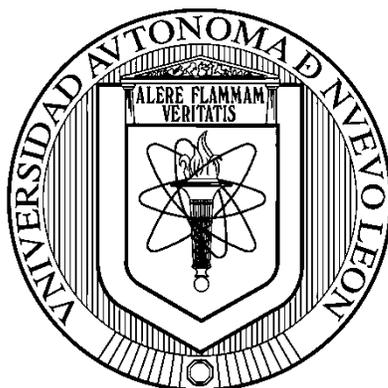


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TERPENOS AISLADOS
A PARTIR DE *Turnera diffusa* EN UN MODELO DE
CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN CÉLULAS HEPG2
RESISTENTES A INSULINA**

Por

Q.C.B. MARCO ANTONIO AGUIRRE GÓMEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Química
Biomédica**

Julio 2024

RESUMEN

QCB Marco Antonio Aguirre Gómez Fecha de graduación: 25 de julio de 2024

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TERPENOS AISLADOS A PARTIR DE *Turnera diffusa* EN UN MODELO DE CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN CÉLULAS HEPG2 RESISTENTES A INSULINA**

Número de páginas: 110

Área de estudio: Química Analítica

Propósito y método de estudio: En México la diabetes mellitus es una de las principales causas de muerte y su incidencia va en aumento. El desarrollo de nuevos fármacos es una necesidad creciente debido a los distintos efectos adversos que poseen los tratamientos actuales. Como fuente de potenciales nuevos fármacos se encuentran los productos naturales. A partir de *Turnera diffusa* se habían aislado previamente tres compuestos a los cuales se les analizó su actividad antidiabética *in vitro*. El propósito de este trabajo fue identificar los compuestos aislados de *T. diffusa* y analizarlos en un modelo *in vitro* para estudiar algún posible mecanismo de acción. El modelo *in vitro* fue un modelo de sensibilización a la insulina con células HepG2 insulinoresistentes.

Contribuciones y conclusiones: Los compuestos aislados se identificaron como teuhetenona A, 11-hidroxi-valenc-1(10)-en-2-ona, y apigenina. La teuhetenona A mostró la mayor actividad sensibilizante a la insulina, seguido de la 11-hidroxi-valenc-1(10)-en-2-ona. No se observó actividad sensibilizante con la apigenina.

Firma del director de tesis



Dra. Cecilia Delgado Montemayor

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TERPENOS AISLADOS A PARTIR DE

Turnera diffusa EN UN MODELO DE CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN

CÉLULAS HEPG2 RESISTENTES A INSULINA

Aprobación de tesis



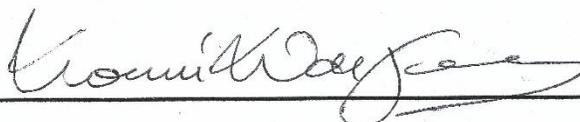
Dra. C. Cecilia Delgado Montemayor

Directora de tesis



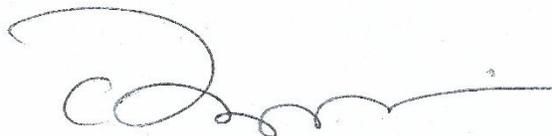
Dra. C. Graciela Granados Guzmán

Codirectora de tesis



Dra. C. Noemí Herminia Waksman Minsky

Comisión de tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de estudios de posgrado

AGRADECIMIENTOS

Muchas cosas pueden cambiar en el trayecto de dos años. Aunque en esencia la mayoría de las cosas se mantienen igual, muchas pequeñas cosas se han añadido o se han ido.

Quisiera agradecer primero a la doctora Cecilia que me permitió ser su tesista de posgrado, por haberme recibido durante otros dos años después de la licenciatura. Por ver por mí cuando se necesitaba y estar al pendiente de posibles oportunidades. He aprendido tantas cosas gracias a ella.

A la doctora Nohemí por recibirme en su laboratorio y permitirme entrar en la maestría. De no haber sido por ella durante la licenciatura mi vida hubiera sido muy diferente.

A mis compañeros de la maestría que estuvieron conmigo compartiendo cubículo durante estos dos años. A Paola y a Miguel que nos apoyábamos cuando las cosas se veían turbias y nos relajábamos cuando se necesitaba un descanso. Las comidas en la cafetería hubieran sido muy solitarias sin su compañía.

También a mis amigos de la secundaria que, si bien, ha disminuido la frecuencia que nos vemos por cuestiones de la vida; siempre es un gusto volver a verlos y

son una parte especial de mi vida. A Azael, Daniel, Juampi, Marifer, Alex, Kito, Gonzalo y demás personas que disfruto tanto verlas.

Una parte importante durante estos dos años fue el equipo de animación de la Facultad de Medicina. Gracias por proporcionarme un espacio donde me sentía cómodo, donde podía hacer acondicionamiento físico y donde pude conocer a tantas personas que sé que van a ser médicos exitosos algún día. No podría mencionar a tantas personas con las que conviví, pero puedo destacar al doctor Juan Villa que confió en mí para poder liderar al equipo. Gracias Juan por llevarnos a conseguir un tercer lugar y enseñarnos que la vida es más que la escuela. Mi ejemplo para seguir y una persona que admiro completamente.

Además, quisiera mencionar a Debanhi por apoyarme en este último semestre cuando las cosas se pusieron difíciles y prácticamente me estuvo dando sesiones de psicología gratis. Estaré esperando cuando sea una gran psiquiatra exitosa.

Las gracias más grandes las tengo hacia Jessica quien estuvo a mi lado durante estos dos años. He aprendido tantas cosas gracias a ella y espero que ella haya aprendido de mí también. Definitivamente la maestría hubiera sido diferente de no haber estado en mi vida. Aunque hubo malos momentos, también hubo muy buenos momentos. No sé qué pasará en el futuro, pero al menos si llego a visitar esta tesis sabré que en este periodo estuviste presente en mi vida.

De rutina quiero agradecer al CONAHCYT por la beca brindada para mantenerme.

Y como siempre a cada una de las personas que han interactuado de alguna forma conmigo durante estos 24 años. Por más grande o pequeña que haya sido el contacto han influenciado en mi forma de ser y pensar.

Contenido

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Definición de diabetes mellitus	1
1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1	2
1.1.2. Diabetes mellitus tipo 2	2
1.1.3. Otros tipos de diabetes.....	3
1.2. Panorama actual de la diabetes	4
1.2.1. Diabetes en México	4
1.3. Insulina	5
1.3.1. Síntesis de la insulina.....	6
1.3.2. Secreción de la insulina.....	6
1.3.3. Acción de la insulina	6
1.3.4. Órganos diana de la insulina	8
1.3.5. Efecto de la insulina en el hígado.....	9
1.4. Resistencia a insulina	10
1.5. Tratamiento para la diabetes/resistencia a insulina	11
1.6. Medicina tradicional	13
1.7. Medicina herbolaria	14
1.8. Productos naturales.....	15
1.9. Cribado de productos naturales.....	17
1.10. Bioensayos con células HepG2.....	18
1.11. Plantas con actividad hipoglucemiante	19
1.12. Plantas mexicanas con actividad hipoglucemiantes.....	19
1.13. <i>Turnera diffusa</i>	20
1.14. Antecedentes.....	21
1.15. Justificación	26
1.16. Objetivo general.....	27
1.17. Objetivos específicos.....	27
CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS	28
2.1. Material, equipos y reactivos.	28
2.1.1. Material.....	28
2.1.2 Equipo	30
2.1.3 Reactivos.....	30

2.1.4. Material biológico	31
2.2. Métodos.....	31
2.2.1. Obtención de la parte aérea de <i>Turnera diffusa</i>	31
2.2.2. Obtención de los extractos en crudo	32
2.2.3. Eliminación de clorofilas del extracto crudo de <i>Turnera diffusa</i>	33
2.2.4. Cromatografías.....	33
2.2.4.1. Cromatografías en columna	33
2.2.4.1.1. Cromatografía en columna gravitacional	33
2.2.4.1.2. Cromatografía de líquidos con columna preparativa	34
2.2.4.1.3. Cromatografía para la purificación del compuesto C.....	34
2.2.4.1.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos.....	35
2.2.4.2. Cromatografía en capa fina.	36
2.2.4.2.1. Cromatografía en capa fina de fase normal	36
2.2.4.2.2. Cromatografía en capa fina de fase inversa.....	36
2.2.5. Cultivo de la línea celular HepG2	36
2.2.6. Mantenimiento de la línea celular.	37
2.2.7. Conteo celular	37
2.2.8. Preparación de las células HepG2 resistentes a insulina.....	37
2.2.9. Cuantificación de la glucosa por método colorimétrico.....	38
2.2.10. Ensayo de captación de glucosa	38
2.2.11. Análisis de los compuestos.....	39
2.2.12. Análisis espectroscópico	39
2.2.12.1. Espectrofotoscopia UV.....	39
2.2.12.2. Espectroscopia IR	39
2.2.12.3. RMN	40
CAPÍTULO III. RESULTADOS	41
3.1. Colecta de material herbal.....	41
3.2. Cromatografía en columna gravitacional	41
3.3. Cromatografía en capa fina de fase normal.....	41
3.3. Cromatografía en capa fina de fase inversa.	42
3.4. Cromatografía con columna preparativa.....	43
3.5. Análisis por HPLC-DAD.....	45

3.5. Elucidación de la estructura de compuesto B.....	49
3.5.1. Espectro UV del compuesto B.....	49
3.5.2 Espectro IR del compuesto B.....	50
3.5.3. Espectro ¹³ C-RMN del compuesto B.....	50
3.5.4. Espectro ¹³ C-RMN por DEPT del compuesto B.....	51
3.5.4.1. DEPT 90°.....	51
3.5.4.1. DEPT 135°.....	52
3.5.5. Espectro ¹ H-RMN del compuesto B.....	53
3.5.6. Espectro HSQC del compuesto B.....	55
3.5.7. Espectro COSY del compuesto B.....	56
3.6. Elucidación de la estructura del compuesto C.....	57
3.6.1. Espectro UV del compuesto C.....	57
3.6.2. Espectro IR del compuesto C.....	57
3.6.3. Espectro ¹ H-RMN del compuesto C.....	60
3.6.5. Espectro HSQC del compuesto C.....	62
3.7. Modelo de desarrollo de resistencia a insulina en células HepG2.....	65
3.8. Modelo de consumo de glucosa con sonda 2-NBDG en células resistentes a insulina.....	72
3.9. Evaluación de la actividad sensibilizante a la insulina de los compuestos aislados.....	76
3.9.1. Evaluación de la actividad sensibilizante a la insulina de teuhetenona A.....	76
3.9.2. Evaluación de la actividad sensibilizante a la insulina del compuesto B.....	77
3.9.2. Evaluación de la actividad sensibilizante a la insulina del compuesto C.....	79
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....	81
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	98
CAPÍTULO VI. PERSPECTIVAS.....	99
BIBLIOGRAFÍA.....	100

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Fármacos utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2; su mecanismo de acción y efectos adversos.	13
2	Condiciones de elución de la columna preparativa.	35
3	Condiciones de elución del HPLC-DAD.	36
4	Desplazamientos y tipos de carbonos obtenido de las señales del espectro ^{13}C -RMN del compuesto B.	54
5	Desplazamientos e integraciones de las señales obtenidas en el Espectro ^1H -RMN del compuesto B.	55
6	Desplazamientos obtenidos de las señales del espectro ^{13}C -RMN del compuesto C.	61
7	Desplazamientos, integraciones y particiones obtenidas de las señales del espectro ^1H -RMN del compuesto C.	63
8	Consumo de glucosa pasadas 12 horas de incubación con diferentes dosis de insulina	67
9	Consumo de glucosa pasadas 24 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.	69

10	Consumo de glucosa pasadas 36 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.	70
11	Consumo de glucosa pasadas 48 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.	71
12	Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 15 μ M por las células resistentes a insulina.	73
13	Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 25 μ M por las células resistentes a insulina.	74
14	Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 50 μ M por las células resistentes a insulina.	76
15	Datos obtenidos del ensayo de captación de glucosa para la teuhetenona A.	77
16	Datos obtenidos del ensayo de captación de glucosa para el compuesto B.	79
17	Datos obtenidos del ensayo de captación de glucosa para el compuesto C.	80
18	Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C del compuesto B con la literatura.	87
19	Comparación de los desplazamientos químicos de ^1H del compuesto B con la literatura reportada.	88
20	Comparación de las señales observadas en espectroscopía IR del compuesto C con la literatura.	90

- 21** Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C **92**
obtenidos por el compuesto C con la literatura.
- 22** Comparación de los desplazamientos químicos de ^1H **93**
obtenidos por el compuesto C con la literatura.
- 23** Condiciones para inducir resistencia a insulina reportadas. **96**

Lista de figuras

Figura		Página
1	Representación esquemática de las vías de señalización de la insulina	8
2	Origen de los nuevos fármacos aprobados por la FDA en los últimos 38 años	17
3	Estructura de la teuhetenona A	24
4	Efecto antidiabético de insulina, glibenclamida y teuhetenona A en ratones diabéticos inducido con 200 mg/kg de aloxano.	24
5	Efecto hipoglucemiante de insulina y teuhetenona A en ratones normoglicémicos	25
6	Efecto hipoglucemiante de insulina y compuesto B en ratones normoglicémicos	26
7	Efecto hipoglucemiante de insulina y compuesto C en ratones normoglicémicos	26
8	Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la columna gravitacional. Fase estacionaria: silica gel F254, Fase móvil: hexano:acetato de etilo (1:1)	43

9	Cromatografía en capa fina de la fracción “teuhetenona impura”. Fase estacionaria: silica gel F254s C18, Fase móvil: metanol:agua (7:3)	44
10	Cromatograma de la cromatografía preparativa de teuhetenona impura.	45
11	Cromatograma obtenido a partir de la fracción “teuhetenona impura”	46
12	Cromatograma de teuhetenona A con pureza del 99%	47
13	Cromatograma de compuesto B con pureza cromatográfica de 92%	48
14	Cromatograma del compuesto C y otro compuesto obtenido a partir de la columna preparativa.	49
15	Cromatograma del compuesto C obtenido a partir de la repurificación en columna cromatográfica.	50
16	Espectro UV del Compuesto B.	50
17	Espectro IR del Compuesto B.	51
18	Espectro de ^{13}C -RMN de compuesto B.	52
19	Espectro de ^{13}C -RMN por DEPT 90° de compuesto B.	52
20	Espectro de ^{13}C -RMN por DEPT 135° de compuesto B.	53
21	Espectro ^1H -RMN del compuesto B.	55
22	Espectro de HSQC del compuesto B.	56
23	Espectro COSY del compuesto B.	57
24	Estructura de la 11-hidroxi-valenc-1(10)-en-2-ona.	58

25	Espectro UV del compuesto C.	58
26	Espectro IR del compuesto C.	56
27	Espectro ¹³ C-RMN del compuesto C.	60
28	Espectro de ¹ H-RMN del compuesto C.	62
29	Espectro HSQC del compuesto C.	64
30	Comparación del espectro ¹ H-RMN del compuesto C y apigenina.	65
31	Estructura de la apigenina.	65
32	Consumo de glucosa pasadas 12 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.	68
33	Consumo de glucosa pasadas 24 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.	69
34	Consumo de glucosa pasadas 36 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.	71
35	Consumo de glucosa pasadas 48 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.	72
36	Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 15 μ M por las células resistentes a insulina.	74
37	Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 25 μ M por las células resistentes a insulina.	75
38	Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 40 μ M por las células resistentes a insulina.	76

39	Consumo de glucosa por las células resistentes a insulina tras la adición de teuhetenona A.	78
40	Consumo de glucosa por las células resistentes a insulina tras la adición de valencenona.	79
41	Consumo de glucosa por las células resistentes a insulina tras la adición de compuesto C.	81
42	Comparativa de espectros IR del compuesto C con la apigenina.	91

Lista de abreviaturas

2-NBDG	2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-desoxiglucosa
μM	micromolar
ATP	Adenosín trifosfato
D.E.	Desviación estándar
DEPT	Ampliación sin Distorsión por Transferencia de Polarización
DPP-4	Dipeptidil peptidasa-4
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GSK	Glucógeno sintasa cinasa
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos
IRS	Sustrato del receptor de insulina
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
M	Molar
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
mg	Miligramo
ml	Mililitros
mTORC1	Objetivo del complejo de rapamicina 1 en mamíferos

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
PDK1	Cinasa dependiente de fosfoinositol-1
PI _{2,4} P	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PI3K	Fosfoinositol-3-cinasa
PIP ₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de diabetes mellitus

La diabetes mellitus es definida como un grupo de trastornos metabólicos con la principal característica de una elevada concentración de glucosa en sangre cuando no hay tratamiento. La hiperglucemia con el tiempo daña gravemente órganos y sistemas del organismo, sobre todo el sistema nervioso y circulatorio. La etiopatogenia del aumento de la glucosa en sangre abarca defectos en la secreción de insulina por las células pancreáticas, la deficiencia en la acción de la insulina en las células periféricas y otras alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas, y proteínas (Organización Mundial de la Salud, 2019).

La clasificación de la diabetes mellitus está dada, principalmente, por el mecanismo que causa la elevación de la glucosa. En esta clasificación se encuentran la diabetes mellitus tipo 1, la diabetes tipo 2, diabetes debida a causas específicas y diabetes gestacional (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2022a).

1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad crónica autoinmune, en la cual la deficiencia de insulina ocurre como consecuencia de la pérdida de las células beta de los islotes pancreáticos (Katsarou et al., 2017a).

La mayoría de los casos de diabetes mellitus tipo 1 están relacionados con la aparición de autoanticuerpos contra proteínas de las células beta. Los anticuerpos median la destrucción de las células del páncreas y son capaces de ser identificados y cuantificados. Sin embargo, en alrededor del 10% de pacientes no hay aparición de autoanticuerpos ni de respuesta inmune, por lo que la causa de la destrucción de las células beta es desconocida (DiMeglio et al., 2018).

La etiología de la autoinmunidad es aún desconocida, pero se sospecha que está relacionada con una combinación de factores ambientales y genéticos que desencadenan la respuesta autoinmune contra las células beta (Katsarou et al., 2017b).

1.1.2. Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2, esta está caracterizada por la desregulación del metabolismo de carbohidratos lípidos y proteínas. El aumento de la glucosa en sangre y la desregulación metabólica son resultado de una producción afectada de insulina, la incapacidad de las células del cuerpo para responder a la insulina o una combinación de ambas (DeFronzo et al., 2015).

Al estado en el que las células producen una respuesta atenuada a la insulina se le conoce como resistencia a la insulina. Las células del cuerpo son incapaces de producir una respuesta adecuada con los niveles de insulina normales, por lo tanto, el cuerpo aumenta su producción y concentración plasmática; este aumento se le conoce como hiperinsulinemia compensatoria (Wilcox, 2005).

No se conocen etiopatologías específicas para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2; sin embargo, se han relacionado diversos factores como el sobrepeso, la obesidad mórbida, estrés, falta de actividad física, edad, entre otras que aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2022a).

1.1.3. Otros tipos de diabetes

Existen otros tipos de diabetes cuya etiopatología son por causas bien definidas como: la diabetes relacionada con fibrosis quística, diabetes mellitus post trasplante, síndromes de diabetes monogénicos, diabetes pancreática, entre otras (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2022a). La más común y de mayor relevancia de estos otros tipos de diabetes es la diabetes mellitus gestacional; esta se define como la aparición de hiperglucemia durante el embarazo que se resuelve después del parto. Este desorden metabólico representa la complicación médica más común en el embarazo (McIntyre et al., 2019).

1.2. Panorama actual de la diabetes

Según cifras de la Federación Internacional de la Diabetes, se estima que en el año 2000 alrededor de 151 millones de personas en el rango de edad de 20 a 79 años padecían algún tipo de diabetes mellitus. Para el año 2021 esta cifra había aumentado más del triple, ya que cerca de 537 millones de personas alrededor del mundo padecían este trastorno. Este número corresponde al 10.5% de la población total en ese rango de edad. Según predicciones, se calcula que para el año 2030 habrá 643 millones de personas con este padecimiento y que en 2045 alcancen los 783 millones (International Diabetes Federation, 2021).

La diabetes mellitus tipo 2 es el tipo de diabetes más frecuente en el mundo. El 90% de los casos diagnosticados de diabetes corresponden al tipo 2, el porcentaje de casos de diabetes mellitus tipo 1 es de 8 – 9% mientras que el restante 1 a 2% es de otros tipos de diabetes.

1.2.1. Diabetes en México

México se encuentra entre los países con mayor incidencia de diabetes mellitus en el mundo. Según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2022 se observó que la prevalencia de diabetes en el país fue de 12.6%. Un dato preocupante es el porcentaje de población mexicana que padece prediabetes, o que padece diabetes, pero no cuenta con el diagnóstico apropiado. Los resultados de la encuesta arrojaron que el 22% de los mexicanos

son prediabéticos. Además, un 5.8% de la población padece diabetes, pero no está diagnosticada, de tal manera que la cifra real de prevalencia en México aumenta a valores aproximados del 18% (Basto-Abreu et al., 2023).

Hace 50 años la diabetes mellitus se encontraba como la 15° causa de muerte en México. Diez años después, en 1980, ocupó el 9° lugar y para 1990 ya se encontraba en el 4° lugar. A partir del año 2000 se encuentra dentro de las tres principales causas de muerte (Aguilar Salinas et al., 2015).

El 85.9% de la población mexicana diagnosticada con diabetes sigue algún tipo de tratamiento farmacológico, de ellos el 67.1% consume hipoglucemiantes orales (Shamah-Levy et al., 2020).

1.3. Insulina

La insulina es una hormona peptídica compuesta de 51 aminoácidos con un peso de 5.8 kDa. Los aminoácidos de la insulina se encuentran distribuidos a lo largo de dos cadenas polipeptídicas. Las cadenas se designan como cadena A (con una longitud de 21 aminoácidos) y cadena B (de 30 aminoácidos de longitud) las cuales se encuentran unidas entre sí por medio de dos enlaces disulfuro, además de un enlace intramolecular entre residuos de la cadena A.

La insulina es secretada por la porción endócrina del páncreas. Los islotes de Langerhans son grupos de células beta. Estas células son las responsables de sintetizar la insulina (Ferrier, 2017).

1.3.1. Síntesis de la insulina

El gen de la insulina se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 11. En el retículo endoplásmico rugoso se sintetiza la pre-proinsulina la cual consta de un péptido señal, la cadena B, un péptido de unión llamado C y la cadena A. Cuando se elimina el péptido señal se forma la proinsulina y posteriormente se pliega en el retículo endoplasmático. Después la proinsulina es llevada al aparato de Golgi mediante vesículas secretoras. Por la acción de enzimas afuera del aparato de Golgi la proinsulina se escinde en insulina y péptido C. Por último, se almacena la insulina en gránulos maduros listos para ser secretados (Ferrier, 2017; Wilcox, 2005).

1.3.2. Secreción de la insulina

Cuando la célula beta detecta la entrada de glucosa por medio de la glucocinasa, la enzima fosforila la glucosa para obtener glucosa-6-fosfato y generar ATP. Esto produce que los canales dependientes de K^+ -ATP se cierren y la membrana se despolarice, lo que lleva a un aumento de la concentración celular de calcio. El aumento del calcio desencadena la secreción de la insulina (Wilcox, 2005).

1.3.3. Acción de la insulina

La insulina ejerce su mecanismo de acción al unirse a su receptor que se encuentra en la membrana plasmática de las células diana. El receptor de

insulina consta de dos subunidades alfa extracelulares que son el sitio de unión de la insulina y dos subunidades beta transmembranales que tienen actividad tirosina cinasa. Tras la unión de la insulina con la subunidad alfa el receptor sufre un cambio conformacional de tal manera que a la subunidad beta se le puede unir ATP, lo cual activa su función de tirosina cinasa (Cheatham & Kahn, 1995; Petersen & Shulman, 2018).

La activación de la actividad de tirosina cinasa permite la fosforilación de proteínas sustrato intracelulares conocidas como sustratos del receptor de insulina. La señalización posterior a la activación de IRS se puede dividir en señales mitogénicas y metabólicas. Las señales mitogénicas implican principalmente la activación de la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). Los sustratos para la mediación de la actividad metabólica de la insulina son el IRS-1 y el IRS-2 (Klover & Mooney, 2004).

Las proteínas IRS fosforiladas, posteriormente, reclutan a los heterodímeros de la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K). PI3K cataliza la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP_3) desde el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato ($PI_{2,4}P$) (Huang et al., 2015).

La acumulación de PIP_3 permite propagar y amplificar la señalización de la insulina. PIP_3 se une a efectores debajo de la cascada de señalización como la cinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1) y AKT.

Estos eventos de señalización de insulina proximal (activación del receptor de insulina y reclutamiento/fosforilación de proteínas de señalización, sobre todo

las isoformas IRS, PI3K y AKT) se conservan en gran medida en los tejidos diana de la insulina e inician la respuesta de la insulina en la membrana plasmática (Petersen & Shulman, 2018).

