demostrado poseer actividad citotóxica. Especies como *S. glabra* y *S. aspera* (Figura 9) poseen actividad contra la sífilis. También se ha demostrado la actividad antileprótica de *S. ornata* y una baja actividad antifúngica de saponinas aisladas de *S. medica* ($CI_{50} = 12.5-50 \mu\text{g/mL}$) frente a tres especies de *Candida* en comparación con el ketoconazol ($CI_{50} = 0.78-1.56 \mu\text{g/mL}$) [43].

Por otro lado, se realizó un estudio del extracto etanólico de *S. china*, la cual presentó actividad citotóxica frente a las líneas celulares KB-Hela (carcinoma cérvico humano) y DLD-1 (tumor de colon humano) y que posteriormente fue fraccionado, lo que llevó al aislamiento de fenilpropanoides como smilásidos D (18), E (19) y F(20), los cuales presentaron actividad citotóxica contra la línea celular DLD-1 ($DL_{50} = 2.7-5 \mu\text{g/mL}$) [50].

Algunos grupos de investigadores se han dedicado al estudio de *S. zeylanica* (Figura 9) [49, 51], especie que es muy utilizada en la medicina Ayurvédica para el tratamiento de diversos padecimientos como enfermedades de la piel, demencia, diarrea, sífilis, gonorrea, artritis e impotencia. Se han realizado estudios con diferentes partes de la planta para determinar diversas actividades farmacológicas destacando el estudio realizado por Hooda y cols. [49], en el cual se evaluó la actividad antidiabética *in vivo*, a partir del extracto metanólico de las hojas de esta especie, demostrándose una disminución de la hiperglucemia en ratas diabéticas equiparable al estándar glibenclamida. Los autores sugirieron que el mecanismo de acción del extracto metanólico puede ser debido al aumento de la secreción de insulina de las células- β del páncreas.

Li y cols., realizaron un estudio para determinar la actividad nefroprotectora del flavonoide astilbin (**13**), obtenido del rizoma de *S. glabra*. Los resultados sugirieron que el efecto nefroprotector de astilbin podría estar relacionado con la inhibición de la expresión de TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β 1) y CTGF (factor de crecimiento de tejido conectivo), especialmente CTGF. La inhibición de la expresión de CTGF puede ser un objetivo potencial de astilbin en terapia de la nefropatía diabética [52].



Figura 9. Algunas especies del género *Smilax*

CAPITULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental de este proyecto de investigación se realizó en dos lugares:

- La parte fitoquímica del proyecto se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales que se encuentra en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- El ensayo enzimático se realizó en el Laboratorio de Ensayos Biológicos localizado en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.1 Materiales y equipo

Para la realización de cromatografías en columna se utilizaron como fase estacionaria: gel de sílice (SiO_2) marca EMD chemicals Inc. con un grosor de 0.040-0.063 mm (230-400 mesh) en la mayoría de las ocasiones; gel de sílice de fase reversa C18 marca Sigma Aldrich; celulosa microcristalina NP. Los disolventes utilizados fueron hexano (Hex), éter dietílico, éter de petróleo, acetato de etilo (AcOEt), diclorometano (DCM), cloroformo (CHCl_3) butanol (BuOH), metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), acetona, ácido acético (AcOH), agua (H_2O).

Para la realización de cromatografía en capa fina preparativa se utilizaron cromatofolios marca Fluka analytical DC-Alufolien-Kieselgel de un grosor de 0.2

mm con indicador fluorescente UV_{254nm}. Como reveladores se usaron una lámpara de UV marca Spectroline (λ 254 y 365 nm), solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico 2N, solución de ácido *p*-toluensulfónico, solución de cloruro férrico, solución de vainillina, solución de *p*-anisaldehído, solución de ácido fosfomolibdico.

Durante todo el proyecto se utilizó el evaporador rotativo marca Yamato modelo BM500. La determinación de punto de fusión de compuestos se determinó en un aparato Fischer-Johns.

4.2 Material vegetal

Para la selección del objeto de estudio se utilizaron las siguientes especies de plantas: *Ibervillea sonora* (raíz) **1**, *Smilax sp.* (raíz) **2** y *Senecio angulifolius* (cabezuelas) **3** (Figura **10**).

El material vegetal cocolmecha (*Smilax sp.*) y wereke (*Ibervillea sonora*) fueron provistos por la Dra. Carmelita García Padrón quien es propietaria de la microempresa Natura Select en Morelia Michoacán (Domicilio: Carpinteros de Paracho 416-A, Colonia Vasco de Quiroga. Morelia, Michoacán. C.P. 58230).

La colecta del material vegetal guardalobo (*Senecio angulifolius*) fue realizada a un costado de la carretera panamericana número 45, en el tramo que va de la Ciudad de Durango a Parral. Las plantas se encontraban a las faldas del Cerro de Mercado en un terreno pedregoso y con bastante maleza (zacate).

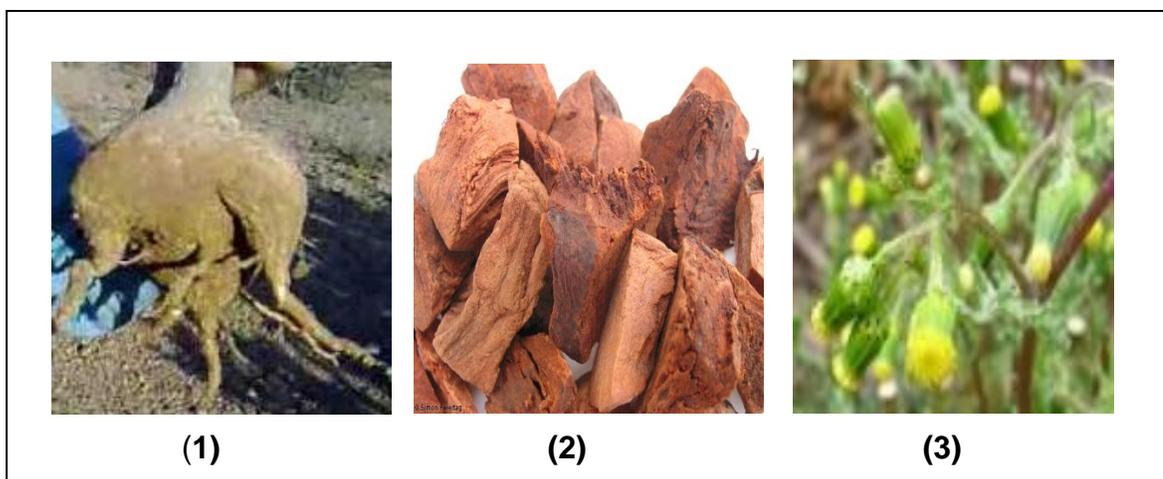


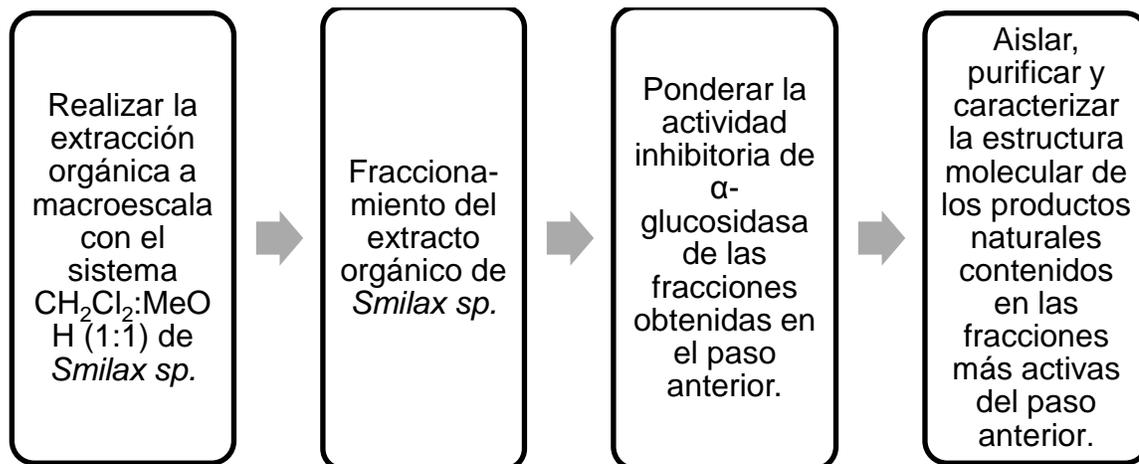
Figura 10. Especies utilizadas para la selección del objeto de estudio [37-39].

4.3 Obtención de los extractos orgánicos a micro escala

La obtención de los extractos orgánicos se realizó por maceración estática y se realizaron a las 3 especies de plantas.

Treinta gramos de material vegetal pulverizada fueron macerados en 150 mL de DCM:MeOH en una proporción (1:1) por 24 horas. Posteriormente, el macerado se filtró al vacío y se concentró en un rotaevaporador hasta sequedad. Este procedimiento se realizó 3 veces con el mismo material vegetal. Después de haber realizado las 3 maceraciones, se recuperó el material vegetal, se filtró y se dejó reposar por 48 horas en etanol (EtOH). Se procedió a filtrar a vacío y se concentró a sequedad en un rotaevaporador.

4.4. Estudio fitoquímico



4.4.1 Obtención del extracto orgánico a macroescala

Después de haber analizado los resultados de la inhibición enzimática (véase tabla 4), se tomó la decisión de realizar el estudio fitoquímico a macroescala para *Smilax sp.* Las raíces de *Smilax sp.* previamente pulverizadas fueron sometidas a una maceración de 48 horas y 2 maceraciones consecutivas de 24 horas.

4.4.2 Maceración del material vegetal

Se colocó 1.4 Kg de material vegetal repartidos en 4 matraces Erlenmeyer de 2 L, se dejó reposar el material vegetal en 4 L de $\text{DCM}:\text{MeOH}$ repartidos en los 4 matraces por 48 horas. Pasado ese tiempo se procedió a filtrar a vacío y a concentrar el decantado en un rotaevaporador hasta sequedad. Posteriormente, se recuperó el material vegetal utilizado anteriormente y se dejó reposar en $\text{DCM}:\text{MeOH}$ por 24 horas. Se procedió a filtrar, colectar el decantado y concentrar en evaporador rotativo hasta sequedad. El procedimiento anterior se repitió una vez más.

4.4.3 Fraccionamiento del extracto orgánico

El fraccionamiento del extracto orgánico de *Smilax sp.* (46g) se realizó por cromatografía en columna de vidrio (80 cm de largo x 12 cm de diámetro). Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice (malla 230-400) y fase móvil Hex:AcOEt en gradiente, AcOEt:MeOH en gradiente, EtOH 100%, EtOH:H₂O (90:10) y MeOH:AcOH (90:10).

4.5 Ensayo enzimático

4.5.1 Ensayo de Inhibición de α -glucosidasa

Es una técnica basada en el rompimiento del enlace α -1,6-glicosídico en el sustrato *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (Figura 10), el cual es detectado por su absorbancia a 405 nm en placas de 96 pozos [53].

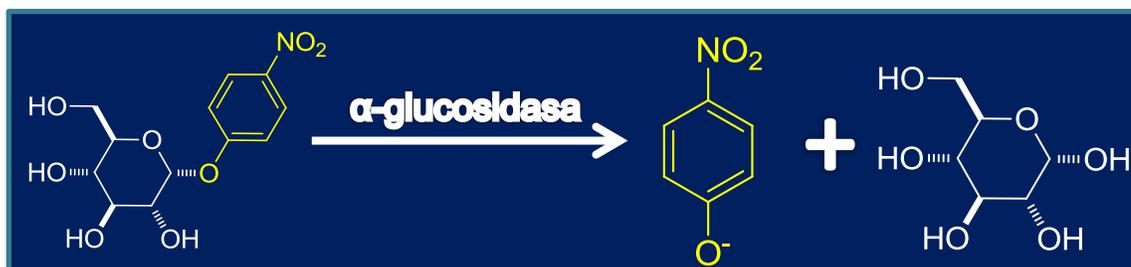


Figura 11. Hidrólisis de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido con α -glucosidasa.

4.5.2 Metodología

Se prepara una mezcla de reacción con 25 μ L de α -glucosidasa (0.2 U/mL) de la compañía Aldrich, 25 μ L de una solución 23.2 mM de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, 25 μ L de varias concentraciones de las muestras a evaluar y 175 μ L de un regulador de fosfatos 67 mM (pH = 6.8). El volumen final de la reacción es de 250 μ L. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 15 minutos y luego se adicionan 50 μ L de una solución 1 M de carbonato de sodio para

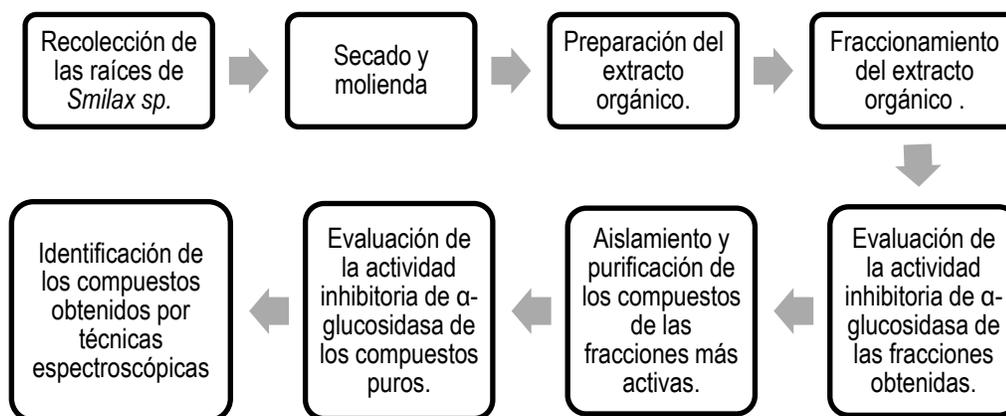
detener la reacción. El control negativo se prepara adicionando el regulador de fosfatos en lugar de la muestra a evaluar. El control positivo se realiza con la quercetina. El blanco se prepara adicionando el regulador de fosfatos en lugar de la α -glucosidasa. El porcentaje de inhibición se calcula mediante la siguiente ecuación (donde DO = Dispersión óptica):

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{[(DO_{\text{control negativo}} - DO_{\text{blanco}}) - (DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{control positivo}})]}{(DO_{\text{control negativo}} - DO_{\text{blanco}})} \times 100$$

4.5.3 Análisis estadístico

Los valores de CI_{50} de las muestras fueron calculados por un análisis de regresión no lineal expresados como el promedio de tres a cuatro experimentos independientes \pm error estándar de la media. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett para aislar grupos con diferencia significativa. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

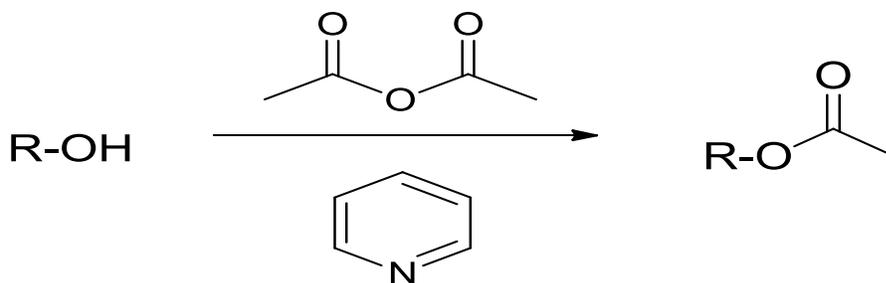
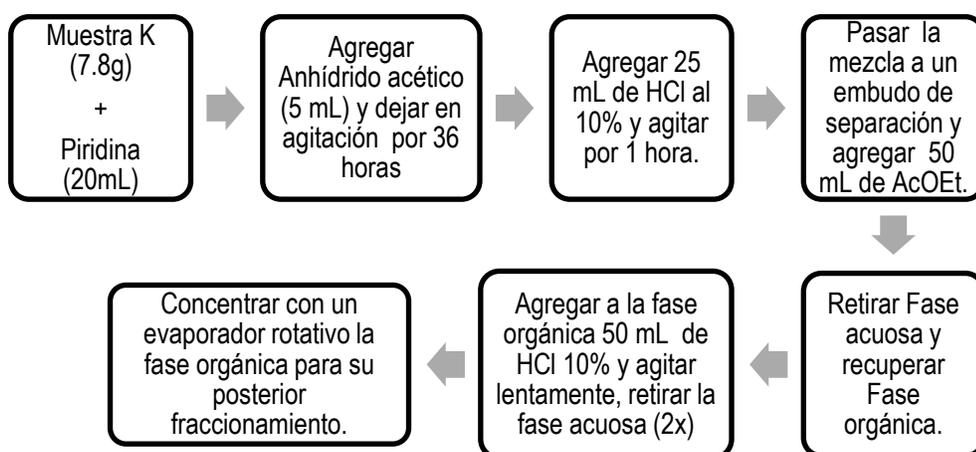
4.6 Estudio biodirigido



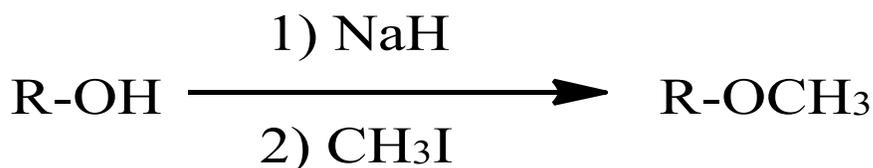
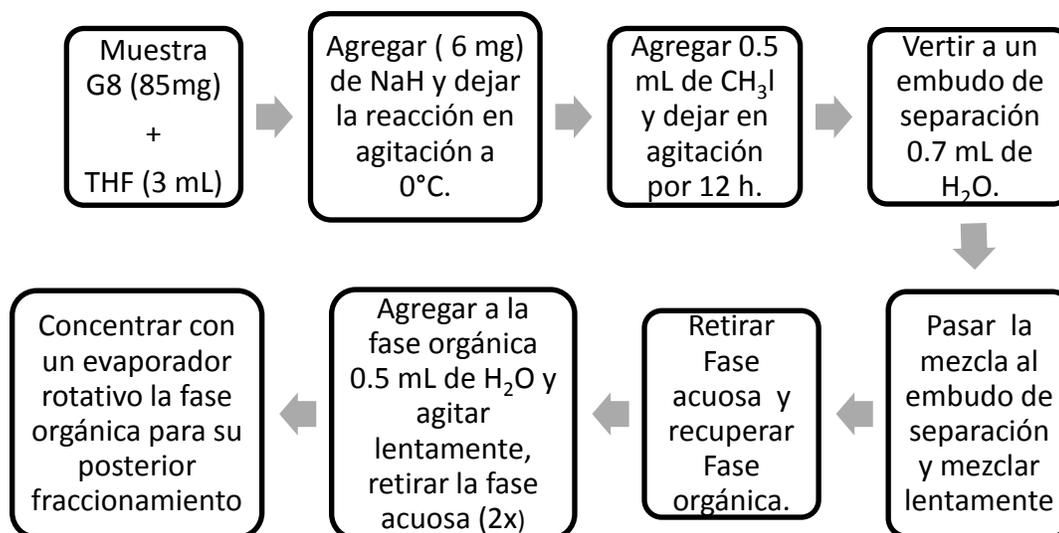
4.7 Aislamiento de compuestos.

El fraccionamiento del extracto orgánico se realizó mediante diversas técnicas cromatográficas: cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, cromatografía en papel, cromatografía de placa preparativa. [54]. Para el extracto crudo se empleó la cromatografía en columna a gravedad o vacío y para el fraccionamiento del extracto se utilizó cromatografía en columna y cromatografía de capa delgada.

Reacción de Acetilación



Reacción de metilación



4.8 Identificación de compuestos

La elucidación estructural de los compuestos purificados se realizó mediante métodos espectroscópicos (Resonancia Magnética Nuclear). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y ¹³C se obtuvieron en espectrómetros analíticos Varian Unity a 75, 100, 300 y 400 MHz empleando como disolvente CDCl₃ (cloroformo deuterado), C₅D₅N (piridina deuterada) y como estándar interno tetrametilsilano (TMS).

CAPÍTULO 5

RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.1 Rastreo primario de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa.

Se realizó un rastreo primario de actividad inhibitoria enzimática de los extractos obtenidos de las 3 especies. Se etiquetaron los extractos orgánicos de acuerdo a la Tabla 3.

Tabla 3. Códigos utilizados para la identificación de los extractos orgánicos.

Extractos orgánicos			
DCM:MeOH		EtOH	
Especie	Código	Especie	Código
<i>Ibervillea sonora</i>	Ms	<i>Ibervillea sonora</i>	MsEN
<i>Smilax sp</i>	Ss	<i>Smilax sp</i>	SsEN
<i>Senecio angulifolius</i>	Sa	<i>Senecio angulifolius</i>	SaEN

Se realizó un rastreo primario de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de los 6 extractos a 4 concentraciones (1, 10, 100, 1000 ppm, Figuras 12-15).

