



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA

TÍTULO DEL PROYECTO

**“ESTUDIO SOBRE EL USO, QUÍMICA Y ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE
Ibervillea sonorae (Watson) GREENE: “Güereque”.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ANGEL JARDÓN DELGADO

TUTOR PRINCIPAL: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR ADOLFO ANDRADE CETTO, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

MÉXICO, D. F.

MARZO, 2014



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/122/14

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **20 de mayo de 2013**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **JARDÓN DELGADO ÁNGEL** con número de cuenta **75173450** con la tesis titulada: **"Estudio sobre el uso, química y actividad farmacológica de *Ibervillea sonora* (Watson) Greene: Güereque"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ:**

Presidente:	DRA. ANA LUISA ANAYA LANG
Vocal:	DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
Secretario:	DR. RAFAEL LIRA SAADE
Suplente:	DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
Suplente	DR. MARTE LORENZANA JIMÉNEZ

De acuerdo con lo anterior, el(a) alumno(a) se acogió a la nueva normatividad, con base en el artículo QUINTO TRANSITORIO en apego a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (9 octubre de 2006).

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 14 de febrero de 2014.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a las autoridades del **Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México** las facilidades otorgadas para que esta investigación se hiciera realidad.

Mi agradecimiento al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo financiero otorgado a través de la beca número 202552, que permitió el progreso y desarrollo del proyecto de investigación sobre el uso, química y actividad farmacológica de *Ibervillea sonorae* (Watson) Greene

La investigación fue realizada bajo la supervisión del **Dr. Mariano Martínez Vázquez**, tutor principal de la misma, a quien mostramos nuestro cariño, respeto y nuestro más sincero agradecimiento por su paciencia, enseñanzas, consejos, comentarios, y el apoyo irrestricto recibido; satisfecho por saber que aun existen investigadores del más alto nivel académico, de calidad ética y profesional.

Mi agradecimiento por el apoyo en el uso del laboratorio 1-4 del Instituto de Química, propuesto dentro del Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Dirección General de Estudios de Posgrado.

La investigación se vio enriquecida con los comentarios del **Dr. Adolfo Andrade Cetto**, miembro del Comité Tutoral, a quien agradezco sus valiosas aportaciones y sugerencias.

Resalta la valiosa aportación del **Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero**, miembro del comité tutorial, a quien con especial gratitud reitero mi agradecimiento por su don de gentes y haberme aceptado en su laboratorio de Fitofarmacología del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México; su apoyo me proporciono las herramientas para dilucidar la actividad farmacológica en esta investigación.

Mi agradecimiento especial, al Jurado, por sus comentarios, sugerencias y por la paciencia para la revisión crítica del escrito: a la Dra. Ana Luisa Anaya Lang, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. Rafael Lira Saade, Dra. Carolina Escobar Briones y el Dr. Marte Lorenzana Jiménez.

Mi agradecimiento al personal técnico del Instituto de Química y del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradecimiento a los Anatomopatólogos Dr. Miguel Angel Contreras Barrios de la Subdirección de enseñanza e investigación del Hospital de la Mujer de la SS y Dr. Humberto Cruz Ortíz del Servicio de Patología del Hospital General de México de la Secretaría de Salud.

Asimismo mi agradecimiento: Al Dr. Rafael Lira Saade, por la identificación taxonómica de la especie estudiada, a la M en C. Abigail Aguilar del IMSS por la revisión crítica del escrito; a la Dra. Martha Martínez Gordillo y al Biol. Ramiro Cruz Durán por las facilidades y atenciones brindadas durante la estancia en el Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME). A las autoridades de la Jurisdicción Sanitaria No. IV de Ciudad Obregón Sonora por la ayuda prestada para la realización del trabajo de campo, a los habitantes de la comunidad del Ejido Cumuripa-Porvenir por su valiosa ayuda en el presente trabajo, en especial a la familia Valencia Encinas, por su inefable colaboración, los señores Francisco Valencia Guzmán y María Encinas y sus hijos Manuel, Carlos y Ernesto y a todos aquellos que hicieron posible llevar a cabo este trabajo,... gracias.

DEDICATORIA:

A mis amigos, profesores, tutores y a mis familiares quienes han impulsado y alimentado en mi la semilla de una verdadera vocación científica, a todos aquellos a quienes de manera indirecta contribuyen a la capacitación y promoción de la investigación científica en nuestro país para la formación y preparación de investigadores que aportan sus esfuerzos en beneficio de la ciencia y de la sociedad mexicana.

	PÁGINA
ÍNDICE.	i
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.	xiv
I. INTRODUCCIÓN.	1
I.1. Definición de diabetes mellitus.	1
I.2. Diagnóstico.	1
I.3. Clasificación de la diabetes mellitus.	2
I.4. Epidemiología.	2
I.5. Problema económico sobre el costo del tratamiento de pacientes en aumento.	3
I.6. Tratamiento de la diabetes mellitus.	4
I.6.1. Tratamiento Farmacológico.	5
I.6.1.1. Sulfonilureas.	5
I.6.1.2. Biguanidas.	6
I.6.1.3. Tiazolidinedionas.	7
I.6.1.4. Inhibidores de las α -glucosidasas.	7
I.6.1.5. Tipos de Insulina.	8
I.6.1.5.1. Insulina de acción rápida.	8
I.6.1.5.2. Insulina de acción intermedia.	9
I.6.1.5.3. Insulina de duración prolongada.	9
I.6.1.6. Incretinas.	10
I.6.1.6.1. Análogos del GLP-1.	10
I.6.1.6.2. Inhibidores de DPP4.	11

II. OBJETIVOS.	11
II.1. Objetivo general.	11
II.2. Objetivos particulares.	11
III. <i>Ibervillea sonora</i>.	12
III.1. Antecedentes.	12
III.2. Algunos metabolitos secundarios de origen vegetal con actividad hipoglucemiante.	14
III.3. Cucurbitacinas.	16
III.4. Género <i>Ibervillea</i> .	16
III.5. <i>Ibervillea sonora</i> (S. Watson) Greene, “Güereque”.	17
III.6. Descripción de <i>Ibervillea sonora</i> (S. Watson) Greene, “Güereque”.	18
III.7. Descripción tradicional de <i>Ibervillea sonora</i> .	25
III.8. Uso de <i>Ibervillea sonora</i> en la medicina tradicional.	26
III.9. Química de <i>I. sonora</i> .	26
III.10. Farmacología <i>I. sonora</i> .	26
III.11. Modelos animales para el estudio de la diabetes mellitus.	27
IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.	27
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	28
VI. HIPÓTESIS.	28
VII. METODOLOGÍA.	29
VII.1. Recopilación etnobiológica y bibliográfica.	30
VII.2. Estudio de herbario.	30
VII.3. Localización geográfica del área de estudio.	30

VII.4. Visitas a la comunidad donde se realizó el estudio.	31
VII.5. Entrevista a los pobladores y aplicación de un cuestionario.	31
VII.6. Colecta de <i>I. sonorae</i> .	32
VII.7. Material colectado.	32
VII.8. Preparación de extractos.	33
VII.8.1 Extracto acuoso liofilizado (EA).	33
VII.8.2. Extractos orgánicos.	33
VII.9. Estudio Farmacológico.	33
VII.9.1. Análisis estadístico de los datos.	34
VII.9.2. Estudio de toxicidad aguda de extractos orgánicos y EA.	34
VII.9.3. Estudio histopatológico en ratones de la cepa CD-I.	36
VII.9.4. Estudio de actividad hipoglucemiante de los EA y EM.	36
VII.9.5. Estudio de actividad hipoglucemiante de los EH, EAE, EM y EA.	37
VII.10. Análisis cromatográficos y técnicas espectroscópicas.	38
VII.11. Análisis del EM.	39
VII.11.1. Método de acetilación.	40
VII.11.2. Método de hidrólisis.	40
VII.12. Obtención de las fracciones activas del extracto de EtOAc.	41
VII.12.1. Aislamiento de las Kinoínas D, B y C	42

VII.12.2. Aislamiento de 16 α -20, 25-trihidroxi-3 α -(2-O- α -L-rhamnopiranosil-D-glucopiranosiloxi)-(10 α)-cucurbit-5-en-11,22-diona (5).	42
VII.12.3. Aislamiento de (22S)-16 α ,22-diacetoxi-20,25-dihidroxi-3 α -[3,4,6-tri-O-acetil-2-O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-rhamnopiranosil)- β -glucopiranosil]-(10 α)-cucurbita-5,23t-dien-11-ona (6).	42
VII.12.4. Aislamiento de 16 α -acetoxi-20,25-dihidroxi-3 α -[3,4,6-tri-O-acetil-2-O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-rhamnopiranosil)- β -Dglucopiranosil]-(10 α)-cucurbita-5-ene-11,22-diona (7).	43
VII.13. Evaluación de la Actividad hipoglucemiante de la kinoína A en ratones macho (<i>Mus musculus</i>) CD-I normoglucémicos.	43
VII.14. Inducción de diabetes experimental.	44
VII.14.1. Actividad hipoglucemiante de la Kinoína A aislada de la raíz de <i>I. sonorae</i> en ratones macho (<i>Mus musculus</i>) CD-I hiperglucémicos.	45
VII.14.1.3. Análisis estadístico.	46
VII.15. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.	47
VII.16.-Evaluación de la actividad de inhibición de la proliferación celular de líneas de cánceres humanos.	47
VIII. RESULTADOS.	48
VIII.1. Estudio de herbario.	48
VIII.2. Estudio etnobotánico sobre el uso de la raíz.	48
VIII.3. Rendimiento de los extractos obtenidos.	51

VIII.4. Toxicidad aguda de los EA y orgánicos obtenidos de la raíz de <i>Ibervillea sonora</i> (S. Watson) Greene.	51
VIII.4.1 Dosis letal (DL ₅₀) del EA, EM y EAE.	51
VIII. 5. Estudio Histopatológico en ratones macho (<i>Mus musculus</i>) cepa CD-I	53.
VIII. 6. Evaluación temporal de los efectos de los EA y EM obtenidos de la raíz de <i>I. sonora</i> en la glucemia de ratones macho (<i>Mus musculus</i>) CD-I normoglucémicos.	55
VIII.7. Evaluación temporal de los efectos de los EH, EAE y EM obtenidos de manera sucesiva de la raíz de <i>I. sonora</i>, en la glucemia de ratones macho (<i>Mus musculus</i>) CD-I normoglucémicos.	56
VIII.8. Evaluación del efecto hipoglucemiante del EAE en ratones macho sanos (<i>Mus musculus</i>) CD-I.	57
VIII.9. Compuestos obtenidos del EM.	58
VIII. 10. Aislamiento de las kinoínas D y A a partir del EAE.	58
VIII.11. Evaluación de la Actividad hipoglucemiante de la kinoína A administrada por vía intraperitoneal (ip) en ratones macho (<i>Mus musculus</i>) CD-I normales.	61
VIII.12. Evaluación de la toxicidad aguda e histopatológica de la kinoína A en ratones de la cepa CD-I sanos.	62
VIII.13. Resultados de diabetes experimental.	63
VIII.14. Actividad hipoglucemiante de la kinoína A en ratones macho (<i>Mus musculus</i>) cepa CD-I con hiperglucemia inducida con aloxana.	64

VIII. 15.- Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los EA, EM y de los metabolitos aislados.	68
VIII. 16. Evaluación de la actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares cánceres humanos de extractos y metabolitos secundarios provenientes de <i>I. sonorae</i> mediante el ensayo de Sulforrodamida B.	69
IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.	70
X. BIBLIOGRAFÍA.	75
XII. LISTA DE FOTOGRAFÍAS.	
Fotografía 1. Planta de <i>I. sonorae</i> (S. Watson) Greene.	18
Fotografía 2. Zarcillos de <i>I. sonorae</i> .	19
Fotografía 3. Hoja de <i>I. sonorae</i> .	20
Fotografía 4. Flor de <i>I. sonorae</i> .	20
Fotografía 5. Frutos de <i>I sonorae</i> .	21
Fotografía 6. Fruto maduro de <i>I. sonorae</i> .	21
Fotografía 7. Placenta con semillas de <i>I. sonorae</i> .	22
Fotografía 8. Raíz de <i>I. sonorae</i> .	22
Fotografía 9. Raíz de <i>I. sonorae</i> rebanada.	23
Fotografía 10. Vegetación asociada con <i>I. sonora</i> .	23
Fotografías 11 y 12. Flores de <i>I. sonorae</i> .	24 y 25
Fotografía 13. Comportamiento de ratones tratados.	53
Fotografía 14. Cavidad abdominal ratón cepa CD-1	53

Fotografías 15-18. Pulmones con puntillero hemorrágico, hígado congestionado, hipertrofia de páncreas e hipertrofia suprarrenal.	54
Fotografía 19a. Imagen de hígado de ratón tratado con Kinoína A.	62
Fotografía 19b. Imagen de hígado de ratón sano.	62
Fotografía 20a. Microfotografía de hígado con esteatosis.	62
Fotografía 20b. Microfotografía de hígado de ratón sano.	62
Fotografía 21. Necropsia comparativa de organismos sano (a), con hiperglucemia leve (b), moderada (c) y severa (d).	63

LISTA DE FIGURAS.

Esquema a. Estructura del esqueleto cucurbitano.	15
Esquema b. Localización geográfica del ejido Cumuripa-Porvenir, Municipio de Cajeme, Sonora, México.	31
Figuras 1-7. Compuestos aislados de la raíz de <i>I. sonorae</i> .	59

LISTA DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Evolución temporal del efecto de extractos de metanol y acuoso de <i>Ibervillea sonora</i> sobre la glucemia de ratones sanos CD-I.	55
Gráfica 2. Evolución temporal del efecto de extractos de hexano, acetato de etilo y de metanol de <i>I. sonorae</i> sobre la glucemia de ratones sanos CDI.	56
Gráfica 3. Evolución temporal del efecto de diferentes dosis del EAE obtenido de la raíz de <i>I. sonorae</i> sobre la glucemia de ratones sanos CD-I.	57
Gráfica 4. Efecto del compuesto 5D sobre la glucosa administrada vía ip en diferentes dosis a ratones sanos CD-I.	61

Gráficas 5-9. Efecto de diferentes dosis Kinoína A aislada de la raíz de *I. sonorae* sobre la glucemia de ratones CD-I con diabetes experimental inducida con aloxana. 65-67

LISTA DE TABLAS.

Tabla I. Agentes farmacológicos actuales.	5
Tabla II. Dosificación y vida media de las principales sulfonilureas.	6
Tabla III. Utilización clínica de la metformina.	7
Tabla IV. Tipos de Insulinas y su tiempo de acción y duración.	9
Tabla V. Algunas plantas medicinales usadas en el tratamiento de diabetes mellitus.	13
Tabla VI. Metabolitos secundarios de origen vegetal.	14
Tabla VII. Especies del Género <i>Ibervillea</i> en México.	17
Tabla VIII. Dosis, vía de administración y vehículo de extractos orgánicos y acuoso.	35
Tabla IX. Grupos y dosis de EM y EA.	37
Tabla X. Dosis administradas de Extractos de <i>I. sonorae</i> por vía ip a ratones macho CD-I.	38
Tabla XI. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del EM, eluída con mezclas de disolventes en diferentes proporciones.	40
Tabla XII. Fracciones obtenidas en la CC del EAE de la raíz de <i>Ibervillea sonorae</i> , eluídas con diferentes mezclas y concentraciones hexano y acetato de etilo.	41
Tabla XIII. Dosis de Kinoína A administrado por vía ip.	44

Tabla XIV. Dosis de Kinoína A, administrado a ratones macho CD-I con hiperglucemia.	46
Tabla XV. Usos de la raíz de <i>I. sonorae</i> en los padecimientos más frecuentes en el ejido Cumuripa-Porvenir.	50
Tabla XVI. Rendimiento porcentual de los EA y orgánicos y obtenidos de la raíz de <i>Ibervillea sonorae</i> .	51
Tabla XVII. Toxicidad aguda (DL50) de extractos obtenidos de <i>I. sonora</i> .	52
Tabla XVIII. Características químicas y farmacológicas de los compuestos aislados.	50
Tabla XIX. Actividad citotóxica de compuestos y extractos obtenidos de la raíz de <i>Ibervillea sonorae</i> (Watson) Greene, "Güereque".	69
XI. LISTA DE ANEXOS.	82
Anexo 1	
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.	82
TRABAJOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.	85
Anexo 2. Diseño del cuestionario.	88
LISTA DE ABREVIATURAS.	
DM	Diabetes mellitus.
DM2	Diabetes mellitus tipo dos.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
DM1	Diabetes mellitus tipo uno.
DMG	Diabetes mellitus gestacional.
EH	Extracto con hexano.
EAE	Extracto con acetato de etilo.

EM	Extracto con metanol.
EA	Extracto acuoso.
DL ₅₀	Dosis letal media.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
¹ H	Protón.
¹³ C	Carbono trece.
IR	Infrarrojo.
UV	Ultravioleta.
MS	Espectrometría de Masas.
ADA	Asociación Americana de diabetes.
mg/kg	Miligramos por Kilogramo.
mg/dL	Miligramos por decilitro.
Mmol/L	Milimoles por litro.
PTOG	Prueba de tolerancia oral a la glucosa.
HBA1c	Hemoglobina glucosilada.
FID	Federación Internacional de Diabetes.
WHO	Organización Mundial de la Salud.
FMD	Federación Mexicana de Diabetes.
IMC	Índice de Masa Corporal.
L/kg	Litros por kilogramo.
PPAR γ	Receptor gamma del activador de la proliferación de peroxisoma.
U/kg	Unidades por kilogramo.
DCM	Diclorometano.
GH	Herbario Gray, Universidad de Harvard.
K	Herbario Kew (Royal Botanic Gardens), Londres.

NY	Jardín Botánico de Nueva York.
US	United State.
INEGI	Intituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.
FCME	Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM.
MEXU	Herbario Nacional, México.
IMSSM	Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social.
MTC	Metilcelulosa.
TOL	Tolbutamida.
SSF	Solución Salina Fisiológica.
AM	Aceite de Maíz.
vo	Vía oral.
ip	Vía intraperitoneal.
iv	Vía intravenosa.
HGMSS	Hospital General de México, Secretaria de Salud.
N	Normalidad.
CC	Cromatografía en columna.
V/V	Volumen/Volumen.
pf.	Punto de fusión.
MHz	Megahertz.
CDCI3	Cloroformo deuterado.
DMSO-d6	Dimetilsulfoxido.
TMS	Tetrametilsilano.
SEM	Error estándar de la media.
p	Probabilidad.
GUE	Güereque.

RESUMEN.

El objetivo de este proyecto fue el de contribuir al conocimiento de las propiedades farmacológicas de la raíz de "*Ibervillea sonora*" popularmente denominada "güereque". Ésta especie ha sido utilizada como remedio para varios padecimientos y destaca su uso como antidiabético. Tomando en cuenta lo anterior uno de los objetivos del presente trabajo fue de identificar los diferentes extractos y principios activos hipoglucemiantes provenientes de esta especie.

Con el fin cumplir con el objetivo planteado, se obtuvieron los extractos de la raíz de *I. sonora*: hexano (EH), acetato de etilo (EAE), metanol (EM) y acuoso liofilizado (EA). Todos los extractos a dosis mayores de 100 mg/kg causaron estiramiento abdominal, piloerección, reducción del tono muscular, menor reactividad, aislamiento, pérdida del reflejo de enderezamiento. La DL₅₀ del EAE administrado por vía intraperitoneal (ip) fue de 282 mg/kg mientras que por vía oral (vo) fue de 776 mg/kg resultados que indicaron una mayor toxicidad para este extracto cuando es administrado por vía ip. Por otro lado la DL₅₀ para los EM y el EA vía ip fue de 641mg/kg y 719 mg/kg respectivamente, señalando que el EM fue más toxico que el EA. Los animales que murieron mostraron convulsiones antes de morir. Se observaron efectos tóxicos aún con dosis menores a la DL₅₀.

La actividad hipoglucemiante de los EH y EAE fueron evaluados en ratón sano a la dosis de 310 mg/kg administradas por vía ip. Los resultados indicaron que EH tuvo actividad hiperglucémica a los 60 minutos después de la administración. Mientras que el EAE mostró una actividad dual, a los 60 minutos su efecto fue de hiperglucemia pero a los 240 y 360 minutos después de la administración mostró una actividad hipoglucemiante.

Un perfil similar al de EAE fue observado para el EA y el EM ya que a la dosis de 310 mg/kg, en ratón normoglucémico y por vía ip mostraron una actividad dual, a los 60 minutos después de la administración tuvieron un efecto hiperglucémico, mientras que a los 360 minutos después de la administración mostraron actividad hipoglucemiante.

La separación cromatográfica de los extractos activos, permitió el aislamiento de varios compuestos del tipo del cucurbitano que son característicos de la familia de las Cucurbitáceas. Se logró aislar una nueva cucurbitacina la 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 –octanorcucurbita-5-ene-3,11,16-trione, a la que llamamos Kinoína D; así como las Kinoínas A, B y C; y los glicósidos 16 α -20,25-trihidroxi-3 α -(2-O- α -L-rhamnopiranosil-D-glucopiranosiloxi)-(10 α)-cucurbit-5-en-11,22-diona, la (22S)-16 α ,22-diacetoxi-20,25-dihidroxi-3 α -[3,4,6-tri-O-acetil-2-O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-rhamnopiranosil)- β -glucopiranosil]-(10 α)-cucurbita-5,23t-dien-11-ona y la 16 α -acetoxi-20,25-dihidroxi-3 α -[3,4,6-tri-O-acetil-2-O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-rhamnopiranosil)- β -D-glucopiranosil]-(10 α)-cucurbita-5-ene-11,22-diona.

Solo la Kinoína A (22S)-3 α ,16 α , 20, 22, 25-pentahidroxi-(10 α)-cucurbita-5, 23-dien-11-ona), con dosis de 10 y 31 mg/Kg mostró actividad hipoglucémica en ratón normoglucémico, el 50% de los animales murieron por hipoglucemia con la dosis de 31 mg/kg después de 6 horas de administrada, la necropsia mostró esteatosis hepática.

Con el fin de evaluar las actividades hipoglucemiantes de los compuestos obtenidos en ratón diabético, se indujo diabetes experimental con aloxana en ratones macho (*Mus musculus*) cepa CD-I. Los animales con valores de glucosa mayores a 150 mg/dL fueron considerados como hiperglucémicos. La dosis de 31 mg/kg de Kinoína A tuvo actividad hipoglucémica después de 4 horas de tratamiento en ratones con hiperglucemia moderada; la misma dosis mostró efecto hipoglucémico después de 6 horas de administrada en ratones con hiperglucemia severa.

De acuerdo a informes de la literatura acerca de las actividades antiinflamatorias y de inhibición de la proliferación celular de líneas de cáncer humano de algunas cucurbitacinas, evaluamos extractos y metabolitos provenientes de *I. sonorae* como agentes citotóxicos y antiinflamatorios.

Los resultados señalaron que sólo el glicósido 16 α -20,25-trihidroxi-3 α -(2-O- α -L-rhamnopiranosil-D-glucopiranosiloxi)-(10 α)-cucurbitácea-5-en-11,22-diona mostró

moderada actividad como agente antiinflamatorio en la prueba de edema inducido por TPA en la oreja de ratón.

