



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PLANTAS UTILIZADAS
CONTRA LA DIABETES, LA HIPERTENSIÓN Y LA
OBESIDAD EN LA MEDICINA TRADICIONAL MAYA

Tesis que presenta

WENDY DEL CARMEN DZIB GUERRA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México
Diciembre 2015

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PLANTAS UTILIZADAS CONTRA LA DIABETES, LA HIPERTENSIÓN Y LA OBESIDAD EN LA MEDICINA TRADICIONAL MAYA" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, dentro de la Opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México, a 13 de Noviembre de 2015

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán, México, a 17 de noviembre de 2015.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Wendy del Carmen Dzib Guerra', is centered on the page. The signature is written over a light blue rectangular background.

Wendy del Carmen Dzib Guerra

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para mis estudios de Maestría No 366286 y el apoyo de Becas Mixtas para estancia en Cuernavaca; Morelos, 2014.

Al CICY y Unidad de Biotecnología por las instalaciones brindadas y las beca de movilidad otorgada para la estancia en Xochitepec; Morelos, 2015.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez por la confianza brindada al permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su asesoría, enseñanzas y apoyo durante mis estudios de maestría y realización de este proyecto.

Al Dr. Guillermo Ramírez Ávila, el M. en C. Edgar Díaz del CIBIS Xochitepec, al Dr. Samuel Estrada Soto y la M. en C. Angélica Flores Flores de la UAEM, Cuernavaca por compartirme su conocimiento y su colaboración en el trabajo experimental que hicieron posible este proyecto, pero sobre todo por su amistad brindada que hicieron agradables las estancias en Morelos.

A la Dra. Severine Derbré, al Dr. Pascal Richomme por su colaboración y apoyo en el trabajo experimental que forma parte de esta tesis.

Al Dr. Rolffy Ortiz Andrade, al Dr. Sergio Peraza Sánchez y al Dr. Gregorio Godoy Hernández; integrantes del comité tutorial y/o de revisión de la tesis, que con sus comentarios y observaciones oportunas contribuyeron en la realización de este trabajo.

A las técnicas Fabiola Escalante Erosa y Karlina García Sosa por su apoyo profesional y experiencia en el laboratorio para la realización de esta tesis.

Al técnico Paulino Simá Polanco por su ayuda en la identificación y colecta de las especies de plantas.

DEDICATORIA

A Dios por permitir esto posible.

A Papá y Mamá por su confianza y fortaleza para seguir adelante y finalizar ésta meta, por enseñarme que la responsabilidad, perseverancia y compromiso son valores que permiten trascender hacia el éxito.

A Raymundo Llanes por estar siempre a mi lado en alegrías, tristezas, desvelos, aventuras, trabajo y todos los momentos compartidos, pero sobre todo por su apoyo incondicional. Te quiero

A mis hermanos y hermana por sus ánimos y por estar siempre conmigo.

A mis amigos y compañeros dentro y fuera del laboratorio del CICY por su apoyo y por formar parte de esta experiencia.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
CAPITULO I	5
1.1. INTRODUCCCIÓN	5
1.2. ANTECEDENTES.....	7
1.2.1. Enfermedades crónico-degenerativas, problemas de salud de importancia mundial.....	7
1.2.2. Diabetes	7
1.2.3. Hipertensión arterial.....	10
1.2.4. Obesidad	12
1.2.5. Participación de los Productos Finales de Glicación Avanzada (AGEs) en las enfermedades crónico-degenerativas.....	13
1.2.6. Especies reactivas de oxígeno (EROs) asociadas al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas.....	15
1.2.7. Plantas como fuente de fármacos.....	16
1.2.8. Plantas medicinales en México y Yucatán	20
1.2.9. Estudios en la literatura de las plantas seleccionadas	21
1.3. HIPÓTESIS	23
1.4. OBJETIVOS	23
1.4.1. Objetivo general	23
1.4.2. Objetivos específicos.....	23
1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

CAPITULO II	31
ENZYMATIC INHIBITION AND VASORELAXANT EFFECT OF EXTRACTS FROM PLANTS USED TO TREAT DIABETES, HYPERTENSION AND OBESITY IN MAYAN TRADITIONAL MEDICINE	32
2.1. ABSTRACT	33
2.2. INTRODUCTION	35
2.3. MATERIALS AND METHODS	37
2.3.1. Plant material and extraction	37
2.3.2. Inhibition of α -glucosidase activity assay	38
2.3.3. Inhibition assay in pancreatic lipase activity	38
2.3.4. Animals	39
2.3.5. Rat aorta rings test	39
2.3.6. Statistical analysis	39
2.4. RESULTS	40
2.4.1. Enzymatic inhibition of crudes extracts	40
2.4.2. Enzymatic inhibition of fractions from active crude extracts	43
2.4.3. Vasorelaxant effect of crude extracts in rat aortic rings	44
2.5. DISCUSSION AND CONCLUSION	45
2.6. ACKNOWLEDGEMENTS	50
2.7. REFERENCES	51
CAPITULO III	57
ANTI-AGE AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF YUCATECAN MEDICINAL PLANTS	58
3.1. ABSTRACT	59
3.2. INTRODUCTION	60
3.3. MATERIALS AND METHODS	61
3.3.1. Collection of plant material	61

3.3.2. Inhibition of Advanced Glycation End products (AntiAGEs).....	62
3.3.3. Antioxidant activity by the 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method	63
3.3.4. Data analysis	63
3.4. RESULTS AND DISCUSSION	64
3.5. ACKNOWLEDGEMENTS.....	67
3.6. REFERENCES.....	68
CAPITULO IV	73
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	73
4.1. DISCUSIÓN GENERAL	73
4.2. CONCLUSIONES.....	77
4.3. PERSPECTIVAS.....	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1. Estructuras química de la (a) galegina y (b) metformina	6
Figura 1. 2. Prevalencia de la diabetes en el mundo.....	8
Figura 1. 3. Prevalencia de la hipertensión arterial en México	11
Figura 1. 4. Formación esquemática de los AGEs	14
Figura 1. 5. Antioxidante neutralizando a un radical libre	16
Figura 1. 6. Metabolitos secundarios aislados de plantas utilizados como fármacos.....	18
Figura 1. 7. Metabolitos secundarios aislados con actividad antihipertensiva.	18
Figura 1. 8. Metabolitos secundarios aislados con actividad antidiabética	19
Figura 1. 9. Metabolitos secundarios aislados con actividad contra la obesidad.	20
Figura 1. 10. Estrategia general.....	24
Figure 2. 1. Inhibitory effect of fractions of actives extracts against α - glucosidase and pancreatic lipase activity.	43
Figure 2. 2. Vasorelaxant effect of actives extracts in aortic rings with and without endothelium	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1. Principales grupos de fármacos utilizados para el control de la diabetes y su mecanismo de acción general	9
Tabla 1. 2. Estudios de actividad biológica reportados para las plantas seleccionadas. .	21
Table 2. 1. Plants used in Mayan traditional medicine for the treatment of diabetes, hypertension and obesity	41
Table 2. 2. Results of the enzymatic inhibition of α -glucosidase and pancreatic lipase of the organics extracts and traditional preparations	42
Table 2. 3. Results of vasorelaxant effect of the organics extracts and traditional preparations of the plant part used in Mayan traditional medicine	44
Table 3. 1. Results of antiAGEs and DPPH radical scavenging activity for organic extracts and aqueous- traditional preparations.....	66



RESUMEN

Actualmente el impacto provocado por las enfermedades crónico-degenerativas va en aumento, entre éstas enfermedades se encuentran la diabetes, la hipertensión, el cáncer y las enfermedades respiratorias, todas ellas frecuentemente asociadas con la obesidad. Por muchos años, las plantas medicinales han sido empleadas para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades que afectan a la población. Sin embargo, hasta la fecha, menos del 10% de las plantas mexicanas han sido estudiadas fitoquímica y farmacológicamente. El objetivo de este estudio fue evaluar la inhibición de α -glucosidasas, lipasa pancreática y la formación de AGEs, junto con la evaluación de la actividad vasorrelajante y antioxidante de extractos etanólicos y preparaciones tradicionales de las siguientes especies: *Brosimum alicastrum* (Moraceae), *Bunchosia swartziana* (Malpighiaceae), *Cassia fistula* (Fabaceae), *Cocos nucifera* (Arecaceae), *Ehretia tinifolia* (Boraginaceae), *Manilkara zapota* (Sapotaceae), *Ocimum campechianum* (Lamiaceae), *Piper auritum* (Piperaceae) y *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae). Los resultados mostraron mayor inhibición en la actividad de α -glucosidasas con las preparaciones tradicionales de *O. campechianum* y *E. tinifolia* (70% y 54%, respectivamente, con 1 mg/mL); mientras que en el ensayo de inhibición de la lipasa pancreática, el extracto de la raíz de *R. mangle* y de hojas de *P. auritum* fueron los más activos (82% y 67%, respectivamente, con 0.25 mg/mL). Por otra parte, el efecto vasorrelajante en tejido de aorta de rata con endotelio fue mayor con los extractos orgánicos de *R. mangle* y *O. campechianum* y la preparación tradicional de *R. mangle*, resultando ser el efecto vasorrelajante dependiente de la concentración de los extractos. Al evaluar éstos mismos extractos en tejido sin endotelio, la actividad vasorrelajante de la preparación tradicional y el extracto orgánico de tallos de *R. mangle* resultaron ser dependientes del endotelio, en tanto que la relajación inducida por el extracto orgánico de hojas de *O. campechianum* es parcialmente dependiente del endotelio y su actividad podría deberse a diferentes mecanismos de relajación del tejido. Por otro lado, el extracto orgánico de la raíz de *C. fistula* mostró la mayor actividad en el ensayo de inhibición de la formación de AGEs similares a vesperlisina y pentosidina ($IC_{50} = 0.1$ mg/mL), y a pesar de que la actividad antiAGEs se ha relacionado a la actividad antioxidante, los resultados obtenidos en este estudio indican que no están necesariamente relacionados entre sí.

ABSTRACT

Currently, the impact of the chronic-degenerative diseases is increase; among these diseases include diabetes, hypertension, cancer and respiratory diseases, often associated with obesity. For many years medicinal plants have been used for the treatment of a wide range of diseases that affect the population. However, to date, less than 10% of Mexican plants have been studied phytochemical and/or pharmacologically. The objective of this study was to evaluate the inhibition of α -glucosidase, pancreatic lipase, AGEs formation, together with the vasorelaxant effect and antioxidant activity, of the ethanolic crude extracts and traditional preparations of the follow species: *Brosimum alicastrum* (Moraceae), *Bunchosia swartziana* (Malpighiaceae), *Cassia fistula* (Fabaceae), *Cocos nucifera* (Arecaceae), *Ehretia tinifolia* (Boraginaceae), *Manilkara zapota* (Sapotaceae), *Ocimum campechianum* (Lamiaceae), *Piper auritum* (Piperaceae) and *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae). The results showed higher inhibition of α -glucosidases activity with the traditional aqueous preparations of *O. campechianum* and *E. tinifolia* (70% and 54%, respectively, at 1 mg/mL), while that in the pancreatic lipase inhibition assay the root extract of *R. mangle* and leaves of *P. auritum* were the most actives (82% and 67% at 0.25 mg/mL). Alternatively, the vasorelaxant effect on aortic tissue with endothelium was significant in the organic extracts of *R. mangle* and *O. campechianum* and with the traditional preparation of *R. mangle*. The effect was concentration-dependent and, in the case of organic extract and traditional preparation of *R. mangle* was endothelium-dependent while the effect induced by the organic leaf extract of *O. campechianum* is partially endothelium-dependent and its activity may be due to different mechanisms of tissue relaxation. Additionally, the organic extract of the root of *C. fistula* showed the highest inhibitory activity in the antiAGEs assay like to vesperlisine and pentosidine ($IC_{50} = 0.1$ mg/mL), and although activity antiAGEs It has been linked to antioxidant activity; the results obtained in this study indicate that are not necessarily related.

CAPITULO I

1.1. INTRODUCCCIÓN

Actualmente el estilo de vida de la población ha favorecido el incremento e impacto de las enfermedades crónico-degenerativas. Entre los problemas de salud que impactan a la población en el mundo se encuentran la hipertensión arterial, con más de mil millones de personas afectadas, la diabetes, con 382 millones de casos, y la obesidad, con 502 millones de personas registradas con esta condición (FID, 2013; OMS, 2012). A su vez, estos padecimientos constituyen factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, reconocidas como la primera causa de muerte en la población (OMS, 2012).

La combinación de diabetes, hipertensión arterial y obesidad da como resultado el desarrollo de una enfermedad multisintomática conocida como síndrome metabólico que afecta la calidad y disminuye la esperanza de vida de quien lo padece. En México, el 46% de las personas que presentan diabetes tienen hipertensión arterial y el 38% de los hipertensos son obesos; en la actualidad el país ocupa el segundo lugar a nivel mundial en obesidad, y el primer lugar en obesidad infantil (FMD-FAO-OMS, 2012). De manera particular, en Yucatán el 32.4% de la población padece de hipertensión, el 20.9% es diabético y el estado ocupa los primeros lugares de obesidad (ENSANUT, 2012; AMNU, 2012).

En México, la carga económica y social por el tratamiento de las enfermedades que afectan a la población es elevada para el sistema de salud pública. Por ejemplo, hoy en día se calcula un gasto anual de 90 mil millones de pesos para el tratamiento de la diabetes, con un 51% del costo a cargo del paciente (Arredondo e Icaza, 2011), siendo los medicamentos los insumos de mayor impacto; por lo que resulta importante la búsqueda de terapias alternativas para el tratamiento de estos padecimientos.

Desde tiempos antiguos, la población ha utilizado las plantas para satisfacer sus necesidades primarias, tanto de alimentación, como vestido y para el cuidado de su salud, constituyendo las plantas medicinales una fuente disponible y rica en productos naturales con propiedades farmacológicas. Una de estas plantas es *Galega officinalis* (Fabaceae),

planta empleada popularmente para la poliuria del diabético en Europa, de la que más tarde se aisló la galegina (Figura 1.1a), un alcaloide bioactivo tipo guanidina con propiedades hipoglucemiantes, que sirvió de modelo para el desarrollo de fármacos relacionados estructuralmente como la metformina (Figura 1.1b), fármaco de primera elección para el tratamiento inicial de la gran mayoría de los pacientes diabéticos tipo II, por su capacidad para estimular la captación de glucosa en músculo mediada por insulina, reducir la producción hepática de glucosa (Lee et al., 2008), inhibir la lipólisis y liberación de ácidos grasos libres, entre otros (Ríos et al., 2014), sin embargo el mecanismo de acción exacto de la metformina no es bien conocido.

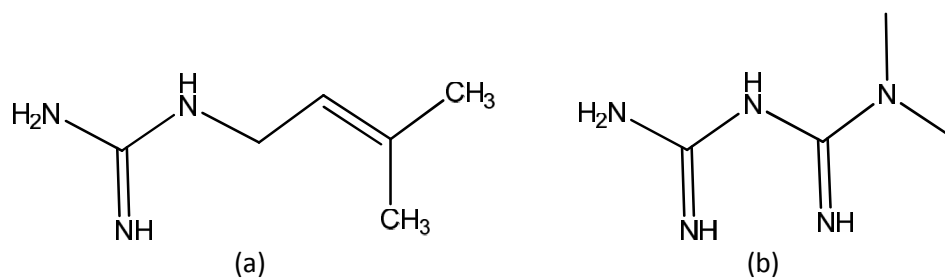


Figura 1.1. Estructuras química de la (a) galegina y (b) metformina

La flora de la península de Yucatán cuenta con una gran diversidad de plantas y la medicina tradicional Maya representa una riqueza cultural importante en cuanto a su uso medicinal. Sin embargo, hasta ahora, el conocimiento fitoquímico y farmacológico de la mayoría de estas especies es limitado o inexistente. Por lo anterior, en este trabajo se planteó como objetivo llevar a cabo la evaluación de la actividad contra α -glucosidasas y lipasa pancreática, el efecto vasorrelajante para evaluar, así como la actividad anti-AGEs y antioxidante a un grupo de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la hipertensión, la diabetes y la obesidad, como fuentes potenciales de nuevos metabolitos bioactivos. Los modelos se seleccionaron debido a que se ha reportado que la inhibición de α -glucosidasas y lipasa pancreática contribuyen en la búsqueda de metabolitos activos que participen como coadyuvante en el manejo de la diabetes y la obesidad, igualmente la evaluación del efecto vasorrelajante representa una estrategia de interés para la búsqueda de metabolitos secundarios contra la hipertensión arterial y finalmente se plantea la evaluación anti-AGEs y antioxidante (ensayo de reducción del DPPH) debido a las asociación que se ha reportado con las enfermedades crónico degenerativas y sus complicaciones.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. Enfermedades crónico-degenerativas, problemas de salud de importancia mundial

Las enfermedades crónico-degenerativas son enfermedades de larga duración y de progresión lenta, que reducen la calidad de vida, la salud y afectan varios órganos del cuerpo con el tiempo. Entre las principales enfermedades crónico-degenerativas se encuentran la diabetes, la hipertensión, el cáncer y las enfermedades respiratorias, a menudo asociadas a factores como el sobrepeso y la obesidad; este grupo de enfermedades son responsables del 63% de las muertes y representan un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, reconocidas como la principal causa de muerte en el mundo (OMS, 2015).

1.2.2. Diabetes

El nombre de la enfermedad proviene del griego “dia”, a través, “bainein”, ir, y “tes”, agente, es decir “lo que va a través”, haciendo referencia a polidipsia y poliuria, síntomas de la enfermedad. La diabetes se define como un conjunto de trastornos metabólicos, caracterizados por hiperglucemia crónica, resultado de la alteración en la secreción o la acción de la insulina o ambas, provocando incapacidad del cuerpo para utilizar la glucosa disponible en la sangre (ADA, 2013).

La diabetes se clasifica en tres principales grupos (FID, 2013):

- Diabetes tipo I, también denominada insulino dependiente, es causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema de defensa del cuerpo ataca las células beta productoras de insulina en el páncreas. Los pacientes con este tipo de diabetes requieren de la administración exógena de insulina para regular los niveles de glucosa en sangre.
- Diabetes tipo II, llamada no insulino dependiente, representa el 90% de los casos; en este tipo el páncreas produce insulina, sin embargo, su producción no es suficiente o el cuerpo es incapaz de utilizarla correctamente, principalmente debido al desarrollo de resistencia a la insulina. Este tipo de diabetes, conocida como diabetes mellitus, es una

enfermedad lenta y progresiva, a menudo asociada al sobrepeso y/u obesidad, cuyos síntomas pueden tardar años en aparecer dañando órganos como riñón, retina e hígado, entre otros.

- Diabetes gestacional, producida durante el embarazo al desarrollarse resistencia a la insulina y dando como resultado una alta concentración de glucosa en sangre. Esta condición desaparece en las mujeres después del nacimiento, sin embargo, presentan mayor riesgo a desarrollar diabetes tipo II y complicaciones en el parto.

Otros tipos de diabetes asociadas a otras patologías o condiciones son menos frecuentes e incluyen pacientes con defectos en la función de las células β del páncreas, como consecuencia de efectos de fármacos o productos tóxicos.

