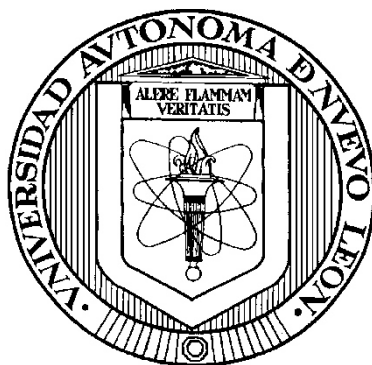


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**AISLAMIENTO DE COMPUESTO(S) A PARTIR DE *Cordia boissieri* CON  
POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA**

**POR**

**Q.C.B. MARCO ANTONIO MENDOZA ESCOBEDO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
QUÍMICA BIOMÉDICA**

**NOVIEMBRE, 2017**

**AISLAMIENTO DE COMPUESTO (S) A PARTIR DE *Cordia boissieri* CON  
ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DR. C. LUIS ALEJANDRO PÉREZ LÓPEZ**  
Asesor de la Tesis



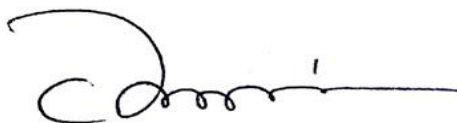
---

**DR. C. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNANDEZ**  
Co-Director de tesis



---

**DRA. C. ALMA LETICIA SAUCEDO YÁÑEZ**  
Comisión de tesis



---

**DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ**  
Subdirector de Estudios de Postgrado

**AISLAMIENTO DE COMPUESTO (S) A PARTIR DE *Cordia boissieri* CON  
ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA**

**Presentada por**

**QCB Marco Antonio Mendoza Escobedo**

**Este trabajo se desarrolló en el departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento de Electrofisiología y Bioevaluación Farmacológica de la Universidad Autónoma del Estado de Moleros, bajo la dirección del Dr. C. Luis Alejandro Pérez López y la co-dirección del Dr. C. Juan José Acevedo Fernández.**

**Director**

---

**Dr. C. Luis Alejandro Pérez López**

**Co-director**

---

**Dr. C. Juan José Acevedo Fernández**

*La ciencia está hecha de errores; pero son errores que son útiles cometer, porque guían poco a poco a la virtud.*

Julio Verne

*El éxito no se logra por cuanto sabes si no por cuanto aplicas.*

Jürgen Klaric

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico a mi madre Juana Ma. Escobedo.  
Y a mis abuelos Vicente y Dora con mucho cariño y el respeto que  
se merecen.

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecer a DIOS, por permitirme recorrer este camino. Del cual me llevo mucho aprendizaje tanto profesional, como emocional.

A mi madre, por apoyarme en cada paso que doy. Por estar siempre a mi lado y confiar en mí y en mis decisiones.

A mis abuelos Vicente y Dora, que sin ellos tal vez no estaría en estos momentos en el lugar donde me encuentro.

A mi asesor de tesis, el Dr. Alejandro, que siempre a confiando en mí. Me ha formado desde hace varios años. Empecé como su becario de investigación y hoy doy un paso más, como su estudiante de maestría. Es de las mejores personas y me siento dichoso de conocer, y además es un gran profesor.

A mi comisión de tesis: el Dr. Juan José, a quien admiro mucho por su forma de ser, una gran persona y un gran profesor. La Dra. Alma, con poco tiempo de conocer como persona y profesora, se ganó mi admiración, cariño y respeto. A la Dra. Graciela quién le agradezco su apoyo, tiempo, paciencia y sus enseñanzas.

A todos los miembros del Departamento de Química Analítica por contribuir cada uno de cierta manera en mi formación y a que este trabajo se lograra.

A mis compañeros de posgrado, que en todo momento me dieron aliento para continuar y no rendirme por pequeños tropiezos además de hacer muy amena mi estadía por esta etapa.

Al CONACYT por otorgarme la beca.

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO .....	VII
LISTA DE TABLAS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XI
ABREVIATURAS .....	XIV
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Epidemiología .....	2
1.2 Diabetes Mellitus.....	4
1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1 .....	4
1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2 .....	6
1.2.3 Diabetes gestacional .....	7
1.2.4 Síntomas y daños graves.....	10
1.2.5 Diagnóstico .....	11
1.2.6 Fisiopatología de la diabetes.....	14
1.2.7 Terapia común en el tratamiento de diabetes mellitus.....	18
1.3 Digestión de los carbohidratos.....	21
1.4 Absorción y Metabolismo de la glucosa .....	23
1.5 Acción de la insulina .....	25
1.6 Glucosa en el estado absortivo y postabsortivo .....	27
1.7 Inhibidores enzimáticos.....	29
1.8 Modelos <i>in vivo</i> .....	30
1.9 Ensayos <i>in vitro</i> .....	32
1.10 Productos Naturales.....	33
1.10.1 Productos naturales en el tratamiento de la DM .....	34
1.11 Planta de Estudio .....	35
1.12 Antecedentes .....	37
1.13 Justificación .....	39
1.14 Objetivos.....	40
1.14.1 Objetivo general .....	40
1.14.2 Objetivos específicos .....	41
CAPÍTULO 2.....	42
MATERIAL Y MÉTODOS.....	42

2.1 Equipo, Material y Reactivos.....	42
2.1.1 Equipo.....	42
2.1.2 Material .....	44
2.1.3 Reactivos .....	45
2.1.4 Disolventes .....	46
2.1.5 Reactivos especiales.....	46
2.2 Métodos.....	47
2.2.1 Colecta de la planta de estudio .....	47
2.2.2 Obtención de extractos primarios .....	48
2.2.3 Obtención de fracciones y/o compuestos .....	49
2.2.4 Elucidación estructural del precipitado blanco (PB-meOHsec) y fracción sobrenadante (Fs-meOH) .....	52
2.2.5 Ensayos de actividad <i>in vivo</i> .....	57
2.2.6 Evaluación hipoglucémica, antihiperoglucémica y antidiabética de la fracción(es) y compuesto(s) obtenido(s). .....	61
2.2.7 Evaluación de actividad <i>In vitro</i> .....	62
CAPÍTULO 3.....	67
RESULTADOS .....	67
3.1 Obtención de extractos primarios.....	67
3.2 Obtención de fracciones y compuestos.....	69
3.2.1. Solubilidad diferencial (lavados).....	69
3.2.2 Seguimiento de compuestos aislados por cromatografía en capa fina .....	70
3.2.3 Purificación de la fracción soluble (FS-meOH) .....	71
3.3 Análisis y elucidación estructural del precipitado blanco (PB-meOHsec).....	75
3.3.1 Determinación cualitativa de nitrógeno.....	75
3.3.2 Análisis del precipitado blanco metanólico (PB-meOHsec) por espectroscopía de infrarrojo FT-IR-ATR.....	77
3.3.3 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. Análisis del precipitado blanco metanólico (PB-meOHsec) .....	79
3.3.4 Identificación de alantoína por MS-ESI en el extracto metanólico secuencial .....	84
3.4 Análisis y elucidación estructural de la fracción soluble en metanol (FS-meOH) 86	
3.4.1 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear .....	86
3.4.2 Identificación de quebrachitol por MS-ESI en el extracto metanólico secuencial.....	90

3.5 Evaluación del efecto hipoglucémico en extractos de <i>Cordia boissieri</i> .....	93
3.6 Evaluación del efecto antihiperoglucémico de extractos a partir de <i>Cordia boissieri</i> .....	95
3.7 Evaluación hipoglucémica, antihiperoglucémica y antidiabética de la alantoína y quebrachitol .....	100
3.7.1 Evaluación del efecto hipoglucémico de alantoína y quebrachitol .....	100
3.7.2 Evaluación del efecto antihiperoglucémico de alantoína y quebrachitol .....	103
3.7.3 Actividad antidiabética de los cristales de quebrachitol .....	107
3.8 Evaluación de actividad <i>In vitro</i> .....	109
3.8.1 Evaluación de la actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa .....	109
3.8.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa.....	110
CAPÍTULO 4.....	111
DISCUSIÓN.....	111
CONCLUSIÓN.....	128
PERSPECTIVAS .....	129
BIBLIOGRAFIA.....	130

## LISTA DE TABLAS

<i>Tabla</i>		<i>Página</i>
1	<i>Clasificación general de la diabetes</i>	9
2	<i>Sistemas de eluentes probados en el rastreo de componentes por CCF</i>	51
3	<i>Grupos y dosis evaluados para la actividad hipoglucémica</i>	58
4	<i>Grupos experimentales de efecto antihiperoglucémico</i>	60
5	<i>Resumen del desarrollo experimental de la actividad <math>\alpha</math>-glucosidasa</i>	64
6	<i>Resumen del desarrollo experimental de la actividad <math>\alpha</math>-amilasa</i>	66
7	<i>Extractos obtenidos a partir de las hojas de <i>Cordia boissieri</i> (por ciento de peso seco)</i>	68
8	<i>Factores de retención de las bandas en la capa fina del extracto meOHsec. C: control de extracto metanólico secuencial, 1: PB-meOHsec, 2: FS-meOH</i>	71
9	<i>Señales y grupos funcionales detectados en el espectro de FT-IR del PB-meOH</i>	78
10	<i>Datos espectroscópicos del compuesto Alantoína, obtenido del PB-meOHsec</i>	83
11	<i>Datos espectroscópicos del compuesto quebrachitol obtenido de la FS-meOH</i>	89
12	<i>Fragmentos de pérdidas lógicas que concuerdan con los de quebrachitol</i>	92
13	<i>Resultado de la actividad inhibitoria de <math>\alpha</math>-glucosidasa, encontrado para los compuestos alantoína y fracción con quebrachitol como compuesto mayoritario</i>	109
14	<i>Resultado de la actividad inhibitoria de <math>\alpha</math>-amilasa, encontrado para los compuestos alantoína y fracción con quebrachitol como compuesto mayoritario</i>	110

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Algoritmo para la evaluación y diagnóstico de DM2	12
2	Patrones de la respuesta secretora de insulina a una infusión intravenosa continua de glucosa	16
3	Esquema general de la regulación de la glucosa	17
4	Esquema general de la digestión de los carbohidratos	23
5	Extracto metanólico secuencial. Se observa la formación de las dos fases que luego fueron separadas y analizadas	69
6	Capa fina a) sin revelar y b) observada en lámpara UV a 254 nm, de las fracciones obtenidas por solubilidad a partir del extracto meOHsec	70
7	Separación de la FS-meOH, utilizando la FM AceOEt/AcOH/meOH/H <sub>2</sub> O en proporción 2:0.5:0.5:1 como disolvente	72
8	CCF observado a 254 nm. Separación de la FS-meOH, utilizando la FM AceOEt/AcOH/meOH/H <sub>2</sub> O en proporción 2:0.5:0.5:1 como disolvente	72
9	CCF observada a 254 nm. Se observan las bandas de DP y fracciones Fi y Fs2. Solo la Fi2, presenta una banda única	73
10	CCF revelado con fosfomolibdico, donde se observa las bandas del carril DP, Fi y Fs2 con Rf=0.35, 0.38 y 0.42 respectivamente	74
11	CCF sílice revelado con alfa-naftol. Se observan las bandas con Rf=0.33 del D-pinitol y Rf=0.38, 0.68 de la FS2.	75
12	Ensayo de sulfato ferroso, una coloración azul indica positiva la prueba para nitrógeno	76
13	Figura 13. Prueba de azul de Prusia. Una tonalidad azul indica que la prueba es positiva para nitrógeno	76

14	Espectro de infrarrojo del PBmeOH	77
15	Espectro completo de <sup>1</sup> HRMN del PBmeOH en disolvente DMSO-d6*	79
16	Espectro de <sup>1</sup> HRMN de PBmeOH, observando desplazamientos químicos entre 5-11 ppm	80
17	Espectro completo de <sup>13</sup> CRMN del PBmeOH, en disolvente DMSO-d6*Anacahuita dosis 0.5 mg/mL normalizada	80
18	Espectro de experimento de <sup>1</sup> H-RMN de PBmeOH en D2O en lugar de DMSO-d6	81
19	Experimentos dept realizados al PBmeOHse	82
20	Estructura del compuesto Alantoína, elucidado a partir del PB-meOHsec	83
21	Espectro completo (150-1500 m/z) de perfil inicial del extracto metanólico secuencial por MS-ESI	84
22	Espectro (zoom al ion 157 m/z) de perfil inicial del extracto metanólico secuencial por MS-ESI	85
23	Espectro <sup>1</sup> H-RMN de FS-meOH en disolvente D <sub>2</sub> O	87
24	Espectro <sup>13</sup> C-RMN de FS-meOH en disolvente D <sub>2</sub> O	87
25	Estructura del compuesto quebrachitol, identificado a partir de la FS-meOH	89
26	Espectro completo de MS-ESI del perfil inicial del extracto metanólico secuencial	90
27	Espectro aumentado del perfil inicial de quebrachitol donde se observa el ion 193 m/z	91
28	Fragmentos 143, 115 y 101 m/z que concuerdan con pérdidas lógicas para quebrachitol	92
29	Efecto hipoglucémico de extractos de Cordia boissieri en ratones CD1 adulto.	94
30	Porcentaje de reducción de glucemia del efecto hipoglucémico de extractos de Cordia boissieri en ratones CD1 adulto.	94

31	Efecto antihiper glucémico de extractos de Cordia boissieri en ratas Wistar adulto.	97
32	Porcentaje de incremento de glucemia del efecto antihiper glucémico de extractos de Cordia boissieri en ratas Wistar adulto.	98
33	Efecto antihiper glucémico de extractos metanólico directo y secuencial de Cordia boissieri en ratas Wistar adulto.	98
34	Efecto antihiper glucémico de extractos metanólico directo y secuencial de Cordia boissieri en ratas Wistar adulto.	99
35	Efecto hipoglucémico del PB-meOHsec en ratones CD1 adulto.	101
36	Porcentaje de reducción de glucemia del efecto hipoglucémico de alantoína en ratones CD1 adulto.	101
37	Efecto hipoglucémico de FS-meOH en ratones CD1 adulto.	102
38	Porcentaje de reducción de glucemia del efecto hipoglucémico de FS-meOH en ratones CD1 adulto.	103
39	Efecto antihiper glucémico de PB-meOHsec en ratas Wistar adulto.	104
40	Porcentaje de incremento de glucemia del efecto antihiper glucémico de PB-meOHsec en ratas Wistar adulto.	105
41	Efecto antihiper glucémico de quebrachitol en ratas Wistar adulto.	106
42	Porcentaje de incremento de glucemia del efecto antihiper glucémico de quebrachitol en ratas Wistar adulto.	106
43	Efecto antidiabético de quebrachitol en ratones CD1 adulto.	108
44	Porcentaje de reducción de glucemia del efecto antidiabético de quebrachitol en ratones CD1 adulto.	108

## ABREVIATURAS

DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DM1	Diabetes mellitus 1
WHO	Organización mundial de la salud
CTG	Curva de tolerancia a la glucosa
ADA	American Diabetes Association
HbA1C	Hemoglobina glucosilada
OCDE	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
FDA	Food & Drugs Administration
GLP-1	Polipéptido tipo glucagón
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
mg	Miligramos
dL	Decilitro
GLUT	Transportador de glucosa
Ca <sup>+2</sup>	Ion calcio
DNJ	Deoxynojirimicina
DMDP	2,5-bis-(hydroxymethyl)-3,4-dihydroxypyrrolidina
kg	Kilogramo
m	Metro
Hex	Hexano

AcOEt	Acetato de etilo
meOH	Metanol
p/v	Peso volumen
°C	Centígrados
UI	Unidades internacionales
i.p.	Intraperitoneal
rpm	Revoluciones por minuto
RMN	Resonancia magnética nuclear
UV	Ultravioleta
nm	Nanómetro
MS	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por electrospray
v/v	Volumen/volumen
FE	Fase estacionaria
FM	Fase móvil
CCF	Cromatografía en capa fina
μL	Microlitro
PBS	Buffer de fosfatos
μg	Microgramo
Abs	Absorbancia

CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria del 50%
mM	Milimolar
pH	Potencial de hidrógeno
FT-IR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

## RESUMEN

Marco Antonio Mendoza Escobedo

Fecha de Graduación: Noviembre 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Título del Estudio: Aislamiento de compuesto(s) a partir de *Cordia boissieri* con potencial actividad antidiabética**

**Número de páginas: 130 Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Química Biomédica**

**Área de Estudio: Química Biomédica**

**Propósito y Método del Estudio:** *Cordia boissieri* es una planta característica del norte de México, que a pesar de que cuenta con pocos estudios fitoquímicos fue reportada para el tratamiento de la diabetes mellitus. En este trabajo se propuso el aislamiento de compuestos a partir de las hojas de esta planta y evaluar *in vivo* su efecto hipoglucémico, antihiperoglucémico y antidiabético para revisar si podían intervenir en la regulación de los niveles de glucemia. Como un acercamiento al mecanismo de acción, se evaluó *in vitro* la inhibición de las enzimas alfa glucosidasa y alfa amilasa. La caracterización química de los compuestos obtenidos se realizó por técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

**Contribuciones y Conclusiones:** El extracto metanólico secuencial de las hojas de *C. boissieri* mostró efecto hipoglucemiante y antihiperoglucemiante. A partir de este extracto se obtuvieron la alantoína y el quebrachitol. La alantoína mostró efecto antihiperoglucemiante, el quebrachitol presentó efecto hipoglucemiante tanto en el modelo normoglucémico como en el diabético. Ninguno de los compuestos presentó inhibición de las enzimas evaluadas. Se concluye que *C. boissieri* tiene la capacidad de regular los niveles de glucemia y que el efecto antihiperoglucémico observado, no es debido a la inhibición de las enzimas digestivas evaluadas. Es importante resaltar el hecho de que *C. boissieri* tiene dos compuestos que podrían ser utilizados en el control de la diabetes. Además que en este trabajo se reporta por primera vez la presencia de quebrachitol en esta especie.

FIRMA DEL ASESOR

---

Dr. C. Luis Alejandro Pérez López

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) hoy en día permanece como una de las enfermedades más dañinas para el hombre, con efectos y síntomas que trascienden en el tiempo si no se trata adecuadamente. Causante de un desbalance en lo que respecta al metabolismo de los carbohidratos, se establece de manera crónica cuando no se detecta a tiempo; por lo que afecta desde la salud física del paciente hasta el modo de vida de quien la padece. Dependiendo del grado de severidad y la etapa en que se detecte, se requerirán distintos cuidados. Este padecimiento no solo afecta a los adultos, ya que recientemente también ha habido un incremento en los casos infantiles de DM. Este aumento en la incidencia es consecuencia, entre otros factores, del aumento del peso corporal promedio y del cambio que se ha tenido en el modo de vida de la sociedad en los últimos años, que en la actualidad es más sedentaria.

El aumento en la ingesta calórica y la disminución de las actividades físicas contribuyen substancialmente al desarrollo de enfermedades como la DM, al grado de volverse una epidemia global. De acuerdo con reportes recientes, casi tres millones de personas cada año mueren en el mundo debido a las complicaciones de DM <sup>1</sup>.

## 1.1 Epidemiología

De acuerdo a la organización mundial de la salud (OMS), cerca del 20% de los mexicanos menores de 35 años padece diabetes [WHO, 2011], mientras que a nivel mundial en el año 2014, este mismo organismo reportó que hay cerca de 422 millones de personas padecieron esta enfermedad. Esta cifra representa una prevalencia mundial del 8.5%. En el año 2015 la OMS estimó que la DM fue la causa directa de muerte de 1.6 millones de personas, mientras que otras 2.2 millones de defunciones fueron atribuibles a la hiperglucemia en el año 2012. Además, la OMS ha estimado que para el año 2030 la cifra de incidencia se duplicará y la DM será la séptima causa de mortalidad. En nuestro país la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tiene una prevalencia del 9.4% en la población adulta y se estima que hay más de 7 millones de personas que la padecen, principalmente en el bloque de edad de 60-69 años [ENSANUT, 2016]. Con estas cifras, nuestro país ocupa el sexto lugar a nivel mundial en número de personas con diabetes, el primer lugar en mortalidad en América Latina y el tercer lugar de padecimientos a nivel mundial. Lo que refleja un mal manejo de la enfermedad en cuanto a prevención, estilo de vida y hábitos alimenticios de nuestra población. Por lo que cualquier tratamiento, programa o política encaminada reducir la incidencia de diabetes, debe tener como uno de sus principales objetivos el retrasar o controlar las complicaciones asociadas,

garantizando la calidad de vida para la persona que viven con diabetes. En cuanto a gasto asociado a la enfermedad y complicaciones, la OMS plantea que hasta 95% de los costos recaen en el paciente. Aun así, los costos generados a instituciones de salud públicas son altos y en consecuencia diversos países han declarado que es insostenible continuar con el ritmo del gasto causado por la diabetes, como es el caso en la Secretaría de Salud en México. Ya que por cada \$100 pesos que se gastan en atender la diabetes, aproximadamente \$51 pesos provienen de ingreso familiar según la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE). Según datos de la encuesta ENSANUT 2012, el costo anual en el 2011 fue de cerca 8 mil pesos por persona al año, por lo que para el 2012 se requerían 48 mil millones de pesos para manejar la enfermedad. De acuerdo al Instituto Mexicano para Competitividad (IMCO), se calculó que a causa de esta enfermedad se pierden en promedio 312 millones de horas laborales, lo que representa un 25% de los empleos generados en el 2014 <sup>2,3</sup>.

La diabetes y sus complicaciones es una problemática de salud pública que va en aumento y es de interés mundial. Se ha convertido en una amenaza epidémica tanto en los países más desarrollados como en las economías emergentes. La asociada morbilidad, mortalidad y altos costos en cuidados, hacen de la DM un importante reto global y su prevención el objetivo de las instituciones de salud <sup>4</sup>.

## 1.2 Diabetes Mellitus

De acuerdo con la OMS la DM es la enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce.

De forma general, la diabetes se define como el padecimiento en el desorden metabólico con múltiples etiologías y es caracterizado por la hiperglucemia crónica, por lo que está presente la alteración del metabolismo de carbohidratos, colesterol y proteínas; resultado de defectos en la secreción de la insulina y/o acción de la misma. Los efectos de la DM incluyen daño a largo plazo, disfunción y falla de algunos órganos siendo principalmente afectados los ojos, riñón, nervios, corazón y vasos sanguíneos<sup>3-5</sup>.

La etiología en general es muy variada, siendo las causas más comunes, la herencia y defectos genéticos; así como también los factores ambientales y el estilo de vida. Este último es el factor por el cual se hace más evidente la enfermedad, ya que de acuerdo con el estilo de vida personal los síntomas pueden evidenciarse en edades tempranas o prolongar la aparición<sup>3,5,6</sup>.

### 1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) representa entre 5-10 % de los casos de DM. En la DM1 la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  tiene múltiple

predisposición genética e incluso relación con factores ambientales. En esta forma de diabetes, el rango de destrucción de las células beta es muy variable, siendo rápida principalmente en niños y más lenta en adultos <sup>4,6</sup>. Se caracteriza por la ausencia total de la insulina, por lo que los carbohidratos no pueden ser introducidos en la célula para que sigan su metabolismo normal, siendo indispensable la administración de la hormona <sup>5,6</sup>. Los pacientes rara vez presentan obesidad cuando padecen este tipo de diabetes, ya que inclusive la presencia de obesidad no es compatible con el diagnóstico. Una minoría con DM1 no tienen etiología conocida, los pacientes son insulino dependientes permanentemente y propensos a cetoacidosis, pero sin evidencia de autoinmunidad (diabetes idiopática) <sup>3,6</sup>.

### 1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2

En la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), puede presentarse una predominante resistencia a la insulina con relativa deficiencia de insulina o a la utilización ineficaz de la insulina; hasta el predominio del defecto en la secreción de insulina con resistencia a la insulina, también se puede presentar por defectos en su funcionamiento. La etiología de la relativa deficiencia de insulina es desconocida, pero no ocurre destrucción autoinmune de las células beta del páncreas. El 90-95% de los casos que padecen diabetes corresponde a la DM2, anteriormente referidos como no insulino dependientes. La mayoría de estos pacientes son obesos, por lo que existe una correlación de que la obesidad por si misma causa algún grado de resistencia a la insulina <sup>3,6</sup>.

Esta forma de diabetes puede estar presente sin ser diagnosticada por varios años, debido al desarrollo gradual de la hiperglucemia y en estadios iniciales, es probable que no sea suficientemente severa para el paciente como para notar algún síntoma clásico de la enfermedad. Sin embargo, en estos pacientes se tienen en riesgo el desarrollar complicaciones macro y micro vasculares. Los pacientes con DM2 aparentan tener niveles normales de insulina, pero sus niveles de glucosa en sangre son altos. Tienen una función normal de las células  $\beta$  del páncreas pero su secreción es defectuosa e insuficiente haciendo difícil compensar la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina puede

mejorarse con cambios drásticos ya sea en la reducción de peso, y/o con tratamiento farmacológico para la hiperglucemia, pero por si solo no es restablecida a la normalidad. El riesgo de padecer este tipo de diabetes se incrementa con la edad, obesidad y falta de actividad física. También frecuentemente ocurre en mujeres con previa diabetes gestacional y en individuos con hipertensión o dislipidemia. Es común asociar la DM2 con una fuerte predisposición genética, más que la diabetes autoinmune. Sin embargo, la genética de la DM2 es compleja y aún no está definida en totalmente <sup>5,6</sup>.

### 1.2.3 Diabetes gestacional

Existe otro tipo de diabetes mellitus, el cual es desencadenado durante la etapa de embarazo, por lo que se conoce como diabetes gestacional (DMG). Por varios años la DMG había sido definida como un grado de intolerancia a la glucosa, ya que durante el embarazo la glucosa alcanza valores que, pese a ser superiores a los normales, son inferiores a los establecidos para diagnosticar una diabetes. Actualmente, la DMG no está considerada como una DM2 manifiesta ya que por lo regular este trastorno desaparece después del parto de tal manera que se considera un periodo de anormalidad condicionado por la gestación, sin embargo si no llega a resolverse antes del término del embarazo este estado permanecerá latente llegando establecerse como una DM2

manifiesta al término del puerperio. Se estima que la DMG tiene una prevalencia aproximadamente del 5 al 10% a nivel mundial. En México la prevalencia nacional de DMG está reportada entre 4.3 y 10.3% de las mujeres embarazadas, con un mayor número de casos en los estados del norte del país (Nuevo León, Tamaulipas) <sup>5,6</sup>.

En la tabla 1 se muestran los tres tipos de generales de diabetes mellitus y sus principales causas etiológicas.

*Tabla 1 Clasificación general de la diabetes.*

Clasificación	Principal causa
Tipo 1	<ul style="list-style-type: none"><li>- Destrucción de las células beta del páncreas (conduciendo principalmente a la deficiencia absoluta de la insulina).</li><li>- Autoinmune.</li><li>- Idiopática.</li></ul>
Tipo 2	<ul style="list-style-type: none"><li>- Resistencia predominante a la insulina con deficiencia relativa de esta.</li><li>- Defecto de secreción con o sin resistencia a la insulina.</li></ul>
Gestacional	<ul style="list-style-type: none"><li>- Intolerancia a la glucosa durante el periodo de embarazo.</li></ul>
Otros tipos	<ul style="list-style-type: none"><li>- Defectos genéticos de la función de las células beta del páncreas o en la acción de la insulina.</li><li>- Endocrinopatías.</li><li>- Inducida por fármacos o químicos.</li><li>- Otras formas poco comunes.</li></ul>

#### 1.2.4 Síntomas y daños graves

Los síntomas de una marcada hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, visión borrosa y en ocasiones pérdida de peso. El deterioro en el crecimiento (en el caso de pacientes jóvenes) y la susceptibilidad a ciertas infecciones pueden acompañar a la hiperglucemia crónica. Las complicaciones a largo plazo incluyen retinopatía con potencial pérdida de la visión; nefropatías que llevan a falla renal; neuropatía periférica con riesgo de úlcera de pie, amputaciones, artropatía (o Charcot); neuropatía autónoma causando síntomas gastrointestinales, genitourinarios, cardiovasculares y disfunción sexual <sup>4-6</sup>.

Algunos pacientes pueden presentar cetoacidosis como la primera manifestación de la enfermedad. En los adultos particularmente, se mantiene una función residual de las células beta, suficiente para prevenir cetoacidosis por varios años; aunque eventualmente se vuelven dependientes de insulina condición con la que aumenta el riesgo de cetoacidosis <sup>4</sup>.

### 1.2.5 Diagnóstico

El criterio diagnóstico para la DM en un principio se estableció a raíz de lo observado en la asociación entre los niveles de glucosa en ayunas y la presencia de retinopatía como factor clave con el cual se identificó el límite del nivel de glucosa <sup>6</sup>.

El diagnóstico clínico de la diabetes se solicita cuando se presentan síntomas como aumento de sed y volumen urinario, infecciones recurrentes, pérdida de peso inexplicable, y en casos severos, somnolencia y coma. Una sola estimación de glucosa con exceso del valor de referencia establece el diagnóstico en casos donde se presentan los síntomas anteriores. Se puede corroborar, evaluando y midiendo la glucemia de nuevo por otra metodología y de acuerdo a los valores y el cuadro clínico poder clasificar el estado patológico. El diagnóstico para DM2 puede ser realizado siguiendo ciertos algoritmos como el esquema de la Figura 1, según “La guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus II” <sup>7</sup> y el “Algoritmo diagnóstico de la diabetes mellitus tipo II” <sup>8</sup> de igual manera estos mismos criterios se encuentran como parte de la detección en la norma oficial NOM-015-SSA-2010 <sup>2</sup>. De acuerdo a la organización mundial de la salud (por su siglas en ingles WHO), para las personas que no presenta los síntomas característicos, es necesario corroborar el valor de glucemia por lo menos una vez más, ya sea por prueba en ayunas aleatoria, o por la prueba de tolerancia a la glucosa, otra de

las pruebas que han facilitado el diagnóstico, es la hemoglobina glucosilada, la cual refleja el promedio de glucemia sobre un periodo de semanas atrás <sup>5,6</sup>.

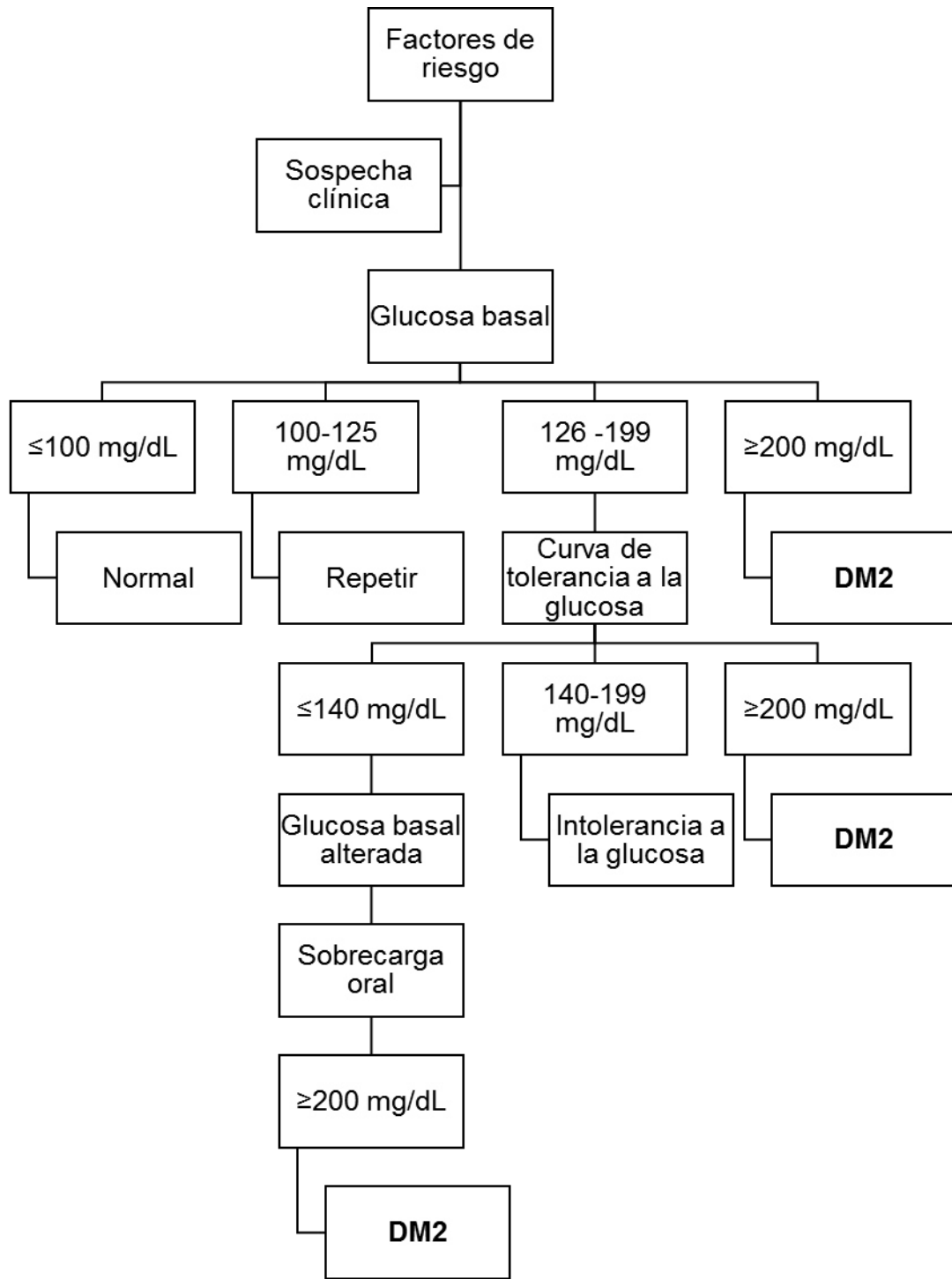


Figura 1 Algoritmo para la evaluación y diagnóstico de DM2

La prueba de tolerancia oral a la glucosa (o curva) [CTG]) ayuda a establecer el estado del diagnóstico, sólo es considerada si la glucosa en sangre se encuentra en rangos inciertos, rangos entre niveles que pueden establecer o excluir el diagnóstico. Esta prueba mide la glucosa en estado de ayuno y la glucosa 2 horas después de la carga oral de glucosa (75 g generalmente). Para niños la carga oral está relacionada con el peso, 1.75 g/kg. Siendo el mismo criterio de diagnóstico para niños igual al del adulto <sup>5,6</sup>.