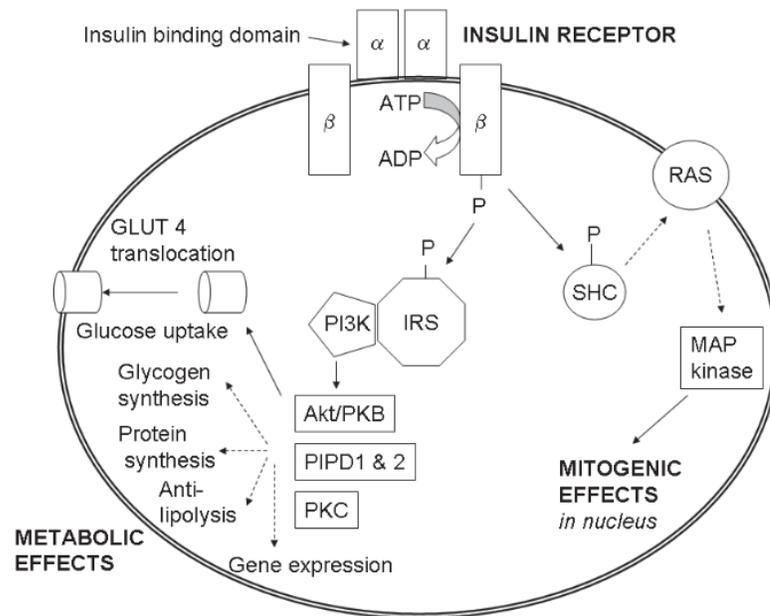


Figura 1. Representación esquemática de las vías de señalización de la insulina (Wilcox, 2005).

1.3.4. Órganos diana de la insulina

Los efectos de la insulina varían según la función fisiológica de los tejidos y órganos afectados y su dependencia de la insulina para los procesos metabólicos. Los principales órganos diana son el hígado, el tejido adiposo y el tejido muscular. Las acciones de la insulina son generalizadas, al igual que las manifestaciones de resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria asociada.

En el hígado, la insulina estimula la captación de glucosa, favoreciendo su conversión en glucógeno mediante la glucogénesis, al tiempo que inhibe la gluconeogénesis, proceso de producción de glucosa a partir de precursores no glucídicos.

En el tejido adiposo favorece la captación de glucosa por los adipocitos, estimula la síntesis de ácidos grasos y contribuye a la acumulación de triglicéridos. Además, la insulina inhibe la lipólisis de triglicéridos en ácidos grasos y glicerol.

En el músculo esquelético, la insulina facilita la captación de glucosa por las células musculares, promoviendo su almacenamiento como glucógeno. Además, estimula la síntesis de proteínas musculares, un proceso crucial para el crecimiento y la reparación del tejido muscular.

1.3.5. Efecto de la insulina en el hígado

El hígado representa uno de los principales órganos en la regulación de la glucemia en todo el cuerpo. Cumple esta función debido a su papel en el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos y glucógeno, además de su función de exportar glucosa cuando hay demanda de energía (Chadt & Al-Hasani, 2020).

La vía de señalización de la insulina en el hígado es similar a otros órganos diana hasta la activación de AKT. Es en los pasos siguientes que se diversifica la señalización, ya que los sustratos de AKT incluyen glucógeno sintasa cinasa

(GSK), objetivo del complejo de rapamicina 1 en mamíferos (mTORC1) y el factor de transcripción FOXO1.

La activación de mTORC1 en el hígado promueve la traducción de proteínas y crecimiento celular. Otra de las ramificaciones en la vía de señalización es la inactivación de la GSK, la cual resulta en la activación de la glucógeno sintasa y la acumulación y síntesis del glucógeno. En la tercera rama de la vía, Akt fosforila e inactiva la familia de factores de transcripción Foxo, que es responsable de la disminución durante la señalización de la insulina en la transcripción de genes que codifican enzimas gluconeogénicas (Lu et al., 2012).

1.4. Resistencia a insulina

Se ha demostrado que el desarrollo de la diabetes tipo 2 se debe principalmente a la respuesta deficiente de las células del cuerpo a la insulina; sin embargo, es difícil adjudicar una causa primaria a la hiperglucemia en la diabetes (Petersen & Shulman, 2018). Se han descrito dos posibles hipótesis acerca del desarrollo de la hiperglucemia.

En la primera hipótesis se cree que la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos antecede a la hiperinsulinemia; el páncreas comienza a producir mayores cantidades de insulina a fin de poder compensar la sensibilidad disminuida de los tejidos hacia la glucosa. Posteriormente, conforme va aumentando la demanda de insulina, las células beta comienzan a fallar debido al estrés acumulado. Finalmente, las células pancreáticas pierden sensibilidad a

la glucosa y se desarrolla el estado hiperglucémico; que es cuando aparece la diabetes mellitus (Czech, 2017; Kahn, 2003).

La segunda hipótesis plantea que la hiperinsulinemia es la causa de la resistencia a la insulina. Se ha observado que en individuos con obesidad existe un estado de hiperinsulinemia en ayuno sin haber cambio detectable en las concentraciones de glucosa. Se cree que la producción aumentada de insulina es efecto de una dieta alta en grasas y la obesidad. Debido a la hiperlipidemia empieza a haber cambios en el hígado y el tejido adiposo, entre los cuales están la inflamación, intolerancia a la glucosa, esteatosis hepática e hiperlipidemia. Con el tiempo la acumulación de este estrés desarrolla la resistencia a la insulina (Czech, 2017).

1.5. Tratamiento para la diabetes/resistencia a insulina

Para el tratamiento exitoso de la diabetes se requiere de cambios en el estilo de vida de los pacientes. El desarrollo de comportamientos de salud positivos y el bienestar psicológico son fundamentales para lograr maximizar la calidad de vida. Para poder alcanzar los objetivos del tratamiento de la diabetes son esenciales la educación y el apoyo para el autocontrol de la diabetes, la terapia de nutrición médica, la actividad física de rutina y la atención psicosocial (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2022b).

Se ha observado que la resistencia a la insulina puede mejorar con la reducción de peso, el ejercicio y/o el tratamiento farmacológico de la

hiperglucemia (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2022c).

La terapia de primera línea depende de las comorbilidades, los factores de tratamiento centrados en el paciente y las necesidades de manejo. La farmacoterapia debe iniciarse en el momento en que se diagnostica la diabetes tipo 2, a menos que existan contraindicaciones (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2022d).

Los fármacos utilizados en la terapia para la diabetes tipo 2 son variados y se agrupan según los mecanismos de acción de los compuestos activos. Se consideran cinco grupos: secretagogos de insulina, sensibilizadores a la insulina, inhibidores de α -glucosidasa, agonistas de GLP-1 e inhibidores de DPP-4 (Rodríguez-Rivera et al., 2017). Ejemplos de estos tratamientos se describen en la tabla 1.

Los tratamientos actuales poseen efectos adversos que limitan el uso de los hipoglucemiantes o son inconvenientes para aquellos que padecen diabetes. El creciente aumento de personas que padecen diabetes mellitus supone un reto para poder suplir la nueva demanda de hipoglucemiantes por lo que se deben de buscar alternativas de las cuales se puedan obtener nuevas y mejores moléculas para el tratamiento.

Tabla 1. Fármacos utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2; su mecanismo de acción y efectos adversos (Aguilar-Salinas et al., 2002; Cheng & Fantus, 2005; González-Mujica, 2016; Pallardo Sánchez, 2008)

Tipo de fármaco	Fármaco	Mecanismo de acción	Ejemplo	Limitaciones
Secretagogos de insulina	Sulfonilureas	Estimulan secreción de la insulina al despolarizar la membrana, favoreciendo la liberación de insulina.	Glibenclamida, clorpropamida, glipizida, tolbutamida	Hipoglucemia, aumento de peso, náuseas
	Glinidas		Repaglinida, nateglinida, mitiglinida	Hipoglucemia, náuseas, daño hepático
Sensibilizadores a la insulina	Biguanidas	Aumentan la permeabilidad de la glucosa hacia las células periféricas.	Metformina, buformina, fenformina	Problemas gastrointestinales, acidosis láctica
	Tiazolidinedionas o Glitazonas		Pioglitazona, rosiglitazona	Aumento de peso, edema, anemia.
Inhibidores de la α -glucosidasa		Reducen la absorción de carbohidratos intestinales	Acarbosa, miglitol	Alteración gastrointestinal
Incretinas y agonistas de GLP-1		Se unen al receptor a GLP-1	Exenatida	Náuseas, hipoglucemia, diarrea.
Inhibidores de DPP-4		Inhiben a la encima DPP-4 incrementando el tiempo de acción	Sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina	Nasofaringitis, síntomas gastrointestinales y dolor de cabeza

1.6. Medicina tradicional

Desde las primeras civilizaciones humanas, cuando surgía algún malestar en el cuerpo se buscaba cómo eliminar o reducir la enfermedad. Cuando el dolor era producido por un agente externo y visible era sencillo poder removerlo. Sin embargo, cuando el malestar se encontraba en el interior del cuerpo y no era evidente la causa se buscaban remedios en la naturaleza.

Esto propició la observación de los efectos de la naturaleza en el cuerpo humano, todo esto en base al conocimiento empírico. Fue así como se les

adjudicaron propiedades curativas a plantas, así como a otros fenómenos como eclipses, dioses y la magia (Castiglioni, 2019).

Desde el siglo pasado se ha buscado otorgar bases científicas fundamentadas a los conocimientos empíricos registrados desde hace milenios. Por esto se han descartado rituales, ceremonias y productos que no poseían efectos demostrables de su actividad medicinal. Por lo que es necesario establecer pautas y criterios objetivos para la investigación clínica metodológica y la evaluación de la eficacia de la medicina tradicional (Firenzuoli & Gori, 2007).

1.7. Medicina herbolaria

Se ha podido demostrar la eficacia de plantas que logran aminorar los malestares o afecciones de diferentes tipos de enfermedades. La medicina herbolaria es un subgrupo de las terapias medicinales complementarias o alternativas. Otros nombres por los que se le conoce son fitomedicina o medicina botánica. El uso de distintas partes de plantas como flores, tallos, hojas, raíces o mezclas de estas con fines medicinales es la base de la medicina herbolaria (Organización Mundial de la Salud, 2009, 2013).

En países en vías de desarrollo la medicina herbolaria juega un rol importante entre su población como un elemento curativo en la etapa primaria de atención médica. Entre el 60 y el 90% de la población de estos países emplea la medicina herbolaria para la atención de afectaciones como disenterías,

malestares gastrointestinales, enfermedades respiratorias, y otras infecciones endémicas (Organización Mundial de la Salud, 2009).

1.8. Productos naturales

La medicina herbolaria ha sido una gran fuente para obtener productos naturales bioactivos. Los productos naturales son metabolitos provenientes de fuentes biológicas como pueden ser plantas, animales o microorganismos. Estos metabolitos pueden clasificarse en primarios o secundarios. Los metabolitos primarios suelen ser moléculas estructurales y que son estrictamente necesarias para la supervivencia del ser. En el caso de los secundarios estos no son esenciales para el crecimiento del organismo y usualmente son agentes contra situaciones de estrés, a menudo son exclusivos de ciertas especies o géneros, poseen diversas actividades biológicas y sus estructuras suelen ser complejas de tal manera que, a menudo, dificultan su síntesis completa a nivel laboratorio (Kennedy & Wightman, 2011).

Los metabolitos secundarios se suelen clasificar según su estructura química principalmente en terpenos y terpenoides, compuestos fenólicos y flavonoides, alcaloides, y compuestos que contienen azufre (Sonkamble et al., 2019).

Las estrategias modernas para la obtención de productos naturales comienzan con la selección de las especies según la etnofarmacología o el uso tradicional. A continuación, se realizan extracciones con distintos solventes y se

evalúa la efectividad de los extractos en modelos animales. A partir de los resultados obtenidos se aíslan los compuestos que son bioactivos mediante fraccionamiento biodirigido; una vez aislados, se procede a identificar o caracterizar los compuestos. Los compuestos purificados vuelven a someterse a ensayos *in vitro* o con animales, para evaluar y confirmar su potencial acción además de realizar pruebas de toxicidad. Una vez realizados estos ensayos se pueden iniciar pruebas preclínicas y por último se realizan ensayos clínicos (Furman et al., 2020).

Estrategias como la descrita anteriormente han permitido la obtención de productos naturales de calidad que hoy en día forman parte de la terapia convencional. Una evidencia de esto es que, hasta el 2019, alrededor del 49.2% de los fármacos aprobados por la FDA en los últimos 40 años tienen algún tipo de relación con productos naturales (Newman & Cragg, 2020).

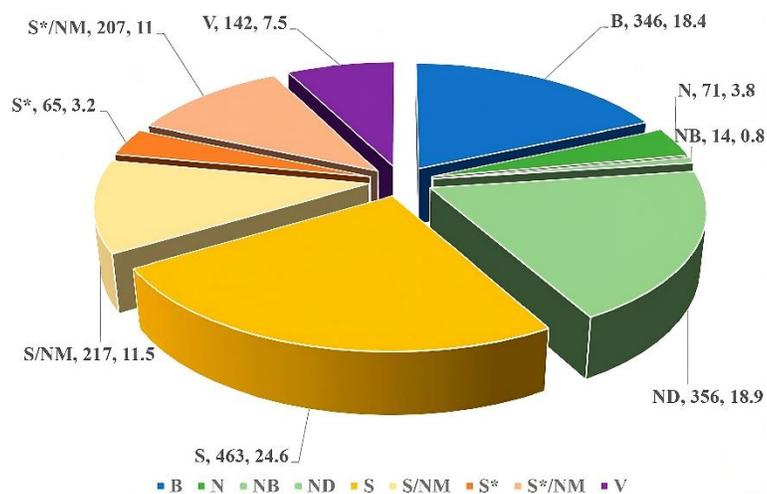


Figura 2. Origen de los nuevos fármacos aprobados por la FDA en los últimos 38 años. (B: biológico, N: Producto Natural, NB: Producto Natural Botánico, ND: Derivado de un producto natural, S: Fármaco sintético, S*:

Fármaco sintético, pero con farmacóforo de producto natural, V: Vacuna)(Newman & Cragg, 2020)

1.9. Cribado de productos naturales

Para la detección de productos naturales con bioactividad se emplea una alta gama de modelos experimentales que simulan la enfermedad o ciertas características de la enfermedad. Los ensayos utilizados se pueden clasificar principalmente como *in vivo* o *in vitro*.

Los ensayos *in vivo* se pueden clasificar en cinco grupos:

- a) Modelos donde la enfermedad ocurre espontáneamente
- b) modelos donde la enfermedad es inducida química o quirúrgicamente
- c) modelos en los que la enfermedad es inducida por manipulación genética
- d) modelos negativos, y
- e) modelos huérfanos, incluidos modelos animales con enfermedades desconocidas para sus homólogos humanos (Lukacinova et al., 2013).

Aunque los modelos *in vivo* tienen desventajas como la poca información acerca del mecanismo de acción que tiene el compuesto analizado, la gran cantidad de animales que se requieren para obtener resultados estadísticos significativos, requerimientos para el mantenimiento de los animales, entre otras; son herramientas indispensables que permiten comprender la patogénesis de las complicaciones y utilidad de los agentes terapéuticos en una enfermedad multifactorial como la diabetes mellitus (Lankatillake et al., 2019).

Los modelos *in vitro* juegan un papel importante en el tamizaje inicial o como seguimiento a estudios en animales. Los modelos *in vitro* tienen ventajas como el esclarecimiento de un posible mecanismo de acción, requieren cantidades pequeñas de muestra, menos insumos y costos, se pueden realizar a la par del fraccionamiento de los extractos, entre otras (Soumyanath & Sriyayanta, 2005).

En el tamizaje de compuestos antidiabéticos, los modelos *in vitro* son los más apropiados debido a las ventajas ya presentadas anteriormente, además de que se pueden hacer muchos replicados en muy poco tiempo. Sin embargo, cabe resaltar que los modelos *in vitro* no reflejan completamente el entorno complejo de la diabetes en los humanos, por lo que los ensayos *in vivo* son imprescindibles cuando se pretende extrapolar los resultados a la población (Furman et al., 2020).

Los principales mecanismos que se evalúan en el tamizaje de posibles compuestos antidiabéticos son la actividad secretagoga de la insulina, la inhibición de enzimas relacionadas con la insulina y absorción de glucosa, así como la actividad similar o sensibilizante a la insulina (Lankatillake et al., 2019).

1.10. Bioensayos con células HepG2

Se han utilizado distintas líneas celulares inmortalizadas para el estudio de diversos órganos. En el caso del hígado, la línea celular más popular son las células HepG2. Esta línea celular fue obtenida originalmente a partir de un hepatoblastoma y fue la primera línea celular en exhibir las características claves

de hepatocitos. A pesar de ser una línea celular tumoral, se ha observado que conservan características metabólicas de los hepatocitos normales (Arzumanian et al., 2021). Esta línea celular se ha utilizado en ensayos de captación de glucosa con distintos extractos y/o compuestos aislados de plantas (Chen et al., 2019a; Esfahani et al., 2023; X. Fan et al., 2019; Jin et al., 2013a; Qin et al., 2011a; Teng et al., 2016a; Xuguang et al., 2019; Zheng et al., 2016).

1.11. Plantas con actividad hipoglucemiante

Alrededor del mundo se han utilizado distintas plantas en el tratamiento de la diabetes dentro de comunidades indígenas. Estudios etnobotánicos mundiales han reportado el uso de cerca de 800 plantas que pueden poseer potencial antidiabético. Se ha comprobado de manera experimental las propiedades de 450 de esas plantas y únicamente se ha logrado proponer un mecanismo de acción completo de 109 plantas (Choudhury et al., 2018; Gurib-Fakim, 2006; Prabhakar & Doble, 2011).

1.12. Plantas mexicanas con actividad hipoglucemiantes

La medicina tradicional juega un papel importante en México desde tiempos prehispánicos siendo las culturas con mayor representación la Azteca y la Maya. La medicina regional actual refleja de cierta manera la influencia de aquellas culturas y se mantiene preservada de mejor manera en las regiones geográficas donde el impacto hispánico fue menor (Zolla, 1980).

En México, hay al menos 383 plantas que se emplean para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2; sin embargo, su uso se basa en conocimiento empírico y sin una evaluación científica apropiada. Se han estudiado cerca de 200 especies de manera científica, pero la mayoría de los estudios se limitan a los extractos y su eficacia preclínica (Mata et al., 2013, 2019).

1.13. *Turnera diffusa*

El género *Turnera* comprende actualmente más de 135 especies en América y dos en África. El género está organizado en nueve series que se pueden dividir en dos grupos sobre la base estructural floral. El primer grupo incluye a las series *Annulares*, *Capitatae*, *Leiocarpae*, *Microphyllae*, *Papilliferae*, *Salicifoliae* y *Stenodictyae*. El segundo grupo las series *Turnera* y *Anomalae*. *Turnera diffusa* se encuentra en el grupo *Microphyllae* (Mercedes Arbo & Espert, 2009).

La planta de *Turnera diffusa* tiene hojas alternas ovado-lanceoladas, pubescentes, de 1 a 2.5 cm de largo y 0.4 a 1 cm de ancho y de color verde grisáceo claro a amarillo verdoso con un margen dentado; su olor es agradable y aromático. Las flores son pequeñas y amarillas de 8 a 12 mm de largo con cinco pétalos amarillentos, que crecen en las axilas de las hojas superiores (Baez-Parra et al., 2018).

Tanto en México como en otros países de Latinoamérica, *Turnera diffusa* ha sido usada como tratamiento de un gran número de afecciones. Es conocida

principalmente por sus propiedades afrodisiacas, diuréticas, expectorantes, entre otras (Parra-Naranjo et al., 2023). Usualmente se emplean las hojas de la planta para la preparación de la decocción; sin embargo, también pueden ser empleados los tallos o la planta completa (Szewczyk & Zidorn, 2014).

1.14. Antecedentes

El primer registro que se dispone de la investigación de los efectos antidiabéticos de *Turnera diffusa* data de 1984. En este estudio se evaluó la actividad hipoglucemiante del extracto acuoso de la planta (50 g/250 mL). El extracto se administró por vía oral y vía peritoneal en un modelo de ratones con diabetes inducida químicamente con aloxano. La glucosa en sangre se midió a las 5 horas posteriores a la administración y se observó una reducción en la glucemia a comparación del control (Pérez G. et al., 1984).

En 1998, Alarcón Aguilar reportó el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *T. diffusa* (40 g/300 mL) tras ser administrado por vía gástrica a conejos hiperglucémicos. La glucemia se monitoreó cada 60 minutos durante un periodo de 5 horas y se reportó la disminución del pico glucémico a comparación del grupo control (Alarcon-Aguilar et al., 1998).

Años después en 2002, Alarcón Aguilar nuevamente analizó extractos de metanol acuoso de la planta (500 mg/kg) administrados vía intraperitoneal a ratones con diabetes inducida con aloxano y ratones sanos. A diferencia de los estudios anteriores, no se observó una disminución del pico glucémico. En este

artículo se menciona que los resultados contradictorios pueden deberse a diferencias en los métodos de extracción o en las variaciones de la planta estudiada (Alarcon-Aguilar et al., 2002).

El grupo de investigación del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL ha desarrollado proyectos de investigación etnofarmacológicos con *Turnera diffusa*. A partir del extracto metanólico de la parte aérea de la planta se logró aislar el heptodamianol como molécula responsable de la actividad antioxidante y hepatoprotectora (Delgado-Montemayor, 2017).

Debido a este antecedente de actividad antioxidante, se estudió la posible actividad antidiabética de *T. diffusa*. Se analizaron en modelos murinos diabéticos el extracto metanólico y fracciones de diferente polaridad obtenidas en los procesos de purificación del heptodamianol.

Esto llevó a que, en 2017, Parra Naranjo demostrara que el extracto metanólico de *Turnera diffusa* tiene efecto hipoglucemiante. La reducción del estado glicémico fue evidente por lo que se consiguió aislar, mediante aislamiento biodirigido, el principal componente activo. La molécula aislada fue la teuhetenona A (figura 3), un nor-sesquiterpeno que, si bien ya había sido identificado en *T. diffusa*, no se le había adjudicado dicha actividad.

Posteriormente, se realizaron ensayos *in vivo* con la molécula. Se administró en dosis de 1 y 5 mg/kg a ratones CD1 sanos y con diabetes inducida químicamente con aloxano para determinar la actividad hipoglucemiante y

antidiabética. Como se observa en la figura 4, en ambos casos hubo una disminución de la concentración de la glucosa en sangre por parte de la teuhetenona A (Parra-Naranjo et al., 2017).

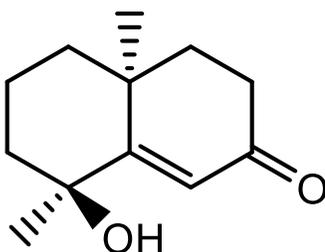


Figura 3. Estructura de la teuhetenona A

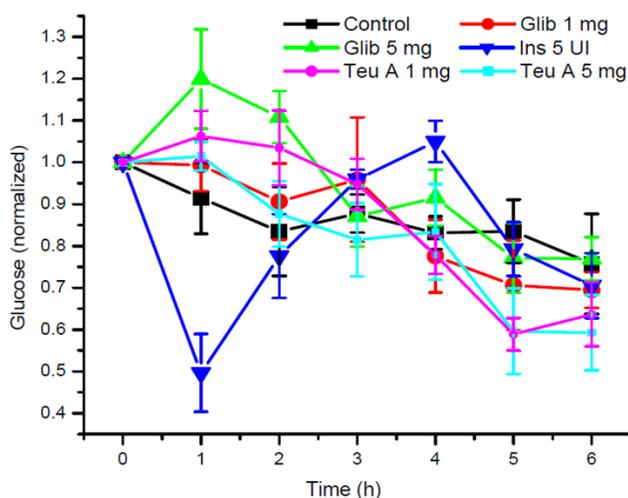


Figura 4. Efecto antidiabético de insulina, glibenclamida y teuhetenona A en ratones diabéticos inducido con 200 mg/kg de aloxano. n = 5, media \pm DE.

Durante el trabajo de Parra Naranjo, la teuhetenona A se obtenía a partir de una fracción de acetato de etilo del extracto metanólico. A fin de facilitar el aislamiento de teuhetenona A, el grupo de trabajo llevó a cabo un análisis que estableció que el acetato de etilo permite extraer el compuesto directamente del

material herbáceo más eficazmente. A partir de estos resultados, las extracciones posteriores para la obtención de teuhetenona A se realizaron con acetato de etilo (Aguirre Gómez, 2022).

En 2022 se pudieron aislar dos compuestos que acompañaban a la teuhetenona A en una fracción impura y se denominaron como compuesto B y C. Se realizó un ensayo *in vivo* en un modelo murino con diabetes inducida con aloxano, donde se probó la actividad de los tres compuestos aislados. Los resultados mostraron una actividad similar a la reportada por Parra Naranjo en 2017 para la teuhetenona y se observó actividad hipoglucemiante en los compuestos denominados como “Compuesto B” y “Compuesto C” (Aguirre Gómez, 2022).

