

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE
Gochnatia hypoleuca*, *Brickellia eupatorioides* Y *Citrus limettioides
EN RATAS WISTAR TRATADAS CON ALOXANO

Por


M.E.C. SILVIA GUADALUPE TREVIÑO MORENO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

2024

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE
Gochnatia hypoleuca, Brickellia eupatorioides y Citrus limettioides
EN RATAS WISTAR TRATADAS CON ALLOXANO

Comité de Tesis



Dr. José Ezequiel Viveros Valdez
Presidente



Dra. María Julia Verde Star

Secretario



Dra. Catalina Rivas Morales

Vocal





Dra. Ruth Amelia Garza Padrón

Vocal



Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza

Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Niño
Subdirector de Posgrado

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE
Gochnatia hypoleuca, Brickellia eupatorioides y Citrus limettioides
EN RATAS WISTAR

Dirección de Tesis



Dr. José Ezequiel Viveros Valdez

Director



Dra. Paula Cordero Pérez

Asesor Externo

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar fuente donde se obtuvo mencionando el autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a la Dra. María Azucena Oranday Cárdenas (†), por haberme aceptado como su tesista y brindarme sus consejos, conocimientos y apoyo total en todo momento. Gracias hasta el cielo.

Al Dr. José Ezequiel Viveros Valdez por aceptar la dirección de este trabajo, por su paciencia, tolerancia y apoyo total siempre.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y las personas que han estado al frente de la dirección de esta, por su confianza y por permitirme la oportunidad de superación académica y profesional.

Al Departamento de Química, especialmente al Laboratorio de Química Analítica por el apoyo brindado con sus instalaciones y equipo para el desarrollo del presente trabajo y al MC. Juan Antonio Rodríguez Arzave por su amistad, apoyo y consejos.

A la Unidad de Hígado de la Facultad de Medicina de la UANL, específicamente a la Dra. Paula Cordero Pérez y a la Dra. Diana Patricia Moreno Peña, por su valioso y gran apoyo para el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Dra. María Julia Verde Star, Dra. Catalina Rivas Morales, Dra. María Adriana Núñez González, Dra. María Eufemia Morales Rubio, Dra. Ruth Amelia Garza Padrón, Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza, Dr. Raymundo Alejandro Pérez Hernández y MVZ. Gilberto Arévalo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado durante un año con la beca No. 298510 para la realización de estudios de Doctorado.

A mi amiga la Dra. Yolanda Gutiérrez Puente, por su amistad, consejos y apoyo en lo personal y en lo profesional siempre. Muchas muchas gracias.

A Adrián René Peña Herrera, por acompañarme en la parte final de este trabajo y ser paciente.

Gracias a Dios Padre, Contigo todo, sin Ti nada.

DEDICATORIA

A mi Madre:

María de la Luz Moreno Domínguez (†)

Ejemplo de fortaleza y tenacidad, por su apoyo incondicional en todo siempre, Gracias.

A mis Hijos:

Gregorio Daniel y Erick Román

Montemayor Treviño

Los amo.

INDICE

TÍTULO	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Definición de Diabetes Mellitus y Clasificación	2
2.2 Signos y Síntomas de la Diabetes	2
2.3 Radicales libres y estrés oxidativo.	3
2.4 Tratamiento farmacológico de la DM	3
2.5 Tratamiento con plantas medicinales	5
2.6 Generalidades de las plantas de estudio	6
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPÓTESIS	11
5. OBJETIVO DEL TRABAJO	12
5.1 Objetivo general	12
5.2 Objetivos particulares	12
6. MATERIAL Y MÉTODOS	13
6.1 Estrategia General	13
6.2 Colecta de material vegetal	13
6.3 Obtención de extractos	14
6.4 Perfil Fitoquímico	14
6.4.1 Insaturaciones por prueba de permanganato de potasio	15
6.4.2 Grupo carbonilo por prueba de 2,4- Dinitrofenilhidracina	15
6.4.3 Taninos por prueba de cloruro férrico	15
6.4.4 Terpenoides por prueba de Liebermann-Burchard	15
6.4.5 Esetroles por prueba de Salkowski	15
6.4.6 Cumarinas por prueba de NaOH	16

TÍTULO	Pag.
6.4.7 Carbohidratos por prueba de Molisch	16
6.4.8 Flavonoides por prueba de Shinoda	16
6.4.9 Flavonoides por prueba de ácido sulfúrico	16
6.4.10 Saponinas por prueba de agitación.	17
6.4.11 Saponinas por prueba del bicarbonato de sodio	17
6.4.12 Alcaloides por prueba de Dragendorff	17
6.4.13 Sesquiterpenlactonas por prueba de Baljet	17
6.5 Animales de Estudio	18
6.6 Inducción de diabetes	19
6.7 Diseño experimental	19
6.8 Bioensayo de evaluación del efecto hipoglucemiante agudo	20
6.9 Ensayos de inhibición enzimática <i>in vitro</i>	20
6.9.1 Evaluación del efecto inhibitorio de α -Glucosidasa	20
6.9.2 Evaluación del efecto inhibitorio de α -Amilasa	21
6.10 Determinación de contenido de Fenoles	21
6.11 Determinación de contenido de Flavonoides	21
6.12 Actividad antioxidante (atrapamiento de radicales libres)	22
6.12.1 Ensayo de DPPH	22
6.12.2 Ensayo de ABTS	22
7. RESULTADOS	23
8. DISCUSIÓN	27
9. CONCLUSIONES	31
10. PERSPECTIVAS	32
11. BIBLIOGRAFÍA	33

INDICE DE TABLAS

Tabla		
No.	Título	Página
1	Porcentaje de rendimiento y perfil fitoquímico de los extractos vegetales de estudio	24
2	Contenido fenólico, actividad antioxidante e inhibición enzimática de las plantas en estudio	26

INDICE DE FIGURAS

Figura No.	Pie de Figura	Página
1	Clasificación farmacológica de hipoglucemiantes orales	4
2	Clasificación de los tipos de insulina de acuerdo con el tiempo de acción fisiológica	5
3	<i>Brickellia eupatorioides</i>	7
4	<i>Gochnatia hypoleuca</i>	8
5	<i>Citrus limettioides</i>	9
6	Estrategia general de trabajo	13
7	Obtención de extractos vegetales	14
8	Pruebas cromogénicas de análisis fitoquímico en placa de porcelana	18
9	Inducción de diabetes con aloxano intraperitoneal	19
10	Niveles de glucosa, a las 0h y 6h después de la administración de glibenclamida o de los extractos en estudio.	25

LISTADO DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABTS	Sal de diamonio 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
CE	Equivalentes de Catequina
DM	Diabetes Mellitus
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
EC ₅₀	Concentración Efectiva media
EDR	Estadística de Defunciones Registradas
GAE	Equivalentes de Ácido Gálico
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria media
ig	intragástrico
ip	intraperitoneal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer Fosfato Salino
pNPG	p-nitrofenilo α -D-glucopiranosido

RESUMEN

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica con una prevalencia en rápido aumento, esta condición está relacionada con una producción aumentada de radicales libres, lo que podría conducir a problemas de salud adicionales. Se requieren más estudios y enfoques creativos para abordar esto, por lo que, los productos naturales podrían explorarse como posibles nuevos medicamentos antidiabéticos, sin embargo, es necesaria su validación. En este contexto, el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto hipoglucemiante y antioxidante de los extractos etanólicos de *Brickellia eupatorioides*, *Citrus limettioides* y *Gochnatia hypoleuca*. La actividad hipoglucemiante se probó en ratas Wistar con diabetes inducida por aloxano (150 mg / kg), así como el efecto inhibitorio sobre la α -glucosidasa y la α -amilasa. El potencial antioxidante se evaluó mediante los ensayos DPPH y ABTS, además se determinó el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides. Los resultados mostraron que el extracto etanólico de *B. eupatorioides* indujo un potente efecto hipoglucemiante *in vivo* con disminución significativa de glucosa a las 6 horas posteriores a la administración, similar al producido por la glibenclamida. La disminución podría estar relacionada con la inhibición de la α -glucosidasa. Además, el extracto mostró una potente actividad antioxidante, IC₅₀ de 33± 6 y 15± 2 μ g/mL con las técnicas DPPH y ABTS respectivamente. Los resultados demostraron la actividad hipoglucemiante y antioxidante de los extractos etanólicos de *B. eupatorioides* en ratas con diabetes inducida por aloxano, estas cualidades podrían usarse para tratar la hiperglucemia postprandial y modular la glucemia en humanos.

