

UNIVERSIDAD NACIONAL

Campus Omar Dengo

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE QUÍMICA

Estudio comparativo del efecto hipoglicemiante y analgésico de cuatros especies de plantas: *Justicia spicigera*, *Justicia secunda* (insulina) y dos variedades de *Momordica charantia* (Sorosí y Bitter Melon) empleadas en medicina tradicional para tratamiento de la diabetes tipo II.

Trabajo sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Química, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura de Química Industrial

B.Q.I. ANYOLETT STELLER NAVARRO

TUTORA:

Ph.D. ANA FRANCIS CARBALLO ARCE

ASESORES:

Dra. NADIA LIZETH CARAM SALAS

Dr. GABRIEL ZAMORA FALLAS

Heredia, Costa Rica

2023

Resumen

Se realizaron extractos alcohólicos de 4 plantas distintas, *Justicia spicigera*, *Justicia secunda* y dos especies de *Momordica charantia*, estos extractos se utilizaron para realizar una caracterización fitoquímica, con la finalidad de encontrar metabolitos secundarios principales y determinar las diferencias químicas entre *Justicia spicigera* y *Justicia secunda*, debido a que popularmente se les conoce con el mismo nombre común, insulina, y ambas son utilizadas para el tratamiento de la diabetes tipo II en la medicina tradicional; y las diferencias químicas entre las dos especies de *Momordica charantia*, Bitter melon y Sosori, que tienen el mismo nombre científico pero popularmente se les conoce con distinto nombre común y visualmente son distintas, encontrando mayores diferencias en el fruto.

Los extractos de las plantas se utilizaron para realizar la prueba de actividad inhibitoria sobre la formación de productos de glicación avanzada, conocidos como AGE's por sus siglas en inglés, que sería la prueba *in vitro*, esta se realizó para determinar si los extractos tienen propiedades hipoglucemiantes, mediante el metabolismo inhibición AGE's, encontrando que 2 de los 4 extractos dieron resultados positivos para esta prueba, *J. spicigera* y *J. secunda*.

Para confirmar la actividad hipoglucemiante de los extractos, se realizaron también pruebas *in vivo*, utilizando ratas con diabetes tipo II inducida por la administración intraperitoneal de STZ (streptozotocina), obteniendo resultados positivos para 3 de los 4 extractos, *J. spicigera*, *J. secunda* y *M. charantia* en la variedad conocida como Bitter melon; en todos los casos se obtuvieron los mejores resultados al administrar dosis de 100 mg/kg de peso.

Además, se realizó la evaluación del efecto antialodínico o analgésico, en ratas con un moldeo noenatal de diabetes tipo II inducida por la administración intraperitoneal de STZ, los resultados obtenidos indican que los 4 extractos tienen efecto analgésico, sin embargo, se obtuvo un efecto con bajo porcentaje de analgesia y de poca duración; para esta evaluación se utilizaron los extractos de las plantas administrando una dosis de 100 mg/kg de peso del animal.

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mi familia por estar siempre, creer en mí y apoyarme en todo momento. En agradecimiento especial a mi esposo, por el apoyo incondicional y por motivarme a ser mejor.

También agradezco enormemente a mi tutora, la Dra. Ana Francis Carballo Arce, por la guía y el apoyo, por la dedicación en este proyecto, por darme la oportunidad de trabajar a su lado y el aprendizaje transmitido con tanto cariño.

Agradezco a todos los profesionales que hicieron posible este trabajo, que me apoyaron y transmitieron de su conocimiento, mis asesores el Dr. Gabriel Zamora Fallas y a la Dra. Nadia Caram Salas que me recibió con tanto cariño y de la que aprendí muchísimo en mi estadía en México.

Finalmente, y no menos importante, agradezco al Dr. José Ángel Rodríguez Corrales por su dedicación y toda la ayuda brindada.

Tabla de contenidos

1. Justificación.....	7
2. Marco teórico.....	10
2.1 Etnobotánica y etnofarmacología	10
2.1.1 Metabolitos secundarios.....	12
2.2 Familia Acanthaceae.....	12
2.2.1. Género Justicia	13
2.2.1.1 <i>Justicia spicigera</i>	15
2.2.1.2 <i>Justicia secunda</i>	16
2.3 Familia Cucurbitaceae	18
2.3.1 Género Momordica	19
2.3.1.1 <i>Momordica charantia</i>	19
2.4 <i>Diabetes mellitus</i>	22
2.4.1 Neuropatía diabética.....	23
2.5 Productos finales de glicación (AGE's).....	25
2.5.1 Receptores de AGE's (RAGE).....	26
3. Objetivos.....	28
3.1 Objetivo general.....	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. Metodología.....	28
4.1 Recolección y autenticación de la materia vegetal	28
4.2 Preparación del extracto.....	28
4.3 Caracterización fitoquímica.....	29
4.4 Actividad inhibitoria sobre la formación de AGE's	29
4.5 Actividad hipoglucemiante mediante ensayos <i>in vivo</i> (Apéndice A).	29
4.5.1 Animales de experimentación	29
4.5.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante de los extractos en ratas con diabetes inducida.....	30
4.5.3 Evaluación del efecto antialodínico (analgésico) de los extractos en ratas con diabetes inducida.....	30
4.5.4 Análisis de datos.....	31
4.5.5 Grupos experimentales	32

5. Resultados y discusión	33
5.1 Caracterización fitoquímica	33
5.1.1 “Chemical fingerprint” <i>J. spicigera</i>	33
5.1.2 “Chemical fingerprint” <i>J. secunda</i>	35
5.1.3 “Chemical fingerprint” <i>M. charantia</i> (Sorosí)	36
5.1.4 “Chemical fingerprint” <i>M. charantia</i> (Bitter melon)	38
5.1.5 Comparación entre los extractos de <i>J. spicigera</i> , <i>J. secunda</i> y <i>M. charantia</i> (Sorosí y Bitter melon)	40
5.2 Actividad inhibitoria sobre la formación de AGE’s	43
5.2.1 Aminoguanidina	43
5.2.2 <i>J. spicigera</i>	44
5.2.2 <i>J. secunda</i>	45
5.2.3 <i>M. charantia</i> (Sorosí)	46
5.2.4 <i>M. charantia</i> (Bitter melon)	48
5.2.5 Comparación entre los extractos de <i>J. spicigera</i> , <i>J. secunda</i> y <i>M. charantia</i> (Sorosí y Bitter melon)	49
5.3 Efecto hipoglucemiante de los extractos en ratas con diabetes inducida.....	50
5.3.1 <i>J. spicigera</i>	51
5.3.2 <i>J. secunda</i>	53
5.3.3 <i>M. charantia</i> (Sorosí)	54
5.3.4 <i>M. charantia</i> (Bitter Melon).....	55
5.3.5 Comparación entre los extractos de <i>J. spicigera</i> , <i>J. secunda</i> y <i>M. charantia</i> (Sorosí y Bitter melon)	57
5.4 Evaluación del efecto antialodínico (analgésico) de los extractos en ratas con diabetes inducida.....	59
6. Conclusiones.....	62
6. Referencias bibliográficas	65
Apéndice A	72
Apéndice B	73
Apéndice C	75
Apéndice D.....	80
Apéndice E	83
Apéndice F.....	85
Apéndice G.....	87

Índice de figuras

- Figura 1. Hojas de *J. gendarusa*¹, *J. pectoralis*², *J. isularis*³, *J. adhatoda*⁴, *J. flava*⁵ y *J. procumbes*⁶.³³**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 2. Hojas y flor de *Justicia spicigera*.³³**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 3. Estructura química de la kaempferitrina.³⁸**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4. Hojas y flor de *Justicia secunda*.²²**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 5. Estructura química del taraxerol.⁴⁰**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 6. Estructura química de la cucurbitacina.¹⁷**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7. a) Hojas y flor de *M. charantia*¹⁴, b) Fruto de *M. charantia*¹³, c) Fruto de *M. charantia*⁴⁴. 20
- Figura 8. Estructura química del momordicin.⁴⁹**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 9. Estructura química del charantin.⁴⁹**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 10. Formación de AGE's (Advanced Glycation End Products)⁶⁶;**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 11. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas y derivatizaciones de extracto de *Justicia spicigera*. (1) exposición a ultravioleta a 254 nm, (2) exposición a ultravioleta a 366 nm, (3) reactivo de productos naturales (366 nm), (4) DPPH (luz visible), (5) reactivo de anisaldehído (luz visible), (6) reactivo de anisaldehído (366 nm), (7) reactivo de vainillina (luz visible), (8) fast blue salt B (luz visible), (9) reactivo de Dragendorff (luz visible). 33
- Figura 12. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas y derivatizaciones de extracto de *Justicia secunda*. (1) exposición a ultravioleta a 254 nm, (2) exposición a ultravioleta a 366 nm, (3) reactivo de productos naturales (366 nm), (4) DPPH (luz visible), (5) reactivo de anisaldehído (luz visible), (6) reactivo de anisaldehído (366 nm), (7) reactivo de vainillina (luz visible), (8) fast blue salt B (luz visible), (9) reactivo de Dragendorff (luz visible). 35
- Figura 13. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas y derivatizaciones de extracto de *Momordica charantia* (variedad Sorosí). (1) exposición a ultravioleta a 254 nm, (2) exposición a ultravioleta a 366 nm, (3) reactivo de productos naturales (366 nm), (4) DPPH (luz visible), (5) reactivo de anisaldehído (luz visible), (6) reactivo de anisaldehído (366 nm), (7) reactivo de vainillina (luz visible), (8) fast blue salt B (luz visible), (9) reactivo de Dragendorff (luz visible). 36
- Figura 14. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas y derivatizaciones de extracto de *Momordica charantia* (variedad Bitter Melon). (1) exposición a ultravioleta a 254 nm, (2) exposición a ultravioleta a 366 nm, (3) reactivo de productos naturales (366 nm), (4) DPPH (luz visible), (5) reactivo de anisaldehído (luz visible), (6) reactivo de anisaldehído (366 nm), (7) reactivo de vainillina (luz visible), (8) fast blue salt B (luz visible), (9) reactivo de Dragendorff (luz visible). 38

Figura 15. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) <i>J. secunda</i> , (2) <i>J. spicigera</i> y <i>M. charantia</i> (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Exposición a luz ultravioleta a 254 nm.	40
Figura 16. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) <i>J. secunda</i> , (2) <i>J. spicigera</i> y <i>M. charantia</i> (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Exposición a luz ultravioleta a 366 nm.	40
Figura 17. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) <i>J. secunda</i> , (2) <i>J. spicigera</i> y <i>M. charantia</i> (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización con reactivo de productos naturales (366 nm).	40
Figura 18. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) <i>J. secunda</i> , (2) <i>J. spicigera</i> y <i>M. charantia</i> (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización con DPPH (luz visible).	40
Figura 19. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) <i>J. secunda</i> , (2) <i>J. spicigera</i> y <i>M. charantia</i> (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de anisaldehído (luz visible).	41
Figura 20. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) <i>J. secunda</i> , (2) <i>J. spicigera</i> y <i>M. charantia</i> (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de vainillina (luz visible).	41
Figura 21. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) <i>J. secunda</i> , (2) <i>J. spicigera</i> y <i>M. charantia</i> (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización fast blue salt B (luz visible).	41
Figura 22. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) <i>J. secunda</i> , (2) <i>J. spicigera</i> y <i>M. charantia</i> (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de Dragendorff (luz visible)	41
Figura 23. Gráfico generado en la herramienta “Calculator de AAT Bioquest”, donde se muestra porcentaje de inhibición vs concentración de aminoguanidina.	44
Figura 24. Gráfico generado en la herramienta “Calculator de AAT Bioquest”, donde se muestra porcentaje de inhibición vs concentración de <i>J. spicigera</i>	44
Figura 25. Porcentaje promedio de inhibición de AGEs con respecto a la concentración del extracto de <i>J. spicigera</i>	45
Figura 26. Gráfico generado en la herramienta “Calculator de AAT Bioquest”, donde se muestra porcentaje de inhibición vs concentración de <i>J. secunda</i>	45
Figura 27. Porcentaje promedio de inhibición de AGE’s con respecto a la concentración del extracto de <i>J. secunda</i>	46
Figura 28. Gráfico generado en la herramienta “Calculator de AAT Bioquest”, donde se muestra porcentaje de inhibición vs concentración de <i>M. charantia</i> (Sorosí).	47
Figura 29. Porcentaje promedio de inhibición de AGE’s con respecto a la concentración del extracto de <i>M. charantia</i> (Sorosí).	47

Figura 30. Gráfico generado en la herramienta “Calculator de AAT Bioquest”, donde se muestra porcentaje de inhibición vs concentración de <i>M. charantia</i> (Bitter melon).	48
Figura 31. Porcentaje promedio de inhibición de AGE’s con respecto a la concentración del extracto de <i>M. charantia</i> (Sorosi).	49
Figura 32. Variación de los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) en ratas con diabetes inducida y ratas normoglicémicas al transcurrir las semanas.	51
Figura 33. Glucosa en sangre con respecto al tiempo al administrar Glibenclamida como control positivo y el extracto de <i>J. spicigera</i> por vía oral en 3 dosis distintas.	52
Figura 34. Porcentaje de glicemia promedio al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de <i>J. spicigera</i> en 3 dosis distintas.	52
Figura 35. Glucosa en sangre con respecto al tiempo al administrar Glibenclamida como control positivo y el extracto de <i>J. secunda</i> por vía oral en 3 dosis distintas.	53
Figura 36. Porcentaje de glicemia promedio al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de <i>J. secunda</i> en 3 dosis distintas.	54
Figura 37. Glucosa en sangre con respecto al tiempo al administrar Glibenclamida como control positivo y el extracto de <i>M. charantia</i> (Sorosi) por vía oral en 1 dosis.	54
Figura 38. Porcentaje de glicemia promedio al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de <i>M. charantia</i> (Sorosi) en 1 dosis.	55
Figura 39. Glucosa en sangre con respecto al tiempo al administrar Glibenclamida como control positivo y el extracto de <i>M. charantia</i> (Bitter melon) por vía oral en 3 dosis distintas.	56
Figura 40. Porcentaje de glicemia promedio al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de <i>M. charantia</i> (Bitter melon) en 3 dosis distintas.	57
Figura 41. Glucosa en sangre con respecto al tiempo al administrar Glibenclamida como control positivo y el extracto de cada planta en dosis de 100 mg/kg.	57
Figura 42. Porcentaje de glicemia promedio al utilizar Glibenclamida como control positivo y el extracto de cada planta en dosis de 100 mg/kg.	59
Figura 43. Variación del 50% de umbral de retiro en ratas con diabetes inducida al transcurrir las semanas.	60
Figura 44. Variación del 50% de umbral de retiro con respecto al tiempo al administrar Gabapentina como control positivo y el extracto de las plantas en dosis de 100 mg/kg.	61
Figura 45. Porcentaje de analgesia promedio al utilizar Gabapentina como control positivo y el extracto de las plantas en dosis de 100 mg/kg.	62
Figura 46. Cromatografía HPTLC de extractos de <i>Justicia secunda</i> , <i>Justicia spicigera</i> y <i>Momordica charantia</i> (variedades Sorosí y Bitter Melon). Exposición de cromatograma a luz ultravioleta a 254 nm.	75

Figura 47. Cromatografía HPTLC de extractos de <i>Justicia secunda</i> , <i>Justicia spicigera</i> y <i>Momordica charantia</i> (variedades Sorosí y Bitter Melon). Exposición de cromatograma a luz ultravioleta a 366 nm.	75
Figura 48. Cromatografía HPTLC de extractos de <i>Justicia secunda</i> , <i>Justicia spicigera</i> y <i>Momordica charantia</i> (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de productos naturales y exposición del cromatograma a luz ultravioleta a 366 nm.	76
Figura 49. Cromatografía HPTLC de extractos de <i>Justicia secunda</i> , <i>Justicia spicigera</i> y <i>Momordica charantia</i> (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con DPPH y exposición del cromatograma a luz visible.....	76
Figura 50. Cromatografía HPTLC de extractos de <i>Justicia secunda</i> , <i>Justicia spicigera</i> y <i>Momordica charantia</i> (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de anisaldehído y exposición del cromatograma a luz visible.	77
Figura 51. Cromatografía HPTLC de extractos de <i>Justicia secunda</i> , <i>Justicia spicigera</i> y <i>Momordica charantia</i> (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de anisaldehído y exposición del cromatograma a luz ultravioleta a 366 nm.	77
Figura 52. Cromatografía HPTLC de extractos de <i>Justicia secunda</i> , <i>Justicia spicigera</i> y <i>Momordica charantia</i> (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de vainillina y exposición del cromatograma a luz visible.	78
Figura 53. Cromatografía HPTLC de extractos de <i>Justicia secunda</i> , <i>Justicia spicigera</i> y <i>Momordica charantia</i> (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de fast blue salt B y exposición del cromatograma a luz visible.....	78
Figura 54. Cromatografía HPTLC de extractos de <i>Justicia secunda</i> , <i>Justicia spicigera</i> y <i>Momordica charantia</i> (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de Dragendorff y exposición del cromatograma a luz visible.....	79
Figura 55. Variación del peso en ratas con diabetes inducida y ratas normoglicémicas al transcurrir las semanas.....	85
Figura 56. Porcentaje de glicemia con respecto al tiempo al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de <i>J. spicigera</i> en 3 dosis distintas.....	85
Figura 57. Porcentaje de glicemia con respecto al tiempo al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de <i>J. secunda</i> en 3 dosis distintas.	85
Figura 58. Porcentaje de glicemia con respecto al tiempo al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de <i>M. charantia</i> (Sorosí) en 1 dosis.	86
Figura 59. Porcentaje de glicemia con respecto al tiempo al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de <i>M. charantia</i> (B. melon) en 3 dosis distintas.	86
Figura 60. Variación del porcentaje de analgesia con respecto al tiempo al administrar Gabapentina como control positivo y el extracto de las plantas en dosis de 100 mg/kg.....	87
Figura 61. Área bajo la curva del % de analgesia al administrar Gabapentina como control positivo y el extracto de las plantas en dosis de 100 mg/kg.	87

1. Justificación

La medicina tradicional y el uso de productos naturales provenientes de plantas para tratar afecciones y enfermedades se dan desde tiempos prehistóricos, en los que el uso de fármacos como tales no era conocido. Según datos de estudios históricos, se traza el uso de plantas medicinales desde hace al menos 60 000 años.^{1,2} El uso de la medicina tradicional es una combinación de conocimientos, experiencia, historia y cultura que ha sido heredado de generación en generación, y se ha compartido el conocimiento entre distintos países, viéndose afectada por una variedad de factores a lo largo del tiempo, como las distintas culturas, métodos de aplicación, selección de distintas hierbas y métodos de preparación, haciendo de esta un gran ámbito de estudio y de gran utilidad.^{3,4}

La medicina tradicional se basa en el uso de productos naturales, la inmensa diversidad de estructuras químicas y su actividad en cuanto a funciones biológicas.⁵ Los compuestos activos encontrados en productos naturales han tenido muy buenos resultados en cuanto a eficacia y selectividad farmacológica, debido a que sus complejas estructuras se encuentran bien organizadas de forma tridimensional, por sus propiedades estéricas que favorecen estas características en los compuestos. Lo anterior demuestra la importancia de conocer las características fitoquímicas e identificar los metabolitos secundarios presentes en las plantas empleadas en la medicina tradicional.^{1-3,6}

Para inicios del 2000, solo cerca del 6 % del total de especies de plantas tenían estudios relacionados con su actividad biológica y aproximadamente un 15 % relacionados con sus características fitoquímicas, esto debido a la amplia variedad de plantas, los usos relacionados y la biodiversidad presente a nivel mundial.¹ Para el 2018, dentro de los fármacos aprobados por la FDA, un 18 % eran procedentes de productos naturales, lo que demuestra su potencial y el crecimiento que ha tenido en los últimos años el interés por los mismos.⁵ Además, es importante destacar que aproximadamente un 40 % de los fármacos consumidos en países desarrollados son procedentes de productos naturales, principalmente de plantas.⁷

En muchos de los casos, los productos naturales a estudiar no son la cura en si para la enfermedad, sino un tratamiento alternativo o un coadyuvante, que contribuye al mejoramiento de las condiciones de las personas que las padecen, o disminuyen el uso de

otro tipo de fármacos que pueden ser más costosos o generan efectos secundarios a largo plazo en el cuerpo del paciente.^{1,5,6}

La *diabetes mellitus* es considerada una enfermedad crónica, que conlleva a múltiples complicaciones en la salud de las personas que la padecen. Según la Federación Internacional de la Diabetes, esta se describe como un padecimiento crónico que ocurre cuando el páncreas no es capaz de producir insulina o cuando el cuerpo no es capaz de utilizar de forma correcta o eficiente la insulina que produce.⁸

Los tipos de diabetes más comunes son diabetes tipo 1, la cual representa de un 5 % a un 10 % de las personas con esta enfermedad y generalmente se presenta en niños y adultos jóvenes, es causada por una reacción autoinmune en la que el cuerpo ataca y destruye las *células β* del páncreas, que son las encargadas de la producción de insulina. La diabetes tipo 2 es la más común y se presenta en alrededor de un 90 % de los casos de diabetes, mayormente en personas adultas o adultos jóvenes, es del tipo no insulina dependiente, y se genera debido a que el cuerpo no metaboliza bien la insulina, ocasionando que los niveles de glucosa en sangre se eleven, a esto se le conoce como hiperglicemia, este tipo de diabetes se da por una mezcla de factores genéticos con factores del entorno o el estilo de vida de las personas. Y, por último, la diabetes gestacional se da cuando durante el embarazo se presenta altos niveles de glucosa en sangre (hiperglicemia) y se asocia a complicaciones durante el embarazo que pueden afectar tanto al bebé como a la madre. Este tipo de diabetes tiene una incidencia de 1 de cada 6 embarazos, normalmente el padecimiento cesa después del embarazo, pero aproximadamente el 50 % de las mujeres que tuvieron diabetes gestacional desarrollan Diabetes tipo 2 durante los siguientes 5 años a 10 años.^{8,9}

Desde la década de los 80 el número de personas con esta enfermedad se ha cuadruplicado, aumentando los casos en todo el mundo, presentado una mayor incidencia en los países de medios y bajos recursos. Aproximadamente, 422 millones de personas alrededor del mundo sufren de diabetes, de los cuales, para el 2012 se reportaron 1.5 millones de muertes relacionadas directamente con esta enfermedad, colocándola como una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Además, incrementa el riesgo de otras enfermedades como las cardiovasculares, lo cual provocó otros 2.2 millones de muertes indirectas asociadas a la enfermedad. Es importante mencionar que la diabetes tiene alta probabilidad de desarrollar

afecciones severas como: ceguera, insuficiencia renal, neuropatías y amputación de extremidades.^{10,11}

La *Mormordica charantia* es una planta utilizada por distintas culturas, que abarca desde la medicina tradicional mexicana hasta la medicina tradicional China, los países en los que se consume con mayor frecuencia se encuentran en África y Asia. Esta planta tiene una gran variedad de usos relacionados al tratamiento de enfermedades y se le han atribuido propiedades antihelmínticas, antimaláricas, antiulcerosas, antivirales, antineoplásicas, antihiperlipidémicas, antisépticas, antioxidantes, antiinflamatorias, hepatoprotectoras y antidabéticas, siendo este último uno de los más conocidos.¹²⁻¹⁷

Las propiedades de la *M. charantia* mencionadas se le atribuyen a dos compuestos, llamados charantin y momordicin. Para el momordicin se han realizado estudios *in vitro* que demuestran su actividad antioxidante e hipoglucemiante, sin embargo, no se han realizado estudios *in vivo*; en el caso del charantin si se cuenta con estudios *in vivo* utilizando ratas con diabetes tipo II inducida, dando resultados positivos para la disminución de azúcar en sangre al administrar dosis de 50 a 100 mg/kg.¹²⁻¹⁷

La *Justicia spicigera* y la *Justicia secunda* son plantas utilizadas en la medicina tradicional, conocidas como “insulina” debido a su uso en el tratamiento de la diabetes, son muy populares en los países de América Latina, en los que se consumen en forma de té, el cual es característico debido a su color morado-rojizo.¹⁸⁻²²

En el caso de la *Justicia spicigera* se atribuyen las propiedades hipoglucemiantes a un compuesto llamada kaempferitrina, con el que se han realizado tanto estudios *in vitro* como *in vivo* utilizando ratas con diabetes tipo I inducida con aloxan, dando resultados positivos al utilizar dosis de 100 a 200 mg/kg; para la *Justicia secunda* se han hecho estudios fitoquímicos que señalan que el compuesto activo responsable de la actividad hipoglucemiante es el taraxerol, y los extractos de la planta se han utilizado para estudios *in vivo*, obteniendo resultados positivos al utilizar ratas con diabetes tipo I inducida con aloxan administrando dosis de 50 a 150 mg/kg.¹⁸⁻²²

Costa Rica es un país con una amplia variedad de biodiversidad, en el cual el uso de plantas con fines medicinales es bastante común, sin embargo, la mayoría de las plantas no han sido

estudiadas. Por lo que no se han caracterizado fitoquímicamente, ni se han determinado los metabolitos secundarios presentes, responsables de la actividad biológica, y con potencial uso farmacológico.²³ Por lo que se plantea la posibilidad de estudiar las plantas *Justicia spicigera* y *Justicia secunda* conocidas como “insulina” y dos variedades de *Momordica charantia* conocidas como sorosí y bitter melon (originario de países de Asia y utilizado en la medicina tradicional China), en un estudio comparativo en el que se evalúe su actividad hipoglicemiante en un modelo de diabetes Tipo II neonatal en ratas, con la finalidad de evaluar su posible uso como tratamiento coadyuvante para la diabetes. Además, de evaluar su actividad antialodínica o analgésica en el desarrollo de la neuropatía diabética en este modelo. También, caracterizar de manera fitoquímica los extractos alcohólicos de las cuatro plantas.¹³⁻²³

Es importante recalcar que las cuatro plantas mencionadas no cuentan con estudios *in vivo* que evalúen su actividad antialodínica en casos de neuropatía diabética, solamente en neuropatías derivadas de otras enfermedades.¹³⁻²³

2. Marco teórico

2.1 Etnobotánica y etnofarmacología

Las plantas se han utilizado para el tratamiento de enfermedades en distintas culturas durante muchos años, conforme ha pasado el tiempo se han investigado las propiedades y características de estas para identificar los compuestos responsables de esta actividad. Relacionado con lo anterior, la etnobotánica permite la identificación y caracterización botánica de las plantas utilizadas tradicionalmente en distintas culturas y las posibles aplicaciones de estas en el ámbito de la salud; la etnofarmacología se basa en el estudio de la actividad biológica y el posible uso farmacológico de los compuestos activos responsables de la actividad demostrada en la planta.²⁴

La medicina tradicional se puede definir como “el uso de plantas o derivados de estas, que han sido mínimamente procesados o sin procesar, para aliviar los malestares de salud de una población o región”, esta práctica se realiza gracias al conocimiento que ha trascendido durante generaciones en cada cultura.²⁴ Las plantas y técnicas utilizadas para estas prácticas pueden variar dependiendo de la zona de estudio, aunque suele ser bastante interesante que estas pueden llegar a ser muy similares, utilizar plantas de la misma familia o tener los

mismos principios de uso. Cabe mencionar que los productos naturales no solamente se utilizan como tratamiento principal para una enfermedad, en muchas ocasiones se toma como un tratamiento coadyudante en conjunto con un fármaco alópata, esto incluso en la medicina tradicional moderna.²⁴⁻²⁶

Desde el descubrimiento del primer compuesto farmacológicamente activo, en 1805, llamado morfina y aislado de la planta de opio, solamente una pequeña fracción de las especies existentes de plantas han sido científicamente estudiadas para la búsqueda de compuestos bioactivos, y a pesar de esto, en la medicina tradicional ha representado una gran contribución para la medicina moderna, por lo que es un gran potencial de estudio científico y farmacológico.²

La utilidad que se le ha encontrado al uso de plantas y sus beneficios en la salud, juega un rol muy importante en la sociedad y en las distintas culturas a través del tiempo, las plantas son capaces de sintetizar compuestos complejos de alta especificidad, llamados metabolitos secundarios, los cuales son responsables de la actividad biológica que estas pueden presentar y representan un gran potencial para el descubrimiento de nuevos fármacos. Estudios recientes muestran que hay patrones en común cuando han comparado distintas plantas utilizadas en la medicina tradicional en distintas regiones y culturas del mundo, sin importar que tan distantes sean las zonas estudiadas; estos patrones se relacionan con el uso de plantas del mismo género o incluso de la misma especie para tratar las enfermedades.^{25,26}