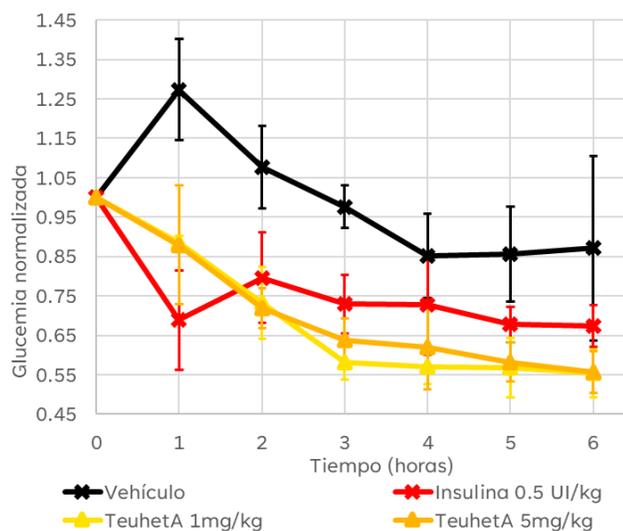


Figura 5. Efecto hipoglucemiante de insulina y teuhetenona A en ratones normoglicémicos. n = 5, media \pm DE.

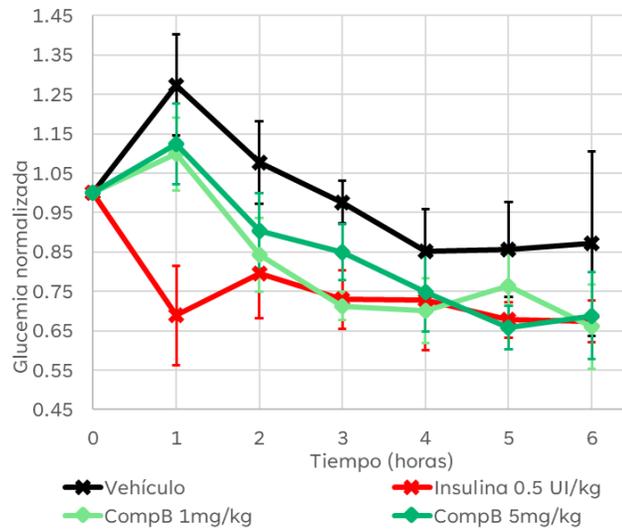


Figura 6. Efecto hipoglucemiante de insulina y compuesto B en ratones normoglicémicos. n = 5, media ± DE.

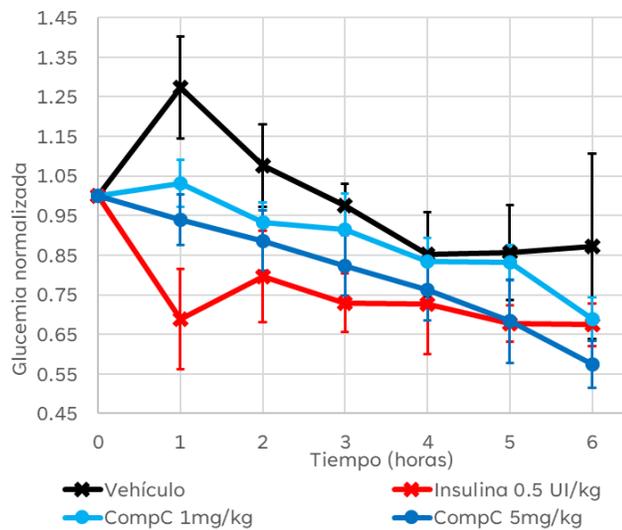


Figura 7. Efecto hipoglucemiante de insulina y compuesto C en ratones normoglicémicos. n = 5, media ± DE.

1.15. Justificación

La diabetes mellitus es uno de los problemas de salud mundial más importantes, siendo una de las tres principales causas de muerte en México. La farmacoterapia actual presenta dificultades para los pacientes, por lo que existe una necesidad de invertir en la investigación de nuevas terapias para el tratamiento y control de la diabetes. La medicina herbolaria ha demostrado ser una excelente fuente de nuevos fármacos que pueden actuar como alternativa a los tratamientos convencionales.

A partir de *Turnera diffusa* se logró aislar la teuhetenona A, así como otros dos compuestos que poseen actividad hipoglucemiante, por lo que es necesario seguir realizando ensayos, así como establecer posibles interacciones entre ellos a fin de poder presentar un futuro medicamento herbolario.

El hígado es uno de los principales órganos responsables de la regulación de la glucemia, por lo que se propuso probar el efecto de los terpenos aislados de *Turnera diffusa* en un modelo *in vitro* de captación de glucosa en células HepG2 resistentes a insulina para estudiar su actividad hipoglucemiante, así como postular indicios de un posible mecanismo de acción.

1.16. Objetivo general

Evaluar la absorción de glucosa inducida por terpenos aislados de *T. diffusa* en un modelo de resistencia a insulina en células HepG2.

1.17. Objetivos específicos

1. Implementar un modelo de resistencia a insulina en células HepG2.
2. Implementar un modelo de consumo de glucosa en células resistentes a insulina.
3. Aislar, purificar y elucidar la estructura de los compuestos B y C.
4. Evaluar el efecto de los compuestos aislados en el modelo de consumo de glucosa de células resistentes a insulina.

CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material, equipos y reactivos.

2.1.1. Material

- Agitadores de vidrio
- Aparato de filtración de solventes para HPLC marca VWR Scientific Products
- Bulbo para pipeta pasteur
- Capilares 10 μ L marca Drummon Wiretrol
- Cartucho de SPE de C18 1000 mg/8 mL marca Alltech
- Columna de vidrio para cromatografía de 63 cm marca Sigma Aldrich
- Columna de vidrio para cromatografía de 30 cm marca Sigma Aldrich
- Cromatoplasmas de sílica gel 60 RP-18 F254s 5x7.5 cm marca Merck
- Cromatoplasmas de sílica gel 60 F254 20x20 cm marca Merck
- Cubas cromatográficas de 121x108x80 mm
- Embudo de filtración rápida
- Espátulas para polvos
- Frascos de vidrio ámbar con tapa de plástico
- Gradillas
- Licuadora de 7 velocidades, vaso de vidrio marca Licuaturbo man

- Matracas bola de 50, 100, 250 y 500 mL con boca esmerilada 24/40 marca Pyrex
- Matracas Erlenmeyer 250 y 500 mL marca Pyrex
- Matraz Kitazato de 500 mL marca Pyrex
- Microplacas de 96 pozos de fondo plano clara
- Microplacas de 96 pozos de fondo plano color negro
- Papel filtro
- Pipetas automáticas de 100-1000 μ L marca Eppendorf
- Pipeta automática de 20-200 μ L marca Eppendorf
- Pipeta automática de 0.5-10 μ L marca Eppendorf
- Pipeta automática de 8 canales de 10-100 μ L marca Eppendorf
- Pipetas pasteur
- Probetas de 10, 50, 100, 250, 500 mL marca Pyrex
- Puntillas de 100-1000 μ L marca Eppendorf
- Puntillas de 20-200 μ L marca Eppendorf
- Puntillas de 0.5-10 μ L marca Eppendorf
- Reservorio para solvente
- Tubos cónicos de 15 mL y 50 mL estériles con tapa marca Corning
- Tubos de ensayo de 12x75 mm y 13x100 mm marca Pyrex y Kimax
- Tubos eppendorf claros de 0.2, 0.6, 1.5, y 5 mL, marca Eppendorf
- Vasos de precipitado de 50, 150 y 250 mL marca Pyrex
- Viales de vidrio de 5 mL

2.1.2 Equipo

- Balanza Analítica marca AND modelo GR-120
- Bomba de vacío Gast de 1 caballo de fuerza
- Campana de extracción Lumistell CEE-120
- Campana de seguridad modelo CSB120 marca Prendo
- Cromatografo preparativo de líquidos Agilent 1260 Infinity
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance III 500 MHz
- Espectrómetro de infrarrojo de transformada de Fourier marca Perkin Elmer modelo Frontier
- Fotómetro de microplacas modelo Multiskan FC marca Thermo Fisher Scientific
- HPLC Waters 600 con automuestreador Waters 717 plus y detector de arreglo de diodos Waters 2996
- Lámpara UV de 254 nm
- Lector de microplacas multimodo BioTek Cytation3
- Rotavapor marca Heidolph Laborota 4000-efficient
- Shaker marca Heidolph modelo Unimax 1010
- Sonicador Branson 2510
- Vórtex. VWR Scientific Products

2.1.3 Reactivos

- Acetato de etilo grado analítico, Fermont

- Ácido fórmico, Fermont
- Acetona grado analítico, Fermont
- Agua destilada.
- Agua miliQ
- Buffer fosfato salino
- Dimetilsulfóxido, Fermont
- Etanol. Grado Reactivo ACS. J.T. Baker
- Hexano grado analítico, Fermont
- Medio DMEM Advanced con rojo fenol marca Gibco
- Medio DMEM Advanced sin glucosa sin rojo fenol marca Gibco
- Metanol grado HPLC, JT Baker
- Metanol. Grado Reactivo ACS. J.T. Baker
- Nitrógeno gas de alta pureza grado 5.0 marca AGA
- Sílica gel 60 G for TLC, Merck Millipore

2.1.4. Material biológico

- Línea celular HepG2

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención de la parte aérea de *Turnera diffusa*

El material vegetal fue colectado en el municipio de Montemorelos, Nuevo León, en octubre del 2015. Se decidió trabajar con esta colecta debido a que el

departamento contaba con suficiente material (hoja seca y pulverizada) para el proyecto. El material recolectado constaba de la parte aérea de la planta previamente secada a temperatura ambiente hasta peso constante, triturada y almacenada en un lugar seco y fresco.

Una muestra de la planta se mandó a autenticar en el Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y quedó registrada bajo el número 23569.

2.2.2. Obtención de los extractos en crudo

Se pesaron 785 g de la parte aérea de la planta. El material fue repartido de manera equitativa en cuatro matraces Erlenmeyer de 1 litro de capacidad a los cuales se les agregó acetato de etilo hasta completar 900 mL para la extracción.

La extracción se realizó durante 1 hora en agitación constante a 300 rpm a temperatura ambiente. Una vez terminada la extracción, se decantó y filtró el solvente. Al material vegetal se le agregaron 900 mL de acetato de etilo nuevo. Este procedimiento se realizó tres veces con el mismo material vegetal.. Tras terminar las tres extracciones se eliminó el solvente por evaporación a presión reducida a una temperatura de 38° C hasta sequedad. El extracto seco se recuperó con un volumen mínimo de acetato de etilo en frascos de vidrio color ámbar y se refrigeró a 4°C.

2.2.3. Eliminación de clorofilas del extracto crudo de *Turnera diffusa*

La eliminación de clorofilas se realizó en un cartucho de extracción en fase sólida de C₁₈. El cartucho fue acondicionado con 50 mL de metanol al 70%, y acto seguido se adicionaron 10 mL de una solución del extracto seco disuelto con 5 mL de acetato de etilo y 45 mL de metanol. Después de que el extracto estuviera por completo en el cartucho de C₁₈, se eluyó con 70 mL de metanol al 70%. Posteriormente, se hicieron pasar 80 mL de metanol al 100% y por último 50 mL de acetona. La fracción de metanol al 70% fue colectada y secada por evaporación a presión reducida a una temperatura de 38°C. Una vez seca se recuperó con un volumen mínimo, aproximadamente 10 mL de acetato de etilo en frascos de vidrio ámbar y se mantuvo en refrigeración a 4°C.

2.2.4. Cromatografías

2.2.4.1. Cromatografías en columna

2.2.4.1.1. Cromatografía en columna gravitacional

Se montó una columna de 62 cm de largo para cromatografía gravitacional con 135 mL sílica gel 60 (0.0040-0.063 mm). El acondicionamiento de la columna se realizó con una mezcla de hexano:acetato de etilo (75:25). Se pesaron 1.5 g del extracto y se disolvieron en un volumen mínimo de la mezcla inicial de solventes para posteriormente sembrarlo en la columna. La muestra fue eluída con un sistema de 1000 mL de Hex:AcOEt (75:25), seguido de 600 mL de Hex:AcOEt (65:35), luego 300 mL de Hex:AcOEt (1:1) y por último se pasó

metanol por la columna hasta la decoloración total del eluato. Los eluidos se recolectaron en 100 tubos de ensayo de 16x150 mm.

2.2.4.1.2. Cromatografía de líquidos con columna preparativa

Para la separación de los compuestos se utilizó un cromatógrafo preparativo de líquidos Agilent modelo 1260 Infinity. La columna empleada fue una SymmetryPrep C₁₈ 7.8x300 mm con tamaño de poro de 7 µm marca Waters. El flujo de la fase móvil fue de 0.8 mL/min y el cromatógrafo contaba con un detector de espectrometría UV visible que se ajustó a 265 nm. En la tabla 2 se encuentra el sistema de elución empleado en esta separación cromatográfica.

Tabla 2. Condiciones de elución de la columna preparativa

Tiempo (min)	MeOH (%)	Agua (%)
0	50	50
30	50	50
120	65	45
121	100	0

2.2.4.1.3. Cromatografía para la purificación del compuesto C

Para la purificación del compuesto C se montó una columna de C₁₈ con dimensiones de 13 cm de largo por 0.5 cm de diámetro interno en una columna de vidrio de 30 cm. La columna fue humedecida con metanol durante toda la noche previa al experimento. El acondicionamiento de la columna se realizó con

una solución acuosa de metanol al 45%. Se acondicionó con esta fase móvil durante 3 horas apoyado por una pequeña bomba de aire. Se agregó 1 mg del compuesto C disuelto en metanol. La columna fue eluida de forma isocrática con una fase móvil compuesta de metanol al 45% durante una hora y diez minutos para asegurar el paso de 5 volúmenes de la columna. Tras este tiempo, se pasaron 10 ml de metanol para limpiar la columna y se recolectó el lavado en fracciones de 2 ml.

2.2.4.1.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos

El equipo empleado fue un HPLC Waters 1525 con automuestreador Waters 717 plus y detector de arreglo de diodos Waters 2996. La columna empleada para la separación fue una columna Hypersil-Gold C18 150x4.6mm ThermoScientific, con un tamaño de partícula de 5 μm . El volumen de inyección de la muestra fue de 10 μL y el flujo de la fase móvil de 0.4 mL/min. Los solventes se desgasificaron y filtraron con una membrana de nylon con tamaño de poro de 0.45 μm . El sistema de elución se encuentra descrito en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de elución del HPLC-DAD.

Tiempo (min)	MeOH (%)	Solución acuosa de HCOOH 0.1% (%)
0	30	70
20	60	40
25	70	30
30	70	30

40	30	70
45	30	70

2.2.4.2. Cromatografía en capa fina.

2.2.4.2.1. Cromatografía en capa fina de fase normal

La cromatografía en capa fina de fase normal se realizó en cromatoplasmas de sílica gel 60F₂₅₄ con un sistema de elución de hexano:acetato de etilo (1:1). Las cromatoplasmas fueron cortadas a un ancho de 6.5 cm. Una vez eluida la cromatografía, fue observada bajo una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm.

2.2.4.2.2. Cromatografía en capa fina de fase inversa

La cromatografía en capa fina de fase inversa se realizó en cromatoplasmas de fase C₁₈ F_{254s} con un sistema de elución metanol:agua (7:3). Una vez realizada la elución se observaron bajo una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm.

2.2.5. Cultivo de la línea celular HepG2

Las células HepG2 fueron cultivadas en frascos de cultivo celular T-75 con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) alto en glucosa (4.5 g/L), suplementado con SFB (suero fetal bovino) al 10%, antibióticos (penicilina 100U/mL, estreptomina 100µg/mL) y glutamina. Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% con cambio de medio cada dos días.

2.2.6 Mantenimiento de la línea celular.

Al llegar a una afluencia del 80% en los frascos de cultivo se descartó el medio. Posteriormente, se lavaron las células dos veces con PBS para eliminar rastros de SFB. Se agregó 1 ml de tripsina al 0.05% para despegar las células y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C con 5% de CO₂.

Pasados los 5 minutos se adicionaron 5 ml de DMEM con 10% de SFB para neutralizar la tripsina y esta solución se trasladó a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 2000 rpm durante 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 4 ml de DMEM con SFB al 10%.

2.2.7. Conteo celular

El conteo celular se realizó a partir de una dilución 1:10 de la suspensión celular. En un tubo cónico se añadieron 170 µL de DMEM con 10% SFB, 10 µL de azul tripano y 20 µL de la suspensión celular. De la dilución se tomaron 10 µL y se colocaron en la cámara de Neubauer por capilaridad.

2.2.8. Preparación de las células HepG2 resistentes a insulina

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una afluencia de 4×10^4 células por pozo y se incubaron durante 24 horas con DMEM con 10% SFB. Pasadas las 24 horas se lavaron las células con PBS dos veces. Las células se clasificaron en el grupo control y en el grupo del modelo.

Las células control se incubaron con DMEM libre de SFB, mientras que las células del grupo modelo se incubaron en DMEM libre de SFB con distintas concentraciones de insulina (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M). Las células se incubaron durante diferentes tiempos (12, 24, 36 y 48 horas).

Pasado el tiempo de incubación se cambió el medio por medio DMEM alto en glucosa libre de SFB. Se incubó con el nuevo medio durante 24 horas para cuantificar el consumo de glucosa mediante técnicas colorimétricas.

2.2.9. Cuantificación de la glucosa por método enzimático-colorimétrico

La glucosa del sobrenadante se cuantificó con un ensayo enzimático-colorimétrico. Se empleó un kit comercial SpinReact para la cuantificación de la glucosa por el método de la glucosa oxidasa. Se tomaron 2 μ L del sobrenadante de las células y se mezclaron con 200 μ L de reactivo del kit. Pasados 20 minutos de incubación a temperatura ambiente se leyó la intensidad del color en un fotómetro lector de placas Multiskan FC a 492 nm.

2.2.10. Ensayo de captación de glucosa

A las células resistentes a insulina se les cambió el medio por DMEM libre de glucosa, SFB y rojo fenol. Se incubó durante 21 horas con este medio a 37 °C y atmósfera de 5% CO₂. Después, se añadió metformina como control positivo a diferentes concentraciones (12.5, 25 y 50 μ M) y se dejó incubar por 3 horas. Se lavaron las células para eliminar la metformina y se agregó insulina a 1×10^{-4} M

durante 30 minutos. A continuación, se adicionó un análogo fluorescente de glucosa (2-NBDG) en un rango de concentraciones (15, 25 y 35 μM) y las células se incubaron durante 30 minutos. Después se lavaron las células dos veces con PBS frío para detener el consumo de 2-NBDG. Por último, se lisaron las células con 100 μL de DMSO. La intensidad de la fluorescencia se midió usando un lector de placas BioTek Cytation3 con una longitud de onda de excitación de 467 nm y de emisión de 540 nm.

2.2.11. Análisis de los compuestos

Se realizó la misma metodología descrita en el apartado 2.2.10 cambiando el control positivo por los compuestos durante 3 horas en un rango de concentraciones de 25, 50 y 100 μM .

2.2.12. Análisis espectroscópico

2.2.12.1. Espectrofotoscopia UV

Los espectros UV-Vis se obtuvieron en el rango de 220 a 400 nm con el detector de arreglo de diodos Waters 2996 integrado en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters 600

2.2.12.2. Espectroscopia IR

El espectro de infrarrojo se obtuvo en la región de 550 a 4000 cm^{-1} usando un espectrómetro con transformada de Fourier Perkin Elmer Frontier. El espectro se registró acumulando 50 escaneos a una resolución de 4 cm^{-1} .

2.2.12.3. RMN

La obtención del espectro de ^1H -RMN de los compuestos se realizaron en un equipo Bruker Avance III de 400 MHz con sonda criogénica. Los espectros de ^{13}C -RMN se obtuvieron con una frecuencia de 100 MHz en el mismo equipo. Las muestras fueron disueltas con cloroformo deuterado.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1. Colecta de material herbal

El material vegetal fue colectado en el municipio de Montemorelos, Nuevo León, en octubre del 2015. Se decidió trabajar con esta colecta debido a que el departamento contaba con suficiente material (hoja seca y pulverizada) para el proyecto. El material recolectado constaba de la parte aérea de la planta previamente secada a temperatura ambiente hasta peso constante, triturada y almacenada en un lugar seco y fresco.

3.2. Cromatografía en columna gravitacional

El eluato de la cromatografía gravitacional descrita en el punto 2.2.4.1.1 fue recolectado en 100 tubos de ensayo de 16x150 mm.

3.3. Cromatografía en capa fina de fase normal

Con las fracciones obtenidas de la cromatografía gravitacional se realizó una cromatografía en capa fina de fase normal según lo descrito en el punto 2.2.4.2.1 en donde se pueden observar bandas con diferentes R_f (figura 8).

Los tubos (78-88) en los cuales se observó una banda con Rf de 0.25 fueron colectados e identificados como teuhetenona A impura.

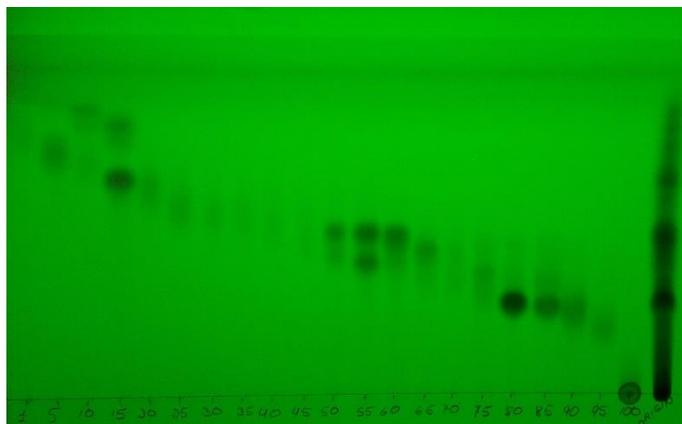


Figura 8. Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la columna gravitacional. Fase estacionaria: silica gel F254, Fase móvil: hexano:acetato de etilo (1:1)

3.3. Cromatografía en capa fina de fase inversa.

A la fracción de teuhetenona A impura se le realizó una cromatografía en capa fina de fase inversa. En la figura 9 se encuentra la capa fina realizada. En el primer y segundo carril se puede observar la banda del compuesto C, en el siguiente carril la banda del compuesto C, en el tercer carril impurezas de la fracción y en el último carril se encuentra la fracción de “teuhetenona impura”. En este último carril se pueden distinguir al menos cinco bandas, la banda con mayor Rf y de mayor intensidad corresponde a teuhetenona A.

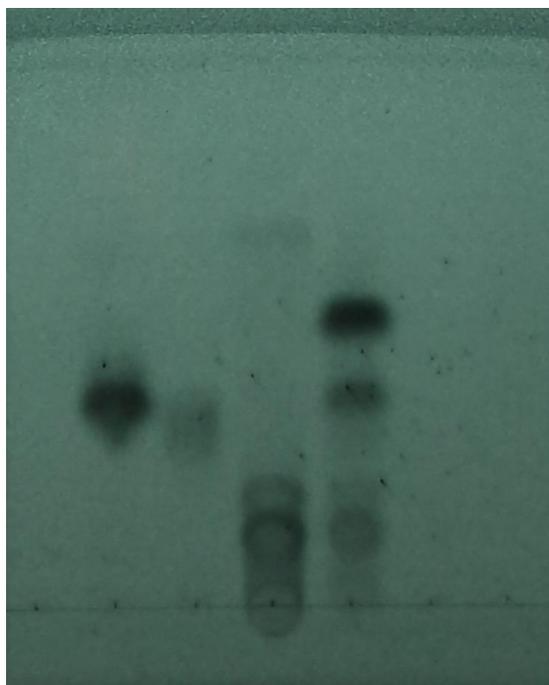


Figura 9. Cromatografía en capa fina de la fracción “teuhetenona impura”. Fase estacionaria silica gel F_{254S} C₁₈, Fase móvil metanol:agua (7:3).

3.4. Cromatografía con columna preparativa

La fracción que contenía la teuhetenona A impura fue separada por cromatografía de líquidos con una columna preparativa. Las condiciones del equipo están descritas en el punto 2.2.4.1.2. La recolección de los tubos se realizó en tiempo real según las señales del detector.

El cromatograma de esta separación se encuentra en la figura 10 donde se pueden observar 5 picos que sobrepasan la capacidad de absorbancia del detector.