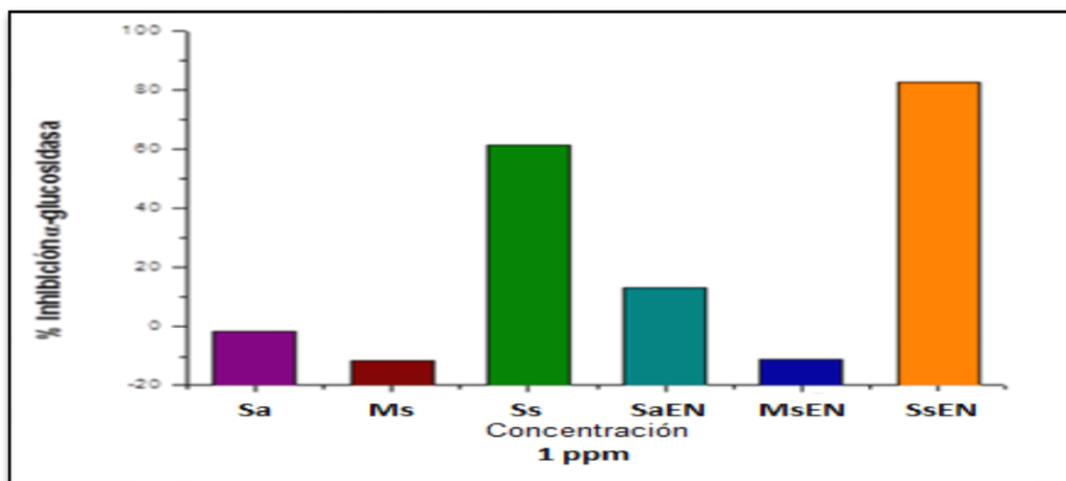


Figura 12. Rastreo primario de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa a 1 ppm.

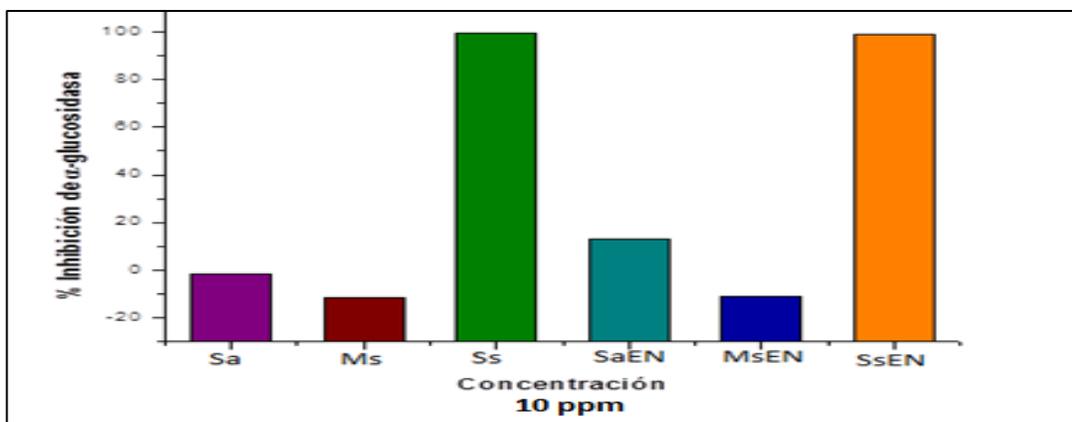


Figura 13. Rastreo primario de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa a 10 ppm.

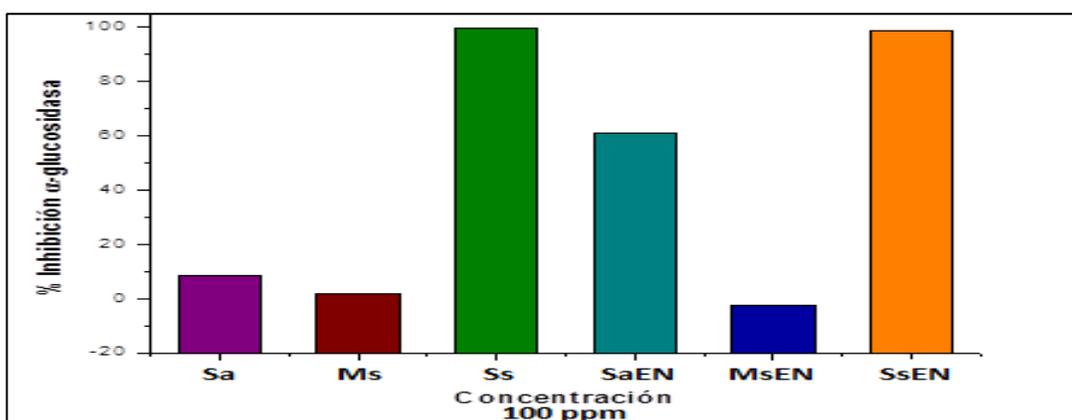


Figura 14. Rastreo primario de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa a 100 ppm.

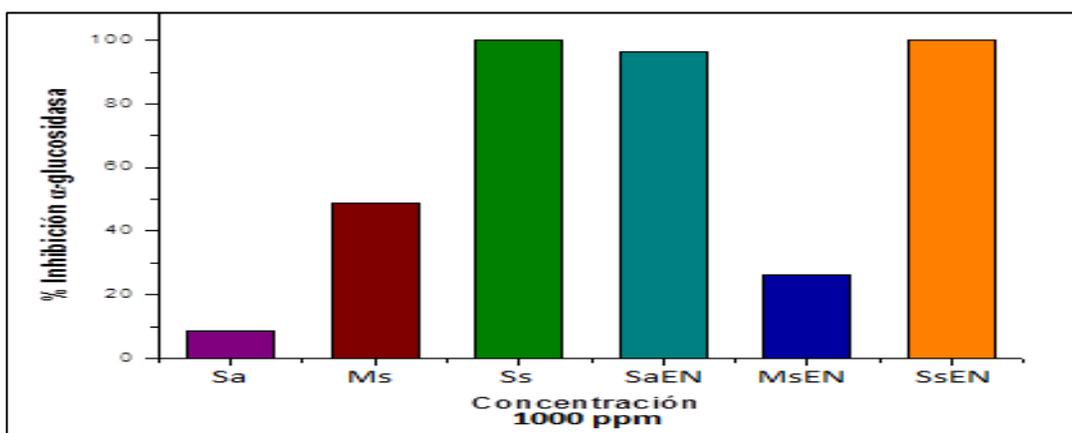


Figura 15. Rastreo primario de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa a 1000 ppm.

De acuerdo a lo observado en las gráficas anteriores, los extractos Sa, Ms y MsEn no presentan una actividad inhibitoria de α -glucosidasa relevante. Con respecto al extracto SaEN se observa un porcentaje de inhibición de α -glucosidasa del 60% a una concentración de 100 ppm, mientras que para el extracto Ss se observa un 62% de inhibición a 1 ppm y un 99-100% a 10 ppm. Por otra parte, el extracto SsEN exhibió un intervalo de inhibición de 95 a 100% a las 4 concentraciones.

Los resultados obtenidos en el rastreo primario de actividad inhibitoria a cuatro concentraciones, ayudaron a determinar el rango de concentraciones a utilizar para calcular la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de los extractos orgánicos obtenidos de *Smilax sp.* que mostraron una potente actividad (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración Inhibitoria Media de extractos orgánicos y quercetina.

Muestra	Concentración (µg/ml)	λ 405 nm	Inhibición (%)	CI ₅₀
SaEN	10	1.866±0.186	-9.40±2.25	100.65±24.86 µg/mL
	31.62	1.509±0.122	10.63±3.77	
	100	0.886±0.144*	48.42±5.35*	
	316.2	0.397±0.103*	78.15±4.08*	
	1000	0.097±0.055*	94.29±2.72*	
SsEN	0.18	1.268±0.082	-5.52±8.25	0.55±0.11 µg/mL
	0.32	1.019±0.115	15.66±8.73	
	0.56	0.657±0.079*	44.65±8.71*	
	1	0.194±0.039*	83.76±3.41*	
	1.78	0.048±0.005*	95.96±0.53*	
Ss	0.18	1.173±0.017	7.33±1.78	0.49±0.02 µg/mL
	0.32	0.911±0.035*	28.11±2.35*	
	0.56	0.539±0.047*	57.39±3.77*	
	1	0.162±0.033*	87.17±2.75*	
	1.78	0.038±0.002*	96.98±0.19*	
Quercetina	1	1.883±0.080	6.71±0.40	5.28±0.57 µg/mL
	1.78	1.774±0.087	12.14±1.29	
	3.16	1.530±0.125*	24.24±4.94*	
	5.62	0.944±0.195*	53.39±8.74*	
	10	0.344±0.069*	82.89±3.44*	

Los valores representan el promedio de tres a cuatro experimentos independientes \pm error estándar de la media. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett para aislar grupos con diferencia significativa. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control. λ a 405nm promedio del control = 1.241.

La Tabla 4 muestra que el extracto Sa (*Senecio angulifolius*) posee una CI_{50} de $100.65 \pm 24.86 \mu\text{g/ml}$, que en comparación con el control positivo quercetina ($5.28 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$), presenta una moderada actividad inhibitoria (20 veces menos potente). Por otra parte, los extractos SsEn y Ss (*Smilax sp.*) muestran CI_{50} de 0.55 ± 0.11 y $0.49 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, por lo que en comparación con el control positivo quercetina ($5.28 \pm 0.57 \mu\text{g/mL}$) se observa que los extractos son 10 veces más potentes que el control positivo. Por lo anterior, se decidió trabajar con los extractos orgánicos de *Smilax sp.* para la continuación de este proyecto.

5.2 Estudio fitoquímico de *Smilax sp.*

Se realizó el estudio fitoquímico a macroescala para *Smilax sp.* Las raíces de *Smilax sp.* (1.4 Kg) previamente pulverizadas fueron sometidas a una maceración de 48 horas y 2 maceraciones consecutivas de 24 horas para la obtención del extracto orgánico (46 g). Posteriormente, se realizó el fraccionamiento del extracto obteniéndose un total de 687 fracciones de 1 L cada una, las cuales fueron reunidas de acuerdo a la similitud cromatográfica que se observó durante su monitoreo por cromatografía de capa fina (CCF) con indicador UV en cromatofolios y reveladas con sulfato cérico amoniacal, obteniéndose un total de 18 fracciones etiquetadas por las letras del abecedario de la A-R (Tabla 5).

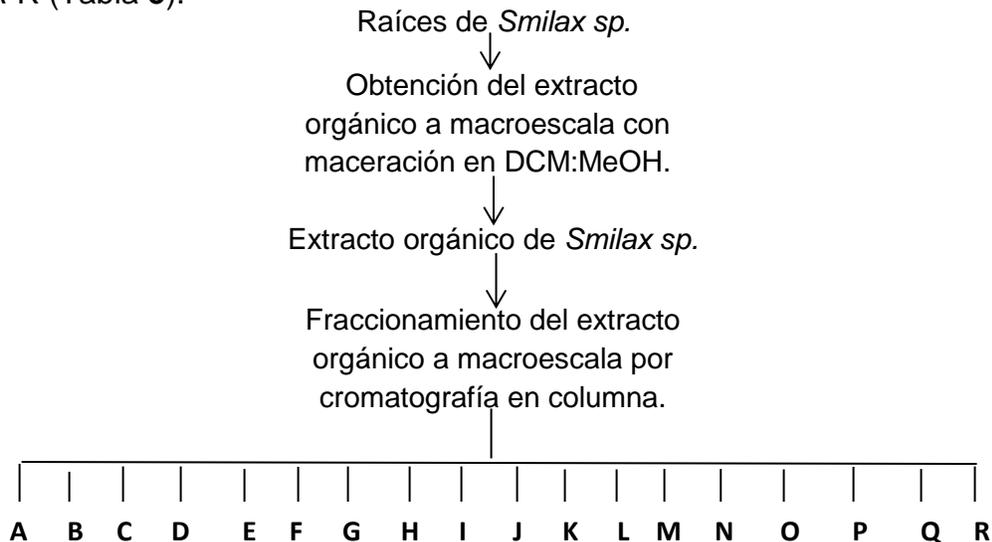


Tabla 5. Fracciones obtenidas del *extracto Smilax sp.*

Fracción	Peso (g)	Fracción	Peso (g)	Fracción	Peso (g)
A	0.046	G	1.75	M	5.23
B	0.189	H	2.72	N	4.22
C	0.880	I	2.38	O	4.29
D	1.11	J	4.824	P	1.89
E	0.146	K	4.78	Q	3.8
F	0.655	L	5.49	R	1.588

5.3 Determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de las fracciones obtenidas del extracto crudo de *Smilax sp.*

Se realizó un rastreo primario de la actividad inhibitoria enzimática de las fracciones obtenidas para seleccionar las fracciones más activas y para conocer el intervalo de concentraciones a utilizar con el fin de poder determinar su CI_{50} .

Tabla 6. Porcentajes de inhibición de α -glucosidasa a tres concentraciones.

Fracción	Concentración (ppm)	DO _{405nm}	% Inhibición de α -glucosidasa
A	1	1.742	9.57
	10	1.376	28.55
	100	0.087	95.48
C	1	1.552	19.45
	10	0.912	52.67
	100	0.023	98.82
D	1	1.407	26.96
	10	0.908	52.86
	100	0.079	95.90
E	1	1.367	29.05
	10	1.124	41.65
	100	0.097	94.96
F	1	1.829	5.05
	10	1.083	43.78
	100	0.106	94.50
G	1	1.404	23.72
	10	0.258	85.98
	100	0.186	89.87
H	1	1.430	22.29
	10	0.064	96.50
	100	0.202	89.00

I	1	1.698	7.75
	10	0.208	88.68
	100	0.052	97.17
J	1	0.874	9.56
	10	0.058	28.552
	100	0.109	95.484
K	1	0.147	88.42
	10	0.042	96.73
	100	0.056	95.63
L	1	0.094	92.59
	10	0.034	97.33
	100	0.060	95.26
M	1	0.032	97.46
	10	0.031	97.54
	100	0.044	94.54
N	1	0.038	97.04
	10	0.047	96.31
	100	0.125	90.18
O	1	0.038	96.51
	10	0.041	96.23
	100	0.274	74.79
P	1	0.037	96.57
	10	0.048	95.59
	100	0.135	87.56
Q	1	0.044	97.61
	10	0.040	97.845
	100	0.134	92.738
R	1	0.044	97.61
	10	0.040	97.827
	100	0.134	92.702

Los resultados obtenidos en el rastreo actividad inhibitoria enzimática de las fracciones obtenidas (Tabla 6), mostraron que la fracción O posee una potente actividad a 1 y 10 ppm pero al incrementar la concentración a 100 ppm se observó que la actividad inhibitoria disminuía un 18%. Lo anterior puede ser atribuido a un antagonismo presente entre las moléculas contenidas en esta fracción O.

Por otro lado, a partir de la fracción K se observó una potente actividad inhibitoria de α -glucosidasa a una concentración de 1 ppm, por lo que se determinaron las CI_{50} de dichas fracciones (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración Inhibitoria Media de las fracciones más potentes.

Muestra	Concentración (ppm)	λ 405 nm	Inhibición (%)	CI ₅₀
K	Control	1.25±0.04	-	0.92±0.23 ppm
	0.32	0.99±0.07	20.70±5.82	
	0.56	0.76±0.09*	38.43±8.66*	
	1	0.49±0.11*	60.22±10.22*	
	1.78	0.23±0.07*	81.06±6.65*	
	3.16	0.09±0.02*	92.01±1.79*	
L	Control	1.25±0.04	-	0.38±0.03 ppm
	0.1	1.14±0.10	1.79±6.86	
	0.18	0.93±0.08*	20.30±7.08*	
	0.32	0.68±0.06*	42.36±3.08*	
	0.56	0.39±0.06*	69.19±5.27*	
	1	0.19±0.03*	87.39±4.09*	
M	Control	1.25±0.04	-	0.20±0.03 ppm
	0.1	0.95±0.06*	23.69±4.36*	
	0.18	0.71±0.08*	43.37±6.14*	
	0.32	0.37±0.08*	69.92±6.25*	
	0.56	0.12±0.03*	90.31±2.97*	
	1	0.04±0.01*	96.62±0.99*	
N	Control	1.23±0.05	-	0.15±0.006 ppm
	0.1	0.83±0.05*	32.90±3.28*	
	0.18	0.50±0.03*	59.61±0.75*	
	0.32	0.19±0.03*	84.41±2.29*	
	0.56	0.05±0.007*	95.30±0.34*	
	1	0.03±0.003*	97.32±0.19*	
O	Control	1.70±0.19	-	0.15±0.004 ppm
	0.1	1.26±0.19*	30.28±6.94*	
	0.18	0.73±0.12*	59.22±6.20*	
	0.32	0.26±0.07*	85.50±3.85*	
	0.56	0.06±0.01*	96.35±0.78*	
	1	0.02±0.006*	98.63±0.32*	
P	Control	1.98±0.14	-	0.13±0.02 ppm
	0.1	1.23±0.17*	38.10±5.92*	
	0.18	0.69±0.19*	65.70±7.85*	
	0.32	0.32±0.09*	84.35±3.32*	
	0.56	0.09±0.02*	95.39±0.95*	
	1	0.04±0.02*	97.95±1.01*	
Q	Control	1.70±0.23	-	0.097±0.01 ppm
	0.03	1.42±0.24	17.89±5.26	
	0.06	1.27±0.23*	26.91±7.2*	
	0.1	0.74±0.27*	54.76±15.63*	
	0.18	0.34±0.10*	79.21±6.2*	
	0.32	0.08±0.02*	95.50±1.07*	
R	Control	2.08±0.08	-	0.169±0.009 ppm
	0.1	1.53±0.04*	26.22±4.30*	
	0.18	1.03±0.03*	50.50±1.98*	
	0.32	0.33±0.004*	83.79±0.86*	
	0.56	0.05±0.01*	97.22±0.76*	
	1	0.02±0.01*	98.80±0.64*	
Quercetina	Control		-	3.36±0.39 ppm
	1.78		19.56±4.11	
	3.16		48.45±7.07*	
	5.62		80.28±5.77*	
	10		94.01±4.43*	

Los valores representan el promedio de tres a cuatro experimentos independientes \pm error estándar de la media ($\bar{x} \pm ES$). Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett para aislar grupos con diferencia significativa. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Los resultados obtenidos de la evaluación inhibitoria α -glucosidasa de las fracciones principales muestran valores de CI_{50} de 0.097ppm-0.92 ppm, siendo más potentes que el control positivo (quercetina).

Considerando que el presente estudio era biodirigido, se eligió la fracción Q, para la etapa de aislamiento y purificación de los constituyentes responsables de la actividad observada.

5.4 Aislamiento y caracterización estructural de compuestos.

5.4.1 Fracción Q

La muestra Q (3.8 g) fue fraccionada mediante cromatografía en columna (30 x 4 cm) utilizando gel de sílice (malla 230-400) como fase estacionaria y mezclas de Hex:AcOEt y AcOEt:MeOH en gradiente de polaridad como fase móvil. El fraccionamiento condujo a la obtención de 372 fracciones que fueron reunidas en 12 subfracciones (Qi-Qxii) de acuerdo a su similitud cromatográfica (Figura 16).

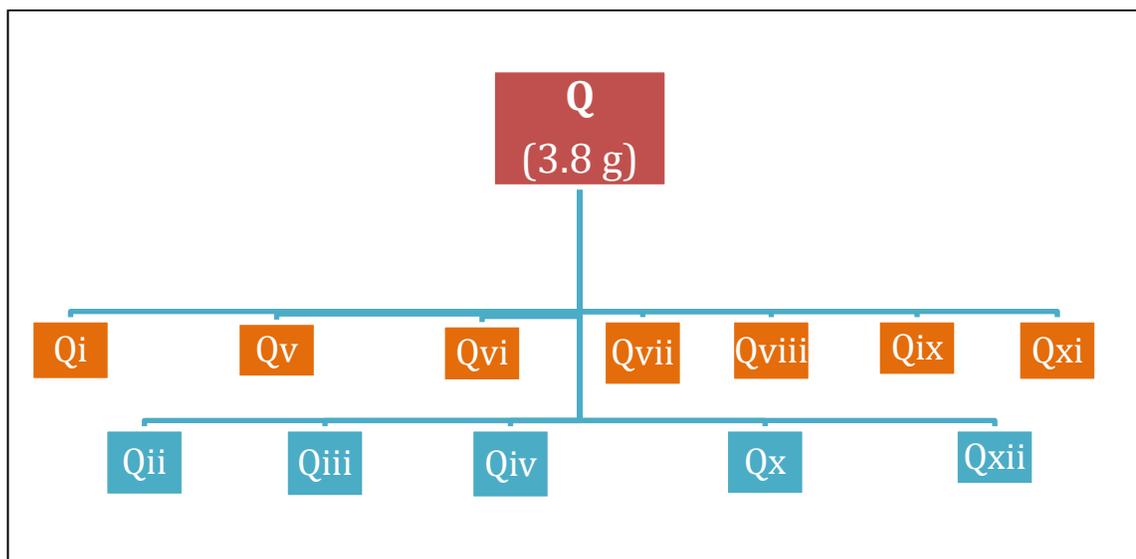


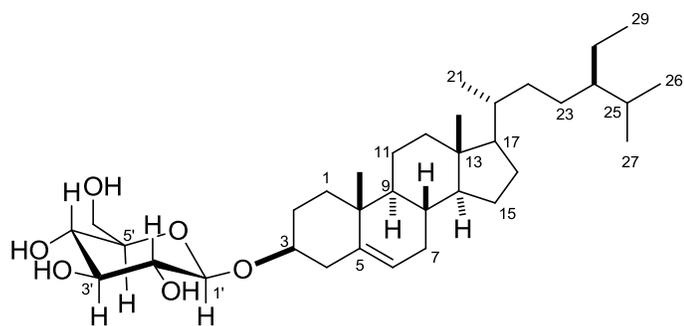
Figura 16.- Esquema de fraccionamiento de Q. Los cuadros de color naranja corresponden a las subfracciones que se trabajaron en este proyecto.