Palabras Clave: Etnobotánica, *Ibervillea sonora*, Güereque, kinoínas A, B, C y D.
ABSTRACT.

The objective of this project was to contribute to the knowledge of the pharmacological properties of the root of *Ibervillea sonora* popularly called "güereque". This species has been used as a remedy for various ailments and highlights its use as an antidiabetic. Taking the above into account one of the objectives of this study was to identify the different extracts and hypoglycemic active principles from this species.

To fulfill the stated objective, the extracts were obtained following *I. sonora*: hexane (EH), ethyl acetate (EAE), methanol (EM) and lyophilized aqueous (EA). All extracts at doses of 100 mg/kg caused abdominal stretch, piloerection, decreased muscle tone, decreased responsiveness, isolation, loss of righting reflex. EAE DL₅₀ administered intraperitoneally (ip) was 282 mg/kg orally while was 776 mg/kg results indicating greater toxicity for this extract when administered ip. Moreover DL₅₀ for EM and EA ip was 641mg/kg and 719 mg/kg, respectively, indicating that the EM was more toxic than EA. Animals that died showed convulsions before dying. Toxic effects were observed even at doses less than the DL₅₀.

The hypoglycemic activity of the EH and EAE was evaluated in healthy mice at doses of 310 mg/kg administered ip. The results indicated that EH had hyperglycaemic activity at 60 minutes after administration. While dual EAE showed activity at 60 minutes was hyperglycemia effect but at 240 and 360 minutes after administration showed a hypoglycemic activity.

EAE a similar profile was observed for the EA and the EM as the dose of 310 mg/kg in mice and normoglycemic via ip showed a dual activity, 60 minutes after the administration they were hyperglycemic effect, while at 360 minutes after administration showed hypoglycemic activity.

The chromatographic separation of the active extracts led to the isolation of several cucurbitano type compounds which are characteristic of the family Cucurbitaceae. It was possible to isolate a new cucurbitacin the 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27-octanorcucurbita-5-ene-3, 11, 16-trione, named kinoin D as well as Kinoínas A, B and C, and glycosides 16 α -20,25-trihydroxy-3 α -(2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosyloxy)-(10 α)-cucurbit-5-en-11,22-dione, Ia (22S)-16 α ,22-diacetoxy-20,25-dihydroxy-3 α -[3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-(2,3,4-tri-O-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl)- β -glucopyranosyl]-(10 α)-cucurbita-5,23t-dien-11-one and the 16 α -acetoxy-20,25-dihydroxy-3 α -[3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-(2,3,4-tri-O-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]-(10 α)-cucurbita-5-ene-11,22-dione.

Only Kinoína A (22S)-3 α ,16 α , 20, 22, 25-pentahydroxy-(10 α)-cucurbita-5, 23-dien-11-one, at doses of 10 and 31 mg/kg showed hypoglycaemic activity on normoglycaemic mouse, 50% of the animals died of hypoglycaemia with the dose of 31 mg/kg after 6 hours of administration, the necropsy showed hepatic steatosis. In order to evaluate the hypoglycemic activity of the compounds obtained in diabetic mouse, experimental diabetes was induced in male mice with alloxan (*Mus musculus*) CD-1 strain. Animals with glucose values above 150 mg/dL were considered hyperglycaemic. The dose of 31 mg/kg of Kinoína A hypoglycemic action was 4 hours after treatment in mice with moderate hyperglycemia, the same dose showed hypoglycemic effect after 6 hours of administration in mice with severe hyperglycemia.

According to literature reports on anti-inflammatory activity and inhibition of cell proliferation of human cancer lines, some cucurbitacins, metabolites evaluated from extracts of *I. sonorae* as cytotoxic agents and anti-inflammatory.

The results showed that only the glycoside 16 α -20,25-trihydroxy-3 α -(2-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glucopyranosyloxy)-(10 α)-cucurbit-5-en-11,22-dione showed moderate activity as anti-inflammatory agent in the test of TPA-induced edema in the mouse ear.

Keywords: Ethnobotany, *Ibervillea sonorae*, Güereque, kinoínas A, B, C and D.

I. - INTRODUCCIÓN.

I.1. Definición de diabetes mellitus.

El Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus, de la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) define la Diabetes Mellitus (DM) como: un grupo de padecimientos caracterizados por hiperglucemia, que aparece como resultado de defectos en la secreción de insulina, alteraciones en la acción de la misma, o de ambas. La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia a daños, disfunciones, y a largo plazo la falla de varios órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón, y vasos sanguíneos [1], [2].

Esta enfermedad tiene un impacto importante a nivel mundial, por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó que más de 176 millones de personas sufren de DM tipo II en todo el mundo. Además, la OMS predice que México tendrá un aumento significativo en la DM, ya que se estima que habrá más de 6 millones de pacientes con DM en 2030 [3]. En México, el Servicio Nacional de Salud informó que la diabetes fue la causa principal de muerte en la población en el año 2008 [4].

I.2. Diagnóstico.

Para el diagnóstico de la DM se observan varios signos y síntomas:

- a). poliuria, secreción y emisión extremadamente abundantes de orina; polidipsia, sed excesiva; polifagia, hambre voraz o excesiva y pérdida inexplicable de peso.
- b). Glucemia en ayunas que sea igual o mayor a 126 mg/dL (7 mmol/L).
- c). Glucemia que sea igual o mayor a 200 mg/dL (11.1 mmol/L) 2 horas después de una carga de glucosa, durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG).

Un nuevo criterio para el diagnóstico de ésta enfermedad es la determinación de la hemoglobina glucosilada en plasma (HbA1c) [5].

I.3. Clasificación de la diabetes mellitus.

La Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés [3], y la Asociación Americana de Diabetes clasifican éste padecimiento en:

- a. Diabetes tipo 1 (DM1).
- b. Diabetes tipo 2 (DM2).
- c. Otros tipos específicos de diabetes.
- d. Diabetes mellitus gestacional (DMG).

La forma más común es la DM2, la cual aparece generalmente después de los 40 años de edad. El sobrepeso y tener antecedentes familiares de diabetes, son factores de riesgo para el desarrollo de ésta enfermedad la cual se puede presentar independiente de la insulina [5, 6].

I.4. Epidemiología.

La DM2 representa un problema mundial de salud pública, en las últimas décadas se ha incrementado la incidencia de pacientes con esta enfermedad, tendencia que podría incrementarse si no hay intervención de los gobiernos y sus sistemas de salud. Como se ha comentado anteriormente éste aumento constante se ve favorecido por diversos factores como los malos hábitos alimenticios, el sedentarismo, el sobrepeso y por el envejecimiento de la población. Éste incremento constante de DM2 ha sido tal que la OMS la considera como una “pandemia moderna”.

De acuerdo a los datos de la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en Inglés) se estima que cerca de 371 millones de personas adultas en el mundo son diabéticos, lo que representa 8,3% de la población adulta mundial. Se prevé que este número aumente a 552 millones de personas en 2030, un 9,9% de los adultos, lo que equivale a aproximadamente tres personas más con diabetes cada 10 segundos. En países desarrollados 75 millones de adultos viven con diabetes, en contraste con los países de escasos recursos donde la incidencia de DM2 es mayor, ya que cuatro de cada cinco adultos son diabéticos. Se ha

calculado que 4.8 millones de persona mueren anualmente a causa de la diabetes y en 10 años se podría duplicar el número de personas. Los fallecimientos, principalmente, son a causa de las complicaciones de esta enfermedad [7].

En México, de 1998 al 2012 se ha observado un incremento en un 4.7%, pasando de una tasa de morbilidad de 342 a 358 casos por cada 100 mil habitantes. Específicamente en el año 2012 se reportaron 418,797 pacientes diagnosticados con diabetes (lo cual representa el 0.4% de la población mexicana), de acuerdo a cifras preliminares emitidas por el INEGI en el año 2012 la Diabetes Mellitus constituyó la segunda causa de muerte en la población mexicana, con una tasa de mortalidad de 75 defunciones por cada 100 mil habitantes. Además se ha presentado un incremento acelerado en los últimos 15 años, ya que en el año de 1998 presentó una tasa de mortalidad de 42.5 defunciones por cada 100 mil habitantes [8], [9].

I.5. Problema económico sobre el costo del tratamiento de pacientes en aumento.

En México en el año 2010 un estudio de micro-costeo del IMSS, reporto un gasto anual en costos directos de atención médica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) de más de 5 mil millones de pesos. Un costo promedio anual por paciente de \$42, 028.47, correspondiendo \$ 46,718.82 para el paciente sin complicaciones y \$ 46,747.21, para el paciente con complicaciones, los días/cama en hospitalización y en la unidad de cuidados intensivos son los servicios con mayor costo [10].

La Federación Mexicana de Diabetes (FMD) estimó, que los pacientes con diabetes mellitus sólo el 10% controlan la enfermedad y el 90 % restante desarrollará complicaciones como ceguera, insuficiencia renal, pie diabético y otras, las que incrementaran los costos en salud para tratarlas [11]. Por lo anterior, en México la diabetes mellitus es un problema económico en desarrollo.

En el mundo, los países desarrollados en el año 2011, gastaron para atención a los pacientes con DM2 cerca de 4 mil millones de dólares, esto es el

82% del total. De manera contrastante en los países de bajos ingresos sólo se gastaron 1,1 mil millones. Ésta falta de inversión, en los países pobres, en el cuidado y tratamiento de pacientes con DM2 explica la alta tasa de mortalidad asociada a ésta enfermedad [7].

Ante estas perspectivas, cabe señalar que actualmente existe una medicina de elite, donde el paciente debe tener cierto nivel económico para poder acceder a los fármacos adecuados. De aquí que la medicina tradicional, por su bajo costo y facilidad de acceso, constituye el recurso principal para la atención de los problemas de salud de los grupos más vulnerables. Es conocido que numerosos grupos étnicos así como las capas más pobres de las comunidades urbanas no tienen recursos para adquirir medicinas comerciales ni posibilidad de acceder a la medicina institucional [12]. Así la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más del 70% de la población mundial tiene que recurrir a la medicina tradicional, como única alternativa, para resolver sus principales problemas de salud [13].

Tomando en cuenta lo anterior, se decidió estudiar la raíz de *Ibervillea sonora*, conocida comúnmente como “güereque”, la cual se ha utilizado en la medicina tradicional como remedio antidiabético.

I.6. Tratamiento de la diabetes mellitus.

Aunque actualmente no existe una cura para la diabetes, se puede controlar mediante el tratamiento con algunos tipos de medicamentos anti-diabéticos. Existen algunos fármacos que se ingieren vía oral para bajar el nivel de glucosa en sangre en los diabéticos de tipo II, pero la mayoría de estos productos tienen efectos secundarios negativos después de un uso prolongado. Por consiguiente, la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la DM tipo II, incluyendo las plantas medicinales que se han utilizado en la medicina popular, se ha incrementado significativamente en los últimos años.

I.6.1. Tratamiento Farmacológico.

Las modalidades terapéuticas en la actualidad incluyen básicamente 6 grupos de fármacos: sulfonilureas, biguanidas, tiazolidinedionas, inhibidores de las α -glucosidasas intestinales, insulinas e incretinas, tabla I.

Los hipoglucemiantes orales se utilizan al inicio de la enfermedad o en pacientes con resistencia insulínica, estos fármacos pudieran retrasar o prevenir el desarrollo de ésta, y pueden interferir en la reducción progresiva de la función pancreática [14].

Tabla I. Agentes farmacológicos actuales.

Agentes	Mecanismo de acción
Sulfonilureas	Incrementa secreción de insulina
Biguanidas (metformina)	Reduce la producción hepática de glucosa por inhibición de la gluconeogénesis
Tiazolidinedionas	Mejoría en la sensibilidad a la insulina
Acarbosa	Inhibidor competitivo de las α -glucosidasas intestinales. Disminuye absorción intestinal de glucosa
Insulinas	Estimulan utilización de glucosa y suprime producción de glucosa hepática
Incretinas	Aumentan la secreción de insulina y disminuyen la de glucagón

I.6.1.1. Sulfonilureas.

Los hipoglucemiantes orales llamados sulfonilureas, estimulan la secreción de insulina, mejorar su sensibilidad y aumentan el número de receptores de ésta, al tratamiento crónico con ellas, reduce la producción de glucosa hepática y por

tanto la hiperglucemia de ayuno o basal, en pacientes con diabetes mellitus tipo2 (DM2) con cambios mínimos en la concentración de insulina plasmática [14], Ver tabla II.

Se absorben en el tracto gastrointestinal, se metabolizan en el hígado y se eliminan en la orina. Son más efectivas cuando se administran media hora antes de los alimentos [14].

Tabla II: Dosificación y vida media de las principales sulfonilureas.

Fármaco (Marca Registrada)	Dosis diaria (mg)	Duración de la acción (h)	Absorción (%)	Vida media (h)
Sulfonilureas de Segunda Generación				
Glibenclamida	1.25-20	16-24	100	1.3-12
Glipizida*	2,5-20*	12-24	100	2-9
Glimepirida	1-8	16-24	100	1.3-3.4
Sulfonilureas de Primera Generación				
Clorpropamida	250-750	60	100	32-50
Tolbutamida	500-3000	6-12	85-100	7

* La dosificación máxima eficaz es de 20 mg/día, aún cuando el fármaco ha sido aprobada para ser utilizada en dosificaciones de hasta 40 mg/día

I.6.1.2. Biguanidas.

La metformina, no causa hipoglucemia por debajo de los niveles de normoglucemia, ni tampoco aumento de peso. Su mecanismo de acción es aún controversial, ya que su efecto antidiabético no se debe a la estimulación de la

secreción de insulina. En pacientes con DM2, incrementan la captación de glucosa por los tejidos periféricos [14], ver tabla III.

TABLA III. Utilización clínica de la metformina.

Indicaciones	Pacientes con DM2 que fallan con la dieta, especialmente con sobrepeso
	Menores de 65 años
Formas de uso habitual	Monoterapia Combinado con sulfonilureas
Dosis disponibles	425,500 y 850 mg
Esquema terapéutico	Tomar con los alimentos, incrementar dosis lentamente. Dosis máxima 3 g
Contraindicaciones	Enfermedad hepática y renal, insuficiencia cardíaca, hipoxia, alcoholismo, historia de acidosis láctica
Precauciones	Controlar lactato posprandial, creatinina y función hepática 1 vez al año

I.6.1.3. Tiazolidinedionas.

Incrementan la acción de la insulina, *in vivo* e *in vitro*, sin estimular la secreción de ésta. Su mecanismo de acción: depende de la presencia de insulina para ejercer su acción. Disminuye la resistencia a la insulina en la periferia y en el hígado, lo que produce un aumento en la captación de glucosa en los tejidos periféricos y una disminución de su producción a nivel hepático, lo que da como resultado la disminución en la glucosa sanguínea, no es un secretagogo de insulina, es un agonista potente y altamente selectivo del receptor gamma del activador de la proliferación de peroxisoma (PPAR [γ]) [14].

I.6.1.4. Inhibidores de las α-glucosidasas.

Los inhibidores de las α-glucosidasas son responsables de la digestión de los carbohidratos. Entre estos la acarbosa, pseudotetrasacárido de origen

microbiano se comporta como un inhibidor competitivo de las α -glucosidasas presentes en la membrana de bordes en cepillo del intestino delgado. Al inhibir las enzimas que degradan los carbohidratos complejos en moléculas simples absorbibles (monosacáridos), este grupo de medicamentos actúan disminuyendo los niveles de glucemia posprandial [14].

I.6.1.5. Tipos de Insulina.

El tratamiento con insulina en pacientes con DM2 depende de la severidad del desorden metabólico. Al diagnosticar niveles de glucemia mayores de 270 mg/dL, se recomienda iniciar el tratamiento con insulina. La terapia insulínica está indicada en pacientes en los que las sulfonilureas han fallado y en los que la metformina no sea recomendable, o en los que presentan alteración renal o hepática importante. En pacientes con DM2 que presentan hiperglucemia moderada (de 140 a 198 mg/dL en ayuno), el tratamiento se puede iniciar con insulina en dosis única diaria.

Existen tres grupos principales de insulinas, tabla IV.

I.6.1.5.1. Insulina de acción rápida.

Se absorbe rápidamente desde el tejido adiposo (subcutáneo) en la corriente sanguínea, incluye: Análogos de la insulina de acción rápida tienen un inicio de la acción de 5 a 15 minutos, efecto pico de 1 a 2 horas y duración de la acción de unas 4-6 horas. La duración de la acción de la insulina, se ve afectada por la dosis, así que unas pocas unidades pueden durar 4 horas o menos, mientras que 25 o 30 unidades pueden durar 5 a 6 horas. La Insulina humana tiene un inicio de actividad en 1/2 hora a 1 hora, su efecto pico es de 2 a 4 horas, y una duración de su actividad de 6 a 8 horas.

Insulina regular (Zinc-Cristalina), es de acción rápida y de corta duración es la única que se utiliza por vía intravenosa.

I.6.1.5.2. Insulina de acción intermedia.

Se absorbe más lentamente y dura más tiempo, incluye:

Insulina humana NPH, tiene un inicio del efecto en 1 a 2 horas, un efecto pico de 4 a 6 horas, y una duración de su actividad de más de 12 horas. Las dosis muy pequeñas tendrán un efecto pico más temprano y una duración de la acción más corta, mientras que las dosis más altas tendrán un tiempo más largo hasta llegar al efecto pico y duración prolongada.

Insulina premezclada, NPH premezclada con insulina humana normal o con un análogo de la insulina de acción rápida. El perfil de la acción de la insulina es una combinación de las insulinas de acción corta e intermedia.

I.6.1.5.3. Insulina de duración prolongada.

Se absorbe lentamente, tiene un efecto pico mínimo, y un efecto de meseta estable que dura la mayor parte del día.

Tabla IV. Tipos de Insulinas y su tiempo de acción y duración [14].

INSULINAS	Inicio de acción	Máxima acción (horas)	Duración Total (horas)
1. Insulinas de duración corta			
Insulina Zn cristalina	30 min	1	6
Insulina semilenta	30 min	1-2	12-16
2. Insulinas de duración intermedia	2 h		
Insulina isofana o HPH	2 h	6-8	18-24
Insulina Zn-globina	2 h	6-8	18-20
Insulina lenta		6-8	24-30
3. Insulinas de duración prolongada			
Insulina Zn-protamina	4-6 h	16	36
Insulina ultralenta	4-6 h	16	36-48

I.6.1.6. Incretinas.

Las incretinas son péptidos secretados por células del intestino en respuesta a la ingesta de alimentos ricos en grasas y carbohidratos, con efectos sobre las células de los islotes de Langerhans. Aumentan la secreción de insulina y disminuyen la de glucagón. Las incretinas una vez liberadas son rápidamente inactivadas por una enzima, la dipeptidil-peptidasa 4 (DPP4) por lo que tienen una vida media de 2 a 7 minutos.

El GIP es producido por las células K que se encuentran en duodeno y primera parte del yeyuno, su acción es principalmente a nivel de células β pancreáticas.

GLP-1 es sintetizado por las células L que se encuentran en íleon colon. Inhibe la secreción de glucagón de las células α ante concentraciones elevadas de glucosa, estimula la secreción de insulina por células β sobre todo en la primera fase, retrasa el vaciamiento gástrico y disminuye apetito.

Estimulan la producción de insulina al actuar en células- β pancreáticas causando disminución de glucosa en sangre.

El “efecto incretina” se demostró al comprobar que la administración de glucosa vía oral producía una mayor secreción de insulina que la glucosa administrada por vía parenteral y representa aproximadamente el 60 % del total de la insulina liberada luego de una ingesta.

Este efecto se encuentra disminuido en pacientes con DM2, tanto por la reducción de secreción de los péptidos, como por la resistencia del páncreas endócrino a los mismos [15].

I.6.1.6.1 Análogos del GLP 1

Determinan liberación de la primera fase de insulina dependiente de glucosa, reducen la secreción postprandial de glucagón, reducen el vaciamiento gástrico y aumentan la saciedad lo que facilita la pérdida ponderal y mejoran la función de las células beta.

Exenatide: vida media 2 a 6 hs. Su dosis inicial es de 5µg 2 veces al día y la de mantenimiento el doble. No usarse en pacientes con insuficiencia renal, ni con antecedente de pancreatitis.

I.6.1.6.2. Inhibidores de DPP4.

Actúan prolongando la vida media del GLP1 endógeno lo que conlleva a un aumento de secreción de insulina y reducción de secreción de glucagón dependiente de glucosa [16].

A pesar del uso de los medicamentos mencionados, la incidencia de las complicaciones a largo plazo de la diabetes mellitus no se detienen. Esto ha motivado la realización de estudios experimentales farmacológicos y químicos encaminados a la validación científica de la raíz de *Ibervillea sonora*, utilizada por la población para tratar la diabetes mellitus ya que ésta representa una fuente potencial para la obtención de nuevos fármacos con actividad hipoglucemiante, motivos por lo que nos planteamos los siguientes:

II. OBJETIVOS.

II. 1. Objetivo general.

Evaluar la actividad hipoglucemiante de extractos y metabolitos secundarios de *Ibervillea sonora*.

II. 2. Objetivos particulares.

II.2.1. Documentar los conocimientos sobre el uso etnobotánico de la raíz de *I. sonora* en la comunidad de Cumuripa-Porvenir.

II.2.2. Obtener los extractos de la raíz de *I. sonora* con hexano (EH), acetato de etilo (EAE), metanol (EM) y acuoso (EA).

II.2.3. Evaluar la toxicidad aguda (DL₅₀) de los extractos obtenidos.

II.2.4. Evaluar la actividad hipoglucemiante de los extractos obtenidos en ratones normoglucémicos de la cepa CD-1.

II.2.5. Aislar los metabolitos secundarios presentes en los extractos farmacológicamente activos de la raíz.

II.2.6. Determinar la estructura molecular mediante métodos químicos espectroscópicos y espectrométricos convencionales.

II.2.7. Evaluar la actividad hipoglucemiante de los compuestos obtenidos en ratones normoglucémicos de la cepa CD-1.

II.2.8. Evaluar la actividad hipoglucemiante de los metabolitos aislados, en ratones de la cepa CD-1 con hiperglucemia inducida con aloxana.

II.2.9 Evaluar actividad antiinflamatoria y citotóxica de extractos y metabolitos aislados.

III. *Ibervillea sonora*.

III.1. Antecedentes.

En el mundo se utilizan más de 1200 plantas medicinales para el control de la diabetes mellitus. Algunas de estas plantas se han estudiado para validar sus propiedades farmacológicas antidiabéticas [13], entre estas se encuentra la raíz de *Ibervillea sonora*, algunos otros ejemplos de especies estudiadas en México se observan en la tabla V.