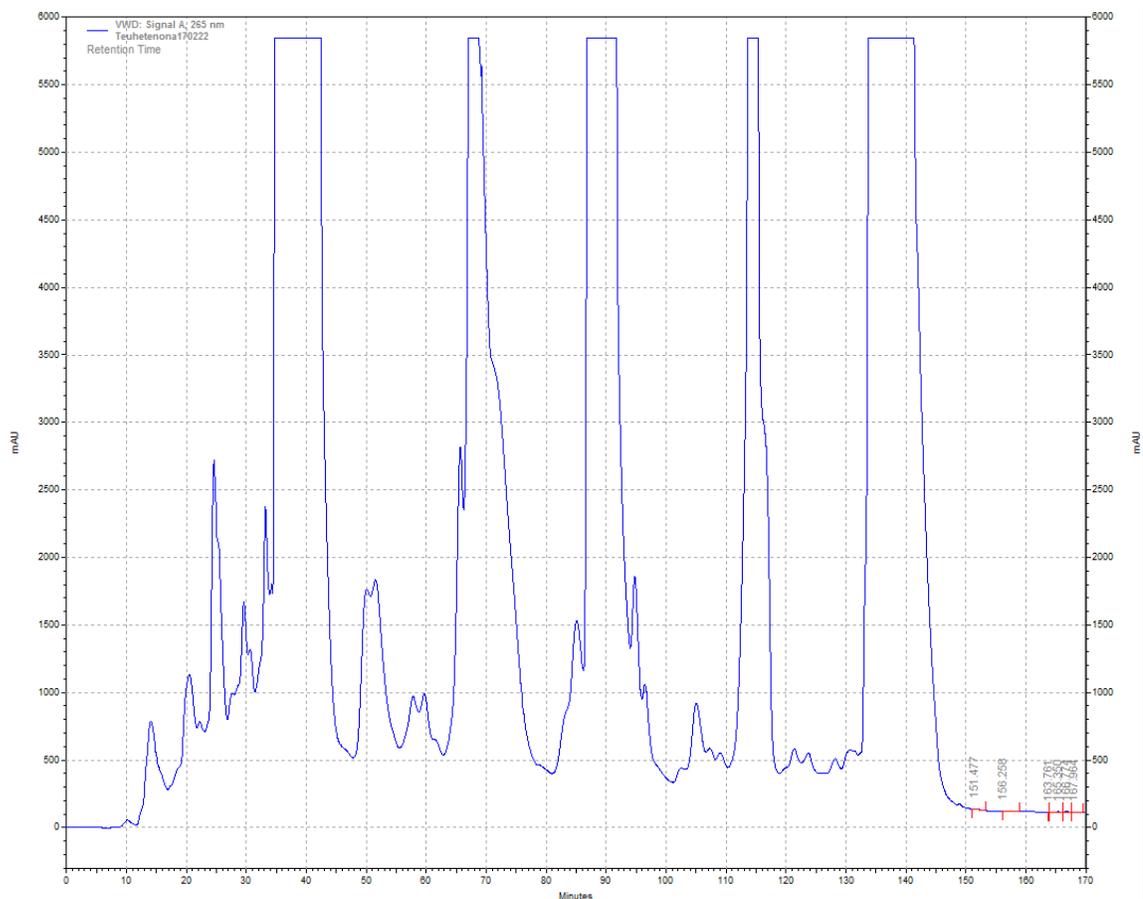


Figura 10. Cromatograma de la cromatografía preparativa de teuhetenona impura. FE: C₁₈, FM: MeOH (50-100%), detección a 265 nm.

Se recolectaron los tubos en los cuales se observan los picos de mayor intensidad de absorbancia. La primera señal que comprende aproximadamente del minuto 36 al 44 corresponde a la teuhetenona A. La segunda señal que inicia en el minuto 66 y finaliza al 76 corresponde al compuesto que denominamos B. La tercera señal observable cubre del minuto 87 al 94 y es propia del compuesto que denominamos C. Por último, se encuentran dos señales que abarcan del minuto 115 al 120 y del 133 al 140, las cuales no pudieron ser identificadas.

3.5. Análisis por HPLC-DAD

Los tubos recolectados se analizaron por medio de HPLC con detector de arreglo de diodos según lo especificado en el punto 2.2.4.1.4. La pureza de cada fracción recolectada se calculó a partir de las áreas de los picos observados en los cromatogramas.

En las siguientes figuras se pueden observar los cromatogramas obtenidos por HPLC de los compuestos observados en la cromatografía preparativa.

En la figura 11 se encuentra el cromatograma obtenido por la fracción de “teuhetenona impura” antes de ser fraccionada por la cromatografía preparativa. El pico con tiempo de retención de 21.859 minutos pertenece a la teuhetenona A, a los 28.111 minutos eluye el compuesto B y el pico con t_R de 29.440 corresponde al compuesto C

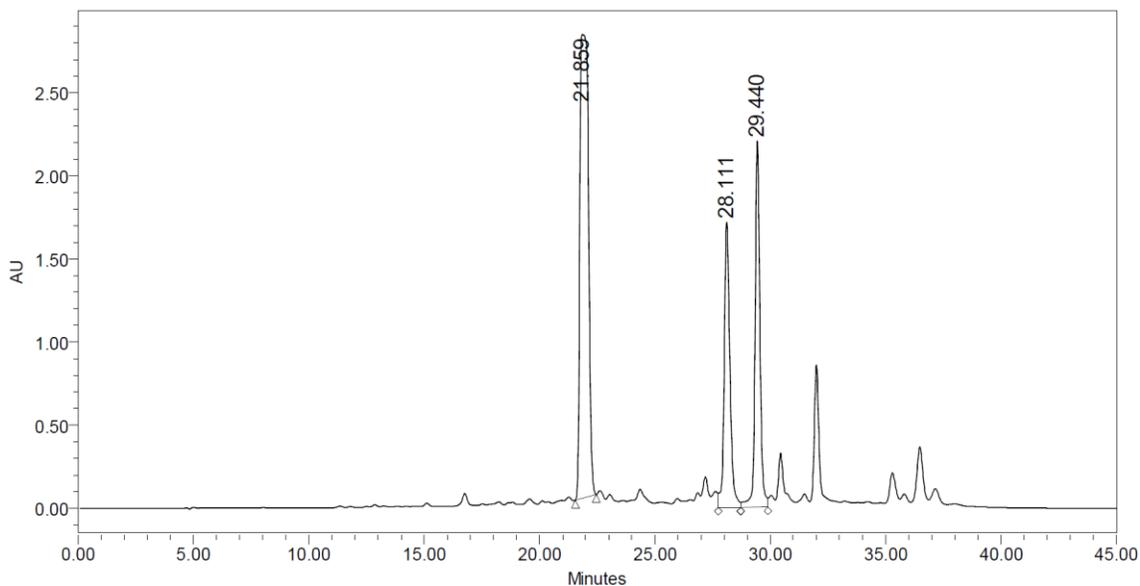


Figura 11. Cromatograma obtenido a partir de la fracción “teuhetenona impura”.
FE: C₁₈, FM: MeOH (30-70%): HCOOH 0.1%, Detección: 254 nm.

Se logró aislar teuhetenona A hasta alcanzar una pureza cromatográfica del 99%. En la figura 12 se observa con un tiempo de retención de 22.749 minutos.

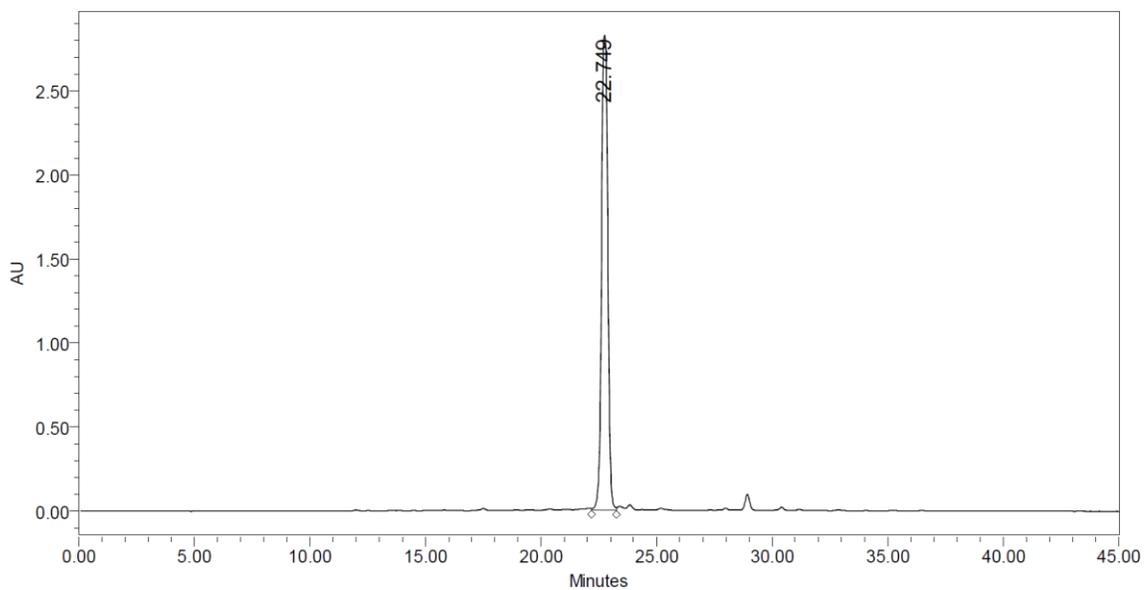


Figura 12. Cromatograma de teuhetenona A con pureza del 99%. FE: C₁₈, FM: MeOH (30-70%): HCOOH 0.1%, Detección: 254 nm.

El compuesto B también se pudo aislar con una pureza de 92%. En el cromatograma el tiempo de retención para el compuesto es de 22.749 minutos (figura 13).

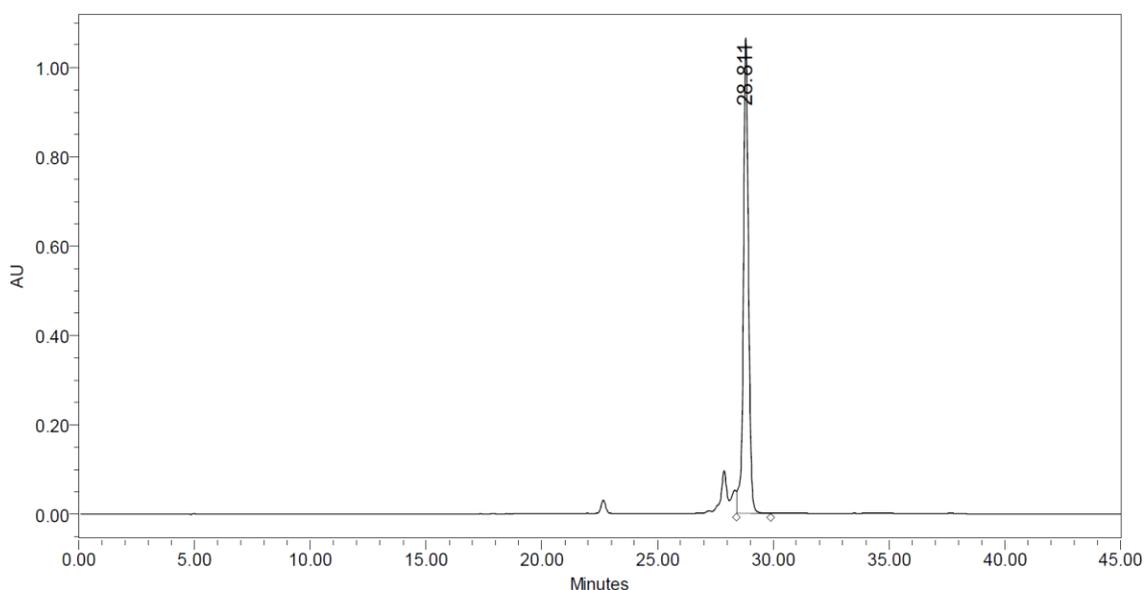


Figura 13. Cromatograma de compuesto B con pureza cromatográfica de 92%. FE: C₁₈, FM: MeOH (30-70%): HCOOH 0.1%, Detección: 254 nm.

El compuesto C no fue posible purificarlo a partir de la columna preparativa. En las fracciones obtenidas a partir de la columna preparativa (figura 14), se logró obtener junto con otro compuesto sin identificar. Se realizó una columna adicional que se detalla en el apartado 2.2.4.1.3. Con esta columna fue posible obtener el compuesto C con una mayor pureza y apropiada para el análisis por RMN.

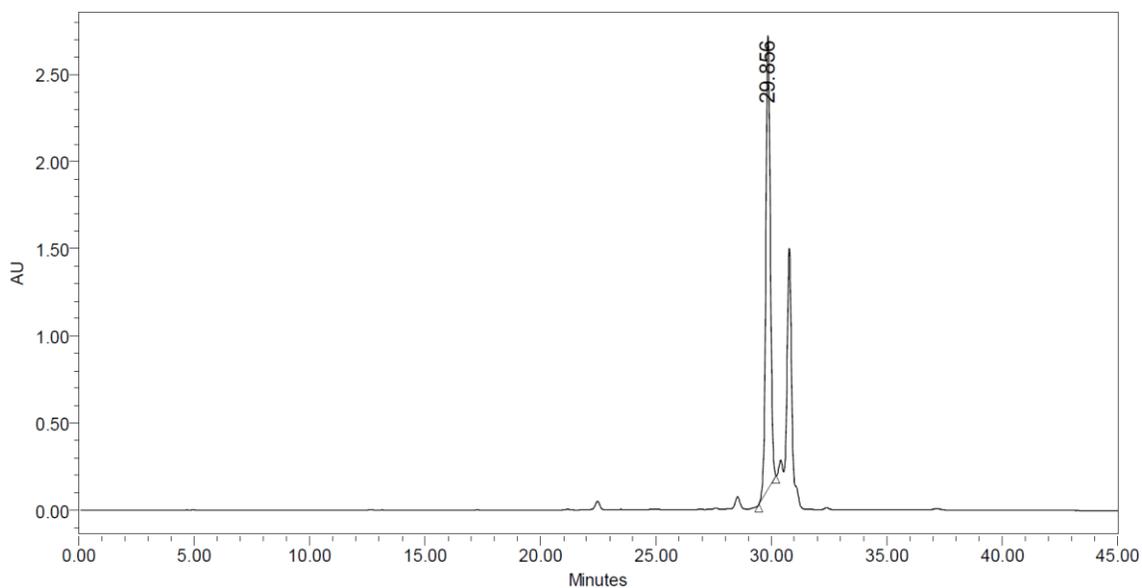


Figura 14. Cromatograma del compuesto C (t_R 29.856) y otro compuesto (t_R 30.987) obtenido a partir de la columna preparativa. FE: C₁₈, FM: MeOH (30-70%); HCOOH 0.1%, Detección: 254 nm.

Una vez realizada la columna de fase inversa se logró obtener el compuesto C puro. La figura 15 muestra el cromatograma del compuesto C con pureza del 95% y un tiempo de retención de 29.889 minutos.

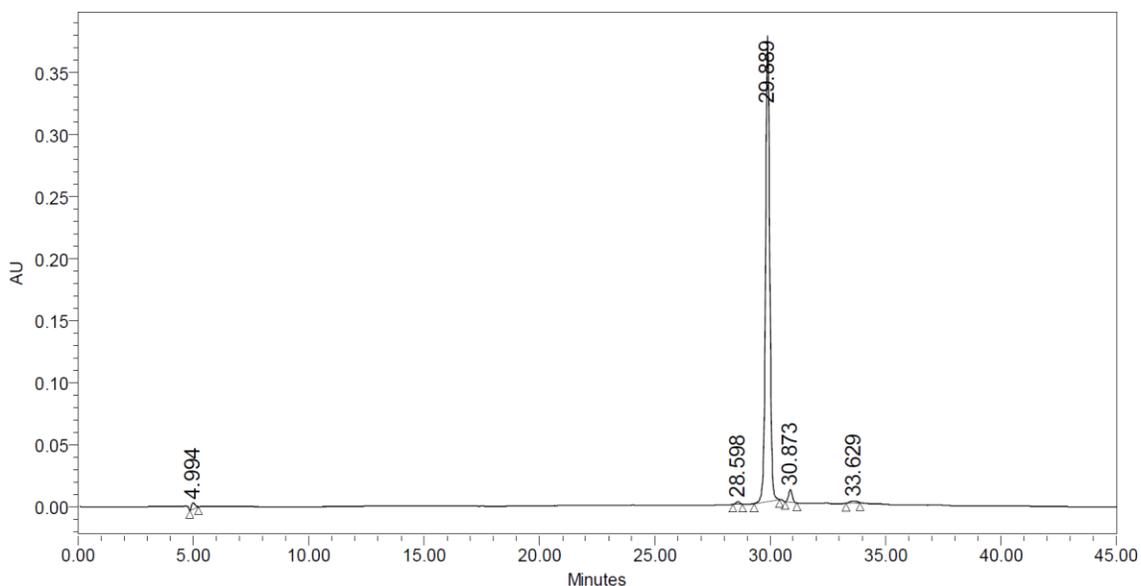


Figura 15. Cromatograma del compuesto C puro obtenido con la columna cromatográfica de fase inversa. FE: C₁₈, FM: MeOH (30-70%): HCOOH 0.1%, Detección: 254 nm.

3.5. Elucidación de la estructura de compuesto B.

3.5.1. Espectro UV del compuesto B.

En la espectrometría molecular de ultravioleta-visible se observó una sola banda con longitud de onda de máxima absorbancia en 243.4 nm (figura 16).

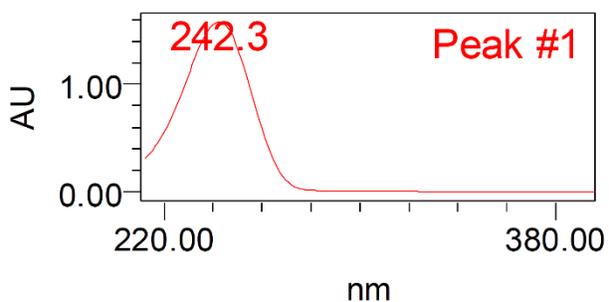


Figura 16. Espectro UV del Compuesto B.

3.5.2 Espectro IR del compuesto B

En el espectro de infrarrojo del compuesto B (figura 17) se puede observar la señal correspondiente al estiramiento O-H entre 3600 y 3200 cm^{-1} . En 3000 cm^{-1} se observa una señal débil que corresponde al estiramiento del enlace C-H con hibridación sp^2 . Por debajo de 3000 cm^{-1} se observaron señales similares pero correspondientes al estiramiento C-H con hibridación sp^3 . Se observó la señal intensa característica del estiramiento C=O situada en 1650 cm^{-1} , seguida de una señal moderada en 1625 cm^{-1} que es propia del doble enlace C=C.

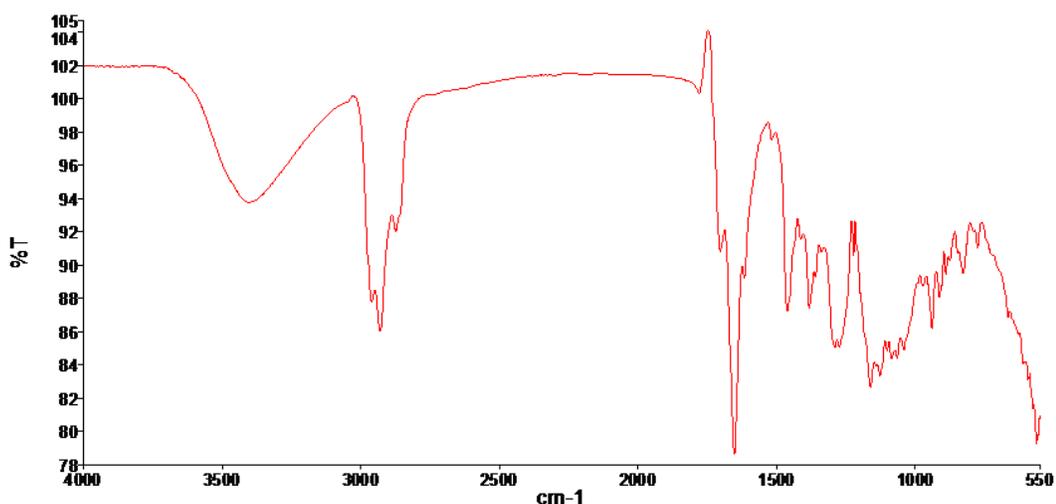


Figura 17. Espectro IR del Compuesto B.

3.5.3. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto B

Con el espectro de ^{13}C -RMN se pudieron observar 15 señales. En el espectro se pueden observar 12 señales por debajo de 80 ppm que corresponden a carbonos alifáticos. Se encontraron dos señales en el rango de 170-100 ppm,

124.2 y 171.6 ppm respectivamente, que corresponden a carbonos de alquenos y una señal en 199.9 ppm correspondiente al grupo carbonilo.

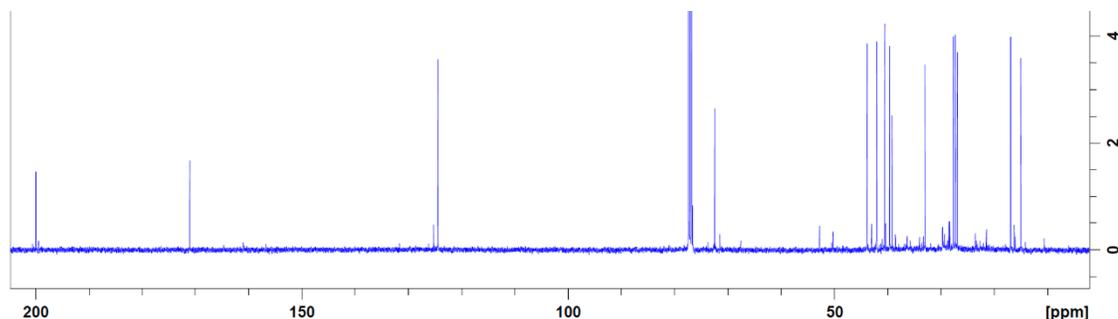


Figura 18. Espectro de ¹³C-RMN de compuesto B.

3.5.4. Espectro ¹³C-RMN por DEPT del compuesto B

3.5.4.1. DEPT 90°

En el espectro de ¹³C-RMN por DEPT 90° (figura 19) se pueden observar únicamente las señales de carbonos de metinos. Las señales que aparecieron en el espectro fueron aquellas de 40.5, 43.8 y 124.2 ppm por lo que compuesto B únicamente cuenta con dos metinos alifáticos y uno correspondiente al alqueno.

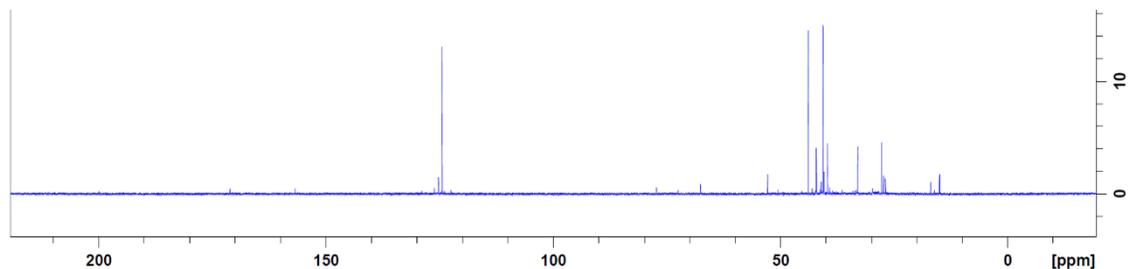


Figura 19. Espectro de ¹³C-RMN por DEPT 90° de compuesto B.

3.5.4.1. DEPT 135°

Por otro lado, en un espectro ^{13}C -RMN por DEPT 135° (figura 20) se pueden observar las señales de metinos y metilos como señales positivas y como señales negativas las de los carbonos tipo metileno. En el espectro se observaron cuatro señales negativas situadas en 27.7, 32.9, 39.6 y 42.0 ppm, lo cual indica que estos carbonos son de tipo metileno. También se observaron las señales que aparecieron en el DEPT 90° junto con otras cuatro señales que se pueden inferir que son de metilos. Estas señales se encuentran en 14.9, 16.9, 26.9 y 27.3 ppm. Cabe resaltar que las señales de 39.1, 72, 171.6 y 199.9 ppm no se encontraron en el espectro lo cual indica que son carbonos cuaternarios.