Las subfracciones Qi, Qv-Qix y Qxi, obtenidas de la fracción Q, fueron sometidas a varias técnicas analíticas para la separación de sus constituyentes. Las técnicas analíticas comprendieron la cromatografía en capa fina preparativa y cromatografías en columna equipadas con gel de sílice como fase estacionaria; en tanto que, la fase móvil consistió en mezclas de gradiente de polaridad o isocráticas de Hex:DCM, DCM:MeOH, CHCl₃:MeOH, AcOEt, AcOEt:MeOH y BuOH:AcOH:H₂O. A pesar de la aplicación meticulosa de éstas técnicas analíticas, solo fue posible obtener mezclas de 2 o más compuestos que fueron evaluadas en el ensayo de inhibición enzimáticas, pero no fueron caracterizados estructuralmente.

5.4.2 Fracción P

La muestra P (1.89 g) fue fraccionada mediante cromatografía en columna (30 x 4 cm) utilizando como fase estacionaria gel de sílice (malla 230-400) y como fase móvil Hex:DCM y DCM:MeOH en gradiente de polaridad. Se obtuvieron 4 subfracciones (P_i-P_{iv}). En la subfracción P_{iii} precipitaron 8 mg de un sólido blanco amorfo (**ARm12**) que después de haber sido analizado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fue identificado como β-sitosteril-3-O-β-D-glucopiranosido (Figura 17).

Rf: AcOEt:MeOH
(8:2)



β-sitosteril-3-O-β-D-glucopiranosido
(**ARm12**)

Datos espectroscópicos de β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido

RMN¹H (300 MHz, C₅D₅N): $\delta_{(ppm)}$: 5.38 (1H, d, $J = 2.1, 3.0$ Hz, H-6), 4.03 (1H, m, H-3), 2.79 (1H, dd, $J = 1.5, 2.7$ Hz, H-4 α), 2.52 (1H, ddd, $J = 0.9, 4.2, 12.3$ Hz, H-4 β), 2.16 (1H, dd $J = 5.4, 6.6$ Hz, H-2a), 2.03-1.12 (30H, m), 1.01 (3H ,d, $J = 7.8$ Hz, H-21), 0.98 (3H, s, H-19), 0.94 (3H,d, $J = 7.5$ Hz, H-29), 0.92 (3H, d, $J = 6.3$, H-27) 0.88 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-26), 0.68 (3H, s, H-18). Parte del glucósido: 5.09 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.59 (1H, dd, $J = 2.1, 12.0$ Hz, H-6'a), 4.47 (1H, dd, $J = 5.1, 11.1$ Hz, H-6'b), 4.33 (2H, d, $J = 8.4$ Hz H-3', H-4'), 4.10 (1H, t, $J = 5.7$ Hz, H-2'), 4.03 (1H, m, H-5').

RMN¹³C (75 MHz, C₅D₅N) δ_{ppm} : 141.36 (C5), 122.39 (C6), 78.98 (C3), 57.30 (C14), 56.71 (C17), 50.81 (C9), 46.50 (C24), 42.95 (C13), 40.42 (C12), 39.81 (C4), 37.96 (C1), 37.40 (C20), 36.87 (C10), 34.68 (C22), 32.65 (C7), 32.53 (C8), 30.73 (C2), 29.93 (C25), 29.02 (C16), 26.85 (C23), 24.99 (C15), 23.86 (C28), 21.76 (C11), 20.46 (C27), 19.90 (C19), 19.68 (C26), 19.49 (C21), 12.64 (C29), 12.46 (C18). Parte del glucósido: 103.05 (C1'), 79.10 (C3'), 78.55 (C5'), 75.82 (C2'), 72.15 (C4'), 63.31 (C6').

5.4.2.1 Elucidación estructural del β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido

El compuesto **ARm12** fue aislado como un sólido blanco que fundió a 295-296 °C. El espectro de RMN-¹H (300 MHz, C₅D₅N) (Figura 17) del compuesto **ARm12** muestra un perfil de señales que son características de estructuras relacionadas al colesterol. En la región de campo alto (δ 2.5-0.5 ppm) del espectro de ¹H (Figura 17) y el experimento DEPT-135 (Figura 19) se observa un patrón complejo de señales, de las que destacan las señales de mayor intensidad atribuibles a seis grupos metilos (δ 1.01, H₃-21; 0.98, H₃-19; 0.94, H₃-

29; 0.92, H₃-27; 0.88, H₃-26; 0.68, H₃-18). Los grupos metilos fueron confirmados mediante el espectro de ¹³C (Fig. 18), los cuales mostraron las seis señales simples resonantes en δ 20.46 (C27), 19.90 (19), 19.68 (C26), 19.49 (C21), 12.64 (C29) y 12.45 ppm (C18). Los carbonos restantes en los experimentos de ¹³C (Figura 19) se pueden atribuir a doce grupos metilenos, del cual uno está unido a un hidroxilo (δ 63.30, C6') y a catorce grupos metinos, de los cuales uno es un metino vinílico δ 121.73 (C6), tres son metinos unido a hidroxilo δ 79.09 (C3'), 75.82 (C2'), 72.15 (C4'), y dos están unidos a un oxígeno de éter δ 78.98 (C3) y 78.54 (C5'). Esto es congruente con lo observable en el espectro de ¹H (Fig. 17) donde se aprecia una señal doble de doble en δ 5.38 que corresponde al hidrogeno vinílico H-6. En la región de los azúcares (5.2-4.0 ppm) se observan 4 señales doble de dobles que corresponden a los protones H-6'a, H-6'b, H-3' y H-4'; un triplete que corresponde al protón H-2' y una señal múltiple en δ 4.03 atribuible a H-5' y al hidrógeno geminal a grupo éter (H-3). La señal más característica del sacárido se aprecia como un doblete (*J* = 7.8 Hz) resonante en δ 5.01 ppm, la cual corresponde al hidrógeno anomérico H-1', mismo que fue confirmado en el espectro de RMN-¹³C con la señal que resuena en δ 103.04 ppm, atribuible al carbono acetálico C1' (Fig. 18). La comparación de estos datos espectroscópicos con los reportados en la literatura [55] permitió establecer la identidad del compuesto **ARm12** como β-sitosteril-3-O-β-D-glucopiranosido (Tabla 8).

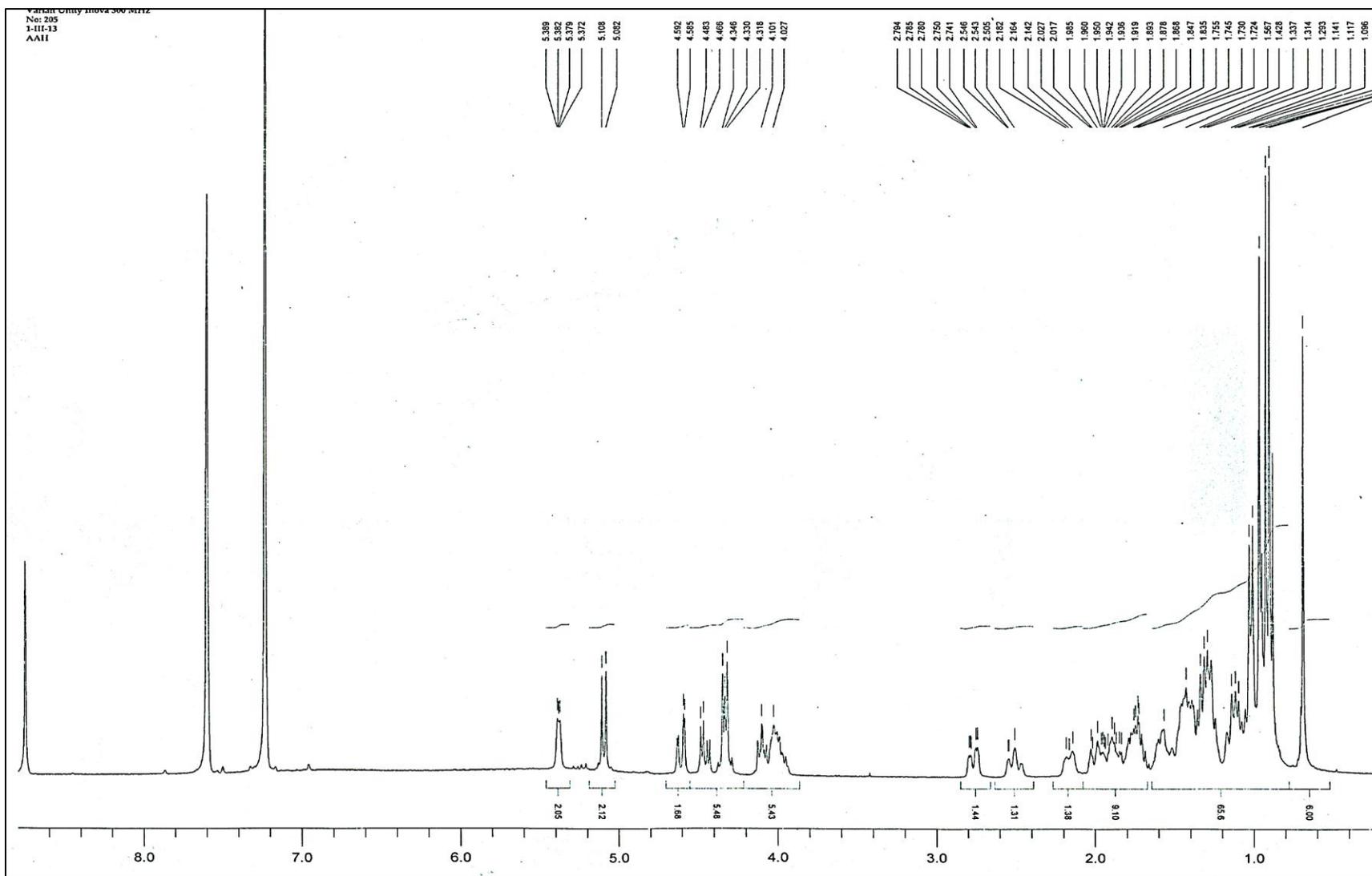


Figura 17. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, C₅D₅N) de β-sitosteril-3-O-β-D-glucopiranosido.

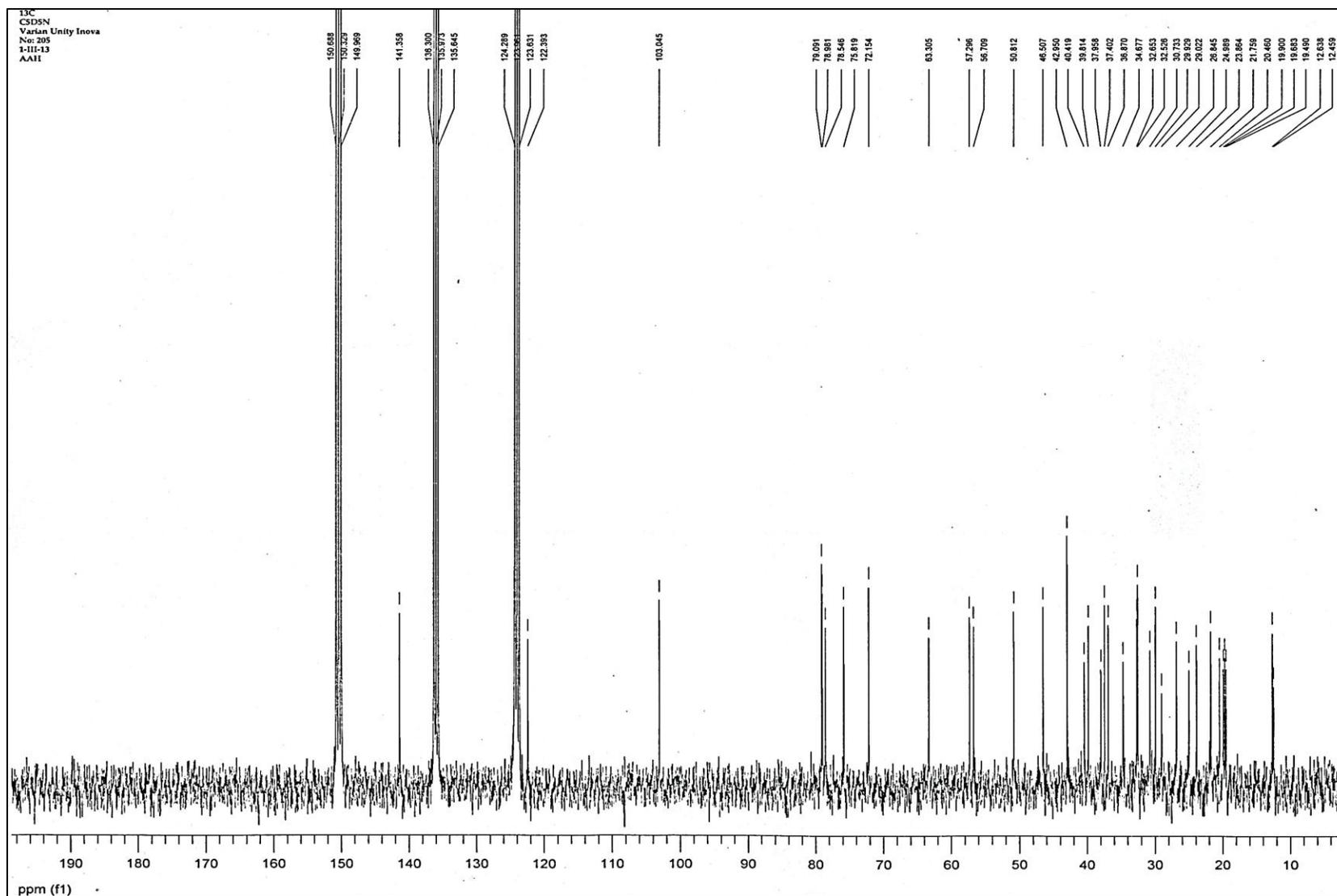


Figura 18. Espectro de RMN-¹³C (75 MHz, C₅D₅N) de β-sitosteril-3-O-β-D-glucopiranosido

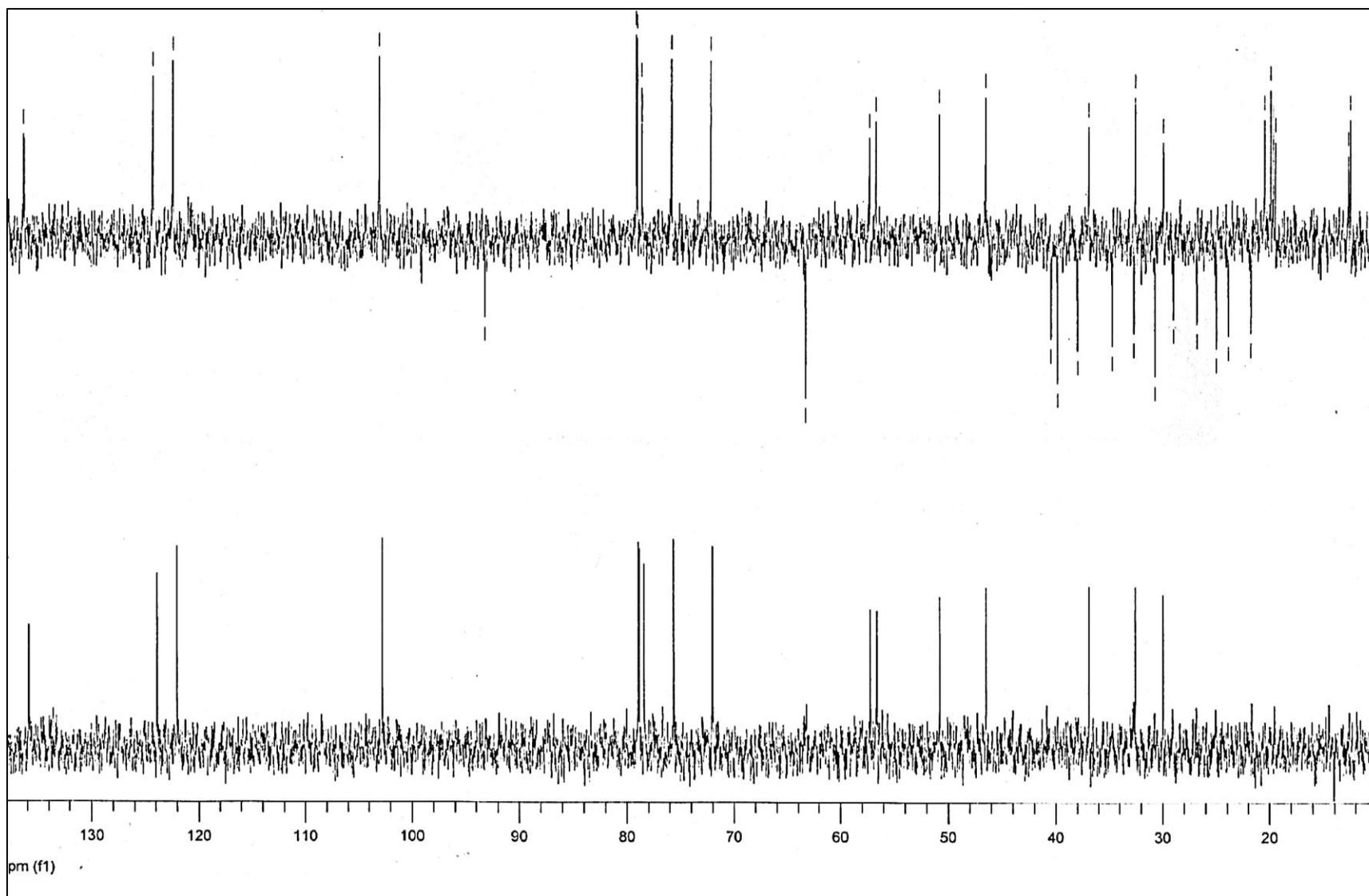


Figura 19. Experimentos DEPT-135 del β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranósido.

Tabla 8. Datos espectroscópicos de β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido

β-sitosteril-3-O-β-D-glucopiranosido					
RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)			RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)		
Hidrógeno	RMN $^1\text{H}_{\text{experimental}}$ δ_{ppm} (m, J/Hz)	RMN $^1\text{H}_{\text{literatura}}$ δ_{ppm} (m, J/Hz)	Carbono	RMN $^{13}\text{C}_{\text{experimental}}$ δ_{ppm}	RMN $^{13}\text{C}_{\text{literatura}}$ δ_{ppm}
H-6	5.38 (d, $J = 2.1$ Hz)	5.35 (t, $J = 2.5$ Hz)	C-5	141.36	140.95
H-3	4.03 (m)	3.96 (m)	C-6	121.73	121.90
H-1'	5.09 (d, $J = 7.8$ Hz)	5.04 (d, $J = 7.7$ Hz)	C-3	78.98	78.38
H-2'	4.10 (t, $J = 5.7$ Hz)	4.04 (dd, $J = 7.69,$ 7.50 Hz)	C-5'	78.54	78.13
H-3'	4.33 (d, $J = 8.4$ Hz)	4.27 (d, $J = 7.5$ Hz)	C-3'	79.09	78.54
H-4'	4.33 (d, $J = 8.4$ Hz)	4.27 (d, $J = 7.5$ Hz)	C-4'	72.15	71.67
H-5'	4.03 (m)	3.98 (m)	C-1'	103.05	102.57
H-6'a	4.59 (dd, $J = 2.1,$ 12 Hz)	4.55 (dd, $J = 2.5,$ 11.7 Hz)	C-6'	63.31	62.82
H-6'b	4.47 (dd, $J = 5.1,$ 11.1 Hz)	4.40 (dd, $J = 5.2,$ 11.7 Hz)	C-18	12.46	11.95
H ₃ -21	1.01 (d, $J = 7.8$ Hz)	1.01 (d, $J = 6.5$ Hz)	C-21	19.49	18.99
H ₃ -19	0.98 (s)	0.94 (s)	C-19	19.90	19.39
H ₃ -29	0.94 (d, $J = 7.5$ Hz)	0.88 (d, $J = 7.5$ Hz)	C-29	12.64	12.13
H ₃ -27	0.92 (d, $J = 6.3$ Hz)	0.86 (d, $J = 7.0$ Hz)	C-27	20.46	19.94
H ₃ -26	0.88 (d, $J = 6.3$ Hz)	0.84 (d, $J = 7.0$ Hz)	C-26	16.68	19.20
H ₃ -18	0.68 (s)	0.66 (s)	C-18	12.45	11.95

Los esteroides vegetales son miembros de la familia de los triterpenos, su estructura es similar a la del colesterol. Dentro del grupo de los esteroides vegetales existen dos categorías o subgrupos: los esteroides, con un doble enlace en posición 5 y los estanoles que no cuentan con dicho doble enlace. Los esteroides se pueden encontrar en la naturaleza en forma de ésteres de

ácidos grasos, ésteres de ácidos fenólicos, glucósidos de esterilo y glicósidos de esterilo acilados [57]. El β -sitosteril-3-O-D-glucopiranosido es un glucósido de esterilo.