El que se encuentren datos de aplicaciones de plantas de las mismas familias para tratamientos similares se podría explicar por distintas razones, por ejemplo, las plantas de una misma familia pueden presentar una bioquímica similar a pesar de desarrollarse en distintos entorno y la migración ha hecho que el conocimiento se transmita entre distintas culturas, por lo que, las personas podían reconocer plantas de una misma familia y probar de forma experimental su aplicación o uso para tratamientos similares. La etnobotánica y etnofarmacología han hecho que todos estos conocimientos sean registrados y guardados en bases de datos que ayudan a la mejor aplicación de los mismos, para estudios relacionados con el descubrimiento y desarrollo de fármacos.^{25,26}

Ambas disciplinas, etnobotánica y etnofarmacología, tienen enfoques novedosos en los que se mezcla el conocimiento tradicional o cultural con el conocimiento científico, combinando

la sabiduría sobre la gran diversidad biológica de cada cultura con herramientas y métodos actuales para la búsqueda de nuevos compuestos biológicamente activos, que colaboren en el estudio de compuestos derivados de productos naturales para el desarrollo de posibles fármacos a futuro.^{24,26}

2.1.1 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos que las plantas y microorganismos son capaces de sintetizar como respuesta química para llamar la atención de otros organismos o cuidarse de depredadores, pero estos no forman parte del proceso del metabolismo central o primario de los mismos, algunos incluso son desechos del metabolito primario y esto se debe su nombre, estos compuestos también pueden ser producto de factores externos a los que se ven expuestos durante su crecimiento, como factores que provocan estrés, un ejemplo muy común son los cambios ambientales o climáticos. Estos factores se pueden manipular con la finalidad de aumentar la producción de metabolitos secundarios de interés.^{27,28}

Estos compuestos tienen una inmensa diversidad por lo que se pueden clasificar en distintos grupos de acuerdo con sus características estructurales y química, algunos ejemplos de los principales grupos son: compuestos aromáticos, glicósidos, flavonoides, alcaloides y terpenoides. De acuerdo con las características de cada tipo de compuesto se les han dado gran variedad de usos como en medicina tradicional o hasta usos industriales.²⁸

La diversidad química de los metabolitos secundarios existentes en las plantas es muy extensa, debido a que van cambiando su estructura química con la evolución, llegando a ser cuantitativamente igual o superior a la cantidad de compuestos químicos con actividad encontrados o descubiertos por medio de síntesis química.^{1,6}

2.2 Familia Acanthaceae

Dentro de la familia Acanthaceae se registran aproximadamente 4000 especies y 250 géneros, lo que la clasifica como una de las 12 familias más diversas de plantas con flores en el mundo, las plantas de esta familia se encuentran distribuidas principalmente en los trópicos y subtrópicos, esta familia es conocida por tener un significativo grupo de plantas con gran diversidad fitoquímica con propiedades farmacológicas, algunos de los géneros más utilizados gracias a su actividad biológica y medicinal son Justicia y Ruellia.^{18,29,30}

En la medicina tradicional las plantas de la familia acanthaceae se utilizan para distintos tratamientos en una gran diversidad de padecimientos, dentro de los que se encuentran: cálculos renales, inflamación muscular y calambres, hipertensión, diabetes, fiebre, dolores y malestares estomacales.^{30,31}

La clasificación por grupos de esta familia ha variado al pasar de los años, por la complejidad de su rango de hábitat, debido a que se encuentra en distintas regiones y que a su vez son extensas, y por la variación morfológica y genética de las plantas que la conforman. En 1789 Jussieu subdividió la familia de acuerdo a la cantidad de estambres, en 1847 Nees realizó el tratamiento taxonómico de toda la familia y la dividió en dos subórdenes el Anechmatacantheae con dos géneros y el Echnatacantheae con 9 géneros; en 1876 Betham dividió a la familia basándose en la estivación de la corola, la forma de la corola, el número de semillas y la ausencia o presencia de retináculos, con especial énfasis en la morfología de las anteras, dando como resultado en cinco géneros: Thunbergieae, Nelsonieae, Ruellieae, Acantheae y Justiciaeae. En la actualidad se han descubierto y clasificado 250 géneros de esta familia, de los cuales 30 de los géneros más conocidos por sus usos tradicionales se encuentran en la Tabla 1.^{30,32}

Tabla 1. Clasificación de algunos géneros importantes de la familia Acanthaceae.³²

No	Género	No	Género	No	Género
1	Blefaris Juss.	11	Justicia L.	21	Asistasia Blume.
2	Lepidagathis Willd.	12	Barlería L.	22	Petalidio Nees.
3	Aphelandra Roxb.	13	Strobilanthes Blume.	23	Aechmanthera Nees.
4	Hygrophila Roxb.	14	Ruellia L.	24	Thunbergia Retz.
5	Dicliptera Juss.	15	Crossandra Salisb.	25	Graptophyllum Nees.
6	Peristrophe Ness.	16	Hemigraphis Nees.	26	Eranthem L.
7	Afrofittonia Lindau	17	Filetia Miq.	27	Geissomeria Lindl.
8	Ambongia Benoist	18	Fittonia Coem.	28	Golea Chiov.
9	Henrya Nees	19	Gymnostachyum Nees	29	Neriacanto Benth.
10	Heteradelfia Lindau	20	Megaskepasma Lindau	30	Vindasia Benoist

2.2.1. Género Justicia

El género Justicia se encuentra dentro de los más extensos de la familia Acanthaceae, está formado por alrededor de 600 especies, que se encuentran ampliamente distribuidas alrededor del mundo, sin embargo la mayoría se encuentran en las zonas tropicales y tienen poca representación en las zonas más templadas, es un género muy conocido en la medicina tradicional en distintas culturas, Dentro de los usos que se les dan a estas plantas se

encuentran los siguientes: antidiabética, antibacteriana, antiinflamatoria, antitumoral y tónico diurético.^{18,29,31,33}

La forma en la que generalmente se consume la planta es mediante una infusión utilizando las hojas, o sus extractos acuosos y las partes más utilizadas son la raíz, el tallo, las hojas y en algunos casos el fruto. Algunos ejemplos del género *Justicia* se encuentran en la Figura 1.^{18,29,31,33}

Además de los usos mencionados, para el género *Justicia* en la medicina tradicional, estas plantas también son conocidas por los efectos que causan a nivel del Sistema Nervioso Central teniendo efectos alucinógenos, somníferos, sedantes, depresores y se ha relacionado con tratamientos para la epilepsia y desórdenes mentales.^{18,31,32}

La descripción general para las especies de *Justicia* las caracteriza como hierbas o arbustos perennes erectos o escandentes, con plantas de 1 a 1,5 metros de alto, con hojas que presentan cistolitos y son pecioladas con un margen foliar que suele ser entero, las inflorescencias están en espigas o panículas cimas, y la especie rara vez tiene flores solitarias, terminales o axilares. Las brácteas y bractéolas suelen ser conspicuas e imbricadas. Se suele reconocer con facilidad a las especies de *Justicia* por su corola bilabial, con un labio posterior generalmente bilobulado, un labio anterior trilobulado, dos estambres, una cápsula con cuatro semillas y una porción basal estéril.^{18, 34}

En América Latina las 3 especies más utilizadas en la medicina tradicional son *Justicia spicigera*, *Justicia secunda* y *Justicia pectoralis*.³⁵



Figura 1. Hojas de *J. gendarusa*¹, *J. pectoralis*², *J. isularis*³, *J. adhatoda*⁴, *J. flava*⁵ y *J. procumbens*⁶.³³

2.2.1.1 *Justicia spicigera*

Esta planta es nativa de México y países de Suramérica, actualmente también se pueden encontrar en Belice, El Salvador, Honduras, Costa Rica y Nicaragua. Es una hierba erecta o trepadora perene, con hojas pecioladas y un margen entero de color verde oscuro con venas marcadas, las flores son tubulares de color anaranjado brillante y se encuentran agrupadas unidas al tallo, presenta dos estambres y una cápsula con cuatro semillas (Figura 2).^{21,29,33,36}



Figura 2. Hojas y flor de *Justicia spicigera*.³³

Algunos de los nombres comunes con los que se conoce la planta son micle, muiltle, muicle, nicle y hierba tinta. Es una planta muy utilizada en la medicina tradicional como estimulante, tónico sanguíneo para el desarrollo de glóbulos rojos, antipirético, antiespasmódico, antiinflamatorio, anticancerígeno, antitumoral, antidiabético, para tratar la bronquitis, la hipertensión, la anemia y aliviar trastornos menstruales.^{29,33}

Debido al extenso uso que se le ha dado a esta planta en la medicina tradicional se ha estudiado para caracterizarla y determinar los metabolitos secundarios presentes, se ha demostrado que contiene flavonoides, antocianinas, carotenoides, taninos, alcaloides, terpenoides y lignanos.^{29,33,37}

En estudios fitoquímicos realizados a la *J. spicigera* se ha encontrado que el compuesto que potencialmente es el responsable de la actividad biológica como antiinflamatorio y antidiabético es el flavonide glucosidado kaempferitrina.¹⁹

La kaempferitrina (Figura 3) es el flavonoide más abundante presente en las hojas de la *J. spicigera*, para el cual existen estudios *in vivo* e *in vitro* de la evaluación de la actividad antidiabética, se ha evaluado su efecto hipoglucemiante. La administración de dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg de ha demostrado tener efecto hipoglucemiante en ratas con diabetes tipo

I inducida con aloxan. Además, se ha demostrado que tiene efecto citotóxico en células que derivan de muestras de cáncer cervicouterino.^{20,38}

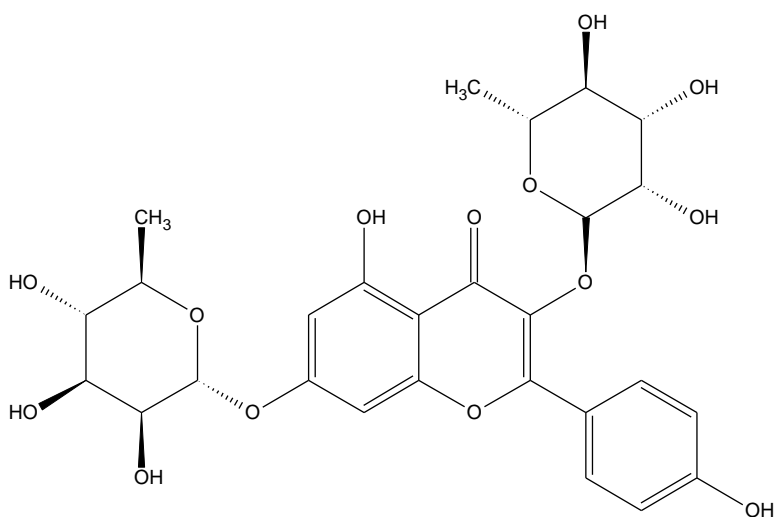


Figura 3. Estructura química de la kaempferitrina.³⁸

2.2.1.2 *Justicia secunda*

Esta planta es nativa de Suramérica, pero actualmente se encuentra distribuida por toda América, mayormente en América Central y Suramérica, también en África. Es una hierba de tallos erectos o ascendentes, sus hojas son simples y opuestas con margen entero, sus flores son tubulares de color rojo-violeta que se agrupan en 5 pétalos mayormente libres sobre la corola y presenta una cápsula con cuatro semillas (Figura 4).^{18,22,35}



Figura 4. Hojas y flor de *Justicia secunda*.²²

Algunos de los nombres comunes que se le dan a esta planta, en las distintas culturas, son la hoja de la vida, singamichilla, cascajera, insulina y sanguinaria. Es una planta que en América

Latina se le ha dado gran variedad de usos en la medicina tradicional para tratar afecciones como anemia, dolores de riñones, oídos, garganta y nariz, control de la presión arterial y los niveles de ácido úrico en sangre, también como hipoglucemiante, energizante, hipolipemiante, antimicrobiano, expectorante y sedante.^{18,20,22,35}

En los estudios que se le han realizado a la planta para su caracterización fitoquímica, se han encontrado distintos metabolitos secundarios como alcaloides, lignanos, flavonoides, terpenoides, fenoles, taninos, saponinas, cumarinas y antocianinas.^{18,22,34} Algunos estudios realizan esta caracterización con base en la distribución de los mismos según la parte de la planta, por ejemplo, se ha demostrado en los tallos, la presencia de amidas fenólicas, alcaloides, amidas, derivados de fenilalanina, lignanos y triterpenos; en las hojas, amidas fenólicas, alcaloides y derivados de fenilalanina; y en las raíces, amidas fenólicas, alcaloides, amidas, derivados de fenilalanina, lignanos y triterpenos.³⁹

La *J. secunda* es utilizada en gran variedad de afecciones, pero pocas han sido demostradas. En los estudios fitoquímicos realizados a la planta, se ha encontrado un compuesto llamado taraxerol (Figura 5), que es un triterpeno con gran potencial farmacológico, presente en distintas plantas utilizadas en la medicina tradicional, al que se le atribuyen distintas propiedades como antiinflamatorio, antitumoral, antimicrobial y antioxidante, además es conocido por sus beneficios al utilizarlo en personas que padecen enfermedades como Alzheimer y Parkinson. A este compuesto, además se le conoce por sus beneficios para el tratamiento contra la diabetes. Sin embargo, no se ha demostrado que sea el responsable de esta actividad en estudios *in vivo* e *in vitro*.^{20,40}

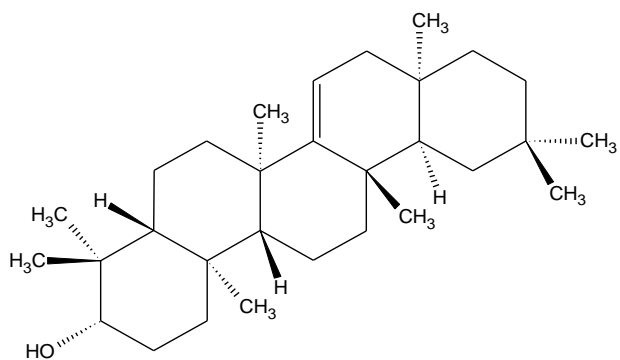


Figura 5. Estructura química del taraxerol.⁴⁰

2.3 Familia Cucurbitaceae

La familia Cucurbitaceae, llamada la familia de las calabazas, consiste en aproximadamente 800 especies y 130 géneros, son plantas herbáceas y autocompatibles. Se cree que estas especies son nativas de India y China, pero actualmente se encuentran distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, en las que se incluyen partes del Amazonas, África, Asia, El Caribe y Suramérica.^{12-14,41}

Esta familia recibe su nombre debido a un grupo de compuestos llamado cucurbitacinas, que están presentes de forma exclusiva en todas las especies de la familia Cucurbitaceae, lo que quiere decir que solamente las especies clasificadas dentro de esta familia presentan estos compuestos.^{17,42}

Las cucurbitacinas son metabolitos secundarios llamados terpenoides, la estructura de la cucurbitacina se observa en la Figura 6, cabe recalcar que esta es la estructura básica, que puede tener variaciones dependiendo de la planta en específico de la que provenga.^{17,42}

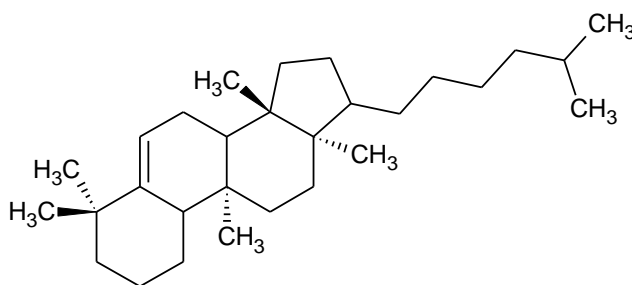


Figura 6. Estructura química de la cucurbitacina.¹⁷

Dentro de las especies más conocidas de esta familia se encuentra la sandía, por su alto consumo a nivel mundial, dentro del ámbito farmacológico una de las más importantes es la *Momordica charantia*. Las familias más conocidas por sus estudios, convirtiéndose en las más importantes son: Trichosanthes, Lagenaria, Luffa, Benincasa, Momordica, Cucumis, Citrullus, Cucurbita, Bryonopsis y Corallocarpus.^{7,42,43}

Muchas de sus especies son utilizadas en la medicina tradicional y mediante estudios experimentales se ha demostrado que son ricas en proteínas y contienen gran variedad de compuestos biológicamente activos, utilizados como antifúngicos, antibacteriales, antivirales, antidiabéticos, antiinflamatorios y antitumorales.⁴²⁻⁴⁴

2.3.1 Género *Momordica*

El género *Momordica* forma parte de la familia Cucurbitaceae y está compuesto por alrededor de 60 especies, son plantas trepadoras herbáceas perennes o anuales, que son parte de la misma familia de la calabaza, melón, sandía y el pepino, la mayoría de las especies de este género son conocidas por su consumo diario, dentro de la alimentación a nivel mundial.^{17,45}

El nombre *Momordica* proviene del Latin, que significa “morder”, esto debido a la forma de la hoja de la mayoría de las especies de este género, con borde de una forma particular, estos son dentados, aparentando haber sido mordida.⁴⁶

Además de su importancia dentro de la alimentación en distintos países, las especies del género *Momordica* también son de suma importancia en la medicina tradicional y cuentan con gran variedad de estudios fitoquímicos y farmacológicos. Algunas de las especies más conocidas por su uso en la medicina tradicional son: *Momordica charantia*, *Momordica balsamina*, *Momordica dioica* y *Momordica foetida*.⁴⁶⁻⁴⁸

Dentro de las propiedades que se les atribuyen a estas plantas, en el área de interés farmacológico se encuentran el tratamiento a padecimientos como: diabetes, tumores, leucemia, candidiasis, malaria, inflamación muscular, deficiencias inmunológicas, hipertensión, condiciones relacionadas con el aumento de colesterol y triglicéridos en sangre.⁴⁶⁻⁴⁸

2.3.1.1 *Momordica charantia*

Esta planta es nativa de Asia, pero actualmente también se encuentra distribuida en América Central, Suramérica, África e India. Es una planta herbácea perenne que puede ser de hasta 6 metros de alto, las hojas son simples y alternadas, palmeadas, generalmente presentan de 5 a 7 lobulaciones separadas, con zarcillos sin ramificar o dos ramificados; la flor es generalmente solitaria en un escapo bracteado, con cáliz lobulado de 5 pétalos, de color amarillo, generalmente con 3 estambres y con pistilos; el fruto es ovoide o elipsoidal, estriado o verrugoso, es de sección transversal hueca con una capa delgada que rodea una cavidad central con semillas de color blanco o rojo según la maduración, de color naranja o verde según la variedad (Figura 7).^{16,45,49}

Momordica charantia es una planta que presenta distintas variedades de forma y tamaño en el fruto; el fenotipo más utilizado y conocido en China (Figura 7.b) es de forma ovoide sin punta, color verde pálido, de 20 cm a 30 cm de largo, con superficie suave y verrugosa; el más común en la India tiene forma más estrecha con extremos puntiagudos, con superficie cubierta de dientes o crestas y es de color verde claro o blanco. En países como Panamá y zonas de Centro América el más utilizado tiene frutos más pequeños de 6 cm a 10 cm de longitud, de color anaranjado brillante cuando están maduros, con semillas rojas y dulces (Figura 7.c).⁴⁹



Figura 7. a) Hojas y flor de *M. charantia*¹⁴, b) Fruto de *M. charantia*¹³, c) Fruto de *M. charantia*⁴⁴.

En países de Asia y África, la *M. charantia* es consumida como un alimento, el fruto es de consumo diario y las hojas se consumen como infusiones o té.^{12,17} La planta es conocida con distintos nombres comunes según la cultura y el color del fruto, algunos son: pera de bálsamo, calabaza amarga, karela, cundeamor, bitter melón (Figura 7.b) o sorosí (Figura 7.c). Es utilizada alrededor del mundo por distintas culturas como antihelmíntica, antimalárica, antiulcerosa, antiviral, antineoplásica, antihiperlipidémica, antiséptica, antioxidante, antiinflamatoria y hepatoprotectora. También, se utiliza en tratamientos para la obesidad, afecciones ováricas, y el más conocido para la *diabetes mellitus*. Muchos de sus usos han sido demostrados, incluso la mayoría se han probado en animales y algunos en humanos (como su uso en tratamientos para la diabetes tipo I y II).^{12,13,16,17,44,45,49-53}

En la caracterización fitoquímica de la planta, se han encontrado distintos metabolitos secundarios, responsables de la gran cantidad de usos y de su bioactividad, como cucurbitacinas, esteroides, triterpenos, flavonoides, saponinas, antocianinas y en su mayoría alcaloides.^{16,17,45,49}

En estudios realizados a la planta se ha encontrado que hay varios compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante. Se ha demostrado que la administración de 100 mg/kg del extracto concentrado de la fruta dos veces al día tiene efectos hipoglucemiantes en ratas con diabetes tipo I inducida con aloxán.⁴⁹

El momordicin (Figura 8) es un triterpeno tetracíclico, al que se le atribuyen propiedades relacionadas con la actividad hipoglucemiante de la *M. charantia*, este compuesto se ha encontrado en todas las partes de la planta y además se le atribuyen también efectos estomacales beneficiosos para la salud.^{16,49}

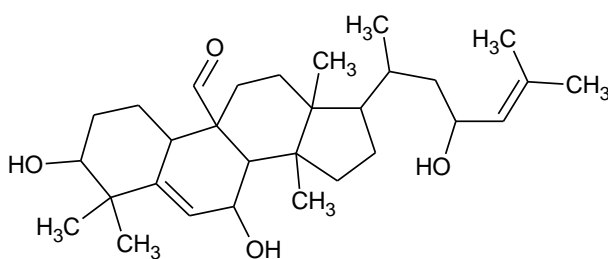


Figura 8. Estructura química del momordicin.⁴⁹

El charantin (Figura 9) es un glucósido esterooidal presente en la *M. charantia*, al que se le atribuyen propiedades relacionadas con la disminución de azúcar en sangre, similar a las de la insulina. Este compuesto se encuentra principalmente en el fruto y tiene efectos similares a los de drogas comerciales en dosis orales en ratas, con diabetes tipo I inducida con aloxán, que van de 50 mg/kg a 100 mg/kg. Además, se le atribuye actividad cardiovascular, la cual también ha sido estudiada y probada en animales.^{12,13,49,51}

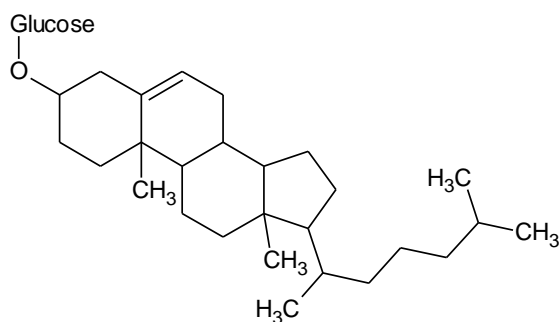


Figura 9. Estructura química del charantin.⁴⁹

2.4 *Diabetes mellitus*

La *diabetes mellitus* es la enfermedad endocrina más común, es considerada una de las cinco causas por las que mueren más personas en el mundo, es causada por un desorden en el metabolismo, generado por una combinación de factores tanto hereditarios como del entorno, que causan un elevado nivel de azúcar en la sangre (hiperglucemia), debido a defectos en la secreción o producción de insulina, la acción de la insulina en el cuerpo o ambas.^{13,51}

El tratamiento más común para este padecimiento se basa en el uso de agentes hipoglucemiantes, que, por lo general, tienen efectos secundarios como aumento de peso, desórdenes gastrointestinales, edema periférico e insuficiencia hepática, algunas de estas complicaciones se dan en plazos de largo tiempo que pueden ser meses o años, haciendo que la expectativa de vida de las personas con esta enfermedad sea de aproximadamente 2/3 con respecto a la población en general.^{51,54,55}

El incremento en los últimos años en el número de personas que padecen *diabetes mellitus* es alarmante, incluso se dice que tiene proporciones a nivel de una pandemia. Actualmente unas de las mayores causas de diabetes son los hábitos de alimentación y el estilo de vida de las personas.^{51,56}

El nivel o el grado de hiperglicemia puede variar con el transcurso del tiempo, incluso la enfermedad puede estar presente pero no desarrollarse en un grado suficiente como para causar hiperglicemia, algunas personas que logran tener un control de esto y ser diagnosticadas a tiempo pueden mantener los niveles de azúcar controlados y evitar el progreso de la enfermedad, manteniendo un peso recomendado o reduciendo su peso de ser necesario, comiendo sanamente y realizando actividad física.⁵⁵

La *diabetes mellitus* se puede presentar de dos formas distintas en los pacientes, la diabetes tipo I caracterizada por el incremento de los niveles de glucosa en sangre. Es una enfermedad autoinmune crónica, que se da por la deficiencia de insulina debido a la pérdida de células β pancreáticas. La etiología de la diabetes tipo I no se comprende por completo, pero de acuerdo con los estudios realizados a lo largo de los años se cree que la destrucción de las células β es mediada por las células T.^{57,58}

Por otro lado, la diabetes tipo II, que es la forma más prevalente de la *diabetes mellitus*, se caracteriza por una resistencia a la insulina. Las células responden de forma inadecuada a la insulina producida por las células β pancreáticas, y al avanzar la enfermedad se da la pérdida progresiva de la secreción de insulina de las células β , esto debido a que el cuerpo detecta que la insulina no es aprovechada y se da una disminución de la masa de células β .^{58,59}

La diabetes tipo I, conocida como insulino dependiente, es difícil de controlar con medicina alternativa, debido a que las personas que la padecen requieren suministrar insulina diariamente para poder sobrevivir a esta enfermedad. A diferencia de la diabetes tipo II que está más relacionada con un desorden en el metabolismo, este tipo de diabetes lo padecen alrededor del 90 % de las personas con la enfermedad.⁵⁵

Estudios recientes estiman que cerca del 30 % de las personas que padecen de diabetes utilizan la medicina tradicional como complemento o tratamiento alternativo para controlar la enfermedad y tratar de disminuir los efectos secundarios relacionados a la diabetes, muchas hierbas o plantas medicinales con actividad hipoglucemiante y antioxidante pueden proteger órganos involucrados en el proceso degenerativo de la *diabetes mellitus*.^{13,54,56}

El estrés oxidativo y la generación de radicales libres se relacionan con gran cantidad de enfermedades, entre ellas la diabetes y el aceleramiento del proceso de envejecimiento. En un metabolismo que funciona de manera ideal, la cantidad de radicales libre y de antioxidantes deben estar en proporción o “equilibrio”, cuando una persona tiene diabetes, los niveles de azúcar son altos por lo que se da un aumento de la producción de los radicales libres, debido a la oxidación de azúcares, y además se da una disminución de antioxidantes. De manera que, el uso de plantas medicinales con actividad hipoglucemiante y antioxidante puede retardar o prevenir la oxidación de moléculas y además estabilizar los radicales libres.^{29,56}

2.4.1 Neuropatía diabética

La neuropatía diabética es una de las complicaciones crónicas más comunes en las personas con diabetes, siendo este un trastorno neurodegenerativo. Esta condición puede afectar el Sistema Nervioso Central, Periférico y Autónomo, pero mayormente afecta el Sistema

Nervioso Periférico, siendo también el factor inicial de otras complicaciones como ulceraciones en la piel y amputación de extremidades.⁶⁰⁻⁶²

Algunas de las neuropatías que se pueden presentar son plexopatías, radiculopatías, cardiopatías y gastropatías; dentro de estas las más estudiadas son las asociadas al Sistema Cardiovascular. Es importante identificar si las neuropatías se deben o se asocian a la diabetes en las personas que padecen la enfermedad, a pesar de que es complicado, esto debido a que se deben excluir otros factores como los hereditarios o procesos inflamatorios asociados a otras causas o enfermedades.^{60,63}

Cerca del 50% de las personas que padecen de diabetes presentan neuropatías, la más común es la polineuropatía simétrica distal, que se manifiesta en manos y extremidades inferiores, presentándose pérdida de la función sensorial, dolor y morbilidad, como consecuencia aumentan las caídas, provocando que aumente el dolor y disminuya la calidad de vida de los pacientes con este padecimiento.⁶²

La neuropatía diabética dolorosa (PDN, por sus siglas en inglés) no se presenta en todos los pacientes con neuropatías diabéticas, esto debido a que pueden darse casos asintomáticos, del 30-50% de los pacientes con neuropatía diabética desarrollan dolor neuropático, relacionado a hiperalgesia y alodinia graves.⁶²⁻⁶⁵

La alodinia se describe como un dolor espontáneo o producido por estímulos no nociceptivos mecánicos o térmicos y la hiperalgesia es producida por el movimiento o la presión de las articulaciones produciendo una respuesta incrementada a estímulos normalmente dolorosos, siendo estas una complicación grave que se manifiesta comúnmente en los pacientes con diabetes que desarrollan PDN, resultando en dolor devastador e inclusive incapacitante.^{65,66}

Existen varios factores metabólicos asociados con presentar PDN, como en muchos de los factores de riesgo asociados al dolor, el sexo femenino es uno de ellos, también se encuentran factores metabólicos como control glucémico deficiente, función renal alterada e índice de masa corporal alto.⁶²⁻⁶⁴