En la medicina tradicional mexicana, hay aproximadamente 306 especies de plantas que se han utilizado como remedios hipoglucémicos [17]. Una de estas plantas, como ya se mencionó, es la *I. sonora*, popularmente conocida como "wereque" o "güereque", que es ampliamente recomendado como un hipoglucemiante [18], antibiótico, antiviral y antimicótico [19], contra la obesidad [20] y como agente antirreumático en la medicina popular. Estudios farmacológicos previos con *I. sonora* revelaron efectos hipoglucémicos [21]. Se ha descrito que el extracto de diclorometano de la raíz presentó acción hipoglucemiante en ratones sanos y diabéticos inducidos con aloxana [18].

Estudios químicos previos de *I. sonora* dieron como resultado el aislamiento y la identificación de varios triterpenos del tipo cucurbitano conocidos como kinoinas [22]. Es probable que los productos químicos más característicos

de la raíz de *I. sonorae* sean las kinoínas y aminoácidos no provenientes de proteínas.

Las cucurbitacinas son un grupo de triterpenos con profundo sabor amargo confinados principalmente a las semillas. Biológicamente, son elementos eficaces de disuasión para los herbívoros, aunque algunos escarabajos crisomélidos se adaptan e incluso requieren, estas sustancias.

Las cucurbitacinas son efectivas en retardar o detener la división celular, y hay numerosas investigaciones sobre los usos médicos, con cientos de artículos sólo en los últimos años [23].

Tabla V. Algunas plantas medicinales usadas en el tratamiento de diabetes mellitus.

Especie	Extracto	Referencia
<i>Equisetum myriochaetum</i>	Extractos acuosos y Butanólicos	[24].
<i>Cecropia obtusifolia</i>	Extractos Acuosos	[25].
<i>Acosmium panamense</i>	Extractos Acuosos	[26].
<i>Hintonia standleyana</i>	Extractos metanólico y diclorometano	[27].
<i>Hintonia latiflora</i>	Extractos metanólico y diclorometano	[27].

III.2. Algunos metabolitos secundarios de origen vegetal con actividad hipoglucemiante.

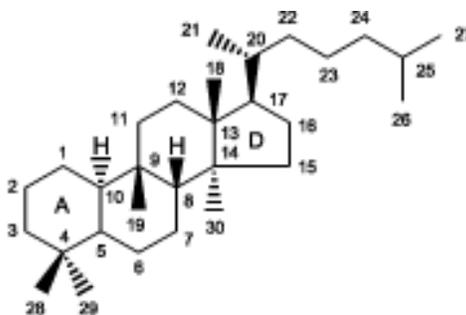
La naturaleza química de los compuestos hipoglucemiantes que se han aislado de plantas medicinales antidiabéticas incluye glucósidos, glucoesteroles, alcaloides, cumarinas, flavonoides, glucopéptidos, triterpenos, entre otros, tabla VI. Un ejemplo notable es *Momordica charantia*, de ésta especie se han aislado 228 diferentes compuestos medicinales. Estos compuestos poseen diferentes esqueletos químicos los cuales incluyen protéicos, triterpenos, lípidos, fenilpropanoides, carotenoides, esteroides, alcaloides, entre otros. Sin embargo, la mayoría de éstos compuestos son protéicos ó triterpenos. Uno de los componentes de probada actividad hipoglucemiante es una saponina esteroideal, la charantina lo cual se ha postulado como el agente hipoglucémico de *M. charantia*. [28].

Tabla VI. Metabolitos secundarios de origen vegetal

Especie	Compuesto	Referencia
<i>B. veronicaefolia</i>	5,7,3'-trihydroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona	[29].
<i>Parmentiera edulis</i>	lactucin-8-O-metilacrilato (guainólida)	[30].
<i>Equisetum myriochaetum</i>	Kaemferol-3-O-soforósido-4'-O-β-D-Glucosa	[31].
<i>Catharanthus roseous</i>	catarantina, leurosina, tetrahydroalstonina y vindolina (alcaloides)	[32].
<i>Tecoma stans</i>	tecomina y tecostanina (alcaloides)	[33, 34].
<i>Trigonella foenumgraceum</i> L.	escopoletina y fenogreequina (cumarinas)	[35].
<i>Momordica charantia</i>	los glucoesteroles, β-sitosterol-D glucósido, 5-25-estigmastadieno-3-α-ol-D-glucósido	[36].
<i>Momordica charantia</i>	Charantina, (triterpeno del tipo cucurbitano)	[37, 38].
<i>Hintonia standleyana</i>	25-O-acetyl-3-O-β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F (triterpeno del tipo cucurbitano)	[39].

Los terpenos provienen de la vía del acetato, están formados por unidades de isopreno, el esqueleto básico de los terpenos puede ser modificado por la introducción de una gran variedad de grupos químicos. La dimerización del sesquiterpeno farnesol origina al escualeno, triterpenoide fundamental, el cual por su gran flexibilidad conformacional se puede funcionalizar de varias formas las cuales pueden ciclarse dando origen a una gran gama de esqueletos de triterpenos y esteroides [40].

Los triterpenos tetracíclicos son un grupo amplio de compuestos con una gran variedad de estructuras y actividad farmacológica, entre estos se ubican los esteroides y las cucurbitacinas. Estas últimas generalmente se les encuentra como glucósidos los cuales son más abundantes cuando está más oxigenada la aglicona. Las estructuras tetracíclicas más representativas de estos triterpenos son las de lanostano, dammarano, tirucalano-eufano, protostanos y cucurbitanos (esquema a).



Esquema a. Estructura del esqueleto cucurbitano

Las modificaciones más frecuentes que puede tener el esqueleto cucurbitano son:

1. En la cadena lateral: pueden variar en su longitud y en sus ramificaciones, sitio y número de dobles enlaces y grupos funcionales, generalmente oxigenados.
2. Los anillos pueden abrirse y formar nuevos esqueletos y/o generar otros ciclos.
3. En el sistema anular, pueden variar la posición de los metilos, la estereoquímica en la fusión de los anillos y de los sustituyentes de funcionalización [41].

III.3. Cucurbitacinas.

Los triterpenos del tipo curcubitano conocidas como cucurbitacinas, se han aislado de varias familias, pero son características de la familia de las Cucurbitáceas. Sus glucósidos son las sustancias de sabor amargo.

Son compuestos altamente oxigenados, constituidos por un esqueleto curcubitano caracterizado por 19-(10 \rightarrow 9 β)-abeo-10 α -lanostano. Debido a que su estructura química es diversa, se han clasificado arbitrariamente en categorías de acuerdo a las letras del alfabeto [42].

Se han encontrado en diversas familias tales como Brassicaceae, Escrophulariaceae, Begoniaceae, Elaeocarpaceae, Datisceae, Desfontainiaceae, Pelemoniaceae, Primulaceae, Rubiaceae, Sterculiaceae, Rosaceae y Thymelaeaceae, entre otras. También, se les ha encontrado en algunos hongos de los géneros *Russula* y *Hebeloma*, así como en la cubierta de moluscos marinos (Nudibranchios) [43].

Las cucurbitacinas han sido utilizadas en diversos estudios como anti-hepatotóxicas, anticancerígenas [44], antiinflamatorias y antidiabéticas [45, 46]. Se sabe que los glucósidos de estas incrementan la secreción de insulina de las células β del páncreas, sin embargo, los estudios sobre la actividad antidiabética de estas son escasos, y la importancia de este efecto podría permitirnos considerarlas como una alternativa para obtener nuevos agentes farmacológicos con actividad hipoglucemiante.

III.4. El género *Ibervillea*.

El género *Ibervillea* en México está representado por nueve especies, tabla VII.

Tabla VII. Especies de *Ibervillea* en México.

<i>I. sonora</i> , se localiza en los estados de Baja California Sur, Sinaloa y Sonora, crece a una altitud de 0 a 1700 metros sobre el nivel del mar. [47].
<i>I. guatemalensis</i> (Standl & Steyerl) Kearns, localizada en el estado de Chiapas.
<i>I. tenuisecta</i> (Gray) Small, en los estados de, Chihuahua, Coahuila, Durango y Sonora, asociada a vegetación de matorral desértico micrófilo y selva baja con especies de los géneros <i>Guaiiacum</i> , <i>Agave</i> , <i>Larrea</i> , <i>Sericoides</i> , <i>Lycium</i> , <i>Fouquieria</i> , <i>Flourenzia</i> , etc., a una altitud 120 a 1370 msnm, en suelo arcilloso.
<i>I. maxima</i> Lira & Kearns, crece a 1400 msnm. en Guerrero, Jalisco, Sinaloa, Michoacán y Nayarit.
<i>I. millspaughii</i> (Cogn.) C. Jeffrey, en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca, Campeche, Yucatán y Quintana Roo.
<i>I. insularis</i> (Brandege) Wiggins, en Baja California Sur.
<i>I. hypoleuca</i> (Standl) C. Jeffrey, en los estados de Oaxaca, Michoacán, Jalisco y Guerrero asociada a vegetación de selva baja caducifolia.
<i>I. fusiformis</i> (E. J. Lott) Kearns, en los estados de Jalisco y Sonora.
<i>I. lindheimeri</i> en los estados de Campeche, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán, [48]; [49]; [50].

III.5. *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene, “Güereque”

El ejemplar tipo de esta especie se encuentra en el herbario de Nueva York, fue colectada por primera vez en Guaymas Sonora, México en 1887, Palmer (283), (GH; IT: K, NY, US.), descrita taxonómicamente 1 años después [51]: ver fotografías 1 a la 12.

III.6. DESCRIPCIÓN DE *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene, “Güereque”.



Fotografía 1. *Ibervillea sonora*, es una planta solitaria, trepadora, perenne, casi lisa o glabra, crece en regiones áridas cubierta de tierra y polvo.



Fotografía 2. Los tallos crecen anualmente sobre los árboles, son delgados postrados o rastreros de varios metros de largo, con zarcillos relativamente pequeños y poco enrollados



Fotografía 3. Hojas con pecíolo de 2 a 5 cm o más, divididas en tres lóbulos, con bordes dentados o sinuados



Fotografía 4. Flores pequeñas, corola amarilla, masculinas y femeninas, en pedúnculos, deciduas, en pequeños racimos o corimbos, algunas estaminadas; hypanthium pequeño, campanulado, pistilo solitario y axilar, cáliz en forma de tubo cilíndrico y más corto que la corola, pétalos pubescentes, ovario ovado.



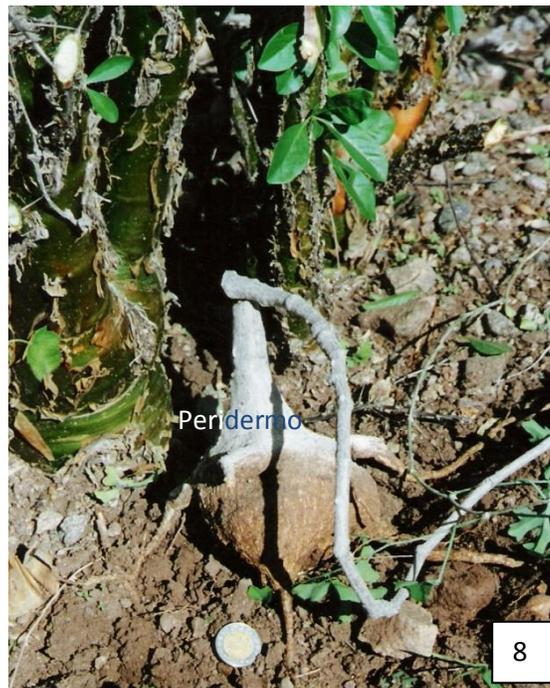
Fotografía 5. Frutos parecidos a calabazas, cáscara dura, lisos, cuando verdes presentan aproximadamente diez hileras longitudinales de puntos blancos.



Fotografía 6. Al madurar en forma de bayas globosas, de color rojo a naranja en *I. sonorae* son de cuatro centímetros de diámetro o más grandes y de dos a seis centímetros de largo.



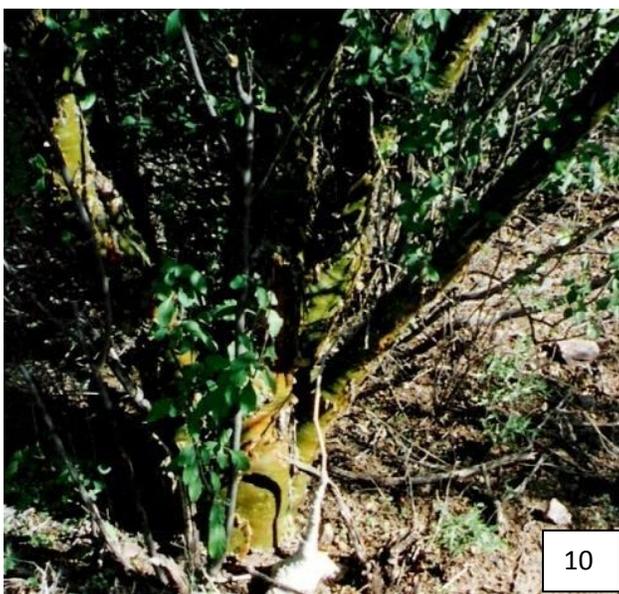
Fotografía 7. Placenta con semillas de 5-8 mm de longitud cubiertas con pulpa roja, margen liso, superficie rugosa.



Fotografía 8. La raíz con superficie expuesta a la luz, de color gris a verde, bajo el peridermo es verde, de color pardo la parte no expuesta, corteza fibrosa de color amarillo claro, olor semejante al de una papa enterrada



Fotografía 9. Después de trabajar con la raíz fresca de “Güereque”, la nariz y garganta se sienten secos e irritados, su sabor amargo persiste en los dedos aún después de varias lavadas, [51]; [52].



Fotografía 10. *I. sonoreae* se asocia con matorral espinoso, xerófilo, selva baja caducifolia, de duna costera y halófila, principalmente con especies de los géneros *Cercidium* *Jatropha*, *Fouqueria*, *Bursera*, *Solanum*, *Olneya*, *Opuntia*, *Croton*, *Mimosa*, *Pachocereus*, *Prosopis*, *Stenocereus* y *Tecota*.



Fotografías 11 y 12. *I. sonorae* florece durante los meses de mayo a agosto, prospera en suelo arenoso-rocoso y arenoso salitroso



III. 7. Descripción tradicional de *Ibervillea sonora*.

Los yaquis le llaman güareque= uu kaw chaani: es una raíz grande, presenta una enredadera que trepa en los árboles; la flor es amarilla; el fruto es una bola verde, rayado cuando es tierno y rojo con rayas claras cuando está maduro; florea en mayo; crece en los cerros, en las lomas y en los valles, es muy amarga [53].

Para los Seris es el Wareki= Yax, “barriga de la tierra”, “pastel de vaca”: la planta tiene un tallo que se padea, es como una pelota en la tierra con aproximadamente 30 cm. de altura o largo, los tallos llegan a crecer aproximadamente un metro y medio de altura o largo, es delgado cuando sale. La fruta es roja, blanda y amarga, la pulpa del tronco (raíz) es muy amarga [54].

Los mayos le llaman Wareki y la describen como una planta trepadora con hembra y macho, la primera tiene un camote blanco cenizo, tableado como la “coacha” de vaca; la hoja tiene 5 “hojitas” y cada hojita con su cruz; las flores son como la cabeza de una güica de metal para sostener la carpa de los circos, de color cremita; el fruto es como una sandía chiquita y pintita. El macho tiene el camote ovaladito hacia arriba, blanco cenizo; las hojas de igual forma que las de la

hembra; la fruta no se le ve; florece en tiempos de aguas; se le encuentra todo el año en el monte o plantado en las casas, con poca agua; es una planta cordial [55]

III. 8. Uso de *Ibervillea sonora* en la medicina tradicional.

En el año de 1795, el alemán Pfefferkorn, misionero jesuita, mencionó su eficacia en el manejo de heridas frescas al ser tratadas con polvo de raíz de güereque, el cual proporcionaba un rápido alivio sin dolor [56].

Actualmente el güereque es utilizado en diferentes regiones de Sonora y Baja California en infusión para el tratamiento de úlceras de estómago y como catártico: los yaquis, mayos y seris utilizan la raíz para tratar enfermedades como la diabetes, artritis, llagas infectadas y úlceras difíciles de cicatrizar. Cortan la raíz en trozos, la secan y muelen hasta polvo; enseguida se lavan las llagas o úlceras y ponen el polvo hasta que sanen. Cuecen el camote al igual que la rama y la flor para lavar las llagas [57].

La raíz de *Ibervillea sonora* también se usa como decocción o bien el jugo de la raíz, para tratar úlceras de estómago y su principal uso es como agente antidiabético [58], y como catártico [51, 52].

III.9. Química de *I. sonora*.

Son pocos los estudios químicos y de actividad farmacológica de la raíz de esta planta. Un estudio químico de la raíz mostró la presencia de sustancias tales como proteínas, carbohidratos, grasas, productos relacionados con el colesterol [52]; se informó sobre la presencia de glucósidos y agliconas del tipo de los cucurbitanos [22], también se ha señalado la presencia de las cucurbitacinas llamadas Kinoínas A, B y C. Los glucósidos de estas kinoínas quizá están implicados en las propiedades hipoglucemiantes de la especie [22, 59].

III.10. Farmacología de *Ibervillea sonora*.

Acerca de las propiedades farmacológicas de esta especie se informó de la acción hipoglucemiante de extractos de diclorometano y metanol en ratas normales como en ratas diabéticas, mencionan que la dosis de 300 a 600 mg/kg

del extracto de diclorometano, causó la muerte de todas las ratas por hipoglucemia severa [58]

El estudio químico del extracto de diclorometano indicó que estaba constituido por una mezcla de monoglicéridos y ácidos grasos, propuestos como los responsables de la actividad hipoglucemiante de esta especie [18].

III.11. Modelos animales para el estudio de la diabetes mellitus.

La diabetes mellitus (DM) es un problema de etiología múltiple caracterizado por hiperglucemia, producto de deficiencias en el metabolismo de los carbohidratos. Para el estudio de esta enfermedad se han propuesto modelos experimentales con animales, en los que se reproducen diferentes aspectos de esta compleja patología. Uno de estos modelos está basado en la administración de sustancias con efectos tóxicos sobre las células β del páncreas. La Aloxana [60], este compuesto ha sido utilizado para inducir diabetes, destruye las células β del páncreas mediante necrosis severa, provocando carencia de insulina y por tanto una diabetes experimental extrapolable a DM1 [61]; [62].

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

El ejido Cumuripa-Porvenir, municipio de Cajeme, ubicado al sur del estado de Sonora, México, es de difícil acceso y está alejado de los principales centros de población. Lo cual se traduce en la carencia de servicios médicos, el uso de la medicina tradicional es el principal recurso para atender sus problemas de salud. Los habitantes de esta comunidad utilizan la raíz de *Ibervillea sonora*, “güereque”, seca, molida y encapsulada para tratar enfermos de diabetes mellitus, cáncer, artritis, ulcera gástrica, así como para inducir la ovulación. También de manera tópica, aplican el polvo en heridas frescas, y en infusión la utilizan para lavar la cara y los pies para tratar el acné y la micosis. A pesar de su intenso uso en varias regiones del norte del país, son escasos los estudios químicos y farmacológicos de ésta especie.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Como se ha mencionado en México la raíz de güereque, es uno de los remedios para el tratamiento de la diabetes mellitus, aunado a esto, son escasos los estudios químicos y farmacológicos que pudieran avalar los posibles efectos antidiabéticos de ésta especie. Tomando en cuenta lo anterior decidimos realizar el estudio sobre el uso, química y actividad farmacológica de la raíz de *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene.

V. HIPÓTESIS.

La raíz de *Ibervillea sonorae*, "güereque", se ha usado de manera tradicional para tratar varias enfermedades como: la diabetes mellitus, cáncer, artritis, ulcera gástrica, para inducir la ovulación, entre otras. Por lo tanto es factible suponer que los extractos y el o las sustancias aisladas de la raíz de esta especie sean las responsables de su actividad farmacológica.



VII. METODOLOGÍA

Para cumplir con el objetivo particular II.2.1 se realizaron las siguientes acciones

VII.1. Recopilación etnobiológica y bibliográfica.

Se obtuvo bibliografía y se investigó los antecedentes históricos y actuales de la región estudiada, de los habitantes del Ejido Cumuripa-Porvenir y del “güereque” *Ibervillea sonorae*.

VII.2. Estudio de herbario.

Se reunió la información disponible en los herbarios de la Facultad de Ciencias y en el Nacional MEXU, sobre las colectas realizadas del género *Ibervillea*, en especial de la especie *sonorae*, y de los sitios en los que se han llevado a cabo [63].

VII.3. Localización geográfica del área de estudio.

El Ejido Cumuripa-Porvenir se encuentra en la región centro-sur del estado de Sonora, entre los 27° y 28° de latitud norte y los 110° y 111° de longitud oeste del Meridiano de Greenwich, en el Municipio de Cajeme, Sonora, México, a una altitud de 200 metros sobre el nivel del mar [64], ver esquema 2. Es una zona de clima *BSo (h') hw (x') (e'')*, que corresponde al Cálido seco y árido, con un régimen de lluvias intermedio entre verano e invierno con una precipitación menor de 18 milímetros cúbicos, la temperatura anual máxima extrema es de 42° C la media es mayor de 22° C muy extremoso [65].



Esquema b.

Localización geográfica del ejido Cumuripa-Porvenir, Municipio de Cajeme, Sonora, México

VII.4. Visitas a la comunidad donde se realizó el estudio.

Se hicieron acercamientos con los habitantes de la comunidad de Cumuripa-Porvenir para establecer mayor confianza con los informantes y reconocer los sitios de colecta en diferentes épocas del año.

VII.5. Entrevista a los pobladores y aplicación de un cuestionario.

Se realizaron entrevistas directas, verbales e individuales, en sus casas, a 145 hombres y 118 mujeres, con edades entre 15 y 70 años. Se visitaron 96 viviendas al azar, Se aplicaron 263 cuestionarios a los pobladores del ejido, éste incluyó información sobre el nombre del entrevistado, sexo, edad, tipo de usuario, curandero, vendedor u otro; nombres con los que se conoce la planta, breve descripción de la planta; partes de la planta que utiliza, corteza, flor, hoja, raíz,

fruto, tallo o toda la planta; época de colecta, lugar de colecta; época de floración; recomendaciones especiales para consumirla; tiempo de tratamiento; enfermedades en las que la utiliza, uso tradicional o ritual, cantidad utilizada, dosificación; modo de preparación, la usa sola o combinada; vía de administración. Los datos obtenidos en la entrevista fueron ordenados y evaluados [66]; [67], ver sección VIII.2 y el Anexo 2, Diseño de cuestionario.

Para cumplir con el objetivo II.2.2. Se realizaron las siguientes acciones.

VII.6. Colecta de *I. sonorae*.

Las colectas se llevaron a cabo al azar, se realizaron caminatas a los alrededores de la comunidad, recorriendo senderos preestablecidos recomendados por los pobladores. Se colectaron ejemplares por triplicado aplicando las técnicas de herborización, secado y conservación de ejemplares botánicos de herbario [68].

VII.7. Material Colectado.

La especie fue reconocida, colectada, y cotejada por los pobladores de la comunidad con su nombre local, e identificada y caracterizada taxonómicamente por un experto de la Familia Cucurbitaceae, el Dr. Rafael Lira Saade de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México. El material estudiado coincidió con la primera descripción botánica hecha en 1889.