ABSTRACT

Diabetes is a chronic metabolic disease with a rapidly increasing prevalence, this condition is linked to an increased production of free radicals, which could lead to additional health problems. More studies and creative approaches are required to address this, so natural products could be explored as potential new anti-diabetic drugs, however, validation is necessary. In this context, the aim of the present study is to evaluate the hypoglycemic and antioxidant effect of ethanolic extracts of *Brickellia eupatorioides*, *Citrus limettioides* and *Gochnatia hypoleuca*. Hypoglycemic activity was tested in Wistar rats with alloxane-induced diabetes (150 mg/kg), as well as the inhibitory effect on α -glucosidase and α -amylase. The antioxidant potential was evaluated using the DPPH and ABTS assays, and the total content of phenolic and flavonoid compounds was determined. The results showed that the ethanolic extract of *B. Eupatorioides* induced a potent hypoglycemic effect *in vivo* with a significant decrease in glucose at 6 hours after administration, like that produced by glibenclamide. The decrease could be related to inhibition of α -glucosidase. In addition, the extract showed a powerful antioxidant activity, IC₅₀ of 33± 6 and 15± 2 μ g/mL with the DPPH and ABTS techniques respectively. The results demonstrated the hypoglycemic and antioxidant activity of ethanolic extracts of *B. eupatorioides* in rats with alloxane-induced diabetes, these qualities could be used to treat postprandial hyperglycemia and modulate glycemia in humans.

1. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus es una enfermedad caracterizada por un estado hiperglucémico crónico, originado por defectos en la secreción de insulina o por defectos en la acción de ésta, o ambos, así como desorden en el metabolismo de proteínas y lípidos. Las consecuencias de esta enfermedad son daños a largo plazo que derivan en la disfunción y fallo de varios órganos. (WHO, 2022)

El estado hiperglucémico que se observa en esta enfermedad produce modificaciones a nivel molecular en distintos tejidos del cuerpo, alterando su aspecto y funcionalidad, como por ejemplo la glicación de proteínas, que repercute en la formación de cataratas y retinopatía diabética, la degeneración axonal que ocasiona neuropatía; también entre estas alteraciones cabe resaltar el daño celular hepático que se produce como resultado de las reacciones del propio metabolismo oxidativo, el metabolismo de ciertos productos químicos endógenos y del metabolismo de fármacos que concluyen en la generación de radicales libres, los cuales producen envejecimiento y daño celular en general. (Singh, 2014)

La combinación de varios factores como la falta de concientización sobre la diabetes y el acceso insuficiente a los servicios de salud y a los medicamentos esenciales puede producir diversas complicaciones como la ceguera, insuficiencia renal o la amputación de miembros, situaciones que representan un gasto económico importante para el sector salud de nuestro país. (González, 2011)

La fitoterapia resulta un recurso valioso para el tratamiento de ésta y otras enfermedades que afectan a gran parte de la población, sin embargo, es necesario sustentar científicamente el empleo de las plantas consideradas como medicinales y documentar la naturaleza química y actividad biológica de los compuestos extraídos de las plantas tradicionalmente empleadas en el tratamiento de la enfermedad. (Esquivel-Gutiérrez, E.R. *et al.* 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1 Definición de Diabetes Mellitus y Clasificación

La diabetes mellitus es una a la enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. La hiperglucemia sostenida con el tiempo se asocia a daño, disfunción y falla de varios órganos y sistemas, especialmente riñones, ojos, nervios, corazón y vasos sanguíneos. (NOM-015-SSA2-2010)

Existen distintos tipos de diabetes, Tipo 1(DMT1), Tipo 2 (DMT2), Diabetes Gestacional (DMG) y diabetes originada de forma secundaria como consecuencia de otros padecimientos (Tipos específicos de diabetes). La DMT1 se presenta cuando hay destrucción autoinmune de las células β del páncreas, lo cual conduce a la nula producción de insulina, mientras que la DMT2 se desarrolla a consecuencia de una pérdida progresiva de la capacidad de producción de insulina. En ambos casos el resultado es una hiperglucemia. La DMG es un tipo de diabetes que desarrollan algunas mujeres durante el segundo o tercer trimestre de gestación con tendencia a la normoglicemia postalumbramiento (Care, D., 2019)

2.2 Signos y Síntomas de la Diabetes

Los síntomas clásicos de la DM son poliuria, polidipsia y polifagia, sin embargo, desafortunadamente en muchos casos, los individuos desconocen que están padeciendo la enfermedad ya que no se presentan síntomas hasta que el daño orgánico producido por la hiperglucemia es avanzado. Entre los signos de alerta que pueden ser reconocidos en un estadio temprano de la DMT2 se incluyen la repentina pérdida de peso y sin razón aparente, boca seca, hormigueo en las manos y pies, visión borrosa, cansancio, piel seca,

comezón en la piel, irritabilidad, cicatrización de heridas lenta e infecciones frecuentes del tracto genitourinario y cavidad oral. (Ramachandran, 2014)

2.3 Radicales libres y estrés oxidativo.

Los radicales libres son especies químicas que se producen como resultado de diversas reacciones metabólicas; tienen electrones desapareados y esta característica les confiere una alta reactividad, pueden unirse con otras biomoléculas y modificarlas, causando graves daños moleculares, por ejemplo, pueden oxidar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y producir subproductos tóxicos que conducen a la disfunción tisular. La hiperglucemia crónica que se presenta en la diabetes mellitus contribuye ampliamente a la generación de estos agentes. (Yaribeygi *et al*, 2020)

Existen varios tipos de radicales libres como son: a) especies reactivas de oxígeno, b) especies reactivas de nitrógeno, c) especies reactivas de cloro y d) algunos derivados de metales pesados. (Asmat *et al*, 2016)

El cuerpo humano tiene mecanismos naturales que ayudan a contrarrestar los efectos nocivos producidos por estas entidades, sin embargo, cuando se rompe el equilibrio entre agentes antioxidantes y agentes oxidantes, a favor de estos últimos, se genera el llamado estrés oxidativo, mismo que promueve el desarrollo de complicaciones de la diabetes mellitus como lo son nefropatía, neuropatía, afecciones cardíacas, degeneración macular, ulceraciones de pies, entre otras. Estas afecciones causan morbilidad y mortalidad considerables que derivan en altos costos para el sistema de salud pública. (Yaribeygi *et al*)

2.4 Tratamiento farmacológico de la DM

La Norma Oficial Mexicana establece los criterios de tratamiento para esta enfermedad el cual está orientado a tratar los síntomas, prevenir complicaciones, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por causa de la enfermedad y sus complicaciones. Para ello deben ser tomadas en cuenta las características de cada caso y las necesidades del paciente.

Los tipos de tratamiento van desde el no farmacológico en el que se incluyen programas de alimentación y ejercicio adecuados apoyados por automonitoreo de glucosa capilar, así como grupos de ayuda mutua en enfermedades crónicas, hasta el manejo farmacológico con medicamentos hipoglucemiantes de diversa índole. (PROY-NOM-015-SSA2-2018)

Los medicamentos que pueden emplearse para el control de la DMT-2 se muestran en la siguiente tabla, así como su forma de acción y sus efectos secundarios.

Hipoglucemiantes Orales

CLASIFICACIÓN FARMACOLÓGICA	FÁRMACO	MODO DE ACCIÓN	EFFECTOS SECUNDARIOS
Sulfonilureas	glipizida, gliburida, gliclazida, glimepirida	Estimulación de la secreción de insulina (secretagogo)	molestares intestinales, ansiedad, mareos
Meglitinidas	repaglinida y netaglinida	Estimulación de la secreción de insulina (secretagogo)	hipoglucemia, cefalea
Biguanidas	metformina	Aumenta sensibilidad a Insulinaza	diarrea, flatulencia, náusea, vómito
Thiazolidinedionas	rosiglitazona, pioglitazona	Aumenta sensibilidad a Insulinaza	edema, hipoglucemia, mialgia
α -Glucosidasa inhibidores	acarbose, miglitol, voglibosa	inhiben la reabsorción de polisacáridos	flatulencia, diarrea
DPP-4 inhibidores	sitagliptina, saxagliptina, vildagliptina, linagliptina, alogliptina	↓ liberación glucagon. ↑ liberación de insulina	hipoglucemia, nasofaringitis
SGLT2 inhibidores	dapagliflozina y canagliflozina	↓ reabsorción de glucosa a nivel renal	dislipidemia, náuseas, poliuria
Cycloset	bromocriptina	reversión de resistencia a insulina disminuye prod. glucosa	mareos, fatiga, cefalea, estreñimiento