De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por su siglas en ingles), el valor de tolerancia normal a la glucosa como glucosa en ayunas es de  $\leq 100$  mg/dl y una glucosa plasmática de  $\leq 140$  mg/dl posterior a 2 horas en respuesta a una carga oral de glucosa (CTG) de 75 g. La diabetes es identificada de acuerdo al criterio de diagnóstico, en donde la glucosa en plasma en ayunas se encuentran valores de glucosa  $\geq 126$ mg/dl (7.0 mmol/L) o glucosa en plasma a las 2 horas, tras la carga oral de  $\geq 200$  mg/dl <sup>5,6</sup>.

La hemoglobina glucosilada (HbA1C) es un marcador ampliamente utilizado en glucemia crónica, que refleja niveles de glucosa promedio en un periodo alrededor de 2 a 3 meses. La HbA1C juega un papel importante en el manejo de pacientes con diabetes, ya que correlaciona bien tanto con complicaciones microvasculares y en menor grado con complicaciones macrovasculares y es ampliamente utilizada como biomarcador estándar. Su valor límite es de  $\geq 6.5\%$ , de acuerdo con los datos de ADA <sup>6</sup>.

Se ha demostrado que la prueba de la carga oral es una medición más sensible de las anormalidades tempranas en la regulación de la glucosa, más que la medición de la glucosa en ayunas o la HbA1C <sup>4</sup>.

En caso de no controlar la hiperglucemia o que no sea tratada adecuadamente, pueden generarse síntomas más severos como son el desarrollo de cetoacidosis y el estado hiperosmolar no cetónico, que puede provocar estupor, coma diabético e incluso la muerte<sup>5</sup>.

#### 1.2.6 Fisiopatología de la diabetes

En el estado de obesidad, el músculo esquelético pierde sensibilidad a la insulina, haciendo necesario que más glucosa sea tomada por los adipocitos, lo que conlleva a la estimulación en la producción y liberación de más ácidos grasos libres y triglicéridos. Una elevada circulación de ácidos grasos libres promueve la hiperglucemia por la estimulación de gluconeogénesis hepática mientras se inhibe la captación y almacenamiento de la glucosa mediada por insulina como glucógeno. El curso de la prediabetes es variable y difícil de predecir. Los diferentes grados de progresión reflejan diferente genética y factores ambientales. El mecanismo básico patofisiológico subyacente a la prediabetes es la resistencia a la insulina y defectos en la secreción a la insulina. Sin embargo, los defectos en la glucemia en ayunas y los defectos de la intolerancia a la glucosa difieren en la naturaleza de ambas. En los defectos

de la glucemia en ayunas, hay una predominante resistencia hepática a la insulina con relativa conservación de la sensibilidad del músculo esquelético a la insulina. Además, hay una disminución en la respuesta de secreción de la insulina de la primera fase (Figura 2) (0-10 min) a la glucosa intravenosa y una respuesta reducida de la insulina de fase temprana (primeros 30 minutos) a la glucosa oral. Sin embargo, la respuesta a la insulina en plasma de fase tardía (60-120 min), durante la prueba de tolerancia a la glucosa es normal. En el defecto de la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad hepática a la insulina es de normal a ligeramente reducida y la resistencia del músculo esquelético a la insulina es de moderada a severo. También hay un defecto en la secreción de insulina de fase temprana y tardía. Datos publicados han mostrado que pacientes con defecto en la tolerancia a la glucosa tienen alto riesgo de muerte por causas micro y macro vasculares y tienen de dos a cinco veces alta incidencia de nuevos sucesos de isquemia cardiovascular, infarto al miocardio total y fatal e infarto en comparación con aquellos sujetos con control normo glucémico. Un estudio mostró que 50% de quienes presenta tolerancia a la glucosa, aumentaron el riesgo mortal cardiovascular. Otros estudios demuestran que tanto el defecto en la glucosa en ayunas y la intolerancia a la glucosa confieren incremento al riesgo de enfermedad cardiovascular<sup>4</sup>. Los resultados de un programa de prevención de diabetes y otros estudios similares dejaron claro que una modificación agresiva de dieta y ejercicio pueden prevenir o retrasar la progresión de la intolerancia a la glucosa hacia diabetes. Pero debido a que la modificación del estilo de vida es usualmente difícil de mantener, la intervención farmacológica ha sido estudiada para prevenir la

progresión hacia DM2. Muchos agentes antidiabéticos orales han mostrado ser efectivos en el retraso del comienzo de la DM2 <sup>4</sup>.

La DM2 no aparece en todas las personas con resistencia a la insulina, sino más bien sólo en aquellos con un defecto en la capacidad de secreción de insulina de tal manera que la secreción de insulina pancreática no compensa la resistencia a la insulina. El inicio de la manifestación de la secreción anormal de insulina es una pérdida de la secreción de insulina de “primera fase” (Figura 2)<sup>9</sup>.

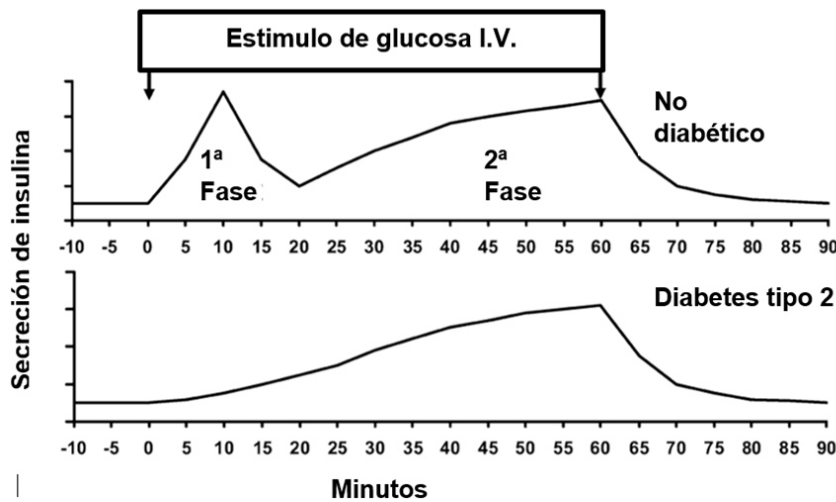


Figura 2 Patrones de la respuesta secretora de insulina a una infusión intravenosa continúa de glucosa

A nivel macroscópico, se puede conceptualmente dividir el día en dos periodos de tiempo básicos: el estado basal o el de ayuno (el nocturno y entre comidas respectivamente) y el estado prandial (después de consumir alimento). La hiperglucemia ocurre en el estado basal o de ayuno debido al incremento de la producción de glucosa hepática. La cual es consecuencia de anomalía en la secreción de insulina (falta de secreción de primera fase) y la resistencia hepática a la insulina, el resultado neto es una modulación inadecuada de la

producción de glucosa hepática. En contraste, la hiperglucemia en el estado prandial aumenta debido al incremento de absorción de glucosa del tracto gastrointestinal y disminuye la habilidad de disponer el consumo de la carga de glucosa, debido a la inadecuada secreción de insulina para compensar la resistencia a la acción en tejido blanco, principalmente músculo y tejido adiposo. En la Figura 3 se muestra un esquema de la regulación de glucosa y además se observan un número de posibles blancos terapéuticos para la regulación de la glucosa en sangre; la glucosa administrada por los alimentos vía gastrointestinal o durante el estado basal de la producción hepática, es modulada por la secreción basal de insulina. El tejido nervioso y el cerebro utilizan la glucosa independientemente de acción de la insulina, mientras que en el tejido periférico (músculo y adipocitos) por acción de la insulina activa los receptores para lograr la absorción y utilización de la glucosa <sup>9</sup>.

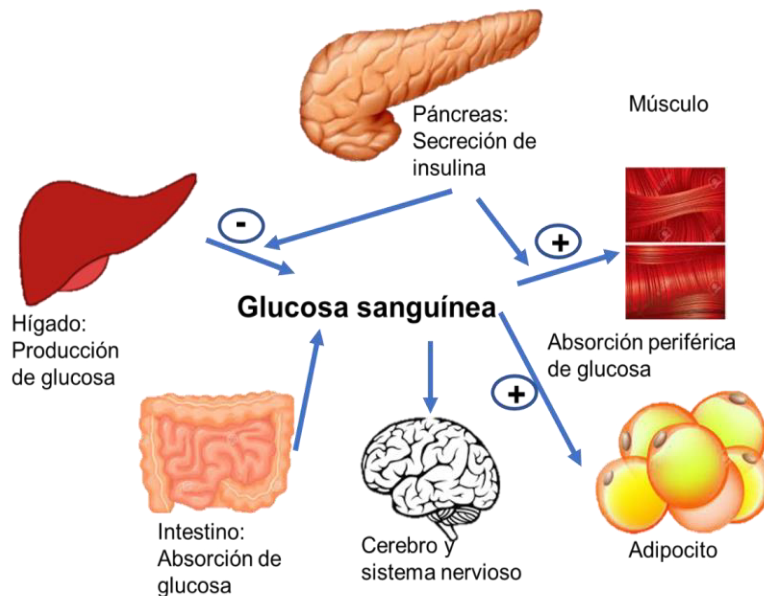


Figura 3 Esquema general de la regulación de la glucosa.

### 1.2.7 Terapia común en el tratamiento de diabetes mellitus.

La prevención juega un papel importante ya que se crea consciencia y cultura de buena salud que deja el ejemplo a futuras generaciones, que puede resultar positivamente en la reducción de la prevalencia de la enfermedad. Los métodos preventivos más efectivos han resultado ser, el cambio radical en la alimentación combinada con una ejercitación regular, llegando a retrasar así el desarrollo de la tolerancia a la insulina, pero esto en ocasiones no siempre es logrado por los pacientes. Por lo que se necesitan estrategias que sean adaptables al estilo de vida de hoy en día.

El tratamiento que se debe recibir debe ser integral, adecuado y seguro, ya que se trata de un padecimiento que afecta varias funciones del organismo. Este debe incluir el manejo farmacológico, siendo los medicamentos que ayuden a controlar los niveles de glucosa los de mayor interés; así como el control no farmacológico, en donde juegan papel importante el estilo de vida y alimentación saludable. A lo que ciertas acciones internacionales coinciden en que el alcanzar el nivel glucémico adecuado ha sido efectivo, reduciendo la mortalidad en algunos países. En México se creó una estrategia para prevenir y controlar el sobrepeso, la obesidad y la diabetes, mejorando hábitos alimenticios y ejercicio <sup>3</sup>.

Las tiazolidinedionas reducen la incidencia de diabetes en cerca del 60%; mientras que la metformina, acarbosa y orlistat son solo la mitad de efectivos que las tiazolidinedionas. Pero los beneficios del tratamiento aun necesitan ser

balanceados en seguridad y tolerancia de la intervención. La metformina es considerado el de primera elección debido a su seguridad, tolerabilidad, eficacia y costos <sup>4</sup>.

La metformina (una biguanidina), es el medicamento de primera instancia para comenzar un tratamiento contra la DM debido a ciertas características como son: que es seguro, tolerable, barato y eficaz. También se utiliza con frecuencia la insulina (principalmente para el tratamiento de la DM1) que puede preescribirse además en combinación con la metformina; otros agentes antidiabéticos, son tales como son las sulfonilureas y las glinidas, estos últimos aumentan la secreción de insulina. También las tiazolidinedionas, un hipoglucémico oral, su mecanismo de acción aún no está descrito por completo, sin embargo hay evidencia que sugiere, que estos compuestos estimulan receptores que median el metabolismo de los carbohidratos. De esta manera es posible reducir la resistencia periférica y mejorar la absorción de glucosa especialmente en tejido muscular y adiposo. Otra alternativa para el tratamiento de la DM es reducir la gluconeogénesis. Otro tipo de tratamientos son los inhibidores enzimáticos, ejemplo de ellos la acarbosa, que ayuda al retraso de la digestión y absorción de los carbohidratos. <sup>4,9-11</sup>.

La terapia es designada con el fin de alcanzar los niveles de glucosa normales o lo más cercano posible. Se ha observado que mediante el uso de inyecciones de insulina, en donde el uso de una terapia más intensa (3 inyecciones por día) retrasa la aparición de daños como retinopatía, nefropatía y neuropatía <sup>12</sup>.

Los hipoglucemiantes son sustancias que reducen los niveles de azúcar, los más utilizados son aquellos administrados oralmente. En este caso la terapia está enfocada en la inhibición de la absorción de la glucosa mediante el retraso de la acción de enzimas gastrointestinales como la alfa-glucosidasa y alfa-amilasa, ha demostrado ser efectiva en el tratamiento tanto para la diabetes como para la obesidad. A pesar de que han resultado ser muy efectivas, tienen algunas limitantes como el caso de las biguanidas ya que no pueden ser prescritas en pacientes con enfermedad renal y, por otra parte, presentan efectos secundarios como el de la acarbosa, con un incremento en las flatulencias <sup>10</sup>.

En los años 90, los inhibidores de alfa glucosidasas como acarbosa, miglitol y voglibosa fueron aprobados como fármacos orales para el tratamiento de la diabetes mellitus. Actualmente, son ampliamente utilizados, solos o en combinación con dieta y terapia de insulina, en pacientes con DM1 y DM2. canaglifozina y dapaglifozina fueron entre los primeros inhibidores de transportadores de glucosa GLUT2 aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) con el propósito de lograr un mejor control glucémico en pacientes con DM2. A partir de estos, muchos otros inhibidores del transportador SGLT fueron desarrollados y encaminados a ensayos clínicos <sup>13</sup>.

La metformina es frecuentemente recomendada como agente de primera línea, especialmente en pacientes obesos con DM2 con niveles de hiperglucemia leves a moderados. Para pacientes que presentan hiperglucemia de moderada a severa, requieren un segundo y en ocasiones un tercer agente al comienzo de

la enfermedad. El uso de dos diferentes clases de agentes hipoglucemiantes de diferentes mecanismos de acción, puede considerarse mejor y más eficiente y con menores efectos adversos <sup>11</sup>.

### 1.3 Digestión de los carbohidratos.

El organismo humano es un sistema abierto y, como tal, capaz de intercambiar materiales con el ambiente. Para cubrir sus requerimientos energéticos necesitan ingerir diferentes tipos de alimentos y metabolizarlos por procesos de oxidación. Estos alimentos están constituidos básicamente por hidratos de carbono, proteínas y grasas.- La digestión inicia en la boca, donde la saliva humana contiene la enzima amilasa salival o ptialina, que es capaz de desdoblar el almidón en maltosa, esto mediante la hidrolisis de los enlaces 1-4  $\alpha$ , después de que la enzima es activada por el cloro de la saliva. Sin embargo, su acción requiere de un contacto prolongado con el substrato y actúa solo en medio alcalino o neutro. Como el bolo pasa rápidamente de la boca al estómago, el tiempo que permanece en la cavidad bucal, faríngea y esófago no es suficiente para que ejerza su acción. <sup>14-16</sup>

Las enzimas digestivas son producidas por el epitelio intestinal y las células acinares del páncreas exocrino, estas enzimas incluyen peptidasas, disacaridasas y una proteasa llamada enteropeptidasa. La digestión de carbohidratos en el intestino delgado termina convirtiendo los polisacáridos digeribles y los disacáridos en monosacáridos que pueden ser absorbidos (Figura 4). El jugo pancreático contiene amilasa alfa, que digiere almidón, hidrolizando las uniones 1-4 alfa, pero sin afectar las uniones 1-6 alfa junto a los puntos de ramificación. En consecuencia, los productos terminales de la digestión de amilasa alfa son sobre todo disacáridos de maltosa (dos residuos de glucosa alfa unidos por enlaces 1-4 alfa), oligosacáridos (varios residuos de glucosa unidos por enlace 1-4 alfa), y dextrinas del límite alfa (polímeros de glucosa que contienen un promedio de alrededor de ocho moléculas de glucosa con uniones 1-6 alfa).<sup>14,15</sup>

Hay cinco enzimas encargadas de la digestión de los carbohidratos en el borde del cepillo intestinal. 1) La sacarasa degrada sacarosa en glucosa y fructosa. 2) La maltasa (alfa glucosidasa) separa las uniones 1-4 alfa y libera glucosa. 3) La isomaltasa (alfa dextrinasa) degrada las uniones 1-6 alfa y libera glucosa. 4) La lactasa (beta glucosidasa) degrada la lactosa en glucosa y galactosa. 5) La trehalasa hidroliza a la trehalosa, un dímero con unión 1-1 alfa de la glucosa en dos moléculas de glucosa<sup>14</sup>.

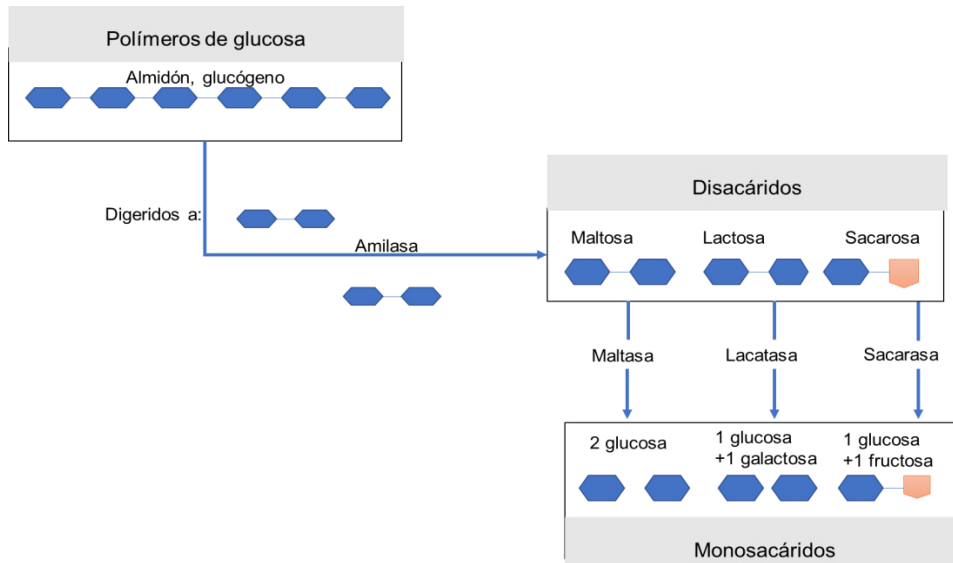


Figura 4 Esquema general de la digestión de los carbohidratos

#### 1.4 Absorción y Metabolismo de la glucosa

Los productos de la digestión de los alimentos ingeridos son absorbidos; pasan desde el lumen del aparato digestivo (especialmente a nivel del intestino delgado) hacia la sangre. La glucosa absorbida después de una comida entra en circulación del sistema portal hepático y es llevada directamente hacia el hígado, donde alrededor del 30% de toda la glucosa ingerida es metabolizada. EL 70% restante continúa en el torrente sanguíneo para su distribución hacia el encéfalo, los músculos y otros órganos y tejidos. La glucosa pasa del líquido intersticial a las células por medio de los transportadores GLUT. La mayor parte de la glucosa absorbida de una comida va inmediatamente a la glucólisis y al

ciclo del ácido cítrico para formar ATP. Parte de la glucosa la utiliza el hígado para la síntesis de glucoproteínas. La glucosa que no es requerida para energía y síntesis es almacenada como glucógeno o como grasa. La capacidad del cuerpo para almacenar glucógeno es limitada, de modo que la mayor parte del exceso de glucosa es convertida en triglicéridos y almacenada en tejido adiposo generando obesidad <sup>15</sup>.

Bajo el efecto de glucosa suministrada por vía oral, la mucosa gástrica y la del intestino secretan dos hormonas intestinales que son potentes estimuladores de la secreción de insulina por el páncreas endocrino; el polipéptido tipo glucagón I (GLP-1), secretado por el íleon, y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (glucose-dependent insulintropic polypeptide [GIP]) secretado por el duodeno <sup>14-16</sup>.

Durante el periodo de absorción de los carbohidratos, aumenta la secreción de la insulina por las células beta del páncreas, este aumento de concentración promueve los procesos característicos de la absorción.—Durante la post-absorción, la secreción de la insulina disminuye, y esta disminución interrumpe el proceso de absorción. Diversos factores contribuyen a esta regulación de insulina, sin embargo, es de especial importancia la concentración de glucosa plasmática. Durante el período de absorción, los niveles de glucosa plasmática aumentan conforme es transportada desde el tubo digestivo <sup>18</sup>. La hiperglucemia estimula las células beta del páncreas y aumenta consecutivamente la entrega de insulina a la circulación. Esta es la razón por la cual la glucosa administrada por vía oral tiene mayor efecto sobre la secreción de insulina que la inyectada

por vía venosa <sup>14,16,17</sup>. Los carbohidratos digeridos son transportados en la sangre como glucosa, distribuyéndose por todo el organismo, de los capilares, pasan al líquido intersticial y luego al interior de las células. Dentro de la célula pueden seguir tres rutas, 1) romperse en moléculas más pequeñas, oxidándose para liberar energía; 2) sintetizar otras moléculas necesarias, proporcionando otros sustratos para reacciones metabólicas; 3) convertirse en moléculas de almacenamiento energético (glucógeno hepático).

### 1.5 Acción de la insulina

La insulina se forma en las células beta por escisión de la proinsulina hacia insulina y el péptido conector o péptido C. El péptido C y una cantidad de proinsulina sin dividir, son excretadas con la insulina y producen un débil efecto similar a la insulina <sup>14</sup>.

La glucosa es un estímulo importante para la secreción de la insulina, pero algunos factores pueden estimular, amplificar o inhibir la secreción. Un aumento de las concentraciones de glucosa es un estímulo importante para la liberación de insulina a partir de una concentración de glucosa mayor de 100 mg/dL. <sup>15</sup>.

La insulina y glucagon están reguladas por las concentraciones plasmáticas de glucosa que aumentan durante la absorción de una comida (estado absortivo) y disminuyen durante periodos de ayuno (estado post-absortivo). La secreción de

la insulina cambia durante estos estados, y ayuda a mantener la homeostasis de la concentración de glucosa. La insulina estimula la inserción de proteínas transportadoras GLUT4 hacia la membrana plasmática de las células blanco, principalmente en músculo esquelético y cardiaco, el tejido adiposo y el hígado. Esto permite la entrada de glucosa hacia sus células blanco mediante la difusión facilitada. Como resultado, la insulina promueve la producción de moléculas de glucógeno y grasa que almacenan energía. La insulina también inhibe la desintegración de grasa, induce la producción de enzimas formadoras de grasa, e inhibe la desintegración de proteínas musculares. De modo que promueve el anabolismo conforme regula la concentración de glucosa en sangre. Los mecanismos que regulan la secreción de insulina y la acción de esta hormona normalmente evitan que la concentración plasmática de glucosa aumente por arriba de 170 mg/dL después de una comida, o que disminuyan por debajo de alrededor 50 mg/dL entre comidas. Esta regulación es importante porque la glucosa anormalmente alta en sangre puede dañar el encéfalo. Este efecto depende de que la glucosa entra al encéfalo mediante difusión facilitada; cuando el índice de esta difusión es demasiado bajo, el aporte de energía metabólica para el cerebro puede hacerse insuficiente. Como resultado a esto puede dar debilidad, mareo, cambio de personalidad y finalmente, coma y muerte. La insulina reduce la glucosa en plasma de tres formas <sup>15</sup>:

1. La insulina aumenta el transporte de glucosa en la mayoría de las células sensibles a la insulina, pero no en todas ellas.

2. La insulina aumenta la utilización celular y el almacenamiento de la glucosa.
3. Promueve la síntesis de grasas

### 1.6 Glucosa en el estado absortivo y postabsortivo

La concentración plasmática de glucosa en ayuno está en el rango de 65 a 105 mg/dL. Durante la absorción de una comida, la concentración de glucosa aumenta hasta aproximadamente 140 a 150 mg/dL. Este aumento actúa sobre las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos, donde lleva al cierre de canales de  $K^+$ ; produciendo una despolarización de la membrana, esto abre los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje. El aumento resultante de  $Ca^{2+}$  estimula la exocitosis de vesículas que contienen insulina. Así, un aumento de glucosa en sangre lleva a un aumento de la secreción de insulina; al mismo tiempo, inhibe la secreción de glucagon desde las células alfa de los islotes pancreáticos, dado que la insulina disminuye la concentración de glucosa al estimularse la captación celular, y el glucagon actúa de manera antagonista para aumentar la glucosa plasmática, al estimular la glucogenolisis en el hígado. Durante el estado postabsortivo, la concentración de glucosa plasmática disminuye, la secreción de insulina se reduce y la secreción de glucagon aumenta. Estos cambios ayudan a la

captación celular de glucosa plasmática hacia órganos, como los músculos, el hígado y el tejido adiposo (cuando son requeridos, en estado absortivo) y posteriormente promueven la liberación de glucosa desde el hígado, por estimulación del glucagon (estado postabsortivo). La prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral, es una medición de la capacidad de las células  $\beta$  para secretar insulina, y de la capacidad de insulina para disminuir la glucosa en sangre. En una persona con metabolismo normal de los carbohidratos, un aumento de glucosa en sangre durante la prueba, se revierte hasta cifras normales en el transcurso de 2 horas tras la ingestión. En una persona con diabetes mellitus la concentración plasmática permanece en 200 mg/dL o más alta después de las 2 horas después de la ingestión. La secreción de insulina también es estimulada por aminoácidos particulares derivados de las proteínas de la dieta. Los islotes de Langerhans reciben inervación parasimpática como simpática. La división parasimpática del sistema autónomo se activa durante las comidas y estimula tanto la función gastrointestinal como la secreción de insulina. La división simpática se encarga de inhibir la secreción de la insulina, pero estimula el glucagon que, en momentos de estrés, junto con la adrenalina produce hiperglucemia. Cuando se toma por vía oral, el intestino secreta hormonas que estimulan la secreción de insulina antes de que se ocurra el proceso absortivo de la glucosa. La secreción de insulina empieza a aumentar en anticipación a un incremento de la glucosa <sup>15,16</sup>.

## 1.7 Inhibidores enzimáticos

La alfa-glucosidasa es una enzima digestiva de carbohidratos primarios, que están presentes en el borde de cepillo del intestino delgado y actúan sobre los enlaces  $\alpha$  1-4. Esta enzima cataliza la degradación de almidón y disacáridos a glucosa. Debido a que los carbohidratos necesitan metabolizarse por medio de la  $\alpha$  glucosidasa antes de ser absorbidos en el intestino delgado, al inhibir esta enzima, el proceso de digestión de los carbohidratos se hace lento, ayudando de este modo a prevenir el estado de hiperglucemia postprandial, el cual es causa importante tanto de la diabetes mellitus y como de las complicaciones asociadas a dicho padecimiento. Algunos compuestos aislados a partir de plantas o productos naturales pueden tener la capacidad de actuar inhibiendo competitivamente a la enzima alfa glucosidasa intestinal. Como ejemplo, se ha demostrado que ciertos alcaloides como deoxynojirimycin (DNJ) y 2,5-bis-(hydroxymethyl)-3,4-dihydropyrrolidina (DMDP), son potentes inhibidores enzimáticos que han sido aislados de distintas plantas <sup>19</sup>.

## 1.8 Modelos *in vivo*

Los modelos animales son una complicada parte del descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos. Los experimentos *In vivo* han jugado un papel importante en la investigación biomédica en el pasado, y también han sido un tema de discusión público, científico e incluso filosófico. En el presente, el paradigma respecto a la necesidad, utilidad, y trato ético de los animales en la investigación ha evolucionado, pero la discusión está abierta. Es un hecho que el uso de animales de experimentación es una necesidad para el propósito primario de validar el objetivo y estimación de múltiples parámetros de nuevos fármacos, incluyendo la eficacia, margen de seguridad, metabolismo y farmacocinética. También es obvio que las necesidades actuales no satisfechas con respecto a la experimentación con animales se centran principalmente en el desarrollo de mejores modelos animales, con versión cercanas al humano, así como en otros avances de alternativa de reemplazo, minimización del número y dolor de los animales utilizados, y mejora continua del bienestar de los animales de laboratorio. Existen tres necesidades principales respecto a modelos no humanos en investigación biomédica: 1) la necesidad del uso, 2) la necesidad de mejorar, 3) la necesidad de reemplazar, reducir y clarificar (principios rectores). Para justificar el uso de experimentación en animales, este debe permitir obtener algún beneficio, tales como el avance en el conocimiento, como lo es el mejorar el diagnóstico de una enfermedad y su tratamiento. Una

adecuada validación interna de un experimento en animales implica que las diferencias observadas entre grupos asignadas a diferentes intervenciones pueden, además del error aleatorio, ser atribuidas al tratamiento bajo investigación. La validación interna puede ser reducida por diferentes tipos de sesgo a través del cual las diferencias entre los tratamientos de grupos son presentadas. Los científicos, debido a la necesidad de proveer evidencia suficiente de la efectividad de algún fármaco para el tratamiento de enfermedades humanas, han desarrollado modelos no humanos que ayudan en la predicción de como el paciente puede responder al fármaco. La compleja biología de todo un organismo vivo, no puede ser recreada en una placa Petri, por lo que muchos animales son utilizados para entender cómo funciona un fármaco in vivo. La limitada concordancia de toxicidad y eficacia de los fármacos en humanos y animales ha contribuido a la disminución de la producción en la industria farmacéutica, y al retiro de muchos fármacos del mercado aprobados para su uso. Los animales han contribuido significativamente para entender en el humano la bioquímica, fisiología, patofisiología y farmacología. Una de las condiciones humanas importantes es el síndrome metabólico (Incluye obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, presión alta y dislipidemia) y este puede ser exitosamente simulado en roedores <sup>20</sup>.

Los ratones ob/ob (C57BL/6-ob/ob) fue uno de los primeros modelos genéticos utilizados en el estudio de diabetes. Algunas proteínas de importancia que han sido eliminadas en ratones para investigación de diabetes y obesidad, tales

como receptores de insulina, GLUT4 entre otras. Otros modelos son los químicamente inducidos para diabetes, ya sea con el uso de alloxano y estreptozotocina, que son análogos estructurales de la glucosa, estos entran en las células  $\beta$  del páncreas por la vía del transportador de GLUT2. Una sola inyección del fármaco, puede inducir necrosis selectiva de las células  $\beta$  del páncreas en ratas, ratón y conejos como modelos de DM1 y DM2. El modelo de DM2 se induce por el uso de bajas dosis de estreptozotocina administrada neonatalmente, por ejemplo, dosis de 70 mg/kg en el día 5 de vida, produciendo moderada hiperglucemia en ratas adultas <sup>21</sup>.

### 1.9 Ensayos *in vitro*

Los modelos *in vitro* ofrecen ciertas ventajas en comparación del modelo animal. Tienen el potencial de ser estandarizados rigurosamente, y un buen control experimental <sup>20</sup>.

Dentro de los ensayos *In vitro*, un método espectrofotométrico muy demandado, por rapidez y análisis continuo de la actividad inhibitoria de la enzima alfa glucosidasa, es aquel que utiliza el pseudo sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (p-NPG) e inhibidor de alfa glucosidasa libre, ya sea sintético o de producto natural. Sin embargo, se señala que los resultados de la evaluación

*in vitro* no es comparable con resultados obtenidos mediante ensayos *in vivo*, es decir, en muchas ocasiones ambos resultados no se correlacionan <sup>22</sup>.

### 1.10 Productos Naturales

A lo largo de los años se ha demostrado que los productos naturales han sido sumamente importantes en el desarrollo de nuevos medicamentos, debido a la variedad de funcionalidad de sus metabolitos secundarios tanto de microorganismos como especies de plantas, los cuales presentan una gran diversidad química. Las plantas son parte de la medicina tradicional de diversas regiones por lo que son utilizadas para el tratamiento de ciertas enfermedades, sin embargo; un gran número de ellas aún no han sido estudiadas. Los productos de plantas convergen en, la cultura social, sistemas de salud y economía; donde el conocimiento étnico acerca de alguna planta con cierto efecto es de ayuda para investigar los productos naturales y además un mayor desarrollo benéfico para la sociedad <sup>23</sup>.