Las características o síntomas más comunes en las PDN son: sensación de hormigueo, entumecimiento, ardor, dolor punzante insoportable e incluso en algunas ocasiones

intratable, dolor de pies y manos; afecta con mayor frecuencia a las partes más distales de las extremidades por lo que es común la pérdida sensorial.⁶²⁻⁶⁴

Para pacientes con diabetes tipo I el control de los niveles de glucosa detiene la progresión de la neuropatía diabética, pero este fenómeno no se da de forma efectiva en los pacientes que padecen diabetes tipo II, por lo que los enfoques para prevenir y tratar este trastorno son distintos para cada tipo de diabetes.⁶²

2.5 Productos finales de glicación (AGE's)

La prolongación de la hiperglucemia, como se presenta en los pacientes con diabetes, es el factor que causa la mayoría de las complicaciones de la enfermedad, uno de los cambios irreversibles más importantes que se producen en el cuerpo humano, al presentar hiperglucemia prolongada, es la formación de los productos finales de glicación avanzada (AGE's); estos tienen una variedad de efectos químicos, celulares y tisulares, y actúan como mediadores de las complicaciones diabéticas y de los cambios asociados con el envejecimiento, debido a que alteran la estructura y función de las moléculas en los sistemas biológicos y aumentan el estrés oxidativo.⁶⁷

El término glicación se utiliza para referirse a la unión no enzimática de un azúcar a otra biomolécula; los AGE (Advanced Glycation End Products) por sus siglas en inglés, son compuestos que se derivan de la glicación y oxidación no enzimática de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en un proceso conocido como reacción de Maillard. En la formación de AGE's (Figura 10) inicialmente se da una reacción entre el grupo carbonilo de un azúcar reductor (como glucosa, fructosa, galactosa y manosa) y el grupo amino libre de una proteína, lípido o ácido nucleico (mayoritariamente en residuos de lisina o arginina) que forman una Base de Schiff inestable, esta reacción depende de la concentración de glucosa, es reversible y ocurre en pocas horas; el siguiente paso puede tardar varias semanas y es la formación de un compuesto Amadori que es más estable y la reacción es parcialmente reversible. Si las reacciones continúan y la hiperglicemia es persistente, al pasar semanas e incluso meses se da la acumulación de compuestos Amadori y estos sufren otras reacciones irreversibles como oxidación, deshidratación y degradación, parte de estos productos Amadori sufren una desglicosilación y forman los dicarbonilos oxidantes glioxal y 3-deoxiglucosona que son potentes oxidantes, capaces de catalizar nuevas reacciones de unión de glucosa a proteína, en

esta fase se da reacciones de glico-oxidación proteica formando productos unidos a una sola proteína incapaces de formar puentes entre ellos como pirralina y *N*-carboximetil-lisina. Por último, se da la unión de la pirralina y de la *N*-carboximetil-lisina con una segunda proteína y forman estructuras conocidas como puentes DOLD y GOLD, los AGE's que son compuestos muy estables y que alteran irreversiblemente la estructura ternaria y cuaternaria de las proteínas.⁶⁸⁻⁷¹

Los AGE's se producen de manera endógena por estrés oxidativo o por hiperglucemia, y no solo a partir de glucosa, también se producen a partir de compuestos dicarbonilo producidos a partir de la autooxidación y los productos de degradación de la glucosa, como el glioxal, el metilglioxal y la 3-desoxiglucosona, o α -hidroxialdehídos como el gliceraldehído y el glicolaldehído. En el caso de la hiperglucemia crónica, los AGE se producen activamente y se acumulan en la sangre circulante y en diversos tejidos, provocando complicaciones vasculares en la diabetes.⁷²

En las personas con diabetes, el aumento de los niveles de glucosa en sangre conduce a la glicación de gran cantidad de proteínas estructurales y funcionales para producir AGE's que resultan en la alteración o pérdida de la función de la proteína e interactúan con su receptor específico (RAGE), para modificar la expresión génica, la señalización intracelular y promover la liberación de moléculas proinflamatorias y radicales libres.⁶²

2.5.1 Receptores de AGE's (RAGE)

Los RAGE son moléculas de superficie celular de tipo inmunoglobulina, que son capaces de reconocer una gran variedad de estructuras químicas y son expresados en gran cantidad de tipos celulares que se encuentran en la región extracelular. Los RAGE son receptores multiligando, por lo que actúan como receptores de diversos ligandos liberados por células estresadas, dañadas e inflamadas. En condiciones normales de salud la expresión de RAGE's es baja, pero la expresión de estos aumenta en condiciones de inflamación crónica como enfermedades intestinales, artritis reumatoide, aterosclerosis, Alzheimer y complicaciones asociadas a la diabetes, este incremento en la expresión se relaciona con el alto nivel de AGE's.^{62,70}

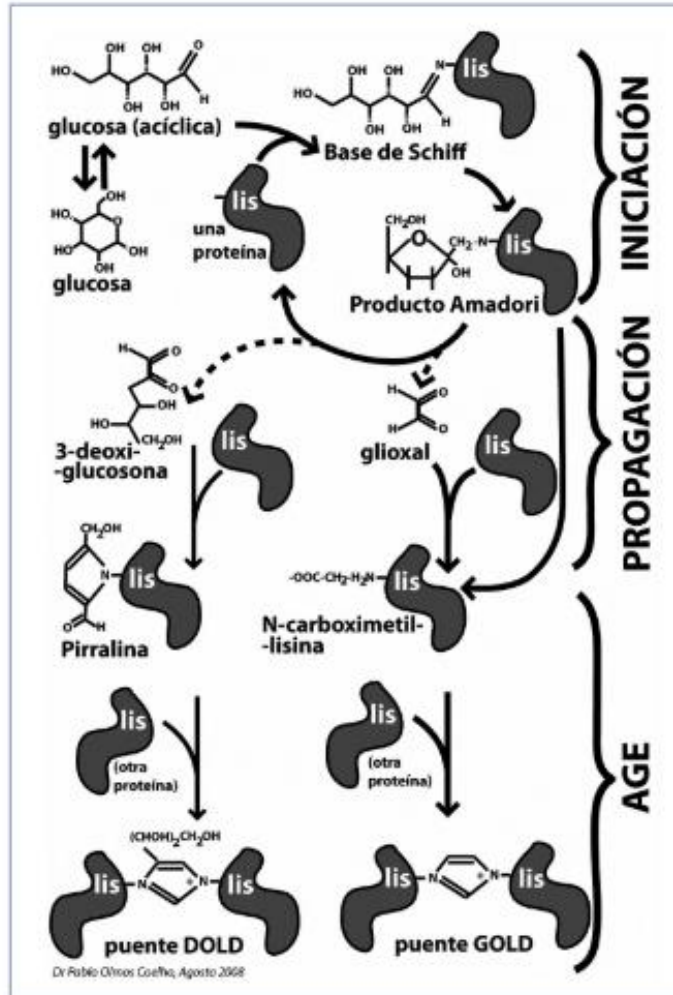


Figura 10. Formación de AGE's (Advanced Glycation End Products)⁷⁰

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto hipoglicemiante, antialodínico y la composición fitoquímica del extracto obtenido de las cuatro especies de plantas: *Justicia spicigera*, *Justicia secunda* y dos variedades de *Momordica charantia*, utilizadas en la medicina tradicional como tratamiento coadyuvante para la diabetes.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la naturaleza química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólicos de las plantas *Justicia spicigera*, *Justicia secunda* y dos variedades de *Momordica charantia*.
2. Comprobar la actividad hipoglicemiante de los extractos hidroalcohólicos de manera *in vitro* mediante bioensayos de glicación avanzada asociados a diabetes tipo II y de manera *in vivo* mediante ensayos para diabetes tipo II.
3. Evaluar la actividad antialodínica de los extractos hidroalcohólicos de manera *in vivo* mediante ensayos de efecto analgésico en ratas con neuropatía diabética.

4. Metodología

4.1 Recolección y autenticación de la materia vegetal

Se recolectaron aproximadamente 3 kg de material vegetal de cada especie a utilizar, hojas frescas de *J. spicigera* y *J. secunda*, hojas frescas y frutos de *M. charantia* (sorosí) y frutos de *M. charantia* (bitter melón). Las plantas fueron identificadas por botánicos que laboran en el Herbario Juvenal Valerio de la Universidad Nacional que colaboraron con el proyecto, testigos biológicos fueron preservados en la colección del herbario para su posterior consulta.

4.2 Preparación del extracto

Las hojas recolectadas se secaron a 60°C por 48 horas, luego se molieron y tamizaron utilizando un molino. Al material molido se le realizaron extracciones utilizando 600 g de material vegetal y etanol al 80% como disolvente, en proporciones de 1:10 (p/v) de materia vegetal: disolvente, la mezcla materia vegetal/etanol se agitó durante al menos 8 horas a 200

rpm y posteriormente se filtró al vacío. Luego, se realizó una segunda extracción con el residuo vegetal utilizando una relación 1:5 de materia vegetal: disolvente, la mezcla obtenida nuevamente se agitó para su posterior filtración. Los dos extractos se combinaron y se secaron al vacío utilizando un rotavapor, posteriormente se almacenaron a 20 °C en la oscuridad.⁷³

4.3 Caracterización fitoquímica

Se utilizó cromatografía de capa fina del alto rendimiento (HPTLC) para la identificación de la naturaleza química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos. Esta técnica y las derivatizaciones se realizaron acorde con los protocolos elaborados por el Dr. Gabriel Zamora del Programa de Microbiología y Química Medicinal del CINAT (Apéndice B).

4.4 Actividad inhibitoria sobre la formación de AGE's

Se utilizaron distintos rangos de concentración para cada extracto y un control positivo, que se colocaron en un sistema de microplacas Biotek Synergy HT, luego se agregó a cada pocillo de la microplaca una cantidad específica de glucosa, azida de sodio como catalizador y albúmina como sustrato para la formación de AGE's. Posteriormente, se disolvió todo en buffer de fosfato pH 7.4 hasta alcanzar un volumen de 100 µL en cada pocillo. Los blancos fueron preparados de la misma manera a excepción de la adición de albúmina.

Las microplacas fueron incubadas por 24 horas a una temperatura de aproximadamente 37 °C, finalizado el tiempo se realizó la medición de la fluorescencia a una longitud de excitación de 370 nm y de emisión de 410 nm en el lector de microplacas Biotek Synergy HT. El protocolo utilizado se encuentra en el Apéndice D.⁷⁴

4.5 Actividad hipoglucemiante mediante ensayos *in vivo* (Apéndice A).

4.5.1 Animales de experimentación

Se emplearon ratas Wistar de 6-7 semanas y con un peso corporal de 160 g a 250 g. Se siguieron los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales para laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), las guías o los estándares de ética para la experimentación de dolor en animales Zimmermann, 1983 y las Guías del Consejo Nacional

para el Uso y Cuidados de Animales de Experimentación de Estados Unidos y Canadá. Además, el protocolo se aprobó por el Comité de Bioética para la Investigación de Animales de Laboratorio del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada). Los animales se distribuyeron en grupos de 4-5, los cuales fueron almacenados en el equipo de mantenimiento optirat, el cual cuenta con todas las condiciones de control como son: 1) temperatura de $24^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 2) ciclo de luz-oscuridad 12h:12h, 3) humedad relativa de $50 \pm 15\%$ y 4) alimento y agua *ad libitum*.

4.5.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante de los extractos en ratas con diabetes inducida

Para la evaluación del efecto hipoglucemiante de los extractos de las plantas *J. spicigera*, *J. secunda* y las dos variedades de *M. charantia*, se empleó el modelo de neuropatía inducida por diabetes experimental. Para ello, se inyectó una dosis de 50 mg/kg de estreptozotocina (STZ, Research Biochemical International, USA) por vía intraperitoneal.⁷⁵ La diabetes se confirmó una semana después mediante la lectura de los niveles de azúcar en sangre, la cual se tomó de la vena de la cola de la rata, utilizando un glucómetro Ascensia ELITE (Bayer, Ciudad de México). La lectura realizó antes de la administración de STZ y cada tercer día posteriores a la administración, durante 2 semanas a 6 semanas, tiempo en el que se desarrolla la alodinia (neuropatía diabética). El efecto hipoglicemiante de los extractos se determinó en ratas con valores de glucosa sanguínea mayores a 270 mg/dL. Una vez confirmada la diabetes, se administraron por vía oral, 3 dosis diferentes de cada extracto. Los niveles de glucosa se determinaron antes y a los 30, 60, 90, 120 y 150 min posteriores a la administración de los extractos alcohólicos.

4.5.3 Evaluación del efecto antialodínico (analgésico) de los extractos en ratas con diabetes inducida

De 6 semanas a 10 semanas posteriores a la administración de STZ, se evaluó el desarrollo de la alodinia. El efecto antialodínico o analgésico se determinó con el método de “up and down” utilizando diversos filamentos de vonFrey de diferentes calibres (UgoBasil). Para ello, las ratas se ponen en cajas de plástico, sobre una malla metálica de acero inoxidable en el fondo para permitir su aclimatización por al menos 30 minutos antes de realizar los experimentos. La prueba de umbral táctil se basa en inducir el retiro de las patas traseras del

animal a estímulos mecánicos ligeros, para lo cual se utilizaron filamentos de von Frey con un rango de 2.36 g a 6.65 g (Stoelting, Wood Dale, IL) para determinar el 50% de umbral de retiro utilizando el método de arriba-abajo descrito por Dixon en 1980.⁷⁶ Se comenzó con el filamento que produzca una fuerza intermedia (3.41 g) y se aplicó una presión constante, haciendo que el filamento genere una forma de u sobre la superficie plantar de la pata de la rata, por 10 segundos, si el animal retiraba la pata (umbral de retiro) se tomó como una respuesta positiva y se tomó un filamento de menor calibre o fuerza, de lo contrario, se tomó como una respuesta negativa y se tomó el filamento que ejerza una mayor fuerza, hasta obtener una respuesta positiva. Una vez que hubo un cambio en la respuesta, ya sea positiva o negativa, se tomaron 4 estímulos más, para tener en total una serie de 6 patrones de respuestas positivas y negativas. Estos datos fueron tabulados y se calculó el 50 % de umbral de respuesta (g).

Para la evaluación del efecto antialodínico (analgésico) de los extractos etanólicos, se van a administrar las mismas dosis que se utilizaron para la evaluación de la hiperglicemia. El umbral de retiro se evaluó al tiempo 0 minutos y cada 30 minutos posteriores a la administración, hasta observar que el efecto analgésico desapareció por completo, con la finalidad de establecer bien el curso temporal y calcular el Área Bajo la Curva de cada dosis para establecer gráficos de dosis-respuesta.

4.5.4 Análisis de datos

Para los datos del efecto hipoglucemiante, se obtuvo el promedio \pm el error estándar de cada grupo administrado de 4 animales y se analizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey para observar diferencias entre tratamientos.

Para los datos del efecto antialodínico, los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar de cada grupo experimental de 4 animales. De los datos obtenidos se realizaron gráficas del 50 % de umbral de retiro (g) en función del tiempo (min).

$$50 \% \text{ Umbral de retiro (g)} = (10[X_f + K\delta])/10\ 000$$

Donde: X_f : es el valor del último filamento de von Frey utilizado (unidades log)

K : es el factor de corrección basado en valor tabulado de respuestas positivas y negativas

δ : es la diferencia de promedio entre estímulos (unidades log).

De los datos del 50 % del umbral de retiro, se construyen gráficas de barras y curvas dosis respuesta del % antialodínico representado como el porcentaje del máximo efecto posible (%MEP), utilizando la siguiente fórmula.

$$\%MEP = [(ABC \text{ fármaco} - ABC \text{ salina}) / (ABC \text{ sham} - ABC \text{ salina})] \times 100$$

4.5.5 Grupos experimentales

Grupo 1: Administración del vehículo (este se determinó dependiendo del disolvente en el cual están los extractos, en este caso agua). Este se tomó como control negativo

Grupo 2: Administración de Glibenclamida u otro fármaco con actividad hipoglucemiante conocida. Este se utilizó solo como control positivo en la evaluación del efecto hipoglucemiante de los extractos.

Grupo 3: Administración de Gabapentina (como control de fármaco con actividad antialodínica). Este se utilizó solo en la evaluación del efecto antialodínico de los extractos

Grupo 4: Administración de dosis 1 (10 mg/kg) del extracto 1 (Justicia secunda)

Grupo 5: Administración de dosis 2 (100 mg/kg) del extracto 1 (Justicia secunda)

Grupo 6: Administración de dosis 3 (1000 mg/kg) del extracto 1 (Justicia secunda)

Grupo 7: Administración de dosis 1 (10 mg/kg) del extracto 2 (Justicia spicigera)

Grupo 8: Administración de dosis 2 (100 mg/kg) del extracto 2 (Justicia spicigera)

Grupo 9: Administración de dosis 3 (1000 mg/kg) del extracto 2 (Justicia spicigera)

Grupo 10: Administración de dosis 1 (10 mg/kg) del extracto 3 (Sorosí, M. charantia)

Grupo 11: Administración de dosis 2 (100 mg/kg) del extracto 3 (Sorosí, M. charantia)

Grupo 12: Administración de dosis 3 (1000 mg/kg) del extracto 3 (Sorosí, M. charatia)

Grupo 13: Administración de dosis 1 (10 mg/kg) del extracto 4 (Bitter melón, M. charantia)

Grupo 14: Administración de dosis 2 (100 mg/kg) del extracto 4 (Bitter melón, M. charantia)

Grupo 15: Administración de dosis 3 (1000 mg/kg) del extracto 4 (Bitter melón, M. charantia)

Nota: Le evaluación del efecto hipoglucemiante y antialodínico se realizó en el Laboratorio del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada), localizado en México, realizando una pasantía.

5. Resultados y discusión

5.1 Caracterización fitoquímica

Utilizando el protocolo descrito en el Apéndice B, se obtuvieron una serie de cromatogramas para cada una de las derivatizaciones realizadas (Apéndice C), a partir de estos se realizó el “chemical fingerprint” de cada planta mediante una imagen comparativa donde se muestra el track con mejores resultados para cada planta, esto con cada una de las derivatizaciones, y a partir de esta imagen se realizó el análisis para determinar la naturaleza química de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de cada planta.

5.1.1 “Chemical fingerprint” *J. spicigera*

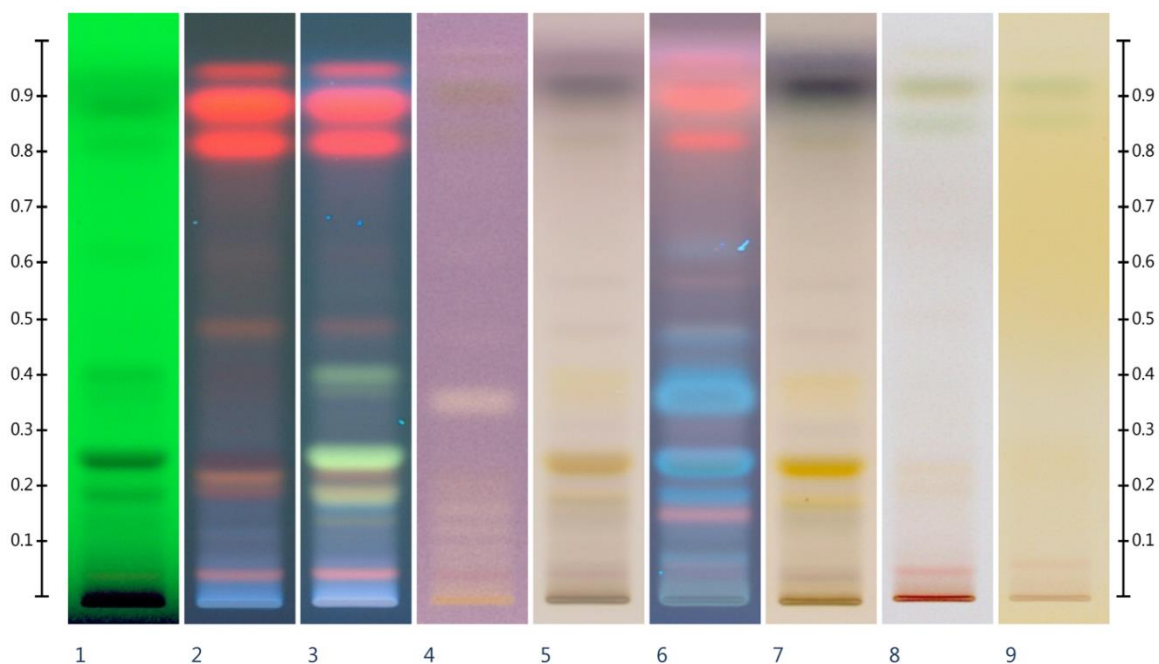


Figura 11. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas y derivatizaciones de extracto de *Justicia spicigera*. (1) exposición a ultravioleta a 254 nm, (2) exposición a ultravioleta a 366 nm, (3) reactivo de productos naturales (366 nm), (4) DPPH (luz visible), (5) reactivo de anisaldehído (luz visible), (6) reactivo de anisaldehído (366 nm), (7) reactivo de vainillina (luz visible), (8) fast blue salt B (luz visible), (9) reactivo de Dragendorff (luz visible).

Como se menciona en el protocolo descrito en el Apéndice B, la determinación de las familias químicas presentes en los extractos se realizó mediante la comparación de los resultados de

las derivatizaciones con literatura especializada, y a partir de esto se puede interpretar lo observado en la Figura 11 de la siguiente manera:

Tercio inferior (Rf 0 – 0.3)

Sobresalen bandas de tonos azules (Rf 0.16), rojos (Rf 0.22) y naranjas (Rf 0.20) al exponerse a 366 nm. Dichas bandas se repiten en la derivatización con el reactivo de productos naturales; se incluyen dos bandas de tono amarillo (Rf 0.19 y Rf 0.25 respectivamente). Lo anterior es presuntivo de compuestos fenólicos y en particular el tono azul lo es de flavononas, el naranja de flavonas y el amarillo de flavonas y flavononas. Todas las bandas descritas reportan un tono amarillo en el reactivo de anisaldehído y vainillina, lo cual es presuntivo de flavonas y flavonoles.

Tercio medio (Rf 0.3 – 0.6)

Sobresalen bandas de tonos verde (Rf 0.41) y naranja (Rf 0.49) en la derivatización con el reactivo de productos naturales. Lo anterior es presuntivo de compuestos fenólicos y en particular el tono verde lo es de flavonoles y el naranja es presuntivo de flavonas y flavonoles. Todas las bandas descritas reportan un tono amarillo en el reactivo de anisaldehído y vainillina, lo cual es presuntivo de flavonas y flavonoles.

Tercio superior (Rf 0.6 – 1.0)

Sobresalen bandas rojizas intensas típicas de residuos de clorofila (Rf 0.83 en adelante). Dichos residuos, es común que se ubiquen en esta área del cromatograma al emplearse la fase móvil descrita.

Otros resultados

Una banda con una reacción con el reactivo de Dragendorff (Rf 0.05), no es presuntiva de alcaloides dado que dicho constituyente tiene una reacción con el reactivo de productos naturales (tono rojizo) y una reacción de tono amarillo con el reactivo de anisaldehído y vainillina. Dichos resultados son presuntivos de flavonas. Este es un claro ejemplo de una reacción falsa positiva con el reactivo de Dragendorff; similar a la reportada por Anderson et al (1977) y Habib (1980).

Hay un constituyente con una reacción positiva con el DPPH (Rf 0.35).

5.1.2 “Chemical fingerprint” *J. secunda*

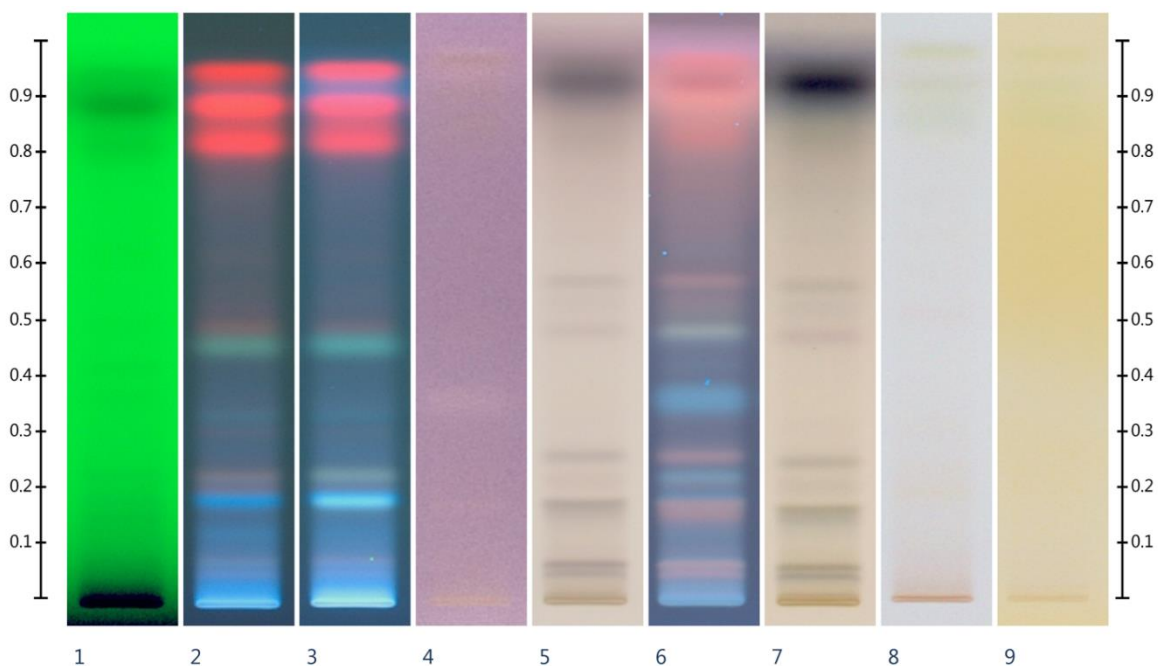


Figura 12. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas y derivatizaciones de extracto de *Justicia secunda*. (1) exposición a ultravioleta a 254 nm, (2) exposición a ultravioleta a 366 nm, (3) reactivo de productos naturales (366 nm), (4) DPPH (luz visible), (5) reactivo de anisaldehído (luz visible), (6) reactivo de anisaldehído (366 nm), (7) reactivo de vainillina (luz visible), (8) fast blue salt B (luz visible), (9) reactivo de Dragendorff (luz visible).

Como se menciona en el protocolo descrito en el Apéndice B, la determinación de las familias químicas presentes en los extractos se realizó mediante la comparación de los resultados de las derivatizaciones con literatura especializada, y a partir de esto se puede interpretar lo observado en la Figura 12 de la siguiente manera:

Tercio inferior (Rf 0 – 0.3)

Sobresalen bandas de tonos rojos (Rf 0.07) y azules (Rf 0.18) al exponerse a 366 nm. Dichas bandas se repiten en la derivatización con el reactivo de productos naturales; se incluye una banda de tono amarillo (Rf 0.22). Lo anterior es presuntivo de compuestos fenólicos y en particular el tono azul lo es de flavononas.

Tercio medio (Rf 0.3 – 0.6)

Sobresalen bandas de tonos rojo (Rf 0.49) y verde (Rf 0.46) al exponerse a 366 nm. Dichas bandas se repiten en la derivatización con el reactivo de productos naturales. Lo anterior es presuntivo de compuestos fenólicos y en particular el tono verde lo es de flavonoles.

Tercio superior (Rf 0.6 – 1.0)

Sobresalen bandas rojizas intensas típicas de residuos de clorofila (Rf 0.83 en adelante). Dichos residuos, es común que se ubiquen en esta área del cromatograma al emplearse la fase móvil descrita.

Otros resultados

Se reporta ausencia de alcaloides acorde a la reacción con el reactivo de Dragendorff.

No hay reacción con el DPPH.