Los glucósidos esteroidales se encuentran con bastante frecuencia en las especies vegetales. Estos se diferencian de los esteroides libres en que presentan un punto de fusión más alto y baja solubilidad en disolventes no polares o poco polares como el éter etílico, y de las saponinas debido a que son insolubles en agua y no son tóxicos para los animales [56].

Se ha comprobado que el β -sitosteril-3-O-D-glucopiranosido posee actividad analgésica, antiinflamatoria [58], antipirética, antineoplásica, quimiopreventivo, inmuno-moduladora [59], anti-gastroulcerativa [60], anti-plaquetaria [61], antihelmíntica [62]. Actualmente, este compuesto ha sido patentado para el tratamiento de infección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [55].

5.4.3 Fracción K

Debido a la complejidad observada en las muestras anteriores para el aislamiento y purificación de sus constituyentes, se decidió someter la fracción K a una reacción de acetilación tal y como fue descrito en el capítulo 4 (véase subtema 4.7), con la finalidad de mejorar la separación de compuestos para su posterior purificación.

El crudo de la reacción de la fracción K (5.20 g) fue fraccionado mediante cromatografía en columna (30 x 4 cm) utilizando como fase estacionaria gel de sílice (malla 230-400) y como fase móvil los sistemas de elución Hex:AcOEt y

AcOEt:MeOH en gradiente de polaridad. Lo anterior condujo a la obtención de 12 subfracciones (K1-K12) (Figura 22).

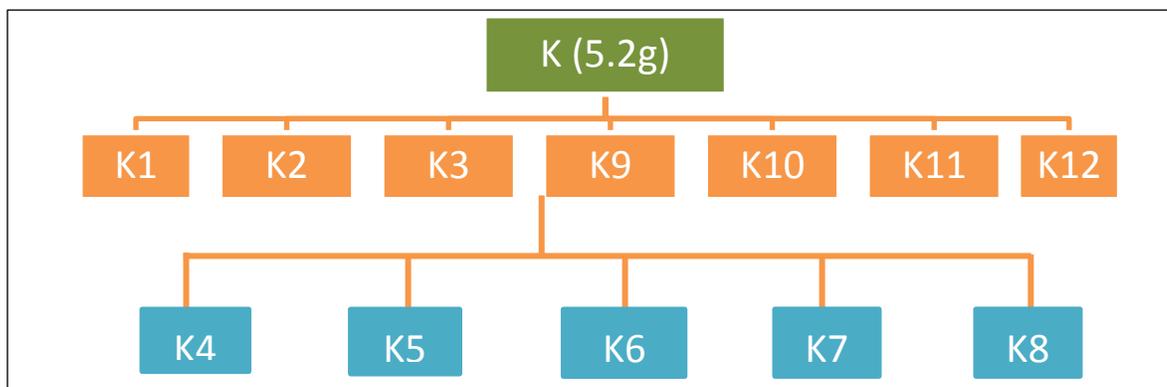
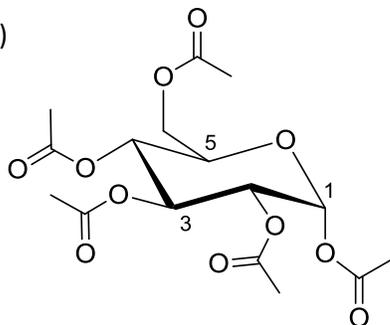


Figura 20.-Esquema de fraccionamiento de K. Los cuadros de color naranja corresponden a las subfracciones que se trabajaron en este proyecto

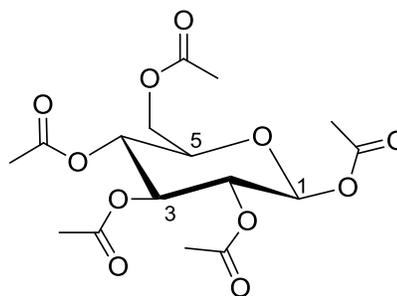
Se realizó el fraccionamiento de K7 (60 mg) mediante una cromatografía en columna (30 x 1 cm) utilizando como fase estacionaria gel de sílice (malla 230-400) y como fase móvil Hex:AcOEt en gradiente de polaridad obteniéndose cinco subfracciones. A partir de la subfracción K7.1 se obtuvo un compuesto resinoso etiquetado como **AR22** (1.3 mg).

Por otro lado, la subfracción K8 (190 mg) fue procesada mediante cromatografía en columna (30 x 1 cm) utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Hex:AcOEt en gradiente de polaridad. De las 12 subfracciones obtenidas (K8.1-K8.12), la subfracción K8.2 condujo al aislamiento de un compuesto resinoso (3.7 mg) etiquetado como **AR24**. La comparación por CCF de **AR22** y **AR24** exhibió una mancha con el mismo factor de retención, por lo cual se reunieron y se analizaron por RMN. De acuerdo a los datos espectroscópicos observados para **AR22-AR24**, se puede deducir la presencia de una mezcla isomérica de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- α -y β -D-glucopiranosas.

Hex:AcOEt (4:6)



α -D-glucosa peracetilada
PM: C₁₆H₂₂O₁₁



β -D-glucosa peracetilada
PM: C₁₆H₂₂O₁₁

Datos espectroscópicos del 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- β -D-glucopiranosas.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): δ_{ppm} : 5.73 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-1), 5.24 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 5.15 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-2), 5.13 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-4), 4.27 (1H, dd $J = 5.7, 9.3$ Hz, H-6b), 4.11 (1H, dd, $J = 2.4, 12.6$ Hz, H-6a), 3.86 (1H, m, H-5), 2.12 (3H, s, H-1'), 2.09 (3H, s, H-2'), 2.04 (3H, s, H-3'), 2.04 (3H, s, H-4'), 2.02 (3H, s, H-6').

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ_{ppm} : 170.6 (C3', 6'), 170.11 (C2',4'), 169.39 (C1'), 91.66 (C1), 72.76 (C3), 72.68 (C5), 70.17 (C2), 67.67 (C4), 61.4 (C6), 20.58 (CH₃COO-1,2,3,4,6).

5.4.3.1 Elucidación estructural del 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- β -D-glucopiranosas.

El espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) (Fig. 22) del compuesto resinoso **AR22-AR24** muestra dos patrones de señales atribuibles a la mezcla isomérica de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- α - y β -D-glucopiranosas, lo cual fue confirmado con los datos espectroscópicos reportados en la literatura para estos compuestos.

El patrón de señales de mayor intensidad corresponde al isómero β . El espectro de ^1H muestra las señales características de los protones anoméricos de la mezcla isomérica de la glucopiranososa peracetilada, las cuales resuenan como dobletes en δ 5.73 ($J = 8.1$ Hz) y 6.33 ($J = 3.9$ Hz) correspondientes a protón H1 α y H1 β , respectivamente (Figura 22).

En la región a campo bajo (δ 5.26-5.12) se observan señales dobles que resuenan en δ 5.24 ($J = 9.6$ Hz), 5.15 ($J = 9.9$ Hz) y 5.13 ($J = 9.3$ Hz) correspondientes a los protones H-3, H-2 y H-4, respectivamente (Figura 21). Además se observa una señal doble de doble de doble que corresponde al protón H-5 que resuena en δ 3.86 ($J = 2.4, 4.5$ Hz). Los protones previamente descritos exhiben desplazamientos químicos característicos de protones geminales a grupos ésteres, lo cual es congruente con las señales observadas en el espectro de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Figura 23) para carbonilos de grupos ésteres (δ 169.39 -170.64 ppm, C1', C2', C3', C4' y C5'). Los grupos ésteres van de acuerdo a lo esperable ya que la molécula proviene de una reacción de acetilación. Los cinco grupos acetilo fueron confirmados en el espectro de ^1H donde se observan cinco singuletes en la región de δ 2.02 a 2.18 ppm. La comparación de estos datos espectroscópicos con los reportados en la literatura permitieron establecer la identidad del compuesto **AR22-AR24** como 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- β -D-glucopiranososa (Figura 22) [63]. En lo que respecta al isómero α , sus señales de RMN no fueron asignadas debido a que algunas señales presentaron baja intensidad o solapamiento con otras señales.

La glucosa es tal vez la segunda sustancia fundamental en el mantenimiento de la vida humana después del agua. Además de su papel como combustible en las células, su participación en las múltiples funciones bioquímicas determina el perfil metabólico humano en los estados normales y patológicos. El 1,2,3,4,6-

penta-O-acetil- α - y β -D-glucopiranosas se ha usado reciente como una señal trazadora de RMN para delinear vías metabólicas en tejidos y fluidos humanos [64].

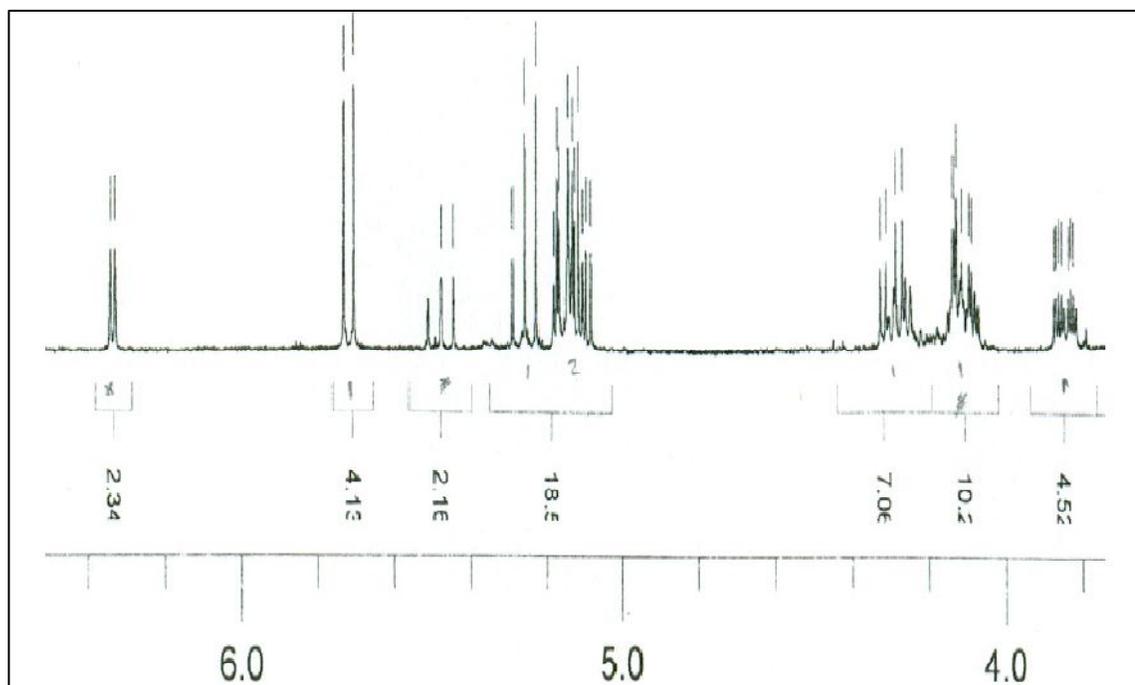


Figura 21. Ampliación del espectro de RMN- ^1H del compuesto 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- β -D-glucopiranosas

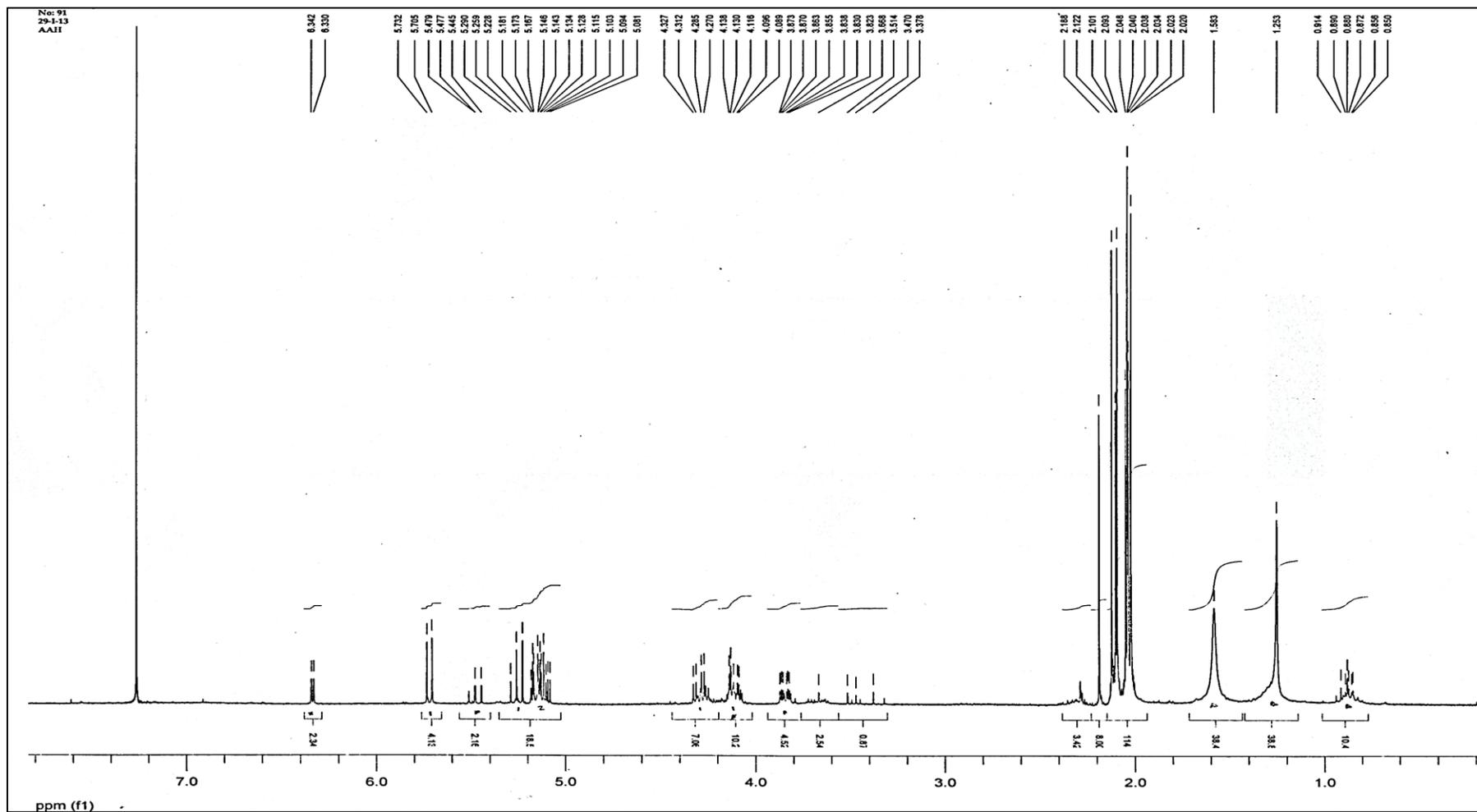


Figura 22. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-β-D-glucopiranos.

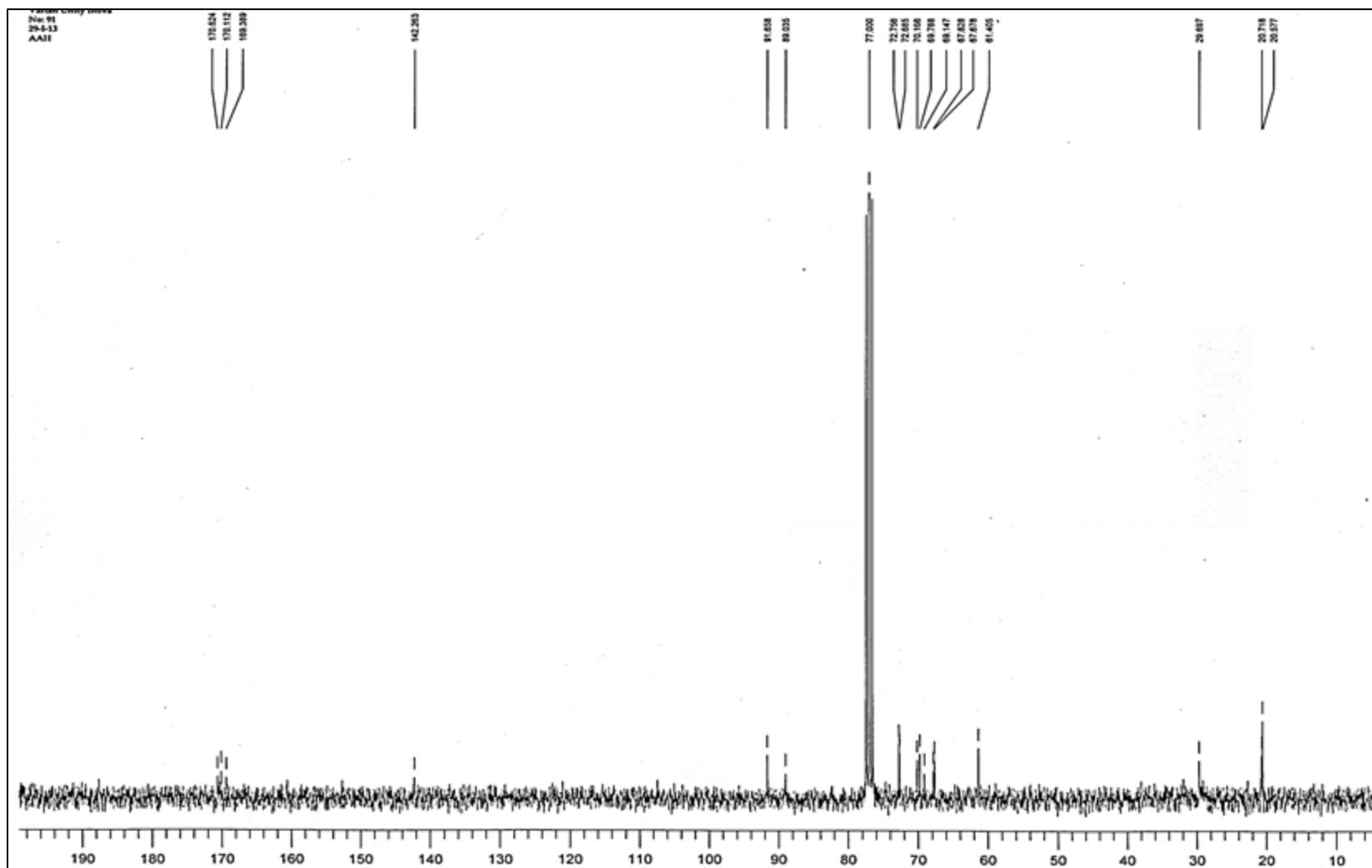


Figura 23. Espectro de RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-β-D-glucopiranosas.

Aunado a la investigación de las fracciones más potentes, se procesaron algunas fracciones que exhibieron moderada actividad inhibitoria de α -glucosidasa (fracción B, C y G) logrando purificar dos esteroides y un flavonoide.

5.4.4 Fracción G

A partir de 1.75 g de muestra se realizó el fraccionamiento mediante una cromatografía en columna de vidrio (30x4cm) utilizando como fase estacionaria gel de sílice (malla 230-400) y como fase móvil los sistemas de elución Hex:AcOEt, AcOEt:MeOH (9:1) y MeOH 100% en gradiente de polaridad. Lo anterior condujo a la obtención de 11 subfracciones G1-G11 (Figura 27).