Los medicamentos basados en plantas son ampliamente utilizados como método primario de cuidado de la salud en muchos países desarrollados. Por lo que en los últimos años, alrededor del 80% de la población mundial utiliza y confía en los beneficios de la terapia basada en la medicina herbal, siendo una estrategia complementaria a la medicina convencional e incluso en ocasiones

es la terapia de primera elección. La medicina tradicional a partir de plantas ha recibido mucha atención debido a que son consideradas más seguras para el humano, aunque esto en ocasiones no ha sido probado científicamente. Dando pie a que la investigación de los productos naturales se realizada con fines de demostrar o apoyar que la planta posee un efecto terapéutico y también que es seguro de utilizarse como tratamiento. Además, aportando sustancias más efectivas o con un potencial terapéutico explotable para mejorar la salud de la gente. <sup>24</sup>.

#### 1.10.1 Productos naturales en el tratamiento de la DM

El descubrimiento de nuevos fármacos hipoglucemiantes potentes y con pocos efectos adversos es importante para mejorar la calidad de vida aquellos pacientes con DM <sup>25</sup>.

Los productos a base de plantas también han sido reportados en el uso para el tratamiento de la diabetes, los cuales pueden tener un efecto hipoglucemiante, antihiperoglucemiante o antidiabético. El mecanismo de acción puede ser dado por, inhibición de alfa glucosidasa o alfa amilasa u otro, donde se han reportado algunos extractos acuosos que han mostrado tener este efecto inhibitorio, y que son útiles en el tratamiento de la DM1 y DM2; o ya sea que el mecanismo puede deberse a que incrementan la secreción de insulina o regeneran las células beta del páncreas, del cual se han reportado algunos extractos

alcohólicos y acuosos con este efecto <sup>10</sup>. En algunos estudios se ha reportado que el Kaempferol aumenta la absorción de glucosa en células HepG2 y en miotubos de porcino <sup>25</sup>.

### 1.11 Planta de Estudio

El género *Cordia* abarca cerca de 250 especies, siendo la mayoría de ellos árboles o arbustos, nativos de América. Dentro de la medicina popular se ha reportado que este género suele ser utilizado para tratar varias afecciones en el ser humano. Dentro de las aplicaciones etnofarmacológicas más notables se encuentran el tratamiento antimicrobiano, antiinflamatorio, antihelmíntico, analgésico y diurético; así como para tratar problemas del sistema digestivo, respiratorio, urogenital, cardiovascular y desordenes sanguíneos. Por lo que esto ha conducido a diversos estudios para corroborar sus propiedades biológicas y farmacológicas, mediante diversas pruebas como ensayos *in vitro*, *in vivo* o pre clínicos. Dentro de los potenciales efectos farmacológicos, los que han sido más estudiados para el este género, son principalmente antimicrobiano, antinociceptivo, antiinflamatorio y antiparasitario. Los metabolitos que se han aislado, son principalmente terpenos, incluyen flavonoides y taninos <sup>26</sup>.

*Cordia boissieri*, también conocido como anacahuita, anacahuite, olivo mexicano u olivo texano; es un árbol perenne que llega a medir 5 metros de altura, sus hojas son ovadas, de 15 a 20 cm de largo y de superficie pilosa o aterciopelada. Posee unas flores blancas con centro amarillento; su fruto es ovoide, de color pardo verdoso. Tiene una distribución por el Noreste del México y algunos estados del sur de Estados Unidos. Tradicionalmente las hojas son utilizadas en el tratamiento de reumatismo y problemas bronquiales <sup>27</sup>.

En 1973 se reportó a partir del fruto *Cordia boissieri*, el aislamiento del p-hidroxibenzaldehído y el D (+) pinitol, no identificando alguna actividad biológica (Domínguez, 1973). En el 2005, Pérez López, en sus tesis de doctorado, demostró que la planta posee actividad contra cepa resistente de *Staphylococcus aureus*, utilizando como material, las hojas de la planta; así también se menciona la aproximación a un aislamiento en el cual se identificó una estructura triterpénica. En el 2007, Molina y colaboradores demostraron que esta especie posee potencial antimicrobiano contra *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. También se ha registrado investigación acerca de los aceites esenciales a partir de las flores de anacahuita cultivada en Egipto, donde los principales componentes determinados fueron (-)-espatulenol y (E)-cariofileno; encontrando al tipo sesquiterpenos como la clase predominante <sup>28</sup>.

## 1.12 Antecedentes

Algunas especies de *Cordia* han sido reportadas por poseer efectos relacionados con el tratamiento de la diabetes mellitus, por lo que esta especie tiene potencial para el manejo de diabetes.

En el 2004, Murillo y colaboradores reportaron que *C. alliodora* posee efecto hipoglucemiante, probado en un modelo de ratón tratado con alloxano, vía de administración intraperitoneal (i.p.), utilizando extractos etanólicos de la planta. En el mismo año, se reportó el aislamiento de un compuesto denominado cordiacroma D a partir de *C. dentata*, donde además se realizaron ensayos *in vivo* en ratas wistar normoglucémicas, tratadas con alloxano y estreptozotocina para probar el efecto hipoglucemiante de extracto metanólico de la planta, donde observaron una disminución de la glucemia en el ensayo de ratas tratadas con alloxano (Méndez y cols., 2004)<sup>29</sup>. En el 2005 Cetto y cols.<sup>30</sup>, mencionan en un trabajo de revisión que *C. elegnoides* y *C. tinifolia* poseen actividad hipoglucemiante. En el 2013, Sarathchandiran & Gnanavel demostraron el efecto hipoglucemiante de extracto alcohólico de *C. sebestena* en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina<sup>31</sup>.

Con respecto al uso de *Cordia boissieri* en el tratamiento de la diabetes mellitus, se realizó un estudio en el cual se entrevistaron pacientes femeninas diagnosticadas con DM, y éstas mencionaron que la anacahuita (*Cordia*

*boissieri*) es usada dentro de los remedios herbales para tratar la diabetes <sup>32</sup>. En el 2013 se reportó la actividad alfa glucosidasa a partir de extractos polares de los frutos de esta especie (Viveros Valdez , 2013)<sup>33</sup>. En el 2016 se evaluó el efecto protector de *Cordia boissieri* contra el síndrome metabólico, utilizando como ensayo *in vivo* un modelo de rata con síndrome metabólico inducido con fructosa, encontrando un posible efecto a partir de extractos de acetato de etilo de las hojas de esta planta (Owis y cols., 2016) <sup>34</sup>. En el mismo año se evaluó (2016) la actividad de *Cordia boissieri* en el tratamiento del síndrome metabólico, y además se reportó el aislamiento de los compuestos, hesperidina, kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, ácido rosmarinico,  $\beta$ -sitosterol-3- D-glucopiranosido, quercetina y kaempferol, a partir de extractos de acetato de etilo de hojas de la planta <sup>35</sup>.

### 1.13 Justificación

Se estima que para el 2030 la cifra de incidencia de DM en el mundo será de alrededor de 700 millones. A nivel mundial México ocupa el sexto lugar respecto al número de casos de DM. En América latina es el primer lugar en mortalidad y el tercero en el número de casos registrados. Adicionalmente, en nuestro país esta enfermedad ha alcanzado el primer lugar entre las causas mortalidad.

Aunque en la actualidad existe una amplia gama de tratamientos efectivos, la incidencia de esta enfermedad va en aumento. En este contexto es importante contribuir con nuevas estrategias que puedan ser combinadas con las ya establecidas para mejorar el tratamiento y el manejo de la enfermedad.

Distintas plantas del género *Cordia* cuentan con reportes de algún tipo de efecto benéfico sobre el metabolismo de la glucemia. Específicamente, *Cordia boissieri* tiene antecedentes de uso etnomedicinal en DM y actividad inhibitoria *in vitro* de enzimas involucradas en el incremento de niveles de glucosa, como la alfa-glucosidasa.

Por la importancia de establecer estrategias de control de la glucemia en la DM y por los antecedentes de efecto hipoglucémico y antihiperoglucémico del género *Cordia*, en el presente trabajo se propuso realizar el aislamiento y caracterización química de compuestos o fracciones a partir de *Cordia boissieri*, una planta endémica del norte de México con potencial actividad antidiabética.

## 1.14 Objetivos

### 1.14.1 Objetivo general

Obtener extractos, fracciones y/o compuestos a partir de hojas de *Cordia boisieri* para evaluar su potencial actividad antidiabética.

#### 1.14.2 Objetivos específicos

1. Obtener extractos, fracciones y/o compuestos a partir de las hojas de *Cordia boissieri*.
2. Evaluar *in vivo* la actividad hipoglucemiante, antihiperglucemiante, y antidiabética de compuestos o fracciones en modelo murino.
3. Evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa de fracciones o compuestos obtenidos.
4. Caracterizar químicamente las fracciones y/o compuestos obtenidos.

## CAPÍTULO 2

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 2.1 Equipo, Material y Reactivos

##### 2.1.1 Equipo

- Licuadora
- Equipo de agitación
- Rotavapor
- Liofilizadora Labconco, 7522800 Freeze Dry-12; Fr

- Incubadora a 37 °C Stabil-Therm
- Glucómetro portátil Optimum Xceed Abbot, EUA
- Balanza analítica, modelo Pioneer, Ohaus, EUA.
- Vórtex, modelo Maxi Mix II, Thermo Scientific, EUA
- Pistola de desecación Desaga Hidelberg Trockenpult, Type 134100
- Lámpara Spectroline Highest Ultraviolet Intensity, 254 y 365 nm
- Equipo FT-IR-ATR, Perkin Elmer®, con cristal de ATR
- Equipo RMN, Bruker® Advance III, 400 MHz
- Equipo UHPLC-MS, Trampa de iones Ultimate 3000 LCQ FLEET
- Lector de placas, modelo Multiskan FC, marca Thermo Scientific, EUA
- Centrifuga, centra CL3, Termo IEC
- Incubadora con agitación para microplacas, marca VWR, EUA
- Potenciómetro, modelo φ61, marca Beckman, EUA
- Placa de agitación y calentamiento, modelo Ceramag Midi, marca IKA, EUA

## 2.1.2 Material

- Matraz Erlenmeyer 1 L
- Tubos de ensaye Pyrex® 13x100 mm
- Microtubos Eppendorf® 1.5 mL
- Pipetas Pasteur
- Frascos para liofilizar Labconco®
- Placas de porcelana
- Papel filtro
- Embudo de filtración rápida
- Tirillas para glucómetro
- Placa de 96 pocillos, poliestireno, fondo plano, Falcon, EUA
- Cromatofolios de sílica gel
- Gel de sílice (0.040-0.063 mm)
- Vaso de precipitado
- Parafilm
- Cánula de acero inoxidable
- Jeringas 1 mL

- Tubos Falcon
- Tubos de RMN de 5 mm

### 2.1.3 Reactivos

- $\alpha$ -Amilasa de páncreas porcino, 15 U/mg, Sigma, EUA
- $\alpha$ -Glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, 12.4 U/mg, Sigma-Aldrich, EUA
- Acarbosa,  $\geq 95\%$ , Sigma, China
- Almidón, Sigma, India
- Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ),  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich, Japón
- Fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), ACS, Fisher Scientific, EUA
- Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Sigma-Aldrich, EUA
- p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, Sigma-Aldrich, EUA
- Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ),  $> 99\%$ , Sigma- Aldrich, España

#### 2.1.4 Disolventes

- Hexano
- Acetato de etilo (AcOEt)
- Metanol (meOH)
- Agua Destilada
- Butanol
- Etanol (etOH)
- Cloroformo
- Nitrógeno gas de alta pureza
- Óxido de deuterio (D<sub>2</sub>O)
- Dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-d<sub>6</sub>)

#### 2.1.5 Reactivos especiales

- Vapores de NH<sub>3</sub>
- Vainillina en ácido sulfúrico
- α-Naftol en ácido sulfúrico
- Ácido fosfomolibdico

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Colecta de la planta de estudio

Se colectaron hojas de *Cordia boissieri* en García, Nuevo León, México en los alrededores del parque Xenpal (carretera a grutas de García, km 18) en la ubicación geográfica, latitud N 25° 50' 0.873 s, longitud O 100° 34' 35.158 s. La colecta se realizó en el mes de agosto del año 2016. Un espécimen de la planta fue autenticada en el Herbario institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y cuenta con el número de voucher 024167.

Posterior a la colecta, la planta se sometió a eliminación del exceso de polvo, utilizando chorro de agua ligero, evitando el completo empapamiento del espécimen. El exceso de agua se eliminó sacudiendo ligeramente las hojas y sometiendo al aire de una secadora expuesta a una distancia aproximada de 1 m para evitar dañar el espécimen de estudio.

A continuación, se sometió a secado a temperatura ambiente, dentro de las instalaciones del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de Nuevo León. Al cabo de 3 días, la

planta se deshojó y estas se trituraron en licuadora, obteniendo un polvo que se sometió a extracción con diferentes solventes.

### 2.2.2 Obtención de extractos primarios

La obtención de los extractos fue realizada en dos modalidades, uno de manera directa y otro secuencial. El primer método consistió en una extracción de manera directa, en donde se colocó una cantidad de planta molida con metanol únicamente y otro con agua. Esto se realizó en proporción 1:3 peso-volumen (p/v), se agitaron por una hora a velocidad media (no. 5) en un agitador Heidolph Unimax 1010. Obteniendo los extractos de metanol y acuoso.

Y un segundo método fue por extracción secuencial. Donde se utilizaron solventes de menor a mayor polaridad. Se pesaron 200 g de hoja molida y se sometieron a extracción en modo secuencial, se inició con n-hexano (Hex), se continuó la extracción con acetato de etilo (AcOEt), luego extracción con metanol (meOH) y por último con agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>), la planta se colocó con cada solvente en proporción de 1:3 peso-volumen (p/v). El proceso de extracción se realizó en agitación constante a velocidad media (velocidad no. 5) en un agitador Heidolph Unimax 1010; agitando durante 1 hora y se repitió el proceso con cada solvente indicado hasta 4 veces. Entre cada cambio de solvente, la planta molida se llevó a sequedad colocándola en un recipiente de

vidrio limpio, tapado con papel y dentro de la campana de extracción para eliminar el residuo del solvente previamente utilizado. En el apéndice A se muestra un esquema general de la obtención de los extractos.

Cada extracto obtenido con cada uno de los solventes fue filtrado y llevado a evaporación a presión reducida en un rotaevaporador concentrando cada extracto, excepto el extracto acuoso el cual se sometió a liofilización. Tras reducir el volumen de solvente, los extractos se sometieron a una temperatura de 37°C en estufa para secar por completo. Se registró el peso de los extractos y se conservaron en frascos ámbar a -10 °C hasta su uso en el desarrollo del trabajo.

### 2.2.3 Obtención de fracciones y/o compuestos

Para continuar con los objetivos se decidió trabajar con el extracto metanólico secuencial ya que fue uno de los que mostró mejor efecto hipoglucémico, descrito en la sección 3.5.

### 2.2.3.1 Solubilidad diferencial (lavados)

El extracto metanólico secuencial (meOHsec) se disolvió con metanol y se centrifugó por 5 min a 2300 rpm, se separó el precipitado (PB-meOH) y el sobrenadante por decantación. El PB-meOH se sometió a lavados con cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) para eliminar impurezas.

A la fase sobrenadante (metanol) se le agregó agua desionizada (MilliQ, 12 ohms) y fue sometida a una extracción con  $\text{CHCl}_3$  (para realizar lavados) adicionando en una proporción de 1:2 v/v solvente/sobrenadante. Se sometió a centrifugación por 5 min a 2300 rpm, y se separaron las fases resultantes. Se obtuvo una fase acuosa (FS-meOH) y una fase orgánica. Éste proceso se repitió hasta lograr extraer la mayor cantidad de componentes afines con el cloroformo indicando el punto final, cuando comienza a salir incoloro la fase orgánica.

El precipitado (PB-meOH) y sobrenadante (FS-meOH) fueron analizados por cromatografía en capa fina. Utilizando una fase móvil (FM) metanol/acetato de etilo 50:50, y se observó en la lámpara ultravioleta a 254 y 310 nm.

### 2.2.3.2 Seguimiento de compuestos por cromatografía en capa fina

Se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) fase normal (gel de sílice) de los extractos secuenciales y de fracciones obtenidos de *Cordia boissieri*. Se probaron tres sistemas de eluentes, los cuales describen en la tabla 2.

*Tabla 2 Sistemas de eluentes probados en el rastreo de componentes por CCF.*

Solventes	Proporciones
Hexano: Acetato de etilo	3:2
Metanol: Acetato de etilo	50:50
Butanol: Ácido acético: Metanol: Agua	2:1:0.5:1

La elución de los distintos componentes en la CCF se observaron en una lámpara UV a 254 nm y 236 nm, así como también mediante el revelado con diversos reactivos como vapores de NH<sub>3</sub>, vainillina en ácido sulfúrico, α-Naftol en ácido sulfúrico y ácido fosfomolibdico.

### 2.2.3.3 Purificación de la fracción soluble (FS-meOH)

La FS-meOH de la sección 2.2.3.1 fue liofilizada, posteriormente se disolvió en proporción 1:3 p/v en la mezcla de solventes AcOEt/AcOH/meOH/H<sub>2</sub>O (en proporción v/v 2:0.5:0.5:1). Se centrifugó a 2300 rpm por 5 min, se obtuvieron 2 fases. Este procedimiento se repitió hasta que la fase superior salió incolora y se descartó la fase superior (Fs). La fase inferior (Fi) se evaporó utilizando un rotavapor para reducir el volumen. Se disolvió con etanol al 90% y se forman dos fases, una fase superior (Fs<sub>2</sub>) y una fase inferior (Fi<sub>2</sub>). Ambas fases se separan mediante centrifugación y la Fs<sub>2</sub> se deja evaporando en una estufa de calentamiento a 37°C. Con lo anterior se logran obtener cristales.

### 2.2.4 Elucidación estructural del precipitado blanco (PB-meOHsec) y fracción sobrenadante (Fs-meOH)

Los procedimientos de infrarrojo (FT-IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS-ESI), que se describen a continuación corresponden al objetivo 4 y de manera experimental se estuvieron realizando a la par con la obtención de fracciones y compuestos (sección 2.2.3)

#### 2.2.4.1 Determinación cualitativa de nitrógeno

Se realizaron dos pruebas cualitativas para determinar nitrógeno en el precipitado blanco (PB-meOHsec).

##### 2.2.4.1.1 Preparación de muestra por fusión con sodio

- a. En un tubo de vidrio se colocó un trocito de sodio, previamente secado sobre papel filtro.
- b. El tubo se calentó bajo la llama directa de un mechero hasta que los vapores de sodio llegaron a 1 cm de sobre el fondo; luego se agregaron 5 mg aproximadamente de muestra sólida.
- c. Se calentó a llama directa durante 2 minutos.
- d. Se dejó enfriar el tubo y se agregó 1 mL de etanol para descomponer el exceso de sodio.
- e. Se agregaron 5 mL de agua se agitó, se calentó la mezcla hasta ebullición. Se filtró en caliente y se diluyó en 10 mL de agua desionizada.
- f. La solución resultante incolora y transparente fue utilizada para los dos ensayos anteriores.

#### 2.2.4.1.2 Prueba de sulfato ferroso

En tubo de ensaye se colocó 1 mL de muestra que fue sometida a la fusión con sodio. Se añadieron 100 mg de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ). La presencia de color azul o verde indica un resultado positivo

#### 2.2.4.1.3 Prueba de Azul de Prusia

En tubo de ensaye se colocó 1 mL de muestra que fue sometida a la fusión con sodio. Se agregaron 2 gotas de solución saturada de  $\text{FeSO}_4$  y amonio ( $\text{NH}_4$ ). Se agregaron 2 gotas de fluoruro de potasio al 30%, se calentó a ebullición y se acidificó con ácido sulfúrico 30%, hasta disolver. Un color azul Prusia indica un resultado positivo.

#### 2.2.4.2 Espectroscopia infrarrojo

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo (FT-IR) del PB-meOHsec y se analizaron para identificar grupos funcionales presentes. La obtención de los espectros llevó a cabo utilizando el equipo FT-IR-ATR, Perkin Elmer®, ATR con cristal de ZnSe, se realizaron 10 barridos como mínimo, en el intervalo con número de onda de  $4000\text{-}732\text{ cm}^{-1}$ .

### 2.2.4.3 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Se obtuvieron los espectros del extracto metanólico, el precipitado blanco y la fracción acuosa  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT 135, así como experimentos de doble dimensión (COSY, HMBC, HMQC) para la elucidación estructural. Los experimentos fueron realizados en distintos disolventes, dependiendo de la solubilidad del analito de interés. Los disolventes empelados fueron agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol tetradeuterado ( $\text{MeOD-d}_4$ ) y dimetilsulfóxido hexadeuterado ( $\text{DMSO-d}_6$ ). Los espectros de RMN fueron obtenidos en un equipo Bruker de 400 MHz equipado con una consola Avance III y una sonda BBO con gradientes en z. Los parámetros utilizados para la obtención de los espectros fueron los preestablecidos para cada tipo de experimento. El procesamiento y análisis de los datos se realizó con el software TopSpin 3.5. Para la identificación de los compuestos se hicieron cálculos del desplazamiento químico, verificación de parámetros espectroscópicos de los datos reportados en la literatura y búsqueda en bases de datos como la *Human Metabolomic Data Base* y *Jeol Natural Product Data Base*.

#### 2.2.4.4 Análisis del perfil de fragmentación inicial por espectrometría de masas con electrospray del extracto metanólico secuencial

Se utilizó un equipo UHPLC-MS Ultimate 3000, Thermo Scientific, Masas LCQ Fleet, Trampa de iones, con inyección directa por electro spray (ESI) en modo de ionización positiva. Estos experimentos se realizaron en la Universidad Estatal Paulista, Sao Paulo Brasil. La muestra de extracto meOHsec, fue particionada mediante una extracción en fase sólida (SPE) utilizando un cartucho C18. Se obtuvieron una fracción alcohólica y una hidroalcohólica. Ambas fracciones se analizaron y se detectaron en modo negativo en el rango de 100 a 1500 m/z.

### 2.2.5 Ensayos de actividad *in vivo*

Los ensayos *In vivo* se realizaron en el Laboratorio de Electrofisiología y Bioevaluación Farmacológica, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y tiene el aval de la Comisión para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CCUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Todos los animales de estudio se mantuvieron en condiciones adecuadas en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEM, con temperatura ambiente de 25-26 °C, una humedad relativa de 40-50 %, en ciclos de luz oscuridad de 12 horas y contando con agua y alimento *ad libitum*, de acuerdo a la NOM-062-ZOO-199.

#### 2.2.5.1 Evaluación del efecto hipoglucémico en extractos de *Cordia boissieri*

Los extractos fueron evaluados para conocer su efecto hipoglucémico. Se utilizaron ratones *mus musculus* normoglucémicos, cepa CD1. Cada grupo formado constaba con 5 ratones. Los grupos experimentales, las sustancias probadas y las dosis se utilizadas en cada grupo se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 Grupos y dosis evaluados para la actividad hipoglucémica.

Grupo	Sustancia a administrar	Dosis
1. Control de vehículo	Agua.	--
2. Control farmacológico positivo	Insulina	5 UI/kg
3. Experimentación (extracto, fracción o compuesto)	Muestra a evaluar	a) 5 mg/kg b) 1 mg/kg

Todos los ratones fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum* hasta el momento en que se realizó la prueba.

Se realizó el registro de la glucosa basal midiendo con un glucómetro portátil (OptimumXceed Abbot), se tomó la muestra de sangre de la vena caudal. Se continuó el estudio, inyectando 100  $\mu$ L vía intraperitoneal (i.p.) de la sustancia a administrar, de acuerdo con el grupo correspondiente (tabla 2). Se tomó una muestra de sangre de la vena caudal cada hora (1-6 horas) a partir de la administración hasta seis horas posteriores, de esta manera se hizo el registro de los niveles de glucosa mediante el uso del glucómetro portátil.

Con los datos obtenidos, se realizaron gráficos de cinéticas de glucemia promedio de cada grupo, así como gráficas normalizadas y de porcentaje de reducción de la glucemia con respecto a la glucosa basal. Para comparar los resultados se realizó el análisis estadístico con el software Microcal Origin,

minitab y excel. Al final se compararon los resultados mediante una prueba estadística de Dunnet.

#### 2.2.5.2 Evaluación de efecto antihiper glucémico en extractos a partir de *Cordia boissieri*

Todos los extractos obtenidos (directos y secuenciales) de *C. boissieri* fueron evaluados para el efecto antihiper glucémico. El estudio se realizó en ratas Wistar macho, normoglu cémicos, con peso entre 250 y 300 g. Todos los ratones fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum* hasta el momento en que se realizó la prueba.

Se formaron grupos de 5 ratas de acuerdo con el número de experimentos requeridos. En la tabla 4 se muestran los grupos formados, las sustancias administradas y las dosis utilizadas.

Tabla 4 Grupos experimentales de efecto antihiper glucémico.

Grupo	Sustancia a administrar	Dosis
1. Control de vehículo	Agua.	---
2. Control hiperglucemia	Almidón de maíz	1g/Kg
3. Grupo de antihiper glucemia	Acarbosa + Almidón	0.5 mg/Kg + 1 g/Kg
4. Experimentación (extracto, fracción o compuesto)	Muestra a evaluar + Almidón	a) 0.5 mg/Kg + 1 g/Kg b) 2.5 mg/Kg + 1 g/Kg c) 5 mg/Kg + 1 g/Kg

Las ratas en todos los grupos se sometieron a un ayuno de 7 horas previo al desarrollo experimental. Se registró el peso de los especímenes en cada grupo y se midió la glucosa basal de cada una, tomando la muestra de la vena caudal y utilizando un glucómetro portátil. Se administró la sustancia a cada sujeto de prueba de acuerdo con la dosis indicada en la tabla 3, mediante vía oral haciendo uso de una cánula, se registró la hora de administración de cada rata; posteriormente se llevaron a cabo las mediciones de la glucosa del mismo modo que la medición basal, a tiempos de 15, 30, 45, 60 y 120 minutos después de la administración.

Con los datos obtenidos se realizó el análisis mediante gráficos de la cinética de la glucemia promedio, normalizada y porcentaje de incremento de glucemia con

respecto a la glucemia basal. Se realizó un análisis estadístico básico haciendo uso del software Microcal Origin, minitab y Excel. Finalmente, se compararon los resultados mediante una prueba estadística de Dunnet.

#### 2.2.6 Evaluación hipoglucémica, antihiperoglucémica y antidiabética de la fracción(es) y compuesto(s) obtenido(s).

Las evaluaciones de efecto hipoglucémico y antihiperoglucémico de los compuestos aislados se realizaron siguiendo los procedimientos anteriormente descritos en el apartado 2.2.5.1 y 2.2.5.2

##### 2.2.6.1 Evaluación del efecto antidiabético

Para llevar a cabo la evaluación del efecto antidiabético se realizó el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.2.5.1. Solo que los ratones utilizados fueron inducidos a diabetes administrando aloxano.

Para la inducción de la diabetes se administró una dosis de 200 mg/Kg de aloxano vía intraperitoneal (i.p.) a cada sujeto de prueba dos semanas previas a la evaluación.

Posterior a las dos semanas después de la inducción, se realiza la medición de la glucosa, y los especímenes con una glucosa mayor 200 mg/dL fueron seleccionados para llevar a cabo la evaluación.

### 2.2.7 Evaluación de actividad In vitro

Las evaluaciones de la actividad *in vitro* de alfa-glucosidasa y alfa-amilasa fueron realizados en el laboratorio de bioensayos del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, UANL. Se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Granados Guzmán (Granados, 2016) en su tesis doctoral.

#### 2.2.7.1 Evaluación de la actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa

Se pesó 1.0 mg de cada uno de los extractos y se disolvió en 500  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos (PBS, 100 mM, pH 6.8), para aquellos extractos que presentaron baja solubilidad fue necesario sonicar para lograr su completa disolución. Posteriormente, se mezclaron en pocillo de la microplaca: 33  $\mu$ L de extracto a evaluar, considerando concentraciones entre 20.6 a 660  $\mu$ g/mL (se

hicieron diluciones seriadas) y 17  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenol- $\alpha$ -D-glucopiranosido (p-NPG, 33.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), esta mezcla se incubó por 5 min a 37°C. Posteriormente se agregaron en pocillo de ensayo 17  $\mu\text{L}$  de enzima  $\alpha$ -glucosidasa (0.55 U/mL, en PBS) y se incubó por 17.5 minutos a 37°C. Finalmente se agregaron 133  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio 100 mM. Se midió la absorbancia (Abs) en un lector de placas a 405 nm. En cada experimento se incluyó un control del 100% de actividad enzimática, el cual, en lugar de muestra o estándar, se colocó en el pocillo, 33  $\mu\text{l}$  de PBS (100 mM pH 6.8). Así mismo se incluyeron en el ensayo un blanco de muestra y/o estándar, en donde el pocillo no contenía enzima; sólo 17  $\mu\text{L}$  de PBS (100 mM pH 6.8). Para calcular los resultados, el valor de absorbancia del blanco de muestra o estándar se restó a los valores de absorbancia de la muestra o estándar evaluado. El porcentaje de inhibición se calculó como se indica en la fórmula siguiente:

$$\%Inhibición = \frac{Abs_{blanco} - Abs_{prueba}}{Abs_{blanco}} \times 100$$

*Fórmula 1. Cálculo del porcentaje de inhibición enzimática.*

Como criterio de selección, se consideraron bioactivos todos aquellos extractos con una concentración inhibitoria del 50 por ciento ( $CI_{50}$ ) menor a 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En la tabla 5 se resume el desarrollo experimental para evaluar la actividad  $\alpha$ -glucosidasa. Para cada ensayo la determinación se realizó por triplicado.

Tabla 5 Resumen del desarrollo experimental de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa.

Pocillo microplaca	Blanco	Control negativo (100% actividad enzimática)	Blanco de muestra	Muestra
Amortiguador de Fosfatos (100 mM, pH 6.8)	50 $\mu$ L	33 $\mu$ L	17 $\mu$ L	--
Muestra Problema (diferentes concentraciones)	--	--	33 $\mu$ L	33 $\mu$ L
p-NPG (395 $\mu$ g/mL)	17 $\mu$ L	17 $\mu$ L	17 $\mu$ L	17 $\mu$ L
Incubar por 5 min. A 37 °C				
Enzima $\alpha$ -glucosidasa (0.55 U/mL)	--	17 $\mu$ L	--	17 $\mu$ L
Incubar por 17.5 min. A 37 °C				
Carbonato de sodio (100 mM)	133 $\mu$ L	133 $\mu$ L	133 $\mu$ L	133 $\mu$ L
Volumen final	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
Medir Abs a 405 nm				

#### 2.2.7.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa

Se pesó 1.0 mg de cada uno de extracto o compuesto y se disolvió en 1 mL de amortiguador de fosfatos (PBS-NaCl, 100 mM, pH 6.9), algunos de ellos se sonicaron para lograr su completa disolución. En un tubo de ensaye se mezclaron 100  $\mu$ L de extracto, según la concentración deseada a evaluar que fue entre 6-200  $\mu$ g/mL; cada ensayo fue realizado por triplicado. Se añadió al tubo con la muestra 100  $\mu$ L de la enzima  $\alpha$ -amilasa (1.5 U/mL en PBS-

NaCl, 100 mM, pH 6.9). Se incubaron por 7.2 min a 37°C. Se añadieron 100  $\mu$ L de almidón (0.38 mg/mL, en PBS-NaCl) se incubaron por 5.5 min a 37 °C. Se agregaron 200  $\mu$ L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA, 96 mM) y se colocó el tubo en un baño de agua hirviendo por 15.6 min. Se enfrió y se transfirieron 100  $\mu$ L a una placa de 96 pozos. Y se diluyeron con 100  $\mu$ L de agua destilada. Se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas Multiskan FC, Thermoscientific. En cada experimento se incluyó un control de 100% de actividad enzimática, en el que se colocaron 100  $\mu$ L de PBS-NaCl 100 mM pH 6.9, en lugar de muestra o estándar. Así mismo, se incluye un blanco de muestra o estándar, que no contiene enzima, contiene 100  $\mu$ L de amortiguador. El valor de absorbancia del blanco de muestra o estándar se resta a los valores de absorbancia de su muestra o estándar. El porcentaje de inhibición se calculó como se indica en la fórmula 1. Se consideraron como activos todos aquellos extractos con  $CI_{50}$  menores a 25  $\mu$ g/mL. En la tabla 6 se resume el desarrollo experimental realizado para evaluar la actividad  $\alpha$ -amilasa.

Tabla 6 Resumen del desarrollo experimental de la actividad  $\alpha$ -amilasa.

Tubo	Blanco	Control negativo (100% actividad enzimática)	Blanco de muestra	Muestra
Amortiguador de Fosfatos (100 mM, pH 6.9)	200 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	--
Muestra Problema (diferentes concentraciones)	--	--	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Enzima $\alpha$ -amilasa (1.5 U/mL)	--	100 $\mu$ L	--	100 $\mu$ L
Incubar por 7.2 min. A 37 °C				
Almidón (3.8 mg/mL)	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Incubar por 5.5 min. A 37 °C				
DNSA (96 mM)	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
Colocar en baño de agua hirviendo por 15.6 min				
Transferir 100 $\mu$ L a microplaca				
Agua	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Medir Abs a 540 nm				

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Obtención de extractos primarios

De la planta de *Cordia boissieri* colectada en García, Nuevo León, México en los alrededores del parque Xenpal (carretera a grutas de García, km 18) en la ubicación geográfica, latitud N 25° 50' 0.873 s, longitud O 100° 34' 35.158 s. Se obtuvieron 1.34 kg (peso seco) de hoja molida. A partir de las cuales se obtuvieron los extractos que se expresan en cantidades porcentuales de peso seco como se indican en la tabla 8. A partir de la planta colectada se obtuvieron de manera directa extractos metanol y acuoso. Así como también, extractos secuenciales de hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso. Los extractos fue-

ron evaluados para conocer los efectos hipoglucémicos y antihiperoglucémicos, con la finalidad de seleccionar el adecuado y continuar con el trabajo.