Muestras de los ejemplares estudiados fueron depositadas en las colecciones de los herbarios de la Facultad de Ciencias e Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el acervo del Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social, con los registros FCME-104682, FCME-110481, MEXU-1209152, MEXU1209153, IMSSM-15219 y IMSSM-15220.

VII.8. Preparación de extractos.

VII.8.1 Extracto acuoso liofilizado (EA).

Por cada 10 g de raíz seca y molida, se agregaron 90 ml de agua destilada, la mezcla se colocó a ebullición durante 10 minutos, posteriormente la solución se filtró y fue liofilizada.

VII.8.2 Extractos orgánicos.

La raíz seca y molida se sometió a un proceso de maceración secuencial con disolventes en orden de polaridad ascendente con hexano, acetato de etilo y metanol, a temperatura ambiente durante 48 horas cada uno en tres ocasiones. Los disolventes se destilaron a presión reducida en un rotavapor hasta obtener los extractos libres de disolvente. Los extractos obtenidos se pesaron y se calculó el rendimiento. Se almacenaron en refrigeración a -4° C en un recipiente cerrado, para su posterior valoración farmacológica, así como para la obtención de las fracciones y de los compuestos activos, ver sección VIII.3.

Para cumplir con los objetivos II.2.3 y II.2.4 se llevó a cabo el:

VII.9. Estudio Farmacológico.

Los experimentos se realizaron con ratones machos adultos (*Mus musculus*) cepa CD-1 de 25 a 40 g de peso corporal y de 2 meses de edad criados en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los ratones provenían de reproductores sanos y fueron criados en un ambiente controlado y de entrada restringida, con agua y comida *ad libitum*, con doce horas de luz y doce de oscuridad. Los ratones se mantuvieron en jaulas de acuerdo a las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana [69].

Todos los experimentos con animales, fueron realizados de acuerdo con los más altos estándares de cuidados animales, como se detalla en la guía del

National Institute of Health de los EEUU para el cuidado y uso de animales de laboratorio [70].

En todos los experimentos con animales donde se evaluó la glucosa se procedió de la siguiente manera: después de dejar a los animales durante 12 horas en ayuno, fueron pesados, marcados y asignados aleatoriamente en grupos, se les determinó la primera glucemia (tiempo 0) con muestras de sangre obtenida de la vena caudal, después de haber administrado cada tratamiento, la glucosa se evaluó a los 60, 120, 240 y 360 minutos, esto se llevó a cabo con un glucómetro ACCU-CHEK sensor de Roche. Los animales fueron mantenidos en ciclos de luz/obscuridad 12/12 h. a temperatura ambiente de 22 °C, con acceso a agua y alimento *ad libitum*, se mantuvieron en observación durante 24 horas.

VII.9.1. Análisis estadístico de los datos.

Se hicieron tres repeticiones en cada experimento, excepto en los que se utilizaron compuestos aislados, debido a su escasa cantidad. Los valores obtenidos en los diferentes ensayos se representaron como el promedio +/- el error estándar de la media (SEM).

La significancia estadística, es decir, que la diferencia encontrada entre los grupos no fuera producto del azar, fue determinada mediante prueba de análisis de varianza (ANOVA) seguida en los casos significativos de una prueba de comparaciones múltiples (Dunnet) con la aplicación del software computarizado (Primer para Windows McGraw- Hill) y la versión 8.0 de ORIGIN, 2009 Northampton, USA [71], [72]. La significancia estadística se definió como $p \leq 0.05$.

VII.9.2. Estudio de toxicidad aguda de extractos orgánicos y EA.

Se hicieron VII grupos de ratones macho de 2 meses de edad de la cepa CD-1 sanos, se ordenaron y trataron de la siguiente forma:

Grupo I: se les aplicó aceite de maíz (AM) como vehículo en dosis de 0.1 mL/10 g por vía intraperitoneal (ip).

Grupo II: se les aplicó como vehículo solución salina fisiológica (SSF) en dosis de 0.1 mL/10 g por vía ip.

A los grupos I y II se les asignó tres subgrupos de 6 ratones a cada uno

Grupo III (EH): en este grupo se administró EH por vía ip, se utilizó AM como vehículo.

Grupo IV (EAE) a este grupo se administró EAE por vía ip, se utilizó como vehículo AM.

Grupo V (EAE): a este grupo se administró EAE por vía oral (vo), se utilizó AM como vehículo.

Grupo VI (EM): se le se administró EM por vía ip, se utilizó SSF como vehículo.

Grupo VII (EA): se le aplicó SSF como vehículo, por vía ip.

A los grupos III-VII se les asignaron 12 subgrupos de 6 ratones para aplicarles cada una de las siguientes dosis: 1, 3, 10, 30, 100, 300, 400, 506, 641, 811, 1000 y 1200 mg/kg; (tabla VIII) [73], [74].

Tabla VIII. Dosis, vía de administración y vehículo de extractos orgánicos y acuoso.

Grupos	Vía de Administración	Dosis (mg/kg)	Vehículo	Subgrupos (n=6)
I AM	ip	0.1 mL/10g	AM	3
II SSF	ip	0.1 mL/10g	SSF	3
III EH	ip	1-1200	AM	12
IV EAE	vo	1-1200	AM	12
V EAE	ip	1-1200	AM	12
VI EM	ip	1-1200	SSF	12
VII EA	ip	1-1200	SSF	12

EH=extracto de hexano, EAE=extracto de acetato de etilo, EM=extracto de metanol, EA=extracto acuoso ip=Intraperitoneal; vo= vía oral, AM= aceite de maíz, SSF=solución salina fisiológica. Dosis: 1, 3, 10, 30, 100, 300, 400, 506, 641, 811, 1000 y 1200 mg/kg

En cada grupo de ratones se registró el porcentaje de mortalidad (%) a las 72 horas después de la administración de los diferentes extractos y se procedió al cálculo de la DL₅₀, con el método computarizado de Litchfield y Wilcoxon [75].

VII.9.3. Estudio histopatológico en ratones de la cepa CD-I.

A los animales, se les realizó necropsia y se obtuvieron órganos: pulmones, hígado, corazón, páncreas, bazo, riñón, suprarrenales y cerebro, fueron colocados en formol al 10 % para su conservación y posterior traslado a los Servicios de Patología de los Hospitales General de México (HGM) y Juárez de la Secretaría de Salud para su análisis Histopatológico, ver sección VIII.5.

VII.9.4. Estudio de Actividad hipoglucemiante de los EA y EM.

4 grupos de ratones macho de 2 meses de edad de la cepa CD-I sanos, se trataron de la siguiente forma:

Al grupo I se le administró SSF en dosis 0.1 mL/10g por vía ip, como control negativo.

Al grupo II se le administró Artosin de laboratorio Roche, tolbutamida (TOL) en dosis de 150 mg/kg, por vía ip, como control positivo.

Al grupo III se le administró EM en dosis de 310 mg/kg por vía ip.

Al grupo IV se le administró EA liofilizado en dosis de 310 mg/kg por vía ip, ver tabla IX y la sección VIII.6.

Tabla IX. Grupos y dosis de extractos EM y EA.

Grupos	Dosis	Subgrupos (n=6)
I SSF	0.1 mL/10g	1
II TOL	150 mg/kg	1
III EM	310 mg/kg	1
IV EA	310 mg/kg	1

VII.9.5. Estudio de actividad hipoglucemiante de los EH, EAE, EM y EA.

7 grupos de ratones macho de 2 meses de edad de la cepa CD-1 sanos, se trataron de la siguiente forma:

Grupo I (AM): solo se les aplicó AM como vehículo en dosis de 0.1 mL/10 g por vía ip, este grupo fue el control negativo.

Grupo II (SSF): solo se le aplicó SSF como vehículo en dosis de 0.1 mL/10 g por vía ip, fue control negativo.

Grupo III (TOL): este grupo fue el control positivo, recibió TOL en dosis de 150 mg/kg vía ip.

Grupo IV (H): se le administró por vía ip EH en dosis de 310 mg/kg, se utilizó AM como vehículo.

Grupo V (EAE): se administró EAE por vía ip, se utilizó AM como vehículo, este se subdividió en 4 subgrupos de 6 ratones cada uno a los que se les administró EAE en dosis de 310, 10, 3.1 y 1.0 mg/kg por vía ip.

Grupo VI (EM): se administró por vía ip extracto EM en dosis de 310 mg/kg, con SSF como vehículo.

Grupo VII (EA): se administró por vía ip EA liofilizado en dosis de 310 mg/kg, se utilizó SSF como vehículo, tabla X.

Las dosis de extractos aplicados fueron determinadas en función de los valores de DL₅₀ (ver tabla XVII) para cada extracto, aproximadamente la mitad.

Tabla X. Dosis administradas de Extractos de *I. sonoreae* por vía i.p. a ratones macho CD-I.

Grupos	Dosis (mg/kg)	Subgrupos (n=6)
I SSF	0.1 mL/10g	1
II AM	0.1 mL/10g	1
III TOL	150	1
IV EM	310	1
V EA	310	1
VI EAE	310, 10, 3.1 y 1.0	4
VII EH	310	1

SSF=Solución Salina Fisiológica; AM= Aceite de maíz; TOL=Tolbutamida;

EM=Extracto de metanol; EA=Extracto acuoso; EAE= Extracto de Acetato

de etilo; EH=Extracto de Hexano

Para cumplir con los objetivos II.2.5 y II.2.6 se hizo:

VII.10. Análisis cromatográficos y técnicas espectroscópicas.

Los diferentes extractos fueron sometidos a cromatografías en columna y en placa fina utilizando sílica gel 60 F254 (Merck 1.05554). Los diferentes compuestos fueron revelados como puntos fueron observadas con luz ultravioleta a 366 y 254 nanómetros, las placas cromatográficas fueron reveladas con sulfato de cerio tetrahidratado en solución de ácido sulfúrico al 1 % y con soluciones de agentes cromógenos de vainillina I y II [76].

Los puntos de fusión (pf.) se determinaron con un equipo Electrothermal modelo 9100 digital y con un aparato Fisher Johns y están sin corregir.

Los espectros de Ultravioleta (UV) fueron elaborados con un espectrofotómetro UV visible Shimadzu Modelo U-160.

Los espectros de infrarojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro Nicolet FT-IR5-SX.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR) se llevaron a cabo con un aparato modelo Unidad Varian 300 (^1H a 300 y ^{13}C a 75.4 MHz) y un Varian-Inova de 500 (^1H a 500 y ^{13}C a 122 MHz).

Los desplazamientos químicos se expresaron en δ (ppm) en relación al tetrametilsilano (TMS) como patrón estándar, y las constantes de acoplamiento J, son en Hz.

La espectroscopia de correlación (COSY), la espectroscopia de efecto nuclear Overhauser (NOESY) y la correlación heteronuclear se llevaron a cabo utilizando el espectrofotómetro Unidad-Varian 300, mientras que la correlación heteronuclear de enlace múltiple (HMBC) fue realizada con un espectrofotómetro Varian-Inova 500.

La espectroscopia de masas de ionización de electrones (EI-MS) y la espectrofotometría de masas de alta resolución (HRMS) fue registrada en un espectrofotómetro de Masas Jeol AH505HR.

VII.11. Análisis del EM.

El EM se sometió a un proceso cromatográfico en una columna empacada con 300 g de sílica gel, y eluída con mezclas de disolventes de polaridad creciente de hexano, acetato de etilo y metanol en diversas proporciones, se obtuvieron 292 fracciones, las fracciones con perfiles similares se reunieron, tabla XI.

Tabla XI. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del EM, eluída con mezclas de disolventes en diferentes proporciones.

FRACCIONES	ELUYENTE	PROPORCION (%)
8	Hexano	100
23	Hexano-Acetato de etilo	90:10
10	Hexano-Acetato de etilo	50:50
15	Hexano-Acetato de etilo	33.4:66.6
13	Acetato de etilo	100
187	Acetato de etilo-metanol	90:10
20	Acetato de etilo-metanol	80:20
9	Acetato de etilo-metanol	50:50
7	Metanol	100
292	<u>Número total de fracciones</u>	

Con la finalidad de facilitar la separación de los componentes de las mezclas complejas se decidió llevar a cabo reacciones de acetilación e hidrólisis.

VII.11.1. Método de acetilación.

La reacción de acetilación se llevó a cabo disolviendo las muestras a acetilar en piridina, posteriormente se le adiciono el mismo volumen de anhídrido acético y se dejaron una temperatura de 60 °C en baño maría por 24 h en agitación continua. Pasado este tiempo se agregó hielo, permitiendo que el producto acetilado precipitase. El producto así obtenido se lavó con agua y se disolvió con acetato de etilo, se trató con sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotavapor a presión reducida se pesó el producto obtenido.

VII.11.2. Método de hidrólisis.

Las fracciones 102-111 (1 g), se trataron con 15 ml de ácido clorhídrico 1 N y 10 ml de metanol, la mezcla se colocó a reflujo a 60 °C durante 2 h. Pasado éste tiempo la mezcla de reacción, se extrajo con acetato de etilo dos veces y se lavó con una solución de NaHCO₃ al 10 %.. La fase orgánica se trató con sulfato de

sodio anhidro, se filtró y el acetato de etilo se evaporó por destilación a presión reducida. Se obtuvo el rendimiento de la reacción. Ver sección VIII.3

VII.12. Obtención de las fracciones activas del extracto de EtOAc.

El EAE se disolvió en metanol y se adsorbió en 10 g de gel de sílice, el disolvente se evaporó a temperatura ambiente. La mezcla seca resultante se colocó en la parte superior de una columna de cromatografía, empacada con 130 g de gel de sílice. La columna se eluyó, con hexano y mezclas de hexano-EtOAc de polaridad creciente. Se obtuvo un total de 296 fracciones de 200 ml cada uno.

Las fracciones obtenidas se agruparon en base a su patrón cromatográfico y a su actividad farmacológica. Se identificaron dos zonas cromatográficas, una con actividad hiperglucemiante y otra hipoglucemiante, estas fueron sometidas a sucesivas cromatografías en columna (CC) utilizando el mismo soporte y eluyentes. Se obtuvieron fracciones de 250 ml, las fracciones con patrón cromatográfico parecido se agruparon, y fueron sometidas a subsecuentes cromatografías en columna y en placa preparativa, eluidas con una mezcla de acetato de etilo-hexano en diferentes proporciones, tabla XII.

Tabla XII. Fracciones obtenidas en la CC del EAE de la raíz de *Ibervillea sonora*, eluidas con diferentes mezclas y concentraciones hexano y acetato de etilo.

ELUYENTE	CONCENTRACIÓN V/V	No. DE FRACCIONES
Hexano	100 %	1-10
Hexano - acetato de etilo	9:1	11-36
Hexano - acetato de etilo	8:2	37-54
Hexano - acetato de etilo	7:3	55-67
Hexano - acetato de etilo	6:4	68-140
Hexano - acetato de etilo	5:5	141-175
Hexano - acetato de etilo	4:6	176-206
Hexano - acetato de etilo	3:7	207-230
Hexano - acetato de etilo	2:8	231-245
Hexano - acetato de etilo	1:9	246-266
Acetato de etilo	100 %	267-296

VII.12.1. Aislamiento de Aislamiento de las Kinoínas D, B y C.

El extracto de EtOAc se disolvió en metanol y se adsorbió en 10 g de sílica gel, el disolvente se evaporó a temperatura ambiente. La mezcla seca resultante se colocó en la parte superior de una columna de cromatografía, empacada con 130 g de gel de sílice y se eluyó con hexano y mezclas de hexano-EtOAc y EtOAc-MeOH de polaridad creciente. Se obtuvieron un total de 198 fracciones de 200 ml cada una. De las fracciones eluidas con hexano: AcOEt (7:3) se aisló una mezcla sólida la cual fue sometida a una subsecuente columna cromatográfica. A partir de las fracciones eluidas con hexano:AcOEt (1:09) se purificaron por cristalización 35 mg de Kinoína D (**1**). A partir de las fracciones eluidas con hexano:EtOAc (2:1) se aisló la Kinoína C (**2**). Mientras que a partir de las fracciones eluidas con hexano:EtOAc (1:1) se aisló la Kinoína B (**3**). También se logró aislar la kinoína A (**4**).

VII.12.2. Aislamiento de 16 α -20, 25-trihidroxi-3 α -(2-O- α -L-rhamnopiranosil-D-glucopiranosiloxi)-(10 α)-cucurbit-5-en-11,22-diona (**5**).

El EM (20 g) se trató con acetato de etilo. La fracción insoluble (1,84 g) se sometió a un proceso de separación por medio de una columna empacada con sílice gel eluida con diclorometano para obtener nueve fracciones de 250 ml cada una. La fracción 2 se sometió a proceso de cromatografía en columna con una mezcla de diclorometano:metanol (4:0.3), se obtuvieron 32 fracciones. De la fracción 16, se aislaron 33,5 mg de **5** previamente aislado de *I. sonorae* [22].

VII. 12.3. Aislamiento de (22S)-16 α ,22-diacetoxi-20,25-dihidroxi-3 α -[3,4,6-tri-O-acetil-2-O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-rhamnopiranosil)- β -glucopiranosil]-(10 α)-cucurbita-5,23t-dien-11-ona (**6**).

De las fracciones eluidas con hexano:acetato de etilo (1:2) de la columna cromatográfica anterior se aislaron 31 mg de **6**.

VII.12.4. Aislamiento de 16 α -acetoxi-20,25-dihidroxi-3 α -[3,4,6-tri-O-acetil-2-O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-rhamnopyranosil)- β -D-glucopyranosil]-(10 α)-cucurbita-5-ene-11,22-diona (7).

Una alícuota (1,12 g) del extracto de MeOH se trató con anhídrido acético y piridina y se calentó a 40 ° C por 4 horas. El tratamiento habitual proporcionó una mezcla sólida que se separó por columna cromatográfica. De las fracciones eluidas con hexano:acetato de etilo (1:1) se obtuvieron 23 mg de 7. La elucidación estructural de 6 y 7 se logró mediante la comparación de sus datos espectrales con los publicados en la literatura [22]. Ver sección VIII.9.

Para cumplir con los objetivos II.2.7:

VII.13. Evaluación de la Actividad hipoglucemiante de la kinoína A en ratones macho (*Mus musculus*) CD-I normoglucémicos.

6 grupos de ratones macho de 2 meses de edad de la cepa CD-I sanos, se ordenaron y trataron de la siguiente forma:

Al grupo I se le administró AM en dosis 0.1 mL/10g por vía ip, fue el control negativo.

Al grupo II se le administró TOL en dosis de 150 mg/kg por vía ip, fue nuestro control positivo.

Al grupo III se le administró kinoína A en dosis de 1 mg/kg por vía ip.

Al grupo IV se le administró kinoína A en dosis de 3.1 mg/kg por vía ip.

Al grupo V se le administró kinoína A en dosis de 10 mg/kg por vía ip.

Al grupo VI se le administró kinoína A en dosis de 31 mg/kg por vía ip, tabla XIII, secciones VIII.11 y VIII.12.

Tabla XIII. Dosis de kinoína A administrado por vía ip.

Compuesto	Dosis
I. AM	0.1 mL/10g
II. TOL	150 mg/kg
III. Kinoína A	1 mg/kg
IV. Kinoína A	3.1 mg/kg
V. Kinoína A	10 mg/kg
VI. Kinoína A	31 mg/kg

Para cumplir con el objetivo II.2.8 se realizó:

VII.14. Inducción de diabetes experimental.

Aloxana (5,6-Dioxyuracilo) monohidratada marca SIGMA Chemical CO., fue diluida en buffer de citratos a pH=4, se administró a los animales por vía intravenosa (iv) en la vena caudal, en dosis de 75 mg/kg a ratones macho de la cepa CDI, en tres ocasiones cada tres días, después de aplicada la última inyección de aloxana, se evaluaron los niveles de glucemia con una muestra de sangre obtenida por punción de la vena caudal, con un glucómetro (Accu-Chek sensor, Roche).

Los ratones que mostraron hiperglucemia fueron marcados, pesados y distribuidos de acuerdo a los valores de glucemia: hiperglucemia leve (150-250 mg/dL), hiperglucemia moderada (250-350 mg/dL) e hiperglucemia severa (> 350). Se obtuvo el 80 % de ratones con diferentes grados de hiperglucemia.

VII.14.1. Actividad hipoglucemiante de la kinoína A aislada de la raíz de *I. sonorae* en ratones macho (*Mus musculus*) CD-I hiperglucémicos.

A los grupos con hiperglucemia inducida con aloxana, después de 12 horas de ayuno, se les cuantificó la glucemia, se ordenaron y trataron de la siguiente manera:

Diabetes leve.

Grupo I, se le administró AM en dosis de 0.1 mL/10 g, control negativo.

Grupo II, se le administró TOL en dosis de 150 mg/kg, control positivo.

Grupos III, se le administró Kinoína A en dosis de 31 mg/kg.

Grupo IV, se le administró Kinoína A en dosis 10 mg/kg.

Grupo V, se le administró Kinoína A en dosis 3.1 mg/kg.

Grupo VI, se le administró Kinoína A en dosis 1 mg/kg.

Diabetes moderada.

Grupo I, se le administró AM en dosis de 0.1 mL/10 g, control negativo.

Grupo II, se le administró TOL en dosis de 150 mg/kg, control positivo.

Grupos III se le administró Kinoína A en dosis de 31 mg/kg.

Grupo IV, se le administró Kinoína A en dosis 10 mg/kg.

Grupo V, se le administró Kinoína A en dosis 3.1 mg/kg.

Grupo VI, se le administró Kinoína A en dosis 1 mg/kg.

Diabetes severa.

Grupo I, se le administró AM en dosis de 0.1 mL/10 g, control negativo.

Grupo II, se le administró TOL en dosis de 150 mg/kg, control positivo.

Grupos III, se le administró Kinoína A en dosis de 31 mg/kg.

Grupo IV, se le administró Kinoína A en dosis 10 mg/kg.

Grupo V, se le administró Kinoína A en dosis 3.1 mg/kg.

Grupo VI, se le administró Kinoína A en dosis 1 mg/kg.

Ver tabla XIV y sección VIII.14.

VII. 14.1.1. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente, mediante análisis de varianza (ANOVA) seguida en los casos significativos con la prueba de comparaciones múltiples (Dunnet), usando software computarizado (Primer para Windows McGraw- Hill) y la versión 8 de ORIGIN, Northampton, USA.

Las diferencias fueron consideradas significativas con respecto a los grupos control tratados con AM y TOL a una $p \leq 0.05^*$. Los resultados tabulados y graficados se expresan como la media \pm error estándar de la media.

Tabla XIV. Dosis de Kinoína A, administrada a ratones macho CD-I con hiperglucemia.

n=6	SEVERA Dosis (mg/Kg)	MODERADA DOSIS (mg/kg)	LEVE
I. AM	0.1 mL/10g	0.1 mL/10g	0.1 mL/10g
II. TOL	150	150	150
III. kinoína A	31	31	31
IV. kinoína A	10	10	10
V. kinoína A	3.1	3.1	3.1
VI. kinoína A	1	1	1

Para llevar a cabo los objetivos II.2.9 se hizo:

VII.15. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.