Fig. 1 Clasificación farmacológica de hipoglucemiantes orales

(Ganesan *et al*, 2023)

La insulina es también una sustancia hipoglucemiante, que de acuerdo con las guías terapéuticas para tratamiento de DMT-1 y DMT-2, puede emplearse desde el momento del diagnóstico o bien en cualquier momento ya sea sola o en combinación con

hipoglucemiantes orales. (NOM-015-SSA2-2010) Existen diferentes tipos de insulina y se agrupan de acuerdo con el tiempo de inicio de la acción fisiológica y al tiempo de duración, tal como se muestra en la siguiente tabla:

TIPOS DE INSULINA

TIPO DE INSULINA	TIEMPO DE INICIO DE ACCIÓN	PICO MÁXIMO DE ACCIÓN	DURACIÓN	EFFECTO
ACCIÓN RÁPIDA	15 MIN	1 HORA	2 - 4 HRS	ADMINISTRACIÓN JUSTO ANTES DE LAS COMIDAS
INHALADA, ACCIÓN RÁPIDA	10 -15 MIN	30 MIN	3 HRS	ADMINISTRACIÓN JUSTO ANTES DE LAS COMIDAS
ACCIÓN REGULAR O CORTA	30 MIN	2 - 3 HRS	3 - 6 HRS	ADMINISTRACIÓN 30 - 60 MIN ANTES DE LAS COMIDAS
ACCIÓN INTERMEDIA	2 - 4 HRS	4 - 12 HRS	12 - 18 HRS	CUBRE NECESIDADES POR MEDIO DÍA O DURANTE LA NOCHE
ACCIÓN PROLONGADA	2 HRS	NO HAY PUNTO MÁXIMO	HASTA 24 HRS	CUBRE NECESIDADES POR UN DÍA ENTERO
ACCIÓN ULTRAPROLONGADA	6 HRS	NO HAY PUNTO MÁXIMO	≥ 36 HRS	CUBRE NECESIDADES POR LARGOS PERÍODOS
PREMEZCLADA	5 - 60 MIN	VARIABLE	10 - 16 HRS	SE ADMNISTRA 10 - 30 MIN ANTES DE DESAYUNO Y CENA COMBINA INSULINA ACCIÓN CORTA Y ACCIÓN INTERMEDIA

Fig. 2 Clasificación de los tipos de insulina de acuerdo con el tiempo de acción fisiológica

(Kuri, *et al.* . 2017)

2.5 Tratamiento con plantas medicinales

En Latinoamérica, la medicina tradicional o herbolaria ha sido ampliamente utilizada desde tiempos prehispánicos para el tratamiento de diversas enfermedades. Esta alternativa de tratamiento obedece en muchas ocasiones a la falta de acceso a programas de seguridad social en la población, al alto costo de los tratamientos de la medicina alópata, a la tradición que se tiene en algunos sectores de la población, pero en muchas ocasiones es debido a que los tratamientos farmacológicos tienen efectos adversos y el

empleo de plantas medicinales es una alternativa para tratar de controlar la enfermedad y evitar esos efectos secundarios.

En México hasta el 2005, había más de 300 especies de 235 géneros y 93 familias de plantas empleadas para el tratamiento de la diabetes, de las cuales sólo pocas de ellas han sido estudiadas científicamente para comprobar su efecto hipoglucemiante. Entre las familias mencionadas comúnmente se encuentran Asteraceae , Fabaceae, Solanaceae, Cactaceae, Laminaceae y Euphorbiaceae (Andrade y Heinrich, 2005). De todas esas especies, sólo para poco más de 100, se tiene información fitoquímica referente a sus metabolitos secundarios principales y son pocas también de las que se tiene registro de algún estudio científico de actividad farmacológica. (Figueroa, 2009)

2.6 Generalidades de las plantas de estudio

Los géneros *Brickellia* y *Gochnatia* pertenecen a la familia Asteraceae, mientras que el género *Citrus* pertenece a la familia Rutaceae.

La familia Asteraceae es también conocida como Compositae, es la más grande de la flora de México, cuenta con alrededor de 314 a 387 géneros y 3,057 especies, de las cuales 66 % son endémicas del país, se distribuyen desde las dunas o vegetación costera hasta los picos nevados de las altas montañas. Estas plantas son productoras de una amplia diversidad de metabolitos secundarios que utilizan como protección contra depredadores o competidores (Villaseñor, 2018).

Algunas especies del género *Brickellia* son empleadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de afecciones biliares, hepáticas y digestivas. Es una planta de tipo perenne que puede llegar a medir hasta 2 metros de altura desde su base leñosa, produce cabezas de flores de color amarillo, marrón o lavanda; se encuentra ampliamente distribuida en México desde Chihuahua hasta Oaxaca. (Argueta *et al.* 1994). *B. cavanillesii* y *B. veronicaefolia*, han mostrado actividad hipoglucemiante. (Escandón-Rivera, *et al.*, 2012), (Pérez, *et al.*, 2000).

Nombre científico: *Brickellia eupatorioides*

Reino: Plantae



Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Eupatoriae

Género: *Brickellia*

Especie: *eupatorioides*

Fig. 3. *Brickellia eupatorioides*

El género *Gochnatia* incluye más de 70 especies distribuidas en toda América; algunas especies han sido empleadas en la medicina tradicional de Brasil y Argentina para tratar afecciones de tipo respiratorio en general empleando la corteza y hojas. (dos Reis Piornedo *et al.* 2011). En la región noreste de México se ha empleado la parte aérea de *G. hypoleuca* como infusión para tratamiento empírico de la diabetes. *G. hypoleuca* es un árbol de tronco leñoso y delgado, las hojas tienen un color verde oscuro en el haz y blanco en el envés, por lo que en algunas poblaciones le llaman “falso olivo”, poseen inflorescencias en color blanco amarillentas y no aporta frutos.

Nombre científico: *Gochnatia hypoleuca*, *Nahuatlea hypoleuca*,

Reino: Plantae

Clase: Magnoliópsidae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Gochnatioideae

Tribu: Gochnatiae

Género: *Nahuatlea*, *Gochnatia*

Especie: *hypoleuca*



Fig. 4. *Gochnatia hypoleuca*

El género *Citrus* pertenece a la familia de las Rutáceas, son árboles que miden de 5 a 15 m, sus ramas por lo general son espinosas y las flores son de color blanco y muy aromáticas, de ellas se origina el fruto carnoso y jugoso, que dependiendo de la especie es el color, tamaño, sabor y forma. Estas plantas son originarias de Asia y en México se cultivan en 28 entidades federativas, lo que representa el 87.5 % del territorio nacional. (SENASICA, 2022). Los aceites esenciales y extractos de los frutos han sido ampliamente empleados en la medicina tradicional para el tratamiento de distintas enfermedades de tipo respiratorio, gastrointestinal, anticancerígeno, antimicrobiano y antioxidante. (Sidana *et al*, 2013). *Citrus limettioides* es conocida como lima dulce o lima dulce de Palestina. Los datos de estas actividades antes descritas son en su mayoría para los frutos. En Nuevo León, México, algunas personas usan las hojas de esta especie en infusiones como tratamiento para disminuir la glucosa sanguínea de forma empírica.

Nombre científico: *Citrus limettioides*,

Reino: Plantae

Clase: Magnoliópsidae

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae



Subfamilia: Aurantioideae

Tribu: Citrae

Género: Citrus

Especie: *limettioides*

Fig. 5. *Citrus limettioides*

3. JUSTIFICACIÓN

Según el informe de la Estadística de Defunciones Registradas (EDR) en 2022 publicado por el INEGI, la DM fue la segunda causa de muerte en México y la tercera a nivel estatal (INEGI, 2022). Otro dato fundamental de la epidemiología de la diabetes en el país es que alrededor de un 10% de la población desarrolla diabetes tipo 2 antes de los 40 años y esta condición los pone en una alta probabilidad de desarrollar complicaciones crónicas, debido a que están expuestos a los efectos de la hiperglucemia desde temprana edad, comparados con individuos que desarrollan la enfermedad posteriormente. (SS, 2001). Estos datos han llevado a las autoridades sanitarias de nuestro país a realizar campañas intensivas de prevención de la enfermedad, así como a proporcionar tratamiento gratuito a pacientes diagnosticados y afiliados a los sistemas de salud gubernamentales, con el fin de proporcionarle una mayor calidad de vida, sin embargo, el costo que se genera debido a esta atención es una cifra importante y aún más las complicaciones que se derivan del curso prolongado de la enfermedad y el tratamiento con fármacos alopáticos.