*Tabla 7. Extractos obtenidos a partir de las hojas de Cordia boissieri (porcentaje de peso seco)*

Porcentaje de extracto (peso seco)	
Hexano (secuencial)	5.86 %
Acetato de etilo (secuencial)	2.05 %
Metanol (secuencial)	14.11 %
Acuoso (secuencial)	11.4 %
Metanol (directo)	24.37%
Acuoso (directo)	20.14 %

## 3.2 Obtención de fracciones y compuestos

### 3.2.1. Solubilidad diferencial (lavados)

Se eligió el extracto metanólico secuencial para continuar con el trabajo experimental, por su fácil manejo en comparación con los otros extractos obtenidos y por experiencia en el grupo de trabajo. Mediante solubilidad diferencial a partir del extracto metanólico secuencial, utilizando como disolvente metanol, se logró obtener un precipitado blanco (PB-meOHsec) y una fracción sobrenadante (FS-meOH), figura 5.

El PB-meOHsec y la FS-meOH fueron analizados por cromatografía en capa fina (CCF) y por técnicas espectroscópicas.



*Figura 5. Extracto metanólico secuencial. Se observa la formación de las dos fases que luego fueron separadas y analizadas.*

### 3.2.2 Seguimiento de compuestos aislados por cromatografía en capa fina

El PB-meOH y la FS-meOH se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice, se utilizó una fase móvil (FM) butanol/ácido acético/agua, (BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O) 2:1:2.5 y se observó bajo la lámpara de UV a 254 nm. En el cromatofolio (figura 6 b) se observaron en el carril C (control de extracto metanólico secuencial) 3 bandas con R<sub>f</sub> de 0.5, 0.61 y 0.77. En el carril 1 de la FS-meOH se observaron 3 bandas con R<sub>f</sub> de 0.5, 0.61 y 0.77. Y en el carril 2 del PB-meOHsec no se observaron bandas, sólo se observó el punto de siembra, por lo cual consideramos que tenía pureza. En la tabla 8 se muestran los factores de retención observados en el cromatofolio de la figura 6.



Figura 6. Capa fina a) sin revelar y b) observada en lámpara UV a 254 nm, de las fracciones obtenidas por solubilidad a partir del extracto meOHsec

Tabla 8 Factores de retención de las bandas en la capa fina del extracto meOHsec. C: control de extracto metanólico secuencial, 1: PB-meOHsec, 2: FS-meOH

Carril	Factor de retención ( $R_f$ )
C	Banda 1: 0.5 Banda 2: 0.61 Banda 3: 0.77
1	Banda 1: 0.5 Banda 2: 0.61 Banda 3: 0.77
2	Punto de siembra: 0

### 3.2.3 Purificación de la fracción soluble (FS-meOH)

Se utilizó una solución de AcOEt/AcOH/meOH/H<sub>2</sub>O en proporción 2:0.5:0.5:1 v/v/v/v. Durante la disolución de la muestra FS-meOH, se observó que se formaban dos fases y en la figura 7 se muestra la separación obtenida. Se separaron ambas fases y se analizaron mediante CCF. En la figura 8 se observan las bandas de cada fracción. En el carril C del control de la FS-meOH se observan 3 bandas, en el carril Fs de la fracción superior se observan 3 bandas y en el carril Fi de la fracción inferior se observan otras bandas que al revelarse con luz UV parecen las mismas en las 3 muestras.



Figura 7. Separación de la FS-meOH, utilizando la FM AceOEt/AcOH/meOH/H<sub>2</sub>O en proporción 2:0.5:0.5:1 como disolvente

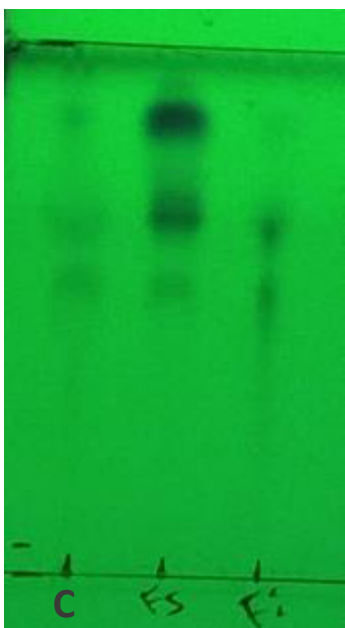
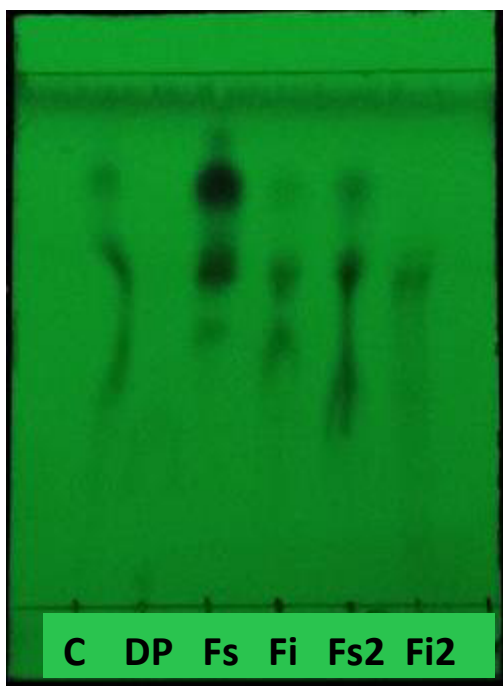


Figura 8. CCF observado a 254 nm. Separación de la FS-meOH, utilizando la FM AceOEt/AcOH/meOH/H<sub>2</sub>O en proporción 2:0.5:0.5:1 como disolvente

La fracción “Fi” fue utilizada y se añadió etanol al 90%, se formaron nuevamente dos fases, una superior, y una inferior con aspecto de emulsión. Ambas fases fueron separadas y denominadas la fracción superior como Fs<sub>2</sub>, y la fase inferior como Fi<sub>2</sub>. Se analizaron ambas fracciones mediante CCF y se observaron bajo luz UV a 254 nm. En la figura 9, los carriles corresponden como se describen a continuación: C = control de fracción FS-meOH, DP = D-

pinitol,  $F_s$  = fracción superior,  $F_i$  = fracción inferior,  $F_{s_2}$  = Fracción soluble y  $F_{i_2}$  = emulsión; se observa ligera diferencia en los patrones de las bandas, la fracción  $F_{i_2}$  presentó una única banda. En la figura 10 se muestra la CCF revelada con fosfomolibdico, donde se observó el compuesto D-pinitol con un  $R_f=0.35$ . En la fracción  $F_i$  y  $F_{s_2}$ , también se observó una banda con  $R_f$  similar al del D-pinitol,  $R_f=0.38$  y  $0.42$  respectivamente. Se continuó trabajando con la  $F_{s_2}$ .



*Figura 9. CCF observada a 254nm. Se observan las bandas de DP y fracciones  $F_i$  y  $F_{s_2}$ . Solo la  $F_{i_2}$ , presenta una única banda.*

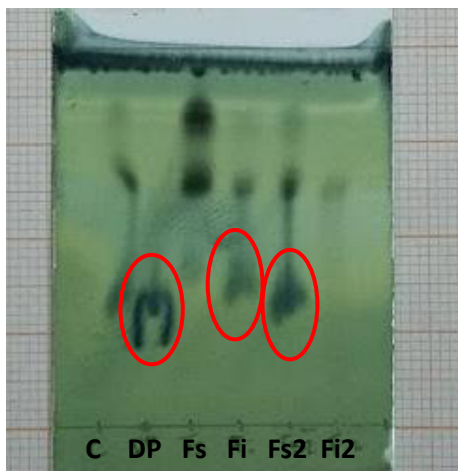


Figura 10. CCF revelado con ácido fosfomolibdico, donde se observa las bandas del carril DP, Fi y Fs<sub>2</sub> con R<sub>f</sub>=0.35, 0.38 y 0.42 respectivamente

Del compuesto D-pinitol y fracción Fs<sub>2</sub>, se realizó una CCF que fue revelada con alfa-naftol, un reactivo afín a compuestos de tipo carbohidrato. En la figura 11 se muestra la correspondiente CCF, donde se observan las bandas del estándar de D-pinitol con R<sub>f</sub> =0.33 y dos bandas para la Fs<sub>2</sub> con R<sub>f</sub> =0.38 y 0.68. El compuesto en la banda R<sub>f</sub> = 0.38 de la Fs<sub>2</sub> es un carbohidrato, posible análogo del D-pinitol. La Fs<sub>2</sub> que contenía este compuesto se evaporó en estufa de calentamiento a 37 °C y se obtuvieron cristales con un rendimiento del 1.48%. Se realizó un análisis por RMN de una porción de los cristales donde se observaron señales del quebrachitol junto con señales de algunos solventes utilizados (material no presentado).



Figura 11. CCF sílice revelado con alfa-naftol. Se observan las bandas con  $R_f=0.33$  del D-pinitol y  $R_f=0.38, 0.68$  de la  $FS_2$ .

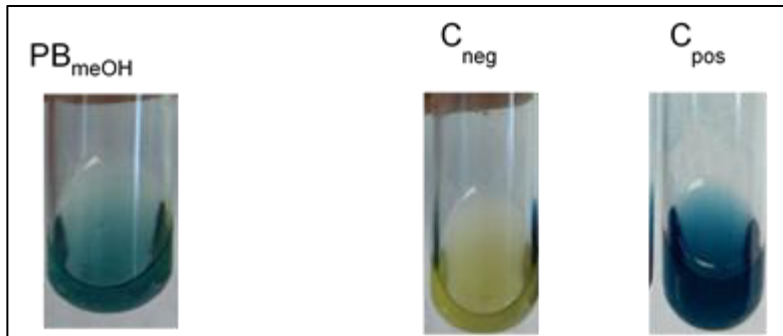
### 3.3 Análisis y elucidación estructural del precipitado blanco (PB-meOHsec)

#### 3.3.1 Determinación cualitativa de nitrógeno

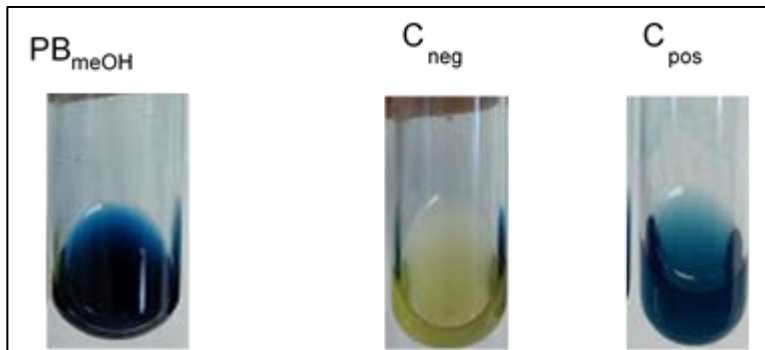
Se hizo una fusión con sodio al PB-meOHsec, posteriormente se realizó el ensayo de sulfato ferroso con la solución de la fusión con sodio. El resultado observado fue una coloración azul en el tubo de prueba (figura 12). Dicho resultado indicó que la prueba era positiva para nitrógeno.

Se realizó también, simultáneamente, el ensayo de azul de Prusia utilizando la solución de la fusión con sodio. El resultado observado en el tubo de prueba fue

una tonalidad azul, que indicó una respuesta positiva a la prueba de nitrógeno, como se muestra en la figura 13.



*Figura 12. Ensayo de sulfato ferroso, una coloración azul indica positiva la prueba para nitrógeno*



*Figura 13. Prueba de azul de Prusia. Una tonalidad azul indica que la prueba es positiva para nitrógeno.*

### 3.3.2 Análisis del precipitado blanco metanólico (PB-meOHsec) por espectroscopía de infrarrojo FT-IR-ATR.

Se llevó a cabo el análisis por FT-IR-ATR del PBmeOHsec. Se obtuvo el espectro de infrarrojo, el cual se muestra en la figura 14. En el espectro se observaron señales características de estiramientos correspondientes a grupos funcionales de amina y carbonilo, que están descritas en la tabla 9 e indicados en la figura 14.

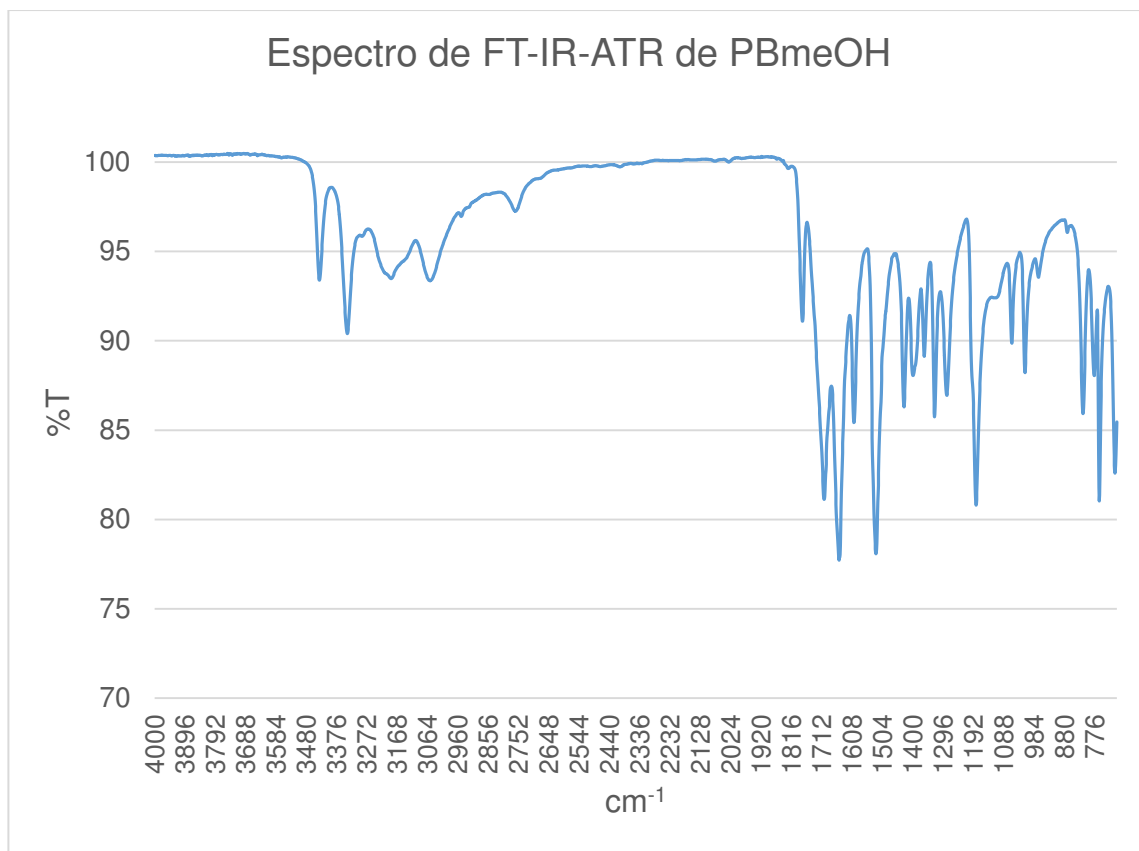


Figura 14. Espectro de infrarrojo del PBmeOH

Numero de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de señal	Grupo funcional
3438, 3341	Estiramiento (asimétrico)	N-H (amida o amina)
3055	Sobretono	O=C-N
1704, 1652	Estiramiento (asimétrico)	C=O
1527	Flexión (tijera)	C-N (O=C-N)

Tabla 9. Señales y grupos funcionales detectados en el espectro de FT-IR del PB-meOH.

### 3.3.3 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. Análisis del precipitado blanco metanólico (PB-meOHsec)

Se obtuvieron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del PB-meOHsec utilizando como disolvente DMSO- $d_6$ . En la figura 15 se muestra el espectro completo de  $^1\text{H}$ -RMN, en donde se observan 5 señales por encima de 5 ppm. Las otras dos señales observadas corresponden al disolvente y a una impureza (\*). En la figura 16 se muestra el espectro anterior con un acercamiento en las señales de desplazamiento químico entre 5 y 11 ppm. En la figura 17 se observa el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, el cual presenta cuatro señales en el intervalo de 50-180 ppm .

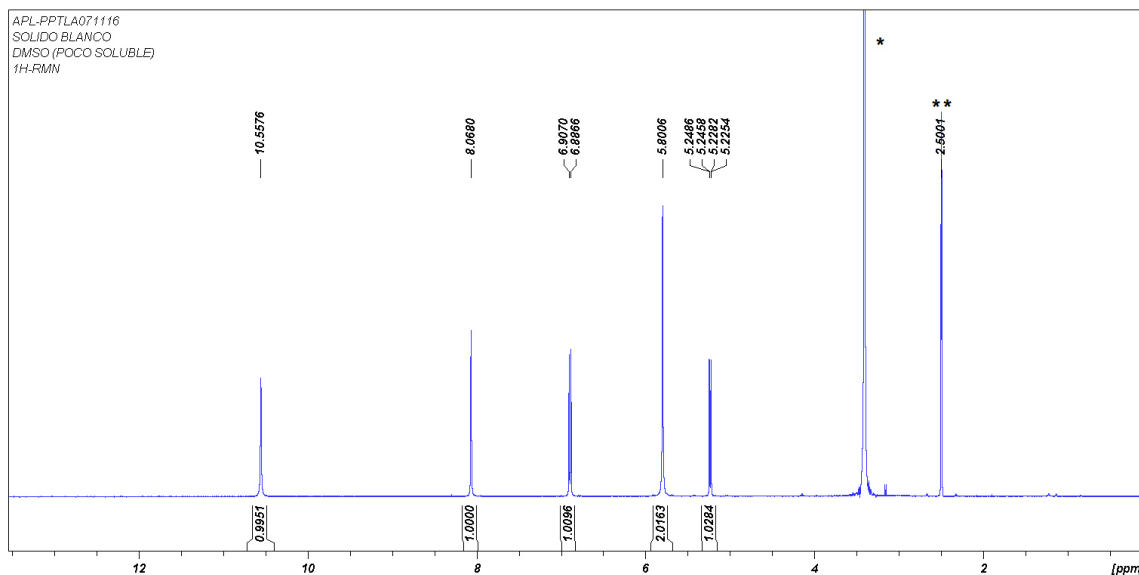


Figura 15 Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del PBmeOH en DMSO- $d_6$  (\*HOD, \*\* DMSO- $d_5$ ).

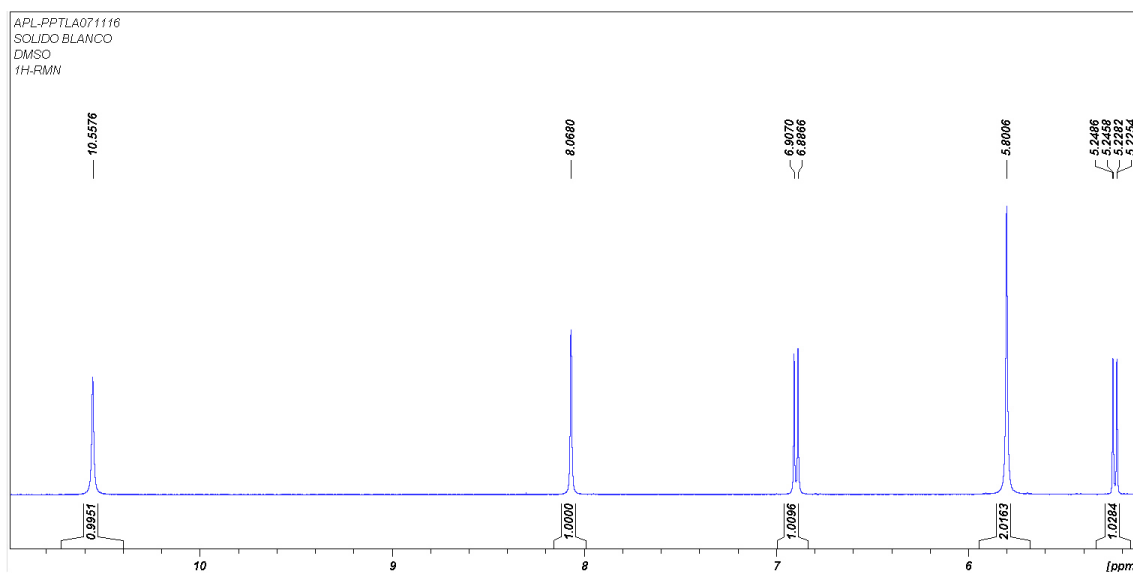


Figura 16 Ampliación del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de PBmeOH, observando señales con desplazamientos químicos entre 5-11 ppm.

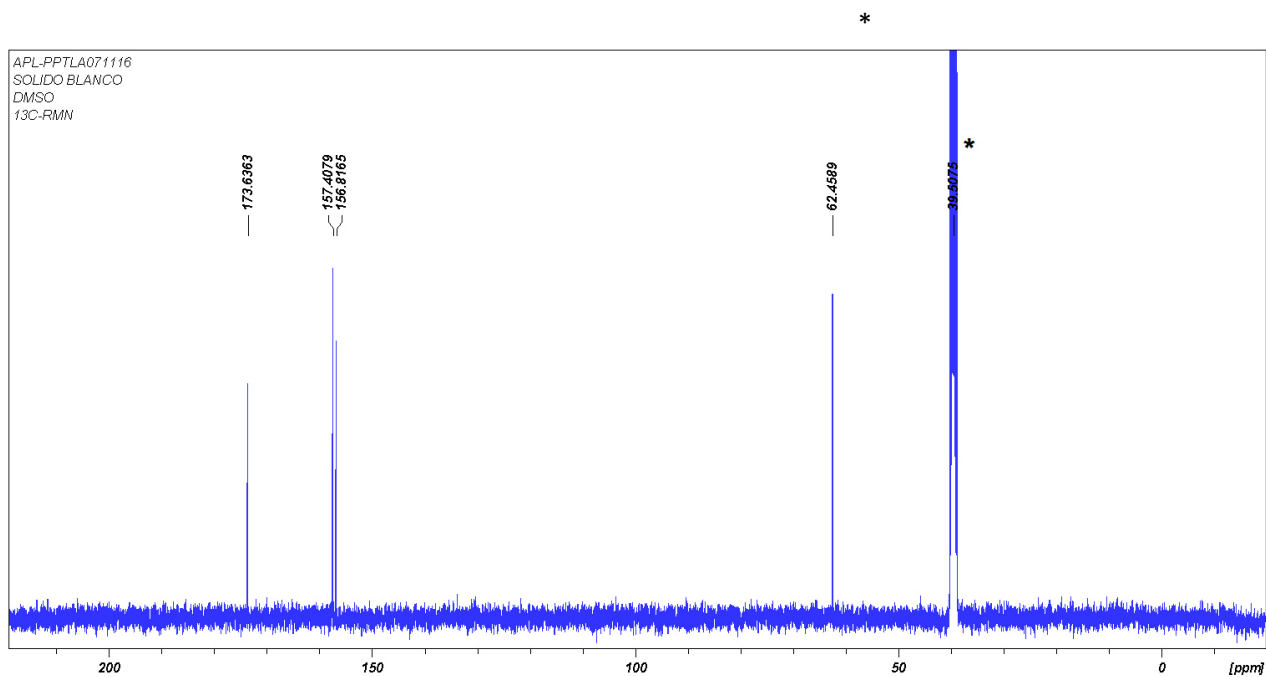


Figura 17 Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del PBmeOH, en DMSO- $d_6^*$ .

Posteriormente, se realizó otro experimento de  $^1\text{H}$ -RMN donde se cambió el disolvente DMSO-d6 por agua deuterada. En la figura 18 se observara que 4 señales con desplazamientos mayores a 5 ppm desaparecieron, esto es evidente al compararlo con el espectro  $^1\text{H}$ -RMN en DMSO-d6 (figura 16). Este efecto indicó la presencia de protones intercambiables como los de grupos amino o hidroxilo.

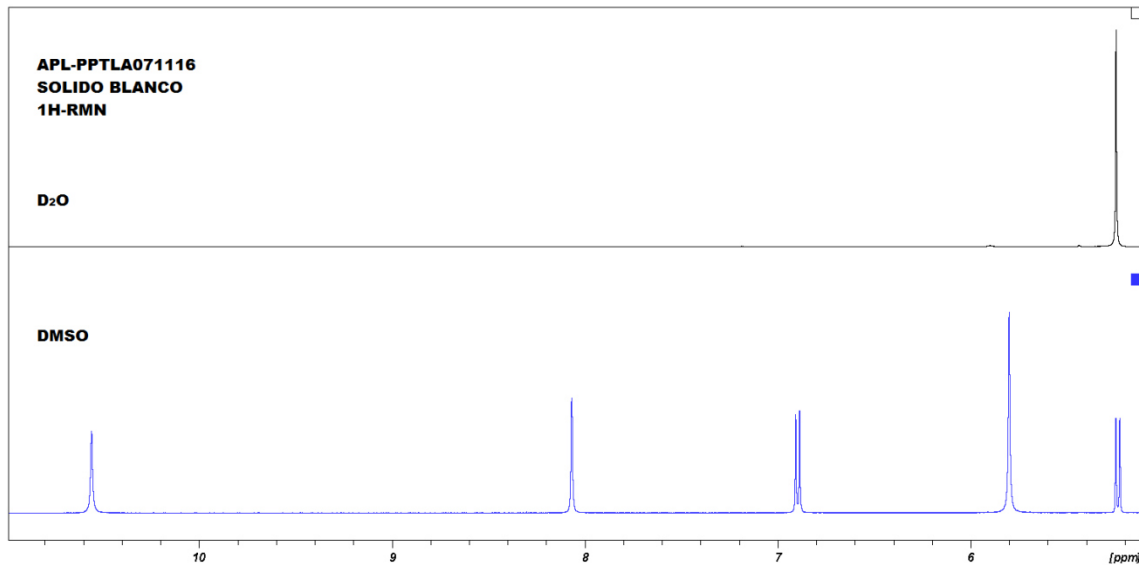


Figura 18. Espectro de experimento de  $^1\text{H}$ -RMN de PBmeOH en  $\text{D}_2\text{O}$  en lugar de DMSO-d6

Se realizaron experimentos de DEPT90 y DEPT135 de PBmeOHsec. En la figura 19 se observan las señales con desplazamiento químico entre 155-185 ppm, que corresponden a carbonos cuaternarios y la señal cercana a 60 ppm corresponde a un carbono de grupo metino (CH).

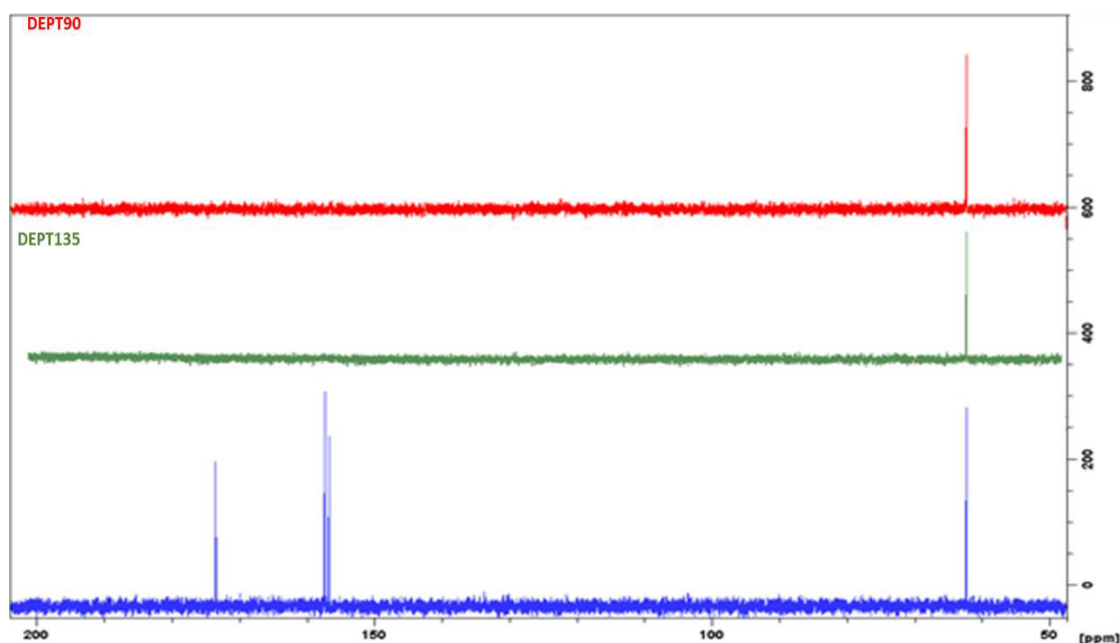


Figura 19. Experimentos DEPT realizados al PBmeOHse

Los experimentos de doble dimensión (2D) utilizados para la identificación del PBmeOHsec, HSQC, COSY y HMBC se encuentran en los apéndices B, C y D respectivamente.

A partir de los datos espectroscópicos derivados de los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y de doble dimensión se identificó al PB-meOHsec como alantoína (Figura 20). En la tabla 10 se resume el análisis de los espectros obtenidos experimentalmente, así como datos reportados en la literatura que concuerdan con los obtenidos y la estructura del compuesto.

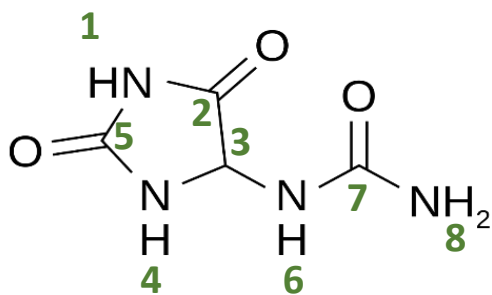


Figura 20. Estructura del compuesto alantoína, elucidado a partir del análisis espectroscópico del PB-meOHsec

Tabla 10. Datos espectroscópicos del compuesto Alantoína, obtenido del PB-meOHsec..

H	<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, DMSO-d6)			<sup>1</sup> H-RMN (300 MHz, DMSO-d6)	<sup>13</sup> C-RMN (100 MHz, DMSO-d6)		<sup>13</sup> C-RMN (300 MHz, DMSO-d6)
	Integración	Experimental δ ppm (m)	J <sub>HZ</sub>	Literatura* δ ppm (J <sub>HZ</sub> )	C	Experimental δ ppm (tipo)	Literatura* δ ppm
1	1	10.55 (s)	----	10.52	2	174 (cuaternario)	173.9
3	1	5.24 (d)	8.4 1.2	5.24	3	62.5 (metino)	62.8
4	1	8.06 (s)		8.04	5	156 (cuaternario)	157.1
6	1	6.9 (dd)	8.4	6.88	7	158 (cuaternario)	157.7
8	2	5.8 (s)	----	5.77	----	----	----

\*Patching, S. (2017)

### 3.3.4 Identificación de alantoína por MS-ESI en el extracto metanólico secuencial

Inicialmente, por parte de la identificación global de la muestra, se obtuvo un perfil espectrométrico del extracto metanólico secuencial mediante MS-ESI. A partir de estos datos fue posible identificar iones que correlaciones con los datos esperados para la alantoína. En la figura 21, se muestra el espectro de espectrometría de masas en la región comprendida entre 150-1500 m/z). En esta ventana espectral se identificó un ion molecular negativo de 157.08 m/z (figura 22, misma imagen que figura 21) que podría tratarse de alantoína, ya que corresponde con el peso molecular (158.117 g/mol).

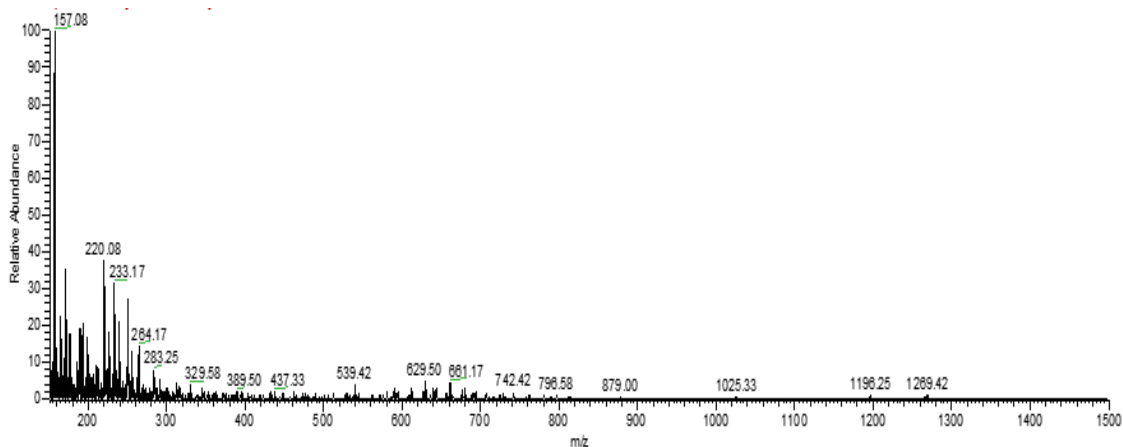


Figura 21. Espectro de masas (150-1500 m/z) de perfil inicial del extracto metanólico secuencial por obtenido por ESI-MS.