La evaluación antiinflamatoria tanto de los extractos como de los compuestos aislados se realizó por el método del (TPA) 14 acetato de 12-O-tetradecanoilforbol como agente inflamatorio, siguiendo el método propuesto por De Young: Una solución de TPA (2.5 µg), en etanol, se aplicó en ambas caras de la oreja derecha de los ratones de prueba. Diez minutos después las sustancias fueron aplicadas de manera tópica en las dos caras de la oreja derecha de los ratones de prueba. Cuatro horas después los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se obtuvieron porciones de 7 mm de diámetro de las orejas tratadas y no tratadas. La variación del edema fue evaluado por las diferencias en el peso entre las porciones de las orejas tratadas y no tratadas. El porcentaje de inhibición del edema (EI %) se evaluó según la metodología propuesta por García, et al [77] ver sección VIII.15.

VII.16.-Evaluación de la actividad de inhibición de la proliferación celular de líneas de cánceres humanos.

La inhibición de la proliferación celular de líneas de cánceres humanos tanto de los extractos como de las sustancias aisladas fue determinada en seis líneas celulares de cáncer mediante el método de la sulforrodamina B. Esencialmente, los compuestos a evaluar se incubaron con las líneas celulares y mediante la unión de las proteínas al colorante sulforrodamina B para medir viabilidad y crecimiento celular [78]; [79] ver sección VIII.16.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Estudio de Herbario.

El estudio del material consultado en los herbarios FCME y MEXU mostró que el género *Ibervillea* (Cucurbitaceae), tiene una amplia distribución geográfica en México, sin embargo a pesar de su amplia distribución son escasos los estudios referentes a éste género. En México, crecen varias especies que se localizan en los estados de Baja California Sur, Campeche, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán [48]; [49]; [50].

VIII.2. Estudio etnobotánico sobre el uso de la raíz.

La información obtenida de las entrevistas sobre el uso del *I. sonorae* en la medicina tradicional de la comunidad Cumuripa-Porvenir se muestra en la tabla XV. Del número total de informantes, el 44.86% son mujeres y el 55.14 % son hombres. El 100 % de las personas entrevistadas lo utilizan para tratar la diabetes, cáncer, úlceras difíciles de cicatrizar y para lograr un embarazo. Solo el 33.84% de la población la utilizan para la artritis, el 54.38% para acné y el 86.31% para el tratamiento del reumatismo.

Para el tratamiento de la diabetes y cáncer se recomienda ingerir 1 cápsula con aproximadamente 500 mg cada 8 horas (3 cápsulas diarias), se menciona que debe seguir la administración hasta que haya una evidente mejoría.

Para la artritis, reumatismo y golpes contusos, se administran 3 cápsulas diarias vía oral, además, una rebanada de la raíz fresca se fija, con un vendaje, en los sitios de dolor, renovándose el vendaje cada 24 h.

Para lograr el embarazo, tomar tres cápsulas al día durante 1 año.

Para las úlceras difíciles de cicatrizar (heridas infectadas), se indica aplicar raíz molida de *I. sonorae* (pulverizada) dos veces al día, hasta una cicatrización completa.

En las infecciones cutáneas (granos maduros) y hongos en los pies (*Tinea pedis*), se recomienda lavar la zona afectada dos veces al día, con una infusión fría preparada con agua hirviendo y puño de la planta seca.

Todos informan el mismo método de preparación cuando es utilizada vía oral, el cual consiste en rebanar la raíz, secarla a temperatura ambiente, molerla hasta obtener polvo, se encapsula para su administración debido a su extremo sabor amargo.

La comercialización de las cápsulas las realiza el curandero (yerbero) de la comunidad. El hecho de que se utilicen cápsulas, para el consumo de esta especie, es una costumbre que se aleja de los cánones en el uso de la medicina tradicional, lo que indica, que en la práctica se ha integrado una aportación tecnológica en la medicina tradicional de la región.

Los resultados muestran que esta planta es utilizada en 9 padecimientos de importancia en Salud Pública: diabetes, cáncer, artritis, golpes contusos y reumatismo, úlceras difíciles de cicatrizar, hongos en los pies, embarazo y acné (granos maduros) ver tabla XV.

Tabla XV. Usos de la raíz de *I. sonorae* en los padecimientos más frecuentes en el ejido Cumuripa-Porvenir.

PADECIMIENTO	PARTE DE LA PLANTA	MODO DE PREPARAR	DOSIS (Aprox. 500 mg)	MUJER %	HOMBRE %	TOTAL(No.)
DIABETES	Raíz	Rebanada, seca, molida y encapsulada	1 cápsula c/ 8 h	44.86 (118)	55.14 (145)	263
CANCER	Raíz	Rebanada, seca, molida y encapsulada	1 cápsula c/ 8 h	100 (118)	100 (145)	263
ÚLCERAS DIFÍCILES DE CICATRIZAR	Raíz	Rebanada, seca, molida, se aplica el polvo.	Aplicar polvo c/12 h Hasta mejoría	44.86 (118)	55.14 (145)	263
ARTRITIS	Raíz	Rebanada, seca, molida y encapsulada	1 cápsula c/ 8 h	15.9 (42)	17.8 (47)	33.8 (89)
REUMATISMO	Raíz	Fresca, rebanada, se coloca en el sitio de dolor con un vendaje	Cambiar rebanada c/12 h Hasta mejoría	44.8 (118)	41.44 (109)	86.3 (227)
GRANOS MADUROS	Raíz	Rebanada, seca, en infusión	Lavar la cara 2 veces al día	33.85 (89)	20.53 (54)	54.38 (143)
HONGOS EN LOS PIES (<i>Tinea pedis</i>)	Raíz	Rebanada, seca, en infusión	Lavar los pies 2 veces al día	44.86 (118)	55.14 (145)	100 (263)
FERTILIDAD FEMENINA	Raíz	Rebanada, seca, molida y Encapsulada	1 cápsula c/ 8 h	44.86 (118)	55.14 (145)	100 (263)
GOLPES CONTUSOS	Raíz	Fresca, rebanada, se coloca en el sitio de dolor con un vendaje	Cambiar rebanada c/12 h Hasta mejoría	44.8 (118)	41.44 (109)	86.3 (227)

De acuerdo a los datos obtenidos en las entrevistas, todos los informantes utilizan el güereque en los padecimientos mencionados en la tabla XV. Esta planta, recibe los siguientes nombres; Güereque, Güareque, Güareki, Wereke, Warequi, Werequi y Wereque.

VIII.3. Rendimiento de los extractos obtenidos.

El rendimiento de los diferentes extractos orgánicos se calculó a partir del material vegetal, 650 g de raíz de *I. sonorae* seca, el extracto que tuvo mayor rendimiento fue el EM seguido del EAE y el EH, tabla XVI.

Tabla XVI. Rendimiento porcentual de los extractos orgánicos y acuoso liofilizado obtenidos de la raíz de *Ibervillea sonorae*.

Raíz seca	Hexano	Acetato de Etilo	Metanol	Acuoso
650 g	8.15 g (1.25%)	8.67 g (1.33%)	32 g (4.9%)	1.63 g (16.3%)

VIII.4. Toxicidad aguda de los EA y orgánicos obtenidos de la raíz de *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene.

VIII.4.1 Dosis letal (DL₅₀) del EA, EM y EAE.

En cada grupo de ratones se registró el porcentaje de mortalidad (%) y se procedió al cálculo de la DL₅₀ [75]. De acuerdo a la clasificación de toxicidad de las sustancias [80], los EA, EM y EAE administrados vía oral, se ubican en los rangos de ligeramente tóxicos (LT) de 500 a 5000 mg/kg, mientras que el EAE administrado por vía intraperitoneal resultó ser moderadamente tóxico (MT) de 50 a 500 mg/ kg, tabla XVII.

Tabla XVII. Toxicidad aguda (DL₅₀) de extractos obtenidos de *I. sonorae*.

Extracto	Toxicidad	Vehículo	DL ₅₀ (mg/kg)	Vía de administración
EA	LT	SSF	719	IP
EM	LT	SSF	641	IP
EAE	MT	AM	282	IP
EAE	LT	AM	776	O

LT= Ligeramente toxica; MT= Moderadamente Tóxica

La dosis letal 50 (DL₅₀) se determinó a las 72 horas después de haber administrado los extractos.

De acuerdo con los datos en la tabla XVII se observa que la toxicidad del EAE depende de la forma de administración. Así el EAE administrado por vía intraperitoneal es menos tóxico que el administrado por vía oral. Esta diferencia podría explicarse por variaciones farmacocinéticas que tienen los compuestos activos en las vías de administración probadas. Entre las posibles explicaciones, tenemos: A) la biodisponibilidad de los compuestos activos por vía oral es menor que por vía intraperitoneal, B) Los compuestos activos sufren metabolismo de primer paso en el tracto gastrointestinal C) las propiedades fisiológicas del tracto gastrointestinal disminuyen la concentración del o los compuestos activos disponibles para absorberse.

VIII. 5. Estudio Histopatológico en ratones macho (*Mus musculus*) cepa CD-1.

En los animales sacrificados se observaron daños aún con dosis menores a la DL₅₀. Los animales que recibieron las dosis mayores de EA, EM y EAE mostraron estiramiento abdominal, piloerección, reducción del tono muscular, menor reactividad, aislamiento, y perdieron el reflejo de enderezamiento un poco antes de morir, fotografía 13.



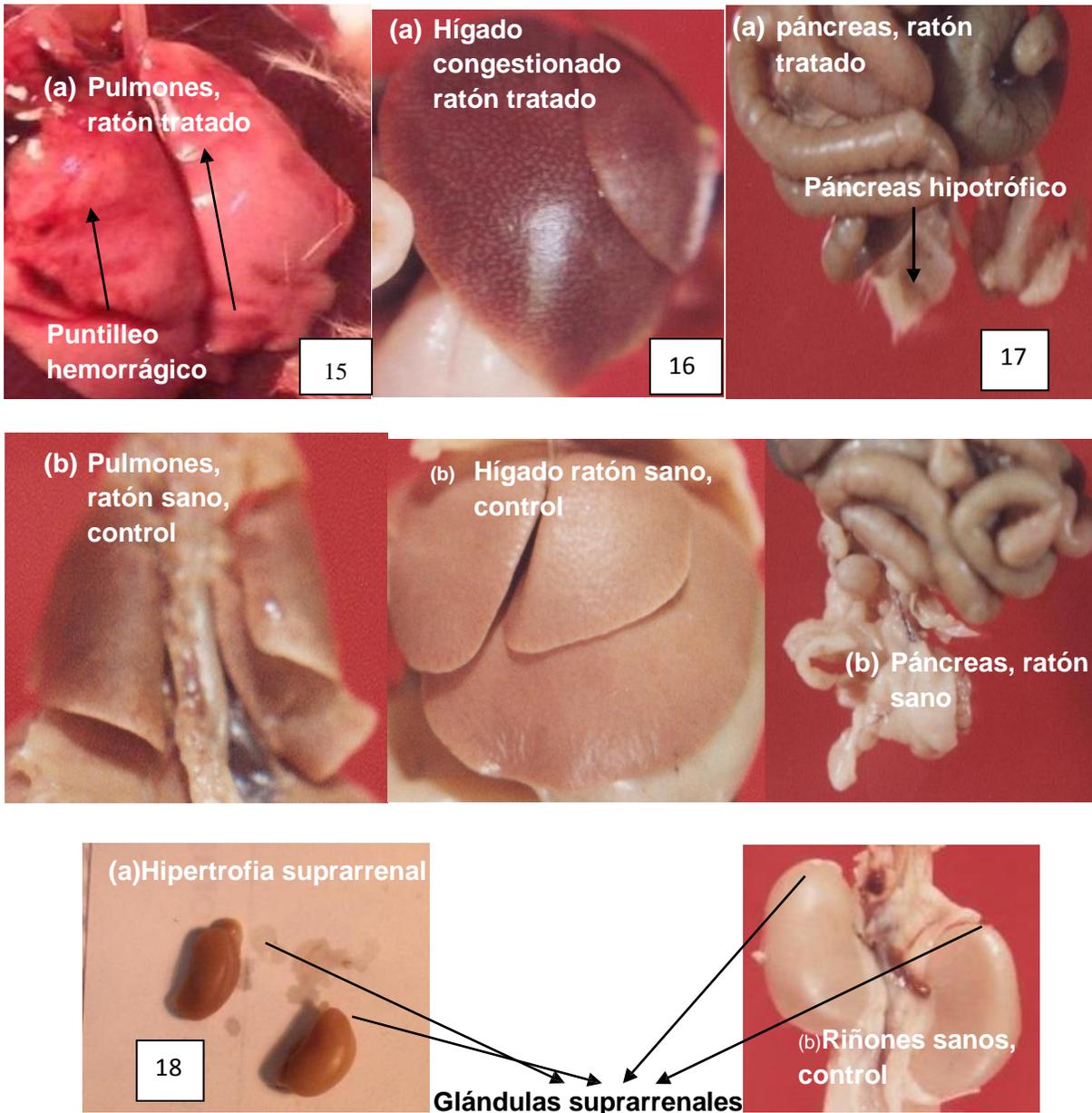
Fotografía 13: Comportamiento de los ratones tratados.

En los animales que murieron, la necropsia reveló: líquido libre en la cavidad peritoneal, ver fotografía 14



Fotografía 14. Características macroscópicas de la cavidad peritoneal de ratones tratados.

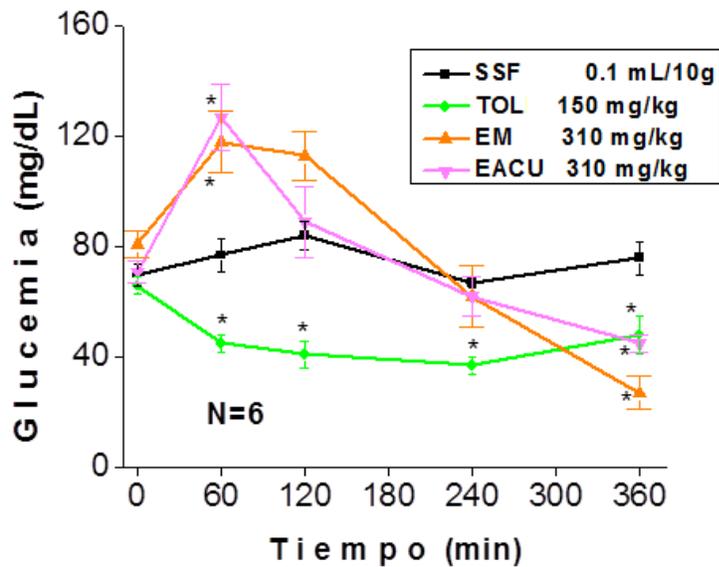
El estudio histopatológico informó daño a los pulmones, como órgano de choque, consistente en congestión, edema y hemorragias con dosis de 1000 mg/kg con todos los extractos, como se observa en las fotografías: Macroscópicamente se observó pulmones con puntilleo hemorrágico y francas hemorragias, fotografía 15; hígado congestionado, fotografía 16; páncreas hipotrófico y en algunos casos difuso a “disuelto”, fotografía 17; e Hipertrofia suprarrenal, fotografías 18. Las fotografías Inferiores (b) corresponden a órganos de ratones sanos.



Fotografías 15-18. Pulmón de choque, hígado congestionado, hipertrofia suprarrenal e hipotrofia pancreática.

VIII. 6. Evaluación temporal de los efectos de los EA y EM obtenidos de la raíz *I. sonorae* en la glucemia de ratones macho (*Mus musculus*) CD-I normoglucémicos.

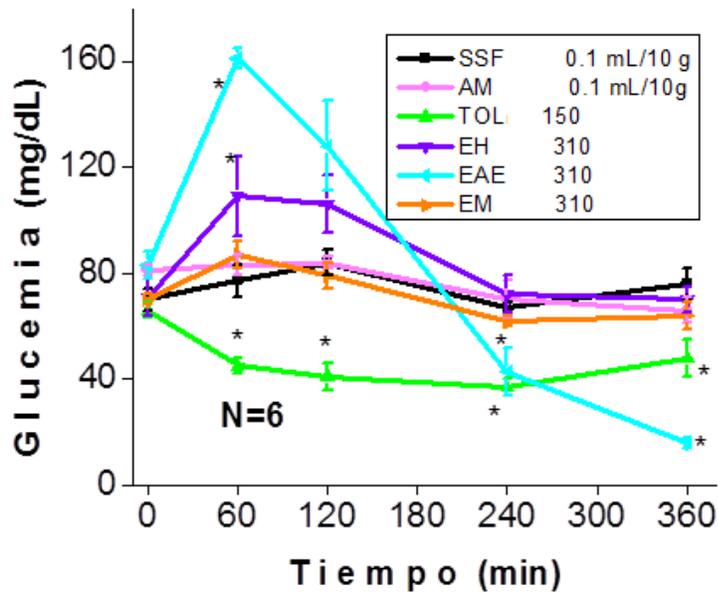
La grafica 1 muestra la evolución temporal de la glucemia en ratones sanos, después de la administración ip de los EA y EM a las dosis de 310 mg/kg. La glucemia no cambio con el control negativo, SSF, mientras que con el control positivo TOL, causó hipoglucemia durante todo el experimento. Los EM y EA causaron actividad dual, en los primeros sesenta minutos indujeron un efecto hiperglucémico e hipoglucemia después de los 120 minutos.



Gráfica 1. Evolución temporal del efecto de EM y EA obtenidos de la raíz de *Ibervillea sonora* sobre la glucemia de ratones sanos CD-I.

VIII.7. Evaluación temporal de los efectos de los EH, EAE y EM obtenidos de manera sucesiva de la raíz de *I. sonorae*, en la glucemia de ratones macho (*Mus musculus*) CD-I normoglucémicos.

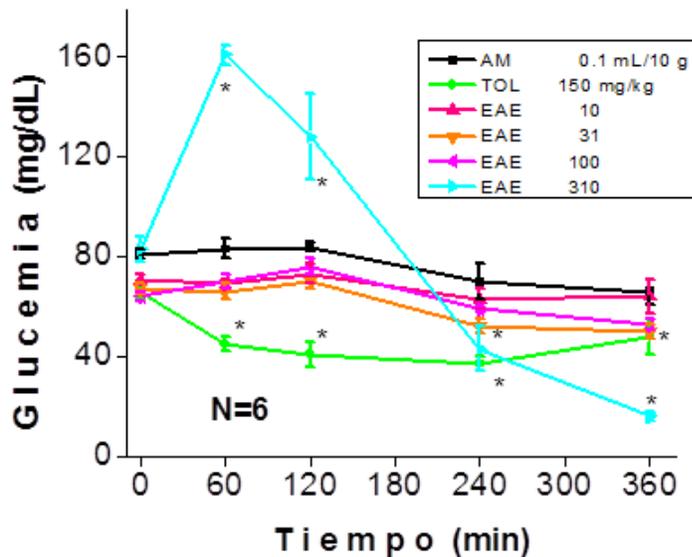
La gráfica 2 muestra la evolución temporal de la glucemia en ratones normoglucémicos, después de la administración ip de los EH, EAE y EM en dosis de 310 mg/kg. La glucemia no cambio con los controles negativos, SSF y AM ni con el EM, macerado previamente con hexano y acetato de etilo, mientras que con el control positivo TOL, mostró actividad hipoglucemiante significativa durante todo el experimento. Los EH y EAE tuvieron significativa actividad hiperglucémica a los 60 minutos. Por otro lado, el EAE mostró efecto hipoglucémico después de los 120 minutos, con hipoglucemia significativa menor a 30 mg/dL a los 360 minutos.



Gráfica 2. Evolución temporal del efecto de los EH, EAE y EM obtenidos de la raíz *I. sonorae* sobre la glucemia de ratones CD-I.

VIII.8. Evaluación del efecto hipoglucemiante del EAE en ratones macho sanos (*Mus musculus*) CD-I.

En la gráfica 3 se muestra el efecto hipoglucémico agudo del EAE administrado por vía ip, a las dosis de 10, 31, 100 y 310 mg/kg en ratones sanos. La glucemia no cambio con el control negativo AM, mientras que el control positivo TOL, mostró efecto hipoglucemiante significativo durante todo el experimento. Los resultados muestran significativa actividad hiperglucémica del EAE con dosis de 310 mg/kg EAE a los 60 minutos, descendiendo paulatinamente a partir de los 120 minutos después de la administración, hasta alcanzar valores de hipoglucemia menores a los 40 mg/dL a los 360 minutos, el efecto hipoglucemiante del EAE fue mayor que el inducido por la TOL. De manera diferente, a las dosis de 100 y 31 mg/kg el extracto sólo mostró un leve efecto hipoglucemiante.



Gráfica 3. Evolución temporal del efecto de diferentes dosis del EAE obtenido de la raíz de *I. sonorae* sobre la glucemia de ratones CD-I.

VIII.9. Compuestos obtenidos del EM.

De las columnas del extracto de metanol, previamente mencionada, se reunieron las fracciones eluidas con acetato de etilo: metanol (9:1). El residuo obtenido se sometió a una hidrólisis ácida. La mezcla de reacción se purificó mediante una columna empacada con sílice y en las fracciones eluidas con hexano: acetato de etilo (2:1) se obtuvieron 14 mg de la kinoína C (**2**) (3 α , 16 α -dihidroxi-4,4,9,14-tetrametil-(9 β ,10 α)-19-norpregn-5-ene-11,20-diona) previamente aislada de *I. sonorae* (Weckert, et al 1993). La determinación estructural de los metabolito aislados se obtuvo mediante la comparación de los datos físicos y espectroscópicos con aquellos informados en la literatura.

El EM (40 g) fue tratado con acetato de etilo formándose una solución y un precipitado. La parte insoluble (3.68 g) se sometió a un proceso de separación por medio de una columna empacada con sílice y eluida con diclorometano obteniéndose nueve fracciones de 250 ml cada una. La evaporación del disolvente a presión reducida de la fracción dos permitió la separación de una parte aceitosa y una sólida. Esta última se sometió a un proceso de cromatografía en columna eluida con una mezcla de diclorometano: metanol (4:0.3) y de la fracción 16 se obtuvo 33.5 mg de un producto sólido blanco amorfo, el cual se identificó mediante la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos, como la 16 α -20,25-trihidroxi-3 α -(2-O- α -L-rhamnopiranosil-D-glucopiranosiloxi)-(10 α)-cucurbit-5-en-11,22-diona (**5**), figuras 2 y 5.

VIII. 10. Aislamiento de las kinoínas D y A a partir del EAE.

El EAE fue sometido a cromatografía en columna empacada con sílice gel y eluida con mezclas de hexano-acetato de etilo en diferente proporción, de las fracciones sometidas a placa preparativa se obtuvieron 47 mg de un compuesto menos polar y 25 mg de otro más polar.

Un análisis espectroscópico detallado permitió elucidar la estructura 20, 21,22, 23, 24, 25, 26, 27-octanorcucurbita-5-eno-3, 11, 16-triona para el compuesto menos

polar. Resultando un nuevo triterpeno del tipo cucurbitano, éste compuesto se denominó kinoína D (**1**).