1.2.2.1. Prevalencia de la diabetes

Según datos de la Federación Internacional de Diabetes, en 2013 existían 382 millones de personas afectadas por la diabetes (Figura 1.2). Sin embargo, las cifras pueden ser mayores dado que existen miles de personas que padecen la enfermedad y que lo desconocen. Actualmente la incidencia de diabetes va en aumento, por lo que se estima que para el 2035 el número de personas con esta enfermedad puede alcanzar los 592 millones.

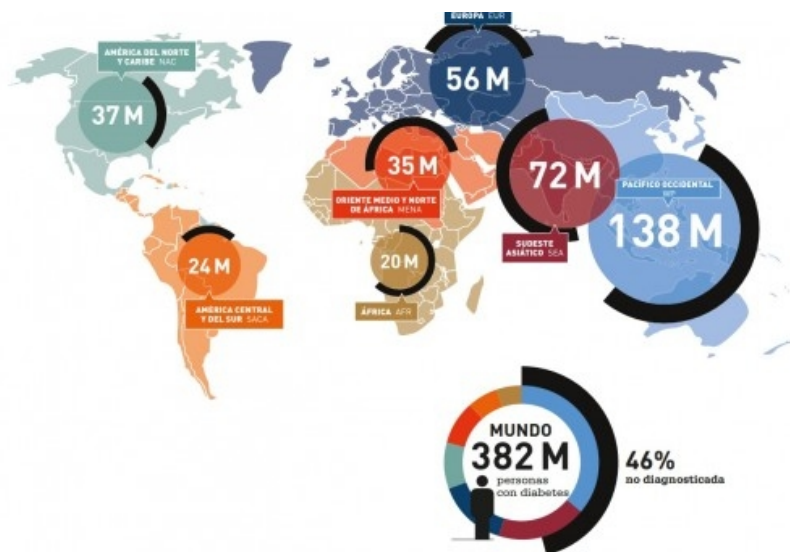


Figura 1.2. Prevalencia de la diabetes en el mundo (Datos de FID, 2013)

México se encuentra en una situación alarmante con 6.4 millones de casos diagnosticados con DM (9.2%), siendo éste uno de los motivos más frecuentes de hospitalización y una de las principales causas de mortalidad e incapacidad prematura en la población del país (ENSANUT, 2012). Yucatán ocupa el quinto lugar entre los estados de la República Mexicana con mayor número de casos de diabetes, siendo esta enfermedad la tercera causa de muerte en el estado (ENSANUT, 2012).

1.2.2.2. Tratamiento de la diabetes

La diabetes causa un impacto enorme a los sistemas de salud y la mejor manera de controlar esta enfermedad es reducir el número de casos mediante la adopción de medidas preventivas, que incluyen un cambio en el estilo de vida y una alimentación adecuada. Sin embargo, para la mayoría de los pacientes es difícil adoptar estos cambios, por lo que es importante contar con fármacos que ayuden al control de la hiperglucemia en ayuno y postprandial.

Actualmente, los tratamientos farmacológicos disponibles para el control de la diabetes son variados y ejercen su acción en los distintos aspectos fisiopatológicos de la enfermedad. En la Tabla 1.1, se enlistan algunos de los grupos de fármacos y su mecanismo de acción.

Tabla 1.1. Principales grupos de fármacos utilizados para el control de la diabetes y su mecanismo de acción general (Tébar y Escobar, 2009)

Grupo farmacológico	Mecanismo de acción
Biguanidas	Reducción de la producción hepática de glucosa; aumento de la captación en músculo
Glitazonas	Activación de receptores específicos regulando homeóstasis lipídica y acción de la insulina para captación de glucosa en la célula muscular
Inhibidores de α-glucosidasas	Reducción de la absorción de hidratos de carbono complejos
Sulfonilureas	Aumento de la secreción de insulina

Secretagogos de acción rápida

Aumento de la secreción de insulina postprandial inmediata

1.2.3. Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad caracterizada por un aumento de la presión en el interior de los vasos sanguíneos (arterias) con valores superiores a 140 mm Hg en la presión sistólica y a 90 mm Hg en la presión diastólica. Esta enfermedad representa el principal factor de riesgo de daño endotelial, fallo cardiaco, síndrome metabólico, disfunción renal y enfermedad de arteria coronaria (Sardana and Madan, 2003).

1.2.3.1. Epidemiología de la hipertensión arterial

La HTA afecta a mil millones de personas en el mundo; aun cuando, en el pasado, este padecimiento se consideraba como exclusivo de la población adulta, actualmente afecta al 40% de la población, incluyendo a jóvenes de hasta 20 años. Esta condición es causa de muerte prematura, dado que favorece el desarrollo de infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares e insuficiencia renal (Stevens et al., 2008; OMS, 2013).

A nivel nacional, durante el periodo 2000-2006, la prevalencia de HTA aumentó hasta afectar 1 de cada 3 adultos, afectando al 31.6% de los adultos mexicanos. Esta tendencia se ha mantenido y actualmente se estima que el 50% de la población que padece la enfermedad, lo desconoce (Figura 1.3). En Yucatán, hasta 2012, la prevalencia de hipertensión arterial por diagnóstico médico previo en personas de 20 años de edad o mayores fue de 13.6% (ENSANUT, 2012).

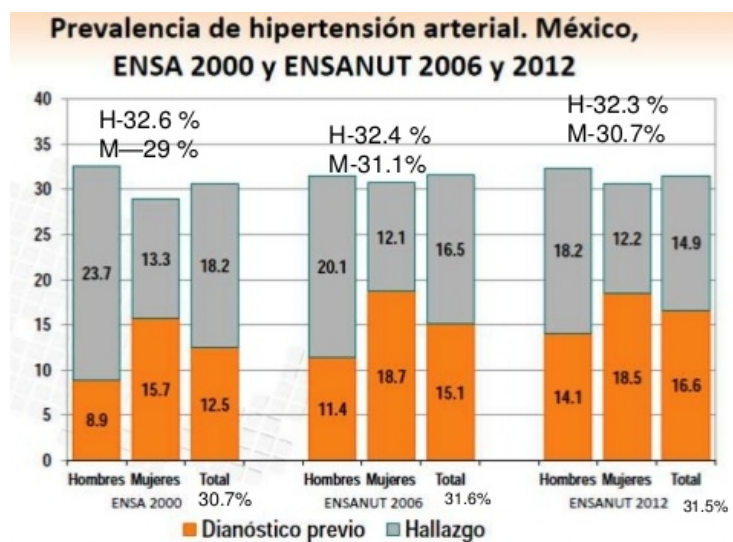


Figura 1.3. Prevalencia de la hipertensión arterial en México, datos de 2000, 2006 y 2012 (ENSANUT)

1.2.3.2. Tratamiento de la hipertensión arterial

Los fármacos para el tratamiento de la HTA se pueden dividir en diuréticos, bloqueadores adrenérgicos o de canales de calcio e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. Los **diuréticos**, que actúan sobre los riñones, reducen el volumen de sangre, provocan la excreción de agua y sal corporal; en tanto que los **bloqueadores adrenérgicos**, que incluyen α -bloqueadores β -bloqueadores, ensanchan los vasos sanguíneos, disminuyendo así la presión arterial, y reducen la fuerza del latido cardíaco, respectivamente; los **bloqueadores de canales de calcio** que inhiben selectivamente la corriente de entrada de Ca^{+2} a través de los canales de voltaje-dependientes del tipo L de las membranas celulares; los **inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina** causan un bloqueo competitivo de la enzima que transforma la angiotensina I a angiotensina II, reduciendo concentraciones de la angiotensina II en tejido y plasma; los **antagonistas de los receptores a angiotensina 1 de angiotensina 2** que bloquean de manera selectiva los receptores AT1 ocasionando aumento de la renina y de la angiotensina II, reducción de la resistencia periférica, de los niveles de aldosterona y de la presión arterial, sin modificar la frecuencia cardíaca y finalmente; los **vasodilatadores directos** que relajan directamente el músculo liso vascular (Lorenzo et al., 2008).

La elección del fármaco más adecuado para un paciente en particular se realiza tomando en consideración la efectividad, toxicidad, tipo de hipertensión y otros trastornos clínicos concomitantes, recurriendo incluso a combinaciones de fármacos (Dickerson y Gibson, 2005).

1.2.4. Obesidad

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa, consecuencia de un desequilibrio en la ingesta y gasto energético, que puede ser perjudicial para la salud. Este padecimiento es una condición de etiología multifactorial de curso crónico, en la cual se involucran aspectos genéticos, ambientales y de estilo de vida.

Los principales daños que se reconocen como causados por la obesidad se presentan en los aparatos respiratorio, digestivo y locomotor. Este padecimiento es además factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, complicaciones diabéticas y enfermedades cardiovasculares (OMS, 2015).

1.2.4.1. Epidemiología de la obesidad

En 2014 más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso; de éstos, más de 600 millones eran considerados obesos (OMS, 2015). Actualmente este padecimiento afecta a la población infantil, con 42 millones de niños menores de cinco años reportados con sobrepeso.

En México, el sobrepeso y la obesidad se encuentran entre los principales problemas de salud, ya que el país se encuentra en los primeros lugares de obesidad en adultos y ocupa el primer lugar en obesidad infantil. Hasta 2012 se estimaban 26 millones adultos con sobrepeso y 22 millones eran considerados obesos (ENSANUT, 2012; Barrera-Cruz, 2013). En Yucatán la prevalencia de obesidad abdominal es de 76.6%, por arriba de la media nacional, y el estado ocupa el primer lugar nacional en obesidad en niños menores de 5 años de edad (Barquera et al., 2013).

1.2.4.2. Tratamiento de la obesidad

El tratamiento de la obesidad se basa en el logro de una reducción en la ingesta de alimentos mediante dietas hipoenergéticas, la realización de ejercicio físico y la modificación de la conducta.

El tratamiento farmacológico como apoyo del dietético y del ejercicio se clasifica, de acuerdo a su mecanismo de acción, en los siguientes grupos: fármacos anorexizantes, que disminuyen el apetito o aumentan la saciedad, inhibidores, que modulan la absorción de nutrientes, y termogénicos, que incrementan el gasto energético (Morales, 2010)

Como última instancia, se tiene el tratamiento quirúrgico, reservado principalmente a pacientes que cumplan una serie de condiciones, incluyendo un índice de masa corporal de 35-40 o superior, complicaciones de riesgo asociadas a la obesidad, y el fracaso de tratamientos no quirúrgicos (Galicia y Simal, 2002).

1.2.5. Participación de los productos finales de glicación avanzada en las enfermedades crónico-degenerativas

Los productos finales de glicación avanzada (AGEs, Advanced Glycation End Products, por sus siglas en inglés), son productos resultantes de una reacción no enzimática, también llamada reacción de Maillard, que se da entre el grupo carbonilo de azúcares reductores que incluyen a la glucosa y grupos amino libres de las proteínas, principalmente lisina y arginina, dando lugar a una base de Schiff, que es un producto reversible; el siguiente paso involucra la conversión a un producto estable por medio del rearrreglo de Amadori para formar los llamados productos de Maillard. Finalmente estos productos glicosados pueden sufrir una serie de reacciones de fragmentación, deshidratación, oxidación (por especies reactivas de oxígeno) para dar a una variedad de productos finales conocidos como AGEs (Figura 1.4). La formación y acumulación de AGEs conduce al daño celular por alteración estructural y función de las proteínas y al incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno involucradas en la auto oxidación de glucosa y formación de AGEs.

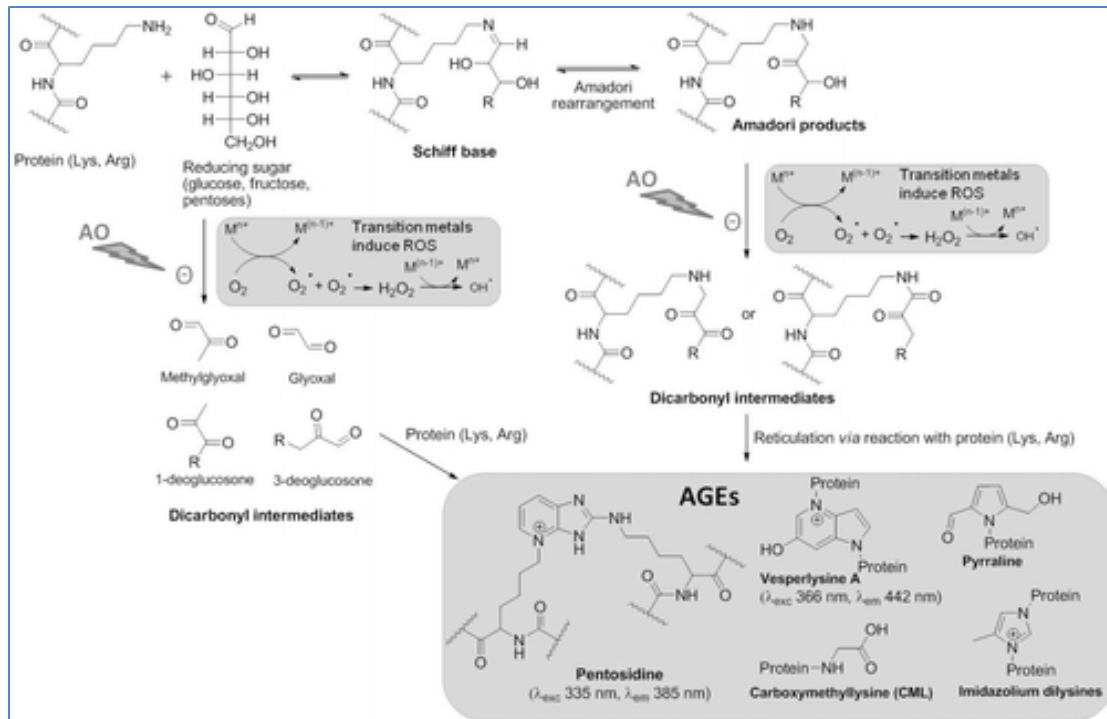


Figura 1.4. Formación esquemática de los AGEs. (Tomado de Boisard et al., 2014)

Los AGEs se encuentran implicados en varias patologías, específicamente en diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas, disfunción endotelial, enfermedades neurológicas como Alzheimer y el envejecimiento (Jandeleit-Dahm et al., 2008). Debido a la hiperglucemia crónica de la diabetes mellitus, la formación de AGEs es mayor y se asocia con complicaciones micro y macrovasculares que incluyen la glicación como mecanismo que conduce al desarrollo de retinopatía, neuropatía, nefropatía, cataratas y aterosclerosis (Hansen, 1986). Asimismo, el nivel de hemoglobina glicada (HbA1c) es considerado un parámetro muy utilizado en la diabetes para el control del paciente, ya que aumenta en función de la glucemia (Radoi et al., 2011). Los productos finales de glicación avanzada tienen la característica de presentar diversas estructuras y en algunos casos ser fluorescentes, propiedad empleada en la búsqueda de metabolitos activos de agentes que inhiban la formación de AGEs.

Históricamente, la aminoguanidina fue el primer inhibidor de AGEs; aunque es un agente que atrapa intermediarios carbonílicos reactivos para formar productos no tóxicos, su producción comercial no fue aprobada debido a los efectos adversos observados en pacientes con diabetes. Sin embargo, este producto representa la mejor evidencia de que la inhibición de la formación de AGEs podría ser una terapia razonable para el tratamiento de complicaciones de la diabetes (Chinchansure et al., 2015).

1.2.6. Especies reactivas de oxígeno (EROs) asociadas al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas

Los radicales libres son átomos o moléculas que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad, causando una reacción en cadena (Figura 1.5). Como resultado del metabolismo se generan distintos tipos de radicales libres. Las especies reactivas son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en radicales libres, lo que les confiere la capacidad de reaccionar de manera indiscriminada sobre células y tejidos. Las especies reactivas incluyen a las de oxígeno (ROS) y las de nitrógeno (RNS), que provocan daño en las biomoléculas llevando a modificación conformacional y, por lo tanto, pérdida o alteración en la función biológica de las células.

Naturalmente, en el organismo las especies reactivas son eliminadas por el sistema antioxidante; sin embargo, cuando la producción de especies reactivas supera los mecanismos antioxidantes se produce el estrés oxidativo, e.g. condiciones alteradas resultado de la hiperglucemia, en la que se favorece la formación de radicales libres debido a la auto-oxidación de la glucosa, que contribuye al desarrollo de las complicaciones diabéticas (Maldonado et al., 2010). Igualmente, se sabe que el estrés oxidativo celular contribuye en el desarrollo de hipertensión arterial, aterosclerosis, cáncer, procesos inflamatorios y disfunción endotelial, considerado este último como el factor de riesgo principal de enfermedades cardiovasculares (Beristaín- Pérez et al., 2006).

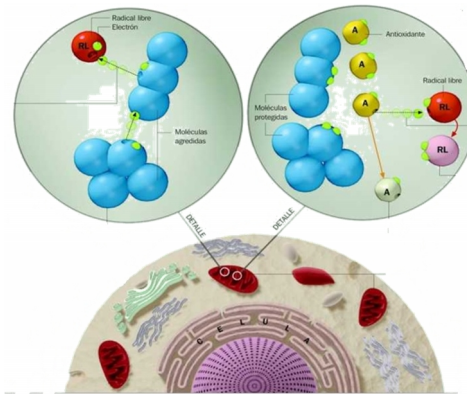


Figura 1.5. Antioxidante neutralizando a un radical libre

Las principales características de un compuesto o sistema antioxidante son la prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado y la regeneración del antioxidante ayudando así a reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano (Namiki, 1990).

Hay dos tipos principales de antioxidantes, el "primario" (ruptura de la reacción en cadena, secuestrador de radicales libres) y el "secundario" o "preventivo". Los mecanismos antioxidantes "secundarios" pueden incluir la desactivación de metales, la inhibición de hidroperóxidos lipídicos interrumpiendo la producción de volátiles indeseables, la regeneración de antioxidantes "primarios", la eliminación del oxígeno singlete, etc (Gordon, 1990).

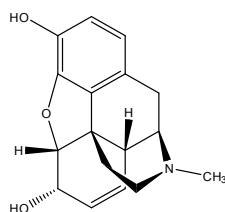
1.2.7. Plantas como fuente de fármacos

El interés por el estudio e impulso de la medicina alternativa resurgió tras la demanda popular en recuperar la tradición del uso de las plantas medicinales, pues las plantas han contribuido en gran manera a la medicina desde la antigüedad. Inicialmente la población utilizaba las plantas como remedios tradicionales, sin comprender la lógica científica detrás de sus infusiones, cataplasmas y otras preparaciones. Según la OMS, actualmente el 80% de la población en países desarrollados depende de la medicina tradicional para su atención primaria de salud; el 20% restante depende, en más del 45% de los casos, de fármacos derivados de productos naturales. De los fármacos disponibles, al menos del

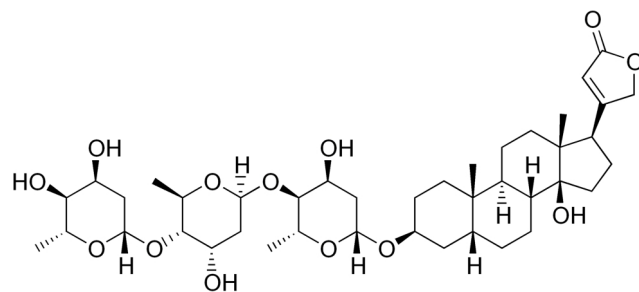
25% contienen uno o más principios activos derivado de plantas (Pushpam, 2004; Newman y Cragg, 2012).