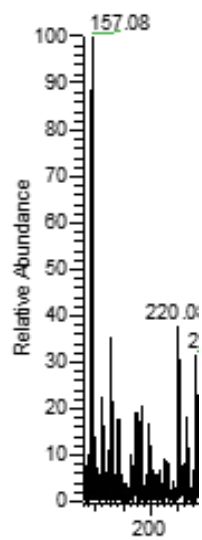


Figura 22. Espectro de masas (150-1500 m/z) de perfil inicial del extracto metanólico secuencial por MS-ESI

### 3.4 Análisis y elucidación estructural de la fracción soluble en metanol (FS-meOH)

#### 3.4.1 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Mediante RMN se realizó el análisis de la FS-meOH. En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en la figura 23, se observan diversas señales que corresponden con un compuesto mayoritario y también señales atribuibles a algunas impurezas. Se describen a continuación las señales correspondientes al compuesto principal. Se observan señales singulete, triplete y multiplete en la zona de 3 a 4.3 ppm que pueden deberse a grupos metinos y metilo. En esta región de desplazamiento químico es usualmente la zona en donde se observan las señales de los carbohidratos. Por otra parte, el análisis comparativo de los espectros de varias fracciones equivalentes permitió establecer que la señal a 1.25 ppm corresponde con una impureza que coeluye con el compuesto mayoritario. Se determinó que la señal en 1.25 no corresponde al compuesto mayoritario debido a que la integración de la señal no es proporcional en los distintos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN que fueron obtenidos. Esta relación cambiante de áreas con respecto a las señales en la región de los carbohidratos sugiere que se trata de un compuesto independiente. Por otra parte, en el espectro  $^{13}\text{C}$ -

RMN de la figura 24, se observan 7 señales de mayor intensidad en la zona de 56 a 80 ppm, que corresponde al compuesto de mayor abundancia en la muestra.

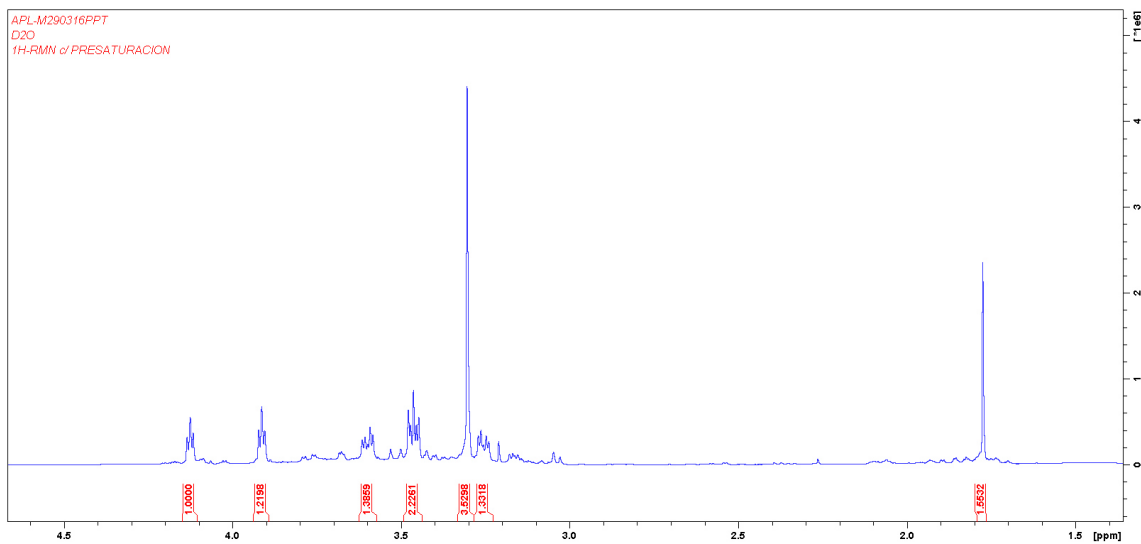


Figura 23. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN de FS-meOH en disolvente  $\text{D}_2\text{O}$

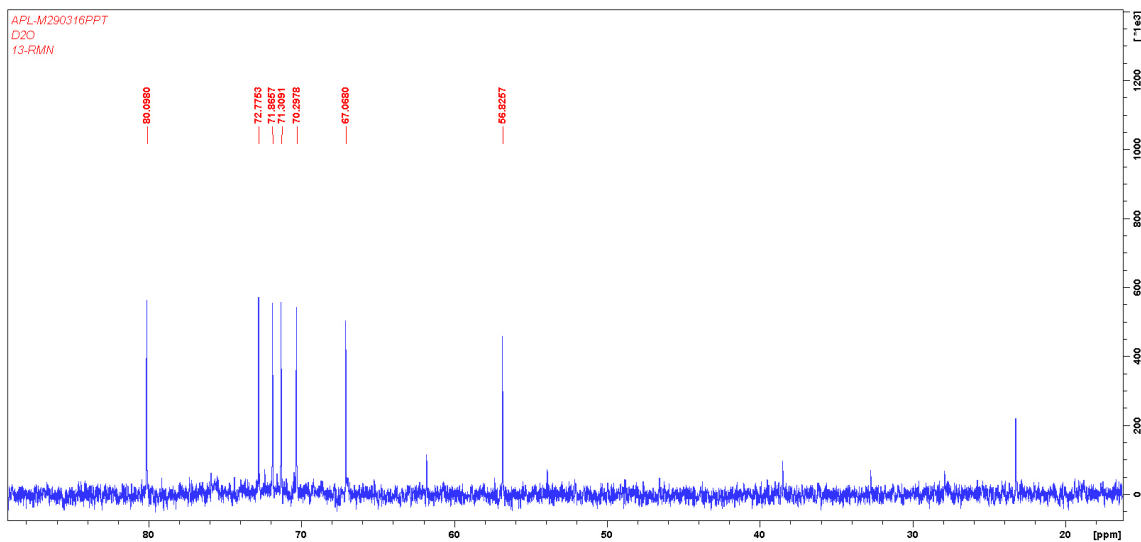


Figura 24. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de FS-meOH en disolvente  $\text{D}_2\text{O}$

También se realizó un experimento de doble dimensión, donde se obtuvo el espectro HSQC, apéndice E, con la finalidad de establecer la correlación de entre los núcleos de hidrógeno y carbono a un enlace de distancia. El análisis de este espectro permitió confirmar la presencia de un carbohidrato en la muestra.

Con los datos de los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN se realizó una búsqueda en la base de datos “Jeol Natural Products” (<http://www.j-resonance.com/en/nmrdb/>). Por comparación de desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento, se identificó que el compuesto mayoritario en la FS-meOH es quebrachitol (Figura 32). En la Tabla 14 se resume el análisis de los espectros obtenidos experimentalmente, así como datos reportados en la literatura que concuerdan con los obtenidos y la estructura del compuesto.

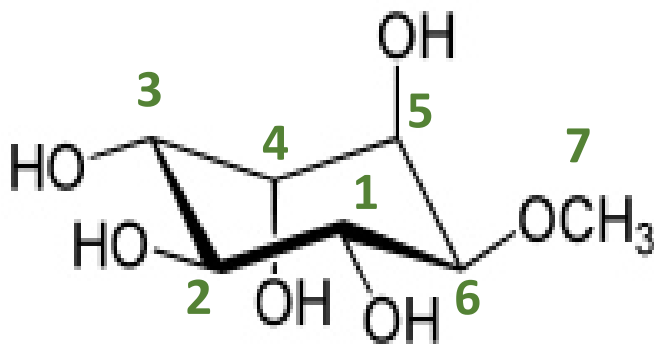


Figura 25. Estructura del compuesto quebrachitol, identificado a partir de la FS-meOH

Tabla 11. Datos espectroscópicos del compuesto quebrachitol obtenido de la FS-meOH

H	<sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, D <sub>2</sub> O)		<sup>1</sup> H-RMN (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> )		C	<sup>13</sup> C-RMN (100 MHz, D <sub>2</sub> O)		<sup>13</sup> C-RMN (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	
	Experimental δ ppm (m)	J <sub>Hz</sub>	Literatura δ ppm (m)	J <sub>Hz</sub>		Experimental δ ppm (tipo)	Literatura δ ppm		
1	3.58 (c)	9.5	3.6 (t)	9.5	1	72.5 (CH)	73.1		
2	3.51 (c)	9.5	3.56 (t)	9.5	2	72.1 (CH)	74.6		
3	3.67 (c)	9.5	3.68 (dd)	9.5	3	70.3 (CH)	72.3		
				3.6					
4	3.95 (t)	3.6	3.94 (t)	3.6	4	70.18 (CH)	73.2		
5	4.13 (t)	3.5	4.12 (t)	3.5	5	66.5 (CH)	69.2		
6	3.4 (m)	9.5, 3.6	3.33(dd)	9.5	6	80 (CH)	82.4		
				3.6					
7	3.45 (s)	--	3.45 (s)	--	7	56.5 (CH <sub>3</sub> )	57.8		

\*Mahmoud, A. (2006)

### 3.4.2 Identificación de quebrachitol por MS-ESI en el extracto metanólico secuencial

Mediante el análisis experimental por MS-ESI se obtuvo un perfil inicial de masas del extracto metanólico secuencial. En la Figura 26 se muestra el barrido completo en el intervalo de 50-1500 m/z, en el cual se logró identificar un ion molecular negativo de 193 ( $M^-$ ). En la Figura 27 se observa el acercamiento al ion molecular el cual podría deberse al quebrachitol, ya que corresponde con el peso molecular de este compuesto (194.183 g/mol).

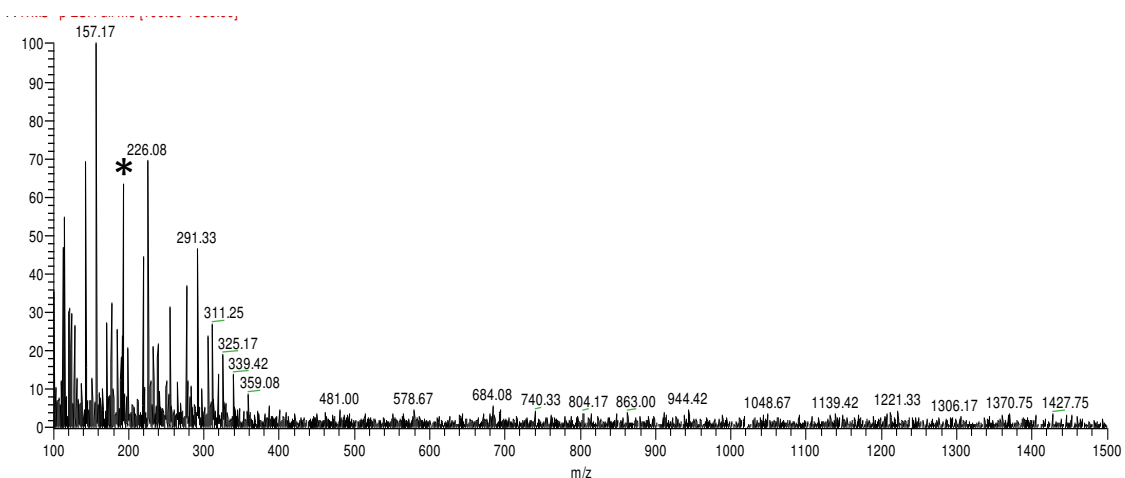


Figura 26. Espectro completo de MS-ESI del perfil inicial del extracto metanólico secuencial

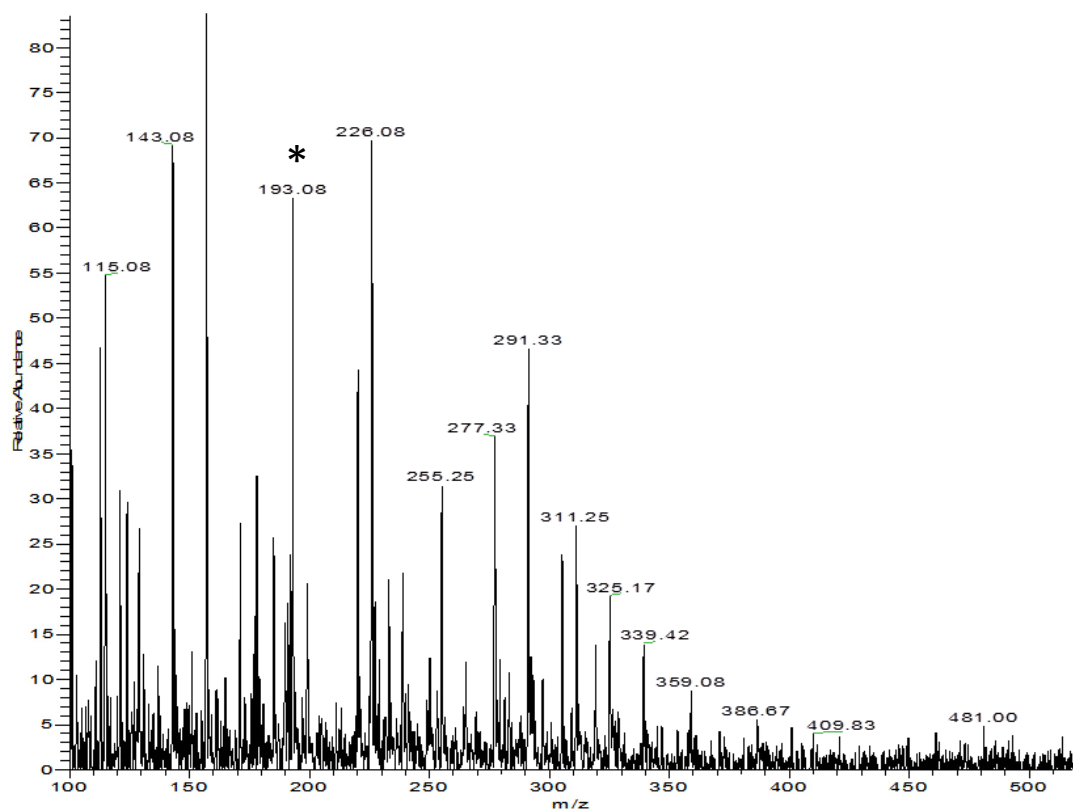


Figura 27. Espectro aumentado del perfil inicial de quebrachitol donde se observa el ion 193 m/z

En el mismo espectro de masas se lograron identificar iones negativos ( $M^-$ ) que concuerdan con fragmentos de pérdidas lógicas para el compuesto quebrachitol. En la Tabla 12 se resumen los fragmentos obtenidos experimentalmente en modo negativo y datos de literatura encontrados en modo positivo ( $M^+$ ). Se observan las señales de estos fragmentos en la Figura 28.

Tabla 12. Fragmentos de pérdidas lógicas que concuerdan con los de quebrachitol

Ion $M^-$ experimental	Ion $M^+$ literatura*
143 m/z	144 m/z
115 m/z	116 m/z
101 m/z	102 m/z

\* Annuziata, M., (1976)

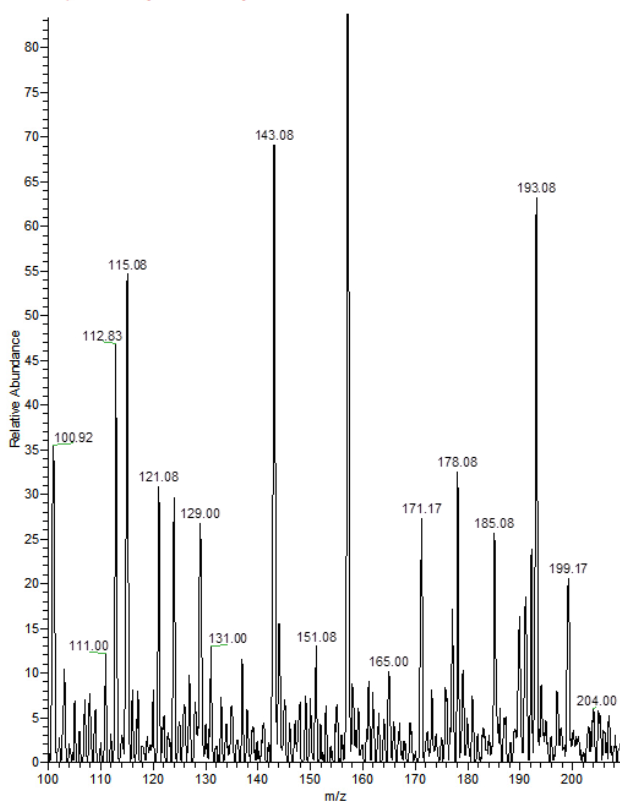


Figura 28. Fragmentos 143, 115 y 101 m/z que concuerdan con pérdidas lógicas esperadas para quebrachitol

### 3.5 Evaluación del efecto hipoglucémico en extractos de *Cordia boissieri*

En la Figura 29 se muestra la cinética de la hipoglucemia durante la evaluación de los extractos: metanólico directo, hexano secuencial, acetato de etilo secuencial, metanol secuencial y acuoso secuencial. Los valores de glucemia se normalizaron con respecto a la glucemia basal de cada grupo experimental. En esta figura se observa que el efecto hipoglucémico de la insulina se presentó en la hora 1, de 6 que fueron evaluadas. También se observa que 3 de los extractos evaluados tienen un efecto hipoglucémico que se presentó en las horas 5 y 6, al final del periodo evaluado. Para apreciar mejor el efecto hipoglucémico máximo de cada uno de los tratamientos durante las 6 horas que duró el experimento, los resultados se graficaron como porcentaje de reducción de la glucemia (Figura 30), tomando en cuenta el efecto hipoglucémico, independientemente de la hora presentado. Podemos observar que los extractos polares, metanólico secuencial, acuoso secuencial y metanólico directo, redujeron la glucemia en aproximadamente 49%, 45% y 32% respectivamente, los cuales no son significativamente diferentes al 50% registrado para la insulina.

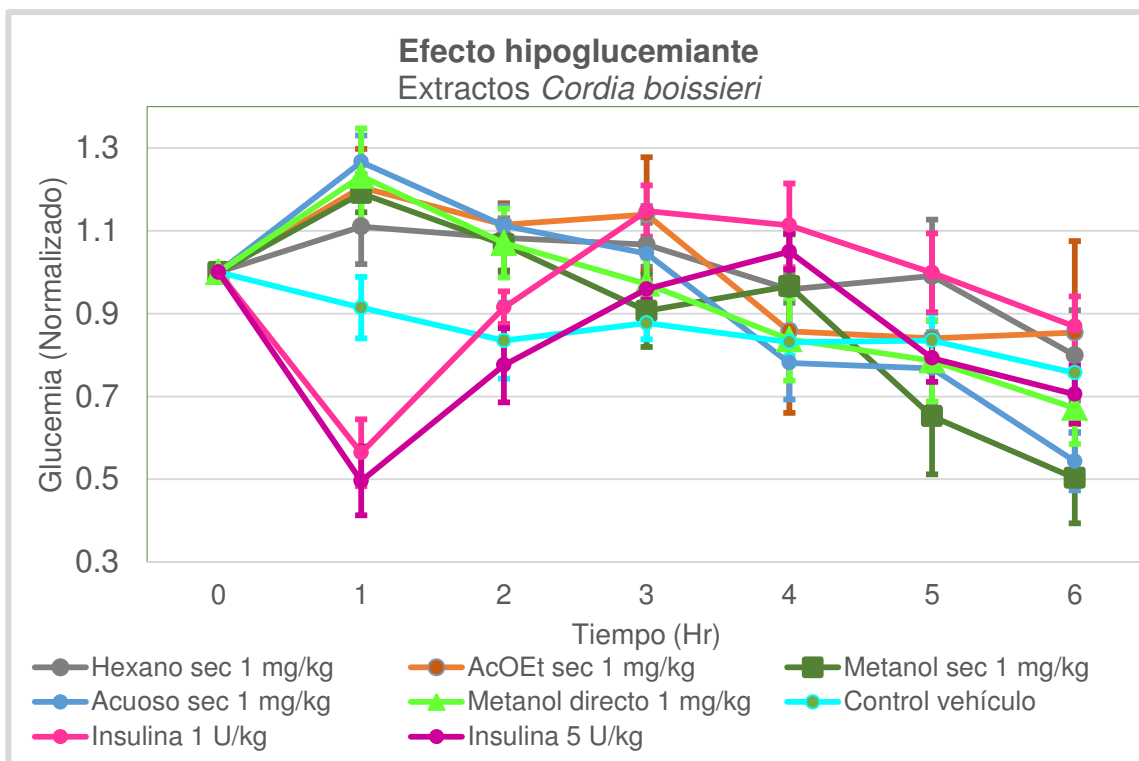


Figura 29. Efecto hipoglucémico de extractos de *Cordia boissieri* en ratones CD1 adulto. Dosis de 1 mg/kg administración intraperitoneal. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES).

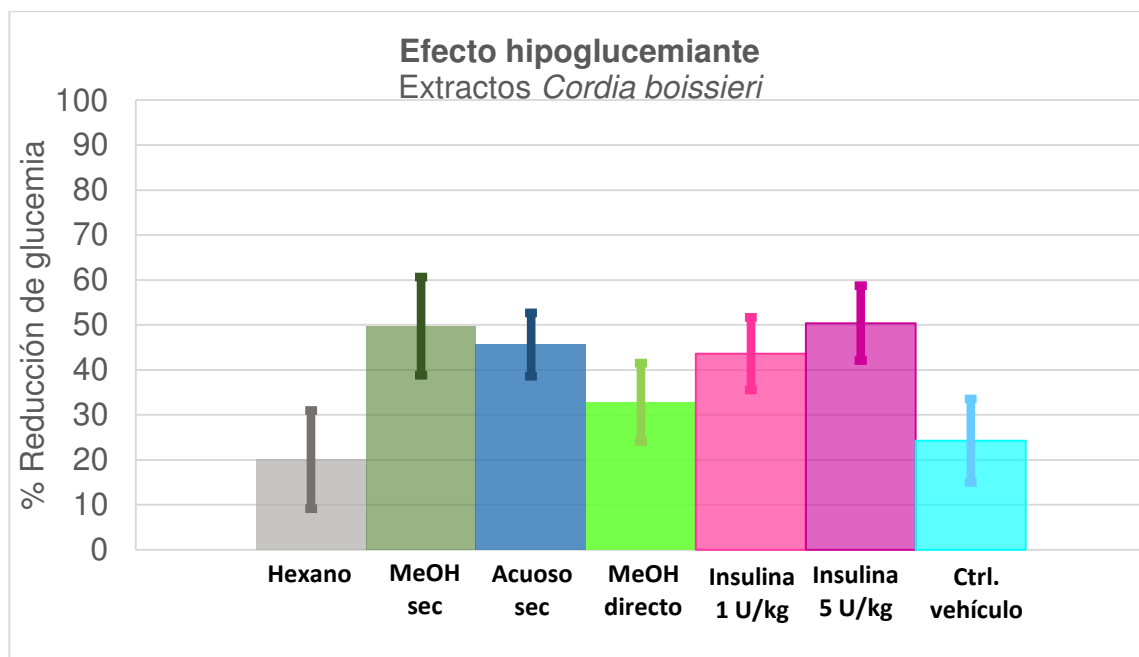


Figura 30. Porcentaje de reducción de glucemia del efecto hipoglucémico de la insulina y los extractos de *Cordia boissieri* en ratones CD1 adulto. Dosis de los extractos: 1 mg/kg, administración intraperitoneal. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES).

### 3.6 Evaluación del efecto antihiper glucémico de extractos a partir de *Cordia boissieri*

Los extractos obtenidos a partir de *Cordia boissieri* también fueron evaluados para medir el efecto antihiper glucémico, después de co-administrarse con almidón en ratas Wistar, normoglu cémicas, por vía oral. La disminución de la glu cemia después de la administración del almidón y los extractos, podría indicar inhibición de la digestión del almidón o inhibición del transporte intestinal de glu cosa. En la Figura 31 se muestra la cinética hiper glucémica normalizada (respecto a la glu cemia basal) para la dosis de 0.5 mg/kg de cada extracto. En esta evaluación, la búsqueda del efecto antihiper glucémico se centró en el tiempo de 15 minutos, tiempo en el cual hay un mayor incremento de la glu cemia tras la administración de la carga de carbohidratos (control de almidón). Para visualizar mejor el efecto antihiper glucémico observado de los extractos evaluados en las dosis de 0.5 mg/kg, se graficó en un esquema de barras el porcentaje de incremento de la glu cemia observado en el minuto 15 (Figura 32). En las Figuras 31 y 32 se observa que el extracto acuoso secuencial y metanólico secuencial registraron un incremento de glu cemia menor al del almidón, el porcentaje de incremento de glu cemia fue del 9% y 11% respectivamente, y es estadísticamente diferente al incremento que se observa con el control de carbohidratos (almidón). No se encontró diferencia significativa respecto al incremento de glu cemia observado con el control de

acarbosea (inhibidor de la digestión del almidón), esto a la misma dosis de 0.5 mg/kg. Los extractos restantes presentaron un incremento igual o mayor del observado por el control del almidón. Con el fin de determinar el posible efecto dosis-dependiente, se evaluaron los extractos metanólico secuencial y metanólico directo en dosis de 2.5 y 5 mg/kg. Las cinéticas hiperglucémicas se muestran en las Figuras 33 y 34. Para la dosis de 2.5 mg/kg, los dos extractos registraron una glucemia menor a la del control de almidón, diferente significativamente, ambos extractos tuvieron una glucemia similar a la del control de acarbosea (sin diferencia estadísticamente significativa). Sin embargo, en la dosis de 5 mg/kg, ambos extractos no tuvieron efecto antihiperglucémico. Al minuto 15, la glucemia fue igual a la del control de almidón, siendo significativamente no diferente, y mayor a la del control de acarbosea (con diferencia significativa).

En el apéndice A, se muestra un esquema de barras que indica el incremento de glucemia a los 15 minutos, del extracto metanólico secuencial en las tres dosis evaluadas de 0.5, 2.5 y 5 mg/kg.

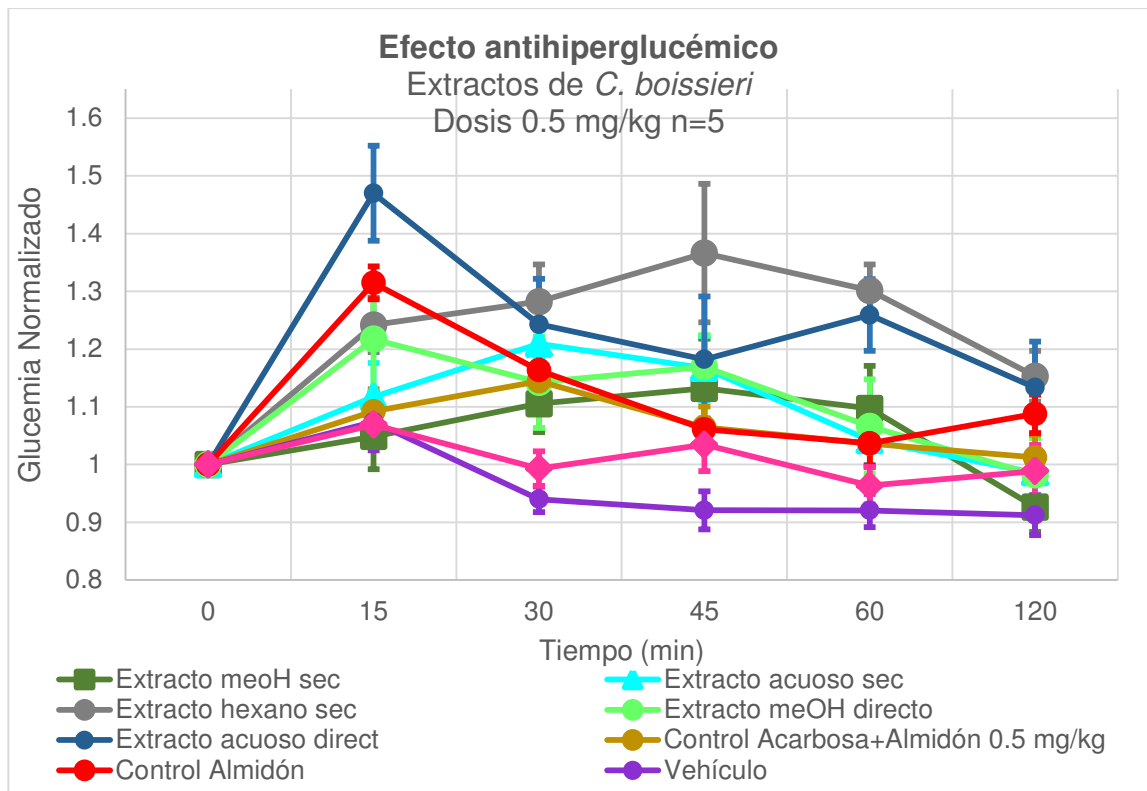


Figura 31. Efecto antihiper glucémico de extractos de *Cordia boissieri* en ratas Wistar adulto. Dosis de 0.5 mg/kg administración oral. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES)

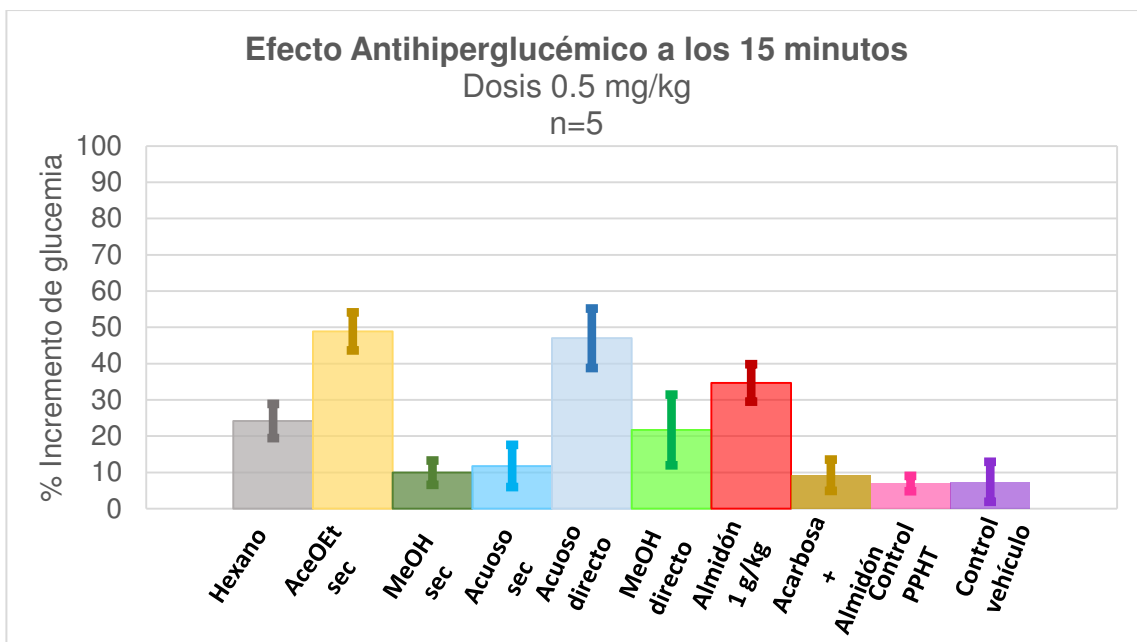


Figura 32. Porcentaje de incremento de glucemia del efecto antihiper glucémico de extractos de *Cordia boissieri* en ratas Wistar adulto. Dosis de 0.5 mg/kg administración oral. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES).