La identidad de la kinoína A (**4**) [(22S)-3 α ,16 α , 20, 22, 25-pentahidroxi-(10 α)-cucurbita-5, 23-dien-11-ona] se logró por la comparación de sus datos químicos y espectroscópicos con aquellos informados en la literatura, figuras 1 y 4.

Figura 1-7. Compuestos Aislados de la raíz de *I. sonorae*

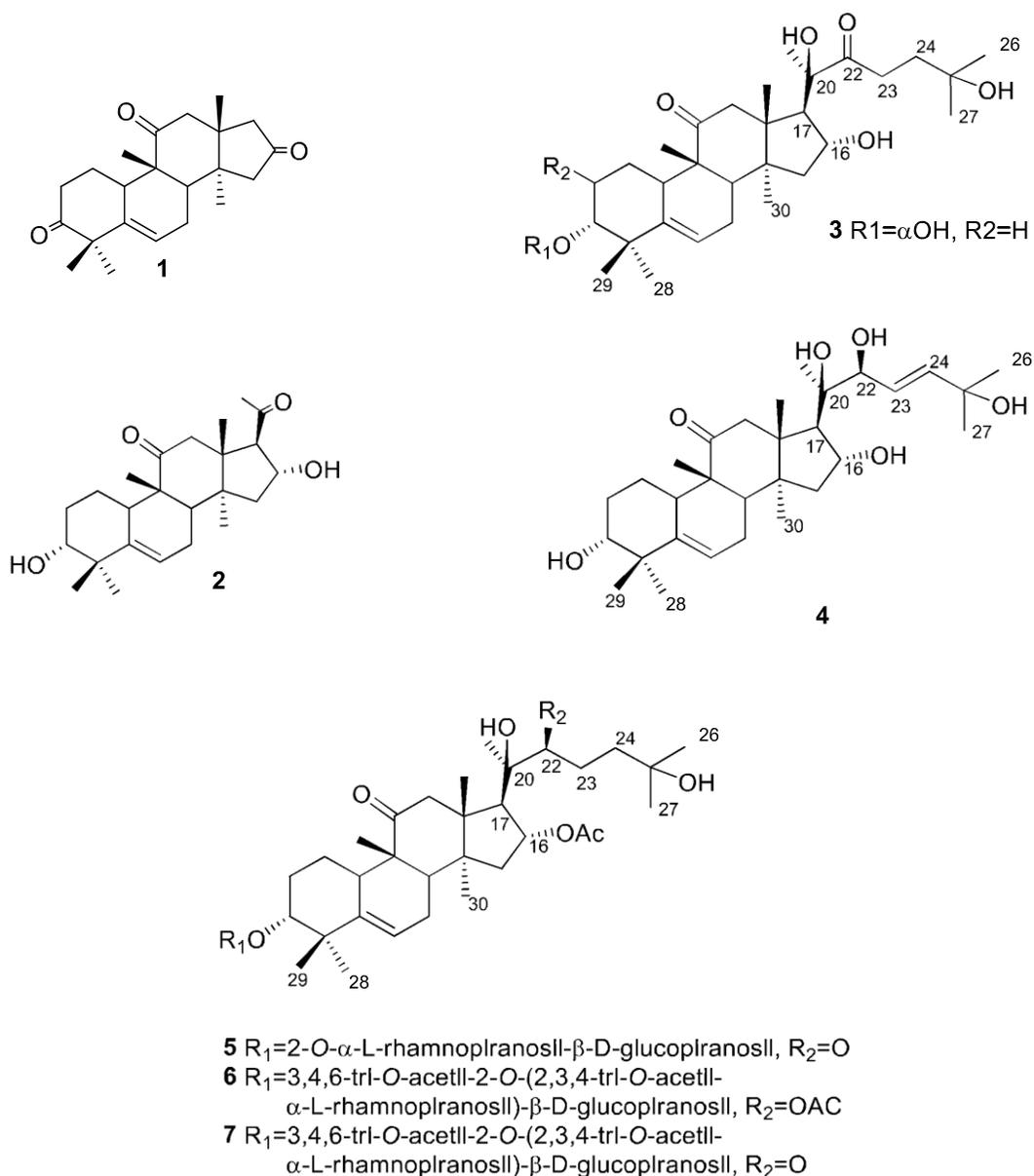
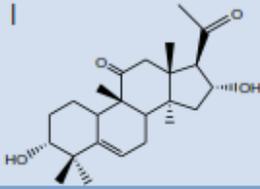
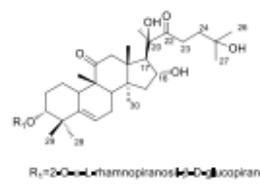
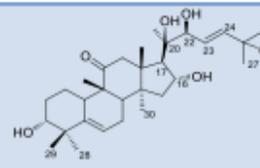
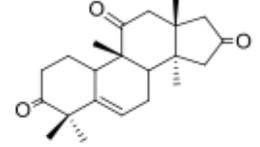
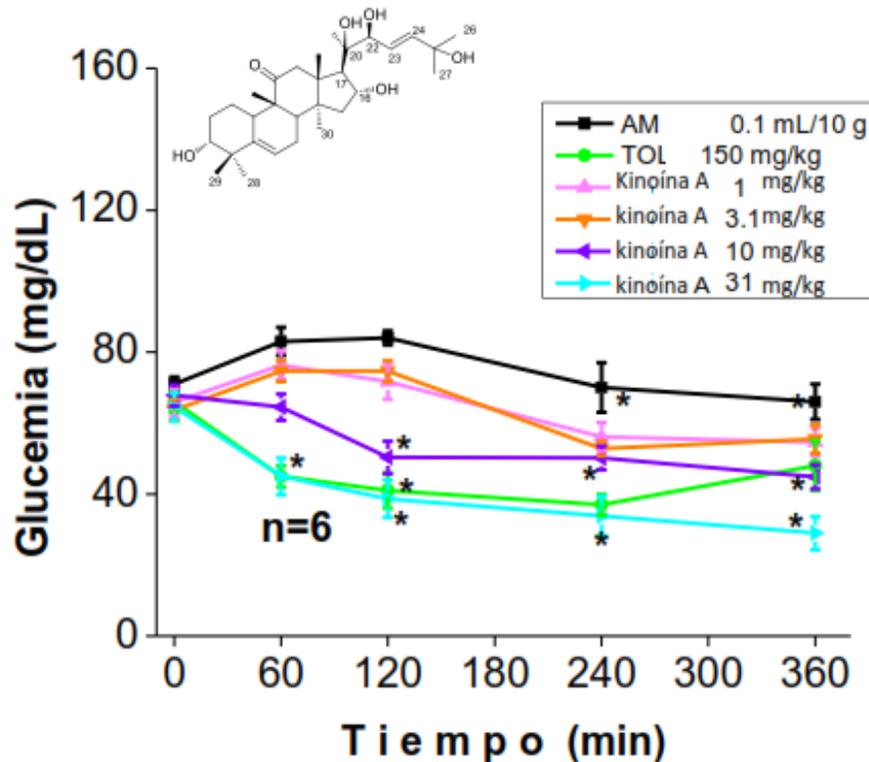


Tabla XVIII. Características químicas y efectos farmacológicos de los compuestos aislados de extractos obtenidos de la raíz de *I. sonorae*.

Compuesto	Nombre	Cantidad (mg)	Punto de Fusión °C	Extracto	Actividad
	Kinoína C (2)	14	184-188	EM	
 R ₁ =2-O-α-L-rhamnopyranosil-O-glucopyranosil	2-O-α-L-rhamnopyranosil-D-glucopyranosiloxil-Kinoína B (3)	35	238-245	EM	Anti-inflamatorio
	Kinoína A (4)	76	147-152	EAE	Hipo-glucémico
	Kinoína D (1)	47	203-205	EAE	Anti-inflamatorio

VIII.11 Evaluación de la Actividad hipoglucemiante de la kinoína A administrada por vía ip en ratones macho (*Mus musculus*) CD-I normales.

La gráfica 4 muestra el efecto hipoglucémico agudo obtenido en ratones sanos, después de la administración ip de kinoína A a las dosis de 1, 3.1, 10 y 31 mg/kg. La glucemia no cambió con el control negativo AM, mientras que con el control positivo TOL causó hipoglucemia significativa durante todo el experimento. La kinoína A con dosis de 31 mg/kg tuvo significativa actividad hipoglucémica a los 60, 120, 240, y 360 de minutos, con valores de glucosa menores de 40 mg/dL a partir de los 120 minutos después de la administración, mientras que la dosis de 10 mg/kg mostró actividad hipoglucémica a los 120, 240 y 360 minutos.



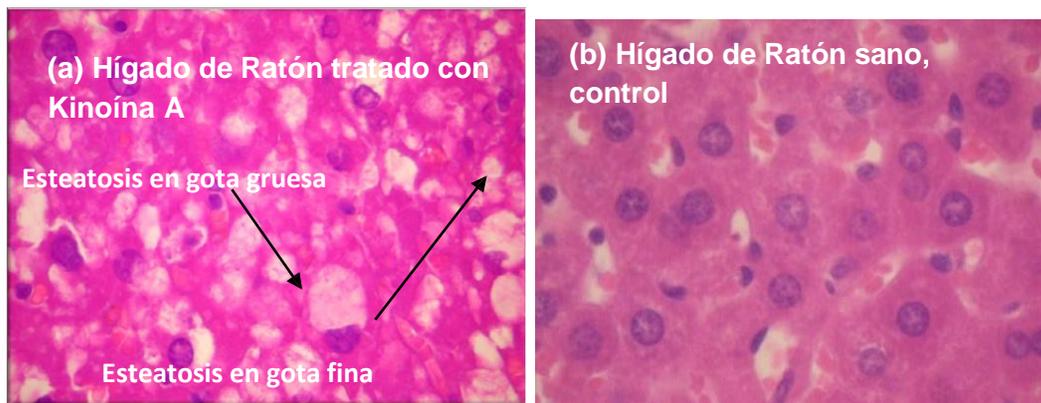
Gráfica 4. Evolución temporal del efecto de diferentes dosis de kinoína A administrada vía ip sobre la glucemia a ratones sanos CD-I.

VIII.12. Evaluación de la toxicidad aguda e histopatológica de la Kinoína A en ratones de la cepa CD-I sanos.

La dosis letal media (DL_{50}) de la kinoína A, fue de 31 mg/kg aplicado por vía ip. Esta dosis única, causo hígado en nuez moscada en ratón normoglucémico CD1. En la fotografía 19 a, se observa la superficie del corte de hígado con numerosas áreas irregulares de color café claro que contrastan con áreas de color café oscuro y que corresponden a zonas de necrosis, Imagen en “Nuez moscada”. Superficie de corte de hígado donde se observa numerosas áreas irregulares de color café claro, la imagen (b) corresponde a un hígado de ratón sano, control.



Fotografías 19 a y b. Imágenes de hígado de ratones tratado (a) y sano (b)



Microfotografías 20 (a), hígado tratado con Kinoína A y (b) sano

Las microfotografías 20 (a) y (b), la primera corresponde al hígado de ratón de la cepa CD-I tratado con Kinoína A administrada por vía ip en dosis de 31mg/kg, en esta se observa pérdida de la arquitectura normal de los hepatocitos, hay necrosis

irregular de los hepatocitos, con acentuada esteatosis en gota gruesa y los menos en gota fina, la segunda corresponde al hígado de ratón sano, ambas fueron observadas con microscopio óptico con el objetivo de inmersión 100 X.

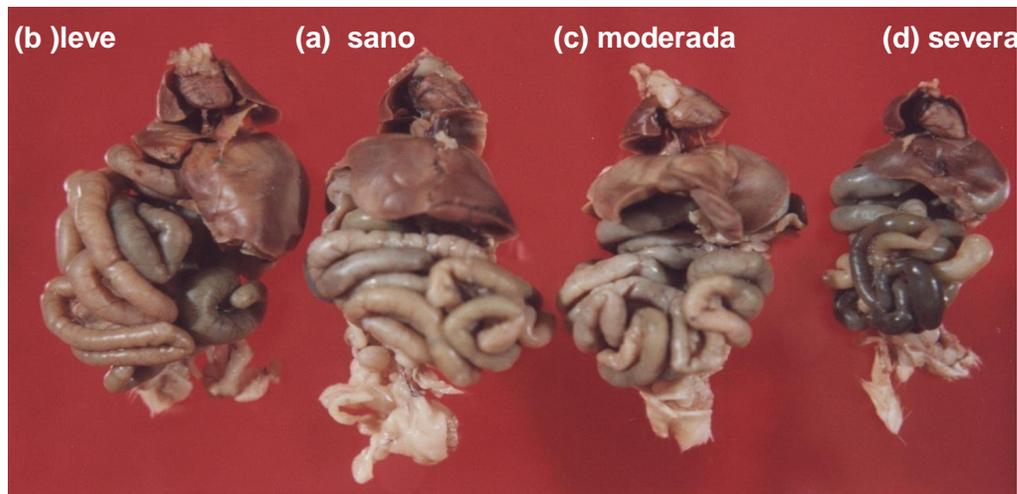
VIII.13. Resultados de diabetes experimental.

Después de 7 días de aplicada la última dosis de aloxana se evaluó la glucemia, de los organismos tratados y se clasificaron de la siguiente forma:

hiperglucemia leve (b), órganos no necrosados, con la presencia de tejido pancreático, glucosa 130-200 mg/dL, ver fotografía 21(b).

hiperglucemia moderada (c) los órganos están contraídos, aún hay de tejido pancreático, glucosa mayor a 200 mg/dL, ver fotografía 21 (c).

hiperglucemia severa (d), con valores de glucosa mayores a 500 mg/dL, la necropsia del organismo con los órganos presentan coloración oscura (necrosis), con escaso tejido pancreático, ver fotografía 21 (d)



Fotografía 21. Se observa la necropsia comparativa de ratones CD-1 con hiperglucemia leve (b), moderada (c) y severa (d), comparados con organismo sano (a).

VIII.14. Actividad hipoglucemiante de la Kinoína A en ratones macho (*Mus musculus*) cepa CD-I con hiperglucemia inducida con aloxana.

Las gráficas 5-9 muestran el efecto hipoglucémico agudo obtenido en ratones con hiperglucemia leve, moderada y severa, durante los 0´ (gráfica 5), 60´ (gráfica 6), 120´ (gráfica 7), 240´ (gráfica 8), y 360´ (gráfica 9).

Las barras en negras, representa AM administrado en dosis de 0.1 mL/10 g, en ratones con hiperglucemia severa, moderada y leve.

Las barras rojas, representa TOL administrada en dosis de 150 mg/kg, en ratones con hiperglucemia severa, moderada y leve.

Las barras azules, representa a la Kinoína A administrada en dosis de 1 mg/kg, en ratones con hiperglucemia severa, moderada y leve.

Las barras verdes, representa a la Kinoína A administrada en dosis de 3.1 mg/kg, en ratones con hiperglucemia severa, moderada y leve.

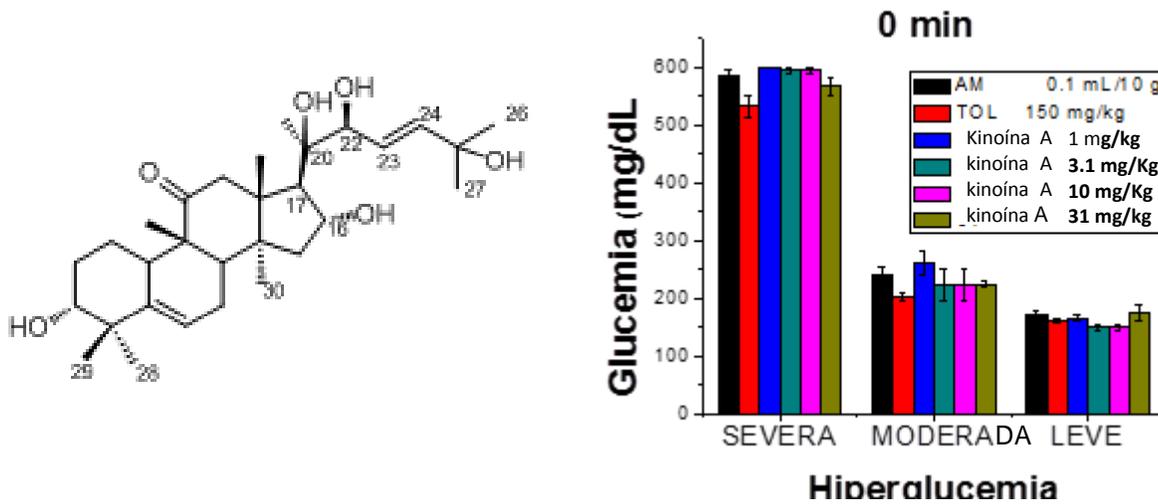
Las barras rosas, representa a la Kinoína A administrada en dosis de 10 mg/kg, en ratones con hiperglucemia severa, moderada y leve.

Las barras cafés, representa a la Kinoína A administrada en dosis de 31 mg/kg, en ratones con hiperglucemia severa, moderada y leve.

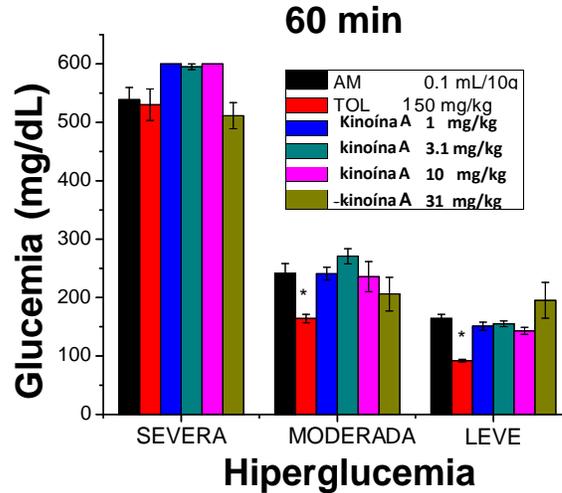
En ratones con **hiperglucemia severa** durante los 0, 60, 120 y 240 minutos (ver gráficas 5, 6, 7 y 8) las dosis de Kinoína A de 1, 3.1 y 10 mg/kg administradas por vía ip no mostró actividad, con la dosis de 31mg/kg mostró actividad significativa a los 360 minutos (ver gráfica 9).

En ratones con **hiperglucemia moderada** las dosis de Kinoína A de 1, 3.1, y 10 mg/kg, administradas por vía ip no tuvo efecto; sólo la dosis de 31 mg/kg administrada por vía ip mostro efecto significativo a los 240 y 360 minutos después de administrada, ver gráficas 8 y 9.

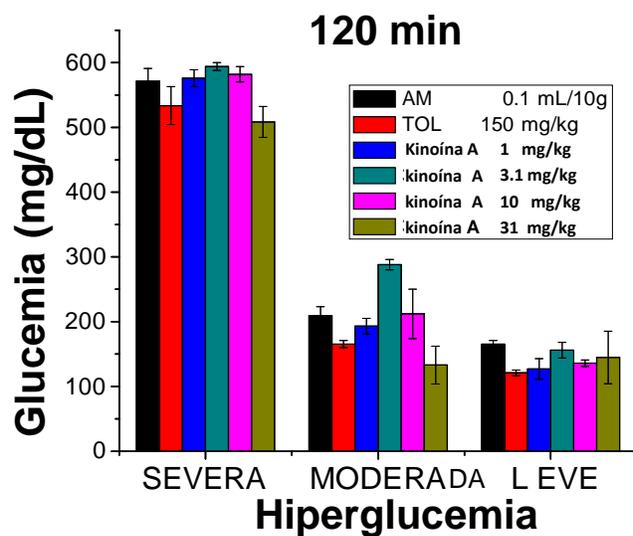
En ratones con **hiperglucemia leve** la dosis de 31 mg/kg administrada por vía ip mostró efecto significativo a los 360 minutos después de administrada, ver gráfica 9.



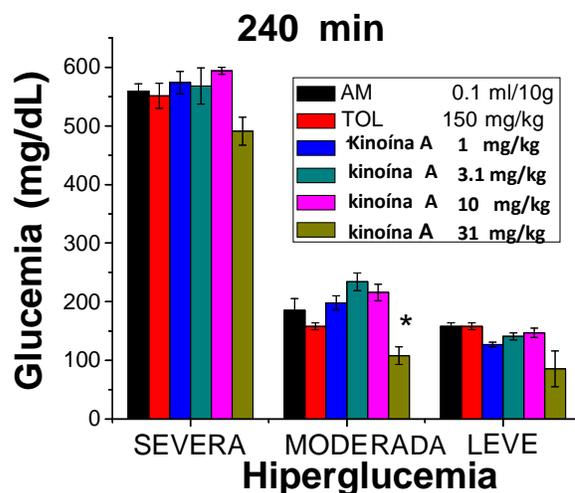
Gráfica 5. Evaluación de la glucemia antes de administrar la Kinoína A en ratones CD-I con hiperglucemia severa moderada y leve, a los 0 minutos.



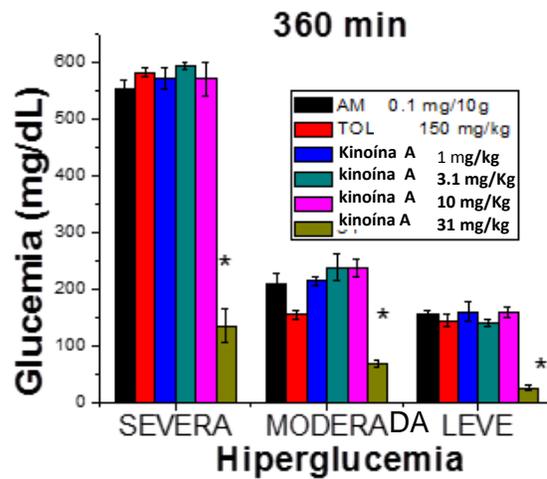
Gráfica 6. Evaluación del efecto de diferentes dosis de kinoína A administrada por vía ip sobre la glucemia de ratones con hiperglucemia severa moderada y leve a los 60 minutos después de la administración



Gráfica 7. Evaluación del efecto de diferentes dosis de kinoína A administrada por vía ip sobre la glucemia de ratones con hiperglucemia severa moderada y leve a los 120 minutos después de la administración



Gráfica 8. Evaluación del efecto de diferentes dosis de kinoína A administrada por vía ip sobre la glucemia de ratones con hiperglucemia severa moderada y leve a los 240 minutos después de la administración



Gráfica 9. Evaluación del efecto de diferentes dosis de kinoína A administrada por vía ip sobre la glucemia de ratones con hiperglucemia severa moderada y leve a los 360 minutos después de la administración.

En resumen, los ratones CD-I tratados con Kinoína A en dosis de 31 mg/Kg mostraron actividad hipoglucémica significativa:

En hiperglucemia severa, leve y moderada a los 360 minutos

En hiperglucemia moderada a los 240 minutos

La Kinoína A a las dosis de 1, 3.1, y 10 mg/kg no mostró efecto durante todo el experimento en ninguno de los grupos de ratones con hiperglucemia.