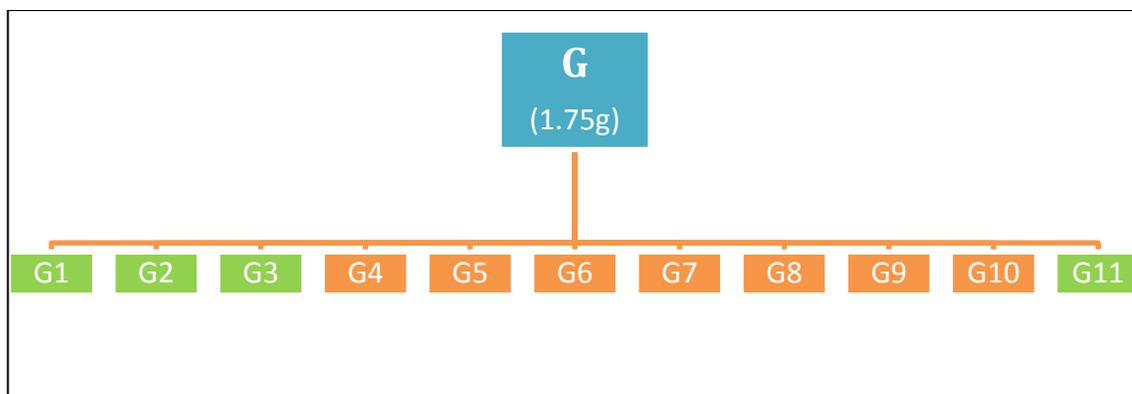


Figura 24.-Esquema de fraccionamiento de G. Los cuadros de color naranja corresponden a las subfracciones que se trabajaron en este proyecto.

Las subfracciones G4, G5, G6, G9 y G10 obtenidas de la fracción G fueron sometidas a varias técnicas analíticas para la separación de sus constituyentes. Las técnicas analíticas comprendieron la cromatografía en capa fina preparativa cromatografía en columna empacadas con diversas fases estacionarias entre las que destacan la celulosa microcristalina NP, la carboximetilcelulosa y el Dowex 50 2 X 200; en tanto que, la fase móvil consistió en mezclas de gradiente de polaridad de éter de petróleo:acetona, CHCl_3 :MeOH, DCM:MeOH, Hex:éter dietílico, éter dietílico:ACN, Hex:ACN y Hex:Acetona. A pesar de la

aplicación meticulosa de éstas técnicas analíticas, solo fue posible obtener mezclas de 2 o más compuestos que no fueron caracterizados estructuralmente.

Durante el fraccionamiento se obtuvieron unos sólidos blancos (**AR5**) que al ser disueltos en MeOH viraron de color naranja a rojo. Al realizar una CCF de los sólidos disueltos, se observan varias manchas que sugieren la presencia de más de dos compuestos. La observación anterior quedó evidenciada por el espectro de RMN-¹H (Figura **28**), que fue adquirido de forma simultánea. Las señales del espectro de RMN-¹H confirma la presencia de más de dos compuestos, destacándose las señales atribuibles a un fenilpropanoide glucosidado (estructuras de smilásidos **18-20**).

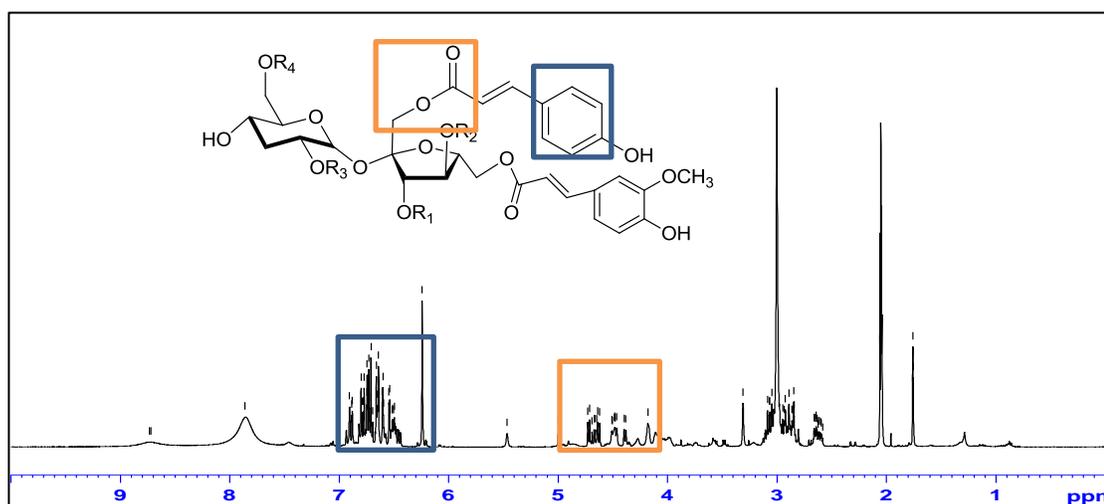
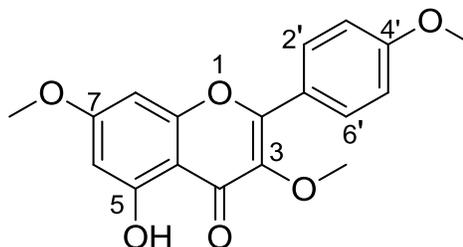


Figura **25**. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CD₃COCD₃) de los sólidos **AR5**.

Considerando la complejidad presentada en la resolución de las mezclas de compuestos de las subfracciones de G, se decidió someter la subfracción G8 a una reacción de metilación (véase capítulo **4**). El crudo de la reacción de metilación de G8 (85 mg) fue sometido a purificación mediante CC empacada con gel de sílice y eluida con Hex:DCM en gradiente de polaridad. Lo anterior condujo a la obtención de siete subfracciones (G8.1-G8.7). A partir de la subfracción G8.6 (15 mg) fue posible purificar 7 mg de un sólido amarillo

(**ARm11**) recristalizado de CHCl_3 en forma de agujas amarillas e identificado como 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (Figura 26) [65].

Hex:AcOEt (6:4)



5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (**ARm11**)
PM: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$

Datos espectroscópicos de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ_{ppm} : 12.65 (1H, s, OH-5), 8.069 (2H, dd, $J = 2.1, 9.0$ Hz, H-2' y H-6'), 7.014 (2H, dd, $J = 2.4, 9.0$ Hz, H-3' y H-5'), 6.43 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.34 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 3.89 (3H, s, OCH_3 -7), 3.86 (3H, s, OCH_3 -3'), 3.85 (3H, s, OCH_3 -4').

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 178.71 (C4), 165.33 (C7), 161.95 (C4'), 161.61 (C5), 156.69 (C9), 155.89 (C2), 138.79 (C3), 130.11 (C2', C6'), 122.73 (C1'), 114.17 (C3', C5'), 105.99 (C10), 97.77 (C6), 92.09 (C8), 60.09 (OMe -3), 55.75 (OMe -7), 55.39 (OMe -4').

5.4.4.1 Elucidación estructural del 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona

A partir de la fracción G se purificaron cristales amarillos (**ARm11**) en forma de agujas que fundieron a 143-144 °C. El espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Fig. 26) de **ARm11** exhibió tres señales simples entre δ 3.8-4.0 ppm que integran para tres hidrógenos cada una y que fueron atribuidas a la presencia de 3 grupos metoxilos (CH_3O -C3, CH_3O -C7, CH_3O -C4'). Los grupos metoxilo

fueron confirmados en el espectro de ^{13}C (Fig. 27) y DEPT-135 (Fig. 28) mediante las tres señales en δ 60.10 ($\text{CH}_3\text{O-C3}$), 55.75 ($\text{CH}_3\text{O-C7}$) y 55.39 ppm ($\text{CH}_3\text{O-C4}'$). En la región de protones aromáticos (fig. 26) se observan dos señales dobles en δ 6.43 (H-6) y 6.34 ppm (H-8) con constantes de acoplamiento ($J = 2.4$ Hz) características de dos protones en posición *meta*. También se observan dos dobletes de dobletes que integran para dos hidrógenos cada una y que resuena en δ 8.06 ($J = 2.4, 9.1$ Hz, H-2' y H-6') y 7.01 ppm (H-3' y H-5'), las cuales corresponden a un sistema de protones AA'BB'. Adicionalmente, el espectro de RMN- ^1H muestra la presencia de un singulete en δ 12.65 ppm atribuible al protón HO-C5 quelatado con el oxígeno del carbonilo C4, quedando éste último evidenciado por la señal resonante en δ_{C} 178.72 ppm. La presencia de protones aromáticos, aunado a las 18 señales resonantes en el espectro de ^{13}C (fig. 27), permitieron establecer la existencia de un flavonoide, que por comparación con los reportes en la literatura fue identificado como 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona [65] (Fig. 26).

Tabla 9. Datos espectroscópicos de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona

5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona					
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)			RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)		
Hidrógeno	RMN $^1\text{H}_{\text{experimental}}$ δ_{ppm} (m, J/Hz)	RMN $^1\text{H}_{\text{literatura}}$ δ_{ppm} (m, J/Hz)	Carbono	RMN $^{13}\text{C}_{\text{experimental}}$ δ_{ppm}	RMN $^{13}\text{C}_{\text{literatura}}$ δ_{ppm}
5-OH	12.65 (s)	12.70 (s)	C-4	178.71	179.0
H-6	6.34 (d, $J = 2.4$ Hz)	6.34 (d, $J = 2$ Hz)	C-7	165.33	165.6
H-8	6.43 (d, $J = 2.4$ Hz)	6.43 (d, $J = 2$ Hz)	C-2'-C6'	130.11	130.4
H2'-H6'	8.06 (d, $J = 9.0$ Hz)	8.06 (d, $J = 8.1$ Hz)	C-3'-C-5'	114.17	114.3
H3'-H5'	7.01 (d, $J = 9.0$ Hz)	7.01 (d, $J = 9.0$ Hz)	$\text{CH}_3\text{O-3}$	60.09	60.3
$\text{CH}_3\text{O-3,4',7}$	3.89, 3.86, 3.85 (3s)	3.86-3.87 (3s)	$\text{CH}_3\text{O-4',7}$	55.7, 55.4	56.0, 55.9

Los flavonoides son un grupo de sustancias que se encuentran en las plantas cuyas estructuras derivan del núcleo aromático flavano o 2-fenilbenzopirano. También son compuestos de la serie C6-C3-C6, por lo que su esqueleto de carbonos consiste en dos grupos C6 que son anillos de benceno sustituidos por una cadena alifática de 3 carbonos [56]. El compuesto 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona es un flavonoide tipo flavanol, el cual ha sido reportado en la literatura por sus propiedades antioxidante [66], antimicrobiana [67] y baja actividad anti-alérgica [68].

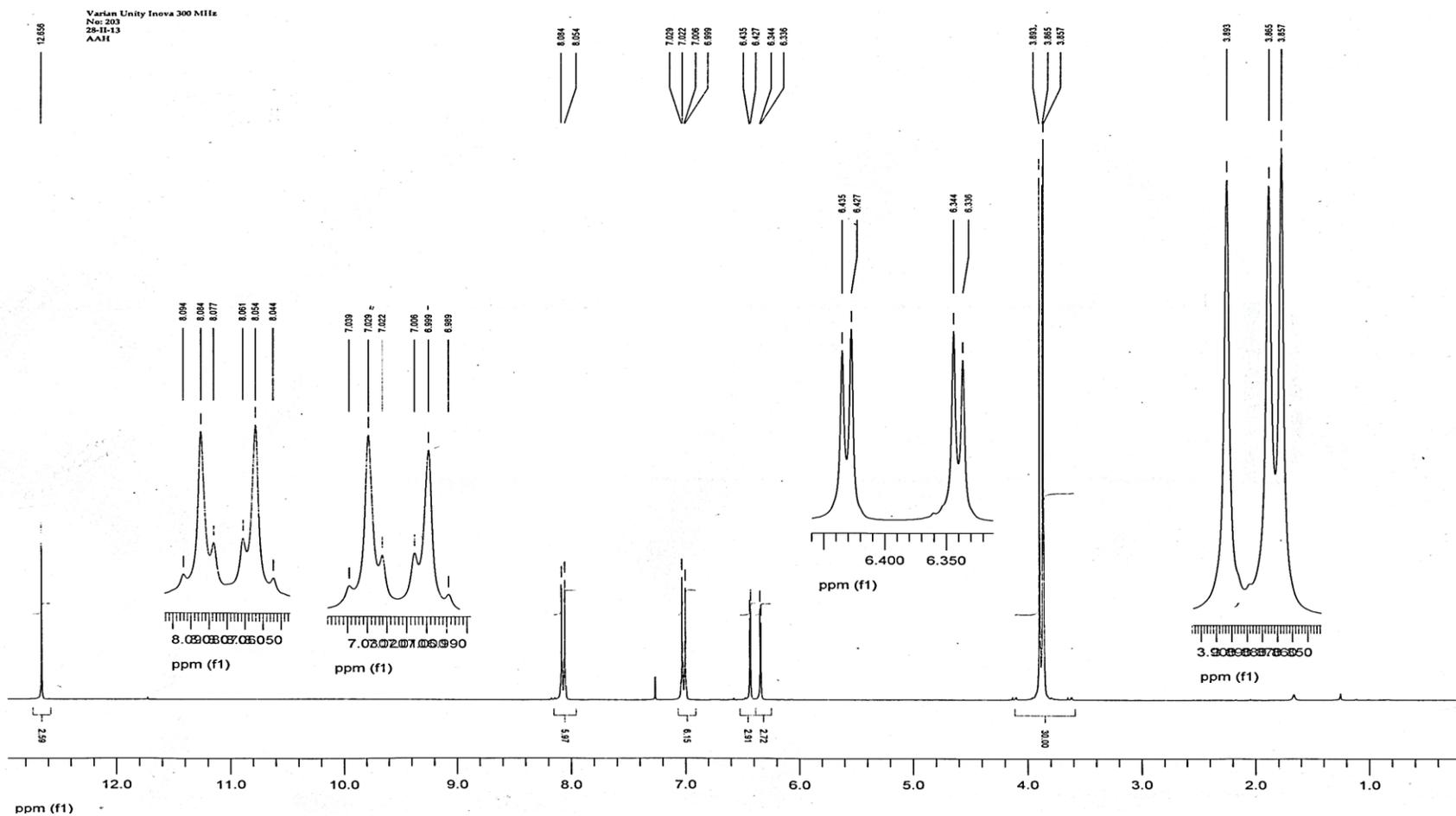


Figura 26. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) del 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona.

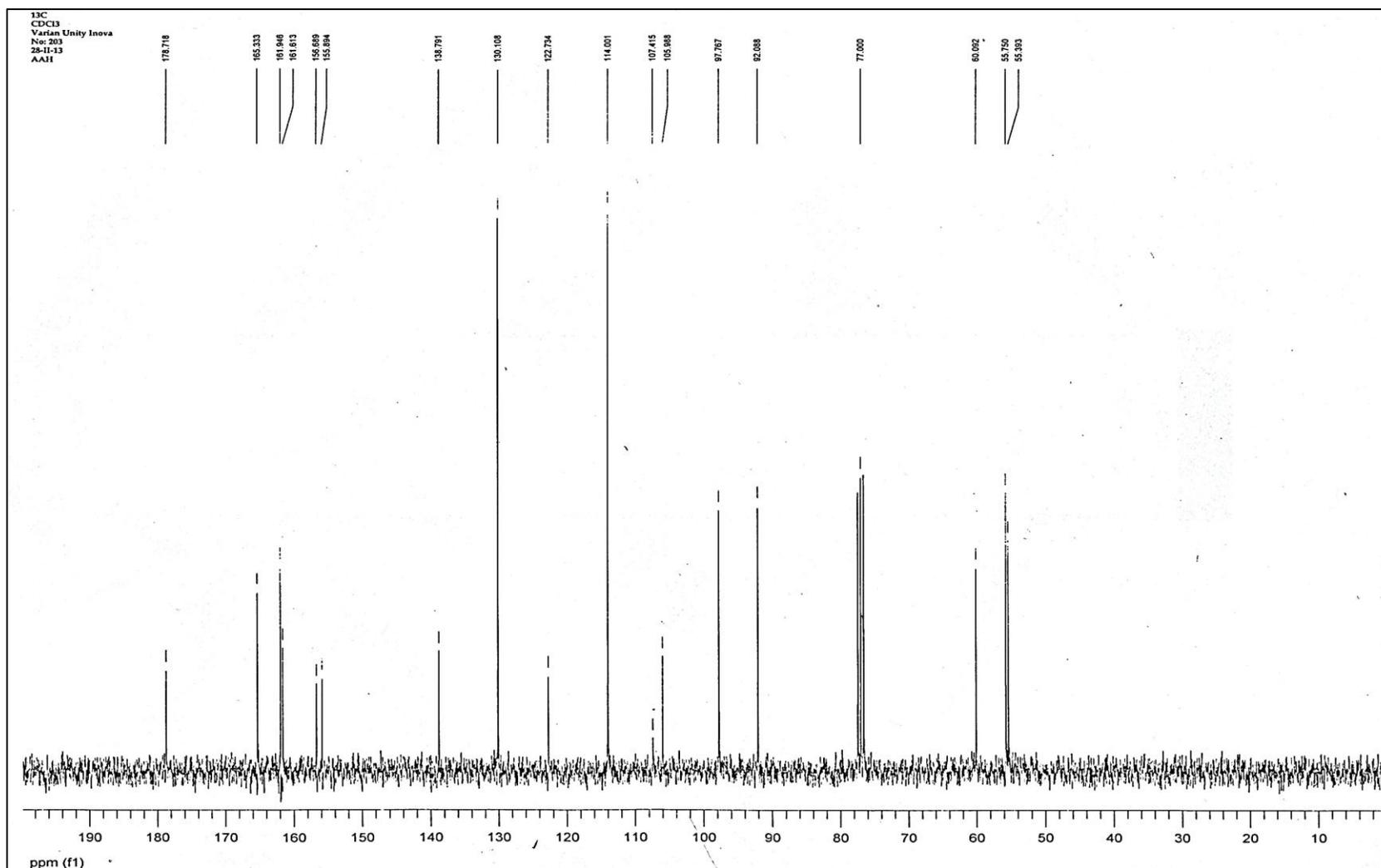


Figura 27. Espectro de RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) del 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona.

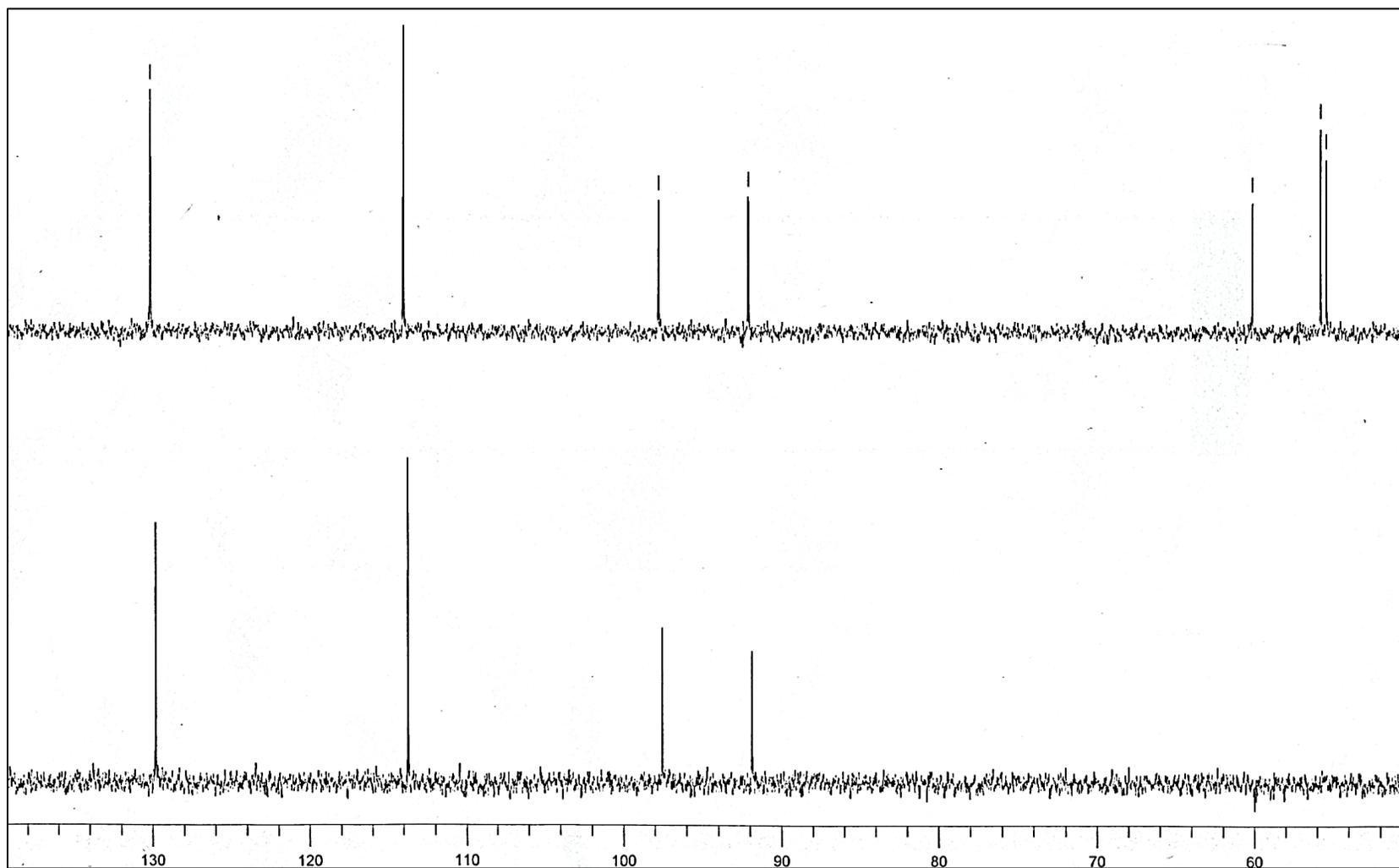
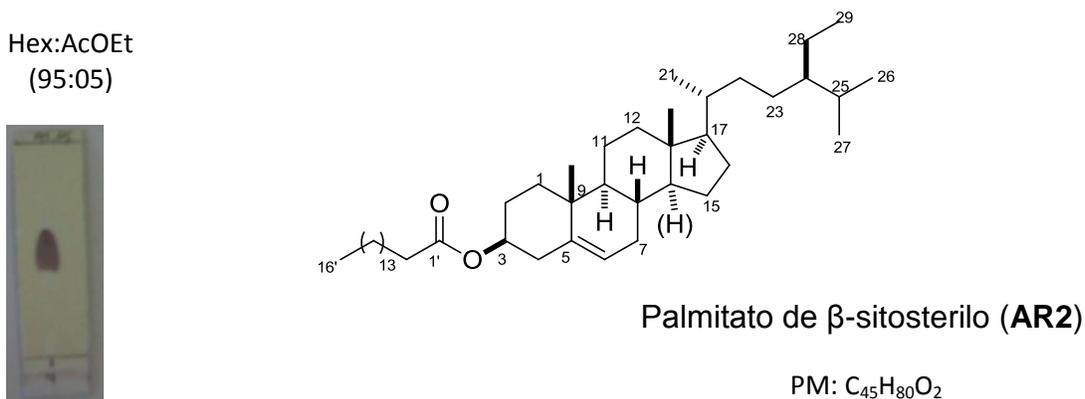


Figura 28. Experimentos DEPT-135 del 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona.