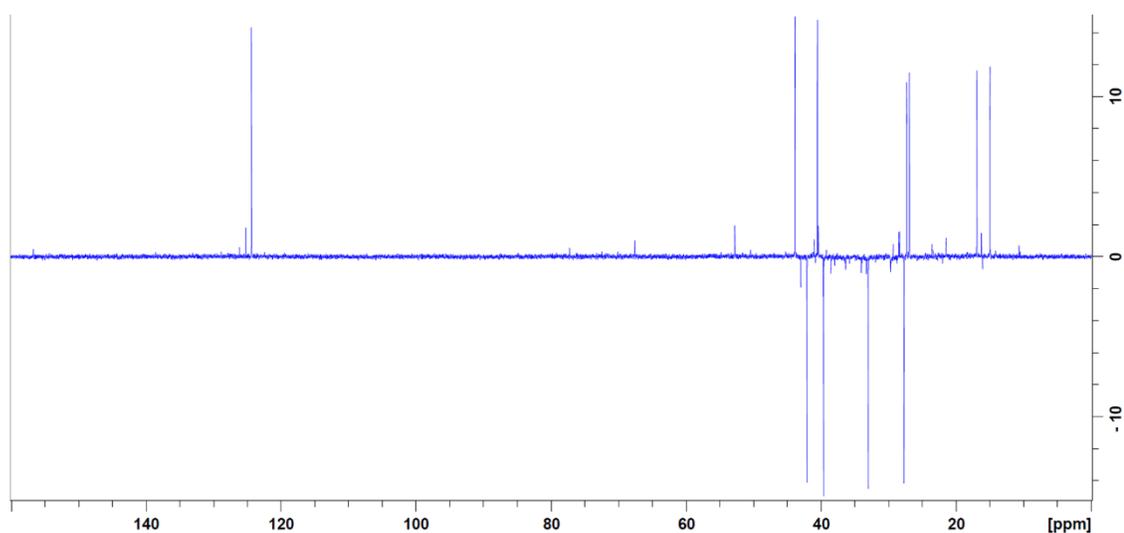


Figura 20. Espectro de ^{13}C -RMN por DEPT 135° de compuesto B.

Como resumen se presenta la siguiente tabla con los desplazamientos de las señales y los tipos de carbonos que corresponden.

Tabla 4. Desplazamientos y tipos de carbonos obtenidos de las señales del espectro ^{13}C -RMN del compuesto B.

δ , ppm	Tipo de carbono
14.9 ppm	CH ₃
16.9 ppm	CH ₃
26.9 ppm	CH ₃
27.3 ppm	CH ₃
27.7 ppm	CH ₂
32.9 ppm	CH ₂
39.1 ppm	C
39.6 ppm	CH ₂
40.5 ppm	CH
42 ppm	CH ₂
43.8 ppm	CH
72 ppm	C
124.2 ppm	CH=
171.6 ppm	C=
199.9 ppm	C=O

3.5.5. Espectro ^1H -RMN del compuesto B

En el espectro de ^1H -RMN del compuesto B (figura 21) se pueden observar las señales de protones unidos a carbonos alifáticos y una señal de un protón

unido a un carbono de alqueno. obtenidas de este análisis. En la tabla 5 se describen los desplazamientos químicos e integraciones de los protones del compuesto B.

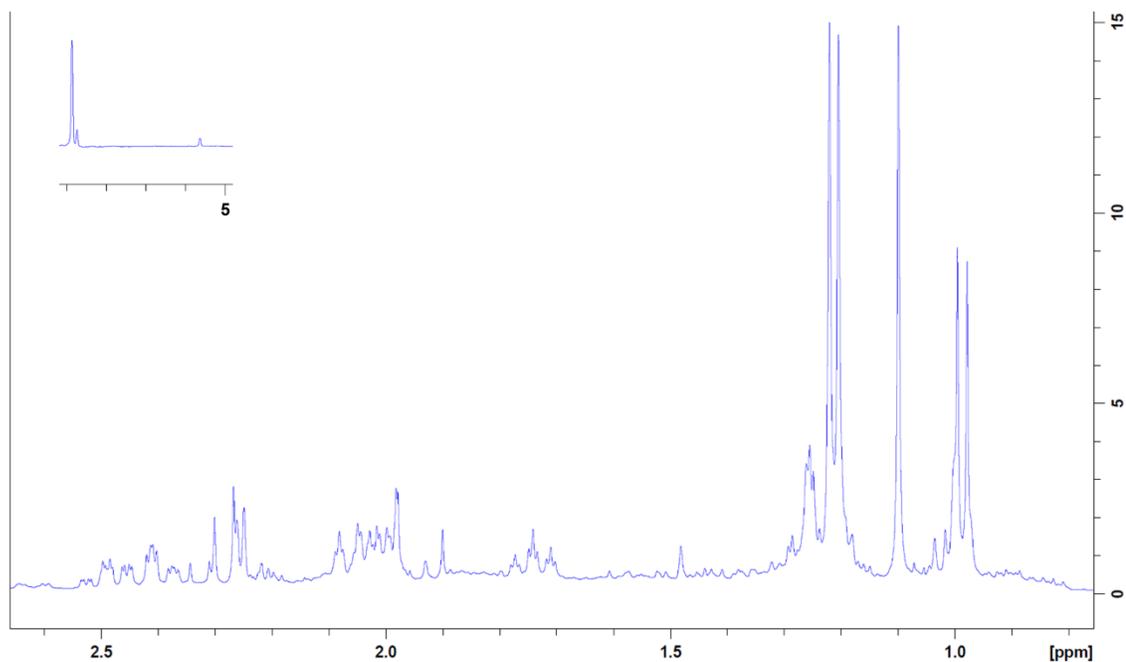


Figura 21. Espectro ^1H -RMN del compuesto B.

Tabla 5. Desplazamientos e integraciones de las señales obtenidas en el Espectro ^1H -RMN del compuesto B.

δ , ppm	Integraciones, particiones
0.98 ppm	4 H
1.09 ppm	3 H,
1.20 ppm	7 H
1.73 ppm	1 H

1.99 ppm	3 H
2.29 ppm	3 H
2.48 ppm	1 H
5.70 ppm	1 H

3.5.6. Espectro HSQC del compuesto B.

Cuando se realiza un espectro de HSQC es posible relacionar las señales observadas en el espectro de ^1H -RMN con aquellas señales del espectro ^{13}C -RMN. En el espectro HSQC del compuesto B (figura B) se pueden distinguir de mejor manera las particiones y los desplazamientos de los hidrógenos.

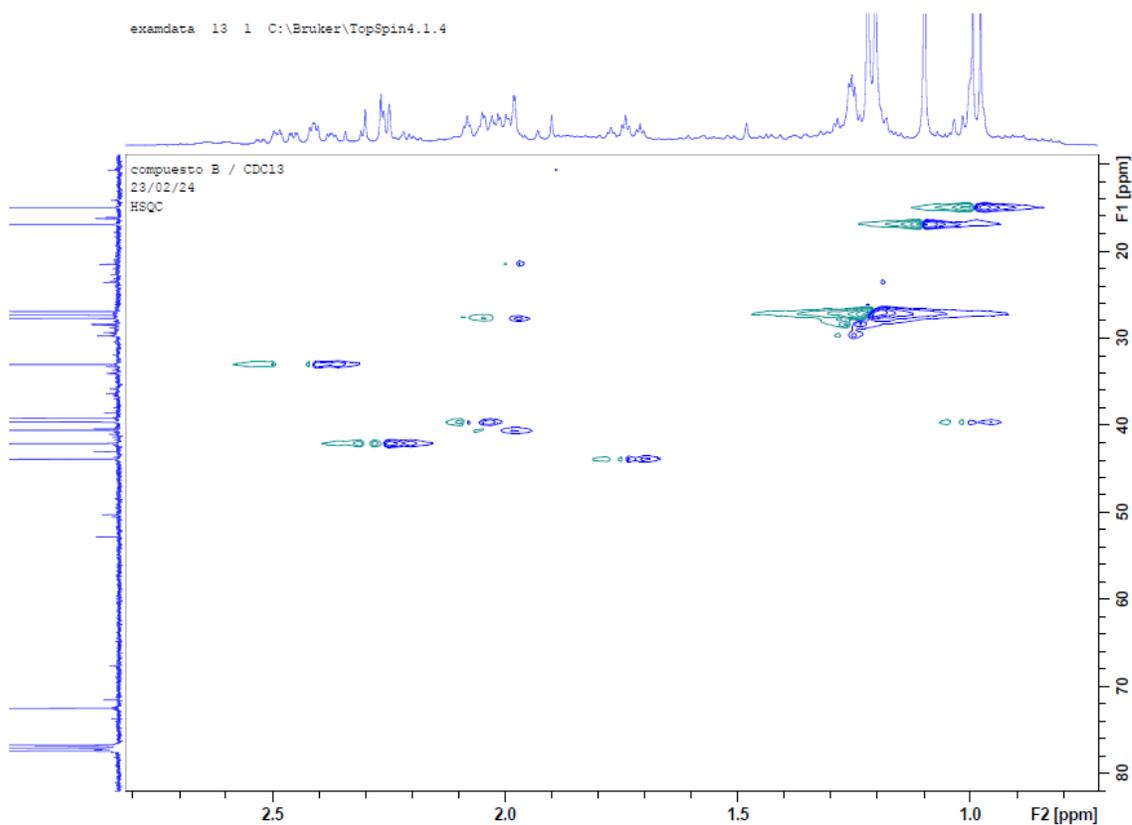


Figura 22. Espectro de HSQC del compuesto B.

3.5.7. Espectro COSY del compuesto B.

Con el espectro COSY se pueden observar las interacciones de hidrógenos vecinos dentro del espectro de ^1H -RMN. Se presenta el espectro COSY del compuesto B en la figura 23.

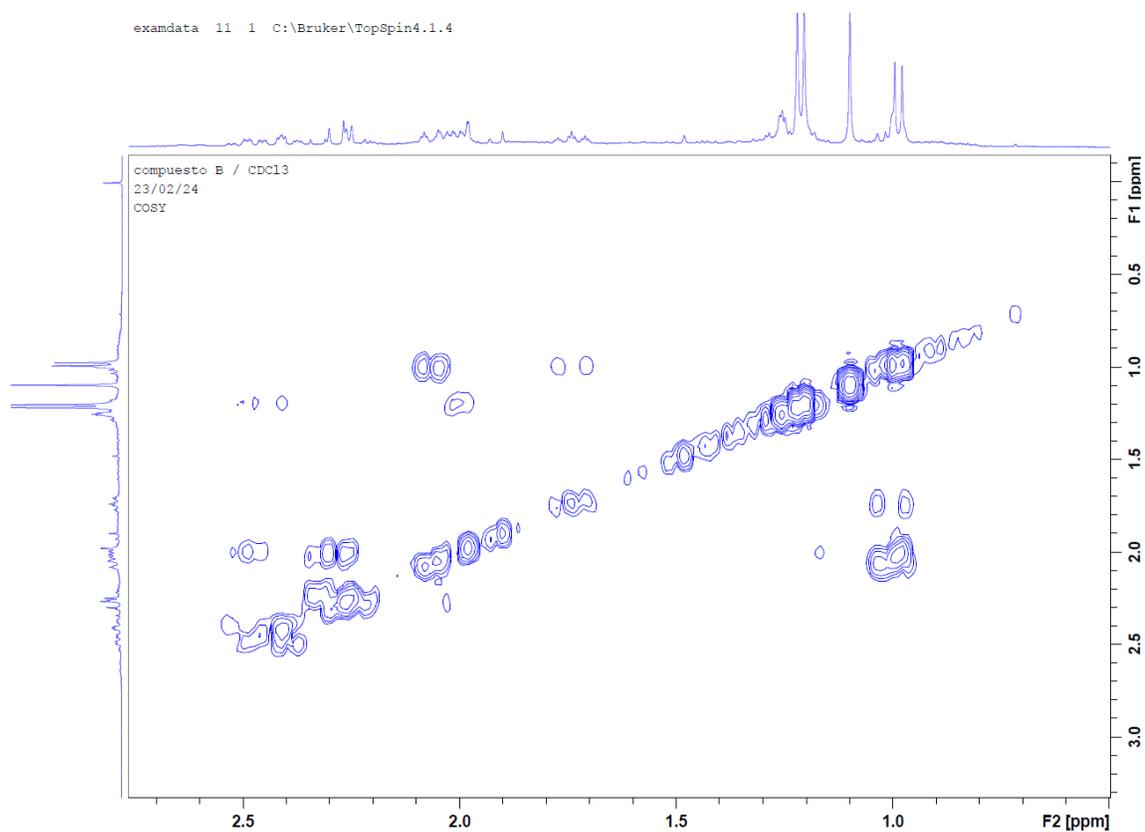


Figura 23. Espectro COSY del compuesto B.

Los datos espectroscópicos obtenidos coinciden con aquellos del compuesto de nombre 11-hidroxi-valenc-1(10)-en-2-ona. La estructura del compuesto se muestra en la figura 24. Sin embargo, con los datos obtenidos no es posible presentar una configuración absoluta de la molécula, sino que únicamente se presenta la estructura planar.

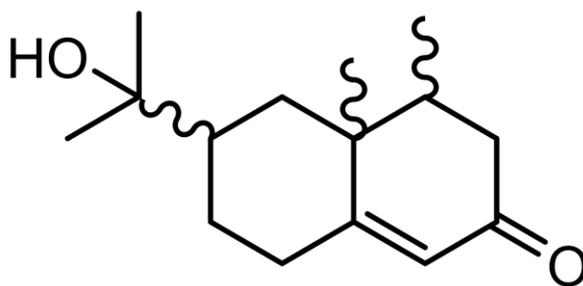


Figura 24. Estructura de la 11-hidroxi-valenc-1(10)-en-2-ona.

3.6. Elucidación de la estructura del compuesto C.

3.6.1. Espectro UV del compuesto C.

En el espectro de ultravioleta del compuesto C se observan dos bandas, la primera situada en λ_{\max} 267.1 nm mientras que la segunda es más ancha y se encuentra en λ_{\max} 340.9 nm (figura 25).

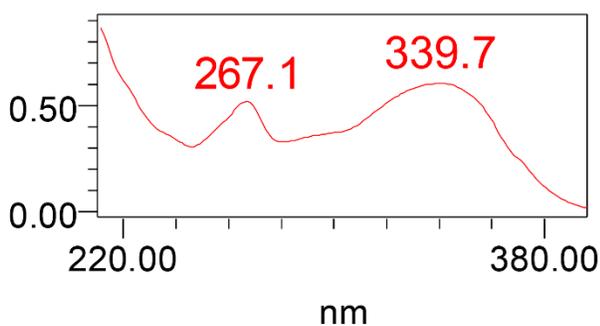


Figura 25. Espectro UV del compuesto C.

3.6.2. Espectro IR del compuesto C.

En el espectro de infrarrojo se pudieron observar las siguientes señales: una señal ancha que abarca desde 3550 cm^{-1} hasta 3250 cm^{-1} , región donde se

puede encontrar el estiramiento O-H. Tres señales en la región de 3000 cm^{-1} , la primera en 3000 cm^{-1} que corresponde al estiramiento del enlace C-H de hibridación sp^2 ; seguida de una a 2950 cm^{-1} y en 2900 cm^{-1} ; correspondientes al estiramiento de C-H con hibridación sp^3 . En la región de 1750 cm^{-1} se observa una señal débil mientras que en la región de 1650 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} se pueden distinguir distintas señales de mediana intensidad. Otras señales que se pueden distinguir son señales de alta intensidad encontradas en 1500 , 1350 , 1300 , 1250 y 1040 cm^{-1} (figura 26).

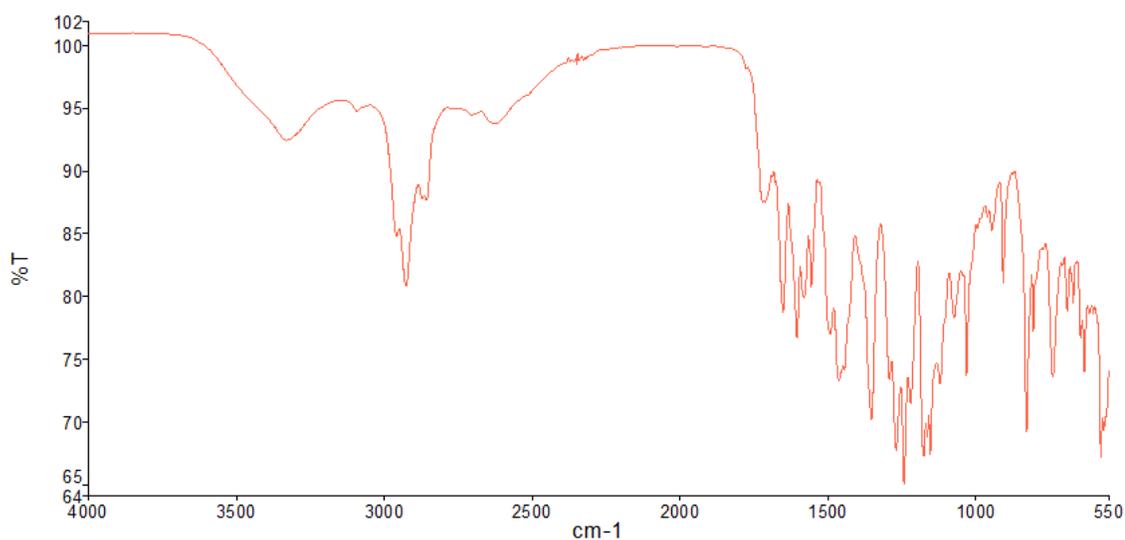


Figura 26. Espectro IR del compuesto C.

3.6.3. ^{13}C -RMN del compuesto C.

En el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto C (figura 27) se observaron 13 señales. Todas las señales se encuentran por arriba de 90 ppm, lo cual indica que no hay presencia de carbonos alifáticos. La mayoría de las señales se

encuentran entre 90 y 165 ppm. Los carbonos que generan señales entre estos valores son los alquenos y aromáticos, indicando que la molécula posee múltiples insaturaciones. Además, la señal en 182.5 ppm es correspondiente a un grupo carbonilo.

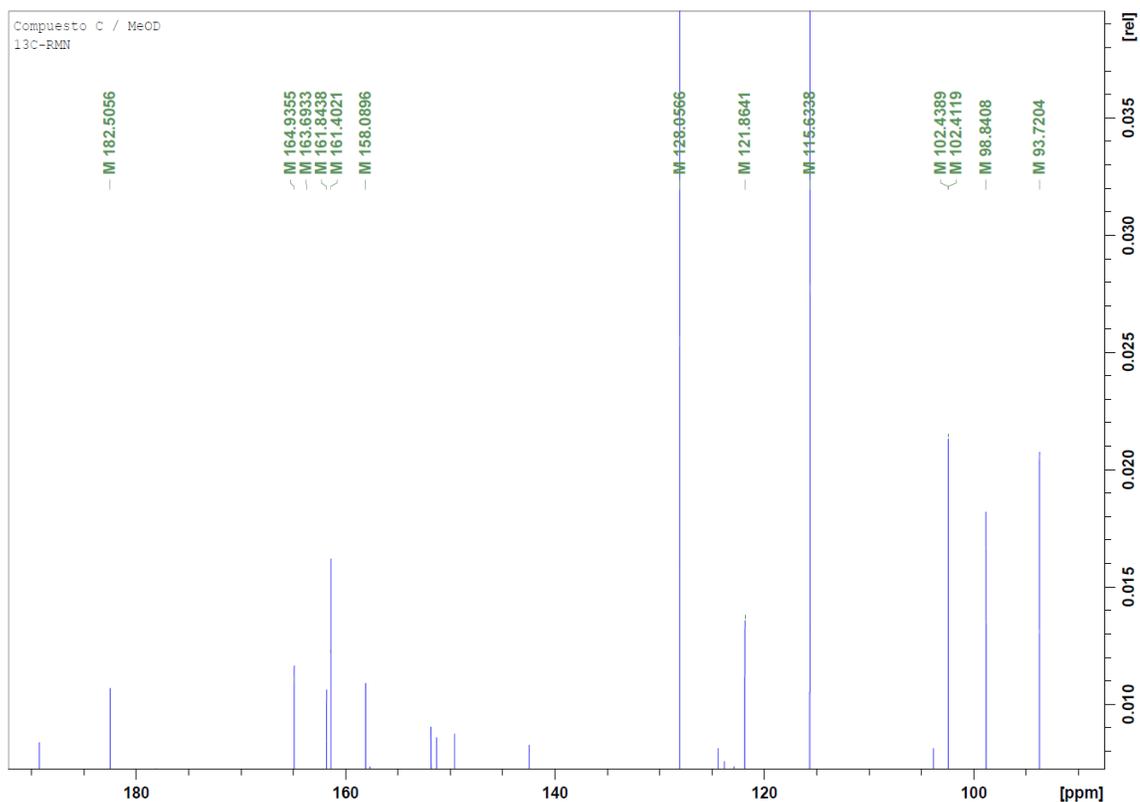


Figura 27. Espectro ^{13}C -RMN del compuesto C.

En la siguiente tabla se resumen los desplazamientos químicos de los carbonos observados en el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto C.

Tabla 6. Desplazamientos obtenidos de las señales del espectro ^{13}C -RMN del compuesto C.

δ , ppm	δ , ppm
1	182.51
2	164.94
3	163.69
4	161.84
5	161.40
6	158.09
7	128.06
8	121.86
9	115.63
10	102.43
11	102.41
12	98.84
13	93.72

3.6.3. Espectro ^1H -RMN del compuesto C.

En el espectro de ^1H -RMN del compuesto C (figura 28) se pueden observar cinco señales que se encuentran en la región de dobles enlaces. Dos de estas señales, 7.86 y 6.93 ppm, integran para dos hidrógenos y muestran partición de doblete. Además, estas dos señales presentan la misma constante de acoplamiento por lo que estos protones son vecinales. Esta configuración es

común encontrarla en anillos aromáticos sustituidos en la posición *para*. Las señales de los hidrógenos con desplazamiento de 6.45 y 6.21 ppm se parten en dobletes y cuentan con la misma constante de acoplamiento, por lo que deben ser hidrógenos cercanos entre sí. También se puede observar que la molécula únicamente cuenta con 7 hidrógenos unidos a carbonos.

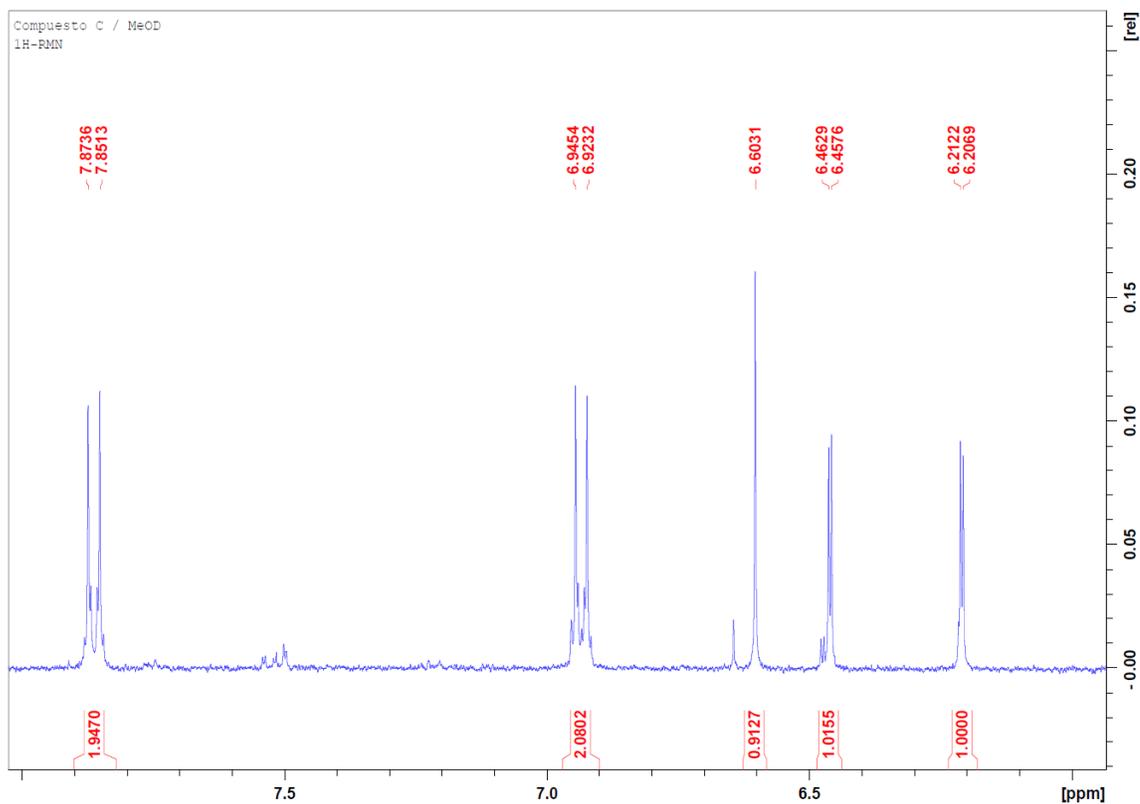


Figura 28. Espectro de ^1H -RMN del compuesto C.

En la tabla 7 se sintetiza los desplazamientos, integraciones y particiones de los protones observados en el Espectro de ^1H -RMN del compuesto C.

Tabla 7. Desplazamientos, integraciones y particiones obtenidas de las señales del espectro ^1H -RMN del compuesto C.