La glucemia no cambió con el control negativo AM, gráficas 5-9; mientras que con el control positivo TOL, sólo tuvo efecto hipoglucémico significativo a los 60 minutos en ratones con hiperglucemia moderada y leve (ver grafica 6)

VIII. 15.- Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los EA, EM y de los metabolitos aislados.

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de todos los extractos y metabolitos secundarios se realizó mediante el método de la inducción de edema por TPA. (acetato de tetradecanoilforbol), como agente antiinflamatorio, siguiendo la metodología propuesta por De Young. Se aplicó 2.5 µg en ambas caras de la oreja derecha de los ratones de prueba, diez minutos después se aplicó las sustancias de prueba en las dos caras de la oreja derecha de los ratones de prueba. Cuatro horas después los animales se sacrificaron mediante dislocaciones cervicales y se obtuvieron porciones de 7 mm de diámetro de las orejas tratadas y no tratadas. La variación del edema fue evaluado por las diferencias en el peso entre las porciones de las orejas tratadas y no tratadas. El porcentaje de inhibición del edema (EI %) fue evaluado según la metodología propuesta. Los resultados indicaron que solo la kinoína D mostró un 41% de inhibición a 1 mg/oreja.

VIII. 16.- Evaluación de la actividad antiproliferativa de diferentes líneas celulares de cánceres humanos de extractos y metabolitos secundarios provenientes de *I. sonorae* mediante el ensayo de Sulforrodamida B.

La evaluación antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer: de pulmón (SKLU), del Sistema Nervioso Central (U251), próstata (PC-3), colon (HCT15), mama (MCF-7) y de leucemia (K562) en la que se aplicaron dosis de 50µg/mL de cada uno de los compuestos aislados, así como de los EA y EM.

Los resultados de este ensayo mostraron que, el (IsPDD) mostró actividad significativa en cáncer de colon, mientras que el extracto metanólico presentó actividad importante en cáncer de colon y pulmón (tabla XIX).

Tabla XIX. Actividad citotóxica de compuestos y extractos obtenidos de *Ibervillea sonorae* (Watson) Greene, “Güereque”.

Dosis 50µg/mL	Kinoína D	IsB	Kinoína A	IsPDD	Kinoína C	EM	EA
SKLU- (Pulmón)	4.9	10.14	1.99	S/A	18.7	92.5	49.5
U251- (SNC)	S/A	31.44	S/A	20.57	7.1	59.5	9.7
PC-3- (Próstata)	27.4	27.4	SA	29.21	21.9	37.2	22.4
K562- (Leucemia)				47.77	10.8	40.6	22.5
HCT15- (Colon)	38.0	39.13	21.6	86.12	8.6	88.5	22.6
MCF-7- (mama)	21.49	7.0	15.67	31.82	S/A	S/A	S/A

IsB= mezcla compleja de cucurbitacinas; IsPDD=16α-20,25-trihidroxi-3α-(2-O-α-L-rhamnopiranosil-D-glucopiranosiloxi)-(10α)cucurbit-5-en-11,22-diona; EM= Extracto de Metanol; EA= Extracto acuoso.

IX. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

El estudio de herbario mostró que el género *Ibervillea* tiene amplia distribución en La República Mexicana, existen 9 especies, de las cuales se usan todas aún fuera de las comunidades rurales. Los resultados obtenidos sobre el uso antidiabético de las mismas corroboran que este género es utilizado desde hace más de 150 años (comunicación personal). La colecta indiscriminada de "Güereque" hace que se encuentren en peligro de extinción por su venta sin control en diversos mercados de México. Es importante promover su conservación para el aprovechamiento racional de las especies del género *Ibervillea*.

Esta investigación mostró que la raíz de la especie *I. sonora* es de amplio uso en la medicina tradicional de los habitantes de la comunidad de Cumuripa-Porvenir, Municipio de Cajeme, Sonora, México. Los usuarios muelen el material vegetal y el polvo seco lo aplican directamente en las heridas recientes tanto en animales como en personas. El uso tópico se recomienda para aliviar el dolor y evitar infecciones. Por otro lado, debido a su intenso sabor amargo, se recomiendan su administración oral mediante capsulas, como remedio contra la diabetes, cáncer, infertilidad femenina, úlceras difíciles de cicatrizar, úlcera gástrica y artritis. Así mismo se administra en infusión para lavar la cara con acné y los pies infectados con hongos. Para el dolor y la inflamación se recomienda su uso ya sea en cataplasma o en rebanadas frescas las cuales se colocan mediante vendas en los sitios con dolor e inflamación o con problemas de artritis.

Nuestros resultados indican que el extracto de acetato de etilo (EAE) de *I. sonora* administrado por vía ip presento un efecto dual, dependiendo de la dosis puede inducir hiper o hipoglucemia tanto en ratones normales como hiperglucémicos. Inclusive éste extracto a la dosis de 282 mg/kg vía ip provocó la muerte en el 50% de los animales de prueba.

Los daños observados en los órganos de los animales de prueba, tales como hipotrofia de páncreas e hipertrofia de suprarrenales, hemorragia en pulmones y el

hígado congestionado. De acuerdo a sus valores de DL₅₀, los EAE y EM son tóxicos. Sin embargo estos extractos fueron los que presentaron actividad hipoglucemiante.

El EM macerado previamente con hexano y acetato de etilo no mostró actividad, debido a que probablemente el o los compuesto con actividad fueron extraídos por el hexano y el acetato de etilo.

Un hecho muy significativo es que los EAE y EM mostraron actividades duales, lo que indudablemente indica que existen metabolitos secundarios con diferentes actividades dentro de éstos extractos.

Por otra parte, al igual que en investigaciones químicas previas de *I. sonorae* nosotros también aislamos varios triterpenos tipo cucurbitano conocidos como kinoínas [22]. Sin embargo, por primera vez informamos de la actividad hipoglucémica de la Kinoína A, así como del aislamiento y la elucidación estructural de una nueva Kinoína, la D, un compuesto aislado a partir del extracto de AcOEt de la raíz.

Es importante mencionar que partir de las fracciones eluidas con hexano:EtOAc se aislaron las kinoínas A y D compuestos de menor polaridad. La separación por columna cromatográfica del extracto de MeOH, nos mostró una evidente dificultad en la separación de los compuestos, debido a que dicho extracto de mayor polaridad contenía una mezcla compleja de glucósidos. Lo que nos permitió realizar reacciones de acetilación e hidrólisis, con el fin de facilitar la separación de los componentes de las mezclas complejas. La separación cromatográfica de las mezcla de reacción de la acetilación del extracto nos permitió separar la Kinoína C

Todos los extractos y compuestos aislados así como sus derivados se ensayaron para determinar sus propiedades antidiabéticas, anti-inflamatorias y de inhibición de la proliferación celular de líneas de cáncer humano.

Nuestros resultados demostraron que la Kinoína A en las dosis de 10 y 31 mg/kg disminuye la glucemia en ratones sanos, en ratones con diabetes moderada y leve con dosis de 31 mg a los 240 y a los 360 minutos, esto hallazgos muestran un

probable efecto de ésta cucurbitacina sobre las células β pancreáticas, para incrementar la producción de insulina o bien requiere de la presencia de esta para actuar. Por otra parte, la dosis de 31 mg/kg de Kinoína A presentó un efecto hipoglucémico en ratones con diabetes severa, es decir, organismos que carecen de páncreas y de células β productoras de insulina, éste efecto se observó a las 6 horas de tratamiento lo cual nos hace pensar en un efecto extra pancreático, probablemente en hígado, y por tanto con un mecanismo de acción diferente.

Esta dosis única de 31 mg/kg de Kinoína A causó la muerte del 50 % de organismos. Lo que nos permite concluir que el efecto antidiabético es producido por un metabolito altamente tóxico, que produce la muerte, causa esteatosis hepática, por lo cual consideramos que su margen de seguridad es muy estrecho.

Aunque los compuestos de tipo cucurbitacina llamados kinoínas se han aislado de *I. sonorensis*, la actividad hipoglucémica de esta especie se atribuyó a una mezcla de monoglicéridos y ácidos grasos [18]. Sin embargo, estudios anteriores han informado que los compuestos de tipo cucurbitacina, tales como cucurbitacina B y 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidro cucurbitacina F tienen actividad anti-hiperglucémica. Este último glucósido de cucurbitacina F provocó actividad anti-hiperglucémica significativa en dos experimentos diferentes sub-agudos a largo plazo. Tanto en animales que tenían diabetes como en animales que estaban desarrollando diabetes inducida por STZ.

En este experimento se utilizó una dosis baja de STZ que produjo una destrucción incompleta de β -células de páncreas. Teniendo en cuenta lo anterior los autores proponen que el posible efecto de éste compuesto aumentó la renovación de las células β o permitió la recuperación de células β parcialmente destruidas y por lo tanto estimula la secreción pancreática de insulina. Curiosamente, en un trabajo anterior los autores mostraron que el glucósido actúa sólo en animales diabéticos y no en ratas sanas [27].

Por otra parte, se ha informado de que la cucurbitacinas momordicine II y kuguaglycoside T aisladas de *M. charantia* indujeron secreción de insulina *in vitro*.

Si bien existen numerosos informes que apoyan tanto *in vitro* como en *in vivo* las propiedades anti - diabéticas de las cucurbitacinas, no se conoce con certeza el mecanismo de acción de estos triterpenos. Uno de ellos, como ya se ha mencionado, es la posible liberación de insulina por estos triterpenos. Otra es la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Muchos estudios sugirieron que la AMPK activa una variedad de procesos metabólicos, la mayoría de los cuales conducen a la reducción de almacenamiento de energía y al aumento de la producción de energía. Por lo tanto, la activación de AMPK se considera como una posible diana terapéutica para el tratamiento de trastornos metabólicos. Se ha informado que varias cucurbitacinas tienen actividad sobre AMPK. Por ejemplo los cucurbitacinas: mogrol , 3 - hydroxymogrol y 3 - hidroxí - 25 - deshidroxí - 24 - oxomogrol todos los aislados de *Siraitia grosvenorii* aumentaron la fosforilación de la AMPK [81]. Por otra parte, se ha informado de que 5 β , 19 - epoxi - 25 - metoxi - Cucurbita - 6 ,23 -dieno- 3 β ,1 - diol aislado de *M. charantia* posee múltiples funciones. Además de una actividad hipoglucémica en las células resistentes a la insulina y un activador de AMPK, esta cucurbitacina también muestra un efecto anti - inflamatorio [82]. En otro estudio de la misma especie se demostró que la cucurbitacinas momordicoside S, karaviloside XI, y sus agliconas tanto en miotubos L6 como en los adipocitos 3T3 - L1, estimulan la translocación de GLUT4 a partir de citosol a la membrana celular . Este efecto se asoció con un aumento en la actividad de la proteína quinasa activada por AMP [83].

Por otro lado, se sabe que en respuesta a la ingestión de alimentos, las células entero endocrinas de la mucosa intestinal liberan hormonas tales como GLP-1 que puede estimular la secreción de insulina del páncreas endocrino y de ese modo reducir la glucosa en sangre. En un informe reciente se indica que los cucurbitanos aislados de *M. charantia*, 19-nor-cucurbita-5 (10), 6,8,22 - (E), 24-pentaen-3 β -ol, y 5 β ,19-epoxycucurbita-6, 24-dien-3 β , 23 ξ -diol (E karavilagenine) estimula la secreción de GLP-1 [84].

Por otro lado, la kinoína D mostró una actividad anti-inflamatoria en un 41%, 16 α -20,25-trihidroxi-3 α -(2-O- α -L-rhamnopiranosil-D-glucopiranosilo)-10 α -cucurbit-5-en-11,22-diona, mostró actividad significativa en cáncer de colon, el extracto metanólico presentó actividad importante en cáncer de colon y pulmón

En resumen hay información bibliográfica que demuestra que diferentes cucurbitacinas tiene propiedades antidiabéticas, antiinflamatorias, y citotóxicas que apoyan nuestros hallazgos. Sin embargo, para aclarar los mecanismos por el que actuan las kinoisas aisladas se requiere de más estudios.

X. BIBLIOGRAFÍA.

1. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 2004, 27, S5-S10.
2. Standards of Medical Care in Diabetes-2012. Volume 35 (supplements 1): S11-S63.
3. World Health Organization Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. 2006.
4. Secretaria de Salud. Diabetes Mellitus, Diario Oficial, Segunda Sección, 2010, 3, 10-11.
5. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*. 2012 volume 35 (supplements 1): S64-S71.
6. Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes-2012. *Diabetes Care*. 2012 35:S4-S12.
7. International Diabetes Federation. 2011. IDF Diabetes Atlas, 5th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.
8. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico. Diabetes mellitus tipo 2. Primer trimestre-2013.
9. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, 2010. Informe 2010. Actividades y resultados. México, Distrito Federal.
10. Rodríguez Bolaños R.A., Reynales Shigematsu L.M., Jiménez Ruiz JA., Juárez Márquez S.A, Hernández Ávila M. Costos directos de atención médica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en México: análisis de micro costeo. *Rev. Panam. Salud Pública*. 2010; 28 (6); 412-20).
11. Federación Mexicana de Diabetes (FMD). Prevalencia y factores de riesgo de DM2. *Revista Diabetes Hoy*. Septiembre-octubre, 2010. 15-22. México D. F.
12. Linares, E. y Bye, R. 1995. Plantas medicinales de México: usos y remedios tradicionales. Segunda edición. Ed. Centro de Tecnología Electrónica e Informática (CETEI) y el Instituto de Biología de La Universidad Nacional Autónoma de México. (IB-UNAM). México, D.F. 155 pp.
13. Farnsworth NR, Marles RJ. 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*. 2: 137-189.

14. Brunton LL, Lazo JS y Parker KL. 2005. The Pharmacological Basis of Therapeutics/ Goodman E Gilman's. Mac Graw Hill. 11° edición. 2021 p.
15. Quintanilla C. Zuñiga S. El efecto incretina y su participación en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Med. Inst. Mex. Seg. Soc.* 2010; 48 (5): 509-520.
16. Grace Flock, Laurie L. Baggio, Christine Longuet, and Daniel J. Drucker Incretin Receptors for Glucagon-Like Peptide 1 and Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Are Essential for the Sustained Metabolic Actions of Vildagliptin in Mice. *Diabetes.* 2007(56): 3006-3013.
17. Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 99, 325–348.
18. Hernández-Galicia, E.; Calzada, F.; Roman-Ramos, R.; Alarcón-Aguilar, F. J. Monoglycerides fatty acids from *Ibervillea sonora* root: Isolation and hypoglycemic activity. *Planta Med.* 2007, 73, 236-240.
19. Ruíz-Bustos, E.; Velázquez, C.; Garibay-Escobar, A.; García, Z.; Plascencia-Jatomea, M.; Cortez- Rocha, M.O.; Hernández-Martínez, J.; Robles-Zepeda, R.E. Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *J. Med. Food.* 2009, 12, 1398-1402.
20. Rivera-Ramírez, F.; Escalona-Cardoso, G.N.; Garduño-Siciliano, L.; Galaviz-Hernández, C.; Paniagua-Castro, N. Antiobesity and Hypoglycaemic Effects of Aqueous Extract of *Ibervillea sonora* in Mice Fed a High-Fat Diet with Fructose. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 2011, doi:10.1155/2011/968984
21. Alarcón-Aguilar, F.; Calzada-Bermejo, E.; Hernández-Galicia, C.; Ruíz-Angeles, R.; Ramos, R. Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonora* root extracts-II *J. Ethnopharmacol.* 2005, 97, 447-452.
22. Achenbach, H.; Horn, K.; Dominguez, X.A.; Rombold, C.; Gómez-López, E.G. Cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides from *Ibervillea sonora*. *Phytochem.* 1993, 33, 437-445.
23. Schaefer, H.; Renner, S. S. Cucurbitaceae. In Flowering Plants Eudicots, The families and genera of vascular plants vol. 10, 2011, 112-174. Klaus Kubitzki The Families and Genera of Vascular Plants Flowering Plants. Eudicots Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae 10.1007/978-3-642-14397-7_10 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.

24. Andrade-Cetto, A., Helmut Wiedenfeld, Ma Cristina Revilla and Islas A. Sergio. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, 72 129–133.
25. Andrade-Cetto, A., and Helmut Wiedenfeld. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001, 78 145–149.
26. Andrade-Cetto, A., and Helmut Wiedenfeld. Hypoglycemic effect of *Acosmium panamense* bark on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004, 90 217–220.
27. Sol Cristians, José A. Guerrero-Analco, Araceli Pérez-Vásquez, Francisco Palacios-Espinosa, Carlos Ciangherotti, Robert Bye, and Rachel Mata. Hypoglycemic Activity of Extracts and Compounds from the Leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: Potential Alternatives to the Use of the Stem Bark of These Species. *J. Nat. Prod.* 2009, 408 72, 408–413.
28. Jaipaul Singh, Emmanuel Cumming, Gunasekar Manoharan, Huba Kalasz and Ernest Adeghate. Medicinal Chemistry of the Anti-Diabetic Effects of *Momordica Charantia*: Active Constituents and Modes of Actions. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, 2011, 5, (Supple 2-M2) 70-77].
29. Pérez RM, Cervantes H, Zavala MA, Sanchez J, Pérez S and Pérez C. Isolation and hypoglycemic activity of 5, 7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytomedicine*. 2000, 7: 25-29.
30. Pérez RM, Pérez C, Zavala MA, Pérez S, Hernández H and Lagunes F. Hypoglycemic effects of lactucin-8-O-methylacrylate of *Parmentiera edulis* fruit. *J. Ethnopharmacol.* 2000, 71: 391-394.
31. Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H, Revilla MC, Islas S. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2000, 72: 129-33.
32. Singh SN, Vats P, Suri S, Shyam R, Kumria MML, Ranganathan S, Sridharan K. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2001.76: 269-277.
33. Hammouda Y. Amer SM. Antidiabetic effect of tecomine and tecostanine. *J. Pharmaceu. Scien.* 1960. 55: 1452-1454.
34. Hammouda Y., R.A. Kader y A.M. Samir. Hipoglycemic proprieties of tecomine and tecostanine. *J. Pharm. Pharmacol.* 1964, 16: 833-834.

35. Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*. 1995, 2: 137-189.
36. Ali L, Azad-Khan AK, Rouf-Mamun MI, Mosihuzzaman M, Nahar N, Nur-e- Alam-M, Rokeya B. Studies on hypoglycemic effects of fruit pulp, seed, and whole plant of *Momordica charantia* on normal and diabetic model rats. *Planta Med*. 1993, 59: 408-412.
37. Tennekoon KH, Jeevathayaparan S, Angunawala P, Karunanayake EH, Jayasinghe KSA. Effect of *Momordica charantia* on key hepatic enzymes. *J. Ethnopharmacol*. 1994, 44: 93-97.
38. Sook Young Lee, Seok Hyun Eom, Yong Kyoung Kim, Nam Il Park and Sang Un Park, Review Cucurbitane-type triterpenoids in *Momordica charantia* Linn. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009 Vol. 3(13), pp. 1264-1269.
39. José Guerrero-Analco, Omar Medina-Campos, Fernando Brindis, Robert Bye, José Pedraza-Chaverri, Andrés Navarrete, Rachel Mata. Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry*. 2007. 68 2087–2095.
40. Anaya Lang A. L. 2003. Ecología Química. Primera Edición, Editorial Plaza y Valdéz. México. P. 36-75.
41. Marcanno D. y M. Hasegawa. 2002. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Colección Estudios. 2da Edición.p. 331-32.
42. Jian Chao Chen, Ming Hua Chiu, Rui Lin Nie, Geoffrey A. Cordell and Samuel X. Qiu. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structure and biological activities. *Nat. Prod. Rep*. 386-399. 2005.
43. Setzer, W. N., Setzer, M. C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Rev. Med. Chem*. 3(6): 540-556. 2003.
44. Yuan, G., Wahlqvist, M. L., He, G. Yang, M., Li, D. Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac. J. Clin. Nutr*. 2006, 15, 143-152.
45. Connolly, J. D.; Hill, R. A. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep*. 2008, 25, 794–830. 46.
46. M. Miró. Cucurbitacins and their pharmacological effects. *Phytotherapy Research*. 1995, 9, 13, 159-168.
47. Kearns, M. D. The genus *Ibervillea* (Cucurbitaceae): an enumeration of the species and two new combinations. *Madroño*. 1994; 41 (1): 13-22.

48. Lira, S.R. & D.M. Kearns. A. New Species of *Ibervillea* (Cucurbitaceae) from Western México. *Sida*. 1990; 14 (2): 223-226.
49. Lira, S., R. y A. Casas. Uso y manejo de *Ibervillea millspaughii* (Cogn.) C. Jeffrey, *Melothria pendula* L. Y otras especies silvestres de la familia Cucurbitaceae: Posibles procesos de domesticación incipientes. *Bol. Soc. Bot. México*. 1998; 62:77-89.
50. Lira, S.R. 2007. Comunicación personal.
51. Watson, S. 1889. Contributions to American Botany. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*. 24:51.
52. Emerson, J. and W. Welker. Some notes on the chemical composition and toxicity of *Ibervillea sonorae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1908; (4):339-50.
53. López R. 1994. Flora medicinal Yaqui del Valle del Yaqui, Sonora. En: Aguilar A., Argueta A. y Cano L. (Coord.). Flora Medicinal Indígena de México. Tomo I. Editorial Instituto Nacional Indigenista. México, D.F. p. 281; 304.
54. Felger, R. and M. Beck Moser, 1985. People of the Desert and Sea Ethnobotany of the seri Indians. The University of Arizona. Press. Tucson, Arizona. pp. 290.
55. Xolalpa-Molina S. 1994. Flora Medicinal Mayo de la región del Fuerte y Choix, Sinaloa. En: Aguilar A., Argueta A. y Cano L. (Coord.). Flora Medicinal Indígena de México. Tomo 1. Editorial Instituto Nacional Indigenista. México, D. F. p. 410-11.
56. Pfefferkorn, I. 1795. Descripción de la provincia de Sonora. Libro Primero. Traducción de Hopkins A. (1986). Gobierno del estado de Sonora. p. 78.
57. Molina, M., 1989. Diccionario de la Flora y Fauna Indígena de Sonora. Instituto Sonorense de Cultura. Gobierno del estado de Sonora. p. 37.
58. Alarcón-Aguilar, E. Campos, S. Xolalpa and Hernández R. Hipoglycemic Activity of *Ibervillea sonorae* roots in healthy and diabetic mice and rat. *Pharmaceutical Biology* 2002; 40 (8): 570-75.
59. Weckert, E., K. Hummer, X.A. Dominguez, K Horn and H. Achenbach. 1993. The absolute configuration of Kinoin C. *Phytochemistry*. 1993; 33 (2). 447-48.
60. Dunn, J. S, J. Kirkpatrick, N. G. B. McLetchie, and S. V. Telfers. 1943. Necrosis of the islets of Langerhans produced experimentally. *J. Pathol. Bacteriol.* 55:245.
61. Dunn, J. S., H. L. Sheehan, and N. G. B. McLetchie. 1943. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet I*: 484.