El uso de las terapias de la medicina ha sido limitada en la seguridad social de América Latina, mientras que en otras partes, como en Europa ha recibido más difusión, gracias a esto, en nuestro país, el sector salud público ha puesto particular atención en el estudio científico de las plantas empleadas en la herbolaria tradicional mexicana y como producto de ello ha logrado implementar su uso como parte de los tratamientos aplicados en la práctica médica.

Los datos obtenidos del presente estudio aportarán datos científicos de algunas de las plantas de uso popular a las que se les atribuye propiedades hipoglucemiantes no comprobadas científicamente y que son usadas en el norte de México, para que puedan ser empleadas con certeza para tal efecto biológico o descartadas, además de contribuir con datos complementarios para la etnofarmacología.

4. HIPÓTESIS

Los extractos de *Gochnatia hypoleuca*, *Brickellia eupatorioides*, y *Citrus limettioides*, tienen propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes.

5.- OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo General:

Determinar la actividad hipoglucemiante y antioxidante de los extractos orgánicos crudos de *Gochnatia hypoleuca*, *Brickellia eupatorioides* y *Citrus limettioides*.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener los extractos etanólicos crudos de *Gochnatia hypoleuca*, *Brickellia eupatorioides* y *Citrus limettioides*.
- Realizar perfil fitoquímico de los extractos mediante pruebas cromogénicas.
- Analizar la actividad hipoglucemiante de los extractos en estudios *in vivo* mediante un modelo murino
- Determinar el efecto hipoglucemiante de los extractos en estudios *in vitro*:
 Evaluar la actividad inhibitoria de α -Amilasa y de α - Glucosidasa
- Cuantificar el contenido fenólico en los extractos analizados.
- Determinar la actividad antirradical/antioxidante de los extractos crudos mediante las técnicas DPPH y ABTS

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estrategia general



Fig. 6 Estrategia general de trabajo

6.2 Colecta de material vegetal

B. eupatorioides fue colectada en el municipio de Galeana, Nuevo León, México. (25°39'08.23"N, 100°42'40.14"W, 1169m) en 2014 (número de registro 26846); *C. limettioides* de Montemorelos, Nuevo León (25°12'28.2"N 99°51'34.9"W) (número de registro 27789); y *G. hypoleuca* de Montemorelos, Nuevo León (25°12'28.2"N 99°51'34.9"W) (número de registro 27797). Las plantas fueron identificadas en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.3 Obtención de extractos

Cien gramos de hojas secas y molidas de cada una de las plantas se sometieron a extracción con etanol (Sigma-Aldrich) y maceración (tres sesiones de 24h cada una). La relación planta/disolvente fue de 1:10 (peso/volumen). Posteriormente se filtró por gravedad con papel Whatman No. 1 y el filtrado se recuperó en un vaso de precipitados de vidrio de 250 mL. Finalmente, los filtrados de cada especie fueron concentrados empleando un rotavapor a presión reducida a 60°C. Se vaciaron a un frasco de vidrio de boca ancha y se llevaron a sequedad total a temperatura ambiente protegidos de la luz y de fuentes contaminantes. Una vez secos, se cerró el frasco con tapa de rosca y se guardaron los extractos a 4°C para su uso posterior.



Fig. 7. Obtención de extractos vegetales

6.4 Perfil Fitoquímico

Los extractos crudos de cada planta fueron sometidos a pruebas químicas cualitativas para detectar la presencia de diferentes tipos de grupos funcionales. Se utilizaron tubos de ensayo o placas de porcelana de 12 pozos. (Domínguez, 1979). (Raaman, 2006).

6.4.1 Insaturaciones por prueba de permanganato de potasio

Se disolvió 1 mg de muestra en metanol y se le agregaron 3 gotas de permanganato de potasio al 2% en agua. La prueba fue positiva con la presencia de un precipitado café o la decoloración del reactivo.

6.4.2 Grupo carbonilo por prueba de 2,4-Dinitrofenilhidracina

Una muestra de 1mg del extracto se disolvió en etanol, se le añadió una solución saturada de 2-4-dinitrofenilhidracina en HCl 6N, la formación de un precipitado naranja indicó la presencia de compuestos con grupo carbonilo.

6.4.3 Taninos por prueba de cloruro férrico

Se disolvió 1 mg de muestra en etanol y se añadió una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 12.5%. La presencia de una coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde se consideró positiva.

6.4.4 Terpenoides por prueba de Liebermann-Burchard

Se mezcló 1 mL de anhídrido acético con 1 mL de cloroformo, se dejó enfriar en baño de agua fría y se le añadió una gota de ácido sulfúrico concentrado. Una vez preparada la mezcla reactiva se combinan 2 gotas del reactivo con 2 gotas del extracto y una coloración roja- café confirma la presencia de terpenoides.

6.4.5 Esteroles por prueba de Salkowski

Se colocó 1 mg de la muestra en 1 mL de cloroformo al cual se le agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. La reacción es positiva cuando se desarrollan colores amarillo o rojo.

6.4.6 Cumarinas por prueba de NaOH

En un tubo de ensayo se colocó 1 mg de extracto se le agregó 1 mL de NaOH al 10% , la salida del tubo se tapó con papel filtro , se colocó en baño de agua por 10 minutos. Posterior al enfriamiento, el papel se colocó bajo la luz ultravioleta y una fluorescencia amarilla fue evidencia de cumarinas. (de Oliveira Souza,2020)

6.4.7 Carbohidratos por prueba de Molisch

Se preparó el reactivo de Molish disolviendo 1 g de α -naftol en 100 mL de etanol al 95%. En un tubo de ensaye se mezclaron 1 mg del extracto con 1 – 2 gotas del reactivo de Molisch, posteriormente se agregó 2 mL de ácido sulfúrico concentrado por la pared del tubo inclinado. Es positivo cuando se forma un anillo de color morado o púrpura en la interfase.

6.4.8 Flavonoides por prueba de Shinoda

En un tubo de ensaye se disolvió 1mg de muestra con 1 mL de etanol y con una pizca de limaduras de magnesio, se le aplicó calor a 60°C y posteriormente se le agregaron unas gotas de HCl concentrado por la pared del tubo de ensaye. El desarrollo de coloración rojo, rosa se consideró positiva.

6.4.9 Flavonoides por prueba de ácido sulfúrico

Se disolvió 1 mg de muestra con 1 mL de hidróxido de amonio diluido, se le agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, la aparición de un color amarillo que se desvanece con el tiempo es evidencia de la presencia de flavonoides.

6.4.10 Saponinas por prueba de agitación.

Una porción del extracto se disolvió en 1 mL de agua destilada en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm y se agitó durante 3 a 5 minutos en agitador tipo vortex. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja estable por 30 minutos se consideró prueba positiva.

6.4.11 Saponinas por prueba del bicarbonato de sodio

La sal se preparó al 10% en agua, se disolvió 1 mg del extracto en etanol, se mezcló con 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agitó ligeramente la solución y se agregaron 2 a 3 gotas de la solución de bicarbonato. La producción de espuma y su permanencia por más de 1 minuto indicaron la presencia de saponinas

6.4.12 Alcaloides por prueba de Dragendorff

Se preparó el reactivo de trabajo de la siguiente manera:

Solución A: 0.85 g nitrato de bismuto , 40 mL agua destilada, 10 mL Ácido acético glacial

Solución B: 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada.

Solución reactiva: 5 mL de la solución A + 4 mL de la solución B y 100 mL de agua destilada.

Se mezclaron 4 gotas del extracto + 4 gotas de la solución reactiva. La presencia de un precipitado o turbidez de color rojo demostró la presencia de alcaloides.

6.4.13 Sesquiterpenlactonas por prueba de Baljet

Se preparan las soluciones de reactivo de Baljet: Solución A: Ácido pícrico 1 % en etanol, solución B: NaOH 10% en agua. Se mezclan en proporción 1:1 al momento de usarse.