Los productos aislados de las plantas poseen actividades biológicas de importancia para la salud humana, por lo que se han utilizado en terapéutica como modelo para realizar modificaciones estructurales específicas y para generación de nuevos fármacos. Los metabolitos secundarios bioactivos pueden actuar de manera individual, de forma aditiva o sinérgicamente (Kingston y Newman, 2005), además de resultar esenciales en algunos casos para identificar la diana de un fármaco sintético o establecer su papel en una determinada ruta bioquímica (Harvey, 2008). Actualmente, menos del 10% del total de las plantas que se estima hay en el planeta, han sido estudiadas fitoquímicamente y menos del 5% han sido evaluadas farmacológicamente (Verpoorte, 2000).

Entre los productos naturales aislados de plantas reconocidos por su aplicación en la terapia de enfermedades podemos mencionar a la morfina, aislada de *Papaver somniferum* y usada como analgésico; a la digitoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y de uso cardiotónico; el paclitaxel, aislado de *Taxus brevifolia* y reconocido como agente anticanceroso; y a la vinblastina y vincristina de *Catharanthus roseus*, con actividad contra el cáncer (Prieto et al. 2004) (Figura 1.6).



Morfina



Digitoxina

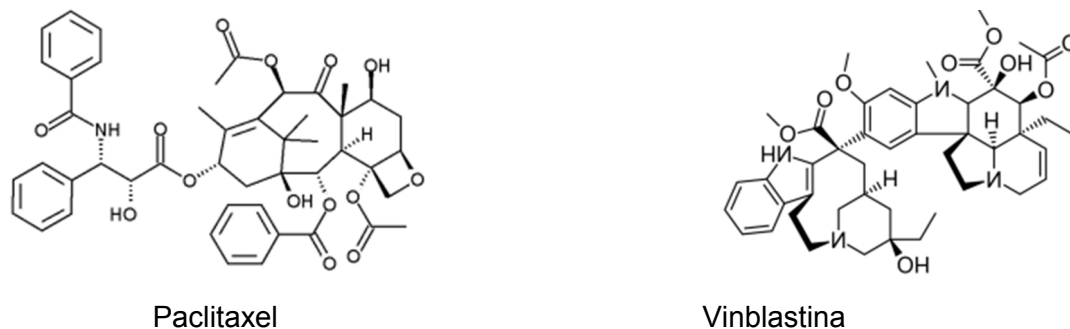


Figura 1.6. Metabolitos secundarios aislados de plantas utilizados como fármacos

1.2.7.1. Plantas como fuentes de metabolitos bioactivos contra diabetes, hipertensión y obesidad

En las últimas décadas se han investigado los efectos antihipertensivos de plantas utilizadas en la medicina tradicional de diferentes partes del mundo. Algunas de las plantas con actividad antihipertensiva de importancia mundial son *Rauwolfia serpentina* y *Veratrum album* de las que se han aislado metabolitos activos como reserpina, protoveratrina A y B, respectivamente (Figura 1.7) (Esquivel et al., 2012).

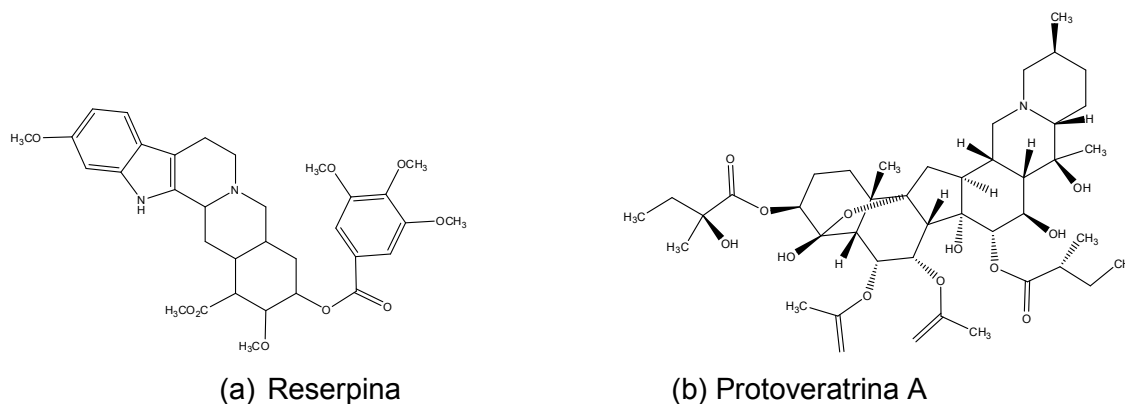


Figura 1.7. Metabolitos secundarios aislados con actividad antihipertensiva.

Los estudios del efecto antihipertensivo de extractos de plantas, o sus principios activos, generalmente se realizan tanto con ensayos *in vivo* como *in vitro*; para los estudios con animales vivos generalmente se usan ratas normotensas, espontáneamente hipertensas (SHR, Spontaneously Hypertensive Rats, por sus siglas en inglés) e inducidas (L-NAME, Nitro-L-Arginina-Metil Éster). Los ensayos *in vitro* van desde células, tejidos y órganos

aislados para determinar el efecto de extractos o compuestos activos sobre mecanismo de bloqueadores e inhibidores de blancos específicos. De igual manera, en la búsqueda de agentes nuevos para el control de la hipertensión arterial se emplea la evaluación de extractos y productos puros para la determinación del efecto relajante en tejido vivo, que permite obtener información sobre el mecanismo por el cual actúan las muestras evaluadas (Vogel, 2008).

También se han utilizado ensayos de inhibición enzimática de α -glucosidasas, amilasa pancreática y salival con el fin de encontrar metabolitos presentes en las plantas medicinales o sus extractos que puedan optimizar el metabolismo de la glucosa y mejorar la condición integral de los diabéticos, siendo la función principal de las enzimas mencionadas la hidrólisis de oligosacáridos a monosacáridos libres que puedan ser absorbidos, esto tiene como resultado una reducción en los picos de glucemia postprandial. Estos ensayos son de utilidad para la búsqueda de antihiperoglucemiantes que participan en el tratamiento antidiabético como coadyuvante. Como ejemplos de este tipo de productos se pueden mencionar criptolepina de *Cryptolepis sanguinolenta* y salacínol de *Salacia reticulata* (Figura 1.8) (Esquivel et al., 2012).

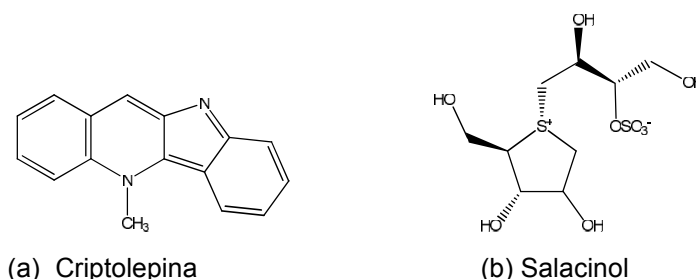


Figura 1.8. Metabolitos secundarios aislados con actividad antidiabética

Por otra parte, en la búsqueda de la generación de suplementos y agentes que disminuyan eficientemente la absorción de grasas, se han buscado productos naturales de plantas que inhiban la actividad de la lipasa, puesto que esta enzima constituye el eslabón bioquímico más importante para la regulación hidrolítica de los triglicéridos (Villa et al., 2011). Un ejemplo de este tipo de productos es *Camelia sinensis* que contiene catequinas y *Rosmarinus officinalis*, fuente de ácido carnósico, metabolitos reconocidos por su actividad contra la lipasa (Figura 1.9).

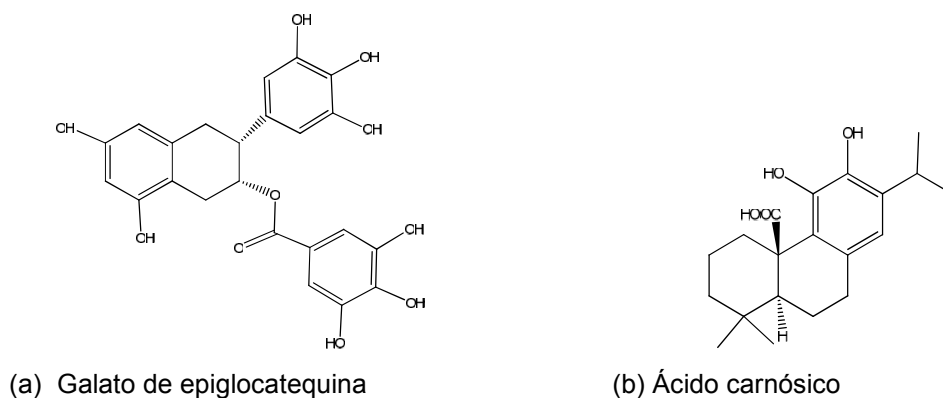


Figura 1.9. Metabolitos secundarios aislados con actividad contra la obesidad.

1.2.8. Plantas medicinales en México y Yucatán

México, siendo uno de los países con mayor biodiversidad y donde se encuentra representado el 12% de la diversidad terrestre del planeta, cuenta con una fuente potencialmente importante para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. México ocupa el cuarto lugar en diversidad de plantas y aproximadamente el 50% de las especies de plantas son endémicas, lo que significa aproximadamente 15,000 especies (CONABIO, 2008). Esta rica variedad de especies vegetales contienen una amplia gama de metabolitos secundarios que, para algunas, les significan propiedades medicinales (aproximadamente el 15% de la flora total) que son aprovechadas por la sociedad; estas plantas medicinales requieren del estudio científico para conocer adecuadamente sus propiedades, sus principios activos y la seguridad de su consumo en términos de toxicidad (Ocegueda et al., 2005).

Por otro lado, se estima que la península de Yucatán cuenta con alrededor de 2200- 2500 especies de plantas vasculares, de las cuales se ha documentado algún uso medicinal para aproximadamente 680 especies (30%) y de éstas, el 2% son usadas para el control de la diabetes. Dadas las condiciones económicas y sociales en la actualidad, en las que el acceso a los servicios de salud no siempre es posible sumando el costo de los medicamentos, las plantas constituyen una gran alternativa para el tratamiento de muchas afecciones (Méndez et al., 2012).

1.2.9. Estudios en la literatura de las plantas seleccionadas

El estudio de las especies de la flora de Yucatán como fuentes de metabolitos bioactivos, con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos, constituye un área importante de estudio dado que representa la oportunidad de descubrir de nuevos productos naturales, con aplicaciones biológicas comprobadas. El grupo de plantas utilizadas en la medicina tradicional Yucateca contra la diabetes, la hipertensión y/o la obesidad que fueron seleccionadas para su evaluación en los diferentes modelos han sido poco estudiadas en cuanto a su actividad biológica y composición fitoquímica (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Estudios de actividad biológica reportados para las plantas seleccionadas.

Especie	Nombre común	Uso tradicional	Estudios en la literatura:
<i>Brosimum alicastrum</i> S. (Moraceae)	Ramon, ojite	Hojas: Diabetes	Evaluación de la respuesta glicémica de las semillas de ramón (Arévalo, 2010)
<i>Bunchosia swartziana</i> G. (Malpighiaceae)	Manzanillo, Sip che'	Hojas: Hipertensión	No se encontraron
<i>Cassia fistula</i> L. (Fabaceae)	Lluvia de oro	Tallos: Diabetes	Vainas con actividad hipolipidemiante (Gupta and Jain 2009; Sutar et al., 2015). Extractos de corteza y hojas con actividad antidiabética (Wilking et al., 2013) Catequina aislada de tallo con actividad hipoglucemiante (Daisy et al., 2010) Flores con actividad antioxidante en ratas diabéticas (Manonmania et al., 2005) Corteza del tallo con actividad antioxidante (Luximon-Ramma et al., 2002; Siddhurajua et al., 2002)
<i>Cocos nucifera</i> L. (Arecaceae)	Coco	Agua: Diabetes	Agua de coco con actividad antidiabética (Preetha et al., 2013). Inflorescencias con actividad antioxidante y homeostasis de glucosa (Renjith and Rajamohan 2012) Inflorescencias con actividad antihiperглиcémica en ratas (Naskar et al., 2011).

			Actividad antihipertensiva y vasorrelajante del endocarpio (Bankar et al., 2011)
			Agua de coco para hipertensión (Alleyne et al., 2005)
			Agua de coco con actividad antioxidante (Mantena et al., 2003)
<i>Ehretia tinifolia</i> L. (Boraginaceae)	Roble, Beek	Hojas: Hipertensión	Actividad antioxidante de los frutos (Pío-León et al., 2012).
<i>Manilkara zapota</i> V.R. (Sapotaceae)	Chicozapote, zapote chicle,	Hojas: Diabetes e hipertensión	Extracto de hojas y fruto con actividad antidiabética y antilipidémica (Barbalho et al., 2015)
			Extracto de hojas y semillas con actividad hipoglucemiante (Saradha et al., 2014; Saikat and Md. Lukman, 2015).
			Extracto de hojas con actividad antioxidante (Chanda and Nagani, 2010; Islam et al., 2012; Kaneria and Chanda, 2012)
			Actividad antioxidante de los frutos (Guanghou et al., 2004)
<i>Ocimum campechianum</i> W. (Lamiaceae)	X'kakaltun	Hojas: Diabetes e hipertensión	Aceite esencial de hojas con actividad antioxidante (Sacchetti et al., 2004)
<i>Piper auritum</i> K. (Piperaceae)	Hierba santa, momo	Hojas: Diabetes	Extracto hexánico de hojas con actividad antioxidante y antiAGEs (Pérez et al., 2012; González et al., 2014)
			Extracto de hojas con actividad antidiabética (Pérez 2012)
			Extracto de hojas con actividad contra α -glucosidasas y lipasa pancreática (Ramírez et al., 2012)
			Aceite esencial de hojas con actividad antioxidante (García Ríos et al., 2007)
<i>Rhizophora mangle</i> L. (Rhizophoraceae)	Mangle rojo, Tab'ché	Tallos: Diabetes	Extracto de corteza con actividad hipoglucemiante en ratas (Andrade y Rabucalba, 2012)
			Extracto de corteza con actividad antioxidante (Sánchez et al., 2010)
			Extracto de tallos con actividad hipoglucemiante en conejos (Alarcón-Agilara et al., 1998)

1.3. HIPÓTESIS

Dado el uso medicinal que las comunidades yucatecas le dan a las plantas seleccionadas, los extractos obtenidos deben contener metabolitos secundarios que les brinden las propiedades terapéuticas para el tratamiento de la diabetes, la hipertensión y la obesidad.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Determinar la actividad biológica de extractos de plantas empleadas tradicionalmente en la península de Yucatán para el tratamiento de la diabetes, hipertensión y/u obesidad.

1.4.2. Objetivos específicos

- ❖ Evaluar la actividad inhibitoria en la acción de las α -glucosidasas, lipasa pancreática y el efecto vasorrelajante, de las preparaciones tradicionales y extractos etanólicos de las diferentes especies.
- ❖ Evaluar la actividad anti-AGEs y reductora del radical DPPH de las preparaciones tradicionales y extractos etanólicos de las diferentes especies.
- ❖ Comparar y establecer si existe relación de los extractos más activos en los diferentes ensayos de evaluación
- ❖ Establecer de manera preliminar la naturaleza química de los metabolitos que presentan la mayor actividad en los ensayos realizados

1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

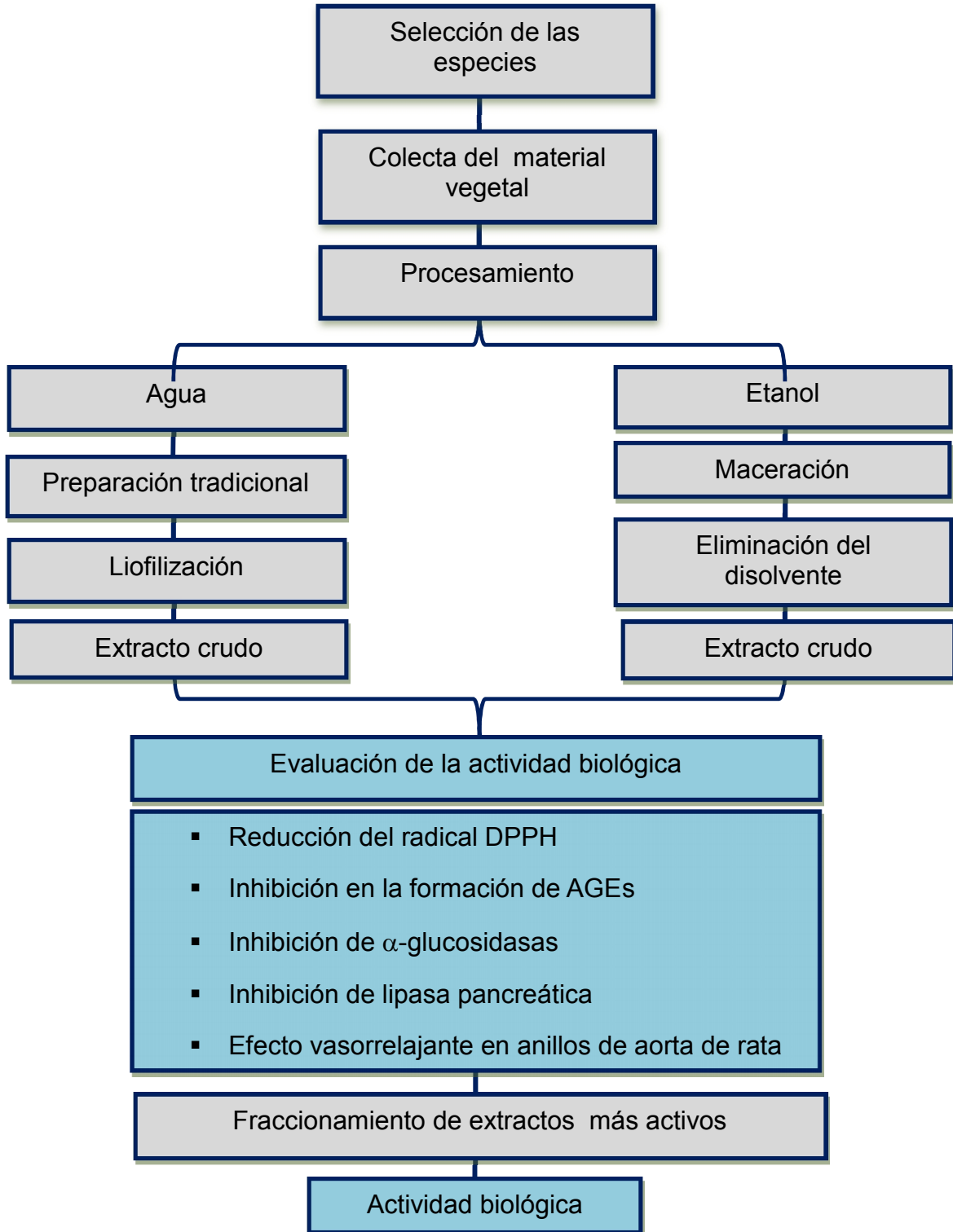


Figura 1.10. Estrategia experimental

1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón Aguilara, F.J., Román-Ramos, R., Pérez-Gutiérrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C. and Flores-Saenz, J.L (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. 61,101-10.
- Alleyne, T., Roache, S., Thomas, C. and Shirley, A (2005). The control of hypertension by use of coconut water and mauby: two tropical food drinks. *West Indian Medical Journal*. 54(1), 3-8.
- Bankar, G.R., Nayak P.G., Bansal, P., Paul, P., Pai, K.S., Singla, R.K. and Bhat, V.G (2011). Vasorelaxant and antihypertensive effect of *Cocos nucifera* Linn. endocarp on isolated rat thoracic aorta and DOCA salt-induced hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 134, 50–54.
- Barbalho, S.M., Bueno, P.C., Delazari, D.S., Guiguer, E.L., Coqueiro, D.P., Araújo, A.C., de Souza, M.S., Farinazzi-Machado, F.M., Mendes, C.G. and Groppo, M (2015). Antidiabetic and antilipidemic effects of *Manilkara zapota*. *Journal of Medicinal Food*. 18(3), 385-91.
- Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A. and Rivera-Dommarco, J.A (2013). Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT. *Salud Pública de México*; 55supl 2:S151-S160.
- Barrera, C.A. and Rodríguez, G.A (2013). Escenario actual de la obesidad en México. *Revista Médica del Instituto Mexicano de Seguro Social*. 51(3), 292-99.
- Beristain, P.S., Sánchez, R.M., Ruiz,R.M. and Mendoza,N.VM (2006). Estrés oxidativo como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus, osteoartritis o hipertensión arterial en adultos mayores. *Bioquímica. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica*. 31(1), 13-22.
- Chanda, S.V. and Nagani, K.V (2010). Antioxidant capacity of *Manilkara zapota* L. leaves extracts evaluated by four *in vitro* methods. *Nature and Science*. 8 (10), 260–266.