5.4.5 Fracción B

A partir de la fracción principal B (189 mg) se realizó una cromatografía en columna con fase móvil Hex:AcOEt en gradiente y con gel de sílice (malla 230-400) como fase estacionaria. Se obtuvieron seis subfracciones (B1-B6) y a partir de la subfracción B3 (22.2 mg) se aislaron 2.5 mg de un compuesto (**AR2**) de apariencia cerosa y color blanco, el cual fue identificado como palmitato de β -sitosterilo (Figura 34).



Datos espectroscópicos de Palmitato de β -sitosterilo.

RMN-¹H (400MHz, CDCl₃): δ_{ppm} : 5.37 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-6), 4.62 (1H, m, H-3), 2.292-1.119 (25H, m), 2.24 (2H, t, H₂') 2.01 (2H, d, $J = 6$ Hz, H-4), 1.88 (2H, d, $J = 9.6$ Hz, H-7), 1.28 (26H, s.a.-(CH₂)₁₃, H-3'-H15'), 1.02 (3H, s, H-19), 0.93 (15H,m, H₃- 26, H₃-27, H₃-H21, H₃-29, H₃-H16'), 0.68 (3H,s,H-18).

RMN-¹³C (100MHz, CDCl₃) δ_{ppm} : 139.73 (C5), 122.59 (C6), 73.69 (C3), 56.69 (C14), 56.04 (C17), 50.03 (C9), 45.84 (C24), 42.32 (C13), 39.73 (C12), 38.17 (C4), 37.01 (C1), 36.61 (C10), 36.16 (C20), 33.94 (C22), 31.94 (C7), 31.92 (C8), 29.12 (C25), 28.26 (C16), 27.82 (20), 26.07 (C23), 24.30 (C15), 23.07 (C28), 21.04 (C11), 19.83 (C26), 19.33 (C19), 19.04 (C27), 18.78 (C21), 11.99 (C18), 11.86 (C29). Parte de la cadena alifática: 173.2 (C1'), 34.74 (C2'), 31.87 (C14'), 29.71-29.27 (C4'-C13'), 25.08 (C3'), 22.71 (C15'), 14.13 (C16').

5.4.5.1 Elucidación estructural del Palmitato de β -sitosterilo

A partir de la fracción B se obtuvo un compuesto ceroso color blanco. El espectro de RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 29) de este compuesto muestra un perfil de señales que son características de estructuras relacionadas al colesterol. En la región de campo alto (δ 2.5-0.5 ppm) del espectro de ^1H (Figura 29) se observa un patrón complejo de señales, de las que destacan las señales de mayor intensidad atribuibles a seis grupos metilos (δ 1.01, H_3 -19; 0.92, H_3 -21; 0.84, H_3 -29; 0.83, H_3 -27; 0.81, H_3 -26; 0.68, H_3 -18) y la señal singulete ancha que corresponde a los grupos metilenos de la parte de cadena alifática resonante en δ 1.28 ppm (H -3'- H 15'). Los grupos metilos fueron confirmados mediante el espectro de ^{13}C (Figura 30), el cual mostró señales resonantes en δ 19.83 (C27), 19.41 (C19), 19.03 (C26), 18.78 (C21), 11.99 (C29) y 11.87 ppm (C18). Los carbonos restantes en los experimentos de ^{13}C se pueden atribuir a 11 grupos metilenos y a nueve grupos metinos, de los cuales dos carbonos fueron fácilmente atribuibles a metino unido a grupo éster (δ 73.69) y metino vinílico (δ 122.59). Estos grupos funcionales son congruentes con lo observable en el espectro de ^1H (Figura 29) donde se aprecia una señal doble de dobles en δ 5.37 correspondiente al hidrogeno vinílico H-6 y una señal múltiple en δ 4.62 atribuible al hidrógeno H-3 geminal a grupo éster. La comparación de estos datos espectroscópicos con los reportados en la literatura [68], permitió establecer la identidad del compuesto **AR2** como palmitato de β -sitosterilo (Tabla 10).

Tabla 10. Datos espectroscópicos del Palmitato de β -sitosterilo

Palmitato de β -sitosterilo					
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)			RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)		
Hidrógeno	RMN $^1\text{H}_{\text{experimental}}$ δ_{ppm} (m, J/Hz)	RMN $^1\text{H}_{\text{literatura}}$ δ_{ppm} (m, J/Hz)	Carbono	RMN $^{13}\text{C}_{\text{experimental}}$ δ_{ppm}	RMN $^{13}\text{C}_{\text{literatura}}$ δ_{ppm}
H-6	5.37 (d, $J = 4.4$ Hz)	5.38 (d, $J = 4.8$ Hz)	C-6	122.59	122.6
H-3	4.62 (m)	4.62 (m)	C-3	73.69	73.7
$\text{H}_2(\text{H}_3'-\text{H}_{15}')$	1.27 (s.a)	1.28 (s)	C-4'-C13'	29.2-29.7	29.2-29.7
H-19	1.02 (s)	1.04 (s)	C-27	19.83	19.0
$\text{H}_3-26, \text{H}_3-27, \text{H}_3-\text{H}_{29}, \text{H}_3-21, \text{H}_3-\text{H}_{16}'$	0.80-0.93 (m)	0.80-0.93 (m)	C-19, C26, C21, C18	19.41, 19.03, 18.78, 11.87	19.3, 19.8, 18.8, 11.88
H-18	0.68 (s)	0.69 (s)	C29	11.99	12.0

El palmitato de β -sitosterilo es un esteroil esterificado con el ácido palmítico. Los esteroides esterificados poseen actividad antioxidante y antiinflamatoria [57]. Se ha reportado actividad anti-aterogénica [61]. Ju y cols. mencionan que la adición de esteroides en forma esterificada en suplementos alimenticios, disminuyen el colesterol sérico, especialmente colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) [59].

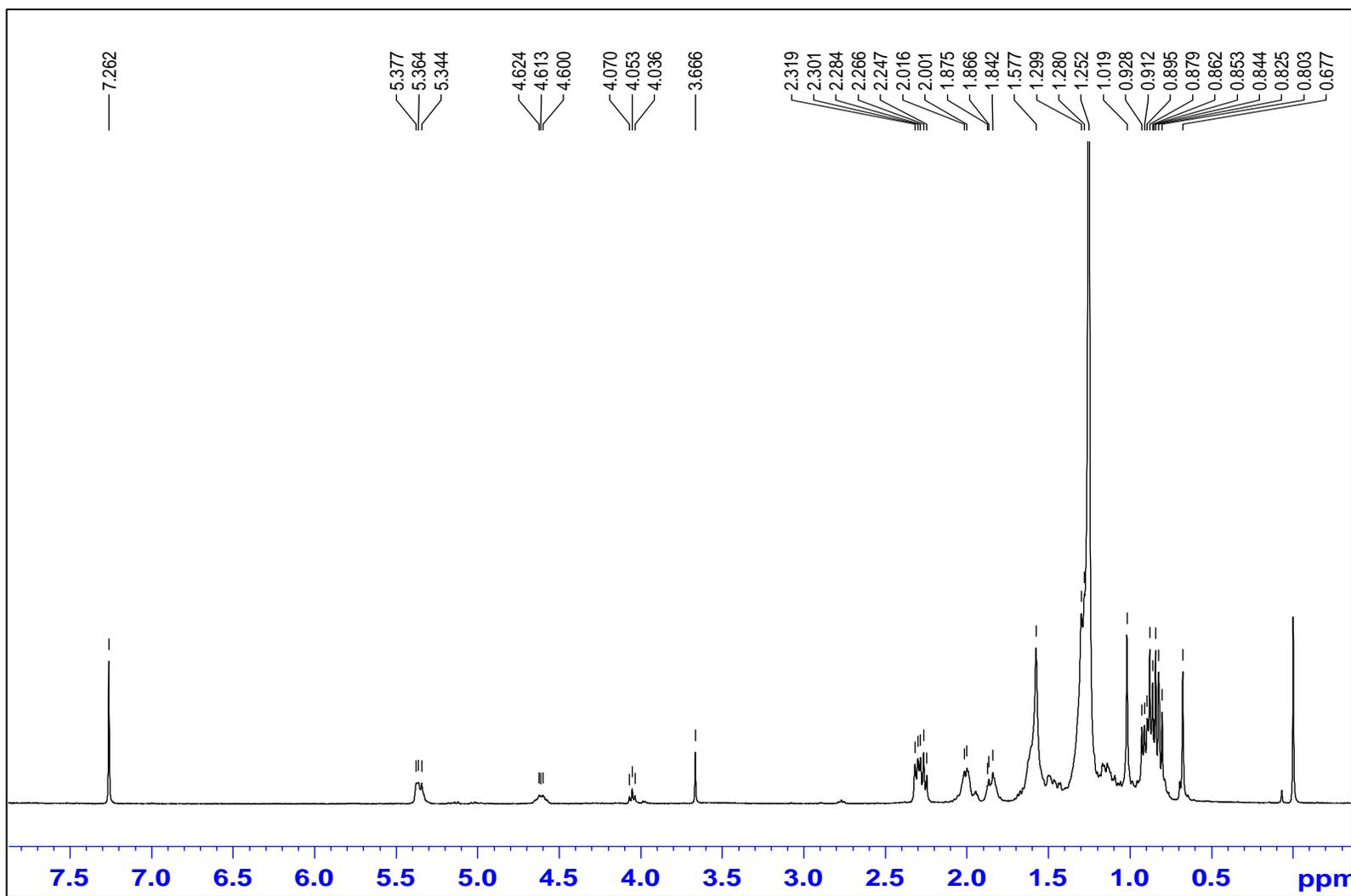


Figura 29. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) del palmitato de β -sitosterilo.

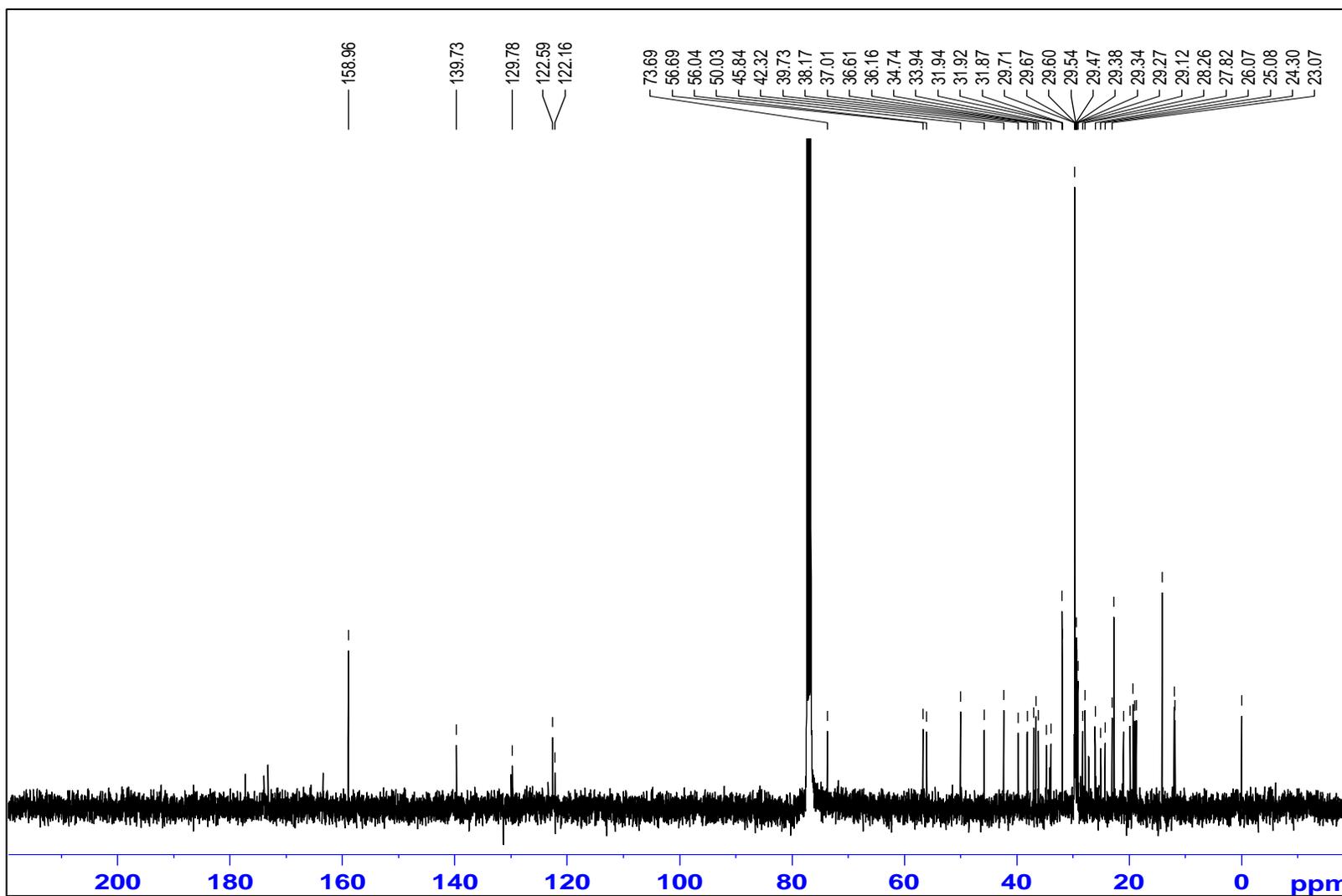
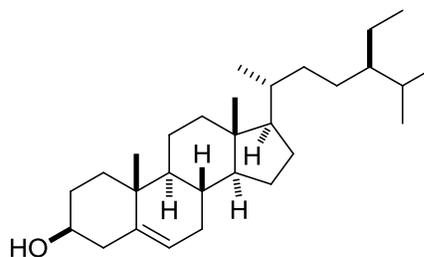


Figura 30. Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) del palmitato de β-sitosterilo.

5.4.6 Fracción C

A partir de la fracción principal C (880 mg) se realizó una cromatografía en columna (30 x 1 cm) previamente empacada con gel de sílice y eluida con Hex:AcOEt (98:2) en gradiente de polaridad. Lo anterior condujo a la obtención de siete subfracciones (C1-C7), de las cuales C6 presentó un precipitado blanco (7 mg) que fue identificado como β -sitosterol (**AR4**) (Figura 37).

Hex:AcOEt (9:1)



β -sitosterol (**AR4**)

PM: C₂₉H₅₀O

Datos espectroscópicos de β -sitosterol.

RMN-¹H (400MHz, CDCl₃): δ_{ppm} : 5.36 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 2.292-1.119 (28H-m), 1.99 (2H, d, $J = 5.6$ Hz, H-4), 1.84 (2H, d, $J = 10.4$ Hz, H-7), 1.014 (3H, s, H-19), 0.92 (3 H, d, $J = 6.8$ Hz, H-29), 0.85 (3H,t, H-21) 0.84 (3H, d, $J = 7.6$, H-27) 0.82 (3H, d, $J = 8.4$ Hz, H-26), 0.68 (3H,s,H-18).

RMN-¹³C (100MHz, CDCl₃) δ_{ppm} : 141.0 (C5), 121.74 (C6), 71.83 (C3), 56.77 (C14), 56.05 (C17), 50.13 (C9), 45.84 (C24), 42.33 (C13), 42,30 (C4), 39.78 (C12), 37.26 (C1), 36.51 (C10), 36.16 (C20), 33.95 (C22), 31.91 (C2), 31.66 (C7), 29.72 (C8), 29.15 (C25), 28.26 (C16), 26.07 (C23), 24.31 (C15), 23.07 (C28), 21.09 (C11), 19.83 (C27), 19.41 (C19), 19.04 (C26), 18.79 (C21),11.99 (C18), 11.87 (C29).

5.4.6.1 Elucidación estructural de β -sitosterol

A partir de la fracción C precipitó un sólido amorfo blanco (**AR4**) que fue cristalizado de CHCl_3 en agujas transparentes que fundieron a 98°C . El espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 31) de **AR4** muestra un perfil de señales que son características de estructuras relacionadas al colesterol. En la región de campo alto (δ 2.5-0.5 ppm) del espectro de ^1H (Figura 31) se observa un patrón complejo de señales, de las que destacan las señales de mayor intensidad atribuibles a seis grupos metilos (δ 1.01, H_3 -19; 0.92, H_3 -29; 0.84, H_3 -21; 0.83, H_3 -27; 0.81, H_3 -26; 0.68, H_3 -18). Los grupos metilos fueron confirmados mediante el espectro de ^{13}C (Figura 32), los cuales mostraron seis señales simples resonantes en δ 19.83 (C27), 19.41 (19), 19.03 (C26), 18.78 (C21), 11.99 (C18) y 11.87 ppm (C29). Los carbonos restantes observados en el espectro de ^{13}C (Figura 32) se pueden atribuir a 11 grupos metilenos y a nueve grupos metinos, de los cuales dos carbonos fueron fácilmente atribuibles a metino unido a grupo hidroxilo (δ 71.83) y metino vinílico (δ 121.73). Estos grupos funcionales son congruentes con lo observable en el espectro de ^1H (Figura 31) donde se aprecia una señal doble de dobles en δ 5.36 correspondiente al hidrogeno vinílico H-6 y una señal múltiple en δ 3.52 atribuible al hidrógeno H-3 geminal a grupo hidroxilo. La comparación de estos datos espectroscópicos con los reportados en la literatura [68], permitió establecer la identidad del compuesto **AR4** como β -sitosterol (Tabla 11).

El β -sitosterol es el principal fitoesterol que se encuentra en la mayoría de las plantas superiores [57]. Se le atribuye actividad antiinflamatoria [58,70], antipirética [71], analgésica [58], quimiopreventiva [72], antihelmíntica, antimutagénica [58,70], antiulcerativa [60], antidiabética, antioxidante [72], angiogénica [73]. Se encuentra comercialmente disponible como un producto herbal llamado *beta-s*. Es usado para disminuir la absorción de colesterol en el sistema digestivo y la cantidad de colesterol producido por el hígado. Rosenblat y cols. sugieren utilizar el β -sitosterol como terapia adicional a una disminución

de uso de Estatinas [74]. Estudios recientes han mostrado que el β -sitosterol es un agente quimiopreventivo en cáncer de colon, próstata y mama [72].