62. Lazarow, J. and S. L. Palay. 1946. The production and course of alloxan diabetes in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 31: 1004.
63. Hernández-Xolocotzi E., 1985. Exploración etnobotánica y su metodología. *Revista Geográfica Agrícola Xolocotzia*, 1: 163-188.
64. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 1984. México; Distrito Federal.
65. García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen para adaptarlo a las condiciones de la República mexicana. México, D.F. UNAM.
66. Alexiades, N. M. 1996. Selected Guidelines Ethnobotanical Research: A Field Manual. The New York Botanical Garden, Bronx, New York, USA. pp. 5-169.
67. Cotton, C. M. 1996. Ethnobotany. Principles and Applications. John Wiley & Sons, New York. USA. 90-126; 171-197.
68. Gaviño de la Torre G., C. Juárez López y H. Figueroa Tapia. 1979. Técnicas Biológicas selectas de laboratorio y de campo. Editorial Trillas, México, D.F. pp. 112-19.
69. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial, 2001, México, D.F.
70. National Institute of Health, National Academy of Sciences. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eighth Edition. The National Academic Press, Washington, USA. pp 220.
71. Primer para Windows McGraw- Hill, 2006.
72. Versión 8.0 de ORIGIN, 2009 Northampton, USA
73. Jardón-Delgado A., A. N. García-Argáez, J. L. Figueroa Espitia, G. Fernández Saavedra, C. Céspedes Cortés, J. L. Figueroa-Hernández y M. Martínez Vázquez. 2007. Determinación de la toxicidad aguda del extracto metanólico de *Ibervillea sonora* (Watson) Greene, y evaluación histopatológica. 4ª Reunión Nacional de Investigación en Productos Naturales Del 16 al 18 de Mayo del 2007 en Monterrey Nuevo León.
74. Jardón-Delgado A., A. N. García Argáez, J.L. Figueroa Espitia, G. Fernández Saavedra, C. Céspedes Cortés, J. L. Figueroa-Hernández y M. Martínez Vázquez. 2007. Determinación de la toxicidad aguda del extracto acuoso de *Ibervillea sonora*

(Watson) Greene, y evaluación histopatológica. 4ª Reunión Nacional de Investigación en Productos Naturales Del 16 al 18 de Mayo del 2007 en Monterrey Nuevo León.

75. Litchfield, J.T. and F. Wilcoxon. A simplified method of evaluating dose- effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 1949; 96: 99-113.

76. Stahl E. 1969. Thin-Layer chromatography, A Laboratory Handbook. Seg.edicion. Springer-Verla. New York. 861-874.

77.-García-Argáez, A. N., Ramírez, A. M. T., Parra Delgado, H., Velásquez, G., Martínez-Vázquez, M. 2000. Antiinflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. *Planta Medica.* 66. 279-281.

78.- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paul, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 38.757-766.

79.- Oviedo-Chávez, I., Ramírez, M. T., Martínez-Vázquez M. 2005. Citotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 57. 1087-91.

80. Loomis, Ted A. 1982. Fundamentos de toxicología. Editorial Acribia, Zaragoza, España. p. 274.1.

81. Chen, X.B.; Zhuang, J.J.; Liu, J.H.; Lei, M.; Ma, L; Xu Shen, J.C.; Hu, L.H. Potential AMPK activators of cucurbitane triterpenoids from *Siraitia grosvenorii* Swingle. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 5776–5781.

82. Cheng, H.L.; Ching, Y.; Liao, Y.W.; Lin, C.C. EMCD, a hypoglycemic triterpene isolated from *Momordica charantia* wild variant, attenuates TNF- α -induced inflammation in FL83B cells in an AMP-activated protein kinase-independent manner. *Eur. J. Pharmacol.* 2012, 689, 241–248.

83. Tan, M. J.; Ye, J. M.; Turner, N.; Hohnen-Behrens, C.; Ke, C. Q.; Tang, C. P.; Chen, T.; Weiss, H. C.; Gesing E. R.; Rowland, A.; James, D. E.; Ye, Y. Antidiabetic Activities of Triterpenoids Isolated from Bitter Melon Associated with Activation of the AMPK Pathway. *Chem. Biol.* 2008, 15, 263–273.

84. Huang, T.; Lu, K. N.; Pai, Y Ping Chin Hsu, Huang, C. J. Role of GLP-1 in the Hypoglycemic Effects of Wild Bitter Gourd. *J. Evidence-Based Complementary Altern. Med.*, 2013, Article ID625892.

XI. LISTA DE ANEXOS

Anexo 1

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.

Angel Jardón-Delgado, Gil Alfonso Magos-Guerrero and Mariano Martínez-Vázquez
."Isolation of a new anti-inflammatory 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27-
octanorcucurbitacin-type triterpene from *Ibervillea sonora*" *Natural Product
Communications* Vol. 9 (1) 2014: 15-16.

Isolation of a New Anti-inflammatory 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27-Octanorcucurbitacin-type Triterpene from *Ibervillea sonora*Angel Jardón-Delgado^a, Gil Alfonso Magos-Guerrero^b and Mariano Martínez-Vázquez^{a*}^aInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, C. Exterior, C. Universitaria, Coyoacán 04510, México, DF, México^bFacultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, C. Escolar, C. Universitaria, Coyoacán 04510, México, DF, México

marva@unam.mx

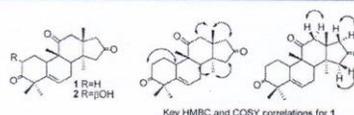
Received: September 18th, 2013; Accepted: October 21st, 2013

A new cucurbitane-type triterpene, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27-octanorcucurbita-5-ene-3, 11, 16-trione (**1**), named kinoin D, was isolated from the roots of the medicinal plant *Ibervillea sonora*, (werekue). The structure of **1** was established on the basis of extensive NMR and MS studies. In addition, the known kinoin B (**3**) and C (**5**) were isolated, as were 16 α -20,25-trihydroxy-3 α -(2-*O*- α -L-rhamnopyranosyl)-D-glucopyranosyloxy)-(10 α)-cucurbit-5-ene-11,22-dione (**6**), (22S)-16 α ,22-diacetoxy-20,25-dihydroxy-3 α -[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl)- β -glucopyranosyl]-(10 α)-cucurbita-5,23-dien-11-one (**7**) and 16 α -acetoxy-20,25-dihydroxy-3 α -[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]-(10 α)-cucurbita-5-ene-11,22-dione (**8**). Compound **1** exhibited anti-inflammatory activity in TPA-induced edema in mice.

Keywords: *Ibervillea sonora*, Anti-inflammatory activity, Cucurbitane.

Over 306 plant species have been used as hypoglycemic remedies in Mexican traditional medicine [1a]. One of these is *Ibervillea sonora*, colloquially known as "Werekue," which is widely recommended in folk medicine as a hypoglycemic [1b], antibiotic [2], anti-obesity [3a] and anti-rheumatic agent. Previous pharmacological studies with *I. sonora* revealed antiviral, antifungal [2] and hypoglycemic effects [3a], and a prior chemical investigation resulted in the isolation and identification of several cucurbitane-type triterpenes known as kinoin [3b]. As part of our systematic study of anti-inflammatory compounds from natural sources [3c], this paper reports the isolation and structural elucidation of a new octanorcucurbitane (**1**), named kinoin D, from *I. sonora* roots.

Column chromatography of the EtOAc extract of the roots of *I. sonora* gave 35 mg of **1** whose molecular formula was assigned as C₂₂H₃₁O₃ based on the molecular ion at *m/z* 343.2267 (Calcd 343.2273) in the FAB⁺ MS. The ¹H NMR spectrum of **1** had five methyl singlets at δ_{H} 1.03 (3H, s), 1.17 (3H, s), 1.24 (3H, s), 1.25 (3H, s) and 1.29 (3H, s), and three pairs of AB doublets at δ_{H} 2.01 (1 H, d, *J*=18 Hz) and 2.56 (1 H, d, *J*=18 Hz), δ_{H} 2.39 (1 H, d, *J*=14.7 Hz) and 3.18 (1 H, d, *J*=15 Hz) and δ_{H} 2.08 (1 H, d, *J*=17.1 Hz) and 2.25 (1 H, d, *J*=17.1 Hz), which correlate with the CH₂ groups at 49.2, 45.1 and 50.1 ppm, respectively, by HETCOR. A vinylic proton at δ_{H} 5.79 (1H, dt, *J* = 5.6, 2.2 Hz) was also observed. The ¹³C NMR spectrum of **1** (Table 1) revealed 22 carbon signals. The assignment of all hydrogen atoms was achieved by HETCOR and COSY experiments. Since the tetracyclic triterpenoids isolated thus far from the genus *Ibervillea* are cucurbitane-type compounds, **1** was tentatively proposed to have a basic skeleton of 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27-octanorcucurbitacin. Comparison of the NMR data of **1** with those of endecaphyllacin A (**2**) from *Hemsleya endecaphylla* [4a], indicated that these two compounds are structurally very similar in rings A-C. A detailed comparison of the ¹³C NMR data of these compounds disclosed that a methine group (C-2) at δ_{C} 72.3 in **2** was replaced by a methylene group at δ_{C} 24.2 in **1**. The HMBC correlation from H-2a and H-2b

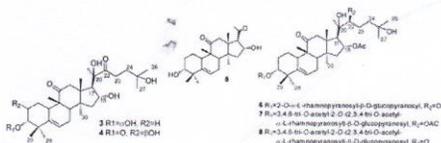
**Table 1:** NMR spectroscopic data for **1**.

No.	δ_{C}	δ_{H}	No.	δ_{C}	δ_{H}
1	37.8 CH ₂	2.52, 2.42 m	12	45.1 CH ₂	2.39 d (14.7), 3.18 d (14.7)
2	24.2 CH ₂	1.94, 1.54 m	13	44.3 qC	
3	213.1 qC		14	45.0 qC	
4	51.0 qC		15	50.1 CH ₂	2.08 d (17.1), 2.25 d (17.1)
5	140.9 qC		16	216.0 qC	
6	119.1 CH	5.78 br s	17	49.2 CH ₂	2.01 d (18), 2.56 d (18)
7	24.8 CH ₂	2.49 m, 1.98 m	18	24.3 CH ₂	1.03 s
8	42.9 CH	2.21 br s	19	19.7 CH ₃	1.17 s
9	50.4 qC		28	22.7 CH ₃	1.29 s
10	36.2 CH	2.62 m	29	28.5 CH ₃	1.25 s
11	211.1 qC		30	19.1 CH ₃	1.24 s

(δ_{H} 1.94, 1.54) to C-10 (δ_{C} 36.2, CH) confirms this proposal. Therefore, **2** has an alcohol group at C-2 that is missing in **1**. This is reflected in the presence of an additional oxygen atom in **2**. Thus, compound **1** was established as 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27-octanorcucurbita-5-ene-3, 11, 16-trione, and named kinoin D.

In addition to kinoin D (**1**) in *I. sonora* and endecaphyllacin A (**2**) in *H. endecaphylla*, these species also synthesize other structurally similar products, such kinoin B (**3**) [3b] (3 α ,16 α ,20,25-tetrahydroxy-(10 α)-cucurbit-5-ene-11,22-dione) in *I. sonora* and 23,24-dihydrocucurbitacin D (**4**) (2 β ,16 α ,20,25-tetrahydroxy-(10 α)-cucurbit-5-ene-3,11,22-trione) in *H. endecaphylla* [4a]. However, the phylogenetic relationship of the genera *Ibervillea* (fam. Cucurbitaceae, subfam. Cucurbitoidae, tribe Coniandreae) and *Hemsleya* (fam. Cucurbitaceae, subfam. Nhandroboideae, tribe Zanoinieae, subtribe Gomphogyninae) is quite distant [4b].

Kinoin C (**5**) was isolated from the fractions eluted with *n*-hexane: EtOAc (2:1), and kinoin B (**3**) from the fractions eluted with *n*-hexane: EtOAc (1 : 1), as previously reported [3b].



Although chromatography of the MeOH extract led to the isolation of glycoside **6**, a portion was acetylated to facilitate the separation of the components of the mixture. Chromatography of the acetylation reaction mixture led to the isolation of **7** and **8**, both previously isolated from *I. sonorae* [3b]. All of the isolated compounds and their derivatives were tested for their anti-inflammatory properties against TPA-induced edema in the mouse ear. However, only **1** showed activity (41% at a dose of 1 mg/ear).

Experimental

General: Melting points, Fisher Johns apparatus; UV, Shimadzu U 160 model; IR, Nicolet FT-IR5-SX spectrophotometer; NMR, Varian-Unity 300, Varian-Inova 500 spectrometer; EI-MS and HRMS, Jeol AH505HR mass spectrometer. Vacuum column chromatography (VCC) and TLC, silica gel 60 F254 (Merck 1.05554). The spots were observed under ultraviolet (UV) light at 366 and 254 nm, and the TLC plate was then sprayed with cerium sulfate tetrahydrate (1%) in sulfuric acid solution.

Plant material: *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Green was collected by locals from El Ejido Cumuripa-Porvenir, Sonora, México. The specimens were identified by Dr Rafael Lira Saade and deposited at the Herbario de La Facultad de Ciencias UNAM FCME-104682 FCME-110481 and the Instituto de Biología UNAM MEXU-1209152, MEXU-1209153.

Extraction: Dried and ground roots (650 g) were extracted with *n*-hexane, ethyl acetate and MeOH successively at room temperature, 3 times for 48 h each. Evaporation of the solvents under low pressure afforded the respective extracts: *n*-hexane 8.15 g (1.25%), ethyl acetate 8.67 g (1.33%) and 32 g methanol (4.9%).

Isolation of kinoin D (1), kinoin B (3) and kinoin C (5): The EtOAc extract was dissolved in methanol and absorbed into 10 g of silica gel and the solvent evaporated at room temperature. The resulting dried mixture was put on a column, packed with 130 g of silica gel and eluted with *n*-hexane and mixtures of *n*-hexane-EtOAc and EtOAc-MeOH of increasing polarity. A total of 198 fractions of 200 mL each were obtained. From the fractions eluted

with *n*-hexane:EtOAc (7:3) a solid mixture was isolated which was chromatographed with *n*-hexane:EtOAc (1:9) to give a solid which was crystallized from *n*-hexane:EtOAc yielding 35 mg of **1**. From the fractions eluted with *n*-hexane:EtOAc (2:1) kinoin C (**5**) was isolated, while from the fractions eluted with *n*-hexane:EtOAc (1:1) kinoin B (**3**) was isolated, as previously reported [3b].

The methanol extract (20 g) was treated with 1 L of ethyl acetate for 72 h at r. t. The insoluble portion (1.84 g) was chromatographed on silica with CH₂Cl₂ to yield 9 x 250 mL fractions. Fraction 2 was chromatographed with CH₂Cl₂:MeOH (4:0.3) to give 32 x 100 mL fractions. Fraction 16 gave 33.5 mg of **6**, previously isolated from *I. sonorae* [3b].

A 1.12 g portion of the MeOH extract was treated with acetic anhydride and pyridine at 40°C for 4 h. The reaction mixture was diluted with water and extracted with 3 x 20 mL EtOAc. The organic phase was washed consecutively with 10% HCl and water until the pH = 7, dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvent removed under reduced pressure to afford 1.02 g of a solid, which was chromatographed on silica with *n*-hexane:EtOAc (1:1) to give 23 mg of **8** and with *n*-hexane:EtOAc (1:2) to give 31 mg of **7**. The identities of **7** and **8** were determined by comparison of their IR and ¹H NMR spectral data with those reported in the literature [3b].

TPA-induced edema model: Evaluation of anti-inflammatory effects of compounds **1**, **3**, **5-8** was performed according to the TPA-induced ear edema mice test previously described [4c].

Kinoin D, (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27-octanorcurbita-5-ene-3, 11, 16-trione) (1).

MP: 126-128°C.

[α]_D²⁰: +13.9 (c 2.3, CHCl₃).

IR (KBr) ν_{max}: 3490, 1715, 1690 cm⁻¹

¹H NMR and ¹³C NMR (CDCl₃): Table 1.

FAB⁺: *m/z* 343.2267 (calcd for C₂₅H₃₁O₈, 343.2273 [M]⁺).

EI-MS (70 eV) *m/z* (rel. int.): 342 [M]⁺, (80), 327 (93), 299 (90), 193 (70), 91 (85), 55 (100%).

Supplementary data: The ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, HETCOR, COSY and HMBC spectra of **1**.

Acknowledgments – AJD thanks CONACYT and Posgrado en Biología UNAM for a scholarship for his Ph D studies. We thank Elizabeth Huerta-Salazar, Maria de los Angeles Peña-Gonzalez, Maria del Rocio Patiño-Maya, Antonio Nieto-Camacho, Francisco J. Pérez-Flores and Luis Velasco-Ibarra for technical assistance.

References

- [1] (a) Andrade-Cetto A, Heinrich M. (2005) Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, **99**, 325-348; (b) Hernández-Galicia E, Calzada F, Roman-Ramos R, Alarcón-Aguilar FJ. (2007) Monoglyceride fatty acids from *Ibervillea sonorae* root: Isolation and hypoglycemic activity. *Planta Medica*, **73**, 236-240.
- [3] Ruiz-Bustos E, Velázquez C, Garibay-Escobar A, García Z, Plascencia-Jatomea M, Cortez-Rocha MO, Hernández-Martínez J, Robles-Zepeda RE. (2009) Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *Journal of Medicinal Food*, **12**, 1398-1402.
- [4] (a) Rivera-Ramírez F, Escalona-Cardoso GN, Garduño-Siciliano L, Galaviz-Hernández C, Paniagua-Castro N. (2011) Antiobesity and hypoglycemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonorae* in mice fed a high-fat diet with fructose. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, online computer file, doi:10.1155/2011/968984; (b) Achenbach H, Horn K, Dominguez XA, Rombold C, Gomez-Lopez EG. (1993) Cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides from *Ibervillea sonorae*. *Phytochemistry*, **33**, 437-445; (c) Flores-Rosete G, Martínez-Vázquez M. (2008) Anti-inflammatory and cytotoxic cycloartanes from guayule (*Parthenium argentatum*). *Natural Product Communications*, **3**, 413-422.
- [5] (a) Chen JC, Zhang GH, Zhang ZQ, Qiu MH, Zheng YT, Yang LM. (2008) Octanorcurbitane and cucurbitane triterpenoids from the tubers of *Hemslaya endocaphylla* with HIV-1 inhibitory activity. *Journal of Natural Products*, **71**, 153-155; (b) Koeyan A, Zhang LB, Shaefer H, Renner SS. (2007) A multi-locus chloroplast phylogeny for the Cucurbitaceae and its implications for character evolution and classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**, 553-577; (c) Salazar JR, Martínez-Vázquez M, Céspedes CL, Ramírez-Apan T, Nieto-Camacho A, Rodríguez-Silverio J, Flores-Murrieta F. (2011) Anti-inflammatory and cytotoxic activities of chichipegenin, peniocerol and maddockgallin isolated from *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Con. *Zeitschrift für Naturforschung*, **66c**, 24-30.

TRABAJOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

1er CONGRESO INTERNACIONAL CIENCIA E INNOVACIÓN EN DIABETES, CICID 2012. México, D.F. Facultad de Medicina, UNAM. 4-6 de septiembre.

Título: “Toxicidad aguda y subaguda de un Cucurbitano aislado de *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene en ratones CD-1 sanos”.

Autores: A. Jardón Delgado, Miguel Angel Contreras, Gil Alfonso Magos Guerrero y Mariano Martínez Vázquez.

Presentación Poster

LIV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, 2011. León, Guanajuato, México. 10-14 de septiembre

Título: “Toxicidad Hepática de la raíz de *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene en ratones normo e hiperglucémicos.

Autores: **Jardón-Delgado A**, Contreras Barrios MA, Martínez Vázquez M., Magos Guerrero GA.

Presentación oral

INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACOLOGY MEXICO 2011. May 16th 20th at the PALACE OF THE SCHOOL OF MEDICINE, MEXICO CITY.

Título: “Bioactivity-guide isolation of hypoglycemic constituents of *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene roots collected in Cumuripa-Porvenir, Sonora, México”.

Autores: **Angel Jardón Delgado** Mariano Martínez Vázquez and Gil Alfonso Magos Guerrero.

Presentación Poster

SIMPOSIO, INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE PLANTAS MEDICINALES POTENCIALMENTE ÚTILES EN TERAPÉUTICA, 25-26 DE OCTUBRE DEL 2010. FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

Título: “Actividad antidiabética de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene, Güereque”.

Autores: Angel Jardón Delgado.

Presentación oral.

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, 26 de mayo del 2010, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

Título: “Estudio Etnobotánico, Químico y Farmacológico del Efecto Antidiabético de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene (Güereque).

Autores: Angel Jardon Delgado.

Presentación oral.

CONGRESO NACIONAL DE FARMACOLOGIA, OAXTEPEC MORELOS, 14-17 de junio del 2009.

Título: “Efecto hipo e hiperglucemiante del extracto de acetato de etilo de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene en ratones CD-1 sanos”.

Autores: Angel Jardón Delgado, Mariano, Martínez Vázquez y Gil Alfonso Magos Guerrero.

Presentación Poster

Simposio Interno 2008, Instituto de Química, UNAM. México, D.F.

Título: “Estudio químico y evaluación de las actividades hipoglucemiante, antiinflamatoria y de toxicidad del güereque *Ibervillea sonora* (S Watson) Greene.”

Autores: Angel Jardón Delgado, Aída N. García Argáez, José Luis Figueroa-Hernández y Mariano Martínez Vázquez.

Presentación Poster

4ta Reunión Nacional de Investigación en productos naturales, Monterrey, México, 16-18 de mayo del 2007.

Título: “Determinación de la toxicidad aguda y evaluación histopatológica de un extracto metanólico de *Ibervillea sonora* (Watson) Greene.”

Autores: Angel Jardón Delgado, Aída N. García Argáez, José Luis Figueroa Espitia, Gabriela Fernández Saavedra, Humberto Cruz Ortiz, José Luis Figueroa-Hernández y Mariano Martínez Vázquez.

Presentación Poster.

Revista Latinoamericana de Química Suplemento especial.

4ta Reunión Nacional de Investigación en productos naturales, Monterrey, México, 16-18 de mayo del 2007.

Título: “Determinación de la toxicidad aguda y evaluación histopatológica de un extracto acuoso de *Ibervillea sonora* (Watson) Greene.”

Angel Jardón Delgado, Aída N. García Argáez, José Luis Figueroa Espitia, Gabriela Fernández Saavedra, Humberto Cruz Ortiz, José Luis Figueroa-Hernández y Mariano Martínez Vázquez.

Presentación Poster

Revista Latinoamericana de Química Suplemento especial.

CÁNCER

OTRAS ENFERMEDADES
QUE CONOZCA

WEREQUE

MÚSARO

QUE OTROS NOMBRES RECIBE

DESCRIBALO BREVEMENTE

COMO LO PREPARAN

CANTIDAD

MODO DE USO

PARA QUE ENFERMEDADES
SE UTILIZA

ÉPOCA DE FLORACIÓN

ÉPOCA DEL AÑO EN QUE SE
COLECTA

LUGARES EN QUE SE COLECTA

RECOMENDACIONES ESPECIALES
PARA USARLO