Para la prueba se ponen de 1 mg de muestra y 2 gotas de reactivo (mezcla). La prueba es positiva cuando se desarrolla un color naranja o roja oscura

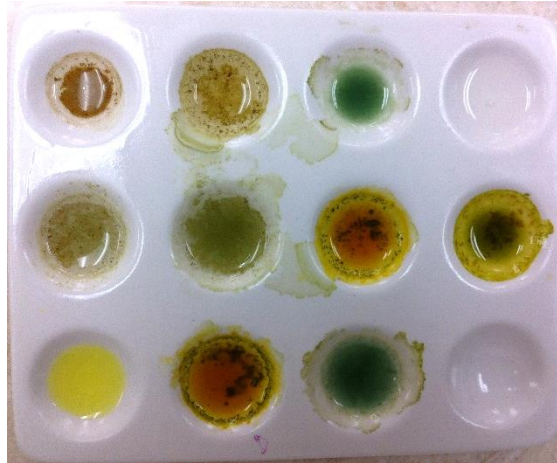


Fig. 8. Pruebas cromogénicas de análisis fitoquímico en placa de porcelana

6.5 Animales de Estudio

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UANL, (HII002) con base en la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Se emplearon 30 ratas hembra de la cepa Wistar, de 250g de peso promedio. Se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad relativa de $55 \pm 10\%$ y ciclos 12:12 h de luz/oscuridad.

6.6 Inducción de diabetes

La inducción de la diabetes en los animales de estudio se realizó mediante la administración intraperitoneal (ip) de Aloxano Sigma Aldrich (150 mg/kg), previo ayuno de 12 h. Posterior a la administración se les mantuvo en jaulas con acceso libre a alimento y solución glucosada durante 72 horas, monitoreando la glucemia diariamente durante siete días; las ratas con glucosa >250 mg/dL fueron seleccionadas para el estudio. Para la medición de la glucosa se empleó un glucómetro modelo Accu Check Performa marca Abbot. ®, usando como muestra sangre de la vena caudal obtenida por punción con lanceta. (Rodríguez-Magaña *et al* 2019).



Fig.9. Inducción de diabetes con aloxano intraperitoneal

6.7 Diseño experimental

Se distribuyeron las ratas en 6 grupos de 5 sujetos cada uno a las que se les administró el tratamiento descrito a continuación por vía intragástrica (ig):

Grupo I: Control Negativo Sano (suero fisiológico con 1% de Tween 20)

Grupo II: Control Diabético (suero fisiológico con 1% de Tween 20)

Grupo III: Grupo Glibenclamida [glibenclamida (Roche) 5 mg/kg de peso corporal]

Grupo IV: Grupo *B. eupatorioides* (extracto etanólico 100mg/kg de peso)

Grupo V: Grupo *C. limettioides* (extracto etanólico 100mg/kg de peso)

Grupo VI: Grupo *G. hypoleuca* (extracto etanólico 100mg/kg de peso)

6.8 Bioensayo de evaluación del efecto hipoglucemiante agudo

Se determinó la glucemia basal (0 h) en ayuno de 12 horas, a cada sujeto de estudio, posteriormente se le administró el tratamiento correspondiente vía intragástrica a cada grupo y se determinó de nuevo glucemia a las 6 h post-tratamiento. Este procedimiento se realizó durante siete días continuos.

Para la medición de la glucemia se empleó un glucómetro modelo Accu Check Performa marca Abbot. ®

6.9 Ensayos de inhibición enzimática *in vitro*

Los ensayos enzimáticos se realizaron empleando alfa amilasa de origen porcino (EC 3.2.1.1) Sigma Aldrich y alfa glucosidasa de *Sacharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20) Sigma Aldrich. Para medir la respuesta de inhibición de las enzimas se empleó un espectrofotómetro para microplacas de 96 pozos Agilent BioTek Epoch.

El porcentaje de inhibición fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(A_{\text{control neg}} - A_{\text{blanco}}) - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco muestra}})}{(A_{\text{control neg}} - A_{\text{blanco}})} \times 100$$

6.9.1 Evaluación del efecto inhibitorio de α -Glucosidasa

Se preparó una solución de α -glucosidasa 0.8U/mL en PBS 0.25 M (pH 6.8). A parte, se preparó una solución de p-nitrofenilo α -D-glucopiranosido (pNPG) 625 mM, en PBS.

Para el ensayo, se mezclaron 50 μ L de extracto vegetal con 50 μ L de solución enzimática y se incubaron a 37° C/10 min. Posteriormente, se añadieron 50 μ L de (pNPG) a cada pocillo y la solución se incubó a 37°C durante 45 min. La reacción se bloqueó mediante la adición de 100 μ L de solución de carbonato de sodio (0.2M). Se midió densidad óptica a 405 nm, utilizando un lector de microplacas (Agilent BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer). Se utilizó la acarbosa como control positivo.

6.9.2 Evaluación del efecto inhibitorio de α -Amilasa

Para el ensayo se llevó a cabo la dilución seriada del extracto vegetal o patrón en microplacas de 96 pocillos con 50 μ L de α -amilasa (1U/mL). Después de la incubación a 37 °C durante 15 minutos, se añadieron 50 μ L de solución de almidón (0.5%), seguida de una nueva incubación a 37 °C durante 20 minutos. A continuación, se añadieron 50 μ L de una solución de yodo (1%) a la muestra de ensayo y se midió la absorbancia a 750 nm (Caramantin *et al.* 2021). La reacción se bloqueó con 20 μ L de ácido clorhídrico (1M).

6.10 Determinación de contenido de Fenoles

El contenido total de compuestos fenólicos se determinó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se preparó una solución metanólica de 0.1g/mL de cada extracto. Se colocaron 100 μ L de cada muestra, 250 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (1 N), 1250 μ L de carbonato de sodio acuoso al 20% y 400 μ L de agua destilada en tubos de ensayo. El contenido de cada tubo se homogeneizó e incubó durante 2 h en oscuridad y a temperatura ambiente. La absorbancia de cada mezcla se midió a 760 nm. Se empleó ácido gálico como estándar y el contenido fenólico total se expresó como mg de ácido gálico eq./ g de extracto vegetal. Cada medición se realizó por triplicado. (Monroy-García *et al.* 2021).

6.11 Determinación de contenido de Flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó mediante el ensayo colorimétrico de cloruro de aluminio y nitrito de sodio. empleando catequina como referencia para la curva de calibración. Se preparó una dilución de cada extracto a una concentración de 1mg/mL con metanol. Posteriormente se colocaron 250 μ L de extracto diluido, se agregaron 1000 μ L de agua destilada y 75 μ L de nitrito de sodio acuoso al 7%. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se le agregaron 75 μ L de cloruro de aluminio acuoso al 10 %, posterior a 1 minuto de incubación, se le agregaron 500 μ L de NaOH 1N y 600 μ L de agua destilada. Se agitaron vigorosamente y se determinó la absorbancia a

496 nm. (Agilent BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer). Los resultados se expresaron como mg (+) Catequina eq./100g de extracto de planta. Se realizó el procedimiento por triplicado para cada extracto. (Monroy-García *et al.*, 2021)

6.12 Actividad antioxidante (atrapamiento de radicales libres)

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó mediante el método de ABTS 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) y mediante el método de DPPH (1,1-Difenil-2-picril-hidracilo) Ambos ensayos de decoloración. Los resultados fueron expresados como Concentración efectiva media (EC50) en $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se emplearon metanol y Trolox como control negativo y positivo respectivamente. (Viveros-Valdez *et al.*, 2008)

6.12.1 Ensayo de DPPH

En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se realizaron diluciones seriadas del extracto con metanol, colocando 100 μL de extracto diluido, se le agregaron 100 μL de DPPH a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se incubaron en oscuridad total durante 30 minutos, posteriormente se registraron las absorbancias de las muestras a $\lambda = 517 \text{ nm}$ en un lector de microplacas (Agilent BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer). El grado de decoloración indica la actividad de atrapamiento de radicales libres. El ensayo fue realizado por triplicado para cada extracto.

6.12.2 Ensayo de ABTS

Para la preparación del radical ABTS $\bullet+$ Se elaboró una solución de 2.5 ml ABTS a concentración de 7 mM, se mezcló con 2.5 ml de persulfato de sodio 2.45 μM durante 12 h en la oscuridad a 4 °C. Luego, la solución resultante se diluyó con etanol absoluto hasta obtener una absorbancia inicial de 0.70 ± 0.02 a 754 nm. Para el ensayo se colocaron 1500 μL de solución ABTS $\bullet+$ y se agregaron 500 μL del extracto (2 mg/mL) en una cubeta mantenida a 30 °C. Se agitó vigorosamente y se dejó reaccionar durante 7 min, luego se leyó la absorbancia a 754 nm.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación taxonómica de las especies en estudio

Los especímenes en estudio fueron identificados taxonómicamente en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, confirmándose género y especie de *Brickellia eupatorioides*, (registro No. 26846) *Citrus limettioides* (registro No. 27799) y *Gochnatia hypoleuca*. (registro No. 27797).