-
- Dickerson, L.M., Pharm, D.M. and Gibson, V (2005). Management of hypertension in older Persons. *American Family Physician*. 71(3), 469– 476.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) (2012). Hipertensión arterial en adultos mexicanos: importancia de mejorar el diagnóstico oportuno y el control. Disponible en: <http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/HipertensionArterialAdultos.pdf> [Acceso 18 Mayo 2015].
- Galicia, M. and Simal, A (2002). Tratamiento farmacológico de la obesidad. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 26,117-127.
- García-Ríos, A., Leyva, M.A., Martínez, M.J. and Stashenko, E.E (2007). Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Piperaceae) difundida en la costa Colombiana. *Scientia Et Technica*. 13(33), 439-442.
- Gupta, U.C. and Jain, G.C (2009). Study on Hypolipidemic activity of *Cassia fistula* Linn Legume in Rats. *Asian Journal Experimental Sciences*. 23, 241-248.
- Islam, M.E., Parvin, M.S., Islam, M.R., Islam, M.S. and Hasan S.M.R (2012). Antioxidant activity of the ethanol extract of *Manilkara zapota* leaf. *Journal of Scientific Research*. 4(1), 193-202.
- Kaneria, M. and Chanda S (2012). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of *Manilkara zapota* L. (chiku) leaves by sequential soxhlet extraction method. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2, S1526-S1533
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M.A., Portolés, A (2008). Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. Editorial Medica Panamericana. Madrid. pp. 419-439.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A. and Aruoma, O.I (2002). Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(18), 5042–5047.
-

-
- Maldonado, S.O., Jiménez, V.E., Guapillo, V.M.R., Ceballos, R.G.M. and Méndez, B.E (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* 10(2), 32-39.
- Manonmania, G., Bhavapriyaa, V., Kalpanaa, S., Govindasamy, S. and Apparananthamb, T (2005). Antioxidant activity of *Cassia fistula* (Linn.) flowers in alloxan induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 97(1), 39–42.
- Mantena, S.K., Jagadish, B.R., Siripurapu, K.B. and Unnikrishnan, M.K (2003). *In vitro* evaluation of antioxidant properties of *Cocos nucifera* Linn. water. *Nahrung*. 47(2), 126-31.
- Morales, G.J.A (2010). *Obesidad, un enfoque multidisciplinario*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. pp. 219-224.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 75(3), 311–335.
- Ramirez, G., Zavala, M., Perez, J. and Zamilpa, A (2012). *In vitro* screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 701261, 6.
- Sacchetti, G., Medici, A. Maietti, S., Radice, M., Muzzoli, M., Manfredini, S., Braccioli, E. and Renato, B (2004). Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd, labiatae in comparison with commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 3486-3491.
- Sánchez, J.C., García, R.F. and Cors, MT (2010). 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical and superoxide anion scavenging activity of *Rhizophora mangle* (L.) bark. *Pharmacognosy Research*. 2(5), 279–284.
- Saikat, R.P. and Lukman H.M (2015). *In vivo* hypoglycemic study of *Manilkara zapota* leaf and seed extracts. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 10, 246-250.
- Naskar, S., Mazumder, U.K., Pramanik, G., Bala, A., Haldar, P.K., Islam, A. and Gupta M (2011). Comparative *in vitro* antioxidant activity of different parts of *Cocos nucifera*
-

(linn.) on reactive oxygen and nitrogen species. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 3(3), 104-107.

Saradha, S., Ruckmani, A., Chokkalingam, M., Maignanakumar, R., Arunkumar, R., Madhavi, E. and Lakshmi pathy P.R (2014). Hypoglycemic activity of aqueous and ethanolic extracts of *Manilkara zapota* seeds in streptozotocin induced diabetic rats. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 6(2), 434-437.

Siddhurajua, P., Mohanb, P.S. and Becker, K (2001). Studies on antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula*): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves flowers and fruit pulp. Journal of Food Chemistry. 79, 61-67.

Organización Mundial de la Salud, OMS (2013). Información general sobre la hipertensión en el mundo, Una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf?ua=1 [Acceso 28 julio 2015].

Organización Mundial de la Salud, OMS (2015). Enfermedades cardiovasculares Nota descriptiva (Actualizado Enero de 2015) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/> [Acceso 4 agosto 2015].

Preethal, P.P., Girija D.V. and Rajamohan, P.T (2013). Comparative effects of mature coconut water (*Cocos nucifera*) and glibenclamide on some biochemical parameters in alloxan induced diabetic rats. Revista Brasileira de Farmacognosia. 23(3), 481–487.

Radoi, V., Lixandru, D., Mohora, M. and Virgolici, B (2012). Advanced glycation end products in diabetes mellitus: Mechanism of action and focused treatment. Proceedings of the Romanian Academy. Series B – Chemistry, Life Sciences and Geoscience. 1, 9–19.

Renjith, R.S. and Rajamohan, T (2012). Young inflorescence of *Cocos nucifera* contributes to improvement of glucose homeostasis and antioxidant status in diabetic rats. International Journal of Diabetes in Developing Countries. 32(4), 193-198.

- Stevens, G., Dias, R., Thomas, K., Rivera, J., Carvalho, N. and Barquera, S (2008). Characterizing the epidemiological transition in Mexico: National and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *Plosmedicine*. 5(6), 125.
- Siddhurajua, P., Mohanb, P.S. and Becker, K (2002). Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp, *Food Chemistry*, 79(1), 61-67.
- Sutar, G.V., Das, K. and Wilking, E.J (2015). Screening of different leaf extracts of *Cassia fistula* Linn for investigation of hypolipidemic activity in two different rat models. *International Letters of Natural Sciences*. 30, 30-43.
- Tébar, M.F. and Escobar, J.F (2009). La diabetes mellitus en la práctica clínica. *Medica Panamericana*. Madrid. pp. 142-154.
- World Health Organization, WHO (2002). *Traditional Medicine Strategy 2002–2005*. [Acceso 6 Agosto 2015].

CAPITULO II

INHIBICIÓN ENZIMÁTICA Y EFECTO VASORRELAJANTE DE PLANTAS USADAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES, HIPERTENSIÓN Y OBESIDAD EN LA MEDICINA TRADICIONAL MAYA

Descripción del capítulo

La medicina tradicional juega un papel importante en la población yucateca para el tratamiento de enfermedades; tales como la diabetes, la hipertensión y la obesidad, con base en reportes las plantas empleadas, se evaluaron preparaciones tradicionales y extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de nueve plantas medicinales en ensayos de inhibición de la actividad de α -glucosidasas, lipasa pancreática, y la evaluación de la actividad vasorrelajante. La preparación acuosa tradicional de *O. campechianum* fue la más activa en el ensayo de inhibición de α -glucosidasas (inhibición 70%), con un valor de IC_{50} de 178 $\mu\text{g/mL}$, alternativamente, los dos extractos con mayor actividad contra la lipasa pancreática fueron los de la raíz de *R. mangle* (82% de inhibición, $IC_{50} = 142,2 \mu\text{g/mL}$) y la hoja de *P. auritum* (inhibición 67%, $IC_{50} = 185,7 \mu\text{g/mL}$). Finalmente, las pruebas de los extractos por su efecto vasorrelajante en aorta de rata mostró que el extracto del tallo ($E_{\text{max}} = 80\%$, $IC_{50} = 0,97 \mu\text{g/mL}$) y la preparación tradicional de *R. mangle* ($E_{\text{max}} = 78\%$, $IC_{50} = 4.57 \mu\text{g/mL}$), junto con el extracto de hoja de *O. campechianum* ($E_{\text{max}} = 81\%$, $IC_{50} = 127 \mu\text{g/mL}$) son los más activos. La bioactividad de los diversos extractos y preparaciones no coinciden completamente con el uso tradicional reportado para las diferentes plantas medicinales, al menos con los modelos de ensayo utilizados en esta investigación.

ENZYMATIC INHIBITION AND VASORELAXANT EFFECT OF EXTRACTS FROM PLANTS USED TO TREAT DIABETES, HYPERTENSION AND OBESITY IN MAYAN TRADITIONAL MEDICINE

Wendy del C. Dzib-Guerra,¹ Fabiola Escalante-Erosa,¹ Karlina García-Sosa,¹ Guillermo J. Ramírez-Ávila,² Samuel E. Estrada-Soto,³ Angélica Flores-Flores,³ Rolffy Ortiz-Andrade,⁴ Luis M. Peña-Rodríguez^{1*}

¹Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Mérida, Yucatán.

²Centro de Investigación Biomédica del Sur IMSS, Xochitepec, Morelos. ³Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos. ⁴Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán.

Sometido a Journal of Ethnopharmacology

* To whom correspondence should be addressed: Unidad de Biotecnología CICY, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná. Mérida, Yucatán, 97200 México. E-mail: lmanuel@cicy.mx; tel.: +52-999-9428330; fax: +52-999-9813900.

2.1. ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Traditional medicine plays an important role in the health of the Yucatecan population when used to treat diseases such as diabetes, hypertension and obesity. The screening of these medicinal plants for bioactivity related to their healing properties can contribute to their identification as potential sources of novel bioactive metabolites.

Aim: To investigate the inhibition of the α -glucosidases and pancreatic lipase activities, together with the vasorelaxant effect, of extracts from plants used to treat diabetes, hypertension and obesity in Mayan traditional medicine.

Materials and methods: Traditional aqueous preparations, as well as ethanolic extracts of leaves, stems and roots of nine selected medicinal plants were evaluated for their vasorelaxant effect using an *ex vivo* assay (rat aortic tissue pre-contracted with norepinephrine), and for their *in vitro* enzyme-inhibition activity against α -glucosidases (1 mg/mL) and pancreatic lipase (0.25 mg/mL). The most active extracts were fractionated and the resulting fractions were also evaluated.

Results: The traditional aqueous preparation of *O. campechianum* was the most active in the α -glucosidases inhibition assay (70% inhibition), with an IC_{50} value of 178 μ g/mL, well below that of the extract of *C. sinensis* (83% inhibition, IC_{50} = 211 μ g/mL) used as positive control. Alternatively, the two extracts with the highest activity against pancreatic lipase were those from the root of *R. mangle* (82% inhibition, IC_{50} = 142.2 μ g/mL) and the leaf of *P. auritum* (67% inhibition, IC_{50} = 185.7 μ g/mL), both showing better inhibition and IC_{50} values than those of the *C. sinensis* extract (58% inhibition, IC_{50} = 229 μ g/mL) used as positive control. Finally, testing of the extracts for their vasorelaxant effect on aortic tissue, showed that the stem extract (E_{max} = 80%, IC_{50} = 0.97 μ g/mL) and the traditional preparation of *R. mangle* (E_{max} = 78%, IC_{50} = 4.57 μ g/mL), together with the leaf extract of *O. campechianum* (E_{max} = 81%, IC_{50} = 127 μ g/mL), showed a vasorelaxant effect which was concentration-dependent and had an efficacy similar to that of the positive control (carbachol).

Conclusion: The bioactivity of the various extracts and preparations did not coincide with the traditional use reported for the different medicinal plants; these differences suggest that the

metabolites responsible for the medicinal properties in each plant might have a different mechanism of action than those detected in the assay models used in this investigation. However, these results constitute an important base for future studies leading to the identification of novel bioactive metabolites with potential pharmacological applications.

Key words: Enzyme inhibition; *Ocimum campechianum*; *Piper auritum*; *Rhizophora mangle*.

2.2. INTRODUCTION

Currently, many countries are experiencing a steady growth of degenerative chronic diseases, which include type II diabetes, hypertension, and cancer, because of an unhealthy lifestyle in the population (WHO, 2012). These diseases, which can act independently or in combination, are often associated with the development of stroke and cardiovascular disease, recognized as the major cause of death (WHO, 2012). Presently, there exist approximately 382 million people affected by diabetes worldwide, and it is estimated that the number will have increased 55% by 2025 (IDF, 2013). Additionally, more than 900 million people suffer from hypertension, and these figures are projected to increase 30% by 2025 (Kearney et al., 2005). Hypertension and diabetes are often associated, and it is widely accepted that obesity represents an important risk factor in both conditions. In 2014, 13% of the world's adult population was reported to be suffering from obesity (WHO, 2015), and Mexico is currently recognized as the most obese country in the world, with diabetes being the major cause of death and with 30% of the Mexican adult population suffering from hypertension (WHO, 2012; Rojas-Martinez et al., 2012).

Nowadays, there are several types of drugs used to treat hypertension, each lowering blood pressure in a different way; these include diuretics, vasodilators, calcium channel blockers, angiotensin II antagonist and angiotensin converting enzyme inhibitors (Chobanian et al., 2003). Similarly the conventional medications used to treat diabetes include biguanides, sulphonylureas, thiazolidinedione, meglitinide derivatives and α -glucosidase inhibitors (Dey et al., 2002). Finally, the only clinically-approved pharmacological agent against obesity is the pancreatic lipase inhibitor Orlistat (Chaput et al., 2007). Generally, the therapeutic treatments for these diseases are administered for life, often requiring combinatory therapy and representing a high economic cost. Frequently, the occurrence of adverse effects such as hypoglycemia, weight gain, gastrointestinal disorders, liver toxicity, etc., or the development of hypersensitivity reactions requires discontinuing or changing the treatment (Chaput et al., 2007, Esquivel-Gutierrez et al., 2012). Because all of these considerations, it is relevant and necessary to search for new pharmaceutical agents for a better control of diabetes, hypertension and obesity.

Recently, the inhibition of key enzymes involved in the metabolism of lipids and carbohydrates represents a specific target for the development of new treatments against obesity and diabetes, respectively. Alternatively, in the search for novel agents to control blood pressure, extracts and purified products have been tested *ex vivo* for their vasorelaxant effect using isolated rodent

arteries that contribute to the modulation of blood pressure. Presently, the control of postprandial hyperglycemia and hyperlipidemia is believed to be important in the treatment of diabetes mellitus and the development of concomitant diseases or complications (Pistroch et al., 2011). One of the enzymes responsible for the postprandial glucose and insulin peaks are the α -glucosidases, required for the release of absorbable monosaccharides; consequently, α -glucosidases inhibitors have the potential to delay the absorption of ingested carbohydrates and consequently control of the blood glucose (Stuart et al. 2004). Additionally, an enzyme that can contribute to weight loss by reducing hyperlipidemia is the pancreatic lipase, responsible for the digestion of dietary triglycerides in the small intestine. Because of its mechanism of action, the inhibition of pancreatic lipase can be helpful in the identification of potential anti-obesity agents (Lunagariya et al., 2014). Finally, in the determination of the vasorelaxant effect, the endothelium represents an important organ in the search of antihypertensive agents; the endothelial cells act as support in the blood vessels and transport of molecules with capacity of modify the vascular tone; it also mediates the release of relaxant factors such as nitric oxide, prostacyclin and contractile factors like endothelin-1, all of them regulators of arterial pressure. For this reason, the knowledge of the vasorelaxant effect being dependent or not of endothelium contributes to learning about the mechanism of action of a bioactive natural product (Vanhoutte et al., 1986; Vogel, 2008).

For many years medicinal plants have been considered safer and less expensive for the treatment of a wide range of diseases that affect the population (Esquivel-Gutierrez et al., 2012). The Yucatan peninsula is characterized for the biodiversity of its flora, which includes about 2300 species (Durán et al., 2000; Arellano et al., 2003); from these, 30% have a documented medicinal use in Mayan traditional medicine, mainly to treat skin problems, as well as hypertension, gastrointestinal and respiratory disorders, and diabetes (Méndez et al., 2012). However, to date, a large number of these plants have not been studied phytochemical and/or pharmacologically. Thus herein is reported the evaluation of the vasorelaxant effect and the inhibition of α -glucosidase and pancreatic lipase of crude extracts from plants used in Mayan traditional medicine for the treatment of diabetes, hypertension and obesity.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Plant material and extraction

Plant material was collected in October- November 2013 and identified by field specialist Paulino Simá-Polanco; a voucher specimen of each species was deposited in the Herbarium of Unidad de Recursos Naturales CICY under the appropriate collection number: *Brosimum alicastrum* (P. Simá 3153), *Bunchosia swartziana* (P. Simá 3155), *Ehretia tinifolia* (P. Simá 3152) and *Manilkara zapota* (P. Simá 3154) were collected in Mopila, a community of Yaxcabá, Yucatán, México. Plants of *Cassia fistula* (P. Simá 3158) were collected on the road from Dzitya to Chablekal, Yucatán, México, 200 m from the entrance of “Universidad de Chapingo”; fruits and inflorescences of *Cocos nucifera* (P. Simá 3) were collected from a study site in San Crisanto, Yucatán, México; *Ocimum campechianum* (P. Simá 3157) was collected on the road from Sierra Papacal to Chuburná Puerto, Yucatán, México, 100 m from the entrance to “Parque Científico y Tecnológico de Yucatán”; *Piper auritum* (P. Simá 3159) was collected in a private home in Baca, Yucatán, México; and *Rhizophora mangle* (P. Simá 3156) was collected in Chuburná Puerto, Yucatán, México.