5.1.3 “Chemical fingerprint” *M. charantia* (Sorosí)

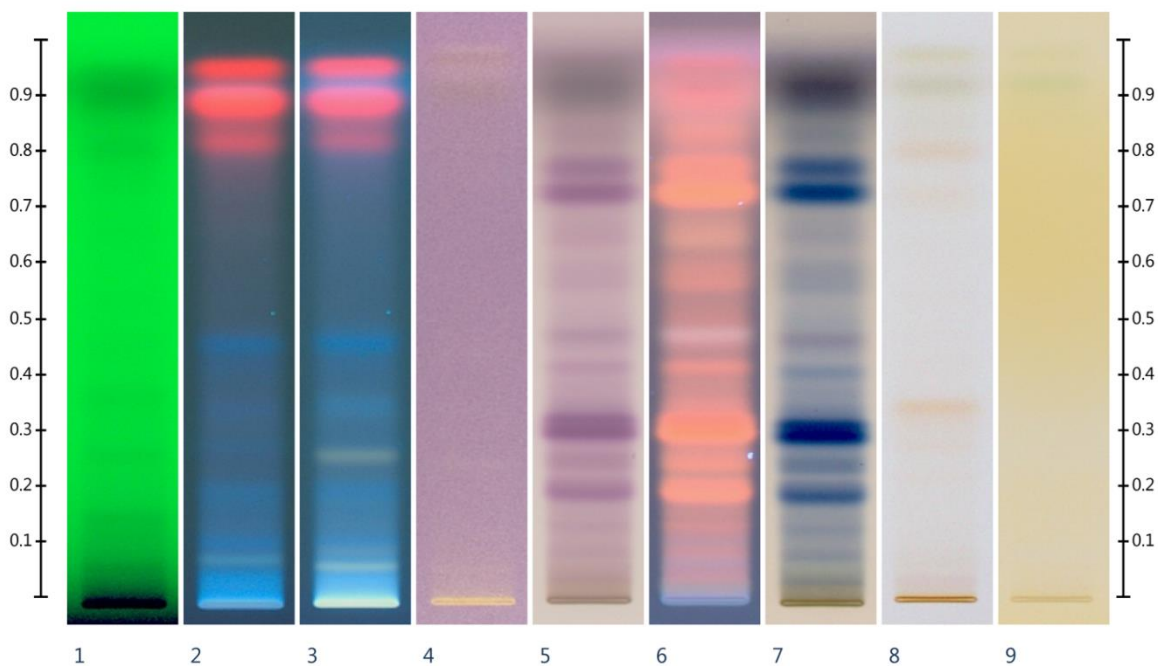


Figura 13. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas y derivatizaciones de extracto de *Momordica charantia* (variedad Sorosí). (1) exposición a ultravioleta a 254 nm, (2) exposición a ultravioleta a 366 nm, (3) reactivo de productos naturales (366 nm), (4) DPPH (luz visible), (5) reactivo de anisaldehído (luz visible), (6) reactivo de anisaldehído (366 nm), (7) reactivo de vainillina (luz visible), (8) fast blue salt B (luz visible), (9) reactivo de Dragendorff (luz visible).

Como se menciona en el protocolo descrito en el Apéndice B, la determinación de las familias químicas presentes en los extractos se realizó mediante la comparación de los resultados de las derivatizaciones con literatura especializada, y a partir de esto se puede interpretar lo observado en la Figura 13 de la siguiente manera:

Tercio inferior (Rf 0 – 0.3)

Sobresalen bandas de tonos azules al exponerse a 366 nm. Dichas bandas se repiten en la derivatización con el reactivo de productos naturales; se incluyen dos bandas de tono amarillo (Rf 0.07 y Rf 0.26). Lo anterior es presuntivo de compuestos fenólicos y en particular el tono azul lo es de flavononas y el amarillo de flavonas y flavononas. Se reportan bandas con un tono morado en la derivatización con el reactivo de anisaldehído (derivados de terpenos y esteroideos) y un tono azul en la derivatización con el reactivo de vainillina, lo cual es presuntivo de derivados de terpenos.

Tercio medio (Rf 0.3 – 0.6)

Sobresalen bandas de tonos azules al exponerse a 366 nm. Dichas bandas se repiten en la derivatización con el reactivo de productos naturales. Lo anterior es presuntivo de compuestos fenólicos y en particular el tono azul lo es de flavononas. Se reportan bandas con un tono morado en la derivatización con el reactivo de anisaldehído (derivados de terpenos y esteroides) y un tono azul en la derivatización con el reactivo de vainillina, lo cual es presuntivo de derivados de terpenos.

Se reporta una banda naranja (Rf 0.34) en la derivatización con el fast blue salt B, lo cual es presuntivo de compuestos fenólicos y taninos.

Tercio superior (Rf 0.6 – 1.0)

Se reportan bandas con un tono morado en la derivatización con el reactivo de anisaldehído (derivados de terpenos y esteroideos) y un tono azul en la derivatización con el reactivo de vainillina, lo cual es presuntivo de derivados de terpenos.

Se reportan dos bandas naranjas (Rf 0.72 y Rf 0.80 respectivamente) en la derivatización con el fast blue salt B, lo cual es presuntivo de compuestos fenólicos y taninos.

Sobresalen bandas rojizas intensas típicas de residuos de clorofila (Rf 0.83 en adelante). Dichos residuos, es común que se ubiquen en esta área del cromatograma al emplearse la fase móvil descrita.

Otros resultados

No se presenta reacción con el reactivo de con el DPPH ni con el reactivo de Dragendorff.

5.1.4 “Chemical fingerprint” *M. charantia* (Bitter melon)

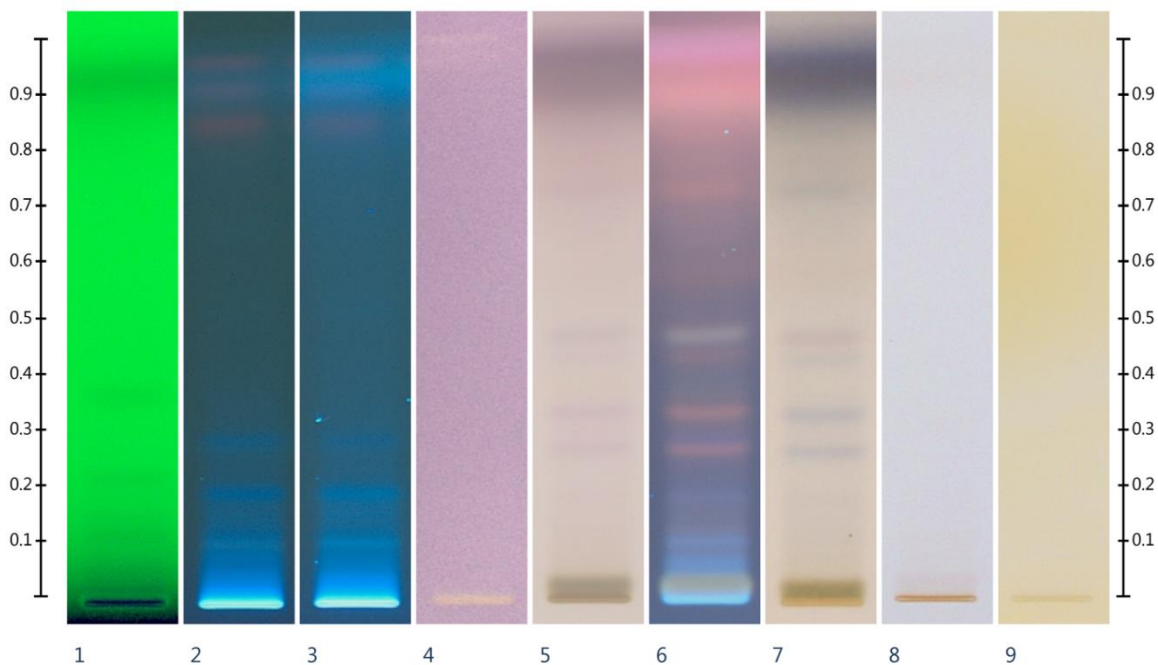


Figura 14. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas y derivatizaciones de extracto de *Momordica charantia* (variedad Bitter Melon). (1) exposición a ultravioleta a 254 nm, (2) exposición a ultravioleta a 366 nm, (3) reactivo de productos naturales (366 nm), (4) DPPH (luz visible), (5) reactivo de anisaldehído (luz visible), (6) reactivo de anisaldehído (366 nm), (7) reactivo de vainillina (luz visible), (8) fast blue salt B (luz visible), (9) reactivo de Dragendorff (luz visible).

Como se menciona en el protocolo descrito en el Apéndice B, la determinación de las familias químicas presentes en los extractos se realizó mediante la comparación de los resultados de las derivatizaciones con literatura especializada, y a partir de esto se puede interpretar lo observado en la Figura 14 de la siguiente manera:

Tercio inferior (Rf 0 – 0.3)

Sobresalen bandas de tonos azules al exponerse a 366 nm. Dichas bandas se repiten en la derivatización con el reactivo de productos naturales. Lo anterior es presuntivo de compuestos fenólicos y en particular el tono azul lo es de flavononas. Se reportan bandas con

un tono morado en la derivatización con el reactivo de anisaldehído (derivados de terpenos y esteroides) y un tono azul en la derivatización con el reactivo de vainillina, lo cual es presuntivo de derivados de terpenos.

Tercio medio (Rf 0.3 – 0.6)

Debido a la poca concentración del extracto, las bandas son muy escasas y delgadas para poder interpretarlas.

Tercio superior (Rf 0.6 – 1.0)

Debido a la poca concentración del extracto, las bandas son muy escasas y delgadas para poder interpretarlas.

Otros resultados

No se presenta reacción con el reactivo de con el DPPH ni con el reactivo de Dragendorff.

5.1.5 Comparación entre los extractos de *J. spicigera*, *J. secunda* y *M. charantia* (Sorosí y Bitter melon)

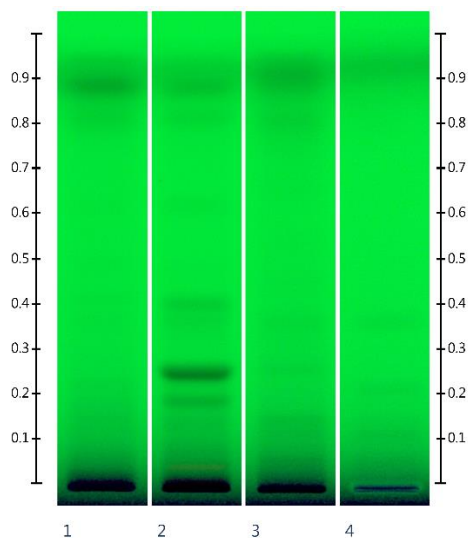


Figura 15. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) *J. secunda*, (2) *J. spicigera* y *M. charantia* (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Exposición a luz ultravioleta a 254 nm.

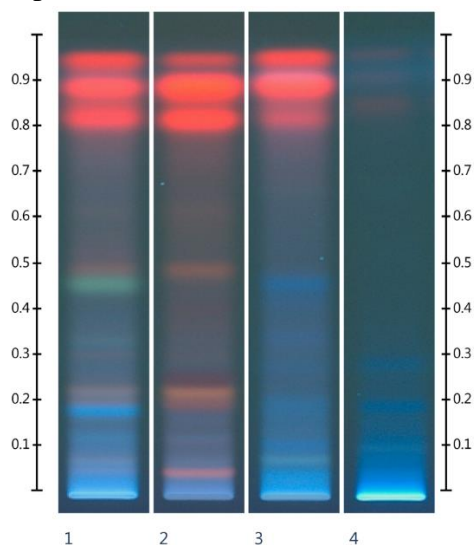


Figura 16. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) *J. secunda*, (2) *J. spicigera* y *M. charantia* (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Exposición a luz ultravioleta a 366 nm.

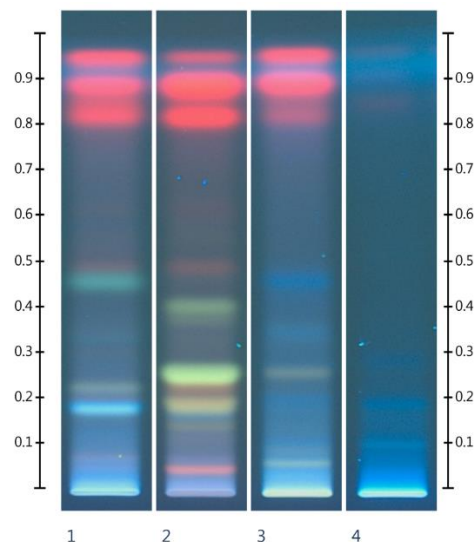


Figura 17. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) *J. secunda*, (2) *J. spicigera* y *M. charantia* (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización con reactivo de productos naturales (366 nm).

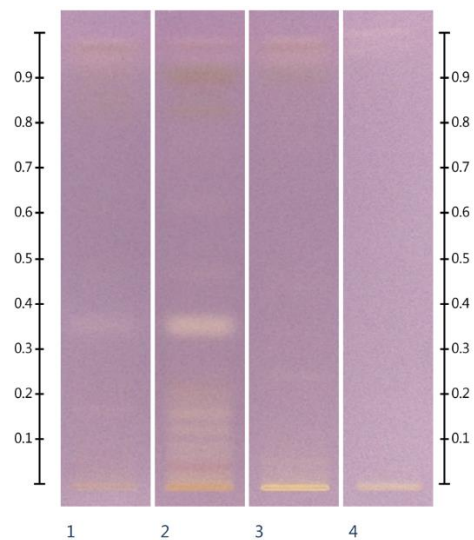


Figura 18. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) *J. secunda*, (2) *J. spicigera* y *M. charantia* (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización con DPPH (luz visible).

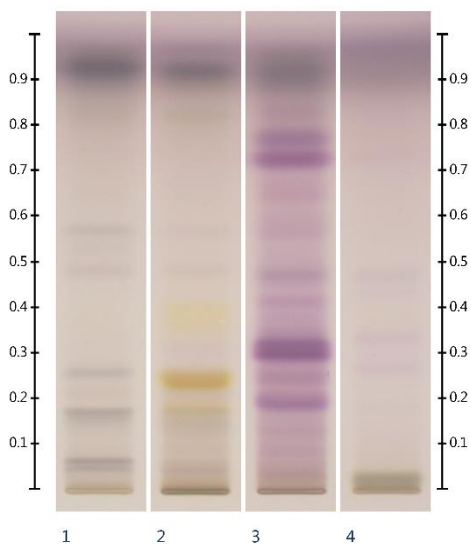


Figura 19. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) *J. secunda*, (2) *J. spicigera* y *M. charantia* (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de anisaldehído (luz visible).

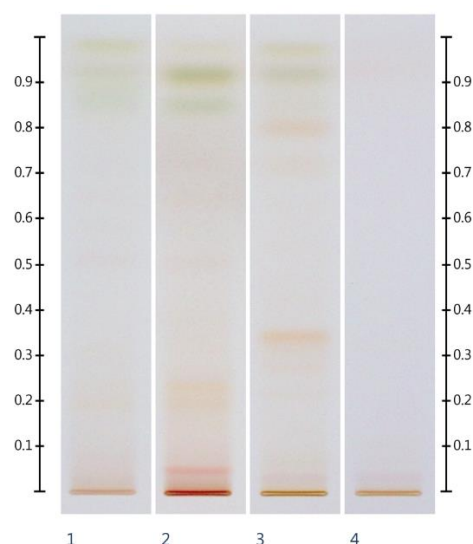


Figura 21. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) *J. secunda*, (2) *J. spicigera* y *M. charantia* (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización fast blue salt B (luz visible).

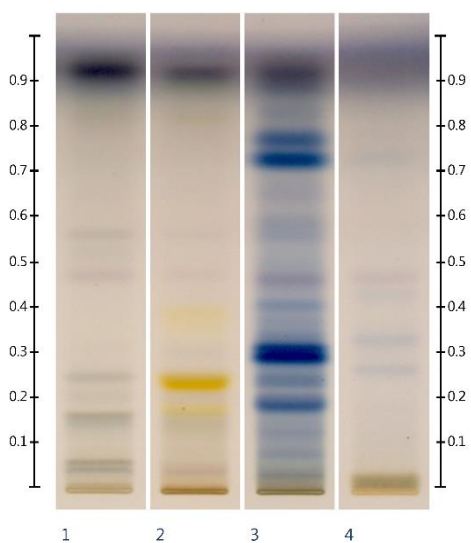


Figura 20. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) *J. secunda*, (2) *J. spicigera* y *M. charantia* (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de vainillina (luz visible).

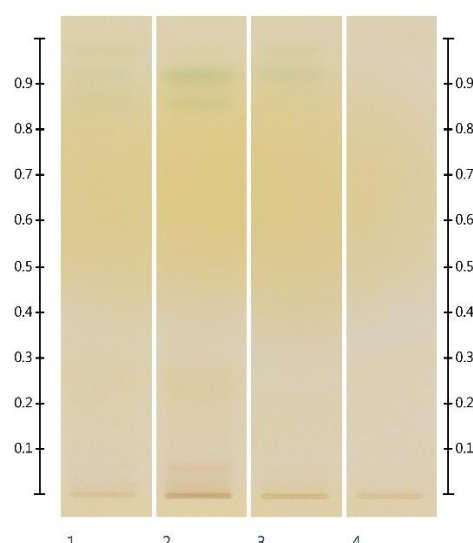


Figura 22. Vista comparativa de imágenes para cromatogramas de extractos de (1) *J. secunda*, (2) *J. spicigera* y *M. charantia* (variedad (3) Sorosí y (4) Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de Dragendorff (luz visible).

De acuerdo con las figuras comparativas presentadas anteriormente y mediante la comparación de los resultados de las derivatizaciones con literatura especializada, como se menciona en el protocolo del Apéndice B, se logran interpretar lo siguiente:

Los extractos de *Justicia secunda*, *Justicia spicigera* y *Momordica charantia* (variedad Sorosí y Bitter Melon) presentan perfiles muy diferentes en cuanto a su composición en compuestos fenólicos (ver Figura 17). Solamente el extracto de *Justicia spicigera* presenta un constituyente (Rf 0.35) que inhibe el DPPH (ver figura 18). Lo cual, implica que dicho constituyente podría emplearse como un marcador de identidad entre estos extractos.

Los resultados para las derivatizaciones con los reactivos de anisaldehído y vainillina (Figuras 19 y 20 respectivamente) indican que los extractos exhiben composiciones muy diferentes en cuanto a compuestos fenólicos y posibles terpenos.

El resultado obtenido con la derivatización de fast blue salt B (figura 21) demuestra que la variedad Sorosí de *M. charantia*, presenta un constituyente color naranja (Rf 0.34) sólo visible en este extracto. De la misma manera, *J. spicigera* presenta 2 constituyentes color naranja solamente visibles en estos extractos (Rf 0.20 y Rf 0.23 respectivamente).

Se reporta ausencia de alcaloides (ver figura 22) en todos los extractos estudiados.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, la *J. spicigera* presenta compuestos fenólicos y se le atribuyen sus propiedades hipoglucemiantes a un flavonoide llamado kaempferitrina, lo cual concuerda con la caracterización realizada al extracto, por lo que se podría indicar que el extracto alcohólico si presenta este tipo de metabolitos secundarios, pero faltarían estudios para confirmar si es el mismo compuesto activo.

En el caso de la *J. secunda*, se reporta en la literatura que el compuesto al que se le atribuyen las propiedades hipoglucemiantes de la planta es un triterpeno, llamado taraxerol, de acuerdo con la caracterización fitoquímica realizada, el extracto alcohólico no presenta este tipo de compuestos, por lo que se puede indicar que los triterpenos de la planta pueden estar presentes en otro tipo de extracto, como por ejemplo uno realizado con compuestos de menor polaridad.

La *M. charantia*, es reportada en la literatura como una única especie, a la cual se le atribuyen las propiedades hipoglucemiantes por varios metabolitos secundarios, los más mencionados

son un triterpeno tetracíclico llamado momordicin y un glucósido esteroideal llamado charantin, de acuerdo a la caracterización fitoquímica realizada para ambas variedades, Sorosi y Bitter melon, ambos presentan terpenos y compuestos esteroideos, por lo que esto podría coincidir con los compuestos reportados, mencionados anteriormente, de igual manera, serían necesarios más estudios para determinar si es el mismo compuesto.

5.2 Actividad inhibitoria sobre la formación de AGE's

Se desarrolló en el Laboratorio de Desarrollo de Tecnología Química de la Universidad Nacional, mediante un método de análisis de actividad antidiabética, el cual se basa en la detección de productos avanzados de glicación (AGE's por sus siglas en inglés). Se analizaron los extractos de las cuatro plantas, con el fin de identificar su potencial antidiabético al disminuir la concentración de AGE's en un sistema de microplacas Biotek Synergy HT.

Para estas pruebas se utilizó el protocolo descrito en el Apéndice D, basado en el descrito por Derbré et al (2010), optimizándolo para adaptarlo a los extractos a analizar. En las cuales para cada extracto se realizaron 6 diluciones en etanol al 70%, ya que en experimentos anteriores se determinó como disolvente orgánico que no compromete los resultados de la lectura de actividad fluorescente de los AGE's, y disoluciones en medio acuoso de aminoguanidina a distintas concentraciones como control positivo.

Los resultados obtenidos se basan en datos de IC50 con su respectiva gráfica, las cuales se obtuvieron utilizando la herramienta "IC50 Calculator de AAT Bioquest".

5.2.1 Aminoguanidina

Se empleó una disolución de aminoguanidina en medio acuoso como estándar de calibración, se utiliza esta sustancia debido a que es un conocido inhibidor de la formación de AGE's.

Utilizando la herramienta llamada IC50 Calculator de AAT Bioquest, a partir de los datos de absorbancia obtenidos en dos experimentos distintos, se generan las gráficas respectivas para determinar el IC50, la gráfica de porcentaje de inhibición (eje y) versus concentración (eje x) debe tener una forma en específico, similar a una "s" invertida, como la que se observa en

la Figura 23. A partir de estos gráficos se obtiene un IC50 promedio de 1,27 mM con una desviación estándar de 0,03.

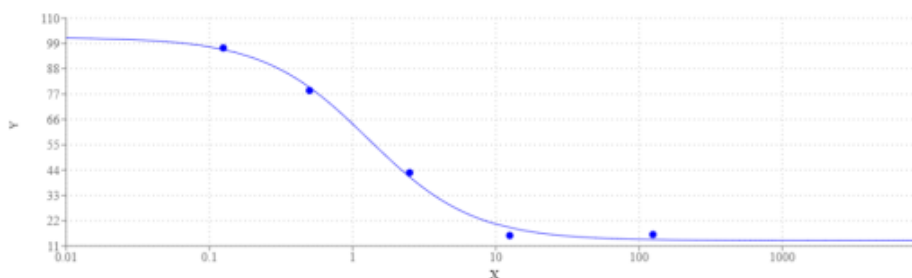


Figura 23. Gráfico generado en la herramienta “Calculator de AAT Bioquest”, donde se muestra porcentaje de inhibición vs concentración de aminoguanidina.

5.2.2 *J. spicigera*

Se realizaron 6 diluciones en etanol al 70% del extracto hidroalcohólico obtenido de la planta.

Utilizando la herramienta llamada IC50 Calculator de AAT Bioquest, a partir de los datos de absorbancia obtenidos en dos experimentos distintos, se generan las gráficas respectivas para determinar el IC50, una de las gráficas de porcentaje de inhibición (eje y) versus concentración (eje x) se observa en la Figura 24. A partir de estos gráficos se obtiene un IC50 promedio de 0,53 mM con una desviación estándar de 0,03.

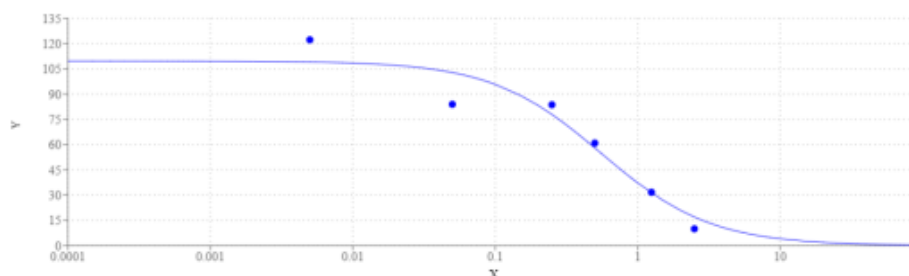


Figura 24. Gráfico generado en la herramienta “Calculator de AAT Bioquest”, donde se muestra porcentaje de inhibición vs concentración de *J. spicigera*.

Además del gráfico mostrado anteriormente, para verificar si realmente el extracto de la planta presenta efecto hipoglicemiante por medio de la inhibición de AGE's, se realiza un gráfico de porcentaje promedio de AGE's versus concentración del extracto. El resultado obtenido para *J. spicigera* se observa en la Figura 25 y por medio de este gráfico se determina que el porcentaje de AGE's en la menor concentración del extracto es alrededor del 100%,

pero este disminuye con el aumento de la concentración de las disoluciones del extracto hasta llegar a un valor menor al 20% al utilizar una concentración de 2,5 mg/mL. Por lo tanto, se puede determinar que el extracto de *J. spicigera* posee actividad hipoglicemiante por medio de la inhibición en la formación de AGE's.

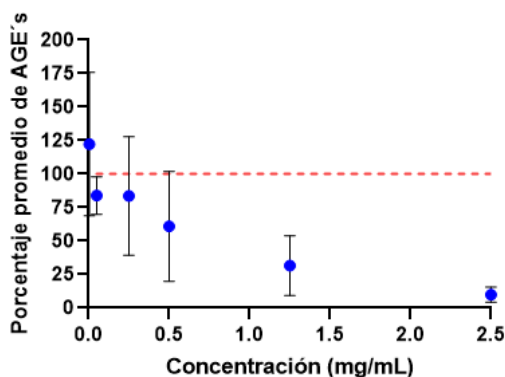


Figura 25. Porcentaje promedio de inhibición de AGEs con respecto a la concentración del extracto de *J. spicigera*.

5.2.2 *J. secunda*

Se realizaron 6 diluciones en etanol al 70% del extracto hidroalcohólico obtenido de la planta.

Utilizando la herramienta llamada IC50 Calculator de AAT Bioquest, a partir de los datos de absorbancia obtenidos en dos experimentos distintos, se generan las gráficas respectivas para determinar el IC50, una de las gráficas de porcentaje de inhibición (eje y) versus concentración (eje x) se observa en la Figura 26. A partir de estos gráficos se obtiene un IC50 promedio de 1,6 mM con una desviación estándar de 0,2.

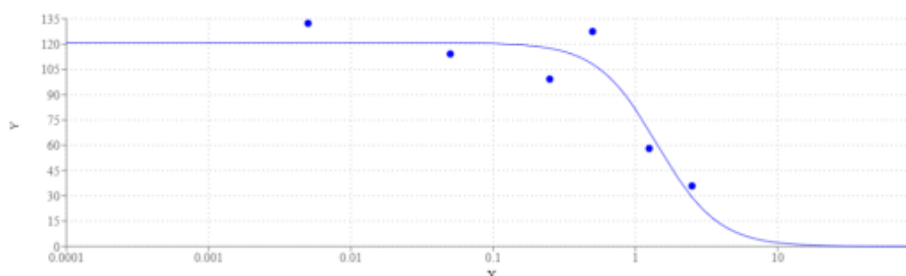


Figura 26. Gráfico generado en la herramienta “Calculator de AAT Bioquest”, donde se muestra porcentaje de inhibición vs concentración de *J. secunda*.

Además del gráfico mostrado anteriormente, para verificar si realmente el extracto de la planta presenta efecto hipoglicemiante por medio de la inhibición de AGE's, se realiza un gráfico de porcentaje promedio de AGE's versus concentración del extracto. El resultado obtenido para *J. secunda* se observa en la Figura 27 y por medio de este gráfico se determina que las concentraciones de 0.005 mg/mL, 0.05 mg/mL y 0.25 mg/mL del extracto no influyen en la señal de fluorescencia, pero después de tener 1.25 mg/mL la inhibición alcanza un 60%. Por lo tanto, se puede determinar que el extracto de *J. secunda* si tiene capacidad de inhibir la formación de AGEs, sin embargo, se necesitan concentraciones altas para ver valores cercanos al 60%-50% de inhibición.

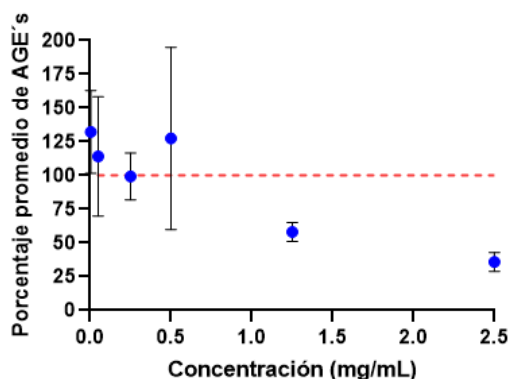


Figura 27. Porcentaje promedio de inhibición de AGE's con respecto a la concentración del extracto de *J. secunda*.

5.2.3 *M. charantia* (sorosí)

Se realizaron 6 diluciones en etanol al 70% del extracto hidroalcohólico obtenido de la planta.

Utilizando la herramienta llamada IC50 Calculator de AAT Bioquest, a partir de los datos de absorbancia obtenidos en dos experimentos distintos, se generan las gráficas respectivas para determinar el IC50, una de la gráfica de porcentaje de inhibición (eje y) versus concentración (eje x) se observa en la Figura 28. A partir de estos gráficos se obtiene un IC50 promedio de 1,5 mM con una desviación estándar de 0,7.