7.2 Obtención de extractos y porcentaje de rendimiento

El porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos por maceración se presenta en la Tabla No. 1. *G. hypoleuca* mostró el porcentaje de rendimiento mayor con 14.6%, mientras que para *C. limettioides* y *B. eupatorioides* fue de 11.14% y 6.8% respectivamente.

7.3 Perfil fitoquímico

El perfil fitoquímico preliminar se muestra en la Tabla No. 1. En ella se observa que los extractos crudos (etanólicos) de las tres especies poseen una gran variedad de compuestos químicos con instauraciones, grupos carbonilo y la presencia de compuestos de tipo taninos, esteroides, triterpenoides, cumarinas, carbohidratos y flavonoides y además se distingue la ausencia de saponinas.

	<i>B. eupatorioides</i>	<i>C. limettioides</i>	<i>G. hypoleuca</i>
Porcentaje de rendimiento	6.8%	11.14%	14.6%
Insaturaciones	+	+	+
Grupo carbonilo	+	+	+
Taninos	+	+	+
Esteroles	+	+	+
Triterpenos	+	+	+
Cumarinas	+	+	+
Carbohidratos	+	+	+
Flavonoides	+	+	+
Saponinas	-	-	-

Tabla 1: Rendimiento (%) y perfil fitoquímico de los extractos crudos analizados.

7.4 Bioensayo de Actividad hipoglucemiante

En la Fig. 10 se muestra el efecto hipoglucemiante inducido por *B. eupatorioides*. El aloxano ip (150 mg/kg de peso) aumento los niveles glicémicos en sangre, de 118.6 ± 6.28 a 478.8 ± 59.17 mg/dL (en comparación con el G-I). Este efecto se mantuvo durante toda la prueba. En G-III (glibenclamida) hubo una disminución significativa en los niveles de glucosa (388.8 ± 43.21 mg/dL); en G-IV, el tratamiento con *B. eupatorioides* (100 mg/kg) a las 6 h mostró una reducción significativa de los niveles de glucosa (385.3 ± 38.52); G-V (*C. limettioides*) y G-VI (*G. hypoleuca*) no mostraron actividad hipoglucemiante.

Grupo I: Control Negativo Sano (suero fisiológico con 1% de Tween 20)

Grupo II: Control Diabético (suero fisiológico con 1% de Tween 20)

Grupo III: Grupo Glibenclamida (glibenclamida (Roche) [5 mg/kg] de peso corporal)

Grupo IV: Grupo *B. eupatorioides* (extracto etanólico [100mg/kg de peso])

Grupo V: Grupo *C. limettioides* (extracto etanólico [100mg/kg de peso])

Grupo VI: Grupo *G. hypoleuca* (extracto etanólico [100mg/kg de peso])

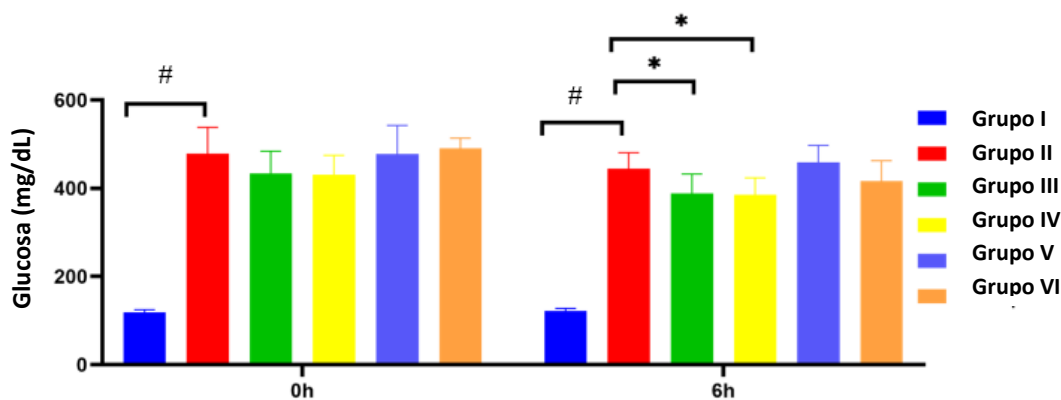


Fig. 10. Niveles de glucosa, a las 0h y 6h después de la administración de glibenclamida o de los extractos en estudio. # $p < 0,0001$ vs. G-II; * $p < 0,05$ vs. G-II. Los valores se expresan como media \pm DE.

7.5 Contenido fenólico, actividad antioxidante e inhibición enzimática

La Tabla 2 muestra que el efecto antioxidante del extracto de *B. eupatorioides* es más efectivo que los otros dos. Se observa un potente efecto contra los radicales libres DPPH y ABTS donde los valores de EC₅₀ fueron 33±6 y 15±2 µg/mL, respectivamente. Esto podría estar relacionado con su alto contenido de fenoles [190±31 GAE/g] y flavonoides [65±7 CE/g]. La tabla también muestra un marcado efecto inhibitorio sobre la α-glucosidasa, valor de IC₅₀ = 0.48±0.06 mg/mL y un pobre efecto sobre α-amilasa, valor de IC₅₀ = 2.66±0.9 mg/mL.

Muestra	Fenoles (mg/g)	Flavonoides (mg/g)	DPPH (CE ₅₀ , µg/mL)	ABTS (CE ₅₀ , µg/mL)	α-Glucosidasa (IC ₅₀ , mg/mL)	α-Amilasa (IC ₅₀ , mg/mL)
<i>B. eupatorioides</i>	190 ± 31	65 ± 7	33± 6 ^a	15± 2 ^a	0.48 ± 0.06 ^a	2.66 ± 0.9 ^a
<i>C. limettioides</i>	62 ± 13	12 ± 0.8	>100	>100	>2	>10
<i>G. hypoleuca</i>	114 ± 20	35 ± 9	68 ± 10	53 ± 15	1.64 ± 0.3	>10
*Control	–	–	18 ± 3 ^b	7 ± 0.8 ^b	0.12± 0.02 ^b	0.97 ± 0.08 ^b

*Se empleó Trolox como control positivo en actividad antioxidante y acarbosa en los ensayos de inhibición enzimática. N =6, (a-b) indica significancia p<0.05.

Tabla 2. Contenido fenólico, actividad antioxidante e inhibición enzimática de las plantas en estudio.

8. DISCUSIÓN

La DMT2 es una complicación en los diversos sectores de salud pública mundial que ha adquirido dimensiones considerables en países en desarrollo como México (Atlas, D. 2021, Tinajero y Malik 2021). En este país, las plantas medicinales juegan un rol protagonista en el tratamiento de esta, ya se han realizado estudios exploratorios para validar su efecto hipoglucemiante (Torres-Vanda *et al* 2023). Con base en esto, el presente estudio aborda la actividad hipoglucemiante y antioxidante de las especies vegetales seleccionadas.

En la búsqueda de compuestos hipoglucemiantes naturales, ya se ha reportado el potencial del género *Brickellia*. Un extracto hexánico de *Brickellia veronicaefolia* (concentración 300mg/kg) disminuyó 72.13% los niveles glicémicos a las 4, 5h tras su administración oral (Pérez-Gutiérrez *et al* 1998). Además, un compuesto aislado de esta planta mostró actividad hipoglucemiante en ratones tratados con aloxano (Pérez *et al* 2000). El extracto de té liofilizado de *Brickellia cavanillesii* exhibió actividad antidiabética *in vitro* en células HepG2 expuestas a 0.2 mg/mL de extracto de té durante 2, 4, 6 y 24 h, lo que sugiere que la expresión facilitada de la proteína transportadora de glucosa 2 (GLUT-2) aumentó (Eshiet *et al.* 2014).

Ya se ha reportado la actividad relevante de los extractos polares de plantas medicinales en modelos de DM inducida por aloxano. Por ejemplo, un extracto metanólico de hojas de *Morus mesozygia* a [200 mg/kg] disminuyó los niveles de glucosa a 273 ± 16.23 mg/dL a las 4 h después de la administración (Tirwomwe *et al.* 2019); el extracto acuoso de *Tectaria heracleifolia* a [100 y 300 mg/kg] mostró una disminución a niveles similares a los obtenidos con glibenclamida a las 3 h y 5 h después de la ingestión (Luna-Rodríguez *et al.* 2019); los extractos acuosos y etanólicos de *Caralluma attenuata* a 100 mg/kg disminuyeron los niveles de glucosa en sangre a 162 ± 2.76 y 150 ± 3.94 mg/dL, respectivamente, 3 h después a su administración (Venkatesh *et al.* 2003). En el presente

estudio, el extracto etanólico de *B. eupatorioides* (concentración 100 mg/kg) también indujo un potente efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas, esto a las 6 h después de la administración, efecto similar al producido por la glibenclamida utilizado como control positivo.