Preparation of plant extracts. Leaves, stems and roots of each species (inflorescences only in the case of *C. nucifera*) were first dried for three days at room temperature and then for three days in an oven at 50°C. The plant material was ground and extracted by maceration (three times) with ethanol (400 ml/20 g of plant material); at room temperature for 72 hr. and only the water from *C. nucifera* was extracted by liquid- liquid extraction with ethyl acetate 2:1 (v/v, three times). Plant material was eliminated by successive filtration through cheesecloth and filter paper (Whatman No. 1) and the ethanol filtrates was concentrated under reduced pressure to produce the corresponding crude extracts. For the traditional preparations (Aq-Tp), an infusion of the dry plant material commonly used in traditional medicine was prepared by adding it to boiling water (20 g/L) and allowing it to stand for 20 min. The plant material was eliminated by filtration and the resulting aqueous extract was frozen and lyophilized; in the case of *C. nucifera*, since the water is traditionally used as a remedy, the water from a coconut was filtered, frozen and lyophilized to produce the corresponding crude extract of aqueous traditional preparation.

Fractionation of crude extracts. The more active extracts were suspended in a 3:2 (v/v) mixture of water/methanol and the resulting aqueous suspension was partitioned successively between hexane, dichloromethane, and ethyl acetate 2:1, v/v). The solvent of each fraction, including the

water in the aqueous residue, was eliminated under reduced pressure to produce the corresponding fractions.

2.3.2. Inhibition of α -glucosidases activity assay

The assay was carried out according to the procedure described by Ortiz-Andrade et al. (2007). In brief, a solution of cornstarch (12.5 mg/ml, S-4126; Sigma-Aldrich) in a 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) was combined with the sample (1 mg/mL) and of the corresponding control (*C. sinensis* extract and acarbose) with a final volume of 250 μ L. The reaction started by adding 10 μ l of the crude enzyme (homogenate from Sprague Dawley rats' intestinal mucosa) and the reaction mixture was kept at 37 °C for 10 min; the reaction was stopped by adding acarbose (12.5 μ g, enough for 99% inhibition, Sincrosa[®], Alpharma, Mexico City, Mexico) and incubating in ice. The released glucose was quantified using a glucose oxidase-based quantification kit (Glucose-TR, Spinreact; Girona, Spain), following the manufacturer's directions and reading at 492 nm. The assays were performed in quadruplicate and the results are reported as percentage of inhibition. Medium inhibitory concentrations (IC₅₀) were determined by testing the samples at different concentrations (0.1–2 mg/mL).

2.3.3. Inhibition assay in pancreatic lipase activity

The assay was carried out according to the method reported by Ramírez et al. (2012). Briefly, the enzyme reaction was performed using a mixture of 2, 3-dimercapto-1-propanol-tributyrate (DMPTB, 97%; 282413, Sigma-Aldrich) in 50 mM TRIS-HCl (pH 7.2), 2 mM CaCl₂, 0.1 M NaCl, 0.06% Triton X-100, and 0.8 mM 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid; DTNB, Ellman's reagent; D-8130, Sigma-Aldrich) in ethanol. The porcine lipase (L3126, Sigma-Aldrich) was prepared as a stock (10 mg/ml) in TRIS-HCl 20 mM (pH 6.2), bovine serum albumin (BSA; 1 mg/mL) and 0.1 M NaCl, and kept at -80°C. The working samples of enzyme were diluted to 2 mg/mL in BSA (1 mg/mL), kept at 4°C, and used within 4-5 hours. The assays were performed at 37°C and initiated by adding 10 μ l of enzyme solution to 790 μ l of reaction mix containing 20 μ l of a 0.25 mg/mL plant extract solution in DMSO, or of the corresponding control (*C. sinensis* extract and orlistat, Lysthin[®], PsicoFarma; Mexico City, Mexico). The changes in absorbance were recorded for up to 5 minutes at 412 nm, plotted in Excel (Microsoft), and the initial slope was used as the velocity of the reaction. The assays were performed in quadruplicate and the results are reported as percentage of inhibition. Medium inhibitory concentrations (IC₅₀) were determined by testing the samples at different concentrations.

2.3.4. Animals

Male Wistar rats weighing an average of 250 g were used and maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 hours light/dark cycle and 45-65% of humidity during experimental time. All animal procedures were developed in accordance with Mexican Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (SAGARPA, NOM-062-ZOO-1999, Mexico), and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (UNAM) based on US National Institute of Health publication #85-23, revised 1985.

2.3.5. Rat aorta rings test

A previous protocol was used (Rendón-Vallejo et al, 2012). Removal of the thoracic aorta from the animals was followed by cleaning to eliminate adhering connective tissue; the aorta was cut into rings (3–5 mm length) and, in some cases, the endothelium was removed. Tissues were mounted in incubation baths containing warm (37°C) and oxygenated (95:5 O_2/CO_2) Krebs solution. An isometric vertical system was used for changes in tension, using Grass-FT03 force transducers (Astromed, West Warwick, RI, USA) connected to an MP100 analyzer (BIOPAC Instruments, Santa Barbara, CA, USA). After equilibration, rings were contracted by norepinephrine (NE, 0.1 mM) and washed every 30 min for 2 h. The absence of endothelium was confirmed by the lack of a relaxing response to carbachol (1mM). After pre-contraction with NE, the test samples (extracts, vehicle, and positive control) were added in cumulative concentrations (from 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to a final volume of 100 μl in the bath to obtain cumulative concentration–response curves of extracts-induced relaxation. The relaxant effect of extracts and positive controls (carbachol or nifedipine) was determined by comparing the muscular tone of the contraction before and after the application of the test materials. Muscular tone was calculated from the tracings, using Acknowledge software (BIOPAC SYSTEM, Inc., Santa Barbara, CA, USA).

2.3.6. Statistical analysis

The results of the vasorelaxant activity are expressed as the mean of five animals \pm standard error of the mean (SEM). Concentration response curves (CRC) were plotted using the Origin 6.0 software. For the determination of the most active samples in all assays, statistical treatment of the data was carried out using the Sigma Plot 10.0 software, with a statistical significance between the mean differences of $p < 0.05$ by an analysis of variance (ANOVA) with post-hoc test of Student-Newman-Keuls (SNK).

2.4. RESULTS

A search of plants used in Mayan traditional medicine to treat diabetes, hypertension and obesity, with limited or no information about their phytochemistry and pharmacology, or belonging to little-known plant families, allowed the identification of nine plants (Table 2.1) (Mendez et al., 2012; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Andrade-Cetto et al., 2005), as potential sources of new bioactive metabolites against diabetes, hypertension and obesity.

A total of 26 organic extracts were prepared from the leaves, stems, and roots of each plant, with the exception of *C. nucifera* whose extracts were only obtained from the inflorescences and coconut water. Additionally, a traditional aqueous preparation of each plant was prepared and lyophilized for testing. The results of the enzymatic inhibition against α -glucosidases and pancreatic lipase, as well as the vasorelaxant effect of the organic crude extracts and traditional preparations are listed in Table 2.2.

2.4.1. Enzymatic inhibition of crudes extracts

The aqueous traditional preparations (Aq-Tp) of the leaves of *O. campechianum* and *E. tinifolia*, together with the ethyl acetate extract of the water from *C. nucifera*, presented the highest activity in the inhibition of α -glucosidases assay at 1 mg/mL, with values of 70% ($IC_{50} = 178 \mu\text{g/mL}$), 54.2% ($IC_{50} = 240.4 \mu\text{g/mL}$) and 44% ($IC_{50} = 288.7 \mu\text{g/mL}$), respectively (Table 2.2). The inhibition of enzymatic activity of Aq-Tp of *O. campechianum* proved to be better than that of the ethanolic extract from the leaves of *C. sinensis* (83% inhibition; $IC_{50} = 211.05 \mu\text{g/mL}$) and close to that of the reference drug acarbose (>90% inhibition) both used as positive controls. None of the ethanolic extracts of the plant materials showed significant activity.

Testing of the organic extracts and aqueous traditional preparations in the inhibition of the porcine pancreatic lipase assay showed the strongest activity in the organic extracts of the roots of *R. mangle* (83%; $IC_{50} = 142.2 \mu\text{g/mL}$), the leaves of *P. auritum* (67%; $IC_{50} = 204.2 \mu\text{g/mL}$) and the roots of *M. zapota* (63%; $IC_{50} = 296 \mu\text{g/mL}$), while the extract of *C. sinensis* used as positive control only presented 58% inhibition ($IC_{50} = 229.7 \mu\text{g/mL}$) (Table 2.2). As expected, orlistat, a well-known anti-lipase agent also used as positive control, significantly inhibited the enzyme

activity with a value of over 95%. In this assay, none of the aqueous traditional preparations showed significant activity.

Table 2.1. Plants used in Mayan traditional medicine for the treatment of diabetes, hypertension and obesity

Family	Scientific name	Popular name	Used part	Medicinal uses
Moraceae	<i>Brosimum alicastrum</i> S.	Ramón, ojite, ox, oox	Leaves	Diabetes, obesity, respiratory and gynecological affections
Malpighiaceae	<i>Bunchosia swartziana</i> G.	Kibche' Sipché, manzanillo	Leaves	Hypertension, nerves, bad air (mal aire)
Fabaceae	<i>Cassia fistula</i> L.	Hoja sen, lluvia de oro	Stems	Diabetes, asthma, stomach diseases
Areaceae	<i>Cocos nucifera</i> L.	Cocotero, marón, palma cocotero, palma de oco.	Water	Diabetes, obesity, intestinal parasites, dysentery, gynecological affections, skin diseases
Boraginaceae	<i>Ehretia tinifolia</i> L.	Bek, beek, roble	Leaves	Hypertension, fever, headache, gynecological affections, inflammation
Sapotaceae	<i>Manilkara zapota</i> V.	Chak ya', sakyá', Ya', chicozapote, zapote	Leaves	Hypertension, diabetes, diarrhea, cholesterol, snakebite.
Lamiaceae	<i>Ocimum campechianum</i> W.	Albahaca de monte, kakaltun, x'kakaltun.	Leaves	Hypertension, diabetes, rash, digestives problems, diarrhea, cataracts.
Piperaceae	<i>Piper auritum</i> K.	Mak'ulan, xmak'olan, hierba santa, momo.	Leaves	Diabetes, diarrhea, asthma, respiratory problems, skin diseases
Rhizophoraceae	<i>Rhizophora mangle</i> L.	Tabché, x'tabche, mangle colorado, mangle rojo	Stems	Diabetes, skin diseases, diarrhea, gynecological affections

Table 2.2. Results of the enzymatic inhibition of α -glucosidase and pancreatic lipase of the organics extracts and traditional preparations

Scientific name	Code	Extract type	Inhibition (%)	
			α -glucosidase (1 mg/mL)	Pancreatic lipase (0.25 mg/mL)
<i>B. alicastrum</i>	BAL	EtOH	14±0.7	25±1.9
	BAS	EtOH	NA	29±1
	BAR	EtOH	18±0.9	16±0.9
	BAT	H ₂ O	8.5±1.2	2±0.4
<i>B. swartziana</i>	BSL	EtOH	15±1	44±0.4
	BSS	EtOH	2±0.6	17±0.6
	BSR	EtOH	22±0.9	48±0.6
	BST	H ₂ O	0.5±0.1	7±0.8
<i>C. fistula</i>	CFL	EtOH	37±0.8	16±0.3
	CFS	EtOH	19±1.7	23±0.6
	CFR	EtOH	23±0.7	28±0.9
	CFT	H ₂ O	16±0.8	6±1.4
<i>C. nucifera</i>	CNI	EtOH	15±0.6	46±0.8
	CNW	AcOEt	44±0.1*	16±0.5
	CNT	H ₂ O	NA	19±0.7
<i>E. tinifolia</i>	ETL	EtOH	7±1.1	41±1.8
	ETS	EtOH	17±0.9	35±0.8
	ETR	EtOH	17±0.3	12±0.4
	ETT	H ₂ O	54±1.6*	14±0.8
<i>M. zapota</i>	MZL	EtOH	18±0.8	52±0.6
	MZS	EtOH	7±0.8	41±0.6
	MZR	EtOH	39±1.3	63±1.7
	MZT	H ₂ O	26±0.5	17±0.5
<i>O. campechianum</i>	OCL	EtOH	12±0.8	49±1
	OCS	EtOH	2±0.5	23±1.4
	OCR	EtOH	4±0.1	40±1.7
	OCT	H ₂ O	70±2.1*	19±1.4
<i>P. auritum</i>	PAL	EtOH	14±0.2	67±0.6
	PAS	EtOH	16±0.7	8±0.6
	PAR	EtOH	5±0.5	13±0.7
	PAT	H ₂ O	5±0.6	17±1
<i>R. mangle</i>	RML	EtOH	10±0.6	32±0.9
	RMS	EtOH	3±0.5	14±0.9
	RMR	EtOH	22±0.4	83±1.2
	RMT	H ₂ O	12±0.5	20±0.4
<i>C. sinensis</i> Acarbose Orlistat	CSL	EtOH	83±0.9*	58±2.4
			>90	-
			-	>95

L: leaf; R: Root; S: Stem; I: inflorescence; W: water; T: traditional preparation; AcOEt: Ethyl acetate; EtOH: Ethanol; H₂O: Aqueous; NA: Not Active; * $p < 0.05$

2.4.2. Enzymatic inhibition of fractions from active crude extracts

Fractionation of the most active extracts produced four fractions of increasing polarity which were tested for their inhibition of enzymatic activity; fractions obtained from the aqueous traditional preparation of *O. campechianum* were tested against α -glucosidases, while those obtained from the root extract of *R. mangle* and the leaf extract of *P. auritum* were tested against pancreatic lipase. The four fractions from *O. campechianum* showed inhibition values of 12%, 2.3%, 54% and 19% of inhibition for the corresponding hexane, dichloromethane, ethyl acetate and aqueous fractions at 1 mg/mL (Figure 2.1.). Similarly, testing of the four fractions from *R. mangle* and *P. auritum* for their inhibition of pancreatic lipase showed values of 15%, 10%, 34% and 17% and 66%, 19.7, 39.5 and 7.2%, at 0.25 mg/mL respectively (Figure 2.1.).

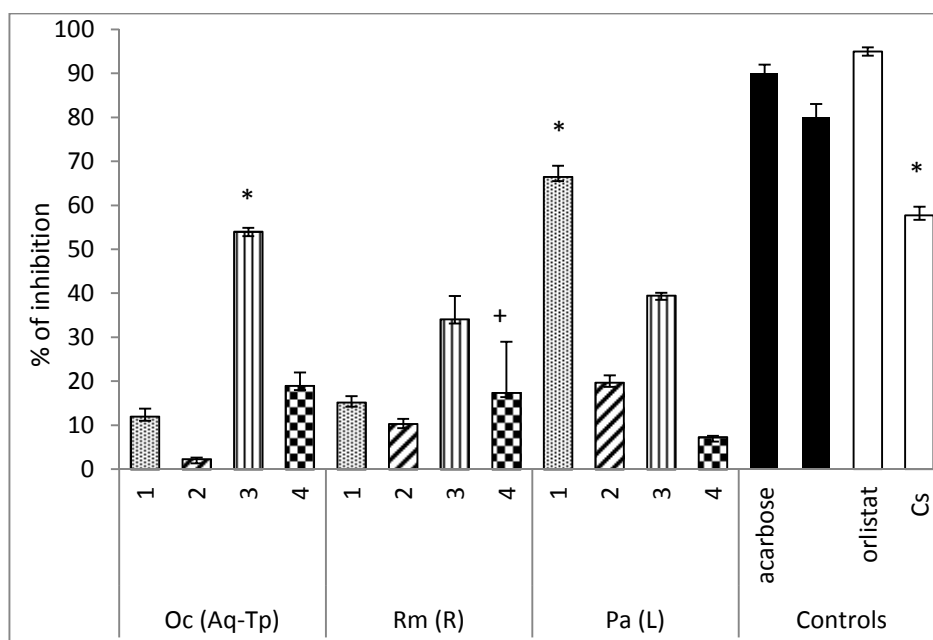


Figure 2.1. Inhibitory effect of hexane (1), dichloromethane (2), ethyl acetate (3), and aqueous (4) fractions from OCT against α -glucosidase, together fractions from RMR and PAL against pancreatic lipase activity. CSL, acarbose and orlistat are positive controls. Means with different letters are statistically different according to an ANOVA-SNK ($p < 0.05$). + Precipitation in the sample interfered with lipase assay.

2.4.3. Vasorelaxant effect of crude extracts in rat aortic rings

The evaluation of the vasorelaxant effect of the traditional preparations and the organic extracts of the plant part used in traditional medicine using rat aortic rings, with and without endothelium, pre-contracted with norepinephrine showed that the organic extract from the leaves of *O. campechianum* ($E_{max} = 81.6\%$, $EC_{50} = 127.6 \mu\text{g/mL}$) (Figure 2.2A), and both the aqueous traditional preparation ($E_{max} = 78\%$, $EC_{50} = 4.57 \mu\text{g/mL}$) and organic extract ($E_{max} = 80\%$, $EC_{50} = 0.97 \mu\text{g/mL}$) from the stem of *R. mangle*, had the most activity in endothelium-intact aorta rings (Table 2.3). Alternatively, testing of the same samples on endothelium denuded aorta rings showed activity only in the organic extract from the leaves *O. campechianum* ($E_{max} = 45.9\%$) (Figure 2.2B).

Table 2. 3. Results of vasorelaxant effect of the organics extracts and traditional preparations of the plant part used in Mayan traditional medicine

Scientific name	Code	Extract type	Vasorelaxation	
			With endothelium (E+) E_{max} (%)	Without endothelium (E-) E_{max} (%)
<i>B. alicastrum</i>	BAL	EtOH	N.A.	NA
	BAT	H ₂ O	24±	NA
<i>B. swartziana</i>	BSL	EtOH	NA	NA
	BST	H ₂ O	NA	NA
<i>C. fistula</i>	CFS	EtOH	NA	NA
	CFT	H ₂ O	NA	NA
<i>C. nucifera</i>	CNW	AcOEt	NA	NA
	CNT	H ₂ O	NA	NA
<i>E. tinifolia</i>	ETL	EtOH	NA	NA
	ETT	H ₂ O	39±	NA
<i>M. zapota</i>	MZL	EtOH	23±	NA
	MZT	H ₂ O	60±	NA
<i>O. campechianum</i>	OCL	EtOH	81± 6	45.9± 3
	OCT	H ₂ O	NA	NA
<i>P. auritum</i>	PAL	EtOH	NA	NA
	PAT	H ₂ O	NA	NA
<i>R. mangle</i>	RMS	EtOH	80± 5	NA
	RMT	H ₂ O	78±5.9	8.3±2
Carbachol			84±3	-
Nifedipine			-	95.2±1.7

L: leaf; R: Root; S: Stem; I: inflorescence; W: water; T: traditional preparation; AcOEt: Ethyl acetate; EtOH: Ethanol; H₂O: Aqueous; NA: Not Active; * $p < 0.05$

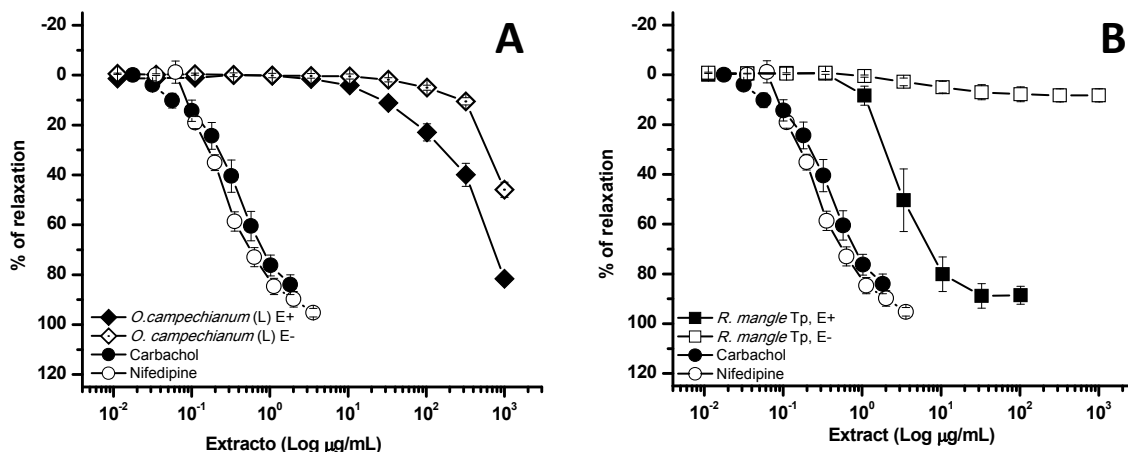


Figure 2.2. Vasorelaxant effect of the OCL (A) and RMT (B) in aortic rings with (E+) and without (E-) endothelium pre-contracted with NE 0.1 µM. Results are expressed as the mean ± SEM of the experiments; * $p < 0.05$.