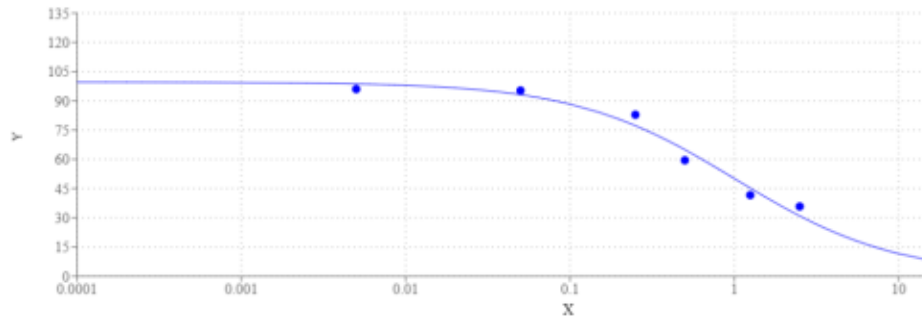


Figura 28. Gráfico generado en la herramienta “Calculator de AAT Bioquest”, donde se muestra porcentaje de inhibición vs concentración de *M. charantia* (sorosí).

Además del gráfico mostrado anteriormente, para verificar si realmente el extracto de la planta presenta efecto hipoglicemiante por medio de la inhibición de AGE's, se realiza un gráfico de porcentaje promedio de AGE's versus concentración del extracto. El resultado obtenido para *M. charantia* (sorosí) se observa en la Figura 29 y por medio de este gráfico se determina que a menor concentración de las diluciones del extracto el porcentaje de formación de AGEs es del 100%, pero con el aumento de la concentración el porcentaje disminuye hasta un valor aproximado del 40% de la formación de AGEs. No obstante, este valor no es suficiente para concluir que el extracto en estudio posee actividad hipoglicemiante, debido a que la desviación estándar entre repeticiones es elevada en comparación con el dato de IC50, y el porcentaje de inhibición en algunos casos no logró alcanzar el 50%, por lo que los resultados no fueron consistentes y congruentes entre sí.

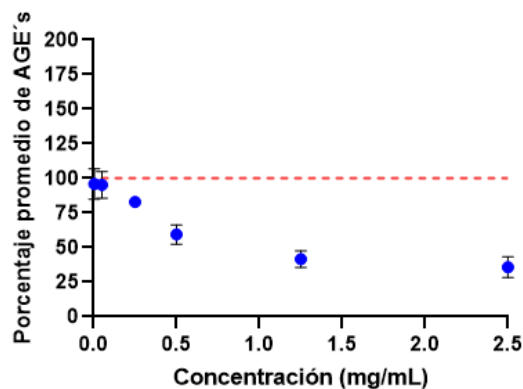


Figura 29. Porcentaje promedio de inhibición de AGE's con respecto a la concentración del extracto de *M. charantia* (sorosí).

5.2.4 *M. charantia* (Bitter melon)

Se realizaron 6 diluciones en etanol al 70% del extracto hidroalcohólico obtenido de la planta.

Utilizando la herramienta llamada IC50 Calculator de AAT Bioquest, a partir de los datos de absorbancia obtenidos en dos experimentos distintos, se generan las gráficas respectivas para determinar el IC50, una de las gráficas de porcentaje de inhibición (eje y) versus concentración (eje x) se observa en la Figura 30. A partir de estos gráficos se obtiene un IC50 promedio de 0,19 mM con una desviación estándar de 0,17.

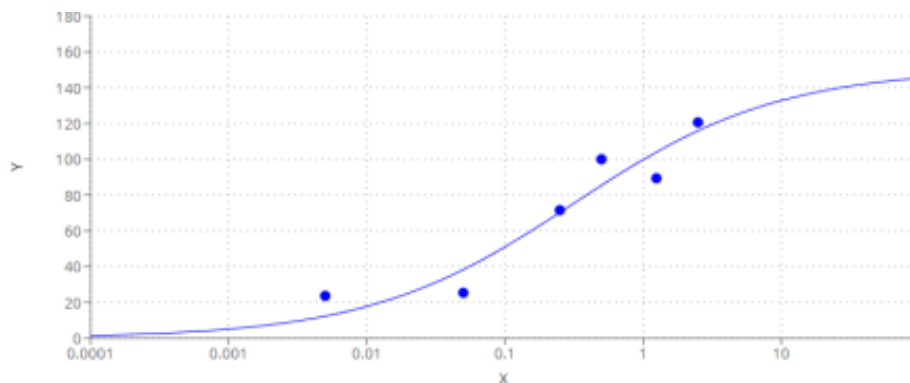


Figura 30. Gráfico generado en la herramienta “Calculator de AAT Bioquest”, donde se muestra porcentaje de inhibición vs concentración de *M. charantia* (Bitter melon).

Además del gráfico mostrado anteriormente, para verificar si realmente el extracto de la planta presenta efecto hipoglicemiante por medio de la inhibición de AGE's, se realiza un gráfico de porcentaje promedio de AGE's versus concentración del extracto. El resultado obtenido para *M. charantia* (sorosí) se observa en la Figura 31 y por medio de este gráfico se determina que el aumento de la concentración del extracto parece no tener injerencia en la reducción de la fluorescencia producida por la acumulación de AGE's en el sistema, y se puede observar que los resultados obtenidos se encuentran sobre la línea del 100% del porcentaje promedio de AGE's, además, la desviación estándar entre repeticiones es elevada en comparación con el dato de IC50. Por lo tanto, se puede determinar que el extracto no presenta actividad hipoglicemiante por medio de la inhibición en la formación de AGE's.

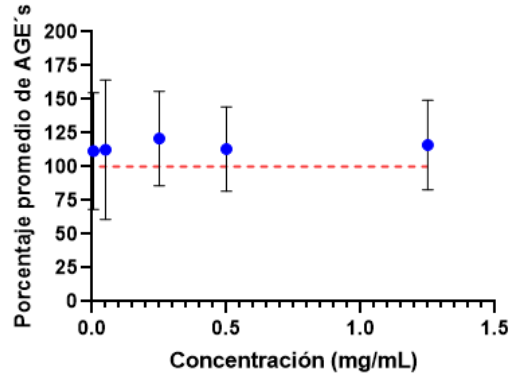


Figura 31. Porcentaje promedio de inhibición de AGE's con respecto a la concentración del extracto de *M. charantia* (Sorosí).

Es importante mencionar que se demostró que el extracto de Bitter melon presentaba fluorescencia propia, por lo que los resultados de la curva de inhibición no podían ser ajustados al ser comparados con los blancos. Se decidió realizar calibraciones para medir la fluorescencia propia del extracto a las distintas concentraciones utilizadas y esto ayudó a realizar los ajustes necesarios para obtener una curva como la que se muestra en la Figura 30, a pesar de las complicaciones, por lo que al realizar una gran cantidad de repeticiones, se determinó el comportamiento de la curva bajo estas condiciones, sin embargo, la forma de la curva no es la esperada, se observa invertida con respecto a los demás extracto y el control positivo.

5.2.5 Comparación entre los extractos de *J. spicigera*, *J. secunda* y *M. charantia* (Sorosí y Bitter melon)

Tabla 2. Comparación del IC50 y la actividad hipoglicemiante por medio de la inhibición en la formación de AGE's para los extractos de *J. spicigera*, *J. secunda* y *M. charantia* (Sorosí y Bitter melon).

Planta	IC50 (mM)	Desviación estándar	Inhibición de formación de AGE's
<i>J. spicigera</i>	0,53	0,03	Si, al aumentar concentración del extracto
<i>J. secunda</i>	1,6	0,2	Si, al aumentar concentración del extracto
<i>M. charantia</i> (Sorosí)	1,5	0,7	No, resultados no congruentes
<i>M. charantia</i> (B. melon)	0,19	0,17	No, 100% de AGE's en distintas concentraciones

Los resultados obtenidos indican que los extractos de *J. spicigera* y *J. secunda* si presentan actividad hipoglicemiante por medio de la inhibición de AGE's, con un IC50 distinto, en donde se puede observar que la concentración necesaria para inhibir el 50% de los AGE's es mucho mayor para los extractos de *J. secunda*, indicando que se necesita una dosis más alta para tener el mismo efecto hipoglicemiante.

En el caso de ambas variedades de *M. charantia* no se obtienen resultados positivos, se observa que los resultados no son congruentes entre sí, no se da la precisión deseada y por ende se observan desviaciones estándar altas, demostrando que los resultados no son lo suficientemente confiables para determinar su efecto hipoglicemiante por medio de la inhibición de AGE's, a pesar de que se tiene un dato numérico para el IC50, esto no determina si el extracto es efectivo o no, debido a que al utilizar la herramienta IC50 Calculator de AAT Bioquest, siempre se va a obtener un valor numérico, por lo que en estos casos también es de suma importancia interpretar el gráfico y verificar que este tenga los valores de eje correctos, tomando en cuenta que son porcentajes deben estar entre 0 y 100, además que el valor central o de IC50 realmente coincida con la forma esperada cerca del valor de 50 del eje y.

Tomando los resultados obtenidos del IC50, sumado a la interpretación del gráfico, y corroborando con el gráfico de Porcentaje promedio de inhibición de AGE's versus concentración, se obtiene una conclusión de si el extracto de la planta presenta efecto hipoglicemiante por medio de la inhibición de AGE's.

Es importante tomar en consideración que el tener un resultado negativo en la prueba de inhibición de AGE's no indica que la planta no funciona como coadyudante en el tratamiento de la diabetes, debido a que el efecto hipoglicemiante se puede dar por distintos mecanismos en el metabolismo de la glucosa/insulina en el cuerpo, por lo que con estas pruebas se determina que las especies plantas de plantas utilizadas de *M. charantia* no utilizan el mecanismo de inhibición de AGE's.

5.3 Efecto hipoglicemiante de los extractos en ratas con diabetes inducida

Se desarrolló en el CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada), Baja California, México. Se emplearon ratas Wistar de 6-7 semanas, se siguieron los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales para

laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), las guías o los estándares de ética para la experimentación de dolor en animales Zimmermann, 1983 y las Guías del Consejo Nacional para el Uso y Cuidados de Animales de Experimentación de Estados Unidos y Canadá.

Para la evaluación del efecto hipoglucemiante de los extractos de las plantas *J. spicigera*, *J. secunda* y las dos variedades de *M. charantia*, se empleó el modelo de neuropatía inducida por diabetes experimental.

Se confirma la diabetes cuando los niveles de glucosa en sangre superan los 180 mg/dL, esto sucedió entre las semanas 5 y 6, como se observa en el gráfico de la Figura 31.

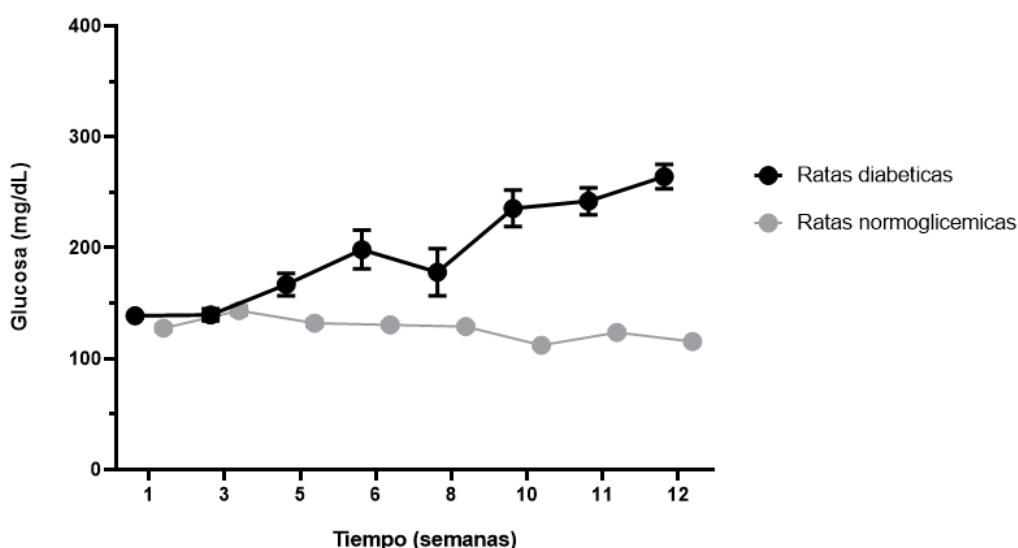


Figura 32. Variación de los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) en ratas con diabetes inducida y ratas normoglicémicas al transcurrir las semanas.

Posteriormente se utilizaron las ratas para la administración de los extractos, por vía oral, cuando superaron los 250 mg/dL de glucosa en sangre, utilizando 3 dosis diferentes de cada extracto (10, 100 y 1000 mg/kg). Los niveles de glucosa se determinaron antes y a los 30, 60, 90, 120 y 150 minutos posteriores a la administración de los extractos alcohólicos.

5.3.1 *J. spicigera*

Se administró el extracto alcohólico de la planta, en las 3 dosis mencionadas anteriormente, utilizando grupos de 4 a 5 ratas para cada una de las dosis. La glucosa en sangre se mide antes de la administración y posterior a esta durante el tiempo estimado, obteniendo un gráfico como el que se observa en la Figura 33.

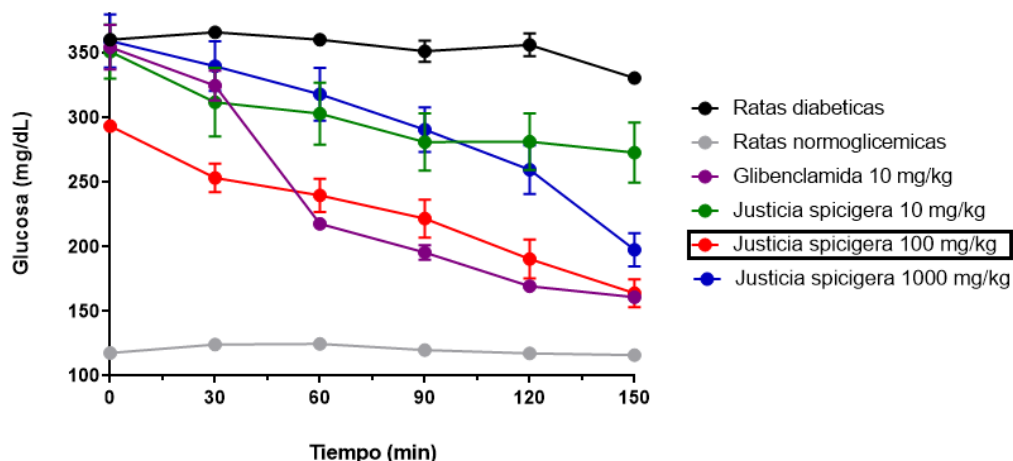


Figura 33. Glucosa en sangre con respecto al tiempo al administrar Glibenclamida como control positivo y el extracto de *J. spicigera* por vía oral en 3 dosis distintas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, observados en la Figura 33, se puede indicar que los extractos de la *J. spicigera* si tienen efecto hipoglucemiante, determinando que la concentración con mejor eficacia fue la de 100 mg/kg.

Tomando los datos como valores porcentuales, siendo el 100% el valor de glucosa en sangre de ratas diabéticas y el 0% el valor de glucosa en sangre de las ratas normoglicémicas, se obtiene el gráfico de la Figura 34, en el que se puede observar que la Glibenclamida, fármaco utilizado para el tratamiento de diabetes tipo II, utilizado como control positivo, disminuye el porcentaje de glucosa en sangre a un 43,65% y la *J. spicigera* en dosis de 100 mg/kg a un 45,13%, confirmando que el extracto de *J. spicigera* tiene un alto efecto hipoglucemiante, siendo este bastante similar al del fármaco utilizado como control positivo.

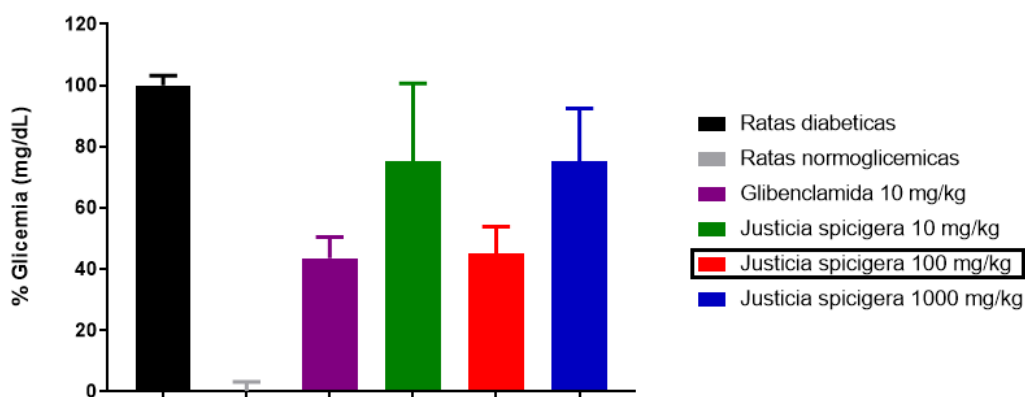


Figura 34. Porcentaje de glicemia promedio al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de *J. spicigera* en 3 dosis distintas.

5.3.2 *J. secunda*

Se administró el extracto alcohólico de la planta, en las 3 dosis mencionadas anteriormente, utilizando grupos de 4 a 5 ratas para cada una de las dosis. La glucosa en sangre se mide antes de la administración y posterior a esta durante el tiempo estimado, obteniendo un gráfico como el que se observa en la Figura 35.

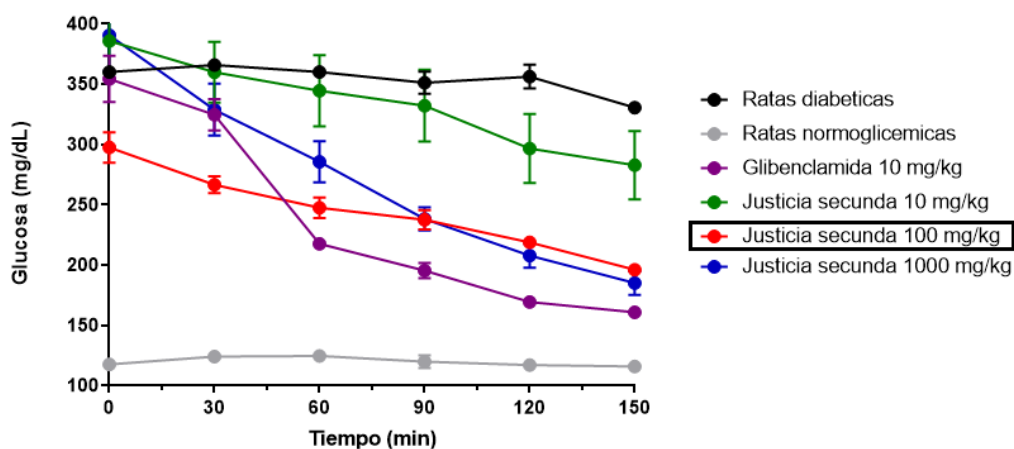


Figura 35. Glucosa en sangre con respecto al tiempo al administrar Glibenclamida como control positivo y el extracto de *J. secunda* por vía oral en 3 dosis distintas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, observados en la Figura 35, se puede indicar que los extractos de la *J. secunda* si tienen efecto hipoglucemiante, determinando que la concentración con mejor eficacia fue la de 100 mg/kg.

Tomando los datos como valores porcentuales, siendo el 100% el valor de glucosa en sangre de ratas diabéticas y el 0% el valor de glucosa en sangre de las ratas normoglicémicas, se obtiene el gráfico de la Figura 36, en el que se puede observar que la Glibenclamida, fármaco utilizado para el tratamiento de diabetes tipo II, utilizado como control positivo, disminuye el porcentaje de glucosa en sangre a un 43,65% y la *J. secunda* en dosis de 100 mg/kg a un 52,27%, confirmando que el extracto de *J. secunda* tiene efecto hipoglucemiante, siendo este un poco más bajo que el del fármaco utilizado como control positivo.

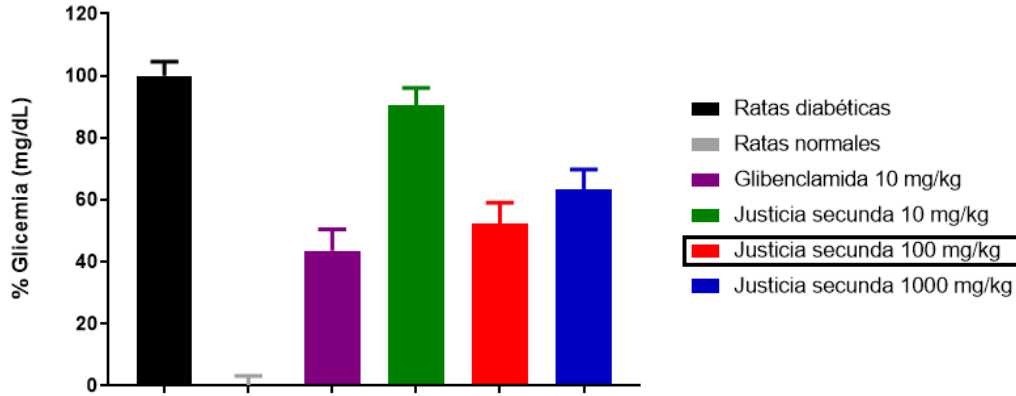


Figura 36. Porcentaje de glicemia promedio al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de *J. secunda* en 3 dosis distintas.

5.3.3 *M. charantia* (Sorosi)

Se administró el extracto alcohólico de la planta, una dosis, utilizando grupos de 4 a 5 ratas para cada una de las dosis. La glucosa en sangre se mide antes de la administración y posterior a esta durante el tiempo estimado, obteniendo un gráfico como el que se observa en la Figura 37.

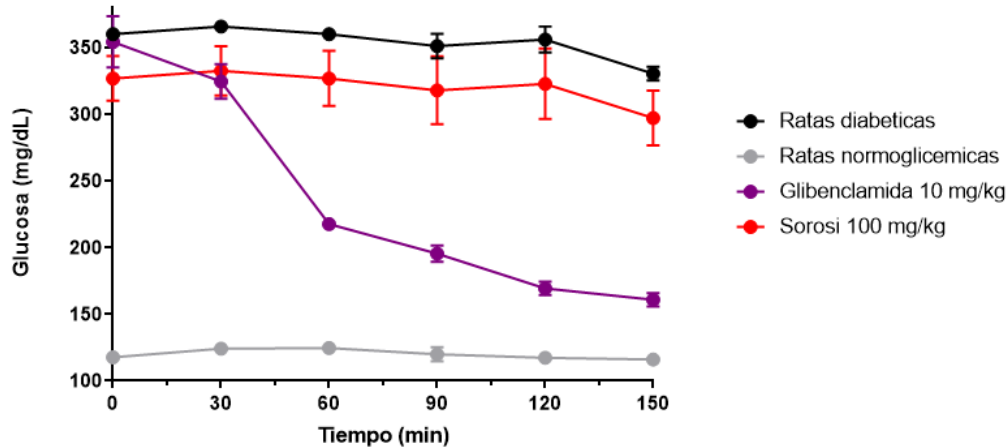


Figura 37. Glucosa en sangre con respecto al tiempo al administrar Glibenclamida como control positivo y el extracto de *M. charantia* (Sorosi) por vía oral en 1 dosis.

De acuerdo con los resultados obtenidos, observados en la Figura 37, se puede indicar que los extractos de la *M. charantia* (Sorosi) no tienen efecto hipoglucemiante, debido que al utilizar la dosis de 100 mg/kg no se obtuvieron resultados positivos, no se obtuvo un descenso en el porcentaje de glucosa en sangre medida a las distintas ratas en los tiempos estimados,

por esta razón no se realizaron los ensayos utilizando las distintas dosis que se utilizaron con los demás extractos.

Tomando los datos como valores porcentuales, siendo el 100% el valor de glucosa en sangre de ratas diabéticas y el 0% el valor de glucosa en sangre de las ratas normoglicémicas, se obtiene el gráfico de la Figura 38, en el que se puede observar que la Glibenclamida, fármaco utilizado para el tratamiento de diabetes tipo II, utilizado como control positivo, disminuye el porcentaje de glucosa en sangre a un 43,65% y la *M. charantia* (sorosí) en dosis de 100 mg/kg a un 85,83%, confirmando que el extracto de *M. charantia* (sorosí) no tiene efecto hipoglucemiante, presentando un porcentaje de glicemia alto al administrar la dosis y además también se puede observar una desviación estándar de los datos bastante alta, esto debido a que el extracto no logró estabilizar ni disminuir la glicemia medida en las ratas.

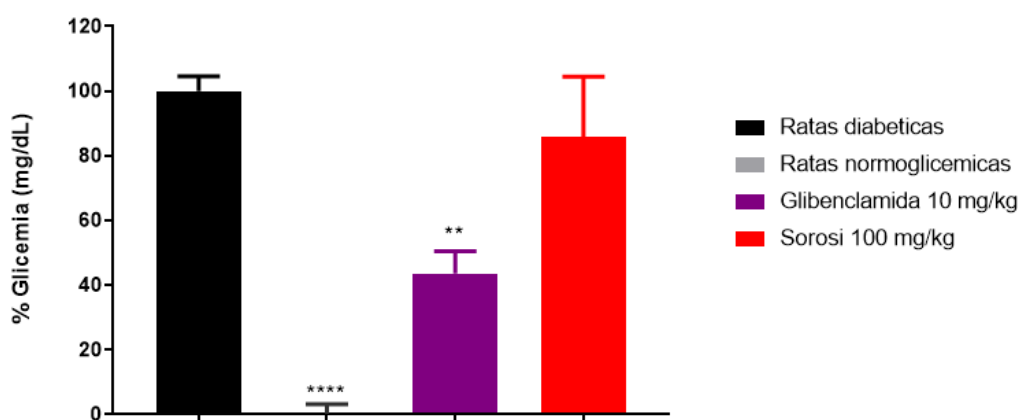


Figura 38. Porcentaje de glicemia promedio al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de *M. charantia* (Sorosí) en 1 dosis.

5.3.4 *M. charantia* (Bitter Melon)

Se administró el extracto alcohólico de la planta, en las 3 dosis mencionadas anteriormente, utilizando grupos de 4 a 5 ratas para cada una de las dosis. La glucosa en sangre se mide antes de la administración y posterior a esta durante el tiempo estimado, obteniendo un gráfico como el que se observa en la Figura 39.

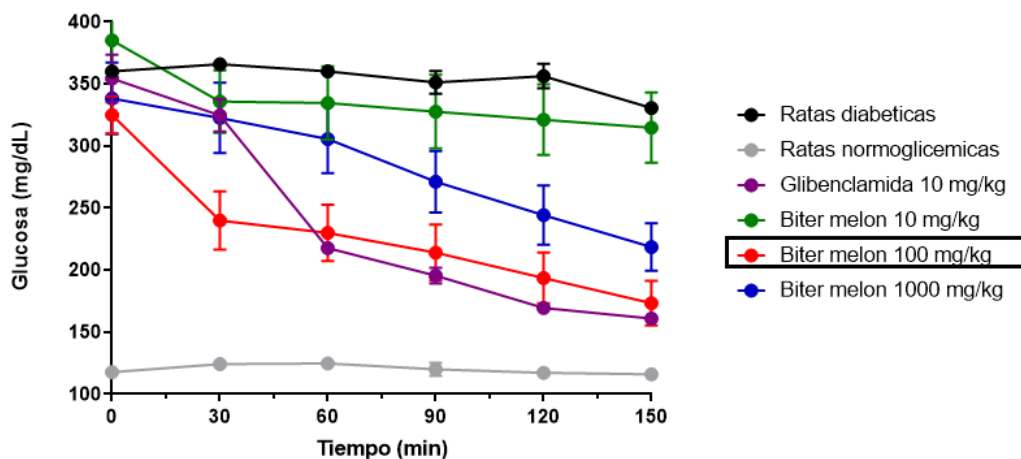


Figura 39. Glucosa en sangre con respecto al tiempo al administrar Glibenclamida como control positivo y el extracto de *M. charantia* (Bitter melon) por vía oral en 3 dosis distintas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, observados en la Figura 39, se puede indicar que los extractos de la *M. charantia* (Bitter melon) si tienen efecto hipoglucemiante, determinando que la concentración con mejor eficacia fue la de 100 mg/kg.

Tomando los datos como valores porcentuales, siendo el 100% el valor de glucosa en sangre de ratas diabéticas y el 0% el valor de glucosa en sangre de las ratas normoglicémicas, se obtiene el gráfico de la Figura 40, en el que se puede observar que la Glibenclamida, fármaco utilizado para el tratamiento de diabetes tipo II, utilizado como control positivo, disminuye el porcentaje de glucosa en sangre a un 43,65% y la *M. charantia* (Bitter melon) en dosis de 100 mg/kg a un 44,52%, confirmando que el extracto de *M. charantia* (Bitter melon) tiene efecto hipoglucemiante, siendo este un poco más bajo que el del fármaco utilizado como control positivo.