En cuanto al género *Citrus*, varias especies han mostrado un efecto hipoglucemiante. Se ha informado que *Citrus pseudolimon* (Naim *et al.* 2012), *Citrus paradisi* (Adeneye *et al.* 2008), *Citrus aurantifolia* (Ramya *et al.* 2020) y *Citrus sinensis* (Parmar y Kar 2007) disminuyen los niveles elevados de glucosa y lípidos en ratas diabéticas inducidas por aloxano (en algunos casos similares a los producidos por glibenclamida). En el presente estudio, *Citrus limettioides* redujo ligeramente los niveles glicémicos en ratas a las 6 h post-tratamiento, pero esto no fue significativo.

El género *Gochnatia* se ha asociado principalmente con actividad antiinflamatoria y antimicrobiana. Se ha reportado que *Gochnatia pulchra* tiene actividad antileishmanial (Lucarini *et al.* 2012), mientras que *Gochnatia polymorpha* tiene actividad antiespasmódica (dos Reis Piornedo *et al.* 2011) y antiinflamatoria (Moreira *et al.* 2000). Además, se ha reportado que *G. polymorpha* tiene la capacidad de inhibir la aldosa reductasa, enzima que cataliza la glucosa en sorbitol, su acumulación en el tejido nervioso se ha relacionado al desarrollo de la neuropatía diabética. (Ferro y Degen 2011). Sin embargo, en el presente estudio, la especie *G. hypoleuca* no mostró efecto hipoglucemiante en ratas inducidas con aloxano.

Para el tratamiento complementario de la DM es frecuente el uso de inhibidores de la absorción postprandial de hidratos de carbono. Estos fármacos inhiben algunas enzimas, como la α -amilasa y la α -glucosidasa (Tundis *et al.* 2010) sin embargo, traen efectos no deseados. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos y/o mejores inhibidores de enzimas digestivas se incluye en la investigación de productos naturales (Governa *et al.* 2018). En este sentido, *B. eupatorioides* tiene un efecto pobre sobre la inhibición de la α -amilasa

(IC₅₀: 2.66±0.9 mg/mL), pero un efecto inhibitorio considerable sobre la enzima α -glucosidasa (IC₅₀: 0.48±0.06 mg/mL). Esto puede estar relacionado con el efecto hipoglucemiante mostrado en el modelo murino. Además, se ha informado de una amplia variedad de metabolitos secundarios con un efecto inhibitorio de la α -glucosidasa, incluidos fenoles y flavonoides (Ćorković 2022).

El extracto etanólico de *B. eupatorioides* tuvo un contenido total de fenoles de 190±31 mg/g, valor similar al reportado por Aryal *et al.* 2019 en diferentes especies (72.66-292.65 mg/g) y un alto contenido de flavonoides (65±7 mg/g), superior al encontrado por Ćorković, que reportó contenido en el rango de 6.61-39.38 mg/g. La importancia y relevancia de los flavonoides en el género *Brickellia* ya han sido reportadas por Goodwing *et al.* en 1984. Se aisló la flavona 5, 7, 3'-trihydroxy-3, 6, 4'-trimethoxyflavona (centaureidina) con efectos antioxidantes e hipoglucemiantes de *B. veronicaefolia* (Pérez *et al.* 2020). Como se desprende de la discusión anterior, es relevante e importante continuar con el estudio de especies del género *Brickellia*, como *B. eupatorioides*, para el tratamiento complementario de la DM.

El aloxano utilizado para inducir hiperglucemia en ratones es un análogo químico-estructural de la glucosa, el cual se que se acumula en las células beta pancreáticas a través del transportador de glucosa GLUT-2, generando especies reactivas de oxígeno, desencadenando luego el estrés oxidativo que provoca la muerte de las células beta (Lenzen 2008). Esto aclara la relevancia y el papel fundamental que juegan los antioxidantes en el desarrollo y progresión de la DM y sus complicaciones relacionadas (Yaribeygi *et al.* 2020).

En el presente trabajo, la capacidad antirradical/antioxidante de los extractos etanólicos también se determinó mediante los ensayos de eliminación de radicales DPPH y ABTS. En el caso de *B. eupatorioides*, los resultados mostraron una concentración efectiva media (CE50) de 33±6 mg/mL para el ensayo DPPH similar a la notificada para las plantas

medicinales (35.8-47.7 mg/ml) (de la Cruz-Jiménez *et al.* 2022) y las plantas comestibles (9.89-45.68 mg/mL) (Monroy-García *et al.* 2021). Para el ensayo ABTS, *B. eupatorioides* y *G. hypoleuca* dieron resultados comparables a los valores reportados para otras plantas medicinales (15.7-75.6mg/mL) (de la Cruz-Jiménez *et al.* 2022).

9. CONCLUSIONES

- Los extractos etanólicos de hojas de *Gochnatia hypoleuca* y *Citrus limettioides* no exhiben actividad hipoglucemiante en la concentración evaluada y su capacidad de captura de radicales libres no es sobresaliente.
- El extracto etanólico de *Brickellia eupatorioides* mostró efecto hipoglucemiante en el ensayo *in vivo* en concentración de 100 mg/kg, lo cual coincide con el efecto inhibitorio *in vitro* sobre la enzima digestiva α - glucosidasa.
- *B. eupatorioides* mostró el mayor contenido de fenoles y flavonoides totales y mayor capacidad de captura de radicales libres que las otras dos plantas en estudio.
- Los resultados sugieren que *Brickellia eupatorioides* posee potencial como agente hipoglucemiante y antioxidante.

10. PERSPECTIVAS

Es necesario realizar investigaciones para aislar y caracterizar químicamente el o los compuestos bioactivos relacionados al efecto hipoglucemiante y antioxidante de *Brickellia eupatorioides*.

También sería conveniente investigar el comportamiento del extracto etanólico de *Brickellia eupatorioides* en combinación con hipoglucemiantes orales para evaluar una posible sinergia.

11. BIBLIOGRAFÍA

- World Health Organization. 2022. Diabetes Fact Sheet. Disponible en : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
- Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 18(1), 1.
- González, C.A.F . 2011. Diabetes mellitus como factor de riesgo cardiometabólico. Sociedad Mexicana para el Estudio de la Hipertensión Arterial. México. Ed. González Caamaño.
- Esquivel-Gutiérrez, E., Noriega-Cisneros, R., Bello-González, M., Saavedra-Molina, A., & Salgado-Garciglia, R. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*, 14(1), 45-52.
- Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. DOF: 23/11/2010
- Care, D. (2019). Care in Diabetes 2019. *Diabetes care*, 42(1), S13-S28..
- Ramachandran, A. (2014). Know the signs and symptoms of diabetes. *The Indian journal of medical research*, 140(5), 579.
- Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2020). Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020.
- Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress— A concise review. *Saudi pharmaceutical journal*, 24(5), 547-553.
- PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-015-SSA2-2018, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la Diabetes Mellitus. DOF-2018

- Ganesan K, Rana MBM, Sultan S. Oral Hypoglycemic Medications. [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482386/>
- Kuri Morales, P., Alvares Lucas, C., Lavalle González, F., González Chávez, A., Ríos González, J., & Bárcena, D. G. (2007). Uso de insulinas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 y 2. *Rev Mex Cardiol*, 19, 57-98.
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 99(3), 325-348.
- Figueroa Hernández, J. L. (2009). Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina. *Revista digital universitaria*, 10(9), 1-11
- Villaseñor, J. L. (2018). Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. *Botanical Sciences*, 96(2), 332-358.
- Argueta, A., Cano Asseleih, L. M., & Rodarte García, M. E. (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana* (No. C QK 99. M6. A84 1994).
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., & Mata, R. (2012). α -Glucosidase inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *Journal of natural products*, 75(5), 968-974.
- Perez G, R. M., Cervantes C, H., Zavala S, M. A., Sanchez A, J., Perez G, S., & Perez G, C. (2000). Isolation and hypoglycemic activity of 5, 7, 3'-trihydroxy-3, 6, 4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytomedicine*, 7(1), 25-29.
- dos Reis Piornedo, R., de Souza, P., Stefanello, M. É. A., Strapasson, R. L. B., Zampronio, A. R., & Kassuya, C. A. L. (2011). Anti-inflammatory activity of extracts and 11, 13-dihydrozaluzanin C from *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* trunk bark in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 133(3), 1077-1084.
- SENASICA. 2022. Análisis de impacto económico ante un posible establecimiento y dispersión del Cancro de los cítricos en México en áreas comerciales. [Online] Disponible en : <https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2022/agosto/An%C3%A1lisisdeimpac toecon%C3%B3micoanteunposibleestablecimientoydispersi%C3%B3ndelCancr>