Tabla 11. Comparación de los datos espectroscópicos del β -sitosterol

β-sitosterol					
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)			RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)		
Hidrógeno	RMN $^1\text{H}_{\text{experimental}}$ δ_{ppm} (m, JHz)	RMN $^1\text{H}_{\text{literatura}}$ δ_{ppm} (m, JHz)	Carbono	RMN $^{13}\text{C}_{\text{exp}}$ δ_{ppm}	RMN $^{13}\text{C}_{\text{literatura}}$ δ_{ppm}
H-6	5.36 (d, $J = 4.8$ Hz)	5.35 (d, $J = 5.2$ Hz)	C-6	122.59	122.6
H-3	3.53 (m)	3.56 (m)	C-3	73.69	73.7
H-19	1.01 (3H, s)	1.00 (s)	C-27	19.83	19.0
H-21, H-26, H-27	0.82-0.85 (m)	0.81-0.84 (m)	C-19, C-26, C-21, C-18	19.41, 19.03, 18.78, 11.87	19.3, 19.8, 18.8, 11.88
H-18	0.68 (3H, s)	0.67 (3H, s)	C29	11.99	12.0

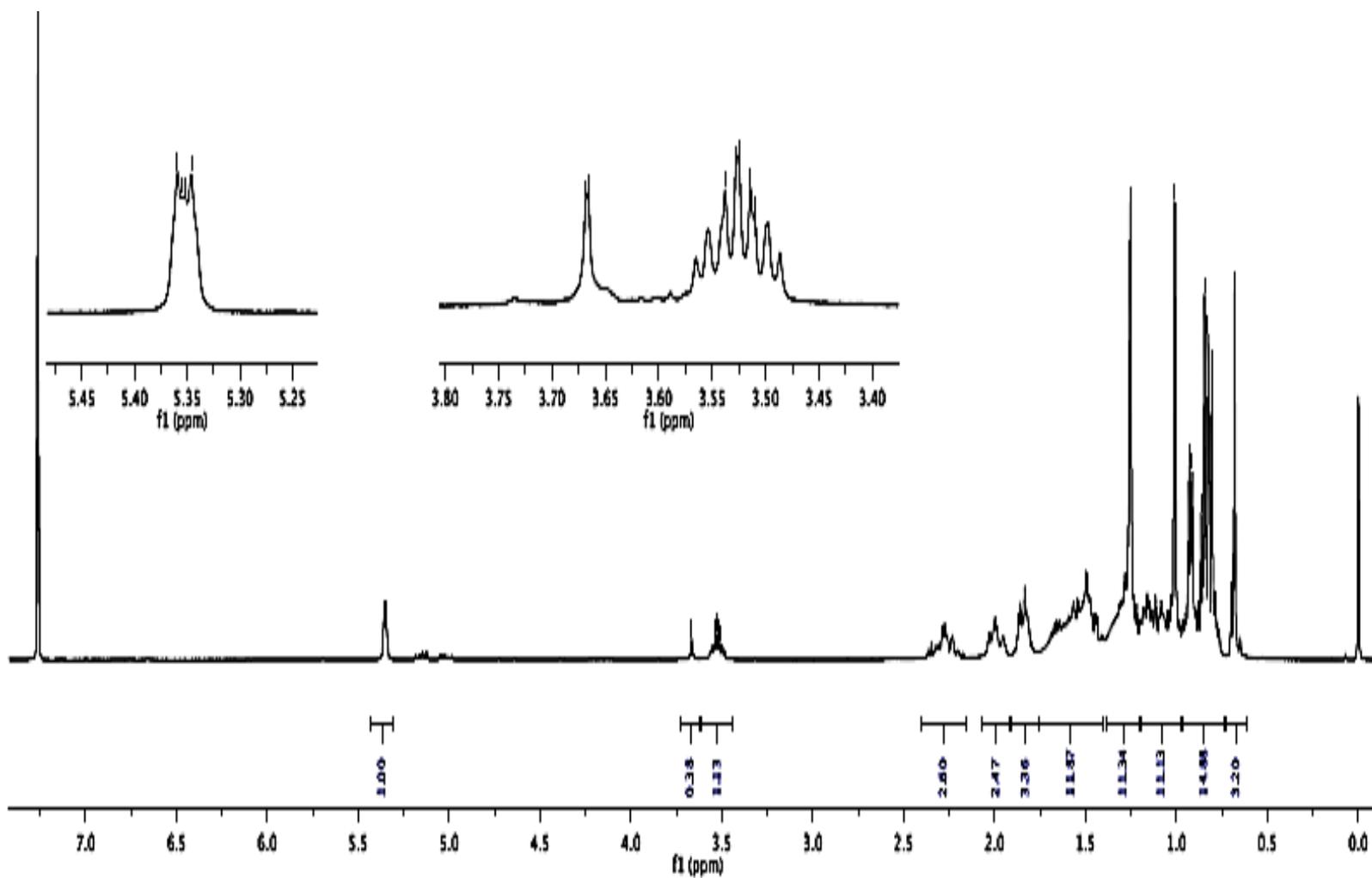


Figura 31. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) del β -sitosterol.

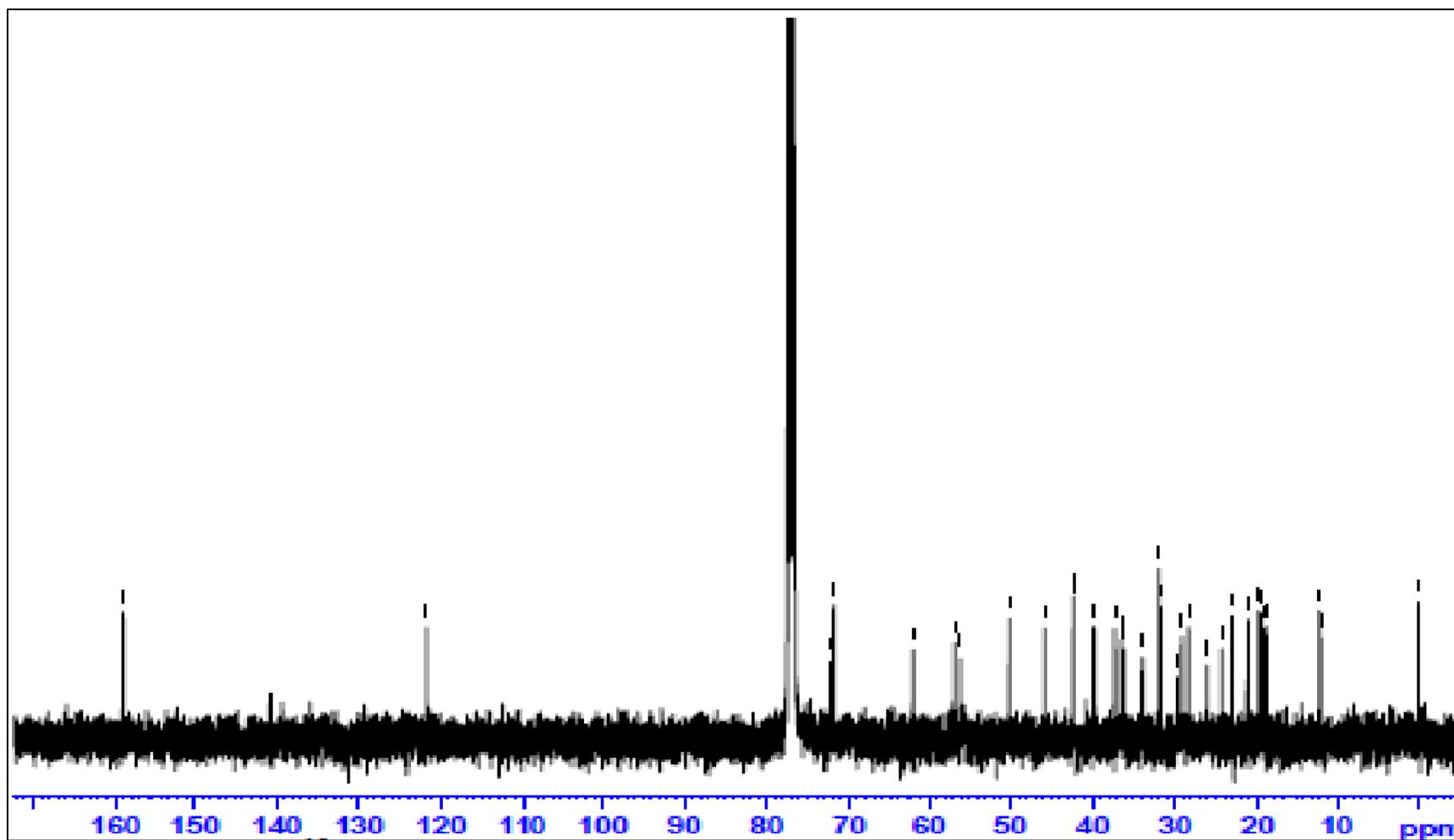


Figura 32. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del β -sitosterol.

5.5 Determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de las subfracciones obtenidas.

Se determinó la actividad inhibitoria enzimática de las subfracciones obtenidas de las fracciones Q, P, K y G.

5.5.1 Determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de la fracción Q

Se determinó la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de las subfracciones de la muestra Q a 10 ppm observándose que disminuye la actividad inhibitoria en al menos un 50% de inhibición en comparación con la fracción Q intacta (Figura 33), lo cual pudiera ser debido al sinergismo que existen entre las moléculas contenidas en la muestra principal.

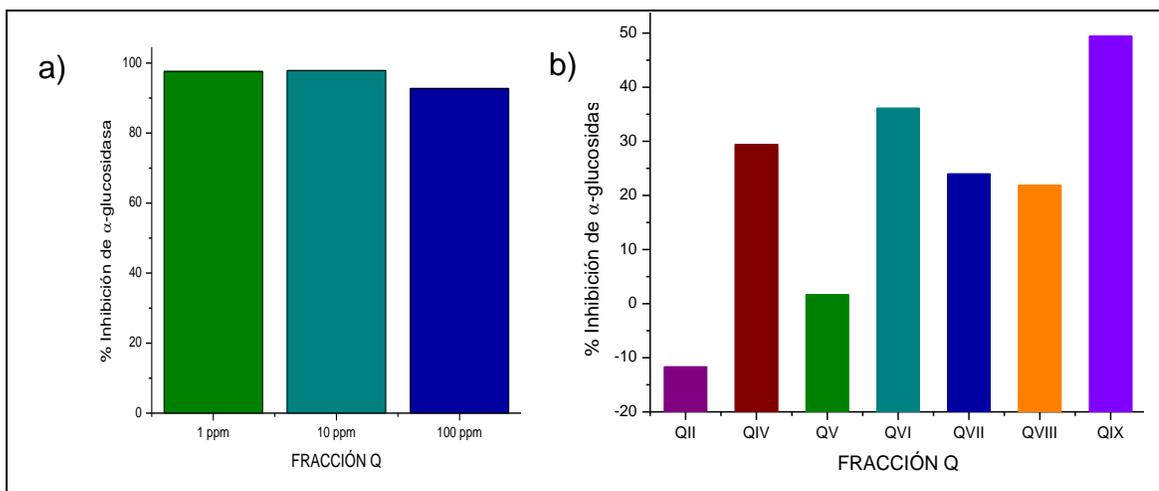


Figura 33. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de la fracción Q: a) determinación de la actividad a tres concentraciones (1,10 y 100 ppm), b) determinación de actividad de las subfracciones a 10 ppm.

5.5.2 Determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de la fracción P

Se determinó la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de las subfracciones de la muestra P a 10 ppm observándose que en la subfracción P1-2 y P4

disminuye la actividad inhibitoria enzimática en un 30% y 70 %; mientras que en la subfracción P3 se observa una actividad inhibitoria enzimática de 97% que es comparable con la actividad mostrada en la fracción P intacta a 10 ppm (Figura 34). De acuerdo a lo anterior se sugiere que los compuestos que están contenidos en la subfracción P3 son los responsables de la actividad inhibitoria enzimática presente en la fracción P principal.

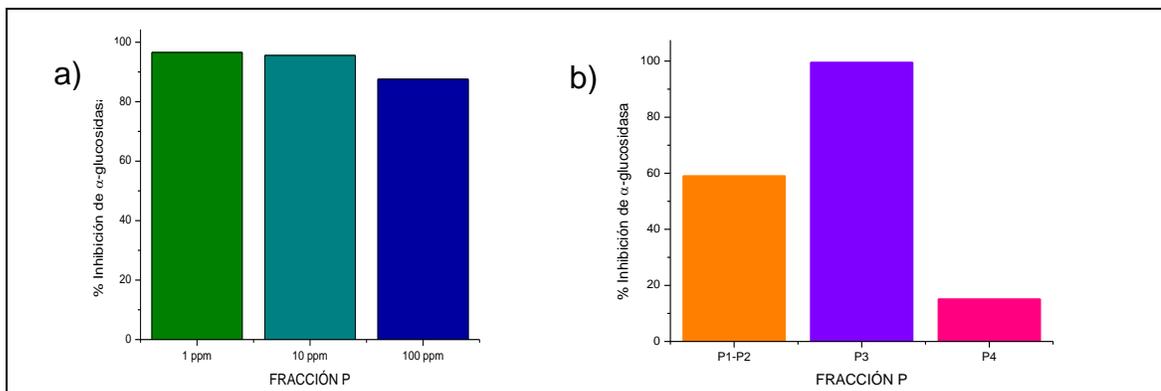


Figura 34. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de la fracción P: a) determinación de la actividad a tres concentraciones (1,10 y 100 ppm), b) determinación de actividad de las subfracciones a 10 ppm.

5.5.3 Determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de la fracción K

Se determinó la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de las subfracciones Ki (fracción K intacta) y Krx (fracción K acetilada) a tres concentraciones (1,10 y 100 ppm). Se observó que la subfracción Ki es 19 veces más potente que la subfracción Krx en una concentración de 10 ppm (Figura 35). De acuerdo a lo anterior, se infiere que debido a la acetilación de los constituyentes de la muestra Krx, se disminuye la actividad inhibitoria enzimática de manera considerable.

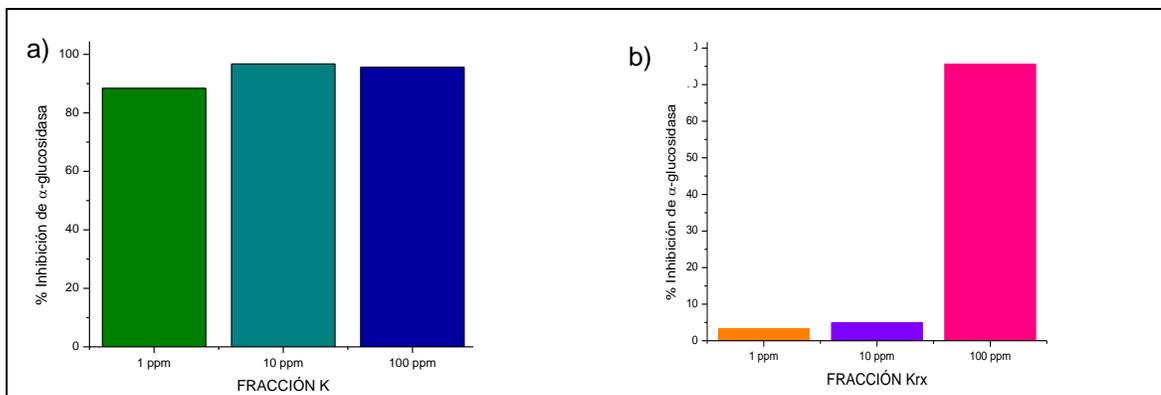


Figura 35. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de: a) la fracción K intacta (K) a 3 concentraciones (1,10 y 100 ppm) y, b) determinación de actividad de la fracción K acetilada (Krx) a 3 concentraciones.

5.5.4 Determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de la fracción G

Se determinó la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de las subfracciones de la muestra G a 10 ppm donde se observa que en la subfracciones G1 y G2 hay un porcentaje de inhibición enzimática aproximadamente del 50% mientras que en las fracciones siguientes se observa una actividad superior al 90% tal y como se observa en la fracción G principal a una concentración a 10 ppm (Figura 36). De acuerdo a lo anterior se sugiere que los compuestos que están contenidos en la subfracción G3 son los responsables de la actividad inhibitoria enzimática presente en la fracción G principal.

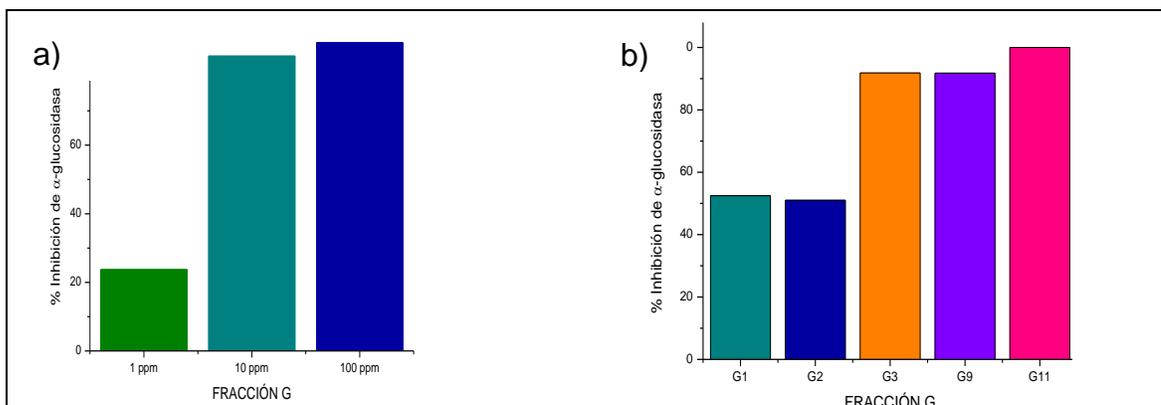
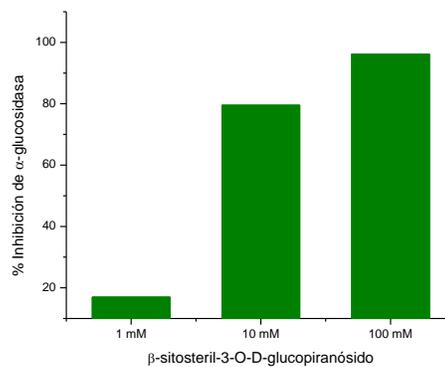
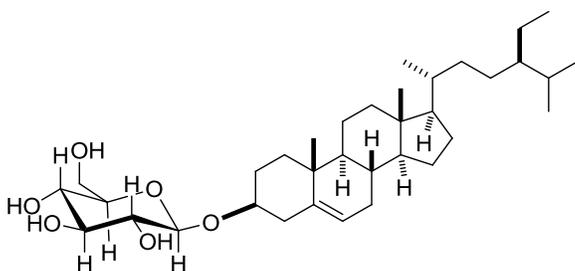
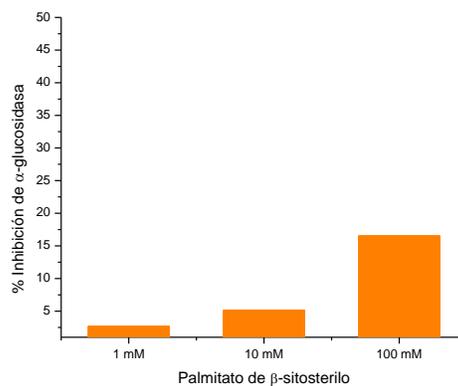
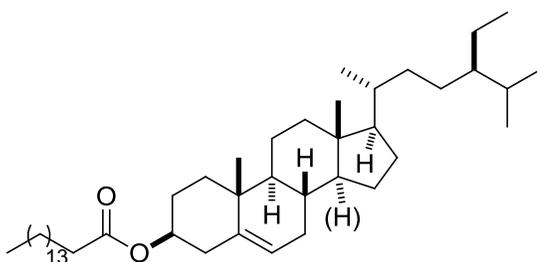
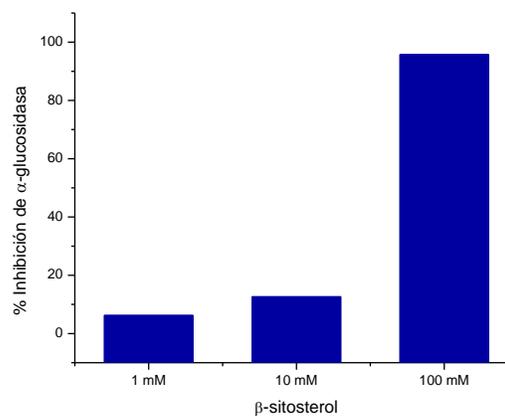
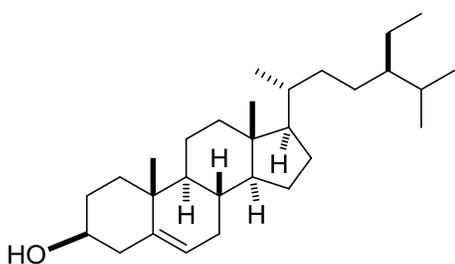


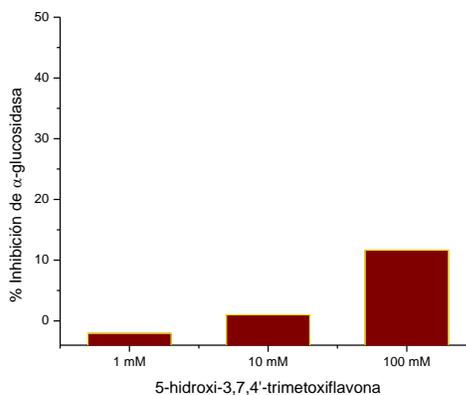
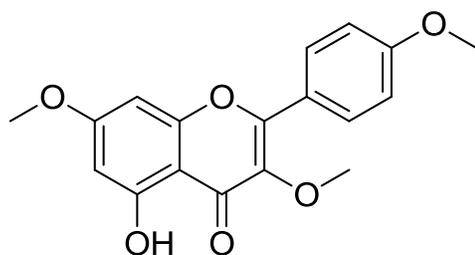
Figura 36. Determinación de la actividad inhibitoria enzimática de la fracción G: a) determinación de la actividad a tres concentraciones (1,10 y 100 ppm), b) determinación de actividad de las subfracciones a 10 ppm.