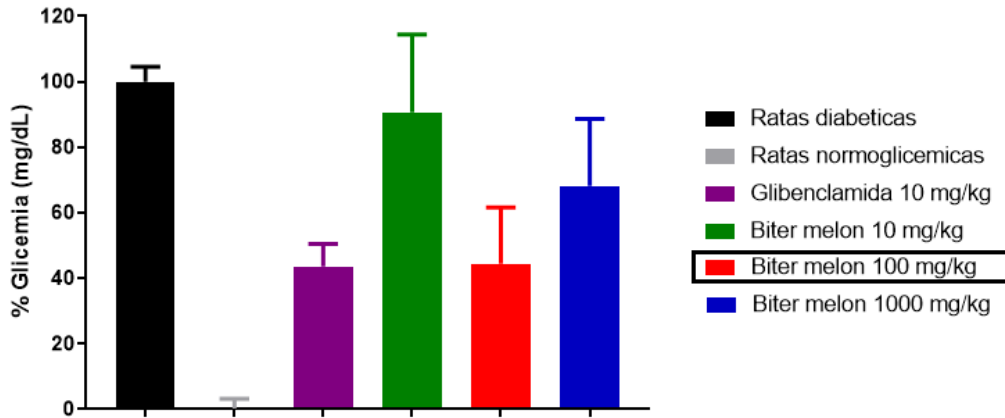


Figura 40. Porcentaje de glicemia promedio al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de *M. charantia* (Bitter melon) en 3 dosis distintas.

5.3.5 Comparación entre los extractos de *J. spicigera*, *J. secunda* y *M. charantia* (Sorosí y Bitter melon)

Al unificar los resultados obtenidos para el extracto de cada planta y tomando en consideración que en los cuatro casos la dosis con mayor efecto fue la de 100 mg/kg, se obtiene un gráfico de comparación, que se observa en la figura 41, en el que se ve cómo van cambiando los niveles de glucosa en sangre con forme pasa el tiempo, después de administrar la dosis mencionada. Cabe recalcar que el nivel de glucosa en sangre inicial, en tiempo 0, es distinto para cada experimento, debido a que se utilizan distintos animales, todos con diabetes inducida y en semanas similares.

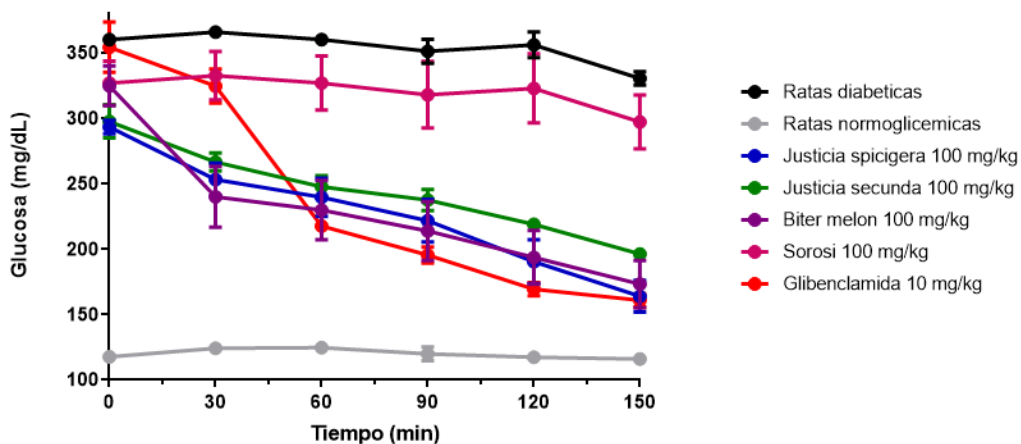


Figura 41. Glucosa en sangre con respecto al tiempo al administrar Glibenclamida como control positivo y el extracto de cada planta en dosis de 100 mg/kg.

De acuerdo a lo observado en la Figura 41, el extracto de la planta *M. charantia* en la variedad de Sorosi, es el único que no presentó efecto hipoglucemiante y la *J. spicigera* presentó los mejores resultados, bastante similares a los de la Glibenclamida utilizada como control positivo. Al finalizar los 150 minutos *M. charantia* en la variedad de Bitter melon y la *J. spicigera* fueron los extractos que lograron reducir los niveles de glucosa en sangre en mayor medida, hasta valores muy similares a los del fármaco.

Tomando los datos como valores porcentuales, siendo el 100% el valor de glucosa en sangre de ratas diabéticas y el 0% el valor de glucosa en sangre de las ratas normoglicémicas, se obtiene el gráfico de la Figura 42, en el que se observan los resultados obtenidos para los extractos de las cuatro plantas.

Con estos resultados, que se observan en la Figura 42, se confirma que los extractos alcohólicos de *M. charantia* en la variedad de Bitter melon administrado en dosis de 100 mg/kg, que logró reducir los niveles de azúcar en sangre hasta un 44,52%, y la *J. spicigera* en dosis de 100 mg/kg, que logró reducirlos hasta un 45,13%, fueron los extractos con mejores resultados; estos en comparación con el fármaco utilizado como control positivo que logró reducir los niveles de azúcar en sangre hasta un 43,65%.

Tomando estos datos en consideración se puede indicar que los extractos de *M. charantia* en la variedad de Bitter melon, *J. spicigera* y *J. secunda*, con una reducción de 52,27%, si funcionan como agentes hipoglucemiantes; en el caso del Sorosi, con una reducción de 85,83, siendo el que presenta los resultados con la reducción de azúcar en sangre más baja, se puede indicar que su efecto hipoglucemiante es muy bajo, por lo que no tendría un impacto significativo en un paciente con diabetes tipo II al utilizarlo como tratamiento coadyudante.

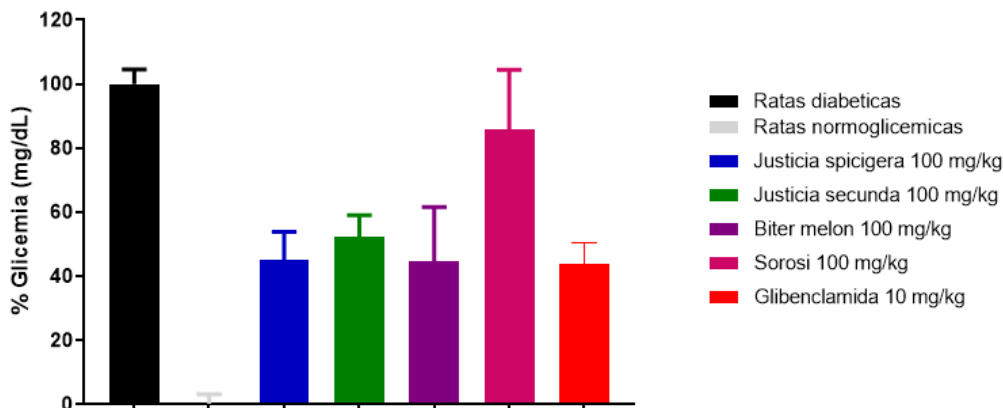


Figura 42. Porcentaje de glicemia promedio al utilizar Glibenclamida como control positivo y el extracto de cada planta en dosis de 100 mg/kg.

5.4 Evaluación del efecto antialodínico (analgésico) de los extractos en ratas con diabetes inducida

Se desarrolló en el CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada), Baja California, México. Se emplearon ratas Wistar de 6-7 semanas, se siguieron los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales para laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), las guías o los estándares de ética para la experimentación de dolor en animales Zimmermann, 1983 y las Guías del Consejo Nacional para el Uso y Cuidados de Animales de Experimentación de Estados Unidos y Canadá.

De 6 semanas a 12 semanas posteriores a la administración de STZ, se evaluó el desarrollo de la alodinia. El efecto antialodínico o analgésico se determinó con el método de “up and down” utilizando diversos filamentos de vonFrey de diferentes calibres, con un rango de 2.36 g a 6.65 g para determinar el 50% de umbral de retiro.

Se confirma la alodinia cuando el 50% del umbral de retiro es cercano a 5 g, los valores para ratas sanas se encuentran entre 12 y 15 g, como se observa en el gráfico de la Figura 43, durante la semana 9 se observó que los valores se encontraban dentro del rango para ratas normales, debido a que durante este periodo las ratas con diabetes inducida aún no habían desarrollado la alodinia, al llegar a semana 11 ya se observan valores bajos para el 50% del umbral de retiro, cercanos o menores a 5, para ambas patas (derecha e izquierda traseras),

por lo que a partir de este momento se realizaron las pruebas para determinar el efecto antialodínico de los distintos extractos.

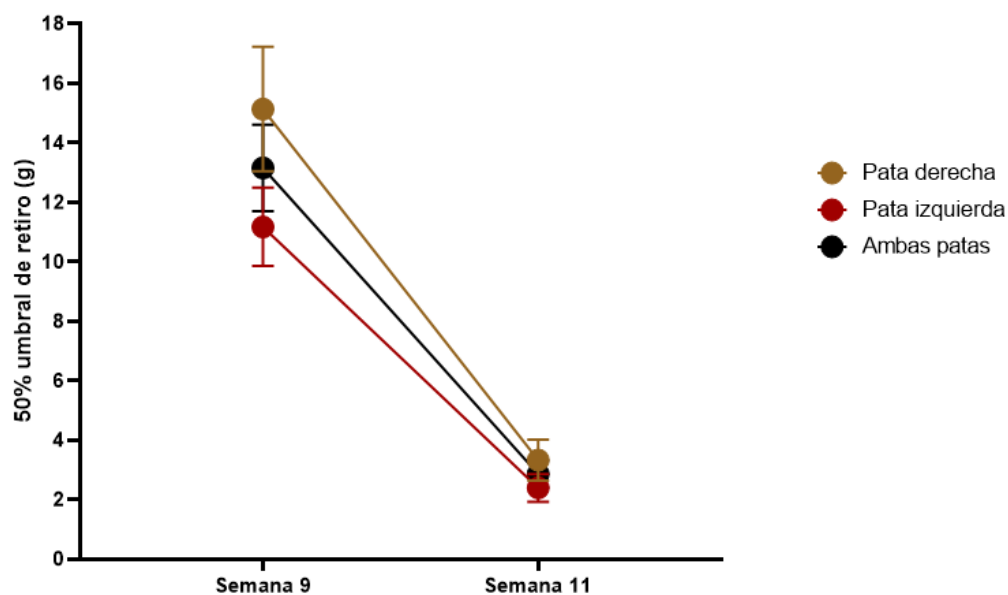


Figura 43. Variación del 50% de umbral de retiro en ratas con diabetes inducida al transcurrir las semanas.

Posterior a la determinación de la alodinia en las ratas con diabetes inducida, se utilizó para cada planta la concentración del extracto con mejores resultados en las pruebas de efecto hipoglucemiante, para las cuatro plantas fue la dosis de 100 mg/kg.

La administración de la gabapentina (GBP), como control positivo, y de los extractos se realizó por vía oral y la medición de respuestas, tanto positivas como negativas, mediante estímulos no dolorosos en ambas patas traseras, utilizando el método “up-down”, se realizó inicialmente en tiempo 0 justo al administrar el extracto, luego a los 15 minutos y continuando en intervalos de 30 minutos hasta llegar a un total de 180 minutos, como se observa en la Figura 44, esto para determinar la fuerza mecánica necesaria para provocar una respuesta de retirada de la pata en el 50% de los animales, de acuerdo a la fórmula estadística utilizada para determinar las DL50.

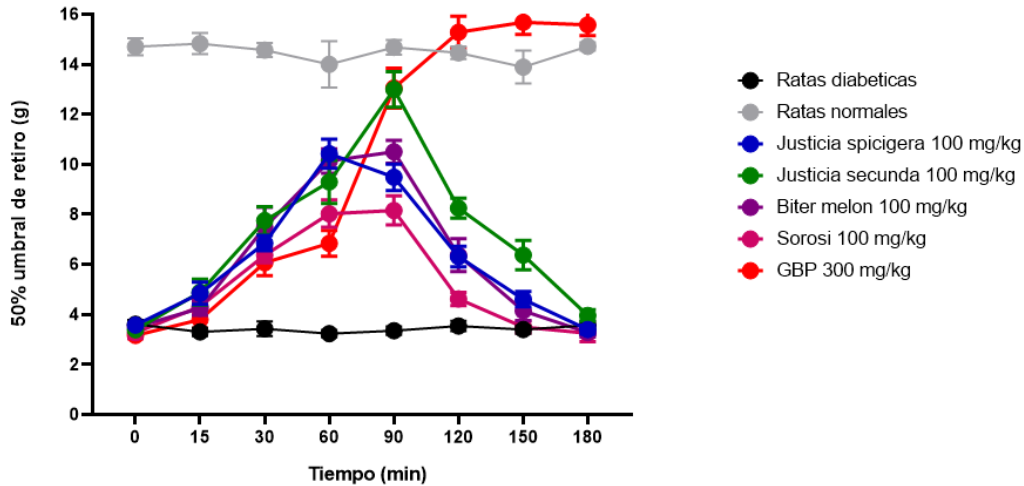


Figura 44. Variación del 50% de umbral de retiro con respecto al tiempo al administrar Gabapentina como control positivo y el extracto de las plantas en dosis de 100 mg/kg.

De acuerdo a los resultados obtenidos, observados en la Figura 44, se puede indicar que los extractos de las cuatro plantas utilizadas (*J. spicigera*, *J. secunda* y dos especies de *M. charantia*) en dosis de 100 mg/kg si tienen efecto antialodínico, debido a que a partir de los 30 minutos se ve un aumento significativo en el 50% de umbral de retiro, sin embargo su efecto y la duración del mismo son bajos en comparación con la Gabapentina utilizada como control positivo en dosis de 300 mg/kg, como se observa en el gráfico, a partir de los 90 minutos en efecto disminuye aumentando el valor del 50% de umbral de retiro, lo que indica que se vuelven a presentar respuestas por parte del animal al aplicar estímulos no dolorosos, y al llegar a los 150 minutos el valor vuelva a ser similar al inicial, indicando que se llega a la finalización del efecto causado por los extractos, esto a diferencia de la Gabapentina que al transcurrir los 180 minutos continúa haciendo efecto en las ratas.

Tomando los datos como valores porcentuales se realiza el gráfico de %MEP (porcentaje máximo efecto posible), siendo el 100% el valor dado a la respuesta de las ratas sin dolor, normoglicémicas, y el 0% el valor dado a la respuesta de las ratas con diabetes inducidas a las que solamente se les administró vehículo, siendo utilizadas como control, se obtiene el gráfico de la Figura 45, en el que se puede observar que la Gabapentina, fármaco utilizado para el dolor, utilizado como control positivo, presenta un porcentaje de analgesia de un 73,43%, disminuyendo la respuesta de las ratas con los estímulos y por ende disminuyendo el dolor percibido por estas, con respecto a los extractos se obtiene un porcentaje de analgesia

de 35,21% para la *J. spicigera*, 46,67% para la *J. secunda*, 29,30% para el Bitter melon y 22,88% para el Sorosi.

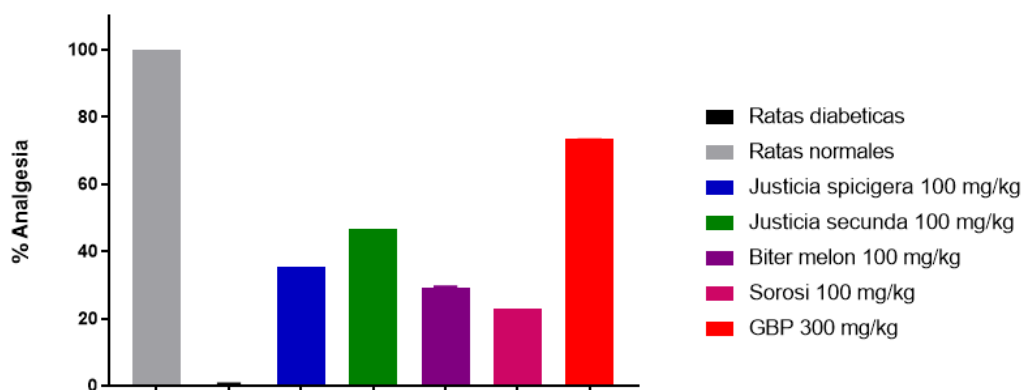


Figura 45. Porcentaje de analgesia promedio al utilizar Gabapentina como control positivo y el extracto de las plantas en dosis de 100 mg/kg.

Los datos presentados anteriormente confirman que los extractos si tienen efecto antialodínico en las ratas con diabetes inducida, pero el efecto es bajo, en donde el mayor efecto analgésico se obtiene con el extracto alcohólico de la planta *J. secunda* y el menor con el extracto de la planta sorosí.

6. Conclusiones

Al realizar la caracterización fitoquímica se logró determinar que el extracto alcohólico de las plantas de la familia Acanthaceae contienen distintos metabolitos secundarios, a pesar de que de forma popular se conocen con el mismo nombre, además para el extracto de la *J. spicigera* se determina, que contiene compuestos fenólicos, como flavonoides, lo que concuerda con la literatura en la que se indica que las propiedades hipoglucemiantes que se le atribuyen a un flavonoide llamado kaempferitrina, los estudios realizados no son suficientes para confirmar que sea el mismo compuesto, sin embargo si pertenece a la misma clasificación de metabolitos secundarios, por lo que si no es el mismo, tendría una estructura química bastante similar.

En el caso de la *J. secunda* ocurrió algo muy distinto, debido a que, de acuerdo con la literatura, se le atribuyen sus propiedades hipoglucemiantes a un triterpeno llamado taraxerol, sin embargo, de acuerdo a la caracterización realizada, el extracto alcohólico de la planta no

contiene triterpenos, por lo que la actividad reflejada puede provenir de otro tipo de compuesto y los triterpenos estar presentes en otro tipo de extracto.

Las plantas utilizadas de la familia Cucurbitaceae, se conocen con el mismo nombre científico, *Momordica charantia*, sin embargo, al realizar la caracterización fitoquímica para los extractos alcohólicos de ambas plantas, conocidas como Bitter melon y Sorosi, se determinó que son químicamente distintas, además se pueden diferenciar por su apariencia física debido a que el fruto tiene distinto tamaño y color.

Con respecto a las propiedades hipoglucemiantes, en la literatura se le atribuyen a dos compuestos, un triterpeno llamado momordicin y a un glucósido esteroideal llamado charantin, según la caracterización realizada, en ambas plantas se determina la presencia de terpenos y compuestos esteroideos, que se podrían asociar a la presencia del momordicin y el charantin respectivamente, sin embargo no se pueden determinar los compuestos químicos como tal con las pruebas realizadas, por lo que únicamente se puede indicar que al estar dentro de la misma clasificación de metabolitos secundarios, tiene una estructura química similar.

Al realizar las pruebas *in vitro* y posteriormente las pruebas *in vivo*, los resultados de ambas se pueden entrelazar para tener conclusiones más exactas. Iniciando con el extracto de *J. spicigera* que, si obtuvo resultados positivos en las pruebas *in vitro*, de inhibición de AGES's, siendo la que presentó mejores resultados, y esto se corrobora con las pruebas *in vivo* que de igual manera tiene los mejores resultados, siendo la que presenta un menor porcentaje promedio de glicemia al ser administrado el extracto en dosis de 100 mg/kg, indicando que el extracto alcohólico de *J. spicigera* si funcionaría como tratamiento coadyudante para la diabetes tipo II.

Al analizar los resultados obtenidos para el extracto de *J. secunda*, se observa que, si presenta resultados positivos en las pruebas de inhibición de AGE's, al igual que en las pruebas *in vivo*, teniendo buenos resultados en ambas, lo que indica que el extracto alcohólico de *J. secunda* si funcionaría como tratamiento coadyudante para la diabetes tipo II, pero se deben administrar dosis mayores para obtener resultados similares a los que se obtendrían al utilizar extractos de *J. spicigera*.

Al utilizar dos especies distintas de *M. charantia*, los resultados se deben analizar por aparte debido a que son plantas distintas y por ende se obtuvieron resultados diferentes, para el extracto de la planta conocida como Bitter melon, se obtienen resultados negativos para las pruebas *in vitro*, pero se obtiene muy buenos resultados en las pruebas *in vivo*, siendo el extracto con el segundo mejor resultado, por lo que se puede concluir que el Bitter melon si funcionaría como tratamiento coadyudante para la diabetes tipo II, pero en el cuerpo interviene en un mecanismo distinto al de inhibición de AGE's al actuar como hipoglucemiante.

En el caso del extracto de la planta conocida como sorosí, se obtiene resultados negativos en ambos tipos de prueba, por lo que se concluye que este extracto no funcionaría como tratamiento coadyudante para la diabetes tipo II.

Por último, se realizaron pruebas para determinar el efecto antialodínico de los extractos alcohólicos de las 4 plantas, para los cuales se obtuvieron resultados bastantes similares, debido a que, en todos los casos, los extractos si tienen efecto antialodínico, pero es bajo y tiene poca duración, en donde el mayor efecto analgésico se obtiene con el extracto de la planta *J. secunda* y el menor efecto con el extracto de la planta *M. charantia* en la especie conocida como sorosí.

6. Referencias bibliográficas

- (1) Fabricant, D.; Farnsworth, N. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ Health Perspect* **2001**, *109* (Suppl 1), 69–75. <https://doi.org/10.1289/ehp.011109s169>.
- (2) Yuan, H.; Ma, Q.; Ye, L.; Piao, G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules* **2016**, *21* (5). <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>.
- (3) WHO. *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*; **2000**.
- (4) Qiu Jane. A Culture in the Balance. Traditional Chinese Medicine and Western Science Face Almost Irreconcilable Differences. *Nature* **2007**, *448*, 126–128. <https://doi.org/10.1038/448126a>.
- (5) de la Torre, B. G.; Albericio, F. The Pharmaceutical Industry in 2018. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. *Molecules* **2019**, *24* (4). <https://doi.org/10.3390/molecules24040809>.
- (6) Alves, R. R. N.; Rosa, I. M. L. Biodiversity, Traditional Medicine and Public Health: Where Do They Meet? *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. March 21, **2007**, pp 3–14. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-3-14>.
- (7) Esquivel-Gutiérrez, E. R.; Noriega-Cisneros, R.; Bello-González, M. A.; Saavedra-Molina, A.; Salgado-Garciglia, R. Plantas Utilizadas En La Medicina Tradicional Mexicana Con Propiedades Antidiabéticas y Antihipertensivas. *Biológicas* **2012**, *14* (1), 45–52.
- (8) International Diabetes Federation. About Diabetes. **2020**. Recuperado el 26 de febrero 2020, a partir de <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes.html>
- (9) American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. **2014**, *37* (SUPPL.1), 581–590. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>.
- (10) International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th edition. **2020**. Recuperado el 26 de febrero 2020, a partir de <https://www.diabetesatlas.org/en/>
- (11) Organización Mundial de la Salud. Datos Sobre Diabetes. **2016**. Recuperado el 26 de febrero 2020, a partir de <https://www.who.int/features/factfiles/diabetes/es/>
- (12) Desai, S.; Tatke, P. Charantin: An Important Lead Compound from Momordica Charantia for the Treatment of Diabetes. *J Pharmacogn Phytochem* **2015**, *163* (6), 163–166.
- (13) Joseph, B.; Jini, D. Antidiabetic Effects of Momordica Charantia (Bitter Melon) and Its Medicinal Potency. *Asian Pac J Trop Dis* **2013**, *3* (2), 93–102. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60052-3](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60052-3).
- (14) Kim, Y.; Kim, R.; Soh, J.; Choi, K. Screening of Medical Plant Momordica Charantia Leaf for Secondary Metabolites. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development* **2013**, *18* (5), 458–465.

- (15) Xu, X.; Shan, B.; Liao, C.-H.; Xie, J.-H.; Wen, P.-W.; Shi, J.-Y. Anti-Diabetic Properties of Momordica Charantia L. Polysaccharide in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *Int J Biol Macromol* **2015**, *81*, 538–543. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2015.08.049>.
- (16) Gupta, M.; Sharma, S.; Gautam, A. K.; Bhadauria, R. Momordica Charantia Linn. (Karela): Nature's Silent Healer. *Int. J Pharm Sci Rev Res* **2011**, *11* (1), 32–37.
- (17) Ahamad, J.; Amin, S.; R. Mir, S. Momordica Charantia Linn. (Cucurbitaceae): Review on Phytochemistry and Pharmacology. *Research Journal of Phytochemistry* **2017**, *11* (2), 53–65. <https://doi.org/10.3923/rjphyto.2017.53.65>.
- (18) Kitadi, J. M.; Lengbiye, E. M.; Gbolo, B. Z.; Inkoto, C. L.; Muanyishay, C. L.; Lufuluabo, G. L.; Tshibangu, D. S. T.; Tshilanda, D. D.; Mbala, B. M.; Ngbolua, K.; Mpiana, P. T. Justicia Secunda Vahl Species : Phytochemistry , Pharmacology and Future Directions : A Mini-Review. *Discovery Phytomedicine* **2019**, *6* (4), 157–171. <https://doi.org/10.15562/phytomedicine.2019.93>.
- (19) Ortiz-Andrade, R.; Cabañas-Wuan, A.; Arana-Argáez, V. E.; Alonso-Castro, A. J.; Zapata-Bustos, R.; Salazar-Olivo, L. A.; Domínguez, F.; Chávez, M.; Carranza-Álvarez, C.; García-Carrancá, A. Antidiabetic Effects of Justicia Spicigera Schltld (Acanthaceae). *J Ethnopharmacol* **2012**, *143* (2), 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.043>.
- (20) Gomez-Verjan, J. C.; Reyes-Chilpa, R.; Aguilar, M. I. Chemistry and Pharmacology of Selected Asian and American Species of Justicia. *Bioactive Phytochemicals: Perspectives for Modern Medicine Vol. 1* **2012**, *1* (1), 400–418.
- (21) Dey, S.; Paul, R. Exploration of Knowledge on New Ethno-Botanical Value of Justicia Spicigera Schltld. *Global Journal of Research on Medicinal Plants and Indigenous Medicine* **2016**, *5* (10), 261–266.
- (22) Mora Zambrano, P.; Bustamante Pesantes, K. E. Caracterización y Estudio Fitoquímico de Justicia Secunda Valh (Sanguinaria , Singamochilla , Insulina). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* **2017**, *22* (1), 1–8.
- (23) Giovannini, P.; Howes, M.-J. R. Medicinal Plants Used to Treat Snakebite in Central America: Review and Assessment of Scientific Evidence. *J Ethnopharmacol* **2017**, *199*, 240–256. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2017.02.011>.
- (24) Vandebroek, I. Intercultural Health and Ethnobotany: How to Improve Healthcare for Underserved and Minority Communities? *J Ethnopharmacol* **2013**, *148* (3), 746–754. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.039>.
- (25) Valussi, M.; Scirè, A. S. Quantitative Ethnobotany and Traditional Functional Foods. *Nutrafoods* **2012**, *11* (3), 85–93. <https://doi.org/10.1007/s13749-012-0032-0>.
- (26) Newmaster, S. G.; Ragupathy, S. Ethnobotany Genomics: Discovery and Innovation in a New Era of Exploratory Research. *J Ethnobiol Ethnomed* **2010**, *6*, 277–298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1746-4269-6-2>.

- (27) De Silva, D. D.; Rapior, S.; Sudarman, E.; Stadler, M.; Xu, J.; Aisyah Alias, S.; Hyde, K. D. Bioactive Metabolites from Macrofungi: Ethnopharmacology, Biological Activities and Chemistry. *Fungal Divers* **2013**, *62* (1), 1–40. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0265-2>.
- (28) Reyes-Silva, J. A.; Salazar-Campos, A.; Ríos-Cortes, H. H. Metabolitos Secundarios de Las Plantas (Angiospermas) y Algunos Usos Interesantes Secondary Metabolites of Plants (Angiosperms) and Some Interesting Uses. *Uno Sapiens Boletín Científico De La Escuela Preparatoria* **2020**, *4* (4), 16–18.
- (29) Navarrete, T.; Del Carmen, S.; Padilla, N.; Martínez, M. T.; Calixto, G.; Robles, A.; García, M. Propiedades Hipoglucemiantes de La Especie Justicia Spicigera Schlechtendal (Scrophulariales: Acanthaceae). *Métodos en Ecología y Sistemática* **2016**, *11* (1), 24–33.
- (30) Sudheer, W. N.; Praveen, N. Phytochemical, Pharmacological and Tissue Culture Studies of Some Important Species of the Genus Barleria L. (Acanthaceae) - a Review. *Plant Science Today* **2021**, *8* (3), 491–500. <https://doi.org/10.14719/PST.2021.8.3.1117>.
- (31) Zakaria, S. M.; Amri, C. N. A. C.; Shahari, R. Ethnobotany and Traditional Knowledge of Acanthaceae in Peninsular Malaysia: A Review. *Pharmacognosy Journal* **2020**, *12* (6), 1482–1488. <https://doi.org/10.5530/PJ.2020.12.203>.
- (32) Khan, I.; Ahmad Jan, S.; Shinwari, Z.; Ali, M.; Khan, Y.; Taweer, K. Ethnobotany and Medicinal Uses of Folklore Medicinal Plants Belonging to Family Acanthaceae: An Updated Review. *MOJ Biology and Medicine* **2017**, *1* (2), 34–38. <https://doi.org/10.15406/mojbm.2017.01.00009>.
- (33) Girón, N.; Salas, R. Evaluación de La Actividad Antidiabética y Antioxidante in Vitro de Extractos Polares de Justicia Spicigera y Elucidación Estructural de Los Compuestos Fenólicos Mayoritarios. **2013**.
- (34) Ejovi, O.; Hamilton-amachree, A. Comparative Study on the Phytochemical and in Vitro Antioxidant Properties of Methanolic Leaf Extract of Justicia Secunda Vahl. *Nigerian Journal of Science and Environment* **2017**, *15* (1), 111–117.
- (35) García, B. A.; Sumba, C. M. Análisis Del Comportamiento de Los Psrámetros Bioquímicos En Pacientes Diabéticos Tipo II, Que Consumen La Infusión de Justicia Secunda (Planta de Insulina), Como Coadyuvante En Su Terapia y Que Integran El Blub de Diabéticos Del Cantón Palestina Guayas. **2015**.
- (36) Morales Cervantes, J. L.; Murillo Villicaña, M.; Mora Martínez, J. A.; Saavedra Molina, F. A. Efecto Hipoglucémico Del Extracto Etanólico de Justicia Spicigera En Ratas Diabéticas. *Tlamati Sabiduría* **2016**, *7* (Número Especial 2).
- (37) Samuel, F.; Luna, S. Extracción e Identificación de Los Metabolitos Secundarios Con Capacidad Tintórea de Justicia Spicigera Schltd Para Su Posible Uso Cosmético Extracción e Identificación de Los Metabolitos Secundarios Con Capacidad Tintórea de Justicia Spicigera Schltdl Pa. **2018**.