[odelosc%C3%ADtricosenM%C3%A9xicoen%C3%A1reascomerciales_107e4f44-49be-4b9a-8058-df20da906b1a.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/EDR/EDR2022-Dft.pdf)

- Sidana, J., Saini, V., Dahiya, S., Nain, P., & Bala, S. (2013). A review on citrus-“the boon of nature”. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 18(2), 20-27.
- INEGI. Estadística de Defunciones Registradas. 2022. [Online] disponible en : <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/EDR/EDR2022-Dft.pdf>
- Secretaría de Salud, Programa de Acción: Diabetes Mellitus. 2011. Pag. 20. México. ISBN 970-721-001-X [Online] Disponible en http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/diabetes_mellitus.pdf
- Domínguez XA. 1979. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial LIMUSA, S.A. de C. V. México, D.F.
- Raaman, N. (2006). *Phytochemical techniques*. New India Publishing. pp.19-24
- de Oliveira Souza, A., Bessa, D. H. R. F., Fernandes, C. C., Pereira, P. S., Martins, C. H. G., & Miranda, M. L. D. (2020). Phytochemical screening of extracts from *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil.(Rutaceae) leaves and their in vitro antioxidant and anti-*Listeria monocytogenes* activities. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 42, 1-10.2
- Rodríguez-Magaña, M. P., Cordero-Pérez, P., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., Moreno-Peña, D. P., García-Hernández, D. G., & Leos-Rivas, C. (2019). Hypoglycemic activity of *Tilia americana*, *Borago officinalis*, *Chenopodium nuttalliae*, and *Piper sanctum* on Wistar rats. *Journal of Diabetes Research*, 2019.
- Caramantin-Soriano MP, Martino-Cruz DJ, Córdor-Cuyubamba EA, De León-Palomo O and Viveros-Valdez E (2021). Antibacterial and Enzyme Inhibition Capacities of Peruvian Lichens: *Xanthoparmelia tasmanica* and *Flavopunctelia flaventior*. *Int. J. Pharmacol.*, 17(8): 606–610.
- Monroy-García, I. N., Carranza-Torres, I. E., Carranza-Rosales, P., Oyón-Ardoiz, M., García-Estévez, I., Ayala-Zavala, J. F., ... & Viveros-Valdez, E. (2021). Phenolic profiles and biological activities of extracts from edible wild fruits *Ehretia tinifolia* and *Sideroxylon lanuginosum*. *Foods*, 10(11), 2710.

- Viveros-Valdez, E., Rivas-Morales, C., Carranza-Rosales, P., Mendoza, S., & Schmeda-Hirschmann, G. (2008). Free radical scavengers from the Mexican herbal tea “poleo”(Hedeoma drummondii). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63(5-6), 341-346.
- Atlas, D. (2015). International diabetes federation. IDF Diabetes Atlas, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 33(2).
- Tinajero, M. G., & Malik, V. S. (2021). An update on the epidemiology of type 2 diabetes: a global perspective. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 50(3), 337-355.
- Torres-Vanda, M., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2023). Mexican Plants Involved in Glucose Homeostasis and Body Weight Control: Systematic Review. *Nutrients*, 15(9), 2070.
- Pérez-Gutiérrez, R. M., Pérez-González, C., Zavala-Sánchez, M. A., & Pérez-Gutiérrez, S. (1998). Actividad hipoglucemiante de Bouvardia terniflora, Brickellia veronicaefolia y Parmentiera edulis. *Salud pública de México*, 40, 354-358.
- Perez G, R. M., Cervantes C, H., Zavala S, M. A., Sanchez A, J., Perez G, S., & Perez G, C. (2000). Isolation and hypoglycemic activity of 5, 7, 3'-trihydroxy-3, 6, 4'-trimethoxyflavone from Brickellia veronicaefolia. *Phytomedicine*, 7(1), 25-29.
- Eshiet, E. R., Zhu, J., & Smith, E. E. (2014). Lyophilized tea extracts of Brickellia cavanillesii (Asteraceae): in vitro characterization of biological activity. *Journal of food science*, 79(7), T1454-T1461.
- Tirwomwe, M., Echoru, I., Maseruka, R., Kimanje, K. R., & Byarugaba, W. (2019). Hypoglycemic and toxic effect of Morus mesozygia leaf extract on the liver and kidneys of alloxan-induced hyperglycemic wistar rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- Luna-Rodríguez, A. K., Zenil-Zenil, M. A., Cristians, S., Osuna-Fernández, A. M., & Osuna-Fernández, H. R. (2022). Evaluation of the hypoglycemic effect of Tectaria heracleifolia (Willd.) Underw. in mice with induced type 2 diabetes. *Polibotánica*, (54), 203-217.

- Venkatesh, S., Reddy, G. D., Reddy, B. M., Ramesh, M., & Rao, A. A. (2003). Antihyperglycemic activity of *Caralluma attenuata*. *Fitoterapia*, *74*(3), 274-279.
- Naim, M., Amjad, F. M., Sultana, S., Islam, S. N., Hossain, M. A., Begum, R., ... & Amran, M. S. (2012). Comparative study of antidiabetic activity of hexane-extract of lemon peel (*Limon citrus*) and glimepiride in alloxan-induced diabetic rats. *Bangladesh Pharm. J*, *15*(2), 131-134
- Adeneye, A. A. (2008). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of methanol seed extract of *Citrus paradisi* Macfad (Rutaceae) in alloxan-induced diabetic Wistar rats. *Nigerian quarterly journal of hospital medicine*, *18*(4), 211-215.
- Ramya, S., Narayanan, V., Ponnerulan, B., Saminathan, E., & Veeranan, U. (2020). Potential of peel extracts of *Punica granatum* and *Citrus aurantifolia* on alloxan-induced diabetic rats. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, *9*(1), 1-11.
- Parmar, H. S., & Kar, A. (2007). Antidiabetic potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan treated male mice. *Biofactors*, *31*(1), 17-24.
- Lucarini, R., Salloum, A. I. O., Rezende, K. C. S., Esperandim, V. R., Ferreira, D. S., Magalhães, L. G., ... & Martins, C. H. G. (2012). Antileishmanicidal activity of *Gochnatia pulchra*. *Planta Medica*, *78*(11), PI416.
- Moreira, A. S., Spitzer, V., Schapoval, E. E. S., & Schenkel, E. P. (2000). Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *14*(8), 638-640.
- Ferro, E., & Degen de Arrúa, R. L. (2011). Actividad inhibitoria de extractos de plantas medicinales de Paraguay sobre Aldosa Reductasa de cristalino de rata. *Rojasiana*, *10*(2), 31-42.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *10*(4), 315–331. <https://doi.org/10.2174/138955710791331007>

- Governa, P., Bains, G., Borgonetti, V., Cettolin, G., Giachetti, D., Magnano, A. R., ... & Biagi, M. (2018). Phytotherapy in the management of diabetes: a review. *Molecules*, 23(1), 105.
- Ćorković, I., Gašo-Sokač, D., Pichler, A., Šimunović, J., & Kopjar, M. (2022). Dietary polyphenols as natural inhibitors of α -amylase and α -glucosidase. *Life*, 12(11), 1692.
- Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., & Koirala, N. (2019). Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. *Plants*, 8(4), 96.
- Goodwin, R. S., Rosler, K. H. A., Mabry, T. J., & Varma, S. D. (1984). Flavonoids from *Brickellia glutinosa*. *Journal of natural products*, 47(4), 711-714.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-226.
- De La Cruz-Jiménez, L., Hernández-Torres, M. A., Monroy-García, I. N., Rivas-Morales, C., Verde-Star, M. J., Gonzalez-Villasana, V., & Viveros-Valdez, E. (2022). Biological activities of seven medicinal plants used in Chiapas, Mexico. *Plants*, 11(14), 1790.