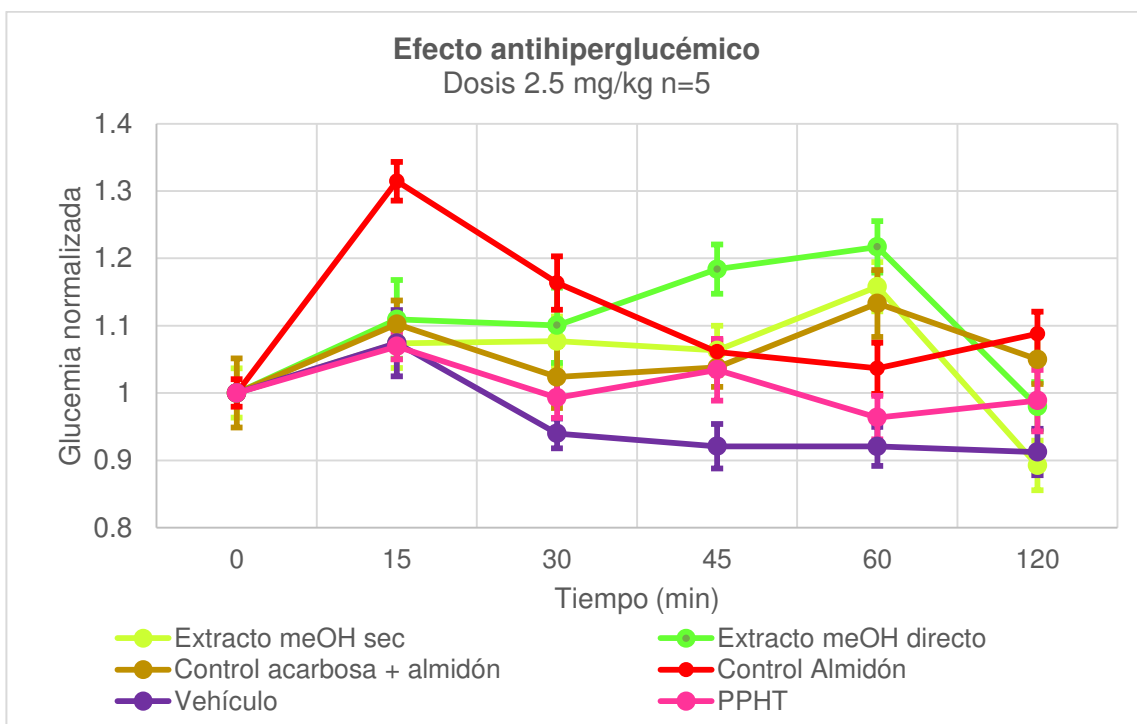
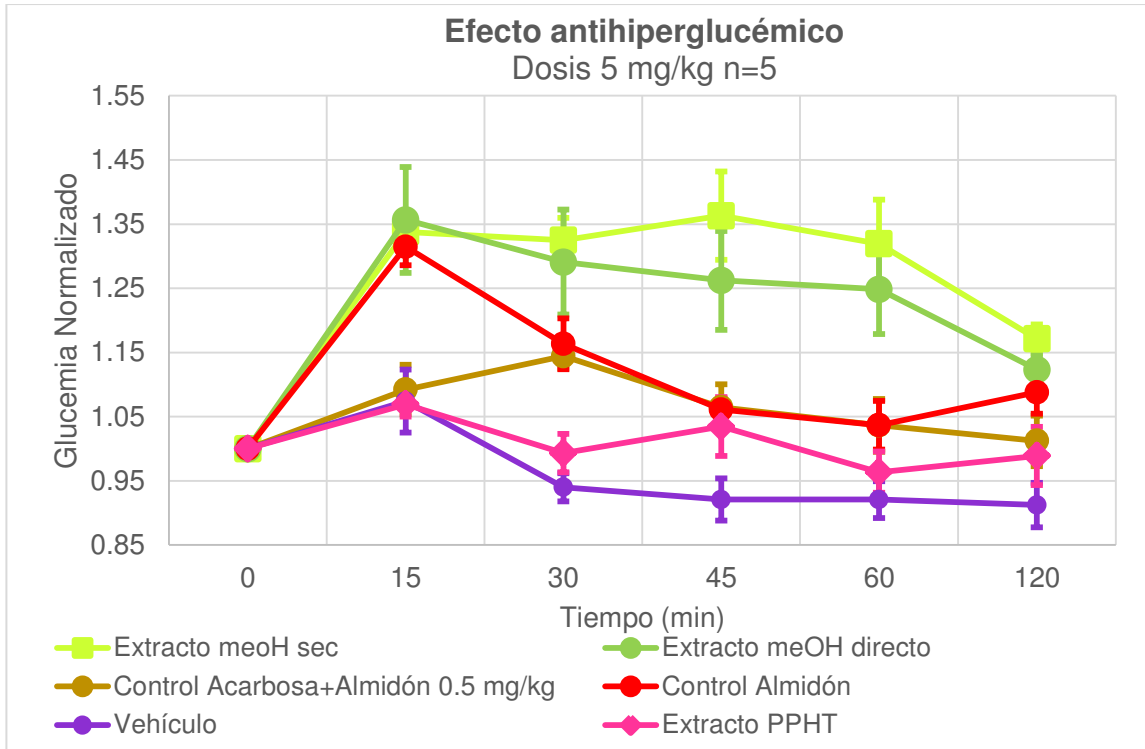


Figura 33. Efecto antihiper glucémico de extractos metanólico directo y secuencial de *Cordia boissieri* en ratas Wistar adulto. Dosis de 2.5 mg/kg administración oral. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES)



*Figura 34. Efecto antihiper glucémico de extractos metanólico directo y secuencial de Cordia boissieri en ratas Wistar adulto. Dosis de 5 mg/kg administración oral. n=5, media ± error estándar (ES)*

### 3.7 Evaluación hipoglucémica, antihiperoglucémica y antidiabética de la alantoína y quebrachitol

#### 3.7.1 Evaluación del efecto hipoglucémico de alantoína y quebrachitol

En la Figura 35 se muestra la cinética de la glucemia normalizada respecto al nivel basal. El efecto hipoglucémico en ratones normoglucémicos se determinó en un periodo de 6 horas para alantoína, en dosis de 1 y 5 mg/kg. Se observa que en el lapso de tiempo evaluado, el compuesto presenta su efecto hipoglucémico máximo en la hora 6, mientras que el control farmacológico de insulina presenta su efecto hipoglucémico en la primera hora. En la Figura 36 se muestra el porcentaje de reducción de glucemia, tomando en cuenta sólo el punto con mayor efecto en el lapso evaluado. La alantoína en las dosis evaluadas de 1 y 5 mg/kg registró una reducción de glucemia del 14% y 10 % respectivamente mientras que la insulina logró reducir la glucemia hasta en un 50%. La alantoína mostró un efecto hipoglucémico menor que el control farmacológico, estadísticamente presentan diferencia significativa, por lo tanto la alantoína no causa efecto hipoglucemiante en el lapso de tiempo evaluado.

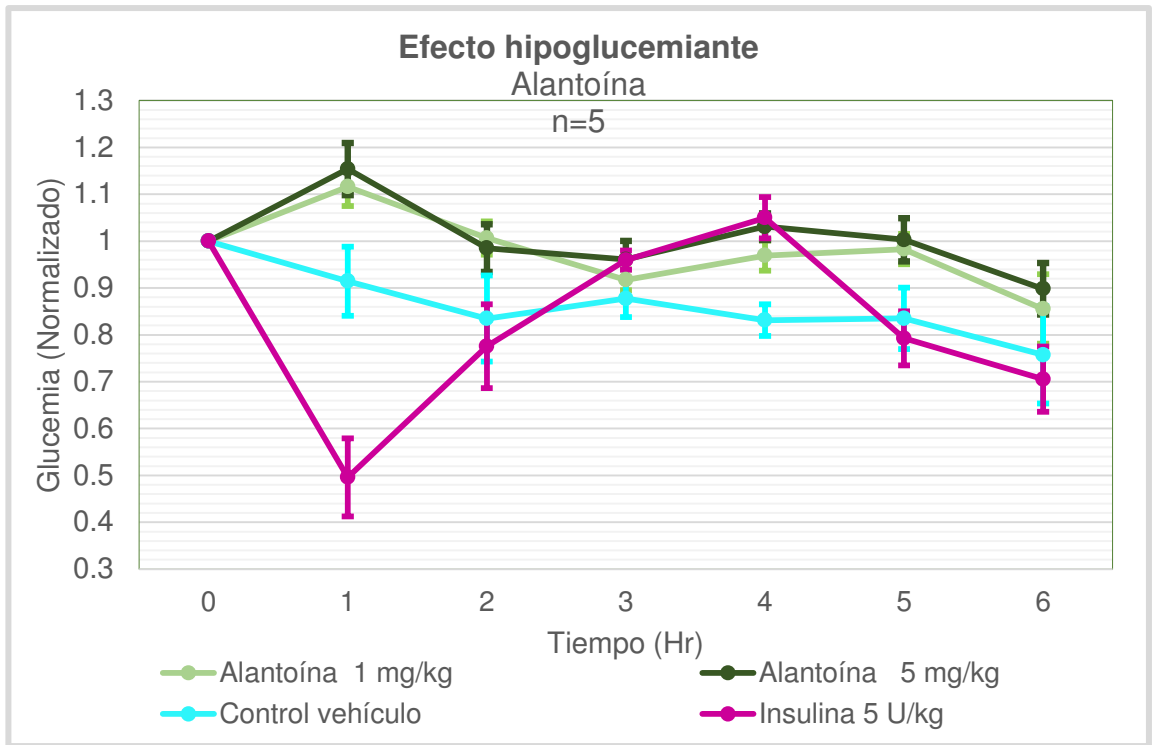


Figura 35. Efecto hipoglucémico del PB-meOHsec en ratones CD1 adulto. Dosis de 1 y 5 mg/kg administración intraperitoneal. n=5, media ± error estándar (ES)

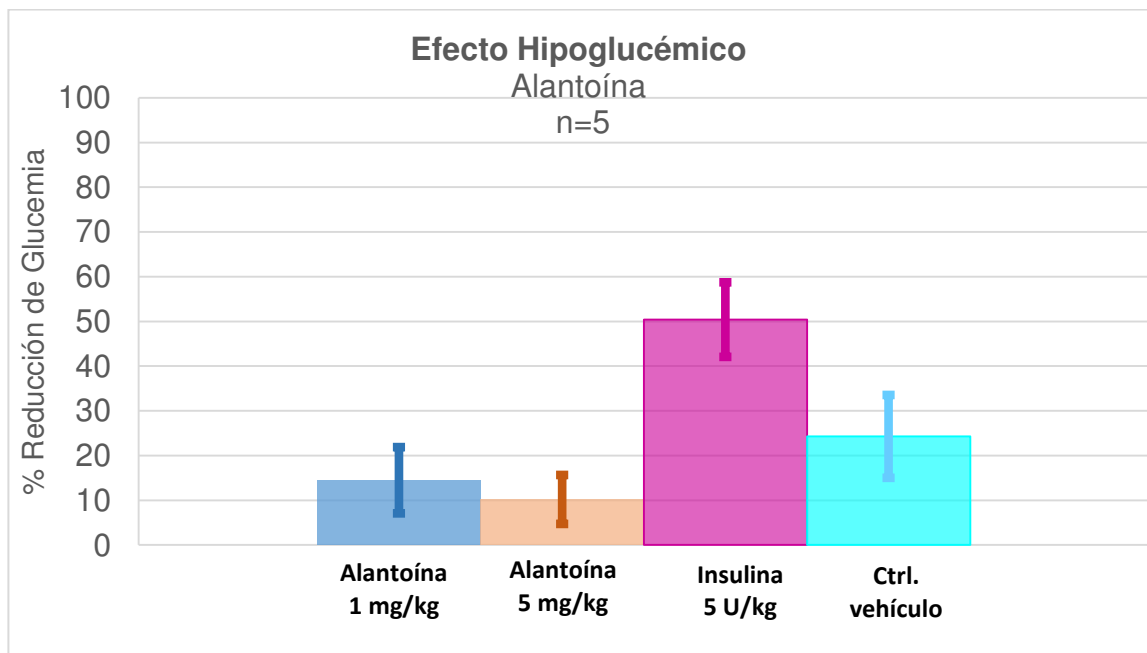


Figura 36. Porcentaje de reducción de glucemia del efecto hipoglucémico de alantoína en ratones CD1 adulto. Dosis de 1 y 5 mg/kg administración intraperitoneal. n=5, media ± error estándar (ES).

En la Figura 37 se muestran los resultados de la evaluación hipoglucémica el quebrachitol. En la gráfica se observa que en las dosis de 1 y 5 mg/kg, la glucemia muestra una tendencia al descenso respecto a la glucemia basal, llegando registrar su mayor efecto reductor en la hora 6. En la Figura 38 se muestra el porcentaje de reducción de glucemia, para el que se tomó en cuenta el punto con mayor efecto en el lapso evaluado. Se observa que el porcentaje de reducción de glucemia de los cristales de  $FS_2$  para la dosis de 1 y 5 mg/kg fue de 38% y 28 % respectivamente, mientras que la insulina presentó una reducción de hasta 50%. La disminución observada con la dosis de 1 mg/kg de los cristales de  $FS_2$ , comparada con el efecto de la insulina, estadísticamente resultó sin diferencia significativa, por lo que los cristales de  $FS_2$  (en la dosis de 1 mg/kg) tienen un efecto hipoglucémico semejante a la insulina, aunque su cinética es muy diferente.

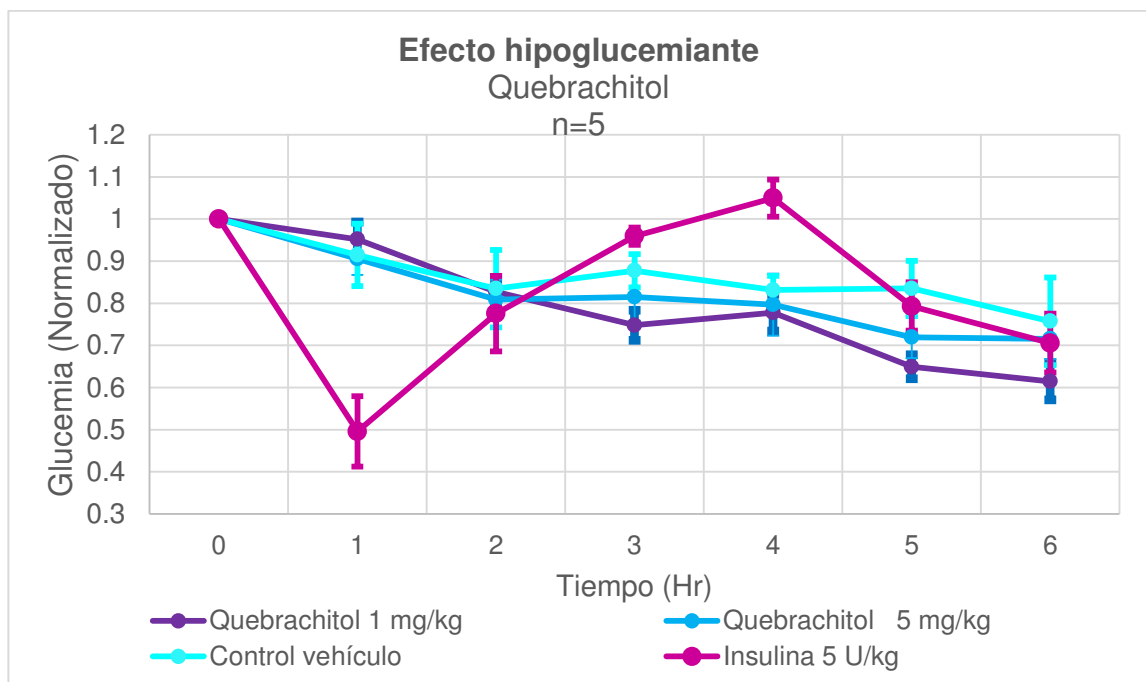


Figura 37 Efecto hipoglucémico de  $FS$ -meOH en ratones CD1 adulto. Dosis de 1 y 5 mg/kg administración intraperitoneal.  $n=5$ , media  $\pm$  error estándar (ES)

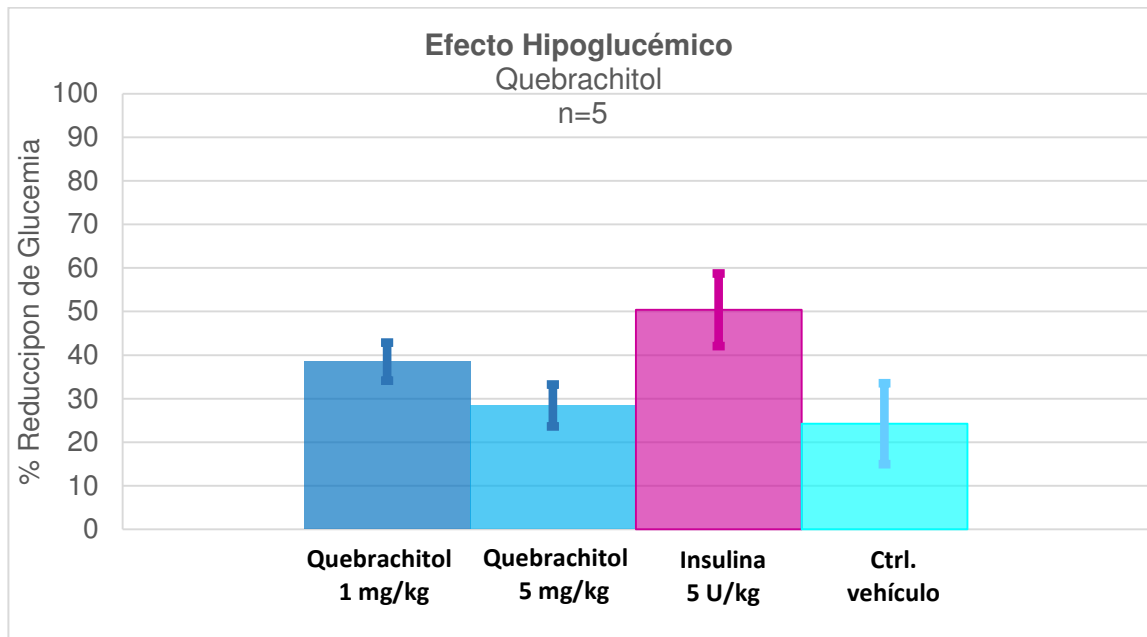


Figura 38 Porcentaje de reducción de glucemia de FS-meOH en ratones CD1 adulto. Dosis de 1 y 5 mg/kg. Administración intraperitoneal. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES).

### 3.7.2 Evaluación del efecto antihiperoglucémico de alantoína y quebrachitol

La alantoína y el quebrachitol fueron evaluados para el efecto antihiperoglucémico en ratas Wistar, normoglucémicas, co-administrados con almidón en dosis de 0.5, 2.5 y 5 mg/kg. En la Figura 39, se muestra el resultado obtenido para la alantoína, en donde se observa que en el minuto 15 la dosis de 0.5 mg/kg presenta un efecto antihiperoglucémico menor al control de almidón. Con el fin de tener una mejor comparación del efecto obtenido para cada tratamiento, en la Figura 40 se muestra el porcentaje de incremento de glucemia, donde la alan-

toína incrementó un 10% de glucemia, misma que fue significativamente diferente al control de almidón. La alantoína tuvo un efecto antihiper glucémico similar al de la acarbosa con un incremento de glucemia del 10%, que resultó significativamente no diferente cuando se evaluaron en la misma dosis. Sin embargo, la alantoína no presentó efecto antihiper glucémico en las dosis de 2.5 y 5 mg/kg, ya que tuvieron un resultado igual al del control de almidón, con un incremento de glucemia de 23% y 24 % respectivamente siendo significativamente no diferente al control de almidón.

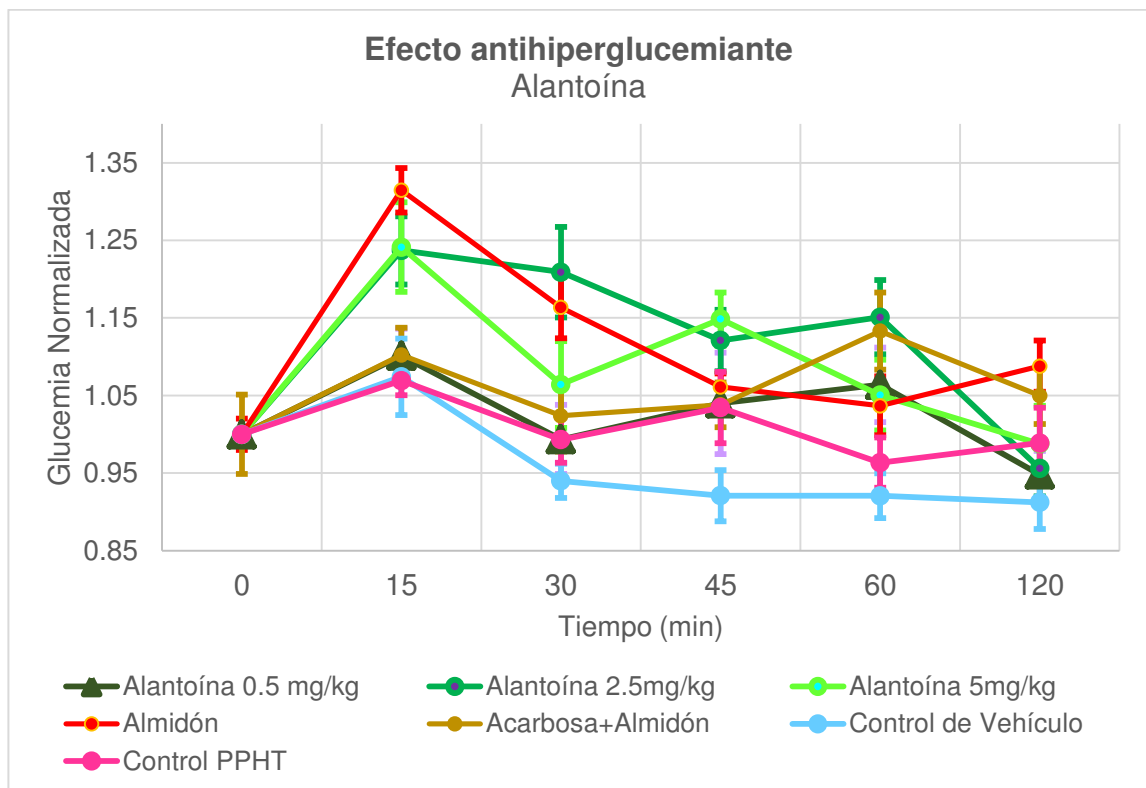


Figura 39 Efecto antihiper glucémico de PB-meOHsec en ratas Wistar adulto. Dosis de 0.5, 2.5 y 5 mg/kg administración oral. n=5, media ± error estándar (ES)

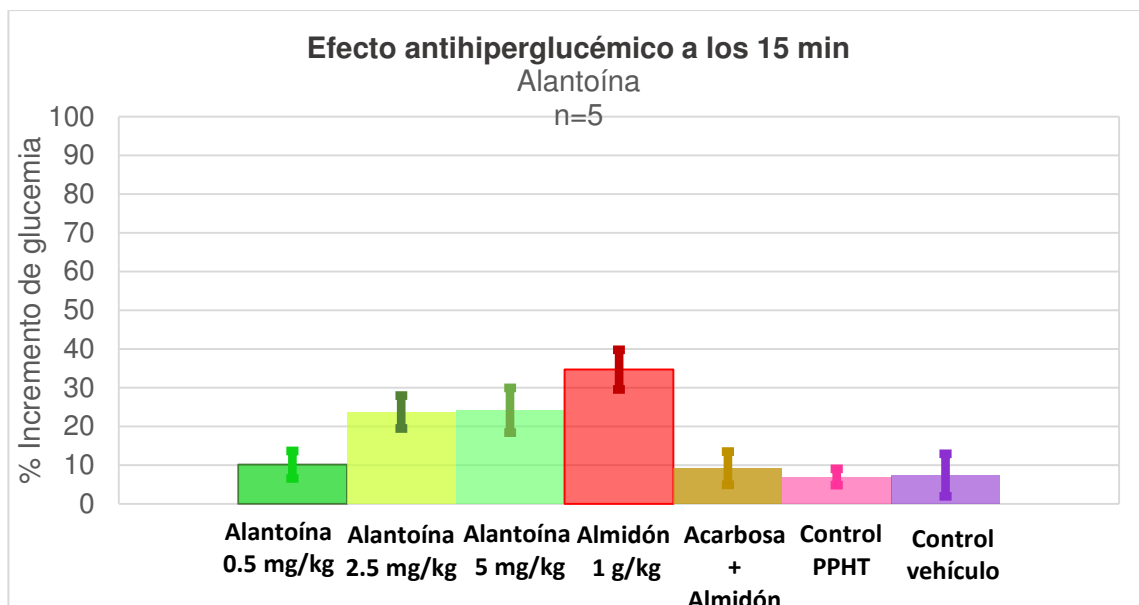


Figura 40. Porcentaje de incremento de glucemia del efecto antihiper glucémico de PB-meOHsec en ratas Wistar adulto. Dosis de 0.5, 2.5 y 5 mg/kg administración oral. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES).

También se evaluó el efecto antihiper glucémico del compuesto quebrachitol, y en la Figura 41 se observa la cinética de glucemia normalizada respecto a su nivel basal para las dosis de 0.5, 2.5 y 5 mg/kg. El compuesto no tiene efecto antihiper glucémico a los 15 minutos, ya que su efecto es igual al del control de almidón. Para analizar mejor el efecto hiper glucémico, la Figura 42 muestra el porcentaje de incremento obtenido en cada tratamiento experimental. El quebrachitol incrementó la glucemia en 34%, 33% y 26 % a las dosis de 0.5, 2.5 y 5 mg/kg respectivamente. Este efecto resultó estadísticamente no diferente al control de almidón en las tres dosis, el cual incrementó la glucemia en un 34%. El control de acarbosa incrementó la glucemia en un 9% teniendo una diferencia significativa con los cristales de  $Fs_2$  en sus dosis probadas, por lo que el quebrachitol no tiene efecto antihiper glucémico en las dosis evaluadas.

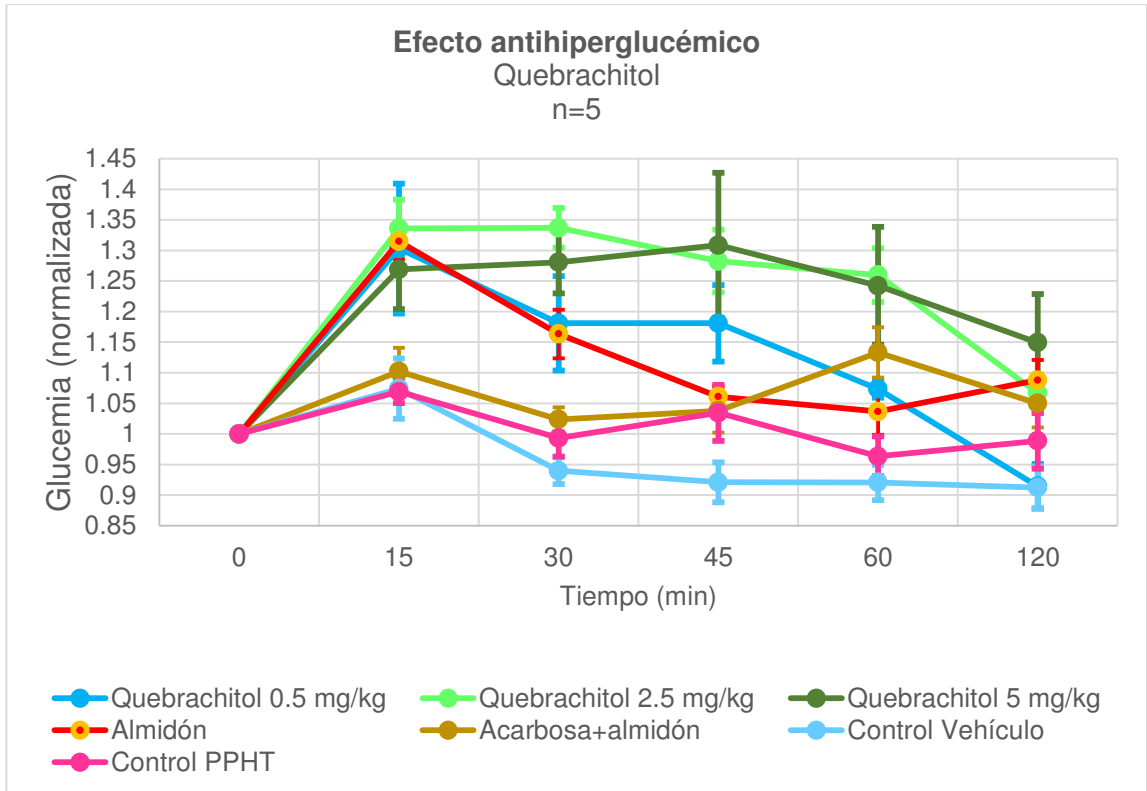


Figura 41 Efecto antihiper glucémico de quebrachitol en ratas Wistar adulto. Dosis de 0.5, 2.5 y 5 mg/kg administración oral. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES)

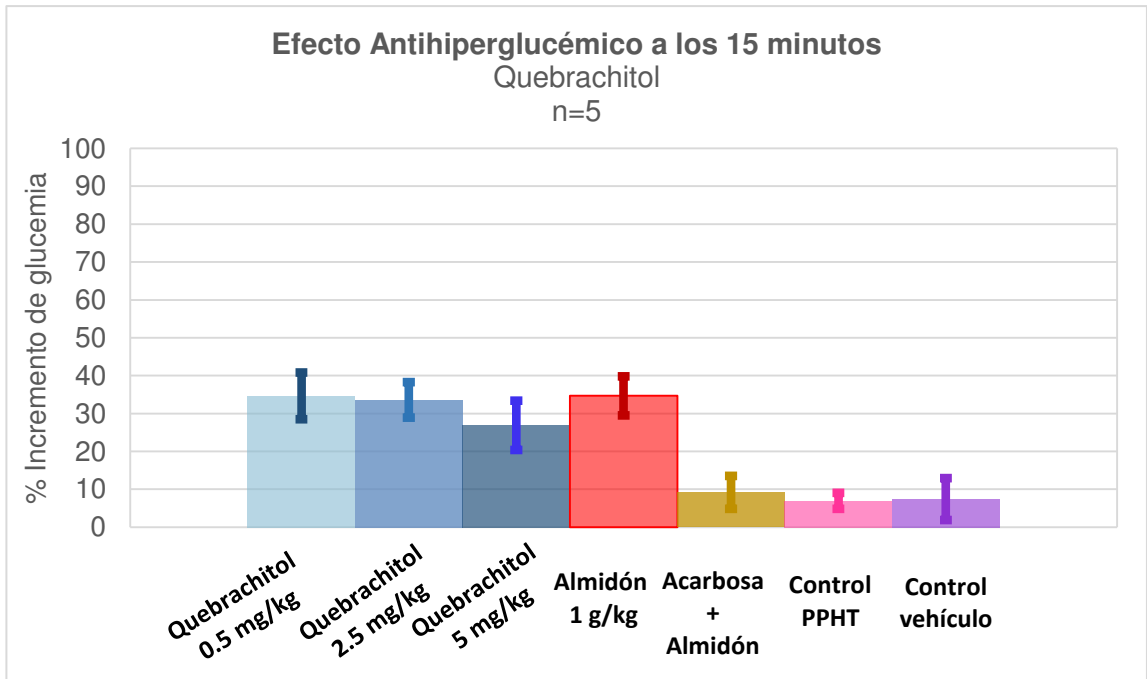


Figura 42 Porcentaje de incremento de glucemia del quebrachitol en ratas Wistar adulto. Dosis de 0.5, 2.5 y 5 mg/kg administración oral. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES)

### 3.7.3 Actividad antidiabética de los cristales de quebrachitol

La actividad antidiabética del quebrachitol se determinó mediante el descenso de la glucemia en ratones inducidos a diabetes con aloxano. En la Figura 43 se muestra la cinética glucémica, en donde se observa que el compuesto a dosis de 5 mg/kg tiene un efecto antidiabético, teniendo el mayor efecto en la hora 6. En la Figura 44 se muestra el porcentaje de reducción de glucemia, tomando en cuenta el nivel de glucemia más bajo obtenido en cada condición experimental. El quebrachitol, en la dosis de 1 y 5 mg/kg reduce la glucemia en 1% y 30% respectivamente, mientras que la insulina disminuyó la glucemia en un 32%. Al comparar la disminución del nivel glucémico del quebrachitol (en dosis de 5 mg/kg) con la insulina, resultaron ser muy semejantes, sin tener diferencia estadísticamente significativa. Por lo que el quebrachitol tiene un efecto antidiabético en la dosis de 5 mg/kg.