- (38) Girón, N. Evaluación de La Actividad Antidiabética y Antioxidante in Vitro de Extractos Polares de Justicia Spicigera y Elucidación Estructural de Los Compuestos Fenólicos Mayoritarios. **2015**.
- (39) Calderón, A. I.; Hodel, A.; Wolfender, J. L.; Gupta, M. P.; Correa, M.; Hostettmann, K. LC-DAD-MS-Based Metabolite Profiling of Three Species of Justicia (Acanthaceae). *Nat Prod Res* **2013**, 27 (15), 1335–1342. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.738207>.
- (40) Sharma, K.; Zafar, R. Occurrence of Taraxerol and Taraxasterol in Medicinal Plants. *Pharmacogn Rev* **2015**, 9 (17), 19–23. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.156317>.
- (41) Wang, S. Z.; Pan, L.; Hu, K.; Chen, C. Y.; Ding, Y. Development and Characterization of Polymorphic Microsatellite Markers in Momordica Charantia (Cucurbitaceae). *Am J Bot* **2010**, 97 (8), 75–78. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000153>.
- (42) Rajasree, R. S.; Sibi, P. I.; Francis, F.; William, H. Phytochemicals of Cucurbitaceae Family – A Review. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **2016**, 8 (1), 113–123.
- (43) Asadi-Samani, M.; Moradi, M. T.; Mahmoodnia, L.; Alaei, S.; Asadi-Samani, F.; Luther, T. Traditional Uses of Medicinal Plants to Prevent and Treat Diabetes; an Updated Review of Ethnobotanical Studies in Iran. *J Nephropathol* **2017**, 6 (3), 118–125. <https://doi.org/10.15171/jnp.2017.20>.
- (44) Pulido, J. B. Plantas Medicinales Silvestres y/o Naturalizadas En La Península de Araya, Estado Sucre, Venezuela. *Agrobiología* **2017**, 29 (August), 326–339.
- (45) A. Al-Bahrani, M. H. The Role of Momordica Charantia in Reducing the Level of Glucose in Mice. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* **2016**, 5 (8), 470–478. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.508.050>.
- (46) Khalid, Z.; Mona Hassan, S.; Sharif Mughal, S.; Khurram Hassan, S.; Hassan, H. Phenolic Profile and Biological Properties of Momordica Charantia. *Chemical and Biomolecular Engineering* **2021**, 6 (1), 17. <https://doi.org/10.11648/j.cbe.20210601.13>.
- (47) Ssenku, J. E.; Okurut, S. A.; Namuli, A.; Kudamba, A.; Tugume, P.; Matovu, P.; Wasige, G.; Kafeero, H. M.; Walusansa, A. Medicinal Plant Use, Conservation, and the Associated Traditional Knowledge in Rural Communities in Eastern Uganda. *Trop Med Health* **2022**, 50 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s41182-022-00428-1>.
- (48) Akwongo, B.; Katuura, E.; Nsubuga, A. M.; Tugume, P.; Andama, M.; Anywar, G.; Namaganda, M.; Asimwe, S.; Kakudidi, E. K. Ethnobotanical Study of Medicinal Plants Utilized in the Management of Candidiasis in Northern Uganda. *Trop Med Health* **2022**, 50 (1). <https://doi.org/10.1186/s41182-022-00471-y>.
- (49) Sathish Kumar, D.; Vamshi Sharathnath, K.; Yogeswaran, P.; Harani, A.; Sudhakar, K.; Sudha, P.; Banji, D. A Medicinal Potency of Momordica Charantia. *Int. J Pharm Sci Rev Res* **2010**, 1 (2), 95–100.

- (50) Abdollahi, M.; Zuki, A. B. Z.; Rezaeizadeh, A.; Goh, Y. M.; Noordin, M. M. Effects of Momordica Charantia Aqueous Extract on Renal Histopathological Changes Associated with Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus Type II in Neonatal Rats. *Histol Histopathol* **2011**, *26*, 13–21.
- (51) Mohammady, I.; Elattar, S.; Mohammed, S.; Ewais, M. An Evaluation of Anti-Diabetic and Anti-Lipidemic Properties of Momordica Charantia (Bitter Melon) Fruit Extract in Experimentally Induced Diabetes. *Life Sci J* **2012**, *9* (2), 363–374.
- (52) Ooi, C. P.; Yassin, Z.; Hamid, T. A. Momordica Charantia for Type 2 Diabetes Mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2012**, No. 8. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007845.pub3>.
- (53) Rankin, E. P. Práctica de Medicina Tradicional En La Comunidad Afrodescendientes Creole de Bilwi. *Wani* **2012**, *66*, 35–38. <https://doi.org/10.5377/wani.v66i0.890>.
- (54) Teoh, S. L.; Latiff, A. A.; Das, S. Histological Changes in the Kidneys of Experimental Diabetic Rats Fed with Momordica Charantia (Bitter Gourd) Extract. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* **2010**, *51* (1), 91–95.
- (55) American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **2014**, *37* (SUPPL.1), 581–590. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>.
- (56) Eddouks, M.; Bidi, A.; El Bouhali, B.; Hajji, L.; Zeggwagh, N. A. Antidiabetic Plants Improving Insulin Sensitivity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2014**, *66* (9), 1197–1214. <https://doi.org/10.1111/jphp.12243>.
- (57) Katsarou, A.; Gudbjörnsdottir, S.; Rawshani, A.; Dabelea, D.; Bonifacio, E.; Anderson, B. J.; Jacobsen, L. M.; Schatz, D. A.; Lernmark, A. Type 1 Diabetes Mellitus. *Nat Rev Dis Primers* **2017**, *3* (March), 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>.
- (58) Raut, S.; Tiwaskar, S.; Umate, R. A Review On Diabetes Mellitus. *World J Pharm Pharm Sci* **2022**, *13* (October), 172–177. <https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.S08.26>.
- (59) Cortez-Navarrete, M.; Martínez-Abundis, E.; Pérez-Rubio, K. G.; González-Ortiz, M.; Méndez-Del Villar, M. Momordica Charantia Administration Improves Insulin Secretion in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Med Food* **2018**, *21* (7), 672–677. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0114>.
- (60) Pop-Busui, R.; Boulton, A. J. M.; Feldman, E. L.; Bril, V.; Freeman, R.; Malik, R. A.; Sosenko, J. M.; Ziegler, D. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* **2017**, *40* (1), 136–154. <https://doi.org/10.2337/dc16-2042>.
- (61) Abbott, C. A.; Malik, R. A.; Van Ross, E. R. E.; Kulkarni, J.; Boulton, A. J. M. Prevalence and Characteristics of Painful Diabetic Neuropathy in a Large Community-Based Diabetic Population in the U.K. *Diabetes Care* **2011**, *34* (10), 2220–2224. <https://doi.org/10.2337/dc11-1108>.

- (62) Feldman, E. L.; Callaghan, B. C.; Pop-Busui, R.; Zochodne, D. W.; Wright, D. E.; Bennett, D. L.; Bril, V.; Russell, J. W.; Viswanathan, V. Diabetic Neuropathy. *Nat Rev Dis Primers* **2019**, *5* (1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0092-1>.
- (63) Kaur, S.; Pandhi, P.; Dutta, P. Painful Diabetic Neuropathy: An Update. *Ann Neurosci* **2011**, *18* (4), 168–175. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.1118409>.
- (64) Callaghan, B. C.; Little, A. A.; Feldman, E. L.; Hughes, R. A. Enhanced Glucose Control for Preventing and Treating Diabetic Neuropathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2012**, No. 6. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd007543.pub2>.
- (65) Junxiong Ma; Hailong Yu; Jun Liu; Yu Chen; Qi Wang; Liangbi Xiang. Metformin Attenuates Hyperalgesia and Allodynia in Rats with Painful Diabetic Neuropathy Induced by Streptozotocin. *Eur J Pharmacol* **2015**, *764*, 599–606. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.06.010>.
- (66) Sarraulte, G. V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SÍNDROME REGIONAL COMPLEJO: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. **2015**, *32* (2).
- (67) Vlassara, H.; Palace, M. R. Diabetes and Advanced Glycation Endproducts. *Journal of Internal Medicine*. 2002, pp 87–101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.00932.x>.
- (68) Carvajal Carvajal, C. Productos Finales de Glicación (AGES) y La Nefropatía Diabética. *Medicina Legal de Costa Rica* **2015**, *32* (1), 154–160.
- (69) Singh, V. P.; Bali, A.; Singh, N.; Jaggi, A. S. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* **2014**, *18* (1), 1–14. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.1.1>.
- (70) Fuentes, M.; Olmos, P.; Santos, J. L. Productos Finales de Glicación Avanzada (AGEs) y Su Importancia En Enfermedades Crónicas Relacionadas Con La Nutrición. *Revista chilena de endocrinología y diabetes* **2015**, *8* (2), 70–77.
- (71) Nowotny, K.; Jung, T.; Höhn, A.; Weber, D.; Grune, T. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules*. MDPI AG March 16, 2015, pp 194–222. <https://doi.org/10.3390/biom5010194>.
- (72) Rhee, S. Y.; Kim, Y. S. The Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Vascular Complications. *Diabetes Metab J* **2018**, *42* (3), 188–195. <https://doi.org/10.4093/dmj.2017.0105>.
- (73) Ta, C. A. K.; Guerrero-Analco, J. A.; Roberts, E.; Liu, R.; Mogg, C. D.; Saleem, A.; Otárola-Rojas, M.; Poveda, L.; Sanchez-Vindas, P.; Cal, V.; Caal, F.; Subramaniam, R.; Smith, M. L.; Arnason, J. T. Antifungal Saponins from the Maya Medicinal Plant *Cestrum Schlechtendahl* G. Don (Solanaceae). *Phytotherapy Research* **2016**, *30* (3), 439–446. <https://doi.org/10.1002/ptr.5545>.
- (74) Derbré, S.; Gatto, J.; Pelleray, A.; Coulon, L.; Séraphin, D.; Richomme, P. Automating a 96-Well Microtiter Plate Assay for Identification of Ages Inhibitors or Inducers: Application to

the Screening of a Small Natural Compounds Library. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *398* (4), 1747–1758. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00216-010-4065-1>.

- (75) Courteix, C.; Eschalier, A.; Lavarenne, J. Streptozocin-Induced Diabetic Rats: Behavioural Evidence for a Model of Chronic Pain. *Pain* **1993**. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(93\)90059-X](https://doi.org/10.1016/0304-3959(93)90059-X).
- (76) Bruce, R. D. An Up-and-down Procedure for Acute Toxicity Testing. *Toxicological Sciences* **1985**. <https://doi.org/10.1093/toxsci/5.1.151>.
- (77) Conde, E.; Cadahía, E.; García-Vallejo, M. Optimization of TLC for Research on the Flavonoids in Wood and Bark of Species of the Genus *Eucalyptus* L'Héritier. *Chromatographia* **1992**, *33* (9), 418–426.
- (78) Foti, M.; Daquino, C.; Geraci, C. Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH•Radical in Alcoholic Solutions. *J Org Chem* **2004**, *69* (7), 2309–2314.
- (79) Matteini, P.; Agati, G.; Pinelli, P.; Goti, A. Modes of Complexation of Rutin with the Flavonoid Reagent Diphenylborinic Acid 2-Aminoethyl Ester. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **2011**, *142* (9), 885–893.
- (80) Spangenberg, B. Derivatization, Detection (Quantification), and Identification of Compounds Online. En: M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma and T. Kowalska. In *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*; Press, CRC: Boca Raton, Florida, **2008**; pp 175–192.
- (81) Wagner, H.; Bladt, S. *Plant Drug Analysis*, 2nd ed.; Springer: Berlin, **1996**.
- (82) Waksmundzka-Hajnos, M. Sherma, J.; Kowalska, T. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*; CRC Press: Boca Raton, Florida, **2008**.

Apéndice A

Tabla 3. Protocolo de antidiabéticos utilizado en Laboratorio de Farmacología Pre-clínica; CICESE-Centro CONACYT

Protocolo de antidiabéticos.			Colaboración: Dra. Ana Francis Carballo Arce(LABORATORIO DE QUIMICA BIOLÓGICA Y FARMACÉUTICA de la Universidad Nacional de Costa Rica) y la Dra. Nadia Caram Salas (Laboratorio de Farmacología Pre-clínica; CICESE-Centro CONACYT)				
Extracto	Dosis (mg/kg de peso)	Animales	Tiempo inducción diabetes por STZ	Evaluación efecto hipoglucemiante	Evaluación efecto antiadolinico	Gráficas, reporte y análisis de resultados	Total en tiempo
1	1	4	10 día	día 11 evaluar	día 28 evaluar	3 semanas	
	2	4	11 día	12 evaluar	29 evaluar		3.5 meses
	3	4	12 día	13 evaluar	30 evaluar		
2	1	4	13 día	14 evaluar	31 evaluar		
	2	4	14 día	15 evaluar	32 evaluar		
	3	4	15 día	16 evaluar	33 evaluar		
3	1	4	16 día	17 evaluar	34 evaluar		
	2	4	17 día	18 evaluar	35 evaluar		
	3	4	18 día	19 evaluar	36 evaluar		
4	1	4	19 día	20 evaluar	37 evaluar		
	2	4	20 día	21 evaluar	38 evaluar		
	3	4	21 día	22 evaluar	39 evaluar		
Control positivo	1	4					
Control negativo	1	4					
Ratas normales	-	5					
Total de animales		61					

Apéndice B

Metodología HPTLC – Caracterización fitoquímica

Se prepararon soluciones de 1 mg / ml a partir de extractos de *Justicia secunda*, *Justicia spicigera* y *Momordica charantia* (variedades Sorosí y Bitter Melon).

Se realizaron cromatografías en capa fina de alto desempeño (HPTLC) mediante el Sistema HPTLC de la marca comercial CAMAG. El cual, está compuesto de un muestreador ATS 4 (Automatic TLC Sampler 4), una cámara para el desarrollo de cromatografías ADC 2 (Automatic Developing Chamber 2), un equipo para la toma de imágenes (Visualizer), uno para la derivatización (Derivatizer) y una interfaz compuesta de un ordenador provisto del software de gestión VisionCATS de CAMAG. La fase estacionaria empleada fueron cromatofolios HPTLC Silica Gel 60 F₂₅₄ con dimensiones de 20 cm X 10 cm y soporte de vidrio (Merck).

Aplicación de muestras: se aplicaron 3 a 4 alícuotas de cada extracto, con un volumen de 20 a 50 µl de mediante el ATS 4 (15 aplicaciones por placa). Las muestras se dispensaron a una altura de 8 mm, cada aplicación tenía 8 mm de largo. El ATS 4 empleó gas nitrógeno para la aplicación en aerosol de las muestras.

Desarrollo de las cromatografías: las cromatografías se realizaron en el ADC 2. La fase móvil empleada tenía la siguiente composición: acetato de etilo, diclorometano, ácido acético, ácido fórmico, agua (100:25:10:10:11). Se emplearon 25 ml de fase móvil para la saturación de la cámara y 10 ml para la cromatografía.

La cromatografía consistió de una etapa de saturación de 20 minutos, 10 minutos de una etapa activación con MgCl₂ (a fin de llevar la humedad relativa al 33%), el desarrollo de la cromatografía hasta los 70 mm de altura y el secado de la placa por 5 minutos.

Captura de imágenes y cálculo de R_fs: el registro fotográfico de las exposiciones a luz visible, luz ultravioleta a 254 nm y 366 nm, las derivatizaciones y cálculo de R_fs se realizaron con el Visualizer en conjunto con el software VisionCATS de CAMAG.

Derivatizaciones: la aplicación de agentes derivatizantes se realizó mediante el Derivatizer de CAMAG. Se emplearon los siguientes agentes derivatizantes: el reactivo de productos naturales (2-amino etil difenil borinato), DPPH, anisaldehído, vainillina, fast blue salt B y reactivo de Dragendorff. Estos reactivos, se prepararon y aplicaron acorde a las instrucciones del fabricante del Derivatizer. En los casos en que las derivatizaciones lo ameritaran, se calentó el cromatograma empleando el TLC Plate Heater de CAMAG.

Procesamiento de datos: se exportaron imágenes de cada cromatograma y se realizaron las determinaciones de familias químicas presentes (chemical fingerprints) a partir de vistas comparativas de imágenes (image comparison views) preparadas mediante el software VisionCATS de CAMAG.

Interpretación de las derivatizaciones: la determinación de las familias químicas presentes en los extractos se realizó mediante la comparación de los resultados de las derivatizaciones con literatura especializada. En particular, las obras de Conde et al (1992), Foti et al (2004), Matteini et al (2011), Spangenberg (2008), Wagner y Bladt (1996) y Waksmundzka-Hajnos et al (2008).⁷⁷⁻⁸²

Apéndice C

Cromatogramas

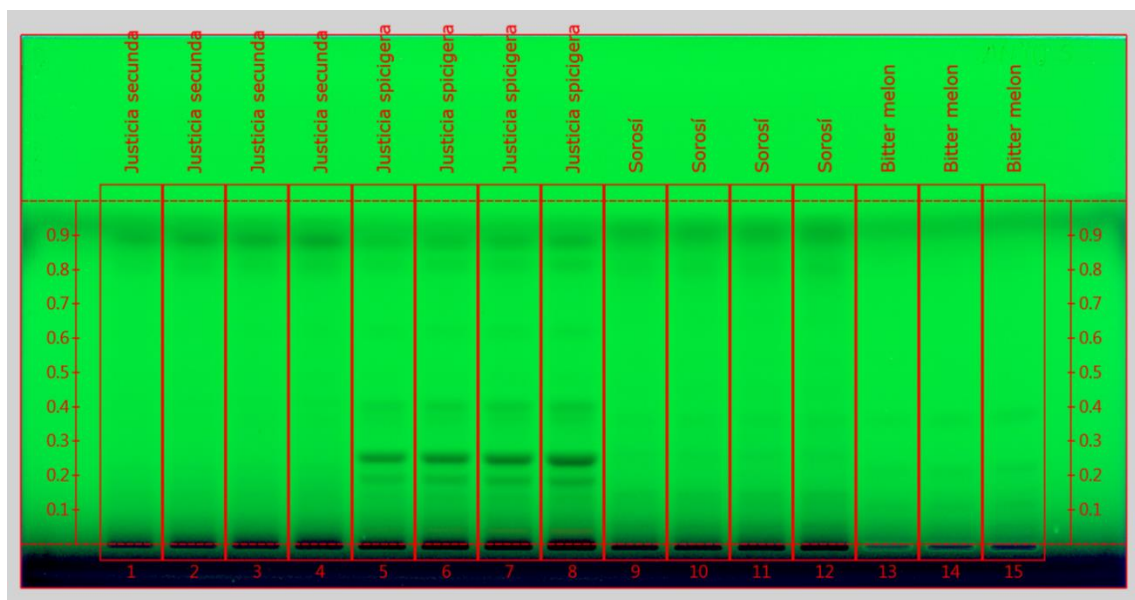


Figura 46. Cromatografía HPTLC de extractos de *Justicia secunda*, *Justicia spicigera* y *Momordica charantia* (variedades Sorosí y Bitter Melon). Exposición de cromatograma a luz ultravioleta a 254 nm.

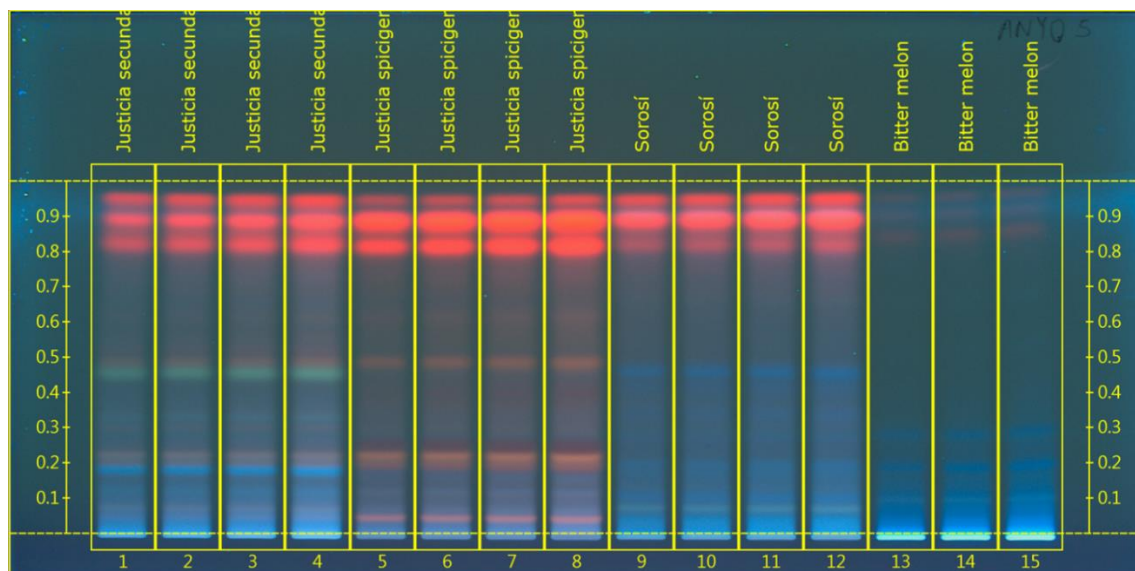


Figura 47. Cromatografía HPTLC de extractos de *Justicia secunda*, *Justicia spicigera* y *Momordica charantia* (variedades Sorosí y Bitter Melon). Exposición de cromatograma a luz ultravioleta a 366 nm.

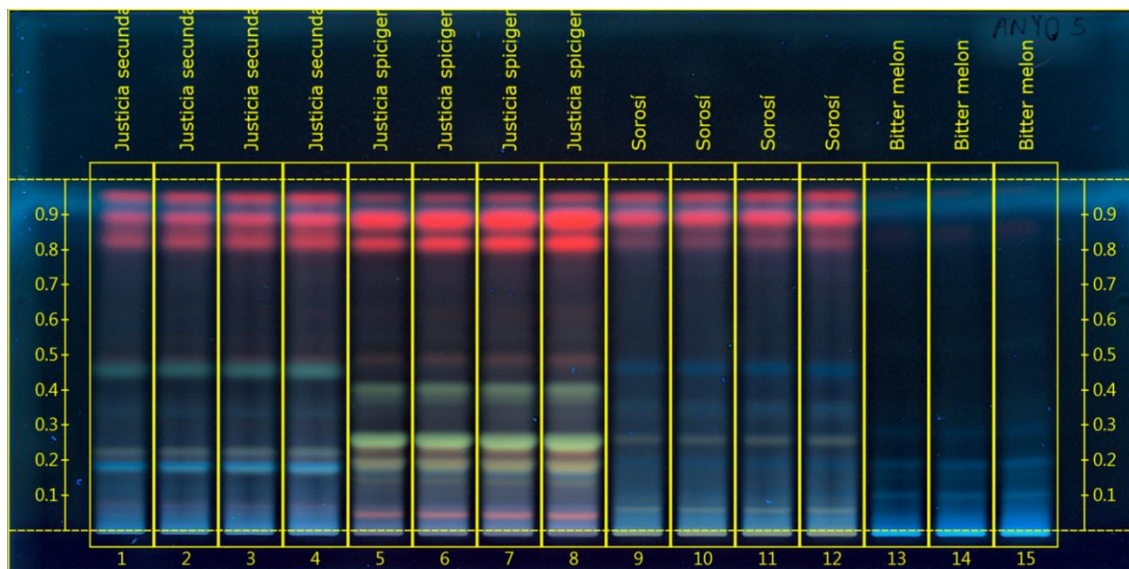


Figura 48. Cromatografía HPTLC de extractos de *Justicia secunda*, *Justicia spicigera* y *Momordica charantia* (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de productos naturales y exposición del cromatograma a luz ultravioleta a 366 nm.

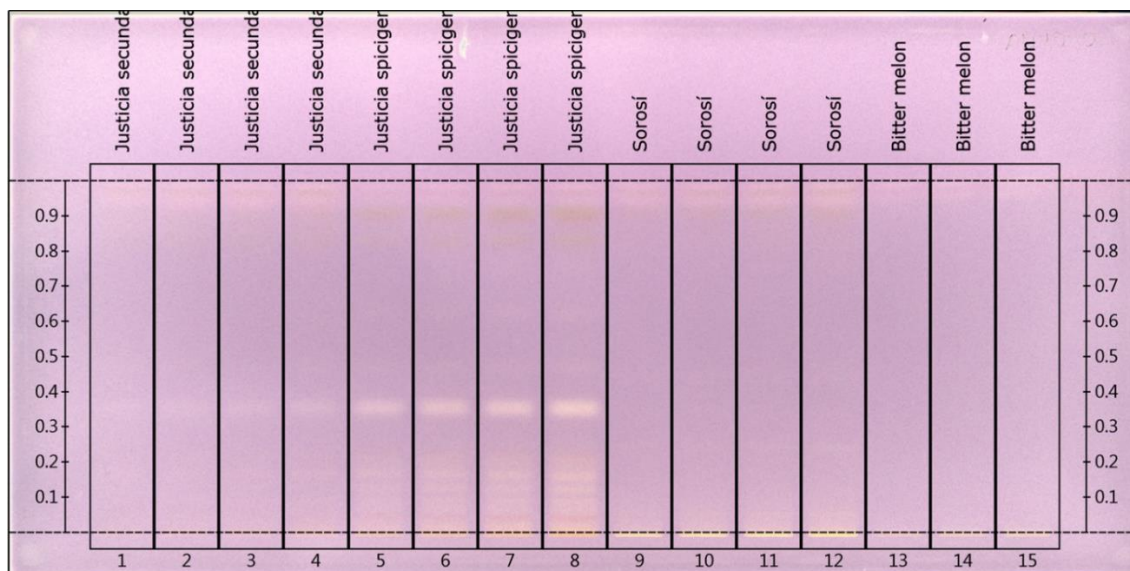


Figura 49. Cromatografía HPTLC de extractos de *Justicia secunda*, *Justicia spicigera* y *Momordica charantia* (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con DPPH y exposición del cromatograma a luz visible.

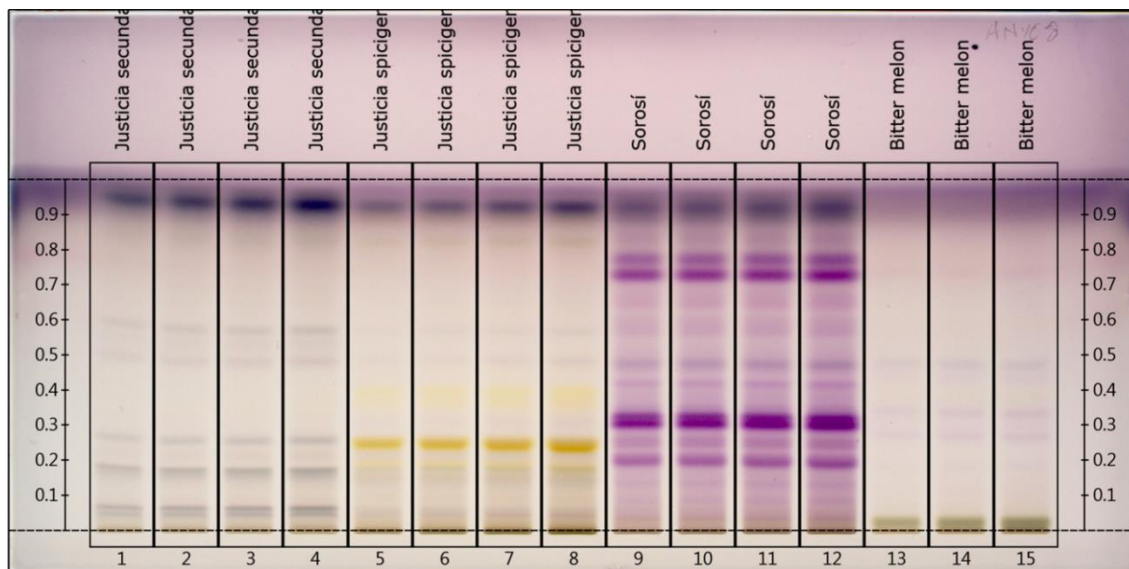


Figura 50. Cromatografía HPTLC de extractos de *Justicia secunda*, *Justicia spicigera* y *Momordica charantia* (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de anisaldehído y exposición del cromatograma a luz visible.