5.6 Determinación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de los compuestos puros

Se determinó la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de los compuestos obtenidos en este proyecto a tres concentraciones (1, 10 y 100 μ M).

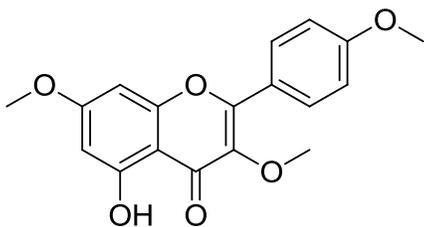


De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que el compuesto más activo de los tres esteroides obtenidos durante este proyecto es el β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranósido. Si hacemos una comparación de las tres estructuras, se puede inferir que la sustitución del grupo hidroxilo de la posición 3 del esteroide, influye de manera considerable en la actividad de cada compuesto. El palmitato de β -sitosterilo es dos veces más potente que el β -sitosterol y esto pudiera ser debido a que el fragmento de ácido palmítico presente en el palmitato de β -sitosterilo le confiere mayor interacción con los residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima. Por otro lado, incremento de la actividad inhibitoria enzimática del β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranósido pudiera ser debido a la presencia del fragmento de glucopiranososa, ya que mimetiza la estructura de la glucosa presente en el *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranósido, usado como sustrato de la α -glucosidasa en la presente investigación. Probablemente, la similitud estructural del β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranósido con el *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranósido le confiere mayor afinidad por el sitio activo de la enzima en comparación con el palmitato de β -sitosterilo (cinco veces menos afín) y el β -sitosterol (15 veces menos afín), los cuales carecen del fragmento de glucopiranososa.

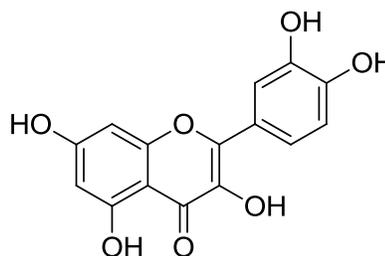


Al comparar la actividad inhibitoria de este flavonoide con el de la quercetina (9.36 μ M = 24%), se puede observar que la 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona es poco activo. La comparación estructural de ambos flavonoides permite inferir

que la quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavona) posee grupos hidroxilo en aquellas posiciones donde la 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona posee grupos metoxilo, lo cual ocasiona una disminución de la actividad inhibitoria enzimática del flavonoide obtenido en la presente investigación. Entonces, la ausencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3, 7 y 4' de la 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona desfavorece las interacciones con el sitio activo de la enzima.

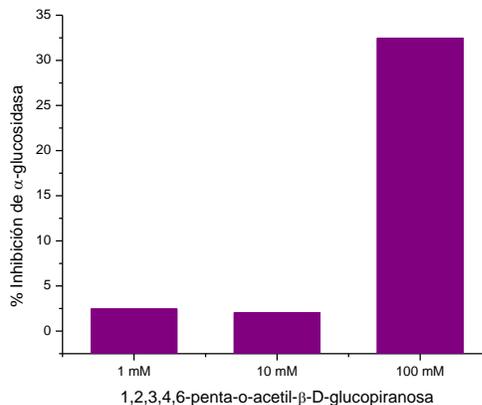
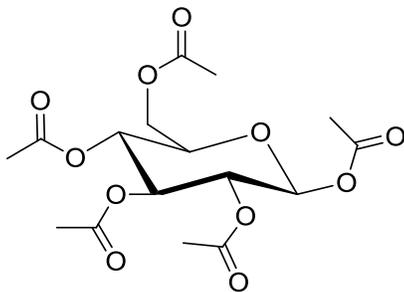


5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona



Quercetina

Con respecto al 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-β-D-glucopiranososa, se observa que presenta una actividad inhibitoria de 32.47% a 100 μM por lo que no presenta una actividad inhibitoria enzimática relevante.



CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Se obtuvo evidencia científica de que la especie *Smilax sp.* posee potente actividad inhibitoria de α -glucosidasa ($CI_{50} = 0.49 \pm 0.02$ ppm), lo cual permite inferir que este pudiera ser uno de los mecanismos de acción mediante el cual se manifiestan las propiedades antidiabéticas atribuidas a esta planta. Para confirmar la inferencia anterior es necesario realizar otros experimentos.

Nueve de las fracciones obtenidas (K-R) mostraron una potente actividad inhibitoria de α -glucosidasa en un rango de CI_{50} de 0.097 a 0.92 ppm, razón por la cual algunas fracciones fueron sometidas a diferentes protocolos de purificación de sus constituyentes.

A partir de la fracción P, muy activa en el ensayo enzimático, se aisló el esteroide identificado como β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido, el cual presentó significativa actividad inhibitoria de α -glucosidasa a 10 μ M (79.56% de inhibición).

Por otra parte, a partir de dos fracciones con baja actividad anti-enzimática (B y C) se aislaron dos esteroides identificados como β -sitosterol y palmitato de β -sitosterilo mediante el análisis de sus propiedades espectroscópicas.

A partir de la fracción G, moderadamente activa contra la enzima, se aisló un derivado semisintético caracterizado como 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona, el cual fue poco activo contra la α -glucosidasa.

Se comparó la actividad inhibitoria de α -glucosidasa del β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido (10 μ M = 79.56%) con el control positivo quercetina (9.34 μ M = 24% y 16.61 μ M = 53%), de lo cual se deduce que el β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido es más activo que la quercetina, por lo que el β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido puede ser utilizado como prototipo molecular para la síntesis de inhibidores de α -glucosidasa más potentes y eficaces.

CAPITULO 7

PERSPECTIVAS

Debido a la complejidad observada en la separación y purificación de los constituyentes del extracto orgánico de *Smilax sp.* por métodos analíticos convencionales, es necesario implementar técnicas analíticas más eficientes como el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) equipado con columnas de fase reversa.

Realizar el estudio químico-biodirigido de las fracciones K-R sin derivatizar y mediante CLAE.

Determinar el perfil químico de *Smilax sp.* (Cocolmecca) para posteriormente realizar un estudio de los perfiles químicos de las dos especies de *Smilax* que componen el producto natural llamado Cocolmecca.

Seleccionar otros blancos moleculares relacionados con la diabetes a fin de determinar si el extracto orgánico y los compuestos de *Smilax sp.* presentan un mecanismo de acción diferente al de inhibición de α -glucosidasas.

Realizar modificaciones estructurales tomando como prototipo molecular al β -sitosteril-3-O- β -D-glucopiranosido para mejorar la actividad inhibitoria de α -glucosidasa y realizar estudios de relación estructura-actividad para conocer las interacciones de la enzima con los compuestos derivatizados.

CAPITULO 8

REFERENCIAS

1. Eshaifol, O.; Kam, A.; Alqahtani, A.; Li, K.; Razmovski-Naumovski, V.; Nammi, S.; Chan, K.; D Roufogalis, B.; Li, G. Herbal medicines and nutraceuticals for diabetic vascular complications: mechanisms of action and bioactive phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design*. 16: 3776-3807 (2010).
2. Soumya, R.; Chowdary, K.; Kar, D.; Lopamudra D. Plants as source of novel anti-diabetic drug: present scenario and future perspectives. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 3:37-55 (2009).
3. Newman, D.; Cragg, G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. 70: 461-477 (2007).
4. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html> Consultada en Septiembre de 2012
5. Scheen, A. Is there a role for α -glucosidase inhibitors in the prevention of type 2 diabetes mellitus? *Drugs*. 63: 933-951(2003).
6. Stuart, R.; Gulve, E.; Wang, M. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. *Chemical Reviews*. 104:1255-1282 (2004).
7. Skyler, J.S. Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies. *Journal of Medicine Chemistry*. 47: 4113-4117(2004)
8. Garcia, B.; El-Sohehy, A.; Haddad, P. Vitamins D, C, and E in the prevention of type 2 diabetes mellitus: modulation of inflammation and oxidative stress. *Biologics: Targets & Therapy*. 5: 7-19 (2011).
9. Clinton, J. C. Modern medicine and traditional Chinese medicine. Diabetes mellitus (part one). *Journal of Chinese Medicine*. 58: 35-44 (1998).
10. Robertson, R.P.; Harmon, S. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet β cell. *Free Radical Biology and Medicine*. 4:177-184 (2006).
11. Robertson, R. Paul. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in Diabetes. *The journal of Biological Chemistry*. 279 (41): 42351-42354, (2004).
12. <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html> Consultada en Marzo de 2011.

13. <http://www.mexicomaxico.org/Voto/MortalidadCausas.htm>. Consultada en septiembre 2012.
14. Gloster, T.; Gideon, D. Glycosidase inhibition: assessing mimicry of the transition state. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 8: 305-320 (2010).
15. Cooper, M. E.; White, M. F.; Zick, Y.; Zimmet, P. Type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews Endocrinology*. Póster (2012).
16. Distefano, J. K.; Watanabe, R. M. Pharmacogenetics of anti-diabetes drugs. *Pharmaceuticals (Basel)*. 3 (8): 2610-2646 (2010).
17. Menéndez, E.; Lafita, J.; Artola, S. Recomendaciones para el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia en la diabetes tipo 2. *Revista Nefrología*. 31:17-26 (2011).
18. Blicklé, JF. Meglitinide analogues: a review of clinical data focused on recent trials. *Diabetes Metab* 32: 113-120 (2006)
19. Hernández, S.; Aguilar, C.; Gómez, F. Tiazolidinedionas. Beneficios y riesgos reales. *Revista de Endocrinología y Nutrición*.10: 69-76 (2002).
20. Nogales, A.; Arrieta, F. Incretinas: nueva opción terapéutica para la diabetes mellitus tipo 2. *Terapéutica*. 62-66 (2010).
21. Jung, M.; Park, M.; Lee, H.; Kang, Y.; Kang, E.; Kim, S. Antidiabetic Agents from Medicinal Plants. *Current Medicinal Chemistry*. 13: 1203-1218 (2006).
22. Mukherjee, P.K.; Maiti, K.; Mukherjee,K.; Houghton, P. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *Journal of Ethnopharmacology*. 106:1-28 (2006).
23. Zhu, Y.; Li, X.; Huang, Z.; Li, L.; Su, Y. Improving anti- α -glucosidase activity of Douchi Koji using a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* B2. *International Journal of Food Engineering*: 7(1): Article 1 (2011)
24. Giorgino, R.; Damato, A. alpha -Glucosidase inhibitors in the therapy of diabetes mellitus. *Annali italiani di medicina interna : organo ufficiale della Società italiana di medicina interna*. 10: 61-65. (1995).
25. Huang, G.; Hsieh, W.; Chang, H.; Huang, S.; Lin, Y.; Kuo, Y. α -Glucosidase and aldose reductase inhibitory activities from the fruiting body of *Phellinus merrillii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 5702–5706 (2011)
26. Andrade, A.; Becerra J.; Cárdenas R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal Ethnopharmacology*. 16: 27-32 (2008).

27. Madsen, R.; Jensen, T.; Mikkelsen, M.; et. al. A concise synthesis of castanospermine by the use of a transannular cyclization. *Journal Organic Chemistry*. 74: 8886–8889 (2009).
28. Chiba, S. Review: Molecular Mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Biosci.Biotech.Biochem*. 61(8):1233-1239 (1997)
29. <http://www.insp.mx/Portal/Centros/ciss/resumen.php> Consultada en Febrero de 2011.
30. Wan, C.; Yuan, T.; Li, L.; Kandhi, V.; Cech, N.; Xie, M.; Seeram, N. Maplexins, new α -glucosidase inhibitors from red maple (*Acer rubrum*) stems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 22: 597-600 (2012).
31. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx> Consultada en Octubre de 2012.
32. Flora Medicinal Indígena de México. Editorial Instituto Nacional Indigenista. Primera Edición. Tomo I, p. 410 (1996).
33. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Tomo: III: 1420. (1994).
34. Martínez, M. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Primera edición. Fondo de Cultura Económica. p. 193. (1979).
35. Fernández-Nava, R.; Ramos-Zamora, D.; Carranza-González, E. Notas sobre plantas medicinales del estado de Querétaro, México. 12: 1-40 (2001).
36. Conforti, F.; Loizzo, M.; Statti, G.; Houghton, P; Menichini, F. Biological properties of different extracts of two *Senecio* species. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 57: 1-8 (2006).
37. <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/ova/?q=content/zarzaparrilla-zarza-cuculmea-smilax-sp#> consultada Octubre 2012.
38. <http://swbiodiversity.org/seinet/collections/individual/index.php?occid=1962166> consultada en Octubre 2012.
39. <http://cohonasa.com/blog/wp-content/uploads/2012/03/Wereke.jpg> consultada en octubre 2012.

40. Pandey, M.; Debnath, M.; Gupta, S.; Chikara, S. K. Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential source of therapeutics. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 3(1): 113-117 (2011).
41. Camacho, J.R.; Lozoya, X. Aguilar, A. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Rev. Med. IMSS*. 25: 283-291 (1987)
42. Challinor, V.L.; Parson, P.G.; Chap, S.; White E. F.; Blanchfield, J. T.; Lehmann, R. P.; De Voss, J.J. Steroidal saponins from the roots of *Smilax sp.*: structure and bioactivity. *Steroids*. 77: 504-511 (2012).
43. Sautour, M.; Miyamoto, T.; Lacaille-Dubois, M. Steroidal saponins from *Smilax medica* and their antifungal activity. *Journal of Natural Products*. 68: 1489-1493 (2005).
44. http://www.discoverlife.org/nh/maps/Plantae/Monocotyledoneae/Smilacaceae/Smilax/map_of_Smilax.jpg Consultada en Octubre 2012.
45. Ivanova, A.; Mikhova, B.; Batsalova, T.; Dzahambazov, B.; Kostova, I. New furastanol saponins from *Smilax aspera* L. and their in vitro cytotoxicity. *Fitoterapia*. 82(2): 282-287 (2011).
46. Li, S. Y.; Fuchino, H.; Kawahara, N.; Sekita, S.; Satake, M. New phenolic constituents from *Smilax bracteata*. *Journal of Natural Products*. 65: 262-266 (2002).
47. Wungsintaweeikul, B.; Umehara, K.; Miyase, T.; Noguchi, H. Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant *Smilax carbularia*. *Phytochemistry*. 72 (6): 495-502 (2011).
48. Cáceres, A.; Cruz, S.; Martínez, V.; Gaitán, A.; Gattuso, S.; Gatusso, M. Ethnobotanical, pharmacognostical, pharmacological and phytochemical studies on *Smilax domingensis* in Guatemala. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22(2): 239-248 (2012).
49. Hooda, V.; Sharma, G.; Singla, R. *Smilax Zeylanica* Linn. - A natural therapeutic hub. *Pharmacologyonline*. 2:151-154 (2011).
50. Kuo, Y. Hsu, Y.; Liaw, C.; Lee, J. K.; Huang, H.; Kuo, L. Y. Citotoxic phenyl propanoid glycosides from the stems of *Smilax china*. *Journal of Natural Products*. 68: 1475-1478 (2005).

51. Rajesh, V.; Perumal, P.; Chinthakindhi, V.; Prabhakaran, S.; Hymavathi, G.; Guntupalli, T. In-vitro evaluation of *Smilax zeylanica* Linn. leaves for anthelmintic activity. *The Internet Journal of Pharmacology*. 9: (2010).
52. Li, G.; Jiang, W.; Yue, X.; Qu, G. Tian, J.; Wu, J.; Fu, F. Effect of astilbin on experimental diabetic nephropathy *in vivo* and *in vitro*. *Planta Médica*. 75: 1470-1475 (2009).
53. Li, W.; Fu, H.; Bai, H.; Sasaki, K.; *et. al.* Triterpenoid Saponins from *Rubus ellipticus* var. *obcordatus*. *Journal of Natural Products*. 72: 1755-1760 (2009).
54. Cordell, A.; Kinghorn, A.; Pezzuto, J.; *et. al.* Bioactive Natural Products. Detection, isolation, and structure determination. CRC Press. Inc. London. Cap. 10, p. 195-216. (1993).
55. Faizi, S.; Ali, M.; Saleem, R.; Bibi, S.; Bibi, I. Spectral Assignments and Reference Data. Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of stigmast-5-en-3-O- β -glucoside and its acetyl derivative. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 39: 399-405 (2001).
56. Valencia Ortiz, Ciria. Fundamentos de Fitoquímica. 1a. edición. Editorial Trillas. México. 1995. 235p.
57. Esche, R. Barnsteiner, A. Scholz, B. Engel, K. Simultaneous analysis of free phytosterols/phytostanols and intact phytosteryl/phytostanyl fatty acid and phenolic acid esters in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 5330-5339 (2012).
58. Villaseñor, I.; Angelada, J.; Canlas, A.; Echegoyen, D. Bioactivity studies on β -sitosterol and its Glucoside. *Phytotherapy research*. 16: 417-421 (2002)
59. Ju, Y.; Clausen, L.; Allred, K.; Almada, A.; Helferich, W. β -sitosterol, β -sitosterol glucoside and a Mixture of β -sitosterol and β -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells *in vitro* and in ovariectomized athymic mice. *The journal of nutrition*. (2013).
60. Xiao M.; Yang Z.; Jiu M.; You J.; Xiao R. The antigastroulcerative activity of β -sitosterol- β -D-glucoside and its aglycone in rats. *Journal of West China University of Medical Sciences*. 23(1): 98-101 (1992)

61. Zhao J.; Zhang Y.; Xu DM.; Huang GQ.; Xu L.; Wang Y.; Fang D.; Chen Y.; Gu L. The antiatherogenic effects of components isolated from *Pollen typhae*. *Thrombosis Research*. 57(6):957-66 (1990)
62. Deepak, M. Dipankar, G. Prashanth, D. Asha, M. Amit, A. Venkataraman, B. Tribulosin and β -sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. *Phytomedicine* 9(8): 753-756 (2002)
63. Roslund, M.; Tähtinen, P.; Niemitz, M.; Sjöholm, R. Complete assignments of the ^1H and ^{13}C chemical shifts and $J^{\text{H,H}}$ coupling constants in NMR spectra of D-glucopyranose and all D-glucopyranosyl-D-glucopyranosides. *Carbohydrate Research* 343: 101-112 (2008).
64. Perez, N.; Álvarez, Celina.; Cerda, C.; Morales, M.; Joseph, P. Deuterium-induced isotope effects on the ^{13}C chemical shift of α -D-glucose pentaacetate. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 51: 136- 142 (2013).
65. Facundo,V.; Azevedo, S.; Rodrigues, R.; do Nascimento, L.; Militao, J.; da Silva, G.; Braz-Filho, R. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22(5): 1134-1139 (2012).
66. Miri, A.; Monse-Esfahani, H.; Amini,M.; Amanzadeh, Y.; Hadjiakhoondi, A.; Hajiaghaee, R. Determination of phenolic and flavonoid contents, antioxidant capacity and major flavonoids structure in *Teucrium perscicum* Boiss. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10 (10): 1258-1261, 2011.
67. Tewtrakul, S.; Subhadhirasakul,S.; Kummee, S. Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *Journal of Ethnopharmacology*. 116: 191-193 (2008).
68. Lefahal, M.; Benahmed, M.; Louaar, S.; Zallagui, A. Duddeck, H.; Medjrubi, K.; Akkal, S. Antimicrobial activity of *Tamarix gallica* L. extracts and isolated flavonoids. *Advances in Natural and Applied Sciences*. 4(3): 289-292 (2010).
69. Su, K.; Gong, M.; Zhou, J.; Deng, S. Study on Chemical composition of *Nauclea officinalis* Leaves. *International Journal of Chemistry*. 1(2): 77-81 (2009).
70. Huang, L.; Zhong, T.; Chen, T.; Ye, Z.; Chen, G. Identification of β -sitosterol, stigmasterol and ergosterin in *A. roxburghii* using supercritical fluid extraction

followed by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 21: 3024-3032 (2007).

71. Begum, T.; Ilyas, M.; Anand, A. Antipyretic activity of *Azima tetracantha* in experimental animals. *International Journal of current biomedical and Pharmaceutical Research*. 1(2): 41-44 (2011).
72. Baskar, A. Ignacimuthu, S. Paulraj, G. Numair, K. Chemopreventive potential of β -sitosterol in experimental colon cancer model an *in vitro* and *in vivo* study. *BMC Complementary and alternative medicine* 10:24 (2010).
73. Moon, E.; Lee, Y.; Lee, O.; Lee, M.; Lee, S.; Chung, M.; Park, Y.; Sung, C.; Choi, J.; Kim, K. A novel angiogenic factor derived from *Aloe vera* gel: β -sitosterol, a plant sterol. *Angiogenesis*. 3: 117-123 (1999).
74. Rosenblat, M.; Volkova, N.; Aviram, M. Pomegranate phytosterol (β -sitosterol) and polyphenolic antioxidant (punicalagin) addition to statin, significantly protected against macrophage foam cells formation. *Atherosclerosis*. 1-8 (2012).