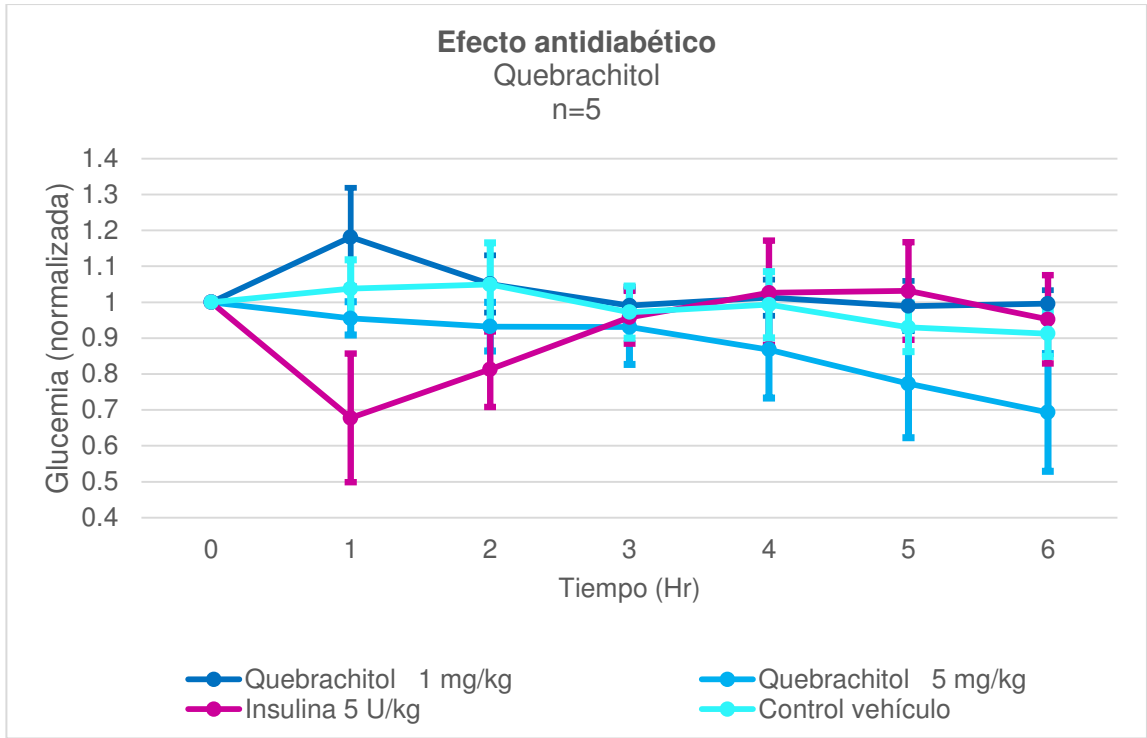


Figura 43 Efecto antidiabético de quebrachitol en ratones CD1 adulto. Dosis de 1 y 5 mg/kg administración intraperitoneal. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES)

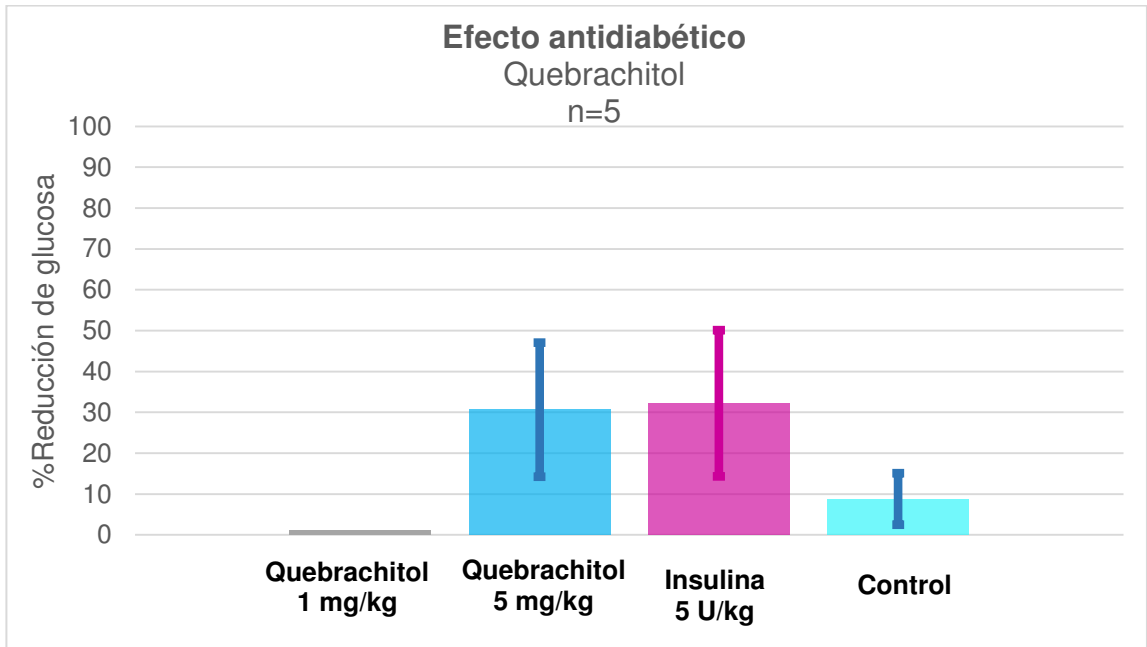


Figura 44 Porcentaje de reducción de glucemia del efecto antidiabético de quebrachitol en ratones CD1 adulto. Dosis de 1 y 5 mg/kg administración intraperitoneal. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES)

### 3.8 Evaluación de actividad *In vitro*

#### 3.8.1 Evaluación de la actividad inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasa

En la Tabla 13 se muestra el resultado obtenido a partir del ensayo de  $\alpha$ -glucosidasa de los compuestos evaluados y el control farmacológico utilizado. Los compuestos alantoína y quebrachitol no resultaron activos para la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa con una concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) que se encuentra por encima de 300  $\mu\text{g/mL}$ .

*Tabla 13. Resultado de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa, encontrado para la alantoína y la fracción con quebrachitol como compuesto mayoritario.*

Sustancia evaluada	$CI_{50}$
Acarbosa	198 $\mu\text{g/mL}$
Alantoína	>300 $\mu\text{g/mL}$
Quebrachitol	>300 $\mu\text{g/mL}$

### 3.8.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de $\alpha$ -amilasa

En la Tabla 14 se muestra el resultado obtenido a partir del ensayo de  $\alpha$ -amilasa de los compuestos evaluados y el control farmacológico utilizado. Los compuestos alantoína y quebrachitol no resultaron activos para la actividad inhibitoria ensayada, con un  $CI_{50}$  que se encuentra por encima de 25  $\mu\text{g/mL}$

*Tabla 14. Resultado de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -amilasa, encontrado para la alantoína y la fracción con quebrachitol como compuesto mayoritario.*

Sustancia evaluada	$CI_{50}$
Acarbosa	1.61 $\mu\text{g/mL}$
Alantoína	>25 $\mu\text{g/mL}$
Quebrachitol	>325 $\mu\text{g/mL}$

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron extractos de *Cordia boissieri* para conocer sus efectos sobre el control glucémico, como alternativa de tratamiento para la diabetes mellitus, que es una enfermedad de gran importancia a nivel mundial por el nivel de morbilidad que presenta. Existen reportes del género *Cordia* en donde se expone que algunas plantas poseen efectos hipoglucémicos y antihiperglucémicos como *C. alliodora* reportada por Murillo cols. en el año 2004<sup>36</sup>; *C. dentata* reportada por Mendez cols., también en el año 2004<sup>29</sup>; *C. elegnoides* reportada por Cetto cols. en el año 2005<sup>30</sup>; y más recientemente *C. sebestena* reportada por Saratchandiran y cols. en el año 2013<sup>31</sup>. También hay reportes del uso etnomedicinal de *Cordia boissieri* para tratar la DM2 como se establece en el trabajo de Johnson y cols.<sup>32</sup>.

El presente proyecto de investigación se realizó con la finalidad de evaluar la potencial actividad hipoglucemiante, antihiperoglucemiente y antidiabética de *C. boissieri*. Para llevar a cabo este trabajo, se prepararon extractos crudos: directos (metanólico y acuoso) y secuenciales (hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso). Basados en la capacidad selectiva de solubilidad de distintos disolventes, se optó por realizar extractos secuenciales con la finalidad de tener una mezcla con un número reducido de compuestos, ya que los extractos directos usualmente contienen una mezcla con un número mayor de componentes. Entre los diversos extractos seleccionados se encontró que los extractos polares favorecen la obtención de mayor cantidad de compuestos en relación al peso (Tabla 7). Por ello, se propuso la estrategia experimental de obtener de extractos secuenciales, ya que favorecen la recuperación de una menor cantidad de compuestos que un extracto crudo. El costo-beneficio de la extracción secuencial (por un incremento en el uso de disolventes) se pondera al valorar los resultados del efecto o actividad de las fracciones secuenciales con cada tipo de extracto. Una ventaja adicional es que, también, con los extractos secuenciales se evitaría descartar extractos crudos con compuestos activos, que por dilución o enmascaramiento con otros compuestos puedan dar resultados falsos negativos.

De esta manera, se realizó el ensayo de efecto hipoglucémico y antihiperoglucemico de extractos de *Cordia boissieri* (Figura 29 y 31), a fin de detectar compuestos con posible actividad contra la condición de hiperoglucemia que caracte-

riza a la diabetes. En estos ensayos, los extractos polares, el metanólico secuencial y acuoso secuencial fueron los que mostraron los mejores efectos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Pandeya, K. y cols. 2013<sup>10</sup>, quienes describe extractos polares a partir de plantas que presentan efectos similares. A partir de esta evaluación dirigida por actividad biológica, como una primera aproximación para identificar y caracterizar los compuestos responsables del efecto antihiper glucémico, se decidió continuar con el extracto metanólico secuencial por su fácil manejo comparado con extractos acuosos.

El primer paso para aislar compuestos a partir del extracto metanólico secuencial de *C. boissieri*, fue realizar pruebas de solubilidad en metanol. Se encontró que se formaban dos fases. Una de ellas se obtuvo como un precipitado blanco que se separaba con facilidad del sobrenadante, lo cual hizo factible un proceso de separación eficiente. Mediante cromatografía en capa fina se demostró que la separación por precipitación da lugar a la obtención de un sólo compuesto (Figura 6). Mediante técnicas espectroscópicas se confirmó que el precipitado blanco era una sustancia con pureza espectroscópica del 90% determinada a partir de la integración de señales del espectro de <sup>1</sup>H-RMN en DMSO-d<sub>6</sub> (Figura 15-17).

Como parte de la revisión de antecedentes, se realizó una búsqueda bibliográfica en distintas bases de datos (PUBMED, JCR, SciFinder, entre otros) para revisar qué compuestos se habían aislado de *Cordia boissieri*. Se encontró que uno de los compuestos aislados de la planta era alantoina, que se caracterizaba por tener nitrógeno en su estructura. Con esta información como antecedentes,

se realizaron pruebas al precipitado blanco basadas en ensayos cualitativos y estudios de espectroscopía infrarrojo para detectar la presencia de nitrógeno. Se confirmó que la molécula contenía nitrógeno, principalmente de grupos funcionales amida (Figura 14). Posteriormente, se compararon los espectros de IR y RMN obtenidos en el presente trabajo con los espectros reportados en bases de datos (Sci-finder) y con los datos publicados en la literatura. Se confirmó que el compuesto aislado del precipitado blanco (PB-meOHsec) es alantoína. Este compuesto había sido previamente reportado en el fruto de *Cordia boissieri* por Dominguez y cols (1973)<sup>37</sup>. En otro reporte realizado por Cova y colaboradores, también se menciona el aislamiento de alantoína a partir de las flores de *Cordia alba* y se propone que este compuesto es un posible marcador quimiotaxonómico del género *Cordia*, Cova, M., (2016)<sup>38</sup>.

Por otra parte, la fracción soluble (FS-meOH) fue analizada por RMN. La interpretación de los espectros indicó la presencia de un compuesto mayoritario, cuya estructura es un carbohidrato con siete átomos de carbono, uno de estos átomos de carbono corresponde con un sustituyente metoxilo. Para la identificación de este compuesto que se encontraba en una mezcla, además del análisis de los espectros de RMN, se hizo una búsqueda en base de datos (JEOL), a partir de los valores de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento obtenidos experimentalmente, con el fin de encontrar semejanza estructural con algún compuesto. Esta técnica es utilizada en los estudios metabólicos cuando se tienen mezclas de compuestos. Los resultados sugieren que se trata de un compuesto cuyo esqueleto es tipo inositol; por lo que se sospe-

chó que era D-pinitol, cuya presencia en el fruto de *Cordia boissieri* había sido previamente reportado en la literatura *por Dominguez y cols (1973)*<sup>37</sup>; sin embargo, el mismo estudio en la base de datos indicó que los valores de desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento del compuesto mayoritario corresponden al quebrachitol. Posteriormente, fue obtenido el espectro de <sup>1</sup>H-RMN del D-pinitol (Sigma-Aldrich) y se confirmó que el patrón de señales de compuestos aislado de *C. boissieri* difiere significativamente de las del D-pinitol. Por lo que se concluye que el compuesto aislado a partir de la fracción soluble del extracto metanólico secuencial de las hojas de *C. boissieri* no es D-pinitol, y se refuerza la tesis de que se trata de quebrachitol.

Dado que el quebrachitol se encontró en la fracción FS-meOH como un compuesto mayoritario pero no puro, se intentó purificar. Después de varios procesos de purificación mediante cromatografía en columna (resultados no mostrados) y varios procesos de lavados (sección 3.2.3), se llegó a obtener la fracción identificada como Fs<sub>2</sub>, la cual presentó dos bandas: una de ellas con un factor de retardo ( $R_f=0.38$ ) semejante al D-pinitol (Figura 10-11), que es un isómero configuracional del quebrachitol, el cual fue utilizado como un estándar en los estudios de capa fina y que además dio positivo al revelado con el reactivo alfa naftol. Lo anterior confirma que esta banda con  $R_f=0.38$  es un carbohidrato que corresponde al quebrachitol, como indican los datos espectroscópicos cotejados con base de datos (JEOL). Al final de este trabajo de investigación, se llegaron a obtener cristales a partir de la Fs<sub>2</sub> (donde está contenido el quebrachitol); sin

embargo, a la fecha aún están pendientes la determinación de difracción de rayos X no se alcanzó a identificar la composición de los cristales.

Este modo de obtención de los cristales, disolviendo la muestra en una mezcla de solventes que contiene AceOEt/AcOH/meOH/H<sub>2</sub>O y la posterior disolución en etanol, el cual se evaporó lentamente, coincide con lo reportado por Alphen, J., (1951)<sup>39</sup> con relación a la solubilidad del quebrachitol en diferentes solventes. El quebrachitol también ha sido aislado de plantas como *Aspidosperma quebracho* (de donde proviene su nombre), *Grevillea robusta*, *Hakea laurina*, *Artemesia afra*, *Haplophyton cimidum*, *Acalypha indica*, *Acer pseudoplatanus* y *Acer platanozdes* Alphen, J., (1951)<sup>39</sup>.

El ensayo del efecto hipoglucémico de los extractos de *C.boissieri*, fue realizado como un primer acercamiento para conocer el efecto de la planta sobre el nivel de glucemia en un organismo vivo, probando diferentes extractos secuenciales (hexano, acetato de etilo, metanólico y acuoso) y comparar con extractos crudos (metanólicos y acuoso).

En general, se observó que los extractos polares, acuoso secuencial, metanólico secuencial y metanólico directo presentaron mejor efecto hipoglucemiante con valores de reducción de glucemia entre 32% y 49%. Todos estos extractos presentaron el efecto máximo al final del periodo de evaluación. Sin embargo, debido a que en ningún caso se observó la fase de recuperación, es importante evaluar el efecto hipoglucémico en un periodo de tiempo mayor (10 a 12 hrs).

De continuar la tendencia descendente de los niveles de glucemia, los modelos experimentales podrían alcanzar niveles hipoglucémicos letales. Afortunadamente ninguno de los tratamientos experimentales fue letal, lo que sugiere que la glucemia alcanzó un nivel mínimo y después se recuperó.

Los extractos polares presentaron el efecto hipoglucemiante a niveles estadísticamente no diferentes al observado con la insulina, la cual presentó una reducción de glucemia del 50%. Estos resultados sugieren que los compuestos polares están involucrados con el efecto hipoglucémico.

En el ensayo de efecto hipoglucemiante, los extractos se administran vía intraperitoneal, lo que implica que las sustancias probadas se distribuyen vía sistémica evitando el efecto de primer paso y el contacto con enzimas digestivas. El hecho de que los extractos hayan presentado un efecto hipoglucemiante sugiere entonces que esto puede involucrar la estimulación del páncreas para producir insulina o que funcionen de manera análoga a la insulina, promoviendo el consumo de la glucosa por los tejidos (principalmente músculo e hígado) o inhibición de la gluconeogénesis hepática. Lo anterior podría confirmarse con ensayos in vitro o in vivo que evalúen los mecanismos de acción involucrados en el efecto hipoglucémico de los extractos.

Otro mecanismo involucrado en el control glucémico de los pacientes diabéticos es la regulación de la glucemia en el estado postprandial, lo cual puede lograrse mediante la reducción de la digestión y absorción de los carbohidratos de la

dieta. Por ello, se determina el efecto antihiper glucémico (posprandial) de los extractos o nuevas propuestas farmacológicas para el tratamiento de la diabetes. Esta evaluación se enfoca en el pico hiper glucémico obtenido a los 15 minutos, tiempo en el cual hay un incremento mayor de la glucemia tras la coadministración de la carga de carbohidratos (almidón) y que se relaciona principalmente con la actividad de las enzimas digestivas y los transportadores intestinales de glucosa. Por ello, se llevó a cabo la evaluación del efecto antihiper glucémico de los extractos de *Cordia boissieri* en ratas normoglucémicas, coadministrados con almidón. Todos los extractos fueron probados en dosis de 0.5 mg/kg (Figura 31-32), a la cual se encontró que los extractos secuenciales metanólico y acuoso resultaron con valores de incremento de glucemia entre 9 y 11%, efecto antihiper glucémico con diferencia significativa al compararse con el control de almidón. Además estos extractos metanólico y acuoso secuenciales mostraron un efecto antihiper glucémico sin diferencia significativa al compararse con un inhibidor de la digestión del almidón como la acarbosa (con 9% incremento de glucemia). Los demás extractos no presentaron efecto antihiper glucémico, y fueron significativamente no diferentes con el control de almidón, a excepción del extracto de acetato de etilo secuencial, el cual incrementó la glucemia por niveles superiores al control del almidón. Es importante destacar que de los extractos polares, el extracto metanólico directo, que había resultado con efecto hipoglucémico, en este ensayo no presentó efecto antihiper glucémico (Figura 31-32). Lo anterior sugiere que los compuestos contenidos en los extractos son diferentes tanto en contenido y proporción de compuestos, por lo que presentan mecanismos de acción diferentes.

En las evaluaciones del efecto hipoglucemiante y antihiperoglucemiante se encontró que los extractos secuenciales metanólico y acuosos tuvieron los mejores resultados. Sin embargo, se continuó la investigación con el extracto metanólico secuencial por facilidad en el manejo de estos extractos, en comparación con extractos acuosos, principalmente durante el proceso de separación y purificación de compuestos.

Con el fin de revisar si el efecto antihiperoglucémico del extracto metanólico secuencial era dependiente de la dosis, se probaron adicionalmente las dosis 2.5 y 5 mg/kg. Se encontró que la dosis de 2.5 mg/kg permitió un incremento de glucemia postprandial del 7% siendo estadísticamente diferente al control de almidón, que incrementó un nivel de glucosa en un 34% (Figura 33 y apéndice A), mientras que la dosis de 5 mg/kg permitió incremento la glucemia postprandial en un 33% significativamente no diferente al almidón (Figura 34 y apéndice A). Debido a que no se observó una mejoría del efecto al aumentar la dosis, se puede concluir que la respuesta está saturada, y ya no es dependiente de la dosis. El mecanismo antihiperoglucémico del extracto metanólico secuencial puede estar relacionado con la digestión o absorción de los carbohidratos, ya que la vía de administración es oral y puede actuar en la luz del sistema digestivo inhibiendo las enzimas que digieren al almidón o a los transportadores de glucosa intestinales.

Los extractos polares de *Cordia boissieri* son los que presentan los efectos hipoglucémico y antihiperoglucémico (Figuras 29 y 31). Este hecho concuerda con lo descrito en algunos reportes, donde se mencionan plantas con algún tipo de control de la glucemia, en las cuales los extractos polares son los que muestran dicho efecto: Pandeya, K. y cols. (2013)<sup>10</sup>, Saravanamuttu, S. (2012)<sup>40</sup>, Adebayo, G y cols (2009)<sup>41</sup>.

En esta investigación, el extracto metanólico directo presentó efecto hipoglucémico pero no presentó efecto antihiperoglucémico. Al ser extractos metanólicos (directo y secuencial), se puede sospechar que pueden contener los compuestos activos y presentar ambos efectos. La diferente actividad entre ambos extractos puede deberse a que el metanólico directo contiene una mezcla de compuestos con una gama más amplia de polaridades, mientras que en el metanólico secuencial la mezcla está reducida solamente a compuestos hidrofílicos. Los compuestos activos pueden estar “diluidos” o enmascarados en el extracto metanólico directo. Por ello es importante evaluar extractos secuenciales o directos de diferente polaridad para no descartar resultados de actividad falsos negativos.

Una vez que se detectó el efecto hipoglucémico y antihiperoglucémico en el extracto metanólico secuencial, se sometió al aislamiento de los posibles compuestos responsables de los efectos evaluados

De esta manera se logró aislar la alantoína y el quebrachitol, los cuales fueron ensayados para detectar su efecto hipoglucémico y antihiperoglucémico. El efecto hipoglucémico se determinó en las dosis de 1 y 5 mg/kg para ambos compuestos. De ellos, la alantoína presentó un efecto hipoglucémico limitado en ambas dosis, presentando valores de reducción de glucemia menores al 15% respecto a la basal, el cual es un valor significativamente menor que el registrado por el control farmacológico de insulina, quien presentó un 50% de reducción de la glucemia. El quebrachitol presentó un efecto hipoglucémico con reducción de glucemia de 38% y 28% para las dosis de 1 y 5 mg/kg respectivamente; sin embargo solamente la dosis de 1 mg/kg no presentó diferencia significativa con la insulina, la cual presentó una reducción de la glucemia del 50%. El efecto hipoglucémico del extracto metanólico secuencial se puede explicar por la presencia del quebrachitol, el cual resultó tener efecto hipoglucémico en dosis 1 y 5 mg/kg.

En relación al efecto antihiperoglucémico, la alantoína y quebrachitol se evaluaron a las dosis de 0.5, 2.5 y 5 mg/kg. Para la alantoína, los resultados mostraron que sólo la dosis de 0.5 mg/kg tuvo efecto antihiperoglucémico, permitiendo un incremento de glucemia postprandial del 10% (Figura 32), este incremento es significativamente diferente al control de almidón, el cual presentó un incremento de glucemia postprandial de 34%. Además, el incremento presentado por alantoína no es significativamente diferente con respecto al control de acarbose, con la cual se observó un incremento de glucemia postprandial del 9%, cuando

se probaron ambas sustancias en dosis de 0.5 mg/kg. Por otra parte, las dosis de 2.5 y 5 mg/kg de alantoína permitieron un incremento de glucemia postprandial del 23 y 24% respectivamente, por lo que no son significativamente diferentes respecto al almidón, y en consecuencia se consideran sin efecto antihiperglucémico. En las dosis de alantoína evaluadas en este trabajo, no se observó un efecto antihiperglucémico dosis dependiente. El efecto antihiperglucémico del extracto metanólico secuencial se puede explicar por la presencia de la alantoína, la cual demostró tener este efecto a dosis 0.5 mg/kg.

La elevación de la glucemia postprandial se encuentra relacionado con la actividad de las enzimas digestivas, como la alfa glucosidasa y alfa amilasa principalmente. El hecho de que la alantoína reduzca el incremento de la glucemia postprandial, sugiere que dicho efecto puede ser por inhibición de enzimas digestivas o por inhibición de la absorción intestinal de glucosa.

La alantoína es capaz de mejorar la glucemia postprandial al ser coadministrada con almidón vía oral, pero no disminuye la glucemia cuando se administra vía intraperitoneal, lo cual no concuerda con lo reportado por algunos autores, quienes reportan un efecto vía intraperitoneal y que la alantoína es degradada por vía oral (Go, H-K 2015)<sup>42</sup>.

Se ha reportado que la alantoína puede mejorar la utilización de glucosa en músculo esquelético a través de las vías dependientes de beta endorfinas, que están relacionadas con la expresión de GLUT4 y que disminuyen la glucosa en plasma en ratas diabéticas: Niu, C (2010)<sup>43</sup>. En otros estudios se demostró que

la alantoína está relacionada con los receptores imidazolina I-2R, el cual influye en la reducción de glucosa por el aumento de beta endorfinas y que a su vez está relacionado con la acción en el músculo esquelético, este mecanismo también está indicado para la metformina, la cual al igual que la alantoína son estructuralmente similares al ser derivados de biguanidina: Lin, K-C, (2011)<sup>44</sup>. En un estudio donde la administración diaria de alantoína durante 31 días, se comprobó que la alantoína revierte la producción de insulina así como el aumento de los niveles del péptido C, GLP-1 en ratas inducidas a diabetes con streptozotocina y en consecuencia la mejoría en los niveles de glucemia: Go, H-K (2015)<sup>42</sup>.

Una posible explicación del efecto antihiper glucémico (vía oral) observado con la alantoína, puede deberse a la capacidad de formar puentes de hidrógeno con las estructuras de carbohidratos, ya que está reportado que la alantoína puede formar puentes de hidrógeno intramolecular en forma sólida y líquida (Cova, M., 2016)<sup>38</sup> y además que se ha reportado que los azúcares con frecuencia se unen a grupos que contienen nitrógeno (Polaina, J. 2004)<sup>45</sup>. Por lo tanto, la unión de los azúcares con la alantoína evitaría que las enzimas digestivas actúen sobre este sustrato (carbohidrato) impidiendo su metabolismo y la elevación hasta cierto grado de la glucemia postprandial.

Al evaluar la actividad antihiper glucémica del compuesto quebrachitol, los resultados mostraron que no presenta un efecto antihiper glucémico, ya que se in-

crementó la glucemia un 34%, 33% y 26% para las dosis evaluadas de 0.5, 2.5 y 5 mg/kg respectivamente, que estadísticamente son no diferentes al control de almidón que tuvo un incremento de glucemia del 34% (Figura 42).

Los resultados obtenidos en ratones y ratas normoglucémicas con el extracto metanólico secuencial y los compuestos aislados, sugieren el uso potencial de *Cordia boissieri* para tratar la diabetes. Para confirmar lo anterior, se evaluaron los compuestos en un modelo experimental de diabetes, determinando la actividad del quebrachitol en ratones inducidos a diabetes con aloxano y cuantificando la reducción de la glucemia. El quebrachitol fue evaluado en dosis de 1 y 5 mg/kg. De ellas, la dosis de 5 mg/kg reduce significativamente la glucemia en ratones diabéticos, teniendo el mayor efecto en la hora 6 del periodo evaluado (Figura 43). El porcentaje de la reducción de la glucemia fue del 30%, mientras que la insulina redujo la glucemia un 32%, significativamente no diferentes (Figura 44).

Los mecanismos de acción de las actividades hipoglucémicas como antidiabético pueden ser muy diferentes. En el ensayo hipoglucémico, las condiciones fisiológicas de los modelos experimentales son normales (páncreas e insulina), mientras que en el ensayo del modelo inducido a diabetes estas condiciones están limitadas, por lo que es posible descartar que el quebrachitol esté actuando sobre la producción de insulina o mejorando la acción de la insulina en los modelos diabéticos. Es posible que el quebrachitol está actuando como un análogo funcional de insulina, como lo menciona Sarah, B. (2000)<sup>46</sup> para un análogo del quebrachitol. Un hecho similar es reportado por Pintaudi, B. (2016)<sup>47</sup> pa-

ra el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus 2 (DM2), en el cual se utilizó como suplemento dos análogos del quebrachitol y observaron una mejora de la glucemia. Sin embargo, en la DM2 la producción y acción de insulina es ineficiente, lo que puede indicar que estos análogos estructurales del quebrachitol también son análogos funcionales de la insulina. Demostrando así que la planta estudiada y el quebrachitol son capaces de reducir la glucemia en el estado diabético.

Entonces, el quebrachitol puede tener un efecto hipoglucémico tanto en el modelo murino normoglucémico como el diabético, por un mecanismo que podría descartar la mejoría del páncreas y la estimulación de producción de insulina. En los modelos diabéticos, la administración de insulina disminuyen los niveles de glucosa, lo que confirma la ausencia de mecanismos de resistencia a la insulina ya que los receptores de insulina se encuentran funcionales (Figura 44). Se sugiere que el quebrachitol está actuando como un análogo funcional de la insulina, lo cual tendrá que comprobarse con otros estudios.

También es importante evaluar el efecto de la alantoína sobre los niveles de glucemia postprandial en un modelo de diabetes inducida, ya que este compuesto tiene la capacidad de evitar el incremento de glucemia postprandial (efecto antihiperoglucémico) en un modelo normoglucémico.

Además de demostrar el efecto de *Cordia boissieri* sobre la regulación de la glucemia en modelos murinos normoglucémicos y con diabetes inducida, también se propuso evaluar los posibles mecanismos de acción involucrados. Por

ello, los compuestos encontrados en *Cordia boissieri* se evaluaron mediante ensayos *in vitro*, determinando la actividad inhibitoria de las enzimas alfa glucosidasa y alfa amilasa, importantes para la digestión de los carbohidratos.

En los ensayos *in vitro* se encontró que ambos compuestos no son capaces de inhibir la acción de las enzimas alfa glucosidasa y alfa amilasa, ya que mostraron valores de concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) mayores a los valores máximos probados, 300  $\mu\text{g/mL}$  y 25  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Valores muy superiores al de control farmacológico de acarbosa, que presentó  $CI_{50}$  de 198  $\mu\text{g/mL}$  y 1.6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente para cada ensayo. Esto sugiere que el efecto antihiperglucémico observado con la alantoína, no puede explicarse por el mecanismo de inhibición de las enzimas digestivas; sin embargo, durante el proceso de digestión y absorción de los carbohidratos están involucrados también otros mecanismos, como el co-transportador GLUT2, que probablemente se esté inhibiendo, limitando así el incremento de glucemia postprandial.

Aunque la alantoína se aisló a partir de las hojas de *Cordia boissieri*, también existen reportes del aislamiento de este compuesto a partir del fruto (Domínguez y cols. 1973)<sup>37</sup>. La alantoína aislada de las hojas no presenta actividad inhibitoria de alfa glucosidasa; sin embargo Valdez y cols. (2013)<sup>33</sup> reportaron actividad inhibitoria de alfa glucosidasa a partir de un extracto del fruto, por lo que la actividad reportada puede deberse a otro componente del fruto y no a la alantoína.

En resumen, *Cordia boissieri* es una planta medicinal que tiene propiedades interesantes para tratar la diabetes mellitus, las cuales fueron demostradas experimentalmente en este trabajo. Además, los compuestos aislados a partir de esta planta mantienen la actividad de la planta, regulando la glucemia de los modelos normoglucémico y diabéticos. La planta o los compuestos aislados pueden ser importantes en la región noreste de México, donde se distribuye de manera abundante y donde también el índice de diabetes es elevado.

## CONCLUSIÓN

Los extractos polares de *Cordia boissieri* presentaron actividades hipoglucemiantes y antihiperoglucemiantes.

Del extracto metanólico secuencial se logró aislar y purificar dos compuestos alantoína y quebrachitol. Este es el primer reporte de quebrachitol en extractos de *Cordia boissieri*.

Los resultados en modelos *in vivo* demostraron que la alantoína reduce los niveles de glucemia postprandial a dosis de 0.5 mg/kg, y su actividad antihiperoglucémica es semejante a la acarbosa.

Por otra parte, el quebrachitol redujo significativamente la glucemia, en dosis de 1 y 5 mg/kg, teniendo un efecto hipoglucémico en ratones normoglucémicos.

En el modelo de diabetes inducida en ratones, el quebrachitol redujo la glucemia (dosis de 5 mg/kg) a niveles semejantes a la insulina.

Con los resultados derivados de la presente investigación se demostró que *Cordia boissieri* tiene un efecto regulador de los niveles de glucemia en los modelos evaluados: antihiperoglucémico, hipoglucémico y en diabetes experimental.

## PERSPECTIVAS

Diseñar un método de purificación más eficiente para la obtención de los compuestos.

Evaluar el extracto acuoso, para establecer si tiene los mismos compuestos bioactivos.

Evaluar los compuestos obtenidos alantoina y quebrachitol, por otros ensayos que permitan esclarecer su vía de acción.

Evaluar los compuestos mediante un modelo crónico, y obtener muestras sanguíneas con la finalidad de medir otros parámetros bioquímicos (hemoglobina glucosilada, colesterol, triglicéridos, glucosa en orina) que permitan establecer una correlación completa.

Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos obtenidos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Meo, S. A. Diabetes mellitus: Health and wealth threat. *Int. J. Diabetes Mellit.* **1**, 42 (2009).
2. Mexicanos, S. de S. de los E. U. Dirección General de Sanidad. *D. Of. la Fed.* 1–35 (2010).
3. Mídete, F. Asumiendo el control de la diabetes. Mexico 2016. (2016).
4. Abujbara, M. & Ajlouni, K. Approach to dysglycemia: Do we need to treat impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose? *Int. J. Diabetes Mellit.* **1**, 22–25 (2009).
5. Alberti, K. & Zimmet, P. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* **15**, 539–553 (1998).
6. Association, A. D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **37**, 81–90 (2014).
7. Gil V., L. E., Sil Acosta, M. J., Domínguez Sánchez, E. R., Torres Arreola, L. del P. & Medina Chávez. Juan Humberto. Guía de práctica clínica Diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Medica Inst. Mex. del Seguro Soc.* **51**, 104–19 (2013).
8. Fernández-Real, J. & Ricart, W. Algoritmo diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2. *Algorithm diagnosis type 2 diabetes Mellit.* **53**, 7–9 (2006).
9. Skyler, J. S. Diabetes mellitus: Pathogenesis and treatment strategies. *J. Med. Chem.* **47**, 4113–4117 (2004).
10. Pandeya, K. B. *cols.* A Critical Review on Traditional Herbal Drugs: An Emerging Alternative Drug for Diabetes. *Int. J. Org. Chem.* **3**, 1–22 (2013).
11. Raef, H., Al-Mahfouz, A. & Al-Khonaizan, A. Adding rosiglitazone to metformin in patients with type 2 diabetes: Effect on diabetes control and metabolic parameters. *Int. J. Diabetes Mellit.* **1**, 2–6 (2009).