δ , ppm	Integración, partición
6.21 ppm	1 H, d
6.46 ppm	1 H, d
6.60 ppm	1 H, s
6.93 ppm	2 H, d
7.86 ppm	2 H, d

3.6.5. Espectro HSQC del compuesto C.

En la figura 29 se presenta el espectro HSQC del compuesto C. Únicamente se muestra la región del espectro de ^{13}C en donde hubo correlación con las señales de los protones. Del espectro destaca cómo aquellos carbonos que tienen hidrógeno unido son metinos. Esto es una señal más de que el compuesto C está constituido por anillos aromáticos

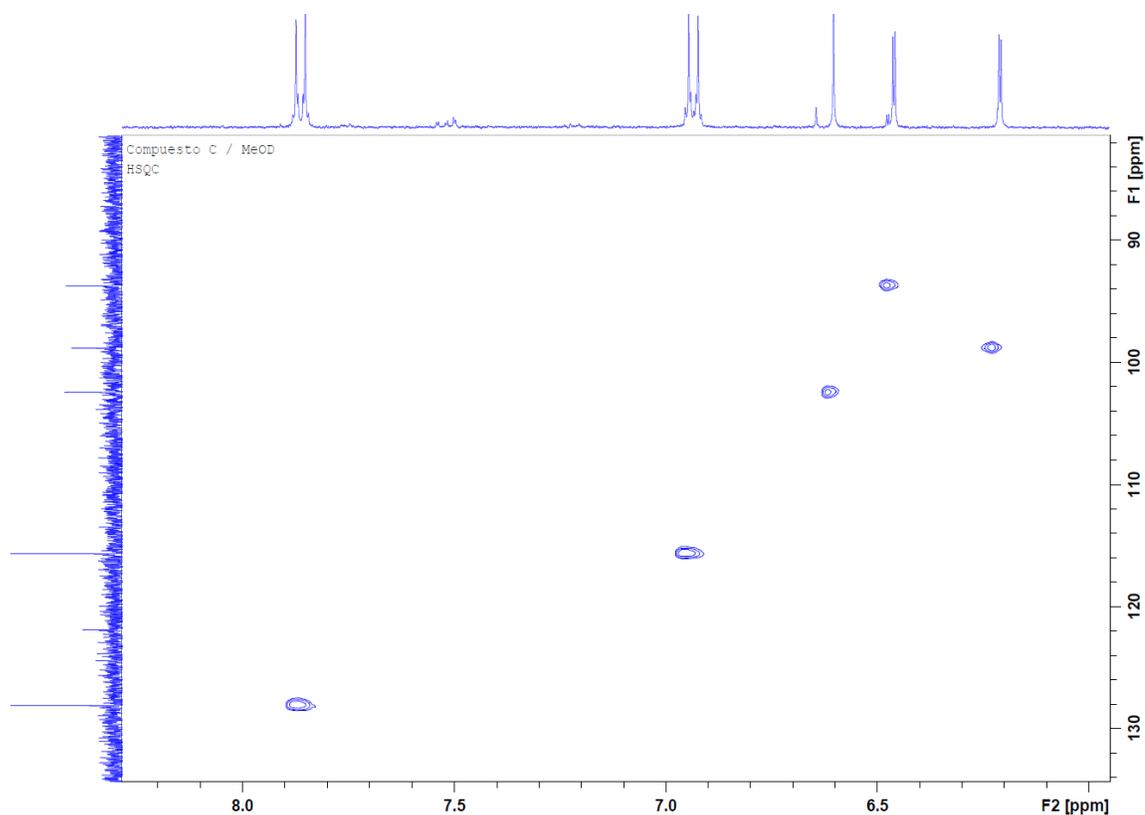


Figura 29. Espectro HSQC del compuesto C.

Con todos los resultados obtenidos con los distintos métodos espectroscópicos se sospechó que el compuesto C correspondía a la apigenina. Para confirmar esta sospecha se analizó por ^1H -RMN un estándar de apigenina y se comparó el espectro con aquel obtenido con el compuesto C.

En la figura 30 se muestra en color rojo el espectro obtenido con el compuesto C y en color azul el espectro obtenido a partir del estándar de apigenina. Con esta comparación se puede observar que el número de señales es idéntico, así como el desplazamiento, integración y particiones de las señales.

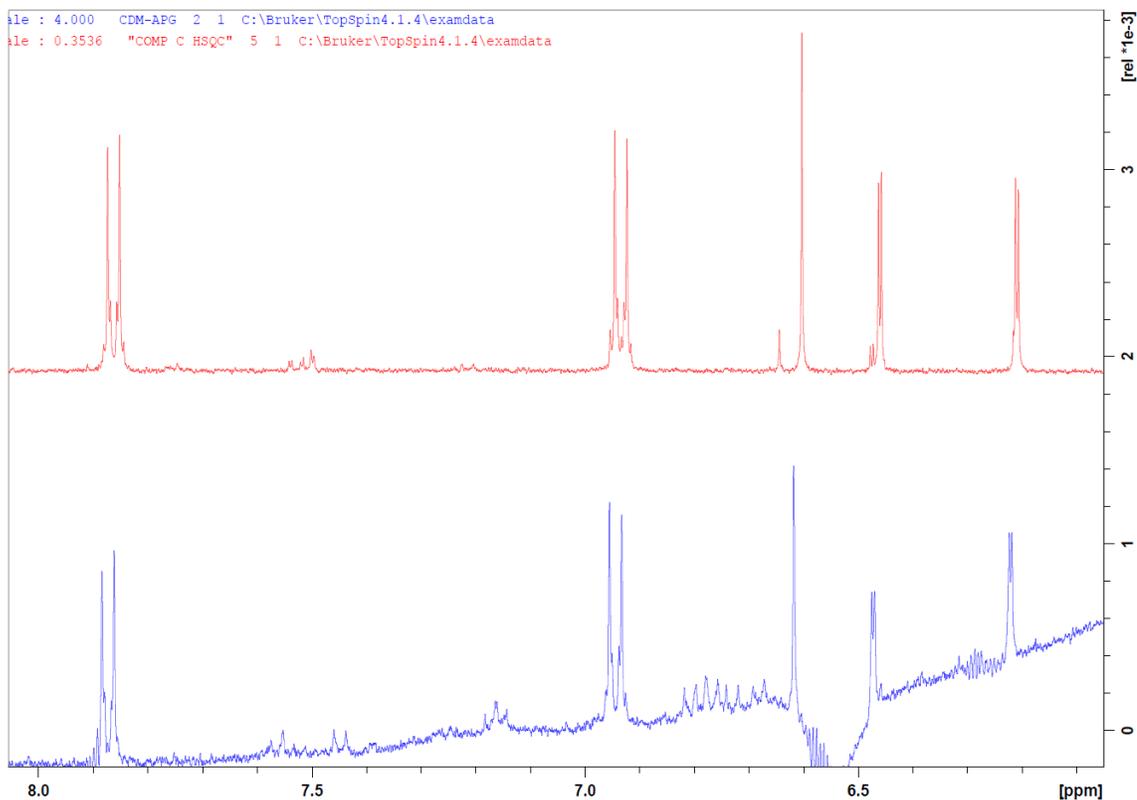


Figura 30. Comparación del espectro ^1H -RMN del compuesto C y apigenina.

Con estos datos se obtuvo que el compuesto C corresponde a la apigenina, una flavona de 15 carbonos que suele ser la aglucona de varios glucósidos de origen natural. En la figura 31 se presenta la estructura de la apigenina.

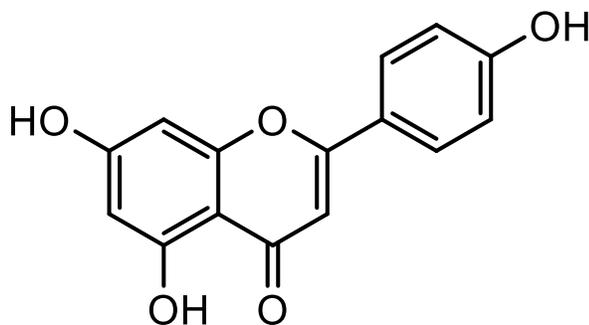


Figura 31. Estructura de la apigenina.

3.7. Modelo de desarrollo de resistencia a insulina en células HepG2.

En base a la literatura ya publicada se implementó un modelo para desarrollar resistencia a la insulina en células HepG2. Las variables que se analizaron fueron las concentraciones de insulina con las que se incubaron las células y el tiempo que se incubaron con la insulina.

Las células se sembraron en placas de 96 pozos en los cuales se agregaron distintas concentraciones de insulina y se incubaron durante 12, 24, 36 y 48 horas respectivamente. Posteriormente, se cambió el medio por uno sin insulina y se midió la glucosa del sobrenadante del nuevo medio pasadas 24 horas de incubación.

Los datos de la glucosa en el sobrenadante se analizaron mediante el método de Dunnett para demostrar si los resultados tienen diferencia significativa respecto al control. Aquellos conjuntos de datos cuyo valor de p sea menor a 0.05 indicará que el valor de la media es diferente de la media del control.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos después de incubar las células con insulina durante 12 horas

Tabla 8. Consumo de glucosa pasadas 12 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.

Concentración de insulina (M)	Promedio (mM)	D.E.	Porcentaje de consumo de glucosa respecto al control	Valor de p
Control	9.068	0.4924	100.0%	
10 ⁻⁹	9.249	0.3267	102.0%	0.9528
10 ⁻⁸	9.192	0.7275	101.4%	0.9908
10 ⁻⁷	8.563	0.7487	94.4%	0.2706
10 ⁻⁶	7.959	0.6183	87.7%	0.0012
10 ⁻⁵	8.035	0.6596	88.6%	0.0027

Control: células sin exposición a insulina

Se pudo observar disminución en el consumo de glucosa cuando se incubaron las células con dosis de insulina de 10⁻⁷ a 10⁻⁵ M. No obstante, hubo diferencia significativa únicamente en las concentraciones de 10⁻⁶ y 10⁻⁵ M de insulina.

La figura 32 corresponde al consumo de glucosa de las células pasadas 12 horas de incubación con insulina.

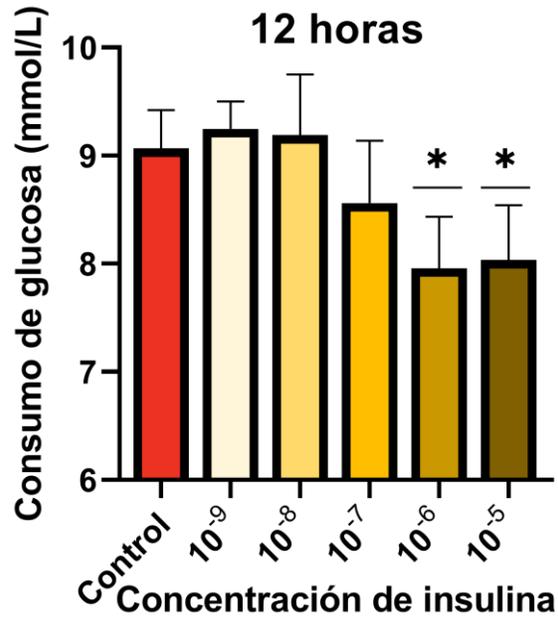


Figura 32. Consumo de glucosa pasadas 12 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.

Los resultados obtenidos tras 24 horas de incubación se muestran en la tabla 9 y figura 33. Se pudo observar que también se observa una disminución significativa en las concentraciones de 10^{-6} y 10^{-5} M de insulina. El consumo de glucosa disminuyó a 84.9% y 89.7% respectivamente.

Tabla 9. Consumo de glucosa pasadas 24 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.

Concentración de insulina (M)	Promedio	D.E.	Porcentaje de consumo de glucosa respecto al control	Valor de p
Control	8.693	0.5224	100.0%	
10 ⁻⁹	8.793	0.3535	101.2%	0.9952
10 ⁻⁸	8.595	0.6838	98.9%	0.9961
10 ⁻⁷	8.777	0.3111	100.9%	0.9982
10 ⁻⁶	7.382	0.6175	84.9%	<0.0001
10 ⁻⁵	7.8	0.8893	89.7%	0.0125

Control: células sin exposición a insulina

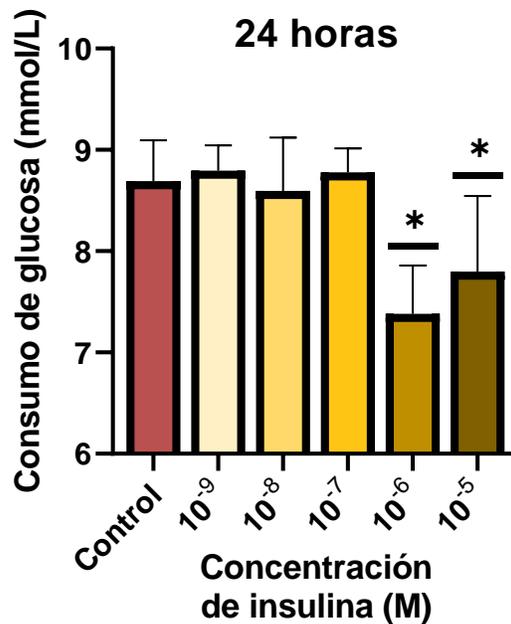


Figura 33. Consumo de glucosa pasadas 24 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.

Los resultados después de 36 horas de incubación con insulina se resumen en la tabla 10 y figura 34. Se observó el mismo patrón que en los demás tiempos de incubación, en el cual las concentraciones de 10^{-6} y 10^{-5} M fueron estadísticamente diferentes al control. El consumo fue del 82.7% para la dosis de 10^{-6} M de insulina y de 81.2% usando 10^{-5} M.

Tabla 10. Consumo de glucosa pasadas 36 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.

Concentración de insulina (M)	Promedio	D.E.	Porcentaje de consumo respecto al control	Valor de p
Control	6.038	0.3935	100.0%	
10^{-9}	6.188	0.6071	102.5%	0.9815
10^{-8}	5.838	0.6099	96.7%	0.9403
10^{-7}	5.78	0.8869	95.7%	0.8401
10^{-6}	4.992	0.6149	82.7%	0.0033
10^{-5}	4.903	0.5077	81.2%	0.0025

Control: células sin exposición a insulina

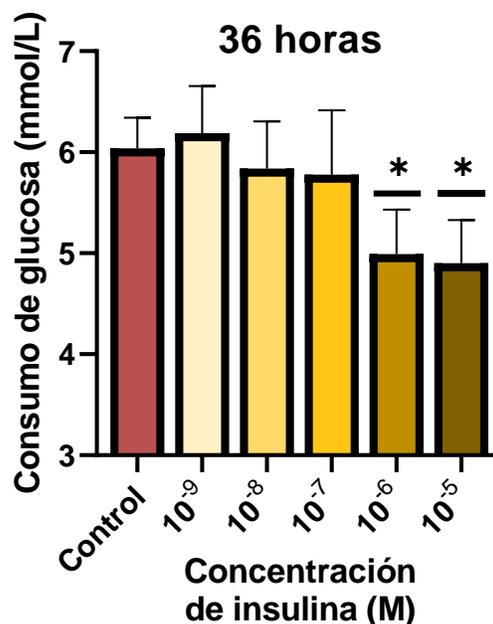


Figura 34. Consumo de glucosa pasadas 36 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.

Por último, se presentan los resultados obtenidos tras 48 horas de incubación con insulina en la tabla 11 y figura 35. Se observaron resultados similares a los demás tiempos de incubación. Las concentraciones de insulina que mostraron una diferencia significativa respecto al control fueron 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M.

Tabla 11. Consumo de glucosa pasadas 48 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.

Concentración de insulina (M)	Promedio	D.E.	Porcentaje de consumo respecto al control	Valor de p
Control	7.844	0.516	100.0%	
10 ⁻⁹	8.07	0.2679	102.9%	0.7690

10^{-8}	7.569	0.4944	96.5%	0.6140
10^{-7}	7.231	0.483	92.2%	0.0359
10^{-6}	6.262	0.4725	79.8%	<0.0001
10^{-5}	6.561	0.5665	83.6%	<0.0001

Control: células sin exposición a insulina

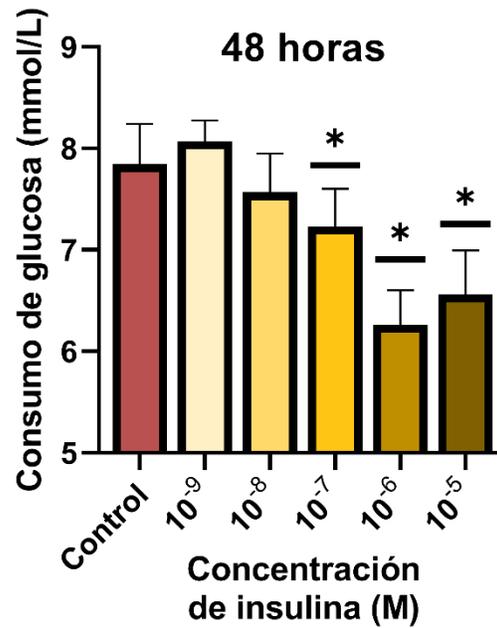


Figura 35. Consumo de glucosa pasadas 48 horas de incubación con diferentes dosis de insulina.

Las condiciones en las que se observó una mayor disminución del consumo de glucosa fueron con una concentración de 10^{-6} M y un periodo de incubación de 48 horas. Por lo que se seleccionaron estas condiciones como las apropiadas para desarrollar resistencia a insulina en las células HepG2.

3.8. Modelo de consumo de glucosa con sonda 2-NBDG en células resistentes a insulina.

Las células resistentes a insulina se dejaron incubando en un medio sin glucosa durante 21 horas y posteriormente se agregaron distintas concentraciones de metformina (12.5, 25 y 50 μM) tres horas previo al ensayo para establecer la concentración a la cual se observa un efecto de sensibilidad a la insulina inducida por el fármaco. Además, los experimentos se realizaron modificando la concentración de sonda fluorescente (15, 25 y 40 μM) para observar en qué concentraciones se obtenían las mejores respuestas.

En la tabla 12 se observan los resultados obtenidos cuando las células se incubaron con 15 μM de 2-NBDG. A esta concentración de sonda fluorescente no se logró observar diferencia significativa respecto al control con ninguna de las tres concentraciones de metformina como se observa en la figura 36.

Tabla 12. Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 15 μM por las células resistentes a insulina.

	Intensidad de fluorescencia	D.E.	Consumo respecto al control	Valor de p
Control	725	133.7	100.0%	
Metformina 12.5 μM	826.2	91.08	114.0%	0.8624
Metformina 25 μM	1121	423.9	154.6%	0.0569
Metformina 50 μM	945.2	289.6	130.4%	0.4074

Control: células resistentes a insulina incubadas con medio

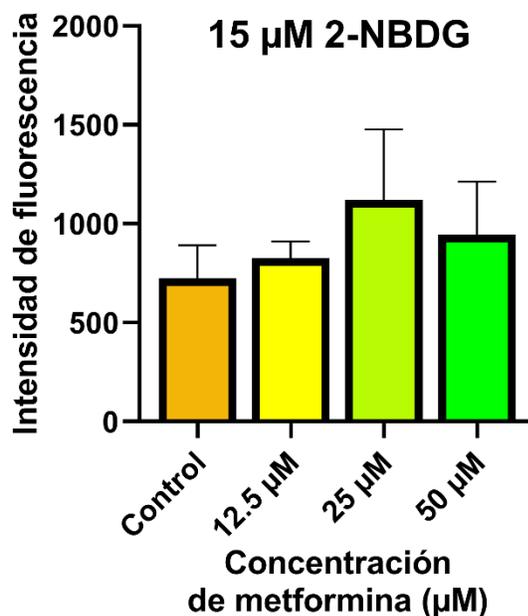


Figura 36. Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 15 μM por las células resistentes a insulina.

Al utilizar una concentración de 25 μM de metformina, las células lograron aumentar el consumo de 2-NBDG. El consumo de la sonda fluorescente aumentó con diferencia significativa respecto al control con las concentraciones de 12.5 μM y 50 μM de metformina. En el caso de 12.5 μM de metformina el consumo aumentó en 148.6% y con 50 μM aumentó en un 172.7%. Estos datos están reflejados en la tabla 13 y figura 37.

Tabla 13. Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 25 μM por las células resistentes a insulina.

	Intensidad de fluorescencia	D.E.	Consumo respecto al control	Valor de p
Control	912.8	65.2	100.0%	
Metformina 12.5 μM	1356	252.4	148.6%	0.0042

Metformina 25 μ M	1077	175.4	118.0%	0.4575
Metformina 50 μ M	1576	401	172.7%	<0.0001

Control: células resistentes a insulina incubadas con medio

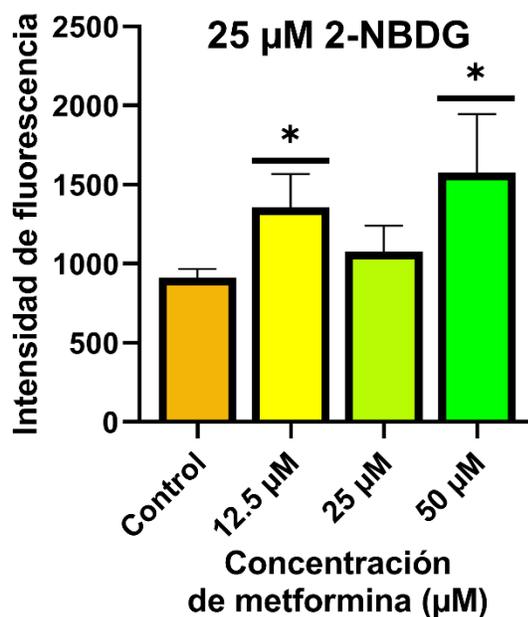


Figura 37. Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 25 μ M por las células resistentes a insulina.

Con la concentración de 40 μ M de 2-NBDG se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 14 y figura 38. La intensidad en la señal únicamente aumentó con la dosis de 12.5 μ M de metformina, este aumento fue de 155.6% en el consumo respecto al control.

Tabla 14. Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 40 μM por las células resistentes a insulina.

	Intensidad de fluorescencia	D.E.	Consumo respecto al control	Valor de p
Control	1385	63.19	100.0%	
Metformina 12.5 μM	2155	406.2	155.6%	0.0005
Metformina 25 μM	1601	366.3	115.6%	0.4678
Metformina 50 μM	1787	354.5	129.0%	0.0568

Control: células resistentes a insulina incubadas con medio

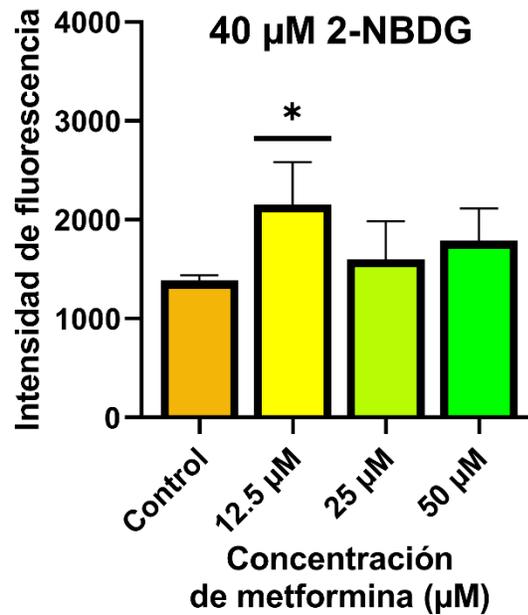


Figura 38. Intensidad mostrada por el consumo de la 2-NBDG a 40 μM por las células resistentes a insulina.

3.9. Evaluación de la actividad sensibilizante a la insulina de los compuestos aislados.

La actividad sensibilizante a la insulina de los compuestos aislados fue evaluada en el modelo de captación de glucosa con 2-NBDG. Se analizaron tres concentraciones de los compuestos a fin de observar si llegaban a aumentar el consumo de la glucosa de las células resistentes a insulina.

3.9.1. Evaluación de la actividad sensibilizante a la insulina de teuhetenona A.

La teuhetenona A mostró un aumento en la captación de glucosa tras ser administrada a las células durante 3 horas. En la siguiente tabla se muestran los datos de la intensidad de fluorescencia que se obtuvieron con las dosis administradas.

Tabla 15. Datos obtenidos del ensayo de captación de glucosa para la teuhetenona A.

	Promedio (mM)	D.E.	Consumo respecto al control	Valor de p
Control	3124	917.2	100.0%	
Metformina 12.5 μ M	7486	2213	239.6%	0.0007
Teuhetenona A 25 μ M	3370	1202	107.9%	0.9946
Teuhetenona A 50 μ M	4949	1042	158.4%	0.1342
Teuhetenona A 100 μ M	7537	3148	241.3%	<0.0001

Control: células resistentes a insulina incubadas con medio

En la gráfica 39 se puede observar que las células lograron introducir más glucosa cuando se les administró 50 y 100 μM de teuhetenona A. Sin embargo, únicamente hubo diferencia significativa respecto al control con a la concentración de 100 μM .