2.5. DISCUSSION AND CONCLUSION

The majority of medicinal plants used in Mayan traditional medicine to treat diabetes, hypertension and obesity are administered orally, as decoctions or infusions of the corresponding plant part; in this study, aqueous traditional preparations of each plant, together with the organic extracts of the roots, stems and leaves were evaluated to determine if the extraction procedure influenced the detection of biological activity and explore the possibility of detecting bioactive metabolites in plant parts not commonly used in traditional medicine. For the case of *C. nucifera*, water from the fruit was designated as traditional preparation and its corresponding ethyl acetate extract as the organic extract; additionally, an ethanolic extract of the inflorescences was prepared and tested.

Testing of all traditional preparations and organic crude extracts for their enzymatic inhibition activity against α -glucosidases and pancreatic lipase, two well-known models in the search for new agents to control blood glucose content and manage type 2 diabetes (Krentz and Bailey, 2005), as well as to reduce obesity by lowering carbohydrate and lipids absorption (Tucci et al., 2010), showed that the traditional preparations from leaves of *O. campechianum*, *E. tinifolia*, and the ethyl acetate extract from water of *C. nucifera*, presented the highest levels of inhibition in the α -glucosidases assay ($IC_{50} = 178.0, 240.4, \text{ and } 288.7 \mu\text{g/mL}$, respectively), while the organic

extracts from the roots of *R. mangle*, the leaves of *P. auritum*, and the roots of *M. zapota* proved to be the most active against the pancreatic lipase ($IC_{50} = 142.2, 204.2, 296 \mu\text{g/mL}$, respectively). In both assays, the most active extract showed a stronger activity than that detected for the extract of *C. sinensis* used as positive control ($IC_{50} = 211.05$ and $229.7 \mu\text{g/mL}$ against α -glucosidases and pancreatic lipase, respectively) (Table 2.2). It is interesting to mention that, while none of the ethanolic extracts of the plant materials showed significant activity in the α -glucosidases assay, none of the traditional preparations showed a significant inhibition of the pancreatic lipase; these results suggest that while the metabolites responsible for the inhibition of α -glucosidases are hydrophilic, those capable of inhibiting the pancreatic lipase are of lipophilic nature. The α -glucosidases inhibitory activity of hydrophilic metabolites can be explained by reports in the literature describing the formation of multiple hydrogen bonds as critical for the affinity and inhibitory effect of bioactive metabolites towards α -glucosidases (Shen et al., 2010). Alternatively, and although a number of hydrophilic metabolites have also been reported to inhibit pancreatic lipase, e.g. glycosides, polyphenols, polysaccharides, saponins (Buchholz and Melzing, 2015; Birari and Bhutani, 2007); the same type of inhibitory activity has been reported for lipophilic metabolites such as alkaloids, carotenoids, and terpenoids (Lunagariya et al., 2014). Fractionation of the aqueous traditional preparation of *O. campechianum* by means of a liquid-liquid partition procedure between hexane, dichloromethane and ethyl acetate yielded four fractions containing metabolites of low (hexane), medium-low (dichloromethane), medium-high (ethyl acetate), and high (aqueous residue) polarity which, when tested in the α -glucosidases inhibition assay, showed significant activity only in the medium-high (ethyl acetate) polarity fraction (54%), indicating that not all of the metabolites responsible for the activity of the traditional preparation were of hydrophilic nature. Furthermore, the lower level of activity detected in the semipurified ethyl acetate fraction, when compared to that of the original extract, suggests a possible synergism between the metabolites of the medium-high and high polarity fractions. Similarly, partitioning of an aqueous suspension of the bioactive organic extracts from root of *R. mangle* and leaf of *P. auritum* produced semipurified fractions which, when tested in the pancreatic lipase assay, showed that only the low-polarity fraction of *P. auritum* had significant activity (66%) when tested against pancreatic lipase, confirming the lipophilic nature of the bioactive metabolites present in the extract of *P. auritum*. However, the lower inhibitory activity detected in the four semipurified fractions of *R. mangle* strongly suggested that the activity detected in the original crude extract is due to a synergistic effect between metabolites of different polarities.

The significant activity detected in the traditional preparation of *O. campechianum* against α -glucosidase is in agreement with literature reports describing high levels of α -glucosidases and α -amylase inhibition in the aqueous extract of *O. sanctum*, which were attributed to its phenolic content (Anil and Sadashiv, 2014). Similarly, the α -glucosidases and α -amylase inhibition activity detected in an aqueous leaf extract of *O. basilicum* was attributed to its phenolic and flavonoid content (El-Beshbishy and Bahashwa, 2012). Phenols with inhibitory activity against α -glucosidases and glucose transport include flavon-3-ol (catechins) and epigallocatechin gallate, that is the major components of green tea (*C. sinensis*; Theaceae) (Singh et al., 2011; Kamiyama et al., 2010), similarly, recent reports suggest that high doses of tea polyphenols, while helping to treat diabetes and prevent obesity, may be also protective against cardiovascular diseases (Hodgson et al., 2010). To date, the phytochemical knowledge of *Ocimum campechianum* is related to the components of its essential oils which are recognized for their antioxidant, antimicrobial and antifungal activities and their containing eugenol, eucalyptol, β -caryophyllene, β -elemene, and sabinene as major components (Sacchetti et al., 2004; Calvo-irabién, 2012).

The leaf extract of *O. campechianum* also showed the highest vasorelaxant effect, with a concentration-dependent vasodilator response, when tested in aortic rings with endothelium pre-contracted with norepinephrine (Table 2.3). However, when the extract was evaluated on endothelium-denude aortic rings, a depression of the cumulative concentration-response curve was observed (Figure 2.2A), suggesting that the response is partially-dependent of endothelium and might involve more than one mechanism of action, e.g. one that may involve a cyclic nucleotide pathway (cGMP), another related to the inhibition of calcium influx, or one associated to the release of relaxation-inducing substances from endothelium (nitric oxide, prostacyclines and endothelium-derived relaxing factor) (Aguirre-Crespo et al., 2005; Yen et al., 1998). It has been suggested that the involvement of different mechanisms could depend on the concentration of the metabolite, e.g. low concentrations of caffeic acid phenyl ethyl ester, one of the main components of propolis, induces a relaxing effect on vascular smooth muscle through the activation of the NO/cGMP pathway, while high concentrations of this metabolite induce vasodilation in an endothelium-independent manner, likely due to the inhibition of Ca^{2+} entry into the cytoplasm of muscle cells or due to the inhibition of the release of this cation from intracellular stores (Cicala et al., 2003; Luna-Vazquez et al., 2013). The vasorelaxant effect detected in the leaf extract of *O. campechianum* coincides with the relaxant effect, partially-dependent of endothelium, reported for the essential oil of *O. gratissimum* (Pires et al., 2012),

and with the vasorelaxant activity of *Agastache mexicana*, a plant belonging to the same family as *O. campechianum* (Lamiaceae), which has been attributed to its high relaxation of the vascular tissue (Hernández et al., 2009).

The significant activity shown by the root extract of *R. mangle* against the pancreatic lipase, even though it is the stem that is commonly used in traditional medicine against diabetes, demonstrates the importance of evaluating all parts of the plant when searching for bioactive metabolites; it is worth mentioning however, that the literature reports the stem extract of *R. mangle* as having hypoglycemic activity in an *in vivo* assay (Alarcón-Aguilara et al., 1998) and that both the ethanol extract and aqueous traditional preparation from stems of *R. mangle* showed a strong activity in the vasorelaxant assay in aortic rings with endothelium (Table 2.3.). The loss of the vasorelaxant effect when both extracts of *R. mangle* were tested on endothelium-free aortic rings, suggested that the effect can be caused by the activation of endothelial adrenoceptors linked to cyclooxygenase or nitric oxide synthase (Vanhoutte, 2001). To date, there are no literature reports about extracts of *R. mangle* as having anti-hypertensive or vasorelaxant activity; however, taking into account that the strong vasorelaxant effect of the methanol extract of *Arbutus unedo* (Ericaceae) has been attributed to its content of tannins and catechin gallate (Legssyer et al., 2004), it is possible to argue that the vasorelaxant effect of the stem extract of *R. mangle* might be due to the presence of this type of metabolites and other polyphenols such as quercetin, catechin, chlorogenic acid, gallic acid and elagic acid, all of which have been reported from this species (Sánchez et al., 2011).

The significant level of pancreatic lipase inhibitory activity detected in the leaf extract of *P. auritum* (Table 2.2.), does not coincide with a previous report in the literature describing a limited activity (15% inhibition) of the hydroalcoholic leaf extract of *P. sanctum* (syn. *P. auritum*) (Ramirez et al., 2012). These differences might be due to differences in geographical origin, altitude, soil composition, weather, and developmental stage of the plants, among others, since it is well known that biotic and abiotic factors influence the biosynthesis and accumulation of secondary metabolites (Lambers et al., 2008). The strong inhibitory activity detected in the hexane fraction from the leaf extract of *P. auritum* (Table 2.2) indicated that the bioactive metabolites are of low polarity; this finding coincides with previous reports describing the hexane leaf extract of *P. auritum* as causing significant body weight loss, as well as lowering levels of blood glucose, serum cholesterol, and triglycerides in streptozotocin-induced diabetic rats (Gutierrez, 2012; González et al., 2014). The limited phytochemical knowledge of *P. auritum*

comes from the chemical characterization of its essential oil, having safrol, myristicin, D-germacrene and β -caryophyllene as the major components (Garcia-Ríos et al., 2007), reported to possess antioxidant activity as well (Navarro et al., 2003).

The results of this investigation contribute to the knowledge about the biological activity of a selected group of plants used in Mayan traditional medicine, and allow the identification of several species as potential sources of novel bioactive metabolites to be used in the treatment of diabetes, hypertension and obesity. The fact that the biological activity detected in the various organic extracts and aqueous traditional preparations did not coincide with the traditional use reported for the different medicinal plants, suggests that the metabolites responsible for the medicinal properties in each plant might have a different mechanism of action than those detected in the assay models used. Additional experiments are necessary to elucidate these alternatives and to identify novel bioactive metabolites with potential pharmacological applications.

2.6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Paulino Simá-Polanco for assistance and identification of the plant material. WCDG wishes to thank the “Becas Mixtas” and “Movilidad” Programs from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), respectively, for financial support to carry out the research stays in Cuernavaca and Xochitepec, Morelos, México. WCDG also thanks CONACYT for scholarship No 366286.

2.7. REFERENCES

- Aguirre-Crespo, A., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Loopez-Guerrero, JJ., Estrada-Soto, S., 2005. Vasorelaxant effect of Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Pharmaceutical Biology*, 43, 540-546.
- Alarcón-Aguilara, F.J., Román-Ramos, R., Pérez-Gutiérrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C., Flores-Sáenz, J.L., 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. 61, 101-10.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99, 325–348.
- Anil R.A., Sadashiv C.A., 2014. Evaluation of alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activities of *Ocimum sanctum* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 25, 130-133.
- Arellano, R.J., Flores J. S., Tun, G.J., 2003. Nomenclatura forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la península de Yucatán. Fascículo No. 20. *Etnoflora Yucatanense*. Universidad Autónoma de Yucatán. 320 p.
- Birari, R.B., Bhutani, K.K., 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: Unexplored potential. *Drug Discovery Today*. 12, 879–889.
- Buchholz, T., Melzig, M.F., 2015. Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta Medica*. 81, 771-783.
- Calvo-Irabién, L.M. 2012. *Plantas Aromáticas de Yucatán*. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Primera Edición. México. 74 p.
- Chaput, J.P., St-Pierre, S., Tremblay, A., 2007. Currently available drugs for the treatment of obesity: sibutramine and orlistat. *Journal of Medical Chemistry*. 7, 3–10.

-
- Cicala, C., Morello, S., Iorio, C., Capasso, R., Borrelli, F., Mascolo, N., 2003. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*. 73, 73–80.
- Durán, R., Campos, G., Trejo, J.C., Simá, P., May, F., Juan, M., 2000. Listado florístico de la Península de Yucatán. *Impresiones Profesionales del Sureste*. Mérida, México. 99 p.
- El-Beshbishy, H.A., Bahashwan, S.A., 2012. Hypoglycemic effect of basil (*Ocimum basilicum*) aqueous extract is mediated through inhibition of α -glucosidase and α -amylase activities: an *in vitro* study. *Toxicology and Industrial Health*. 28,42–50.
- Esquivel-Gutiérrez, E.R., Noriega-Cisneros, R., Bello-González, M.A., Saavedra-Molina, A., Salgado-Garciglia, R., 2012. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*, 14, 45 – 52.
- International Diabetes Federation, IDF. 2013. Prevalence of diabetes in the world. Available from: < http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf> (accessed 9.8.14)
- García-Ríos, A., Leyva, M.A., Martínez, M.J., Stashenko, E.E., 2007. Determinación de la composición química y actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (piperaceae) difundida en la costa Colombiana. *Scientia Et Technica*. 13, 439-442.
- Gondoin, A., Grussu, D. Stewart, G. McDougall, G.J., 2010. White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase *in vitro*. *Food Research International*. 43,1537–1544.
- González, N.A., Pérez, G.R., Flores, Coter, L.B., 2014. Antidiabetic activity of *Piper auritum* leaves in streptozotocin-induced diabetic rat, beneficial effect on advanced glycation end product. *The Chinese Journal of Integrative Medicine*. 10-14. (DOI) 10.1007/s11655-014-1753-2.
- Grassi, D., Aggio, A., Onori, L., Croce, G., Tiberti, S., Ferri, C., Ferri, L., Desideri, G., 2008. Tea flavonoids, and nitric oxide-mediated vascular reactivity. *Journal of Nutrition*. 38, 1554–1560.

-
- Hernández-Abreu, O., Castillo-España, P., León-Rivera, I., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R., González-Christen, J., Vergara-Galicia, J., Estrada-Soto, S., 2009. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochemical Pharmacology*. 78, 54-61.
- Hodgson, J., Croft, K., 2010. Review: tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*. 31, 495–502.
- Kamiyama, O., Sanae, F., Ikeda, K., Higashi, Y., Minami, Y., Asano, N., Adachi, I., Kato, A., 2010. *In vitro* inhibition of α -glucosidases and glycogen phosphorylase by catechin gallates in green tea. *Food Chemistry*. 122, 1061–1066.
- Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P.K., He, J., 2005. Global burden of hypertension: Analysis of worldwide data. *Lancet*. 365, 217–223.
- Krentz, A.J., Bailey, C.J., 2005. Oral antidiabetic agents. *Drugs*. 65, 385-411.
- Lambers, H., Chapin III, F.S., Pons, T.L., 2008. *Plant: Physiological Ecology*. Second edition. Springer. New York.
- Legssyer, A., Ziyat, A., Mekh, H., Bnouham, M., Herrenknecht, C., Roumy, V., Fourneau, C., Laurens, A., Hoerter, J., Fischmeister, R., 2014. Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta. *Phytotherapy Research*. 18, 889-894.
- Lunagariya, N.A., Patel, N.K., Jagtap, S.C., Bhutani, K.K., 2014. Review article: Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *EXCLI Journal*. 13, 897-921.
- Luna-Vázquez, F., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., Rojas-Molina, I., Zavala-Sánchez, M.A., 2013. Vasodilator compounds derived from plants and their mechanisms of action. *Molecules*. 18, 5814-5857.

-
- Méndez, G.M., Durán, G.R., Borges, A.R., Peraza, S.S., Dorantes, E.A., Tapia, M.J., Torres, A.W., Ferrer, C.M., 2012. Flora medicinal de los mayas peninsulares. Primera edición. México.
- Navarro, M.C., Montilla, M.P., Cabo, M.M., Galisteo, M., Cáceres, A., Morales, C., Berger, I., 2003. Antibacterial, antiprotozoal and antioxidant activity of five plants used in Izabal for infectious diseases. *Phytotherapy Research*. 17, 325-329.
- Ortiz-Andrade, R.R., García-Jiménez, S., Castillo-España, P., Ramírez-Ávila, G., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S., α -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent,” *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 48–53.
- Pires, A.F, Madeira, S.V., Soares, P.M., Montenegro, C.M., Souza, E.P., Resende, A.C., Soares de Moura, R., Assreuy, A.M., Criddle, D.N., 2012. The role of endothelium in the vasorelaxant effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* in aorta and mesenteric vascular bed of rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 90, 1380-1385.
- Pistrosch, F., Natali, A., Hanefeld, M., 2011. Is hyperglycemia a cardiovascular risk factor *Diabetes Care*. 34,128–1231.
- Ramírez, G., Zavala, M., Perez, J. and Zamilpa, A., 2012. *In vitro* screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 701261, 6.
- Rendón-Vallejo, P., Hernández-Abreu, O., Vergara-Galicia, J., Millán-Pacheco, J., Mejía, A., Ibarra-Barajas, M., Estrada-Soto, S. 2012. *Ex vivo* Study of the Vasorelaxant Activity Induced by Phenanthrene Derivatives Isolated from *Maxillaria densa*. *Journal of Natural Products* 75, 2241–2245
- Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C.A., Jiménez-Corona, A., Gómez-Pérez, F.J., Barquera, S., Lazcano-Ponce, 2012. Prevalence of obesity and metabolic syndrome components in Mexican adults without type 2 diabetes or hypertension. *Salud Pública de México*. 54, 7-12.
-

-
- Sacchetti, G., Medici, A., Maietti, S., Radice, M., Muzzoli, M., Manfredini, S., Braccioli, E., Brunij, R., 2004. Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 3486-3491.
- Sánchez, J., Martínez, G., García, F., 2011. Efecto protector de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. sobre el daño oxidativo a proteínas y ADN. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 16, 1-12.
- Shen, Q., Shao, J., Peng, Q., Zhang, W., Ma, L., Chan, A.S., Gu, L., 2004. Hydroxycoumarin derivatives: Novel and potent alpha-glucosidase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 53, 8252–8259.
- Stuart, A.R., Gulve, E.A., Wang, M., 2004. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. *Chemical Reviews*. 104, 1255–1282.
- Singh, B.N., Shankar, S., Srivastava, R.K., 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*. 82, 1807–1821.
- Schutta, M.H., 2007. Diabetes and hypertension: Epidemiology of the relationship and pathophysiology of factors associated with these comorbid conditions. *Journal of the Cardiometabolic Syndrome*. 2, 124-30.
- Tucci, S., Boyland, E., Halford, J., 2010. The role of lipid and carbohydrate digestive enzyme inhibitors in the management of obesity: a review of current and emerging therapeutic agents. *Journal of Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 3, 125–143.
- Vanhoutte, P.M., Rubanyi, G.M., Miller, V.M., Houston, D.S., 1986. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Annual Review of Physiology*. 48, 307–320.
- Voguel, H., 2008. Drug discovery and evaluation pharmacological assay. Third edition. Springer, Germany.