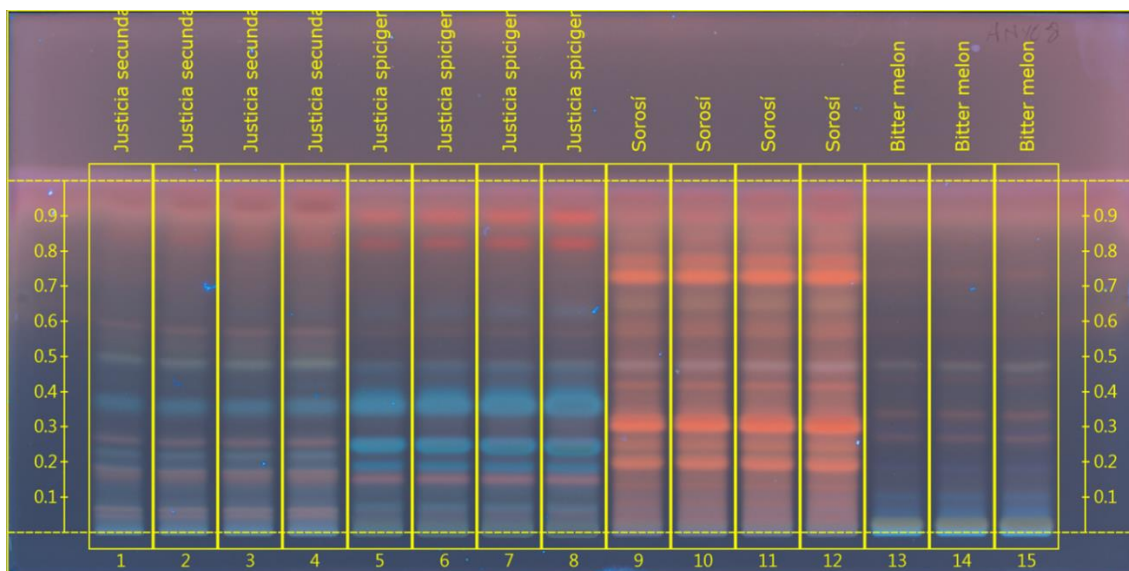


Figura 51. Cromatografía HPTLC de extractos de *Justicia secunda*, *Justicia spicigera* y *Momordica charantia* (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de anisaldehído y exposición del cromatograma a luz ultravioleta a 366 nm.

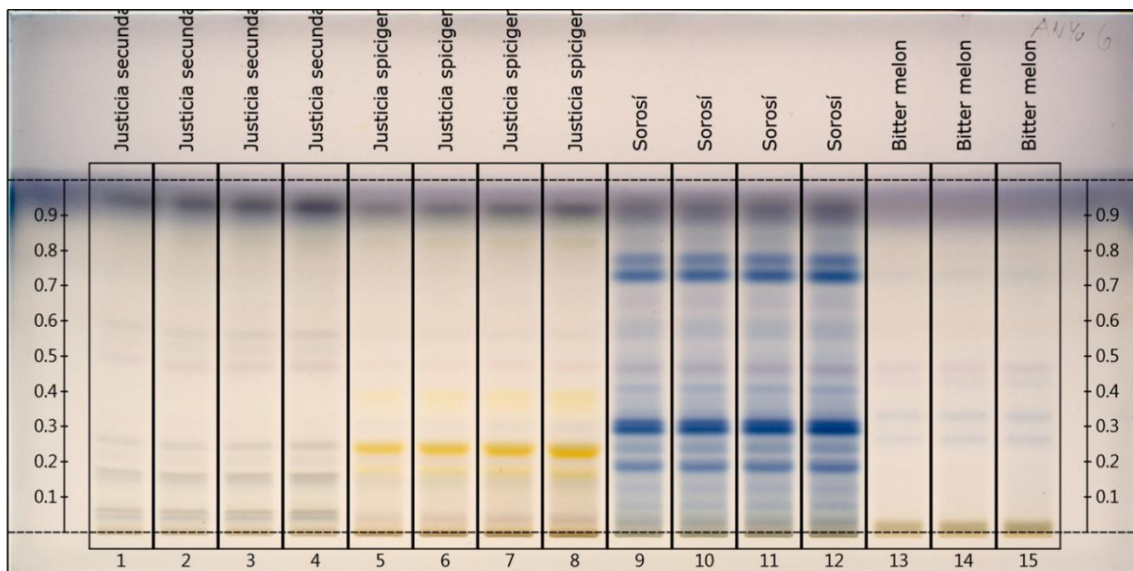


Figura 52. Cromatografía HPTLC de extractos de *Justicia secunda*, *Justicia spicigera* y *Momordica charantia* (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de vainillina y exposición del cromatograma a luz visible.

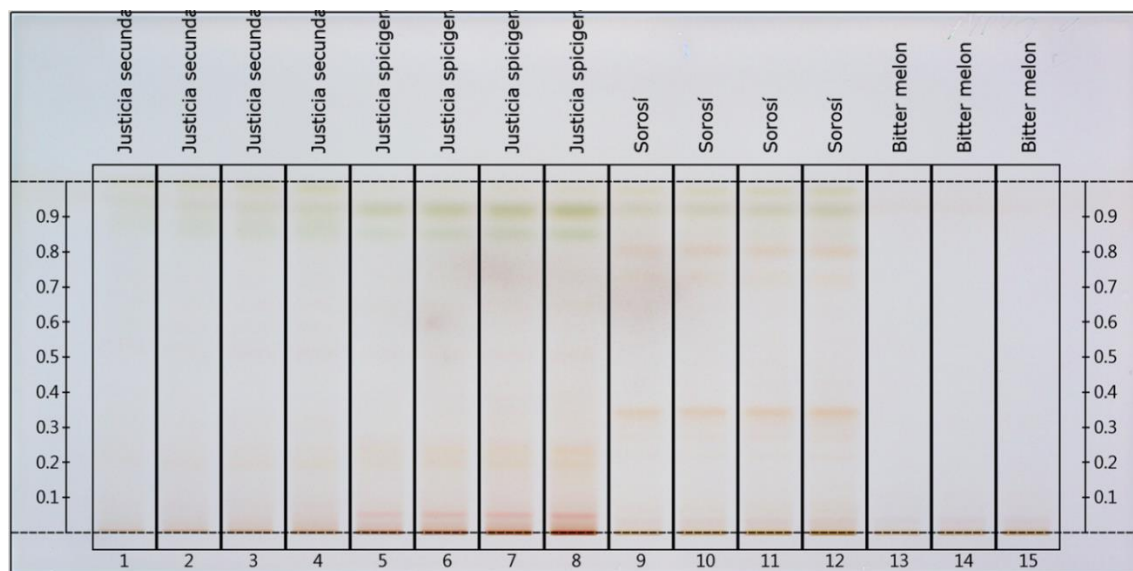


Figura 53. Cromatografía HPTLC de extractos de *Justicia secunda*, *Justicia spicigera* y *Momordica charantia* (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de fast blue salt B y exposición del cromatograma a luz visible.

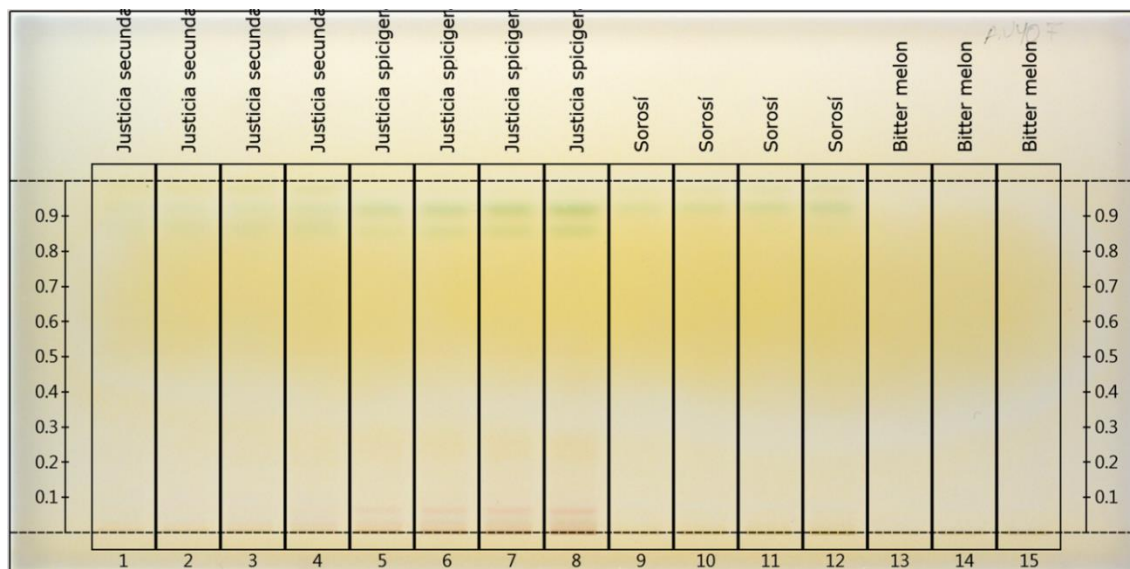


Figura 54. Cromatografía HPTLC de extractos de *Justicia secunda*, *Justicia spicigera* y *Momordica charantia* (variedades Sorosí y Bitter Melon). Derivatización con el reactivo de Dragendorff y exposición del cromatograma a luz visible.

Apéndice D

Protocolo para determinar “Actividad inhibitoria sobre la formación de AGE’s”

Reactivos

- D-ribosa
- Bicarbonato de aminoguanidina
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4)
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)
- Agua destilada (H_2O)
- Ácido Clorhídrico 1:1 (HCl)

Preparación de la disolución de ribosa (2 M)

Para la preparación de la disolución de D-ribosa, se pesó 0.3000 g del reactivo en una balanza analítica. Seguidamente se colocó los 0.3000 g de D-ribosa en un tubo Eppendorf de 2 μL y se dejó a un lado. Debido a la inestabilidad de la ribosa, se introdujo 1 mL de agua destilada al tubo Eppendorf para diluir la D-ribosa cuando la placa ya se encontraba con el resto de los reactivos. Se llevó la disolución a un agitador Vórtex por 2-3 segundos.

Preparación de la disolución madre del Buffer (2 M, pH= 7.4)

Con una balanza analítica, se pesó 1.771 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4) sobre papel de pesar. Además, se tomó de la misma manera 1.361 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y se añadió ambos reactivos anteriormente pesados a un vial. A continuación, 5 mL de agua destilada se añadieron al vial para diluir la preparación del buffer. Una vez diluida, se ajustó el pH de la mezcla a 7.4. Finalmente, se aforó con agua destilada el vial a 10 mL.

Preparación de la disolución del Buffer + NaN_3 + BSA

En una balanza analítica, se pesaron 0.008 g y 0.4 g de azida de sodio (NaN_3) y albúmina de suero bovino, respectivamente. Se colocaron ambos reactivos en un vial de 20 mL y se añadió 5 mL de agua destilada al mismo. Durante cortos tiempos, se agitó suavemente hasta que la disolución se encontrara diluida y sin burbujas. Tras haberse solubilizado los sólidos, se agregó 1 mL de la disolución madre del buffer y 4 mL de agua destilada. Por último, se agitó

y se dejó reposar por al menos 24 horas. La disolución es estable con el tiempo, por lo que esta se almacenó a 4 °C para su uso en distintos ensayos.

Preparación de la disolución de aminoguanidina

Se pesó en una balanza analítica sobre papel para pesar 0,0681 g de bicarbonato de aminoguanidina y se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL. Dentro de la capilla de extracción, se añadió 150 µL de HCl 1:1. Se agregó 300 µL de agua destilada y se agitó. Por último, si la disolución se encontraba homogenizada, se añadía los 50 µL de agua destilada, si era lo contrario, se adicionaba 50 µL de HCl 1:1.

Preparación de los extractos y las diluciones

La disolución madre del extracto se preparó en una concentración de 5 mg/mL en etanol al 70% con la ayuda del ultrasónico para disolver el material liofilizado. Luego se realizaron disoluciones seriadas de los extractos con concentraciones finales de 0.5000, 0.0500, 0.0050 y 0.0005 mg/mL; y luego se modificaron a 2.50, 1.00, 0.50, 0.10, 0.01 mg/mL.

Preparación de la placa de 96 pocillos

En una microplaca de 96 pocillos, se añadió 100 µL de agua destilada en los pocillos alrededor del borde de esta. De los pocillos restantes, se llenaron con 50 µL de la muestra correspondiente, 25 µL del buffer + NaN₃ + BSA y 25 µL de la disolución de D-ribosa recién preparada. Esto se realizó por triplicado. Se prepararon blancos de cada una de las muestras con 50 µL de la disolución correspondiente, 25 µL del buffer + NaN₃ + BSA y 25 µL de agua. Asimismo, el control positivo se preparó con 50 µL de agua destilada, 25 µL del buffer + NaN₃ + BSA y 25 µL de D-ribosa. Estos dos últimos también se realizaron por triplicado. Una vez que los pocillos fueron llenados, se llevó la placa a incubar por 24 horas a 37 °C. Finalmente, se realizó la medición de la absorbancia en el lector de microplacas Biotek Synergy HT.

Preparación de la curva de calibración de aminoguanidina

Se realizaron disoluciones seriadas a partir de la disolución de aminoguanidina previamente preparada. Las concentraciones obtenidas fueron 250.00, 25.00, 5.00, 1.00, 0.25 mM.

Similarmente, se colocó 50 µL de la disolución correspondiente, 25 µL del buffer + NaN₃ + BSA y 25 µL de la disolución de D-ribosa recién preparada. Esto se realizó por triplicado. Se preparó un blanco que contenía 75 µL de agua destilada y 25 µL del buffer + NaN₃ + BSA; y un control positivo que correspondía a 50 µL de agua destilada, 25 µL del buffer + NaN₃ + BSA y 25 µL de la disolución de D-ribosa recién preparada. Estos se prepararon por triplicado. Una vez que los pocillos fueron llenados, se llevó la placa a incubar por 24 horas a 37 °C. Finalmente, se realizó la medición de la absorbancia en el lector de microplacas Biotek Synergy HT.

Determinación del porcentaje de AGE's, IC50, y construcción de las gráficas

De las absorbancias obtenidas se calculó un promedio y se determinó el porcentaje de AGEs por medio de la ecuación 1.

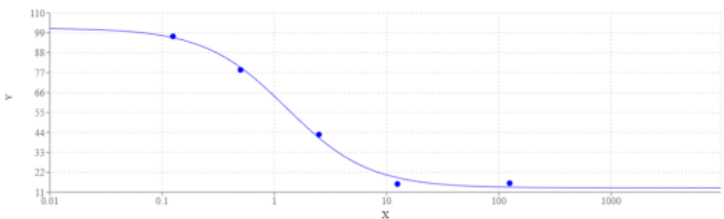
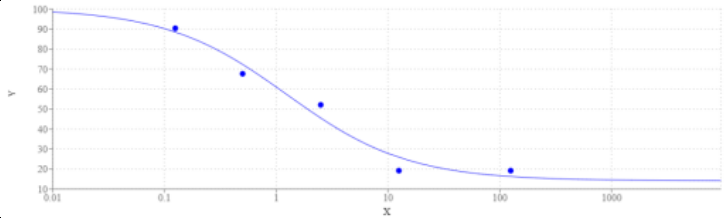
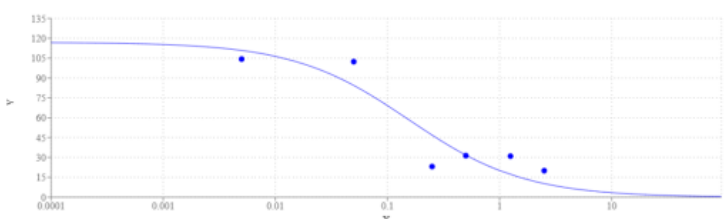
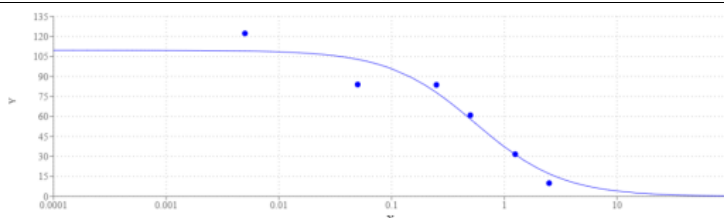
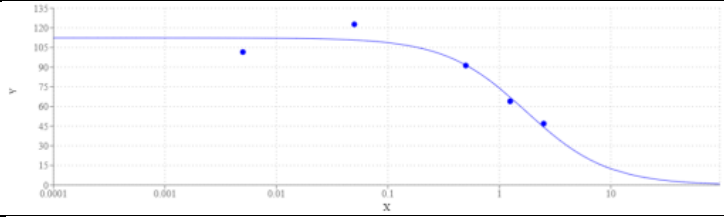
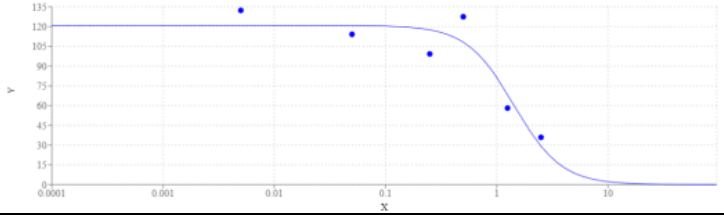
$$\%AGE's = \frac{(\text{Abs de la muestra}) - (\text{Abs del blanco})}{(\text{Abs del positivo}) - (\text{Abs del blanco})} \times 100$$

Donde % AGE's fue el porcentaje de AGE's, Abs de la muestra fue la absorbancia promedio de la muestra, Abs del blanco fue la absorbancia del control blanco, Abs del positivo correspondió a la absorbancia del control positivo. Posteriormente, se utilizó la herramienta IC50 Calculator de AAT Bioquest con el propósito de determinar el valor de la concentración inhibitoria al 50% y obtener gráficas preliminares. Por último, por medio de Microsoft Excel se graficó el porcentaje de AGE's con la concentración de las diluciones de los extractos correspondientes.

Apéndice E

Tablas con gráficos obtenidos para determinación de IC50 en determinación de inhibición de AGE's.

Tabla 4. Resultados obtenidos de IC50 de la curva del porcentaje de AGEs y la concentración de los distintos compuestos o extractos utilizados.

Compuesto o extracto	IC50	Gráfico
Aminoguanidina	1,2862	
	1,2454	
<i>J. spicigera</i>	0,5150	
	0,5549	
<i>J. secunda</i>	1,7378	
	1,4249	

<i>M. charantia</i> (Soros)	1,0146	
	1,9674	
<i>M. charantia</i> (B. melon)	0,3135	
	0,0672	

Apéndice F

Gráficos obtenidos de los resultados para efecto hipoglucemiante de los extractos.

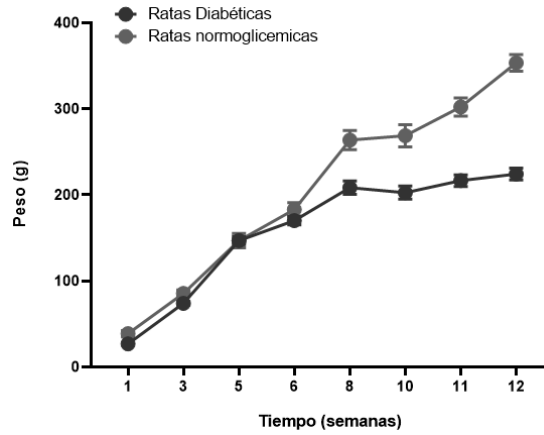


Figura 55. Variación del peso en ratas con diabetes inducida y ratas normoglicémicas al transcurrir las semanas.

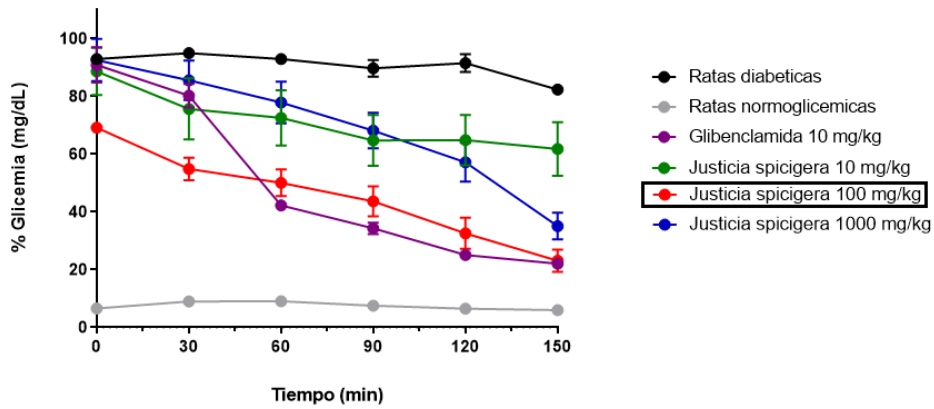


Figura 56. Porcentaje de glicemia con respecto al tiempo al utilizar Glibenclámido como control positivo y extractos de *J. spicigera* en 3 dosis distintas.

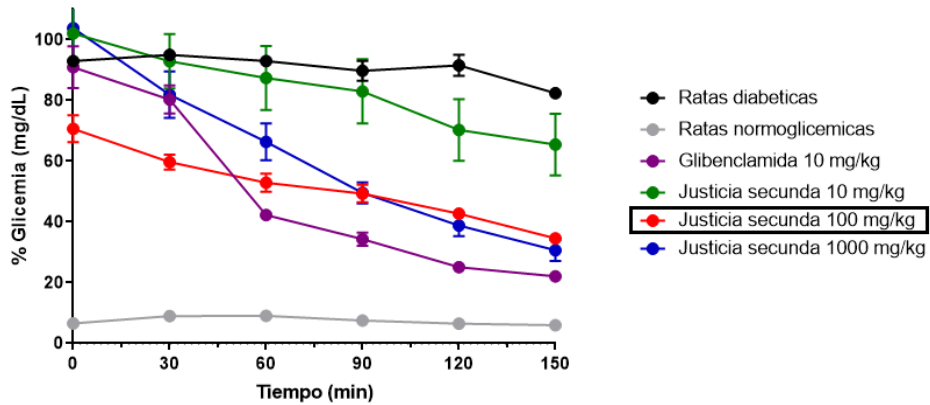


Figura 57. Porcentaje de glicemia con respecto al tiempo al utilizar Glibenclámido como control positivo y extractos de *J. secunda* en 3 dosis distintas.

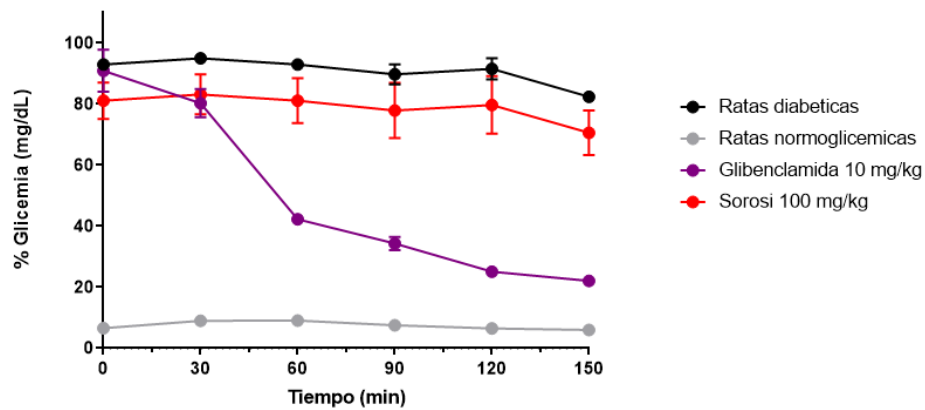


Figura 58. Porcentaje de glicemia con respecto al tiempo al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de *M. charantia* (Sorosi) en 1 dosis.

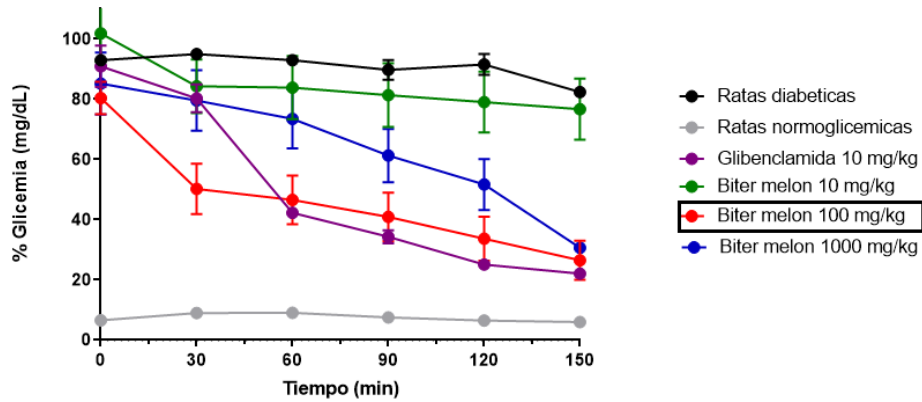


Figura 59. Porcentaje de glicemia con respecto al tiempo al utilizar Glibenclamida como control positivo y extractos de *M. charantia* (B. melon) en 3 dosis distintas.

Apéndice G

Gráficos obtenidos de los resultados para efecto antialodínico de los extractos.

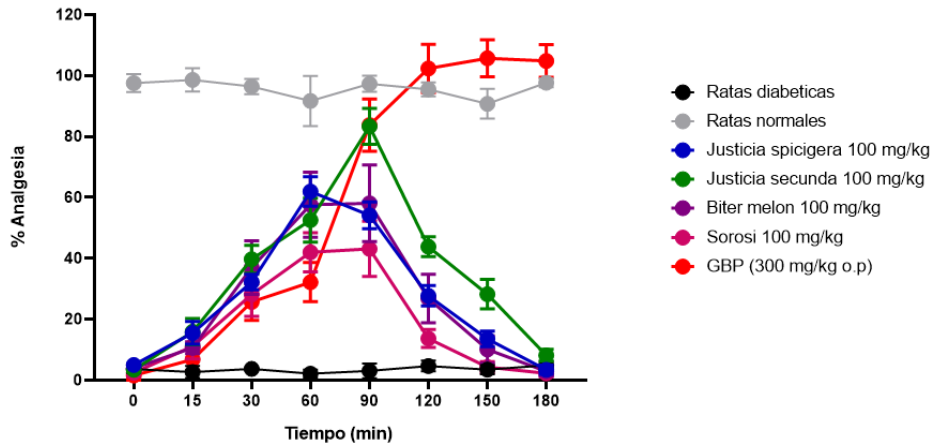


Figura 60. Variación del porcentaje de analgesia con respecto al tiempo al administrar Gabapentina como control positivo y el extracto de las plantas en dosis de 100 mg/kg.

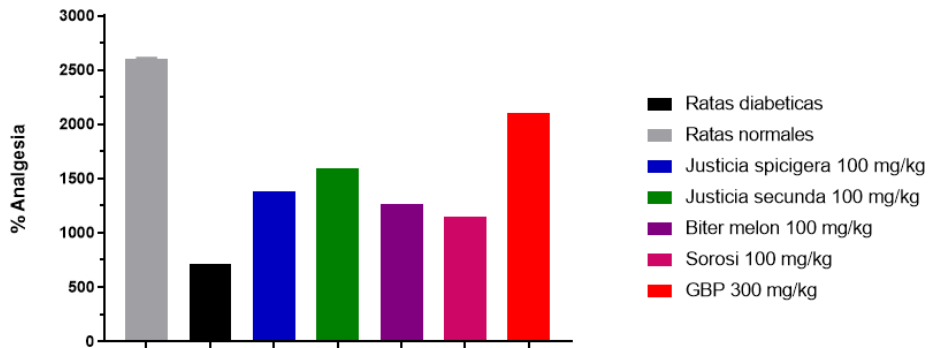


Figura 61. Área bajo la curva del % de analgesia al administrar Gabapentina como control positivo y el extracto de las plantas en dosis de 100 mg/kg.