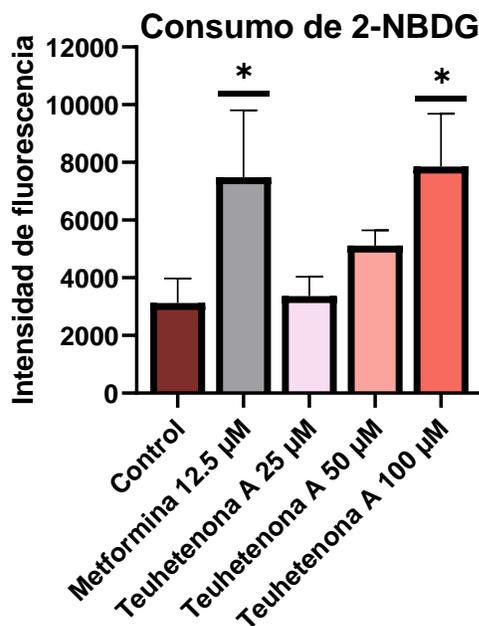


Figura 39. Consumo de glucosa por las células resistentes a insulina tras la adición de teuhetenona A.

3.9.2. Evaluación de la actividad sensibilizante a la insulina del compuesto B.

La adición del compuesto B en las células mostró un aumento en el consumo con las dosis de 50 y 100 μM , sin embargo, únicamente hubo diferencia significativa en la dosis de 100 μM . En la tabla 16 y figura 40 se observan los resultados.

Tabla 16. Datos obtenidos del ensayo de captación de glucosa para el compuesto

B.

	Promedio (mM)	D.E.	Consumo respecto al control	Valor de p
Control	7306	2338	100%	
Metformina 12.5 μ M	13315	5125	182%	0.0182
Compuesto B 25 μ M	8165	2986	112%	0.9567
Compuesto B 50 μ M	12665	4326	152%	0.1294
Compuesto B 100 μ M	14035	5000	174%	0.0179

Control: células resistentes a insulina incubadas con medio

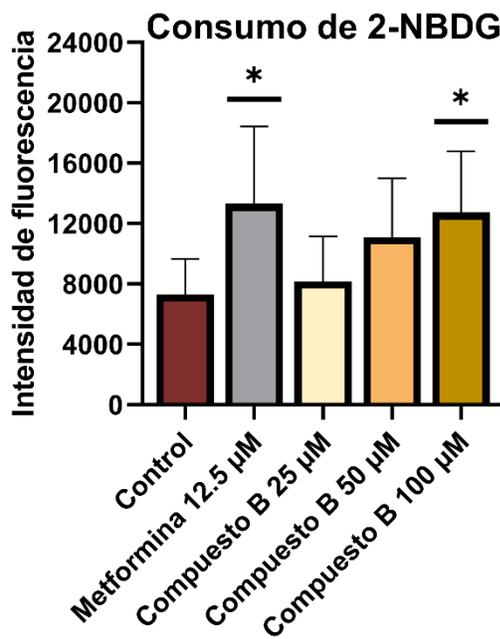


Figura 40. Consumo de glucosa por las células resistentes a insulina tras la adición de compuesto B.

3.9.2. Evaluación de la actividad sensibilizante a la insulina del compuesto C.

El compuesto C no mostró una diferencia significativa con respecto al control en ninguna de las tres dosis utilizadas. Se puede observar una tendencia a aumentar el consumo de glucosa, pero no es lo suficiente para establecer un aumento significativo. En la tabla número 17 se encuentra un resumen de los resultados obtenidos y en la figura 41 la representación de estos datos.

Tabla 17. Datos obtenidos del ensayo de captación de glucosa para el compuesto C.

	Promedio (mM)	D.E.	Consumo respecto al control	Valor de p
Control	4895	1588	100%	
Metformina 12.5 μ M	9417	2175	192%	<0.0001
Compuesto C 25 μ M	4638	898.3	95%	0.9950
Compuesto C 50 μ M	5053	1640	103%	0.9990
Compuesto C 100 μ M	7011	2321	143%	0.0584

Control: células resistentes a insulina incubadas con medio.

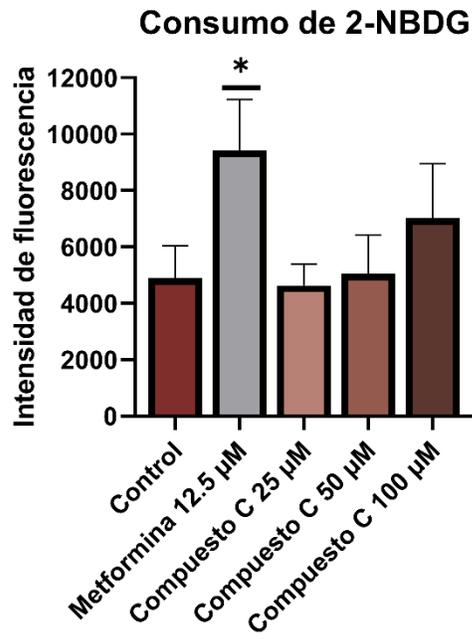


Figura 41. Consumo de glucosa por las células resistentes a insulina tras la adición de compuesto C.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

México es uno de los países con mayor incidencia de diabetes mellitus en el mundo. Además, se reporta que los mexicanos fallecen por complicaciones de la diabetes tanto que resulta ser la segunda causa de muerte en el país. Para el tratamiento de la diabetes se emplean distintos fármacos cuyo mecanismo de acción es diverso. El tipo de fármacos más prescritos son los secretagogos y sensibilizadores de insulina. No obstante, la adherencia al tratamiento es un problema en la práctica clínica. Algunas de las razones por las que no hay adherencia son la desinformación respecto a la enfermedad, la situación socioeconómica de los pacientes y las creencias negativas hacia los medicamentos (de Vries et al., 2014; J. H. Fan et al., 2016; Shiyabola et al., 2018; Stack et al., 2010). A partir de la medicina herbolaria y los productos naturales se busca disminuir las tasas de no adherencia al tratamiento.

Los productos naturales han surgido como una gran fuente de nuevos fármacos los cuales pudieran servir como alternativa a los tratamientos actuales. Los productos naturales son obtenidos a partir de fuentes biológicas y México, siendo uno de los países megadiversos, posee una amplia variedad de plantas con propiedades antidiabéticas. De entre las muchas plantas que se han

reportado en México con actividad antidiabética se encuentra *T. diffusa* la cual es una planta que crece en el noreste del país.

Se ha reportado en diversos estudios la actividad antidiabética de *Turnera diffusa*. Los reportes más antiguos mencionan la actividad del extracto metanólico. En 2009 se reportó que el extracto obtenido con acetato de etilo tenía mayor actividad que los extractos acuosos y metanólicos (Pazos Guarneros, 2009). En el 2017, Parra Naranjo aisló mediante fraccionamiento dirigido el compuesto, teuhetenona A, que resultaba ser uno de los compuestos con mayor actividad antidiabética del extracto metanólico (Parra-Naranjo et al., 2017).

Durante el aislamiento de teuhetenona A se analizó una fracción en la que se encontraba mezclada junto con otros compuestos. La fracción impura de teuhetenona A mostró una disminución de la glucemia más prominente que el compuesto puro. Esto llevó a que en 2022 se aislaran y analizaran dos de los compuestos que se encontraban en la fracción impura en un ensayo *in vivo*. El ensayo confirmó la actividad de la teuhetenona A para disminuir la glucemia y mostró que los otros dos compuestos aislados también la disminuían, aunque no de forma tan efectiva como la teuhetenona A.

Por este motivo, este trabajo se enfocó en desarrollar los modelos *in vitro* de resistencia a insulina y consumo de glucosa para probar la actividad sensibilizadora a insulina de la teuhetenona A y los otros dos compuestos aislados.

Para la obtención de los compuestos se procedió a realizar una extracción masiva de *T. diffusa* con 785 g de la planta. Al extracto crudo posteriormente se le eliminaron las clorofilas con un cartucho de C₁₈ y se le realizó una cromatografía a baja presión.

La cromatografía a baja presión se realizó con una columna de sílica y eluida con fase móvil compuesta de hexano y acetato de etilo. De la cromatografía a baja presión se juntaron 100 fracciones a las cuales se les realizó una cromatografía en capa fina en fase normal. La cromatografía en capa fina sirvió para seleccionar las fracciones que tuvieran una R_f de 0.25 y así juntarlas en una nueva fracción denominada “teuhetenona impura”. Al realizar una cromatografía en placa de fase inversa de esta fracción se pudo distinguir que, aunque en fase normal aparece una sola banda, en realidad son una mezcla de compuestos. Posteriormente esta fracción se pasó por una columna preparativa de fase inversa para obtener los compuestos con una pureza cromatográfica confirmada por HPLC-DAD.

Teuhetenona A y compuesto B se lograron obtener con pureza superior al 90% a partir de la columna preparativa, en cambio, el compuesto C se encontraba junto con otro compuesto no identificado. Para poder aislar compuesto C se realizó otra cromatografía de baja presión de fase inversa con metanol al 45%.

La estructura del compuesto B se determinó mediante espectroscopía de UV-Vis, IR, RMN de una y dos dimensiones ¹H, ¹³C, DEPT, COSY y HSQC. El compuesto B mostró un espectro UV-Vis (figura 28) con una banda de absorción a λ_{\max} 243.3 nm. En el espectro de infrarrojo (figura 29) se puede observar la

presencia de tres principales bandas de absorción las cuales se presentan en áreas representativas para los estiramientos de los grupos funcionales O-H, C=O y C=C.

La señal que abarca de 3600 a 3200 cm^{-1} nos indica la presencia de un grupo OH debido a que en esa región se presenta el estiramiento del enlace O-H en 1650 cm^{-1} se observa un pico de gran intensidad, el cual indica la presencia de un grupo carbonilo; sin embargo, estas señales tienden a aparecer en 1710 cm^{-1} . El desplazamiento a frecuencias más bajas se observa en cetonas α, β insaturadas donde la conjugación con el doble enlace provoca este desplazamiento en el número de onda (Mistry, 2009).

En 1625 cm^{-1} se observa una señal de mediana intensidad que corresponde al estiramiento del doble enlace C=C. Al igual que con la señal del carbonilo esta se encuentra desplazada a frecuencias menores ya que las olefinas alifáticas se presentan entre 1640 y 1680 cm^{-1} . Debido a que ambas señales se encuentran desplazadas, se sugiere la presencia de una cetona α, β insaturada en la estructura del compuesto B. (Silverstein et al., 2005)

Los espectros UV-Vis e IR del compuesto B son muy similares a los que presenta la teuhetenona A. Ambas moléculas poseen un grupo OH y una cetona α, β insaturada. Esto indica que el grupo cromóforo e incluso la estructura del compuesto B podría ser muy similar al de la teuhetenona A.

En el espectro ^{13}C -RMN se lograron distinguir 15 señales de carbonos. Esto indica que a diferencia de la teuhetenona A que es un *nor*-sesquiterpeno (12

carbonos), el compuesto B es un sesquiterpeno. Las señales obtenidas demostraron presencia de un carbono de naturaleza carbonilo, dos carbonos en la región de doble enlace y el resto de corresponden a carbonos alifáticos. Con ayuda de los DEPT 90° y 135° se esclareció que uno de los carbonos del doble enlace (124.2 ppm) era un metino mientras que el otro carbono (171.6 ppm) se encontraba sin hidrógenos unidos a él. Estos datos indican que el doble enlace se encuentra trisustituido. Adicionalmente con los DEPT se obtuvo la naturaleza de los carbonos mostrados en el espectro de ^{13}C -RMN.

Con el espectro de ^1H -RMN se puede observar distintas señales en dos regiones principalmente: la región de alquenos y alifáticos. La señal en la región de alquenos es una señal de tipo singulete a campo bajo con desplazamiento de 5.7 ppm que integra únicamente para 1 hidrógeno. La señal de un hidrógeno olefínico concuerda con los observado en el espectro de ^{13}C -RMN y se confirma que el alqueno presente en la molécula está trisustituido. Las señales que se encuentran en la región alifática mostraron las integraciones ya presentadas en la Tabla 5.

Con el espectro HSQC fue posible relacionar las señales de hidrógeno con los carbonos correspondientes a los cuales están unidos y junto con el COSY se pudieron ver qué señales de hidrógeno se encontraban proximales unas a otras.

Cuando se compararon las señales obtenidas con compuestos ya reportados en literatura se concluyó que el compuesto B coincide con 11-hidroxi-valenc-1(10)-en-2-ona la cual fue sintetizada por primera vez en 1971 en Alemania (Van Der Gen et al., 1971). Posteriormente se hizo el reporte del

aislamiento del compuesto por primera vez a partir de *Teucrium carolipau* (Savona et al., 1987). En la tabla 18 y 19 se puede observar la comparación de las señales obtenidas en este trabajo con las reportadas por Jung et al., 2017.

Tabla 18. Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C del compuesto B con la literatura.

# Carbono	Savona et al. 1987	Jung et al. 2017	Compuesto B
C-1	124.2 ppm	124.70 ppm	124.2 ppm
C-2	199.9 ppm	202.42 ppm	199.9 ppm
C-3	42.0 ppm	42.82 ppm	42.07 ppm
C-4	40.5 ppm	41.98 ppm	40.56 ppm
C-5	39.1 ppm	40.59 ppm	39.18 ppm
C-6	39.6 ppm	41.00 ppm	39.62 ppm
C-7	43.8 ppm	45.05 ppm	43.87 ppm
C-8	27.7 ppm	29.08 ppm	27.70 ppm
C-9	33.0 ppm	34.14 ppm	32.99 ppm
C-10	171.6 ppm	174.95 ppm	171.6 ppm
C-11	72.0 ppm	72.89 ppm	72 ppm
C-12	27.2 ppm	27.26 ppm	27.32 ppm
C-13	26.8 ppm	26.52 ppm	26.91 ppm
C-14	14.9 ppm	15.22 ppm	14.99 ppm
C-15	16.9 ppm	17.21 ppm	16.92 ppm

Tabla 19. Comparación de los desplazamientos químicos de ^1H del compuesto B con la literatura reportada.

# Hidrógeno	Savona <i>et al.</i> 1987	Jung <i>et al.</i> 2017	Compuesto B
1	5.76 ppm (d)	5.74 ppm (s)	5.78 ppm
3 α	~2.18-2.36 ppm (*)	2.34 ppm (d)	2.3 ppm
3 β	~2.18-2.36 ppm (*)	2.17 ppm (dd)	2.29 ppm
4	~2 ppm (*)	1.98 ppm (m)	2.02 ppm
6 α	~2 ppm (*)	2.13 ppm (dd)	2.06 ppm
6 β	0.98 ppm (t)	1.03 ppm (d)	0.98 ppm
7	1.72 ppm (tt)	1.77 ppm (tt)	1.72 ppm
8 α	-	2.00 ppm (dd)	2.05 ppm
8 β	1.18 ppm (m)	1.19 ppm (d)	1.25 ppm
9 α	2.47 ppm (tdd)	2.40 ppm (m)	2.40 ppm
9 β	-	2.54 ppm (m)	2.52 ppm
Me-12	1.19 ppm (s)	1.17 ppm (s)	1.19 ppm
Me-13	1.20 ppm (s)	1.13 ppm (s)	1.18 ppm
Me-14	0.97 ppm (d)	1.00 ppm (s).	0.97 ppm
Me-15	1.08 ppm (s)	1.15 ppm (s)	1.08 ppm

Cabe resaltar que la estructura obtenida en este trabajo únicamente es la estructura planar por lo que se requiere de mayores experimentos a fin de obtener la configuración absoluta.

La 11-hidroxi-valenc-1(10)-en-2-ona ya se ha reportado con anterioridad en otras plantas de distintos géneros. Aun así, este es el primer reporte de este compuesto siendo aislado del género *Turnera*. En la literatura no se le ha atribuido algún tipo de actividad biológica aún.

La estructura del compuesto C se obtuvo mediante los espectros de UV-Vis, IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN de una y dos dimensiones y HSQC. El compuesto C mostró un espectro UV-Vis muy diferente a los obtenidos con la teuhetenona A y la valencenona. En el compuesto C se pudieron observar dos bandas de máxima absorción ubicadas en 267.1 nm y en 339.7 nm. Al comparar el espectro con la literatura se observa que el espectro corresponde con el de la apigenina en forma y longitudes de onda de máxima absorción (Rathod et al., 2021; Tarigan et al., 2023).

El espectro IR presenta los mismos estiramientos que se observan en el espectro de la apigenina. Principalmente la señal ancha débil que abarca desde 3500 cm^{-1} hasta 3250 cm^{-1} . Cabe resaltar que en el espectro obtenido del compuesto C se presentaron señales en la región de 2950 y 2900 cm^{-1} , sin embargo, la apigenina no presenta carbonos con hibridación sp^3 , por lo que estas señales podrían deberse a alguna impureza que pudo haber estado en la muestra analizada por IR. Las señales del estiramiento $\text{C}=\text{C}$ en 1650 y 1600 cm^{-1} se encuentran en el mismo número de onda que las señales observadas en el espectro de la apigenina. Otras señales que concuerdan son las de 1500 , 1350 , 1300 , 1250 y 1040 cm^{-1} .

Tabla 20. Comparación de las señales observadas en espectroscopía IR del compuesto C con la literatura.

Mariappan, G. <i>et al.</i> (2012)	Compuesto C
Número de onda (cm ⁻¹)	
3287	3500 - 3200
3093	3100
1651	1650
1607	1600
1500	1500
1354	1350
1245	1250
1182	1175
1032	1040
908	900
829	840
739	740
634	640
579	580

En la siguiente figura se muestran superpuestos los espectros obtenidos en este trabajo con el compuesto C y los espectros reportados por Mariappan, G. *et al.* y en la base de espectros de John Wiley & Sons, Inc. (John Wiley & Sons Inc., 2024; Mariappan *et al.*, 2012)

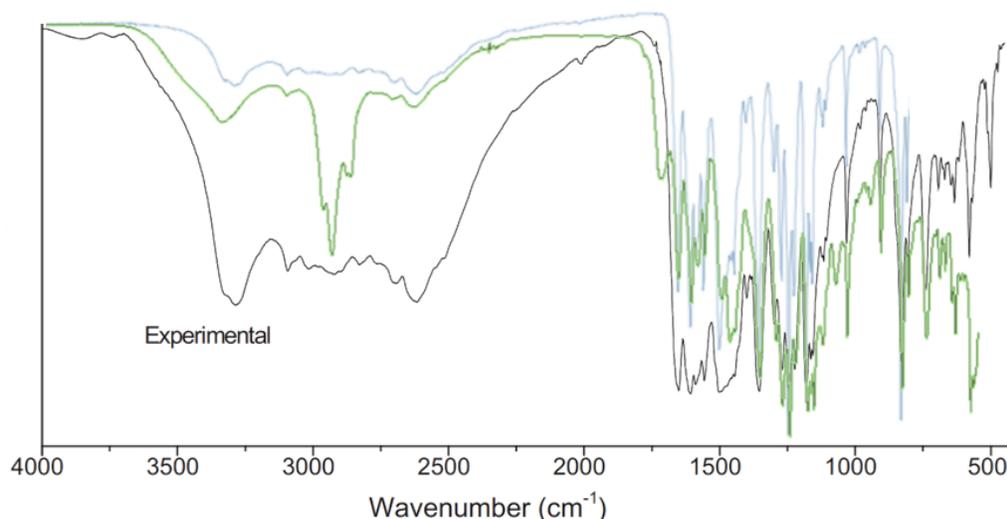


Figura 42. Comparativa de espectros IR del compuesto C con la apigenina. En verde, el espectro obtenido con el compuesto C; en negro, el espectro obtenido por Mariappan G. *et al.*; y en azul, el espectro de la base de espectros de John Wiley & Sons, Inc.

En el espectro de ^{13}C -RMN se pudieron distinguir únicamente 13 señales, sin embargo, dos de ellas presentaron una mayor intensidad por lo que es posible que haya señales dobles con un desplazamiento químico muy similar, dando un total de 15 carbonos. Este número concuerda con el número de carbonos que posee la apigenina. Todas las señales se encontraron con desplazamientos mayores a 90 ppm, lo que indica que el compuesto C no poseía carbonos alifáticos. Las señales se encontraban principalmente entre 90 y 165 ppm que corresponden a la zona de alquenos y anillos aromáticos. Esto concuerda con lo observado en la apigenina cuyos carbonos todos cuentan con una hibridación de tipo sp^2 .

Tabla 21. Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C obtenidos por el compuesto C con la literatura.

	Van Loo, P., <i>et al.</i> (1986).	Mariappan, <i>et al.</i> (2012).	Compuesto C
Carbono	Desplazamiento químico (ppm)		
C-2	163.93	156.41	163.69
C-3	103.06	97.90	102.41
C-4	181.94	170.39	182.51
C-5	161.69	153.67	161.84
C-6	99.07	90.72	98.84
C-7	164.34	152.58	164.94
C-8	94.18	86.16	93.72
C-9	157.48	148.99	158.09
C-10	103.94	99.24	102.43
C-1'	121.41	114.83	121.86
C-2', C-6'	128.64	121.03	128.06
C-3', C-5'	116.17	107.55	115.63
C-4'	161.37	150.57	161.40

Debido a la cantidad de instauraciones que presenta el compuesto C, se observaron pocas señales en el espectro de ^1H -RMN; además de que las señales se encontraban exclusivamente en la región de dobles enlaces. Dos señales presentaron la misma constante de acoplamiento, así como una partición de

doblete. Estos datos junto con los desplazamientos de los carbonos confirmaron la presencia de un anillo aromático que se encontraba sustituido en la posición *para*. Debido a la cantidad de señales se observa que la molécula únicamente cuenta con 7 hidrógenos unidos a carbonos.

Tabla 22. Comparación de los desplazamientos químicos de ^1H obtenidos por el compuesto C con la literatura.

	Van Loo, P., <i>et al.</i> (1986).	Mariappan, <i>et al.</i> (2012).	Compuesto C
Hidrógeno	Desplazamiento químico (ppm), partición		
H-3	6.77, s	6.32	6.60, s
H-6	6.22, d	6.08	6.21, d
H-8	6.50, d	6.17	6.46, d
H-2', H-6'	7.92	8.06	7.86, d
H-3', H5'	6.95	7.04	6.93, d
H(5)-OH	12.99 s	11.67	No detectado
H(7)-OH	10.62 bs	5.69	No detectado
H(4')-OH	3.49 bs	5.69	No detectado

El espectro de HSQC se comparó con aquel presentado por Van Loo *et al.* para la apigenina y concordaron en la correlación de los hidrógenos y los carbonos (Van Loo *et al.*, 1986).

Con todos estos datos espectroscópicos se confirma que la identidad del compuesto C es la apigenina. La apigenina es un producto natural que se clasifica

dentro de los compuestos fenólicos. Entre los compuestos fenólicos se encuentran los flavonoides que tienen como núcleo el flavano y según las sustituciones en los anillos aromáticos o la oxidación de distintos grupos con oxígeno se pueden obtener isoflavanos, flavanonas, flavonas, flavonoles, flavanonoles, entre otros (Salehi et al., 2019). Se ha demostrado que las flavonas tienen actividades biológicas variadas que incluyen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, antialérgica, neuroprotectora, cardioprotectora y antimicrobiana (Ali et al., 2017). La apigenina es un derivado flavonoide con tres sustituyentes hidroxilos. Su nombre químico es 4', 5, 7- trihidroxiflavona. Es sintetizada en un gran número de plantas y se encuentra principalmente como derivados de enlaces O-metílicos. Ya se ha descrito con anterioridad la presencia de apigenina, así como de derivados de la misma, en el género *Turnera*, así como en *T diffusa* (Kumar & Sharma, 2006; Zhao et al., 2007). Ejemplos de estos compuestos son apigenina 7-O-glucosido, apigenina 7-O-(6"-O-p-E-coumaroil)-glucosido, apigenina 8-C-(2-O-rhamnosil)-glucosido, apigenina 7-O- (4"-O-p-E-coumaroil)-glucosido (Szewczyk & Zidorn, 2014).

Para poder establecer la actividad secretagoga o sensibilizante a insulina de los compuestos, primero se estableció un modelo de resistencia a insulina en células HepG2. Las células se incubaron con distintas concentraciones de insulina durante distintos tiempos. Los resultados mostraron que las concentraciones de insulina de 10^{-5} y 10^{-6} M disminuían el consumo de glucosa en cualquiera de los tiempos de incubación. Solamente pasadas 48 horas de incubación se observó que la concentración de 10^{-7} M disminuía el consumo de

glucosa. Las condiciones que se seleccionaron para inducir la resistencia a la insulina en las células fueron de 10^{-6} M de insulina durante 48 horas. Se seleccionaron estas condiciones debido a que fueron aquellas con las que hubo mayor reducción respecto al control.

En la literatura se observó que el rango de concentración más utilizado es entre 10^{-7} a 10^{-6} M de insulina. El tiempo de incubación más reportado es de 24 horas, aunque se ha descrito también 48 horas. Además, la afluencia de células es un parámetro que varía mucho entre artículos. La cantidad de células por pozo varía desde 3,000 hasta 200,000; razón por la que los resultados y respuestas obtenidas varían entre autores.

En la tabla 23 se resumen las distintas condiciones reportadas que se utilizaron para este ensayo según la bibliografía.