World Health Organization, WHO. 2012. Cardiovascular diseases (CVDs) Available from:
><http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>< (accessed 15.7.14)

Yen, M.H., Wu, C.C., Chiou, W.F., 1998. Partially endothelium-dependent vasodilator effect of adenosine in rat aorta. *Hypertension*. 6, 514-518.

CAPITULO III

ACTIVIDAD ANTI-AGE Y DE CAPTURA DE RADICALES LIBRES DE PLANTAS MEDICINALES YUCATECAS

Descripción del capítulo

La formación y acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGE) se reconoce como un proceso patogénico importante en las complicaciones diabéticas, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento normal; adicionalmente, se ha reportado que las especies reactivas de oxígeno y radicales libres participan en la formación de AGE y en el daño celular. Los productos naturales con actividad antioxidante y antiAGE tienen un gran potencial terapéutico en el tratamiento de la diabetes y complicaciones relacionadas. En esta investigación se evaluó la actividad antiAGE y antioxidante de extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces, y preparaciones tradicionales de nueve plantas utilizadas para la diabetes, la hipertensión y la obesidad en la medicina tradicional yucateca. Los resultados mostraron que el extracto de raíz de *C. fistula* (IC_{50} = 0.1 mg/ml) y el extracto de hoja de *P. auritum* (IC_{50} = 0,35 mg/ml) presentan una actividad significativa contra los AGE similares a vesperlisina y pentosidina, Aunque ninguna de las preparaciones tradicionales acuosas mostró una actividad significativa en el ensayo antiAGE, tanto las preparaciones tradicionales acuosas y los extractos etanólicos de *E. tinifolia*, *M. zapota*, *O. campechianum* y *P. auritum* mostró actividad captadora de radicales libres significativa mediante el ensayo de reducción radical DPPH. Estos resultados indican que los metabolitos responsables de la actividad captadora de radicales libres son diferentes a los que participan en la inhibición de la formación de AGE, sugiriendo que las dos actividades no están necesariamente asociadas entre sí.

ANTI-AGE AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF YUCATECAN MEDICINAL PLANTS

Wendy del C. Dzib-Guerra,¹ Fabiola Escalante-Erosa,¹ Karlina García-Sosa,¹ Séverine Derbré,² Patricia Blanchard,² Pascal Richomme,² and Luis M. Peña-Rodríguez^{1*}

¹Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México. ²EA921 SONAS/SFR QUASAV-Université d'Angers, Angers, France.

Sometido a Journal of Mexican Chemical Society

*To whom correspondence may be addressed: Unidad de Biotecnología CICY, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná. Mérida, Yucatán, 97200 México. E-mail: lmanuel@cicy.mx; tel.: +52-999-9428330; fax: +52-999-9813900.

3.1. ABSTRACT

Formation and accumulation of advanced glycation end-products (AGE) is recognized as a major pathogenic process in diabetic complications, atherosclerosis, cardiovascular diseases, Alzheimer's disease and normal aging; additionally, reactive oxygen species and free radicals have also been reported to participate in AGE formation and in cell damage. Natural products with antioxidant and antiAGE activity have great therapeutic potential in the treatment of diabetes, hypertension and related complications. In this investigation, the ethanolic extracts from leaves, stems and roots, together with lyophilized aqueous-traditional preparations, of nine plants used to treat diabetes, hypertension and obesity in Yucatecan traditional medicine, were tested for their anti-AGE and free radical scavenging activities. Results showed that only the root extract of *C. fistula* ($IC_{50}= 0.1$ for both AGEs) and the leaf extract of *P. auritum* ($IC_{50}= 0.35 \mu\text{g/mL}$ for both AGEs) presented significant anti-AGE activity when tested against vesperlysines and pentosidine-like AGE. Although none of the aqueous traditional preparations showed significant activity in the anti-AGE assay, both the aqueous traditional preparations and the ethanolic extracts of *E. tinifolia*, *M. zapota*, *O. campechianum* and *P. auritum* showed significant free-radical scavenging activity when tested using the DPPH radical reduction assay. These results indicate that the metabolites responsible for the detected radical-scavenging activity are different to those involved in inhibiting AGE formation, and confirm that the two activities are not necessarily associated with each other.

Key words: glycation-end products; antioxidant activity; traditional medicine; diabetes

3.2. INTRODUCTION

Advanced glycation end-products (AGEs) are the result of non-enzymatic reactions called Maillard reaction (Maillard, 1912). These reactions are initiated by a nucleophilic addition between the free amino group of a protein and a carbonyl group from a reducing sugar to produce, in a matter of hours, a reversible Schiff's base that can rearrange within a few days to a more stable and irreversible ketoamine or Amadori product (Ahmed, 2005). This rearrangement is followed by a series of cascade reactions that include dehydration, oxidation, condensation and cyclisation to form cross-linked fluorescent and non-fluorescent AGEs (Peyroux and Sternberg, 2006; Wu et al., 2011; Séro et al., 2013). Since the formation of AGEs depends on the presence of a sugar and a protein, hyperglycemic conditions, such as those in diabetes, favor AGE formation, causing alterations in the physicochemical and physiological functions of proteins, and ultimately resulting in cell damage (Cho et al., 2007; Singh et al., 2014). The important role played by AGEs in the pathogenesis of microvascular damage that includes nephropathy, retinopathy, neuropathy and cataracts in diabetes mellitus (DM) is well recognized; similarly, high levels of AGEs and their receptors have been detected in obese individuals (Merhi et al., 2014). AGEs are also known to be involved in the development of Alzheimer's and other neurological diseases (Lue et al., 2009), as well as in cardiovascular diseases, including atherosclerosis (Jandeleit-Dahm et al., 2008), endothelial dysfunction and vasorelaxation (Versari et al., 2009).

Since formation of AGEs is characteristic of individuals with DM, where their formation and accumulation develop at an accelerated rate and correlates with the severity of the complications, and are related to cell damage due to an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) involved in the auto-oxidation of glucose and reactions of the non-enzymatic protein glycosylation pathway (Tessier et al., 1999; Reddy and Beyaz 2006; Yoo et al., 2008; Morales et al., 2011,), antioxidants capable of radical scavenging or metal chelation (Chen et al., 2011; Harris et al., 2011), as well as metabolites able to trap dicarbonyl species or break AGEs, have the potential to limit or reduce the amount of AGEs and their related complications (Reddy and Beyaz 2006).

It has been reported that metabolites with anti-AGE and/or antioxidant activity can effectively protect against glucose-induced cytotoxicity (Duraismy et al., 2003). However,

although numerous AGE inhibitors, including the well-known aminoguanidine, ameliorated diabetic complications in an animal model, they also caused severe side effects including gastrointestinal disturbance, anemia, and flu-like symptoms (Peng et al., 2011). Natural products represent an important option for the discovery and development of new anti-AGE pharmaceuticals; these can include metabolites with antioxidant activity since oxidative stress is involved and accelerates the formation of AGEs (Nowotny et al., 2015). Plants, because of the complexity of their secondary metabolism that results in a great chemical diversity of natural products, are recognized as an important source of bioactive metabolites (Dobson, 2004). Additionally, since many plants are traditionally used to treat diseases such as diabetes and others disorders associated with AGE formation, these particular species constitute a potentially important source for the search of novel secondary metabolites with anti-AGE activity (Chinchansure et al., 2015). We wish to report herein on the results of evaluating the anti-AGEs and radical scavenging activity of the organic extracts, and aqueous traditional preparations, of nine plants used in Yucatecan traditional medicine to treat diabetes, hypertension and obesity.

3.3. MATERIALS AND METHODS

3.3.1. Collection of plant material. Plant material was collected in October-November 2013 and identified by field specialist Paulino Simá-Polanco; a voucher specimen of each species was deposited in the Herbarium of “Unidad de Recursos Naturales CICY” under the appropriate collection number. *Brosimum alicastrum* (P. Simá 3153), *Bunchosia swartziana* (P. Simá 3155), *Ehretia tinifolia* (P. Simá 3152) and *Manilkara zapota* (P. Simá 3154) were collected in Mopila, a community of Yaxcabá, Yucatán, México. Plants of *Cassia fistula* (P. Simá 3158) were collected on the road from Dzitya to Chablekal, Yucatán, México, 200 m from the entrance to “Universidad de Chapingo”; fruits and inflorescences of *Cocos nucifera* (P. Simá 3) were collected from a study site in San Crisanto, Yucatán, México; *Ocimum campechianum* (P. Simá 3157) was collected on the road from Sierra Papacal to Chuburná Puerto, Yucatán, México, 100 m from the entrance to “Parque Científico y Tecnológico de Yucatán”; *Piper auritum* (P. Simá 3159) was collected in a private home in Baca, Yucatán, México; and *Rhizophora mangle* (P. Simá 3156) was collected in Chuburná Puerto, Yucatán, México.

Preparation of plant extracts. Leaves, stems and roots of each species (inflorescences only in the case of *C. nucifera*) were first dried for three days at room temperature and then for three days in an oven at 50°C. The plant material was ground and extracted by maceration (three times) with ethanol (400 ml/20 g of plant material); at room temperature for 72 hr. and only the water from *C. nucifera* was extracted by liquid- liquid extraction with ethyl acetate 2:1 (v/v, three times). Plant material was eliminated by successive filtration through cheesecloth and filter paper (Whatman No. 1) and the ethanol filtrates was eliminated under reduced pressure to produce the corresponding crude extracts. For the traditional preparations (Aq-Tp), an infusion of the dry plant material commonly used in traditional medicine was prepared by adding it to boiling water (20 g/L) and allowing it to stand for 20 min. The plant material was eliminated by filtration and the resulting aqueous extract was frozen and lyophilized; in the case of *C. nucifera*, since the water is traditionally used as a remedy, the water from a coconut was filtered, frozen and lyophilized to produce the corresponding crude extract of aqueous traditional preparation.

3.3.2. Inhibition of Advanced Glycation End products (AntiAGEs)

The anti-AGE assay was carried out following the methodology reported by Séro *et al.* (2013). Briefly, the samples (1 µg to 1 mg) were incubated with D-ribose (0.5 M) and bovine serum albumin (BSA, 10 mg/ml) in a Na-phosphate buffer (50mM pH 7.4); solutions were incubated in black microtiter plates (96 wells) at 37°C for 24h in a closed system before AGE fluorescence measurement. Both vesperlysines-like (λ_{exc} 370 nm; λ_{em} 440 nm) and pentosidine-like (λ_{exc} 335 nm; λ_{em} 385 nm) AGE fluorescence were measured using a microplate spectrofluorimeter Infinite M200 (Tecan, Lyon, France).

To avoid quenching phenomena, the fluorescence resulting from the incubation in the same conditions of BSA (10mg/ml) and the tested extract (1 µg to 1mg) was subtracted from each measurement. The negative control, i.e. 100% inhibition of AGEs formation, consisted of wells with only BSA. A control, i.e. no inhibition of AGEs formation, consisted of wells with BSA (10mg/ml) and D-ribose (0.5 M). The final volume assay was 100µL. The percentage of AGE formation was calculated as follow for each extract concentration:

$$\text{AGEs (\%)} = \frac{\text{fluorescence intensity}(\text{sample}) - \text{fluorescence intensity}(\text{blank of sample})}{\text{fluorescence intensity}(\text{control}) - \text{fluorescence intensity}(\text{blank of control})} \times 100$$

Dose-effect curves were best fit with a sigmoidal dose-response equation using Sigma Plot 12.0 software, which enabled calculation of the IC₅₀ values. Results were compared with those of reference products, aminoguanidine and quercetin.

3.3.3. Antioxidant activity by the 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method

The assay was carried out following the method reported by Brand-Williams *et al.* (1995) with modifications and scaled to a 96 well microplate. For the quantitative analysis, different test solutions (1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} mg/mL) of the various crude extracts were prepared and 20 μ L of the test solution was combined with 180 μ L of a 0.1 mM solution of DPPH in EtOH. The 96 well microplate was left to stand for 20 min in the dark and the absorbance was determined by reading at 540 nm in a microplate reader (ELx800-Biotek). Vitamin C (ascorbic acid) solutions were similarly prepared and used as positive control. A mixture of EtOH (20 μ L) and DPPH solution (20 μ L) was used as blank. The DPPH radical reduction percentages were calculated using the formula:

$$\text{DPPH radical reduction (\%)} = 1 - \frac{\text{Absorbance sample}}{\text{Absorbance DPPH}} \times 100$$

The different concentrations were plotted against the decoloration percentages and a lineal regression statistical analysis (Excel) of the resulting curve allowed the expression of the antioxidant activity of each sample in terms of its EC₅₀ value. All samples were analyzed in triplicate in three different days.

3.3.4. Data analysis

To determine the most active samples in the antioxidant assay, statistical treatment of the data was carried out using the Sigma Plot 10.0 software, with a statistical significance between the mean differences of $p < 0.05$ by an analysis of variance (ANOVA) with post-hoc test of tukey.

3.4. RESULTS AND DISCUSSION

The anti-AGE assay consisted in the simultaneous quantification of both vesperlysines-like (λ_{exc} 370 nm; λ_{em} 440 nm) and pentosidine-like (λ_{exc} 335 nm; λ_{em} 385 nm) AGEs. Best extracts were selected when the fluorescence decreased for at least one wavelength. When the IC_{50} was below the one of the natural compound quercetin. Evaluation of the anti-AGE activity of the ethanol extracts and aqueous traditional preparations of nine Yucatecan medicinal plants traditionally used to treat diabetes, hypertension and obesity showed that the root extract of *C. fistula* presented the highest inhibition activity against vesperlysine and pentosidine-like AGEs (IC_{50} = 0.1 mg/mL for both), higher even than the control aminoguanidine (IC_{50} = 1.0 and 0.17 mg/mL) (Table 3.1); the organic extracts from the leaves and stems of *C. fistula*, together with those of the leaves of *B. alicastrum*, stems of *E. tinifolia*, leaves of *P. auritum* and leaves of *R. mangle* showed antiAGEs activity, but only against vesperlysine-like AGEs (IC_{50} = 0.50, 0.20; 0.5, 0.2; 0.35, and 0.3 mg/mL, respectively) (Table 3.1.). Previous studies on the antiAGE evaluation of extracts, semipurified fractions or pure metabolites report that the samples must be tested for their antiAGE activity against at least the vesperlysines or the pentosidine-like AGEs, in as much as interference between AGEs and the samples could occur (Séro et al., 2013)

Alternatively, testing of the same group of samples for their antioxidant activity using the DPPH radical scavenging test showed a significant level of activity in the organic extracts from the stems of *E. tinifolia* (EC_{50} = 100 ± 9 μ g/mL), the leaves and roots of *M. zapota* (EC_{50} = 98 ± 10 and 107 ± 7 μ g/mL, respectively), the leaves and roots of *P. auritum* (EC_{50} = 135 ± 7 and 155 ± 7 μ g/mL, respectively), and the aqueous traditional preparations of *E. tinifolia*, *M. zapota* and *O. campechianum* (EC_{50} = 139 ± 7 , 165 ± 7 and 150 ± 28 μ g/mL, respectively) (Table 3.1).

It has been reported that the antioxidant effect of plant products is mainly due to the radical scavenging activity of phenolic metabolites such as flavonoids, tannins and phenolic terpenes (Rahman and Moon, 2007), and it has been reported that crude extracts and pure metabolites with antioxidant properties often show antiAGE activity (Kim and Kim, 2003; Harris *et al.*, 2011). However, the results obtained in this study show that these two biological activities are not necessarily associated with each other, suggesting that there might be other mechanisms involved in the antiAGE activity of these extracts. The

organic extract from roots of *C. fistula* can be considered as a hit it exhibited the best anti-AGE activity, with results similar to those reported in the literature for bioactive plant crude extracts (Séro *et al.*, 2013). Even though, to date, there are no reports on the anti-AGE activity of *C. fistula*, a high antiAGE activity has been reported for the flower extract of *C. auriculata* (Perera *et al.*, 2013). Additionally, anthraquinones isolated from the seeds of *C. tora* also exhibited strong inhibitory activity against AGE formation (Jank *et al.*, 2007), while phytochemical studies carried out on the roots of *C. fistula* showed the presence of rhamnetin 3-O-gentibioside (Vaishnav and Gupta 1996) and the secondary metabolites composition of different parts of the plant are recognized as being phenolic antioxidants such as anthraquinones, flavonoids and flavan-3-ol derivatives (Bahorun *et al.*, 2005).

The antiAGE and antioxidant activity detected in the organic extract from the leaves of *P. auritum* coincides with reports on the literature that the strong antiAGE activity in the hexane leaf extract of the plant, when tested in both *in vitro* and *in vivo* models, is related to its antioxidant activity (Perez-Gutiérrez *et al.*, 2012). However, the radical scavenging activity of the leaf extract of *P. auritum* is not in agreement with previous reports in the literature describing low levels of antioxidant activity in the essential oil of *P. auritum*, which was found to contain metabolites such as safrol, myristicin, D-germacrene and β -caryophyllene (Garcia-Ríos *et al.*, 2007), or the lack of antioxidant activity of the methanol and aqueous extracts from *P. auritum* (Navarro *et al.*, 2003).

The results of this investigation contribute to the knowledge about the biological activity in species that are commonly used to treat diabetes, hypertension and obesity in the Yucatan peninsula. Additional studies are necessary to identify the metabolites responsible for the biological activity detected in the root extract of *C. fistula*.

Table 3.1. Results of antiAGEs and DPPH radical scavenging activity for organic extracts and aqueous- traditional preparations.