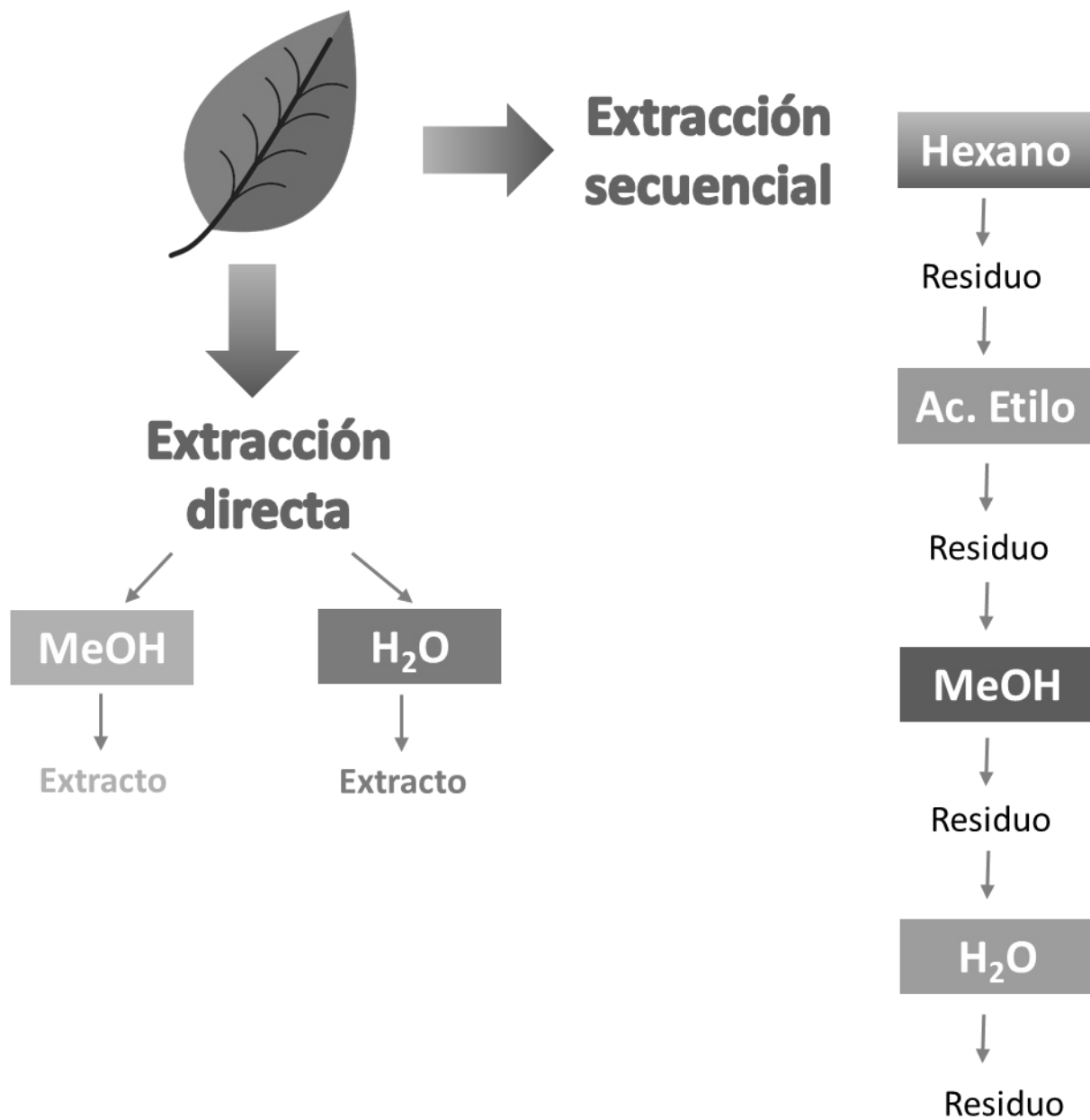
12. Nathan, D. *cols.* The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-independent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **329**, (1993).
13. Yusoff, N. A. *cols.* Aqueous extract of nypa fruticans wurmb. Vinegar alleviates postprandial hyperglycemia in normoglycemic rats. *Nutrients* **7**, 7012–7026 (2015).
14. Michael, J. & Sircar, S. *Fisiología Humana.* (2012).
15. Silverthorn, D. U. *Fisiología humana, un enfoque integrado.* (2010).
16. Ira Fox, S. *Fisiología humana.* (2014).
17. Elaine, M. N. *Anatomía Y Fisiología Humana.* (2011).
18. Stanfield, C. *Principios De Fisiología Humana.* (2011).
19. Zafar, M., Khan, H., Rauf, A., Khan, A. & Lodhi, M. A. In silico study of alkaloids as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: Hope for the discovery of effective lead compounds. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7**, 1–17 (2016).
20. Vela, J., Maldonado, R. & Hamon, M. *In Vivo Models for Drug Discovery.* wiley **62**, (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014).
21. Brown, L. & Panchal, S. K. Rodent models for metabolic syndrome research. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, (2011).
22. Matsumoto, K. *cols.* A Novel Method of The Assay of  $\alpha$ -glucosidase Inhibitory Activity Using a Multi-Channel Oxygen Sensor. *Anal. Sci.* **18**, 1315–1319 (2002).
23. Ngo, L. T., Okogun, J. I. & Folk, W. R. 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. *Nat. Prod. Rep.* **30**, 584 (2013).
24. Mehreen, A., Wahhed, M., Liaqat, I. & Arshad, N. Phytochemical, Antimicrobial, and Toxicological Evaluation of Traditional Herbs Used to Treat Sore Throat. *Biomed Res. Int.* **2016**, (2016).
25. Ho, G. T. T., Kase, E. T., Wangenstein, H. & Barsett, H. Effect of phenolic compounds from elderflowers on glucose- and fatty acid uptake in human myotubes and HepG2-Cells. *Molecules* **22**, (2017).
26. Matias, E. F. *cols.* The genus Cordia: Botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. *Brazilian J. Pharmacogn.* **25**, 542–552 (2015).
27. Alvarado, M., Foroughbakhch, R., Jurado, E. & Rocha, A. Caracterización morfológica y nutricional del fruto de anacahuíta (*Cordia boissiei* A. DC.) en dos localidades del Noreste de México. *Int. J. Exp. Bot.* 85–90 (2004).

28. Owis, A. I. composition of essential oil from flowers of *Cordia boissieri* a.dc. and revision of the use of sesquiterpenes as taxonomic markers for the genus *Cordia*. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **3**, 133–141 (2014).
29. Méndez Ramírez, J., Castillo España, P. & Garduño Ramírez, J. Resúmenes de trabajos en carteles. Estudio químico y farmacológico de las hojas de *Cordia dentata*, empleada en la medicina tradicional mexicana para el control de diabetes mellitus. *Rev. la Soc. Química Mex.* **48**, 22–43 (2004).
30. Andrade Cetto, A. & Heinrich, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* **99**, 325–348 (2005).
31. Sarathchandiran, I. & Gnanavel, M. Investigation on hypoglycemic , antioxidant and Hypolipidemic activity of etha- nolic leaf extract of *Cordia sebestena* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* **4**, 336–343 (2013).
32. Johnson, L. *cols.* Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the southwestern United States. *Phytother. Res.* **20**, 250–255 (2006).
33. Viveros Valdez, E., Jaramillo M., C., Rivas M., C., Oranday C., A. & Carranza R., P. *Actividad antioxidante e inhibitoria de la enzima alfa glucosidasa por parte de los frutos de Cordia boissieri, Ehretia anacua y Prosopis juliflora.* (2013).
34. Owis, A. I., Abo-youssef, A. M. & Osman, A. H. Leaves of *Cordia boissieri* A. DC. as a potential source of bioactive secondary metabolites for protection against metabolic syndrome-induced in rats. *Zeitschrift für Naturforsch. C* **0**, (2016).
35. Owis, A., Abo-youssef, A. & Osman, A. Protective effect of *Cordia boissieri* A. DC. (Boraginaceae) on metabolic syndrome. *J. Appl. Pharm. Sci.* 083–089 (2016). doi:10.7324/JAPS.2016.60813
36. Murillo, E., Moreno, M. L. & Gutiérrez, H. Estudio del efecto hipoglicemiante de *Cordia alliodora* (nogal cafetero) en ratones tratados con aloxano. **11**, 42–48 (2004).
37. Domínguez, X., Escarria, S. & Butruille, D. *p-Hydroxybenzaldehyde dans le fruit de Cordia boissieri.* *Phytochemistry* **12**, (1973).
38. Cova, M. *cols.* AISLAMIENTO Y DE LA ALANTOÍNA A PARTIR DE FLORES DE *Cordia alba*. *Red Rev. Científicas América Lat. y el Caribe, España y Port.* 1–15 (2016).
39. Alphen, J. QUEBRACHITOL Cyclic Polyalcohol from Natural Rubber Latex. *142 Ind. Eng. Chem.* **43**, (1951).

40. Saravanamuttu, S. & Sudarsanam, D. Saravanamuttu and Sudarsanam. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **3**, 3639–3650 (2012).
41. Adebayo, G. I., Alabi, O. T., Owoyele, B. V & Soladoye, A. O. Anti-diabetic Properties of the Aqueous Leaf Extract of Bougainvillea glabra ( Glory of the Garden ) on Alloxan-Induced Diabetic Rats. **4**, 187–192 (2009).
42. Go, H., Rahman, M., Kim, G., Na, C. & Song, C. Antidiabetic Effects of Yam ( Dioscorea batatas ) and Its Active Constituent , Allantoin , in a Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetes. *Nutrients* 8532–8544 (2015). doi:10.3390/nu7105411
43. Niu, C. S. *cols.* Plasma Glucose-lowering Action of Allantoin is Induced by Activation of Imidazoline I-2 Receptors in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *J. Agric. Food Chem.* 12031–12035 (2010). doi:10.1021/jf103234d
44. Lin, K.-C. *cols.* Plasma Glucose-lowering Action of Allantoin is Induced by Activation of Imidazoline I-2 Receptors in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Horm. Metab. Res.* 1–5 (2011).
45. Polaina, J. ESTRUCTURA , FUNCIÓN E INGENIERÍA MOLECULAR DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA DIGESTIÓN DE. *Mensaje bioquímico* **28**, 61–76 (2004).
46. Bates, S. H., Jones, R. B. & Bailey, C. J. Insulin-like effect of pinitol. *Br. J. Pharmacol.* 1944–1948 (2000).
47. Pintaudi, B., Di Vieste, G. & Bonomo, M. The Effectiveness of Myo-Inositol and D-Chiro Inositol Treatment in Type 2 Diabetes. *Int. J. Endocrinol.* **2016**, (2016).

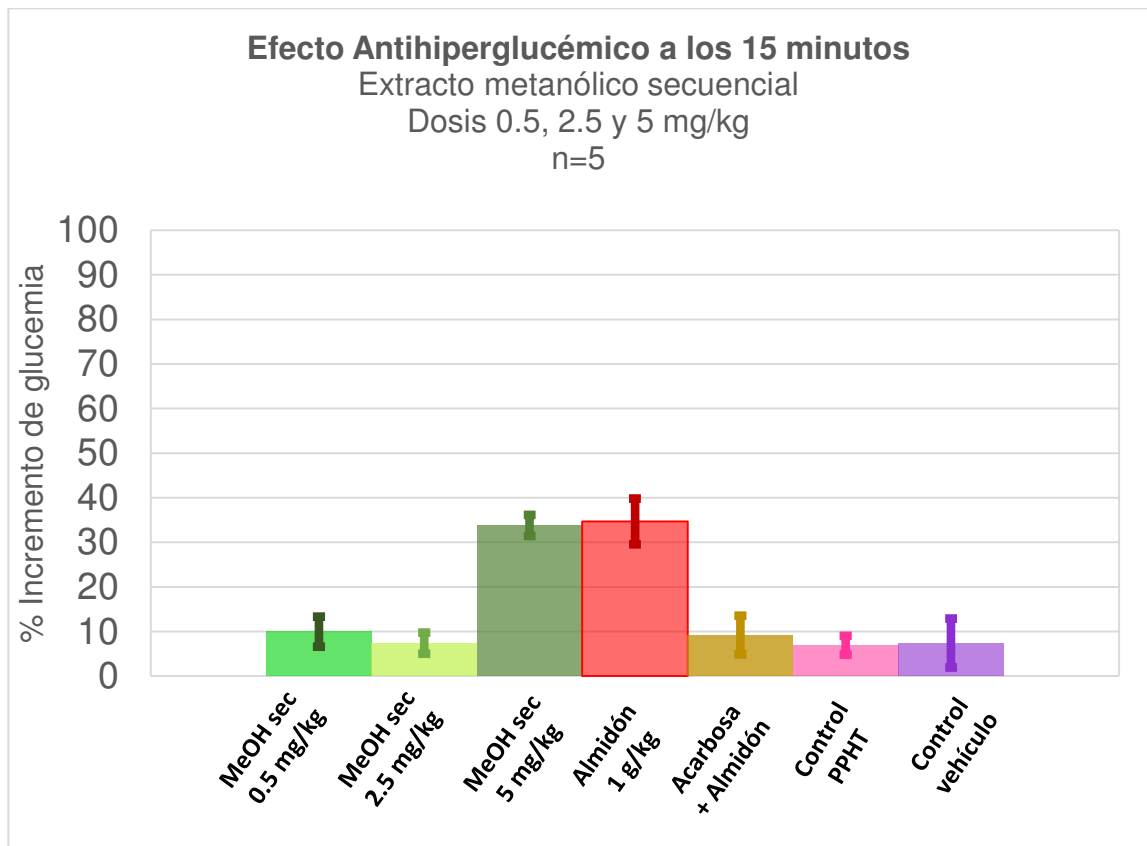
## APENDICE A

Esquema general de las extracciones a partir de *Cordia boissieri*.



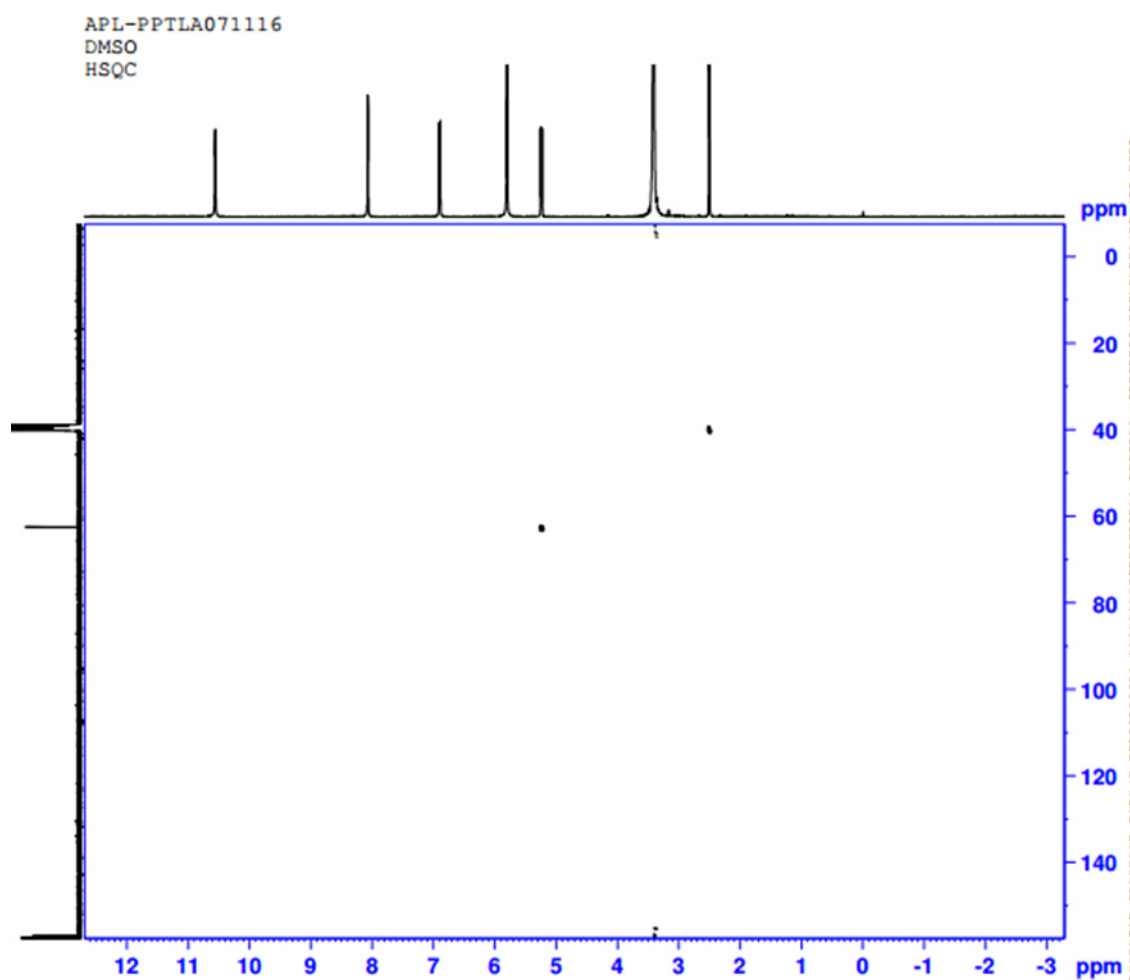
## APENDICE B

Pocentaje de incremento de glucemia de extracto metanólico secuencial de *Cordia boissieri*. Dosis 0.5, 2.5 y 5 mg/kg, administración oral. n=5, media  $\pm$  error estándar (ES).



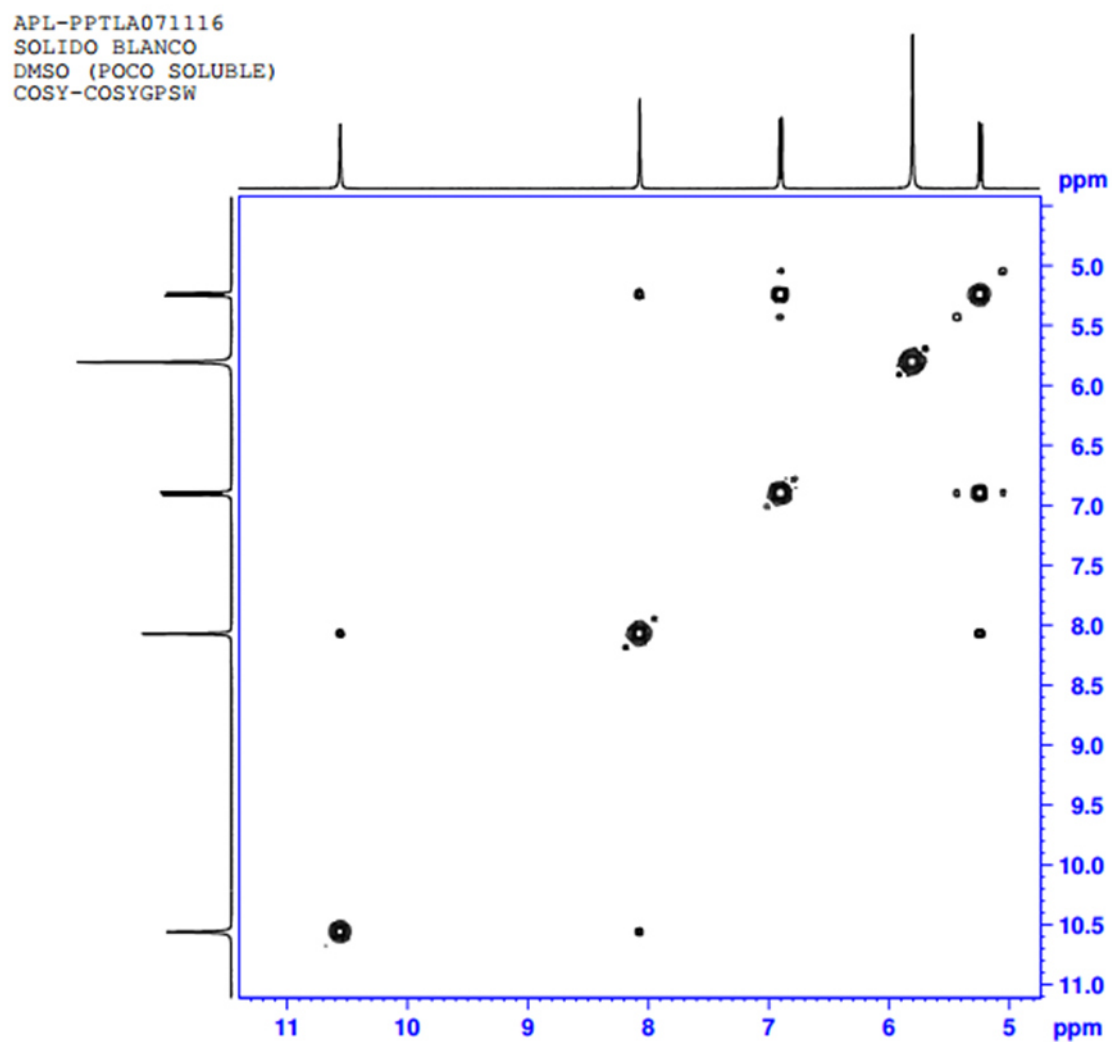
# APENDICE C

Experimento HSQC del polvo blanco PBmeOH



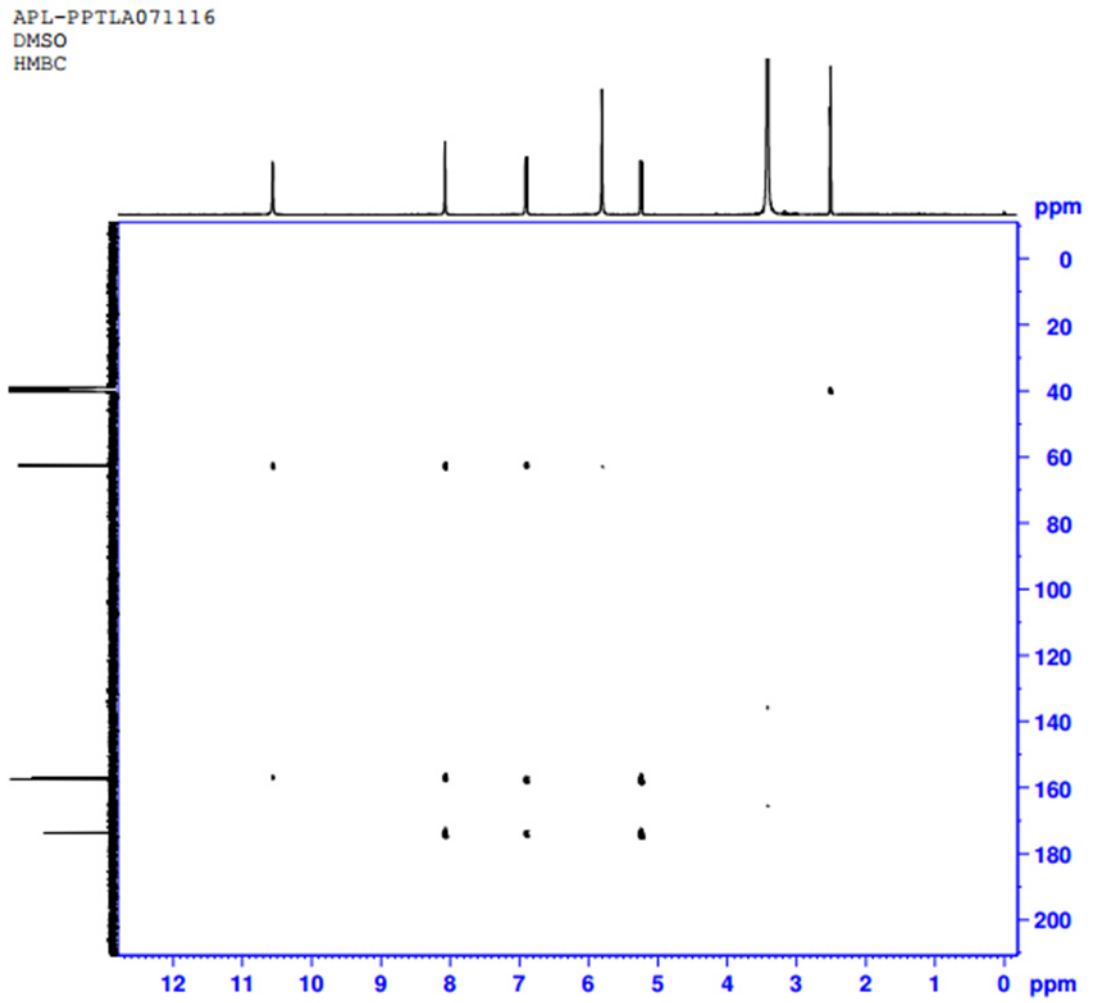
APENDICE D

Experimento COSY del polvo blanco PBmeOH.



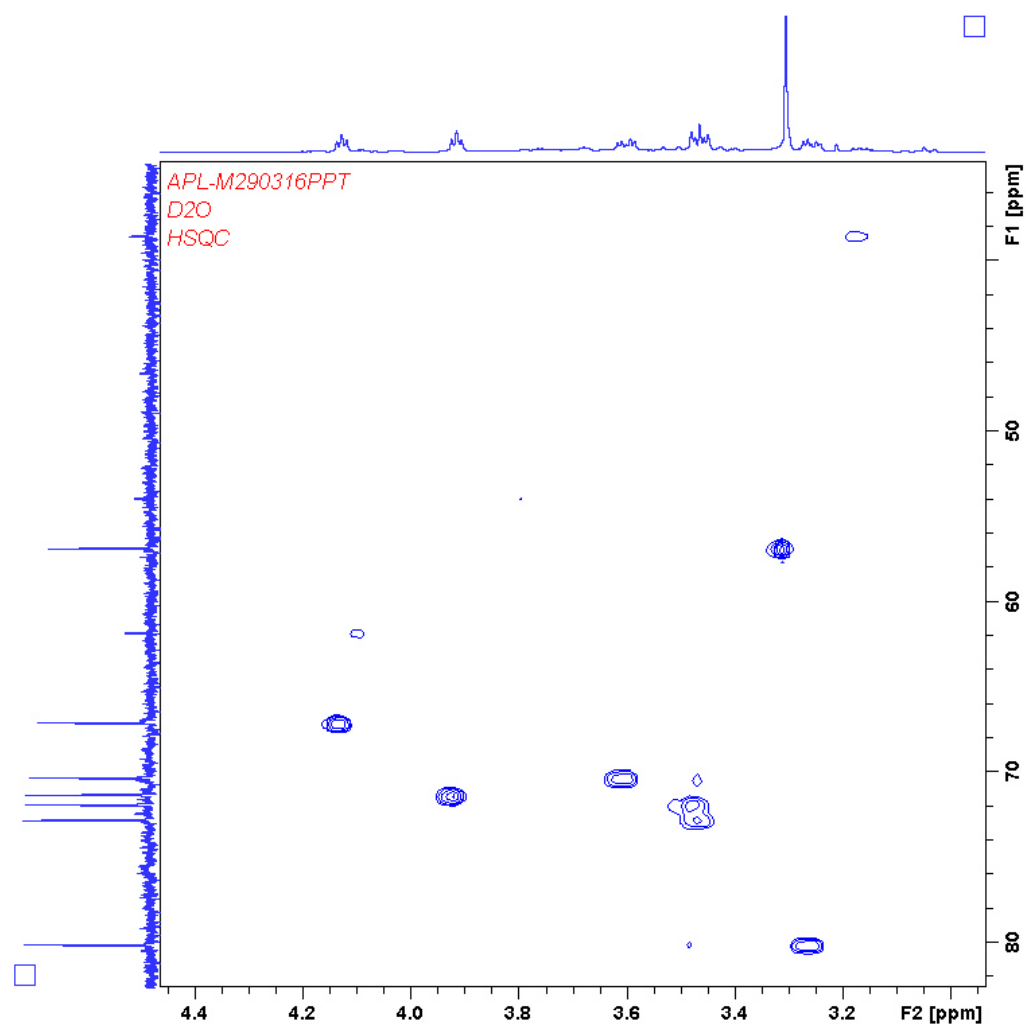
# APENDICE E

## Esperimento HMBC del PBmeOH



# APENDICE F

Experimento HSQC de la fracción FA de FS-meOH



APENDICE G

<b>Evaluación de efecto hipoglucémico de extractos de <i>Cordia boissieri</i></b>				
Extracto evaluado	Glucemia normalizada (mayor efecto observado)	±Error estándar	% Reducción de glucemia (mayor efecto observado)	±Error estándar
Hexano secuencial	0.799	0.109	20.07	10.91
Acetato de etilo secuencial	0.494	0.221	14.58	22.11
Metanol secuencial	0.502	0.109	49.72	10.92
Acuoso secuencial	0.543	0.07	45.64	7.05
Metanol directo	0.672	0.087	32.798	8.701
Control de Insulina 5 U/kg	0.496	0.083	50.399	8.33
Control de vehículo	0.757	0.109	24.277	9.289
<b>Evaluación de efecto antihyperglucémico de extractos de <i>Cordia boissieri</i></b>				
Extracto evaluado	Glucemia normalizada (minut0 15)	±Error estándar	% Incremento (minuto 15)	±Error estándar
Hexano secuencial	1.242	0.047	24.187	4.716
Acetato de etilo secuencial	1.489	0.053	48.847	5.251

Metanol secuencial	1.048	0.057	9.934	3.365
Acuoso secuencial	1.117	0.058	11.74	5.837
Metanol directo	1.217	0.0977	21.701	9.772
Control de almidón	1.315	0.029	34.67	5.133
Control de acarbosa (0.5mg/kg)	1.092	0.039	9.205	4.33
Control de vehículo	1.074	0.049	7.412	5.50
Control de extracto (PPHT)	1.063	0.019	6.914	2.113
<b>Evaluación de efecto antihiper glucémico de extractos de <i>Cordia boissieri</i></b>				
Metanol secuencial (2.5 mg/kg)	1.23	0.04	22.963	3.51
Metanol secuencial (5 mg/kg)	1.338	0.02	33.79	2.018
Metanol directo 2.5mg/kg	1.109	0.06	----	-----
Metanol directo (5 mg/kg)	1.357	0.083	35.668	8.258
Control de almidón	1.315	0.029	34.67	5.133
Control de acarbosa (0.5mg/kg)	1.092	0.039	9.205	4.33

Control de vehículo	1.074	0.049	7.412	5.50
Control de extracto (PPHT)	1.063	0.019	6.914	2.113

APENDICE H

<b>Evaluación de efecto hipoglucémico de compuestos de <i>Cordia boissieri</i></b>				
Compuesto evaluado	Glucemia normalizada (mayor efecto observado)	Error estándar	% Reducción de glucemia (mayor efecto observado)	Error estándar
Alantoína (1 mg/kg)	0.855	0.074	14.48	7.3957
Alantoína (5 mg/kg)	0.898	0.055	10.164	5.481
Quebrachitol (1 mg/kg)	0.615	0.044	38.523	4.378
Quebrachitol (5 mg/kg)	0.715	0.048	28.453	4.817
Control de Insulina 5 U/kg	0.496	0.083	50.399	8.33
Control de vehículo	0.757	0.109	24.277	9.289

APENDICE I

<b>Evaluación de efecto antihiper glucémico de compuestos de <i>Cordia boissieri</i></b>				
Extracto evaluado	Glucemia normalizada (minut0 15)	Error estándar	% Incremento de glucemia (minuto 15)	Error estándar
Alantoína( 0.5 mg/kg)	1.101	0.035	10.11	3.524
Alantoína (2.5 mg/kg)	1.417	0.044	23773	4.24
Alantoína (5 mg/kg)	1.241	0.058	24.13	5.788
Quebrachitol( 0.5 mg/kg)	1.35	0.062	30.29	6.164
Quebrachitol(2.5 mg/kg)	1.34	0.047	33.614	4.468
Quebrachitol (5 mg/kg)	1.27	0.065	26.89	6.477
Control de almidón	1.315	0.029	34.67	5.133
Control de acarbosa (0.5mg/kg)	1.092	0.039	9.205	4.33
Control de vehículo	1.074	0.049	7.412	5.50
Control de extracto (PPHT)	1.063	0.019	6.914	2.113

APENDICE J

<b>Evaluación de efecto antidiabético de Quebrachitol</b>				
Compuesto evaluado	Glucemia normalizada (mayor efecto observado)	Error estándar	% Reducción de glucemia (mayor efecto observado)	Error estándar
Quebrachitol (1 mg/kg)	0.989	0.07	1.066	6.972
Quebrachitol (5 mg/kg)	0.693	0.164	30.671	16.395
Control de Insulina 5 U/kg	0.678	0.179	32.255	17.884
Control de vehículo	0.912	0.0631	8.77	6.307

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Marco Antonio Mendoza Escobedo

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica

Tesis: AISLAMIENTO DE COMPUESTO(S) A PARTIR DE *Cordia boissieri* CON ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

### Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 17 de Noviembre de 1986, hijo de Juana María Escobedo Obregón y Nemecio Mendoza Quintanilla.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de la Facultad de Medicina, con el grado obtenido de Químico Clínico Biólogo en 2015.

Experiencia Profesional: Laboratorista clínico en laboratorio alfa de enero del 2010 a agosto del 2010. Becario de investigación del departamento de química analítica del 2011-2014. Realicé prácticas profesionales en el Laboratorio de clínico y banco de sangre en el Hospital Universitario UANL.