Una vez obtenidas las células resistentes a insulina se analizaron diferentes concentraciones de sonda 2-NBDG, un análogo fluorescente de la glucosa, para obtener la mejor respuesta. Además, como control positivo se emplearon distintas concentraciones de metformina. Las concentraciones empleadas fueron de 15, 25 y 40 μ M de 2-NBDG y 12.5, 25 y 50 μ M de metformina.

Tabla 23. Condiciones para inducir resistencia a insulina reportadas.

Artículo	Volumen de sobrenadante	Células	Insulina	Tiempo
(Bian et al., 2021)	100 μ l	2×10^4	1×10^{-7}	24 horas

(Teng et al., 2016b)	-	1×10^5	1×10^{-7}	24 horas
(Huang et al., 2015)	-	1×10^5	5×10^{-7}	24 horas
(Chen et al., 2019b)	-	1×10^4	5×10^{-7}	24 horas
Esfahani, S. M. M. et al. <i>BMC Complement. Med. Ther.</i> 23, (2023).	-	1×10^5	1×10^{-6}	24 horas
Ali, M. Y. et al. <i>Chem. Biol. Interact.</i> 305, 180–194 (2019).	-	2×10^5	1×10^{-6}	24 horas
Liu, Z.-Q. et al. <i>Toxicol. Appl. Pharmacol.</i> 285, 61–70 (2015).	-	-	1×10^{-6}	24 horas
Fan, X. et al. <i>Eur. J. Pharmacol.</i> 843, 277–284 (2019).	-	1×10^3	1×10^{-7}	36 horas
(Chen et al., 2020)	100 μ l	1×10^5	1×10^{-7}	36 horas
(Qin et al., 2011b)	-	-	1×10^{-7}	36 horas
(Jin et al., 2013b)	-	-	1×10^{-7}	36 horas
(Hu et al., 2016)Zh	-	2×10^4	1×10^{-7}	48 horas

Los resultados mostraron que con la concentración de 15 μ M de 2-NBDG no se obtenía la respuesta apropiada para poder distinguir el control positivo del negativo. Cuando se utilizó 25 μ M de la sonda se observó un aumento en el consumo de glucosa cuando se emplea 12.5 μ M de metformina y 50 μ M. Y por último, La mayor respuesta se obtiene cuando se emplea una concentración de 40 μ M de 2-NBDG y el mayor consumo se da con la concentración de 12.5 μ M de metformina.

En la literatura se emplean concentraciones de 2-NBDG que rondan entre 40 – 50 μ M. En el caso del control positivo se emplea más comúnmente la metformina en un rango de concentraciones de 10 – 15 μ M. Se menciona que este rango se utiliza debido a un efecto citotóxico (Yamamoto et al., 2015).

Además, se reportó que a partir de concentraciones de 10 μM de sonda es posible obtener resultados reproducibles (Zou et al., 2005).

Por último, los compuestos fueron probados en el modelo de consumo de glucosa. La teuhetenona A mostró un aumento en el consumo de la sonda fluorescente lo cual indica que revirtió el estadio de resistencia a la insulina. De las tres dosis de teuhetenona A administrada se observó un aumento en el consumo de glucosa con concentraciones de 50 y 100 μM del compuesto. Cabe resaltar que únicamente con la concentración de 100 μM fue que hubo diferencia significativa respecto al control positivo. El consumo de glucosa de las células tratadas con teuhetenona A fue similar a aquel observado con 12.5 μM de metformina.

En el caso de la valencenona, se obtuvieron resultados similares a la teuhetenona A; donde la única dosis con la que hubo un aumento significativo fue con la dosis de 100 μM . Cabe resaltar que este aumento no fue tan intenso como el obtenido con la teuhetenona A. Este sería el primer reporte de la actividad biológica de la valencenona, que se suman a los resultados de los ensayos *in vivo* realizados en la tesis de licenciatura.

El aumento del consumo de glucosa inducido por la apigenina únicamente se pudo apreciar de manera visual. Esto debido a que no se encontró diferencia significativa respecto al control en ninguna de las tres dosis. Cabe resaltar que a la apigenina ya se le han atribuido distintas actividades biológicas por lo que es posible que este ensayo no sea el apropiado para observar la actividad antidiabética.

La teuhetenona A y valencenona mostraron actividad sensibilizante a la insulina, por lo que se requiere de mayores análisis de los procesos bioquímicos que suceden a fin de obtener un mecanismo de acción a nivel molecular, así como probar modelos de resistencia a insulina en otros tejidos como el adiposo y muscular.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones de un modelo de resistencia a la insulina en células HepG2 en una concentración de 10^{-6} M de insulina y una exposición durante 48 horas.
- Se implementaron las condiciones de un modelo de captación de glucosa con el análogo fluorescente 2-NBDG en células HepG2 resistentes a insulina con 40 μ M de la sonda fluorescente y 12 μ M de metformina.
- Se aisló e identificó teuhetenona A a partir de *Turnera diffusa*, además se demostró por primera vez la actividad sensibilizante a insulina en un modelo *in vitro* de captación de glucosa. En el estudio la teuhetenona A con una concentración de 100 μ M mostró actividad similar a la metformina (12.5 μ M).
- Se aisló e identificó por primera vez 11-hidroxi-valenc-1(10)-en-2-ona dentro del género *Turnera*. También se demostró que posee actividad sensibilizante a la insulina por primera vez. Una concentración de 100 μ M mostró actividad ligeramente menor a la metformina (12.5 μ M).
- Se aisló e identificó apigenina dentro del extracto de acetato de etilo de *Turnera diffusa*.

CAPÍTULO VI. PERSPECTIVAS

- Determinar el posible mecanismo de teuhetenona A a nivel molecular mediante modelos de expresión de proteínas y regulación de genes.
- Establecer las condiciones óptimas para el modelo de resistencia a insulina y captación de glucosa.
- Establecer la configuración absoluta de 11-hidroxi-valenc-1(10)-en-2-ona.
- Analizar la actividad sensibilizante a la insulina en líneas celulares correspondientes a tejido adiposo y muscular.
- Analizar la sinergia entre los tres compuestos a fin de observar si incrementa el consumo de glucosa.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Salinas, C. A., Hernández Jiménez, S., Hernández Ávila, M., & Hernández Ávila, J. E. (2015). *Acciones para Enfrentar a la Diabetes - Documento de Postura*.
- Aguilar-Salinas, C. A., Hernández-Jiménez, S., & Gómez-Pérez, F. J. (2002). Tiazolidinedionas. Beneficios y riesgos reales. *Revista de Endocrinología y Nutrición Abril-Junio*, 10(2), 69–76. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21251997000600014
- Aguirre Gómez, M. A. (2022). *AISLAMIENTO DE COMPUESTOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE Y/O ANTIDIABÉTICA A PARTIR DE Turnera diffusa*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Alarcon-Aguilar, F. J., Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J. L., & Aguirre-Garcia, F. (2002). Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and Alloxan-diabetic mice. *Phytotherapy Research*, 16(4), 383–386. <https://doi.org/10.1002/ptr.914>
- Alarcon-Aguilara, F. J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C. C., & Flores-Saenz, J. L. (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2), 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00020-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00020-8)
- Ali, F., Rahul, Naz, F., Jyoti, S., & Siddique, Y. H. (2017). Health functionality of apigenin: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(6), 1197–1238. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1207188>
- American Diabetes Association Professional Practice Committee. (2022a). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022—2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement 1), S17–S38. <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>
- American Diabetes Association Professional Practice Committee. (2022b). 5. Facilitating Behavior Change and Well-being to Improve Health Outcomes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement_1), S60–S82. <https://doi.org/10.2337/dc22-S005>

- American Diabetes Association Professional Practice Committee. (2022c). 8. Obesity and Weight Management for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement_1), S113–S124. <https://doi.org/10.2337/dc22-S008>
- American Diabetes Association Professional Practice Committee. (2022d). 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement_1), S125–S143. <https://doi.org/10.2337/dc22-S009>
- Arzumanian, V. A., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. V. (2021). The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>
- Baez-Parra, K. M., Alcaraz-Melendez, L., Santamaria-Miranda, A., Heredia, J. B., Leon-Felix, J., Muy-Rnagel, M. D., & Angulo-Escalante, M. A. (2018). Leaf morphology and anatomy of varieties of *Turnera diffusa* var. *Diffusa* and *Turnera diffusa* var. *Aphrodisiaca* (ward) urb. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 15(1), 110–116. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v15i1.11>
- Basto-Abreu, A., López-Olmedo, N., Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. A., Moreno-Banda, G. L., Carnalla, M., Rivera, J. A., Romero-Martínez, M., Barquera, S., & Barrientos-Gutiérrez, T. (2023). Prevalence of prediabetes and diabetes in Mexico: Ensanut 2022. *Salud Publica de Mexico*, 65(1), 163–168. <https://doi.org/10.21149/14832>
- Bian, G., Yang, J., Elango, J., Wu, W., Bao, B., & Bao, C. (2021). Natural Triterpenoids Isolated from *Akebia trifoliata* Stem Explants Exert a Hypoglycemic Effect via α -Glucosidase Inhibition and Glucose Uptake Stimulation in Insulin-Resistant HepG2 Cells. *Chemistry and Biodiversity*, 18(5). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202001030>
- Castiglioni, A. (2019). The Origin of Medicine in Prehistory and in Primitive Peoples. En *A History of Medicine* (pp. 13–30). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780429019883-2>
- Chadt, A., & Al-Hasani, H. (2020). Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 472(9), 1273–1298. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02417-x>
- Cheatham, B., & Kahn, C. R. (1995). Insulin Action and the Insulin Signaling Network. *Endocrine Reviews*, 16(2), 117–142. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-2-117>

- Chen, L., Lin, X., & Teng, H. (2020). Emulsions loaded with dihydromyricetin enhance its transport through Caco-2 monolayer and improve anti-diabetic effect in insulin resistant HepG2 cell. *Journal of Functional Foods*, 64. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103672>
- Chen, L., Teng, H., & Cao, H. (2019a). Chlorogenic acid and caffeic acid from *Sonchus oleraceus* Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 127(March), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.038>
- Chen, L., Teng, H., & Cao, H. (2019b). Chlorogenic acid and caffeic acid from *Sonchus oleraceus* Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 127(March), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.038>
- Cheng, A. Y. Y., & Fantus, I. G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*, 172(2), 213–226. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1031414>
- Choudhury, H., Pandey, M., Hua, C. K., Mun, C. S., Jing, J. K., Kong, L., Ern, L. Y., Ashraf, N. A., Kit, S. W., Yee, T. S., Pichika, M. R., Gorain, B., & Kesharwani, P. (2018). An update on natural compounds in the remedy of diabetes mellitus: A systematic review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(3), 361–376. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.012>
- Czech, M. P. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature Medicine*, 23(7), 804–814. <https://doi.org/10.1038/nm.4350>
- de Vries, S. T., Keers, J. C., Visser, R., de Zeeuw, D., Haaijer-Ruskamp, F. M., Voorham, J., & Denig, P. (2014). Medication beliefs, treatment complexity, and non-adherence to different drug classes in patients with type 2 diabetes. *Journal of Psychosomatic Research*, 76(2), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2013.11.003>
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., & Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 15019. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
- Delgado-Montemayor, C. (2017). *DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO HERBOLARIO CON ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA A PARTIR DE *Turnera diffusa**. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 391(10138), 2449–2462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)

- Esfahani, S. M. M., Tarighi, P., Dianat, K., Ashour, T. M., Mottaghi-Dastjerdi, N., Aghsami, M., Sabernavaei, M., & Montazeri, H. (2023). Paliurus spina-christi Mill fruit extracts improve glucose uptake and activate the insulin signaling pathways in HepG2 insulin-resistant cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-023-03977-y>
- Fan, J. H., Lyons, S. A., Goodman, M. S., Blanchard, M. S., & Kaphingst, K. A. (2016). Relationship Between Health Literacy and Unintentional and Intentional Medication Nonadherence in Medically Underserved Patients With Type 2 Diabetes. *The Diabetes Educator*, 42(2), 199–208. <https://doi.org/10.1177/0145721715624969>
- Fan, X., Tao, J., Zhou, Y., Hou, Y., Wang, Y., Gu, D., Su, Y., Jang, Y., & Li, S. (2019). Investigations on the effects of ginsenoside-Rg1 on glucose uptake and metabolism in insulin resistant HepG2 cells. *European Journal of Pharmacology*, 843, 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.11.024>
- Ferrier, D. R. (2017). *Biochemistry* (7ma ed.). Wolters Kluwer.
- Firenzuoli, F., & Gori, L. (2007). Herbal Medicine Today: Clinical and Research Issues. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4(s1), 37–40. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem096>
- Furman, B. L., Candasamy, M., Bhattamisra, S. K., & Veettil, S. K. (2020). Reduction of blood glucose by plant extracts and their use in the treatment of diabetes mellitus; discrepancies in effectiveness between animal and human studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 247, 112264. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112264>
- González-Mujica, F. (2016). Drogas antidiabéticas diferentes de la insulina. Mecanismos de acción. *Vitae: Academia Biomédica Digital*, 66.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1–93. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Hu, X., Cheng, D., & Zhang, Z. (2016). Antidiabetic activity of *Helicteres angustifolia* root. *Pharmaceutical Biology*, 54(6), 938–944. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1077871>
- Huang, Q., Chen, L., Teng, H., Song, H., Wu, X., & Xu, M. (2015). Phenolic compounds ameliorate the glucose uptake in HepG2 cells' insulin resistance via activating AMPK. *Journal of Functional Foods*, 19, 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.020>
- International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas* (10a ed.). <https://www.diabetesatlas.org>

- Jin, M. N., Shi, G. R., Tang, S. A., Nan-Qin, Qiao, W., & Duan, H. Q. (2013a). Flavonoids from *Tetrastigma obtectum* enhancing glucose consumption in insulin-resistance HepG2 cells via activating AMPK. *Fitoterapia*, *90*, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.07.024>
- Jin, M. N., Shi, G. R., Tang, S. A., Nan-Qin, Qiao, W., & Duan, H. Q. (2013b). Flavonoids from *Tetrastigma obtectum* enhancing glucose consumption in insulin-resistance HepG2 cells via activating AMPK. *Fitoterapia*, *90*, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.07.024>
- John Wiley & Sons Inc. (2024). *Apigenin - Optional[ATR-IR]*. <https://spectrabase.com/spectrum/Az3GhZA3NXy>
- Jung, H. J., Min, B.-S., Jung, H. A., & Choi, J. S. (2017). Sesquiterpenoids from the heartwood of *Juniperus chinensis*. *Natural Product Sciences*, *23*(3), 208. <https://doi.org/10.20307/nps.2017.23.3.208>
- Kahn, S. E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, *46*(1), 3–19. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-1009-0>
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, Å. (2017a). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(1), 17016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, Å. (2017b). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(1), 17016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>
- Kennedy, D. O., & Wightman, E. L. (2011). Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain function. *Advances in Nutrition*, *2*(1), 32–50. <https://doi.org/10.3945/an.110.000117>
- Klover, P. J., & Mooney, R. A. (2004). Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(5), 753–758. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.10.002>
- Kumar, S., & Sharma, A. (2006). Apigenin: The Anxiolytic Constituent of *Turnera aphrodisiaca*. *Pharmaceutical Biology*, *44*(2), 84–90. <https://doi.org/10.1080/13880200600591758>
- Lankatillake, C., Huynh, T., & Dias, D. A. (2019). Understanding glycaemic control and current approaches for screening antidiabetic natural products from evidence-based medicinal plants. *Plant Methods*, *15*(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0487-8>

- Lu, M., Wan, M., Leavens, K. F., Chu, Q., Monks, B. R., Fernandez, S., Ahima, R. S., Ueki, K., Kahn, C. R., & Birnbaum, M. J. (2012). Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nature Medicine*, 18(3), 388–395. <https://doi.org/10.1038/nm.2686>
- Lukacinova, A., Hubkova, B., Racz, O., & Nistiar, F. (2013). Animal Models for Study of Diabetes Mellitus. En *Diabetes Mellitus - Insights and Perspectives*. InTech. <https://doi.org/10.5772/48325>
- Mariappan, G., Sundaraganesan, N., & Manoharan, S. (2012). The spectroscopic properties of anticancer drug Apigenin investigated by using DFT calculations, FT-IR, FT-Raman and NMR analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 95, 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.04.089>
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., & Rivero-Cruz, I. (2013). Mexican Antidiabetic Herbs: Valuable Sources of Inhibitors of α -Glucosidases. *Journal of Natural Products*, 76(3), 468–483. <https://doi.org/10.1021/np300869g>
- Mata, R., Figueroa, M., Navarrete, A., & Rivero-Cruz, I. (2019). Chemistry and Biology of Selected Mexican Medicinal Plants. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 108, 1–142. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01099-7_1
- McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., Mathiesen, E. R., & Damm, P. (2019). Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 47. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8>
- Mercedes Arbo, M., & Espert, S. M. (2009). Morphology, phylogeny and biogeography of *Turnera* L. (Turneraceae). *TAXON*, 58(2), 457–467. <https://doi.org/10.1002/tax.582011>
- Mistry, B. D. (2009). *A Handbook of Spectroscopic Data Chemistry: UV, IR, PMR, CNMR and Mass Spectroscopy*. Oxford Book Company.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Organización Mundial de la Salud. (2009). *The Use of Herbal Medicines in Primary Health Care*.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*.
- Organización Mundial de la Salud. (2019). *Classification of diabetes mellitus*.

- Pallardo Sánchez, L. F. (2008). Sulfonilureas en el tratamiento del paciente con diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinología y Nutrición*, 55(SUPPL. 2), 17–25. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(08\)76259-4](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(08)76259-4)
- Parra-Naranjo, A., Delgado-Montemayor, C., Fraga-López, A., Castañeda-Corral, G., Salazar-Aranda, R., Acevedo-Fernández, J. J., & Waksman, N. (2017). Acute hypoglycemic and antidiabetic effect of teuhetenone a isolated from *Turnera diffusa*. *Molecules*, 22(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules22040599>
- Parra-Naranjo, A., Delgado-Montemayor, C., Salazar-Aranda, R., & Waksman-Minsky, N. (2023). Bioactivity of the Genus *Turnera*: A Review of the Last 10 Years. *Pharmaceuticals*, 16(11), 1573. <https://doi.org/10.3390/ph16111573>
- Pazos Guarneros, D. del C. (2009). *Evaluación del efecto hipolipemiante e hipoglucemiante de extractos de Turnera diffusa, Ibervillea sonorae y Morinda citrifolia* [Instituto Politécnico Nacional]. <https://repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/6936/1/TESIS DIANA DEL CARMEN PAZOS GUARNEROS.pdf>
- Pérez G., R. M., Ocegueda Z., A., Muñoz L., J. L., Avila A., J. G., & Morrow, W. W. (1984). A study of the hypoglycemic effect of some Mexican plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 12(3), 253–262. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(84\)90054-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(84)90054-0)
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Prabhakar, P. K., & Doble, M. (2011). Mechanism of action of natural products used in the treatment of diabetes mellitus. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 17(8), 563–574. <https://doi.org/10.1007/s11655-011-0810-3>
- Qin, N., Li, C. B., Jin, M. N., Shi, L. H., Duan, H. Q., & Niu, W. Y. (2011a). Synthesis and biological activity of novel tiliroside derivants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), 5189–5195. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.059>
- Qin, N., Li, C. B., Jin, M. N., Shi, L. H., Duan, H. Q., & Niu, W. Y. (2011b). Synthesis and biological activity of novel tiliroside derivants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), 5189–5195. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.059>
- Rathod, P., Wakte, P., & Shivling Bhusari, S. (2021). Development and Validation of UV-Visible Spectrophotometric Method for Estimation of Apigenin in Parsley Leaves Extract. *International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Topics*, 2(8), 68–72.

- Rodríguez-Rivera, N., Cuautle-Rodríguez, P., & Molina-Guarneros, J. (2017). Hipoglucemiantes orales para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2: uso y regulación en México. *Rev Hosp Jua Mex*, *84*(4), 203–211. www.medigraphic.com/hospitaljuarezwww.medigraphic.org.mxwww.medigraphic.org.mx
- Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E. B., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W. N., & Martins, N. (2019). The Therapeutic Potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6), 1305. <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>
- Savona, G., Piozzi, F., De La Torre, M. C., Servettaz, O., & Rodríguez, B. (1987). A valencane sesquiterpenoid from *Teucrium carolipai*. *Phytochemistry*, *26*(2), 571–572. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81458-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81458-2)
- Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santaella-Castell, J. A., & Rivera-Dommarco, J. Á. (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. En *Instituto Nacional de Salud Pública* (1a ed.). https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_informe_final.pdf
- Shiyanbola, O. O., Brown, C. M., & Ward, E. C. (2018). “I did not want to take that medicine”: African-Americans’ reasons for diabetes medication nonadherence and perceived solutions for enhancing adherence. *Patient Preference and Adherence*, *Volume 12*, 409–421. <https://doi.org/10.2147/PPA.S152146>
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (D. Brennan & J. Yee, Eds.; Seventh). John Wiley and Sons Inc.
- Sonkamble, V. V., Wagh, N. S., & Pai, S. R. (2019). Role of Plant Secondary Metabolites as Antidiabetic Agents. En *Natural Bio-active Compounds* (pp. 529–550). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7154-7_18
- Soumyanath, A., & Sriyayanta, S. (2005). *In Vitro Models for Assessing Antidiabetic Activity*. <https://doi.org/10.1201/9781420019001.ch4>
- Stack, R. J., Bundy, C. E., Elliott, R. A., New, J. P., Gibson, M., & Noyce, P. R. (2010). Intentional and unintentional non-adherence in community dwelling people with type 2 diabetes: the effect of varying numbers of medicines. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, *10*(3), 148–152. <https://doi.org/10.1177/1474651409357034>

- Szewczyk, K., & Zidorn, C. (2014). Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana—*Turnera diffusa*. *Journal of Ethnopharmacology*, *152*(3), 424–443. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.019>
- Tarigan, I. L., Sutrisno, S., Rumaida, R., Aini, I. P. S., & Latief, M. (2023). Isolation of a Flavone Apigenin and a Steroids Squalene from *Peronema canescens* Jack Leaves with Anti-Inflammatory Activities. *Pharmacognosy Journal*, *14*(6), 744–752. <https://doi.org/10.5530/pj.2022.14.162>
- Teng, H., Chen, L., & Song, H. (2016a). The potential beneficial effects of phenolic compounds isolated from: *A. pilosa* Ledeb on insulin-resistant hepatic HepG2 cells. *Food and Function*, *7*(10), 4400–4409. <https://doi.org/10.1039/c5fo01067e>
- Teng, H., Chen, L., & Song, H. (2016b). The potential beneficial effects of phenolic compounds isolated from: *A. pilosa* Ledeb on insulin-resistant hepatic HepG2 cells. *Food and Function*, *7*(10), 4400–4409. <https://doi.org/10.1039/c5fo01067e>
- Van Der Gen, A., Van Der Linde, L. M., Witteveen, J. G., & Boelens, H. (1971). Stereoselektive Synthese von Eremophilan-Sesquiterpenoiden aus Beta-Pinen. *Chemischer Informationsdienst. Organische Chemie*, *2*(48). <https://doi.org/10.1002/chin.197148249>
- Van Loo, P., De Bruyn, A., & Buděšínský, M. (1986). Reinvestigation of the structural assignment of signals in the ¹H and ¹³C NMR spectra of the flavone apigenin. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *24*(10), 879–882. <https://doi.org/10.1002/mrc.1260241007>
- Wilcox, G. (2005). Insulin and Insulin Resistance. En *Clin Biochem Rev* (Vol. 26).
- Xuguang, H., Aofei, T., Tao, L., Longyan, Z., Weijian, B., & Jiao, G. (2019). Hesperidin ameliorates insulin resistance by regulating the IRS1-GLUT2 pathway via TLR4 in HepG2 cells. *Phytotherapy Research*, *33*(6), 1697–1705. <https://doi.org/10.1002/ptr.6358>
- Yamamoto, N., Ueda-Wakagi, M., Sato, T., Kawasaki, K., Sawada, K., Kawabata, K., Akagawa, M., & Ashida, H. (2015). Measurement of Glucose Uptake in Cultured Cells. *Current Protocols in Pharmacology*, *71*(1), 12.14.1-12.14.26. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1214s71>
- Zhao, J., Pawar, R. S., Ali, Z., & Khan, I. A. (2007). Phytochemical Investigation of *Turnera diffusa*. *Journal of Natural Products*, *70*(2), 289–292. <https://doi.org/10.1021/np060253r>

- Zheng, X., Ke, Y., Feng, A., Yuan, P., Zhou, J., Yu, Y., Wang, X., & Feng, W. (2016). The mechanism by which amentoflavone improves insulin resistance in HepG2 Cells. *Molecules*, 21(5).
<https://doi.org/10.3390/molecules21050624>
- Zolla, C. (1980). Traditional medicine in Latin America, with particular reference to Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 2(1), 37–41.
[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(80\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(80)90028-8)
- Zou, C., Wang, Y., & Shen, Z. (2005). 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 64(3), 207–215.
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.08.001>