Scientific name	Medicinal use	Code	Extract type	Anti-AGE's		DPPH EC ₅₀ (µg/mL)
				IC ₅₀ (mg/mL)		
				Vesperlysine like AGE	Pentosidine like AGE	
Moraceae <i>B. alicastrum</i> L.	Diabetes, Obesity	BAL	EtOH	0.5	0.6	>300
		BAS	EtOH	>1	>1	>300
	BAR	EtOH	0.4	1.0	>300	
	BAT	H ₂ O	>1	>1	>300	
Malpighiaceae <i>B. swartziana</i> G.	Hypertension	BSL	EtOH	1	>1	>300
		BSS	EtOH	>1	>1	>300
		BSR	EtOH	>1	>1	290±1
		BST	H ₂ O	>1	>1	>300
Fabaceae <i>C. fistula</i> L.	Diabetes	CFL	EtOH	0.5	0.2	287.5±3
		CFS	EtOH	0.2	0.9	216,6±15
		CFR	EtOH	0.1	0.1	250±17
		CFT	H ₂ O	>1	>1	>300
Arecaceae <i>C. nucifera</i> L.	Diabetes, Obesity	CNI	EtOH	>1	>1	220±14
		CNW	AcOEt	>1	>1	>300
		CNT	H ₂ O	>1	>1	>300
Boraginaceae <i>E. tinifolia</i> L.	Hypertension	ETL	EtOH	0.7	>1	>300
		ETS	EtOH	1	0.3	100±.9
		ETR	EtOH	>1	>1	>300
		ETT	H ₂ O	>1	>1	139,5±,7
Sapotaceae <i>M. zapota</i> V.	Diabetes, Hypertension	MZL	EtOH	0.4	0.8	98.5±10
		MZS	EtOH	>1	>1	190±14
		MZR	EtOH	0.4	0.7	107,5±,7
		MZT	H ₂ O	0.5	1	165±7
Lamiaceae <i>O. campechianum</i> W.	Diabetes, Hypertension	OCL	EtOH	>1	>1	235±7
		OCS	EtOH	>1	>1	>300
		OCR	EtOH	>1	>1	>300
		OCT	H ₂ O	>1	>1	150±28
Piperaceae <i>P. auritum</i> K.	Diabetes	PAL	EtOH	0.35	0.35	135±7
		PAS	EtOH	>1	>1	>300
		PAR	EtOH	>1	>1	155±7
		PAT	H ₂ O	>1	>1	279,5±13
Rhizophoraceae <i>R. mangle</i> L.	Diabetes,	RML	EtOH	0.3	>1	200±14
		RMS	EtOH	0.45	>1	210±35
		RMR	EtOH	>1	>1	245±1,4
		RMT	H ₂ O	>1	>1	>300
Aminoguanidine Ascorbic acid	Anti-AGEs Antioxidant	CSL -	Control Control	1.0 -	0.17 -	- 51±1,4

L: leaf; R: Root; S: Stem; I: inflorescence; W: water; T: traditional preparation; AcOEt: Ethyl acetate; EtOH: Ethanol; H₂O: Aqueous; **p*<0.05

3.5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Paulino Simá-Polanco for assistance in the identification of the plant material. WCDG wishes to thanks CONACYT for scholarship No 366286.

3.6. REFERENCES

- Bahorun, T., Neergheen, V., Aruoma, O., 2005. Phytochemical constituents of *Cassia fistula*. African Journal of Biotechnology. 4(13):1530-1540.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology. 28(1):25-30.
- Chanda, S., Nagani, K., 2010. Antioxidant capacity of *Manilkara zapota* L. leaves extracts evaluated by four *in vitro* methods. Nature and Science. 8(10):260-266.
- Chen, Y.F., Roan, H.Y., Lii, C.K., Huang, Y.C., Wang, T.S., 2011. Relationship between antioxidant and antiglycation ability of saponins, polyphenols, and polysaccharides in Chinese herbal medicines used to treat diabetes. Journal of Medicinal Plants Research.5(11):2322–2331.
- Cho, S.J., Roman, G., Yeboah, F., Konishi, Y., 2007. The road to advanced glycation end products: A mechanistic perspective. Current Medical Chemistry. 14, 1653-1671.
- García-Ríos, A., Leyva, M. A., Martínez, M.J., Stashenko, E.E., 2007. Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (piperaceae) difundida en la costa Colombiana. Scientia Et Technica. 13(33):439-442.
- Harris, C.S., Beaulieu, L.P., Fraser, M.H., McIntyre, K.L., Owen, P.L., Martineau, L.C., Cuerrier, A., Johns, T., Haddad, P.S., Bennett, S.A., Arnason, J.T., 2011. Inhibition of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and antioxidant activity. Planta Medica. 77(2):196-204.
- Jandeleit-Dahm, K., Cooper, M.E., 2008. The Role of AGEs in Cardiovascular Disease. Current Pharmaceutical Design.14(10):979-986.

-
- Jang, D.S., Lee, G.Y., Kim, Y.S., Lee, Y.M., Kim, C., Yoo, J.L., Kim, J.S., 2007. Anthraquinones from the seeds of *Cassia tora* with inhibitory activity on protein glycation and aldose reductase. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 30(11):2207-2210.
- Kim, H.Y., Kim, K., 2003. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 12(51):1586–1591.
- Lue, L.F., Walker, D.G., Jacobson, S., Sabbagh, M., 2009. Receptor for advanced glycation end products: its role in Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Future Neurology*. 4(2):167-177.
- Maillard, L.C., 1912. Action des acides aminés sur les sucres; Formation des mélanoides par voie méthodique (Amino acid action upon sugars: Melanoidins formation according to a methodical route). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. Paris. 154, 66–67.
- Merhi, Z., Mcgee, E.A., Buyuk, E., 2014. Role of advanced glycation end-products in obesity-related ovarian dysfunction. *Minerva Endocrinology*. 39(3):167-74.
- Morales, S., García-Salcedo, J.A., Muñoz-Torres, M., 2011. Pentosidine: a new biomarker in diabetes mellitus complications. *Medicina clínica (Barc)*. 136(7):298-302.
- Navarro, M.C., Montilla, M.P., Cabo, M.M., Galisteu, M., Caceres, A., Morales, C., Berger, I., 2003. Antibacterial, antiprotozoal and antioxidant activity of five plants seed in Izabal for infectious diseases. *Phytotherapy Research: PTR*. 17(4):325-329.
- Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D., Grune, T., 2015. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 5(1):194-222.

-
- Pérez G.R., Flores C.L.B., Gonzalez, A.M., 2012. Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from *Piper auritum* leaves *in vitro* and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. *Molecules*. 17(10):11897-11919.
- Peng, X., Ma, J., Chen, F., Wang, M., 2011. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food & Function*. 2(6):289-301.
- Perera, P.R.D., Sagarika E. S., Ranaweera, K.K.D., 2013. *In vitro* antiglycation activity of some medicinal plants used in diabetes mellitus. *Medicinal & Aromatic Plants*. 2(143):2-6.
- Peyroux, J., Sternberg, M., 2006. Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathologie et Biologie*. 54, 405-419.
- Pío-Leon, J.F., Díaz-Camacho, S.P., López, M.G., Montes-Ávila, J., López-Angulo, G., Delgado-Vargas, F., 2012. Physicochemical, nutritional and antioxidant characteristics of the fruits of *Ehretia tinifolia*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83(1):273-280.
- Rahman, M.A.A., Moon, S.S., 2007. Antioxidant polyphenol glycosides from the plant *Draba nemorosa*. *Bull. Korean Chemical Society*. 28(5):827-831.
- Séro, L., Sanguinet, L., Blanchard, P., Dang, B., Morel, S., Richomme, P., Séraphin, D., Derbré, S., 2013. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules*. 18, 14320-14339.
- Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., Jaggi, A.S., 2014. Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 18(1):1-14.

- Vaishnav, M.M., Gupta, K.R., 1996. Rhamnetin 3-O-gentiobioside from *Cassia fistula* roots. *Fitoterapia*. 67(1):78-79.
- Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L., Taddei, S., 2009. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care* 32(2):14–21.
- Wu, C.H., Huang, S.M., Lin, J.A., Yen, G.M., 2011. Inhibition of advanced glycation end product formation by foodstuffs. *Food and Function*. 2(59):224–234.
- Yoo, N.H., Jang, D.S., Yoo, J.L., Lee, Y.M., Kim, Y.S., Cho, J.H., Kim, J.S., 2008. Erigeroflavanone, a flavanone derivative from the flowers of *Erigeron Annuus* with protein glycation and aldose reductase inhibitory activity. *Journal of Natural Products*. 71(4):713–715.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

El estudio fitoquímico de las plantas constituye una estrategia importante en la búsqueda de metabolitos biológicamente activos para el desarrollo de nuevos fármacos; hoy en día las enfermedades crónico-degenerativas representan los grandes problemas de salud en la sociedad, siendo las principales causas de muerte, por encima de las enfermedades contagiosas que, hasta hace algunos años, ocupaban los primeros lugares. En el presente estudio se reporta la evaluación de los extractos orgánicos de hoja, tallo y raíz, además de las preparaciones acuosas tradicionales, de *B. alicastrum*, *B. swartziana*, *C. fistula*, *C. nucifera*, *E. tinifolia*, *M. zapota*, *O. campechianum*, *P. auritum* y *R. mangle*, un grupo de plantas utilizadas en la medicina tradicional yucateca para el tratamiento de la diabetes, la hipertensión y la obesidad. La evaluación de las preparaciones acuosas y los extractos orgánicos de las diferentes partes de cada planta se realizó con el fin de reducir la posibilidad de dejar de lado los principios bioactivos debido a su ubicación en el tejido vegetal o a su afinidad por un tipo de disolvente en particular.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de enzimas clave en la absorción de los carbohidratos y lípidos permitieron ubicar la mayor actividad contra α -glucosidasas en las preparaciones tradicionales de *O. campechianum* y *E. tinifolia* y en el extracto orgánico del agua de *C. nucifera* (IC_{50} = 178, 240.4 y 288.7 μ g/mL respectivamente); en tanto que la mayor actividad contra la lipasa pancreática se presentó en los extractos orgánicos de la raíz de *R. mangle*, de hojas de *P. auritum* y de raíz de *M. zapota* (IC_{50} = 142.2, 204.2 y 296 μ g/mL respectivamente), indicando que los inhibidores de α -glucosidasas en *O. campechianum* y *E. tinifolia* son de naturaleza hidrofílica, en tanto que los inhibidores de lipasa pancreática en *R. mangle*, *P. auritum* y *M. zapota* poseen propiedades lipofílicas. Lo anterior puede explicarse tomando en cuenta la afinidad de la enzima con el sustrato, y en cada caso la naturaleza de los inhibidores correspondientes, presentes en los extractos; mientras que la afinidad de los carbohidratos por el agua es bien conocida, los lípidos son más afines a los disolventes orgánicos. Posteriormente se

evaluaron las fracciones semipurificadas de la preparación tradicional de *O. campechianum* contra α -glucosidasas, y de los extractos orgánicos de raíz de *R. mangle* y de hoja de *P. auritum* contra la lipasa; los resultados de *O. campechianum* mostraron que la fracción de acetato de etilo, seguida de la fracción acuosa (54% y 19%, respectivamente), presentan mayor actividad contra α -glucosidasas; sin embargo, debido a que esta actividad resultó ser menor a la obtenida para la preparación tradicional, existe la posibilidad de que la actividad de esta última sea resultado de un efecto de sinergismo entre los metabolitos de mediana y de alta polaridad. La evaluación de las diferentes fracciones contra la lipasa mostró una mayor actividad en la fracción de hexano del extracto de hojas de *P. auritum*, en tanto que en ninguna de las fracciones de *R. mangle* se detectó una actividad significativa. Se ha reportado que, estructuralmente, los metabolitos con alto efecto inhibitorio y afinidad sobre la enzima α -glucosidasas cuentan con grupos oxhidrilo formando múltiples enlaces de hidrógeno (Shen et al., 2010). En contraste, los inhibidores de la lipasa pancreática incluyen una amplia gama de productos naturales que pertenecen a distintas clases, e.g. alcaloides, glucósidos, carotenoides, polifenoles, polisacáridos, saponinas y terpenoides (Buchholz and Melzig, 2015; Birari and Bhutani, 2007), sin embargo, los productos lipofílicos, principalmente de fuentes microbianas son los más activos (Lunagariya et al., 2014).

La evaluación del efecto vasorrelajante de las preparaciones tradicionales y los extractos orgánicos de la parte vegetal empleada en la medicina tradicional, permitió identificar al extracto orgánico de hojas de *O. campechianum*, así como la preparación tradicional y el extracto orgánico de los tallos de *R. mangle* como los de mayor actividad, presentando un efecto dependiente de la concentración en anillos de aorta con endotelio intacto ($E_{max} = 81\pm 6\%$, $72\pm 5\%$ and $70\pm 5.9\%$ de relajación, respectivamente). Al evaluar los mismos extractos en anillos de aorta sin endotelio, con el fin de establecer si el efecto relajante observado es dependiente de su presencia, se observó una reducción en las curvas acumulativas de concentración-respuesta del extracto orgánico de *O. campechianum* ($E_{max} = 45.9\pm 3\%$), siendo este efecto parcialmente dependiente del endotelio, lo anterior sugiere que el efecto vasorrelajante observado se debe a la participación de varios mecanismos de acción que incluyen el involucramiento de la vía del nucleótido cíclico cGMP, la inhibición de la entrada de calcio, y/o la liberación de sustancias dilatadoras como el factor de relajación derivado del endotelio, el óxido nítrico y prostaciclina (Aguirre-Crespo et al., 2005; Yen et al., 1998).

La pérdida del efecto vasorrelajante del extracto orgánico de tallo y preparación tradicional de *R. mangle* al evaluar su actividad en anillos de aorta sin endotelio, indica que el efecto relajante es dependiente del endotelio debido a la liberación de factores derivados de endotelio como son PGI₂, NO o el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (Vanhouette, 2001). El efecto vasodilatador de los tallos en el extracto orgánico y la preparación tradicional de *R. mangle* podría atribuirse a su contenido de taninos, dado que la presencia de este tipo de metabolitos, reportada en tallos de esta especie (Sánchez et al., 2011), se ha asociado al efecto vasorrelajante del extracto metanólico de *Arbutus unedo*, efecto que se redujo significativamente tras la eliminación de los taninos (Legssyer et al., 2004).

Por otra parte, y a pesar de que se ha relacionado la actividad antioxidante con la inhibición de la formación de AGEs (Kim and Kim, 2003; Harris *et al.*, 2011), los resultados obtenidos en este estudio indican que estos dos tipos de actividad biológica no están necesariamente relacionados entre sí; el extracto de raíz de *C. fistula*, que mostró la mayor actividad en el ensayo de inhibición de la formación de AGEs similares a vesperlisina y pentosidina (IC₅₀ = 0.10 mg/mL), no mostró una actividad antioxidante significativa. En tanto que los extractos con los niveles más altos de actividad antioxidante como los extractos orgánicos de tallos de *E. tinifolia* (EC₅₀ = 100±9 µg/mL), de hojas y raíces de *M. zapota* (EC₅₀ = 98±10 y 107±7 µg/mL, respectivamente), de hojas y raíces de *P. auritum* (EC₅₀ = 135±7 and 155±7 µg/mL, respectivamente) y las preparaciones tradicionales de *E. tinifolia*, *M. zapota* y *O. campechianum* (EC₅₀ = 139±.7, 165±7 and 150±28 µg/mL, respectivamente) no mostraron actividad antiAGEs significativa. Adicionalmente, y aun cuando la medicina tradicional yucateca reporta el uso del tallo de *C. fistula* contra la diabetes, la actividad antiAGEs detectada en el extracto de la raíz de la planta demuestra la importancia de evaluar la actividad de las diferentes partes de la planta.

La actividad antiAGEs moderada del extracto etanólico de hojas de *P. auritum* (IC₅₀ = 0.35 mg/mL para AGEs similares a vesperlisina y pentosidina), coincide con la actividad antiAGEs *in vitro* e *in vivo* reportada en la literatura para el extracto hexánico de hojas de la planta (Pérez *et al.*, 2012; González *et al.*, 2014); la diferencia en los niveles de actividad entre un extracto y otro sugieren que los metabolitos bioactivos de *P. auritum* son de baja polaridad y, por consecuencia, de naturaleza lipofílica. Esto es

particularmente importante dado que la fracción hexánica del extracto orgánico de las hojas de *P. auritum* presentó los niveles más altos de inhibición de la lipasa pancreática. Estos resultados podrían explicar el uso tradicional de las hojas de *P. auritum* contra la diabetes y problemas asociados, dado que, además de su importancia en la reducción de complicaciones asociadas a los AGEs, al inhibirse la lipasa pancreática, se reduce la hidrólisis de la grasa ingerida en la dieta, previniendo su absorción y reduciendo así el aporte al organismo de lípidos susceptibles de acumularse en el tejido adiposo y contribuyendo a la reducción de peso.

Dado que ninguna de las especies estudiadas cuenta, hasta ahora, con estudios de actividad biológica, los resultados obtenidos en esta investigación establecen las bases para futuros trabajos dirigidos hacia la purificación e identificación de los metabolitos responsables de la actividad.

4.2. CONCLUSIONES

Los bajos niveles de actividad biológica mostrados por varias preparaciones tradicionales y extractos orgánicos, a pesar de su uso documentado en la medicina tradicional yucateca, sugiere que los metabolitos secundarios responsables de las propiedades medicinales de las plantas, actúan por mecanismos de acción diferentes a los detectados en los modelos utilizados en este estudio.

La mayor actividad de inhibición contra α -glucosidasas observada en las preparaciones tradicionales, comparada con la mayor actividad de inhibición contra la lipasa pancreática observada en los extractos orgánicos, sugiere que los metabolitos con actividad contra la α -glucosidasas son de naturaleza hidrofílica, en tanto que los metabolitos inhibidores de la lipasa pancreática son de naturaleza lipofílica. Adicionalmente, los resultados obtenidos demuestran que los extractos orgánicos de *R. mangle* y *O. campechianum* representan una fuente importante de metabolitos con actividad vasorrelajante y una potencial aplicación en el tratamiento de la hipertensión arterial.

Por otra parte, dados los escasos estudios sobre la evaluación de la actividad antiAGE en la mayoría de las plantas usadas para el tratamiento de la diabetes y otras enfermedades relacionadas, los resultados de este estudio contribuyen de manera significativa al conocimiento de la actividad biológica de las especies seleccionadas. Asimismo, es importante señalar que la actividad antiAGE no está necesariamente asociada al contenido de metabolitos con actividad antioxidante en el extracto y que no existe una relación clara entre los diferentes modelos de ensayo utilizados en este estudio.

Finalmente, el uso etnomédico de las especies evaluadas de la medicina tradicional maya puede ser fundamentada en el contenido de metabolitos secundarios que produce, y a las interacciones de éstos, siendo en algunos casos mayor la actividad en los extractos crudos y preparaciones tradicionales que en fracciones semipurificadas.

4.3. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta tesis establecen las bases de futuros estudios relacionados con el aislamiento e identificación de metabolitos biológicamente activos a partir de los extractos y fracciones con mayor actividad en los diferentes modelos de ensayo utilizados, particularmente de las especies *C. fistula*, *O. campechianum*, *P. auritum* y *R. mangle*.

Asimismo, es importante confirmar el probable sinergismo para el caso de la actividad contra α -glucosidasas del extracto de *O. campechianum*, con el fin de establecer el mecanismo y/o sitio de acción de los metabolitos activos que pudieran ser utilizados como alternativa para el tratamiento de la diabetes, así como caracterizar el efecto vasorrelajante de tallos de *R. mangle* y hojas de *O. campechianum*; dos especies que también presentaron actividad contra lipasa y α -glucosidasas, respectivamente, pudiendo ser candidatos para tratamiento de enfermedades relacionadas al síndrome metabólico.

Finalmente, sería conveniente evaluar los extractos y fracciones de mayor actividad en ensayos *in vivo* o a nivel celular, con el fin de conocer más sobre su posible mecanismo de acción, en tanto que sería importante evaluar los extractos que no presentaron actividad significativa, en modelos diferentes a los utilizados en este estudio.