



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Actividades Hipoglucemiante, Antioxidante y Antiglicación de  
Hojas y Endófitos de *Piper auritum*.**

Tesis que presenta:  
**Adriana Maria Neira González**

Para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directores de Tesis:  
**Dr. Luis Bernardo Flores Cotera  
Dra. Rosa Martha Pérez Gutiérrez**

**México, D. F.**

**Junio, 2015**

---

---

## *DEDICADO A*

*Agradezco especialmente a Dios por su sabiduría y guía espiritual en este camino.*

*A mis padres María Luisa González y Pedro Antonio Neira por su amor, comprensión, apoyo, por ser mi inspiración y a quienes les debo lo que soy.*

*A mis hermanos Laura, David y Mauricio por su cariño, apoyo y ayuda incondicional.*

*A mis familiares mis tías, Rosario, Flor y primas Luz Marina, mi abuelita por su amor y ayuda incondicional.*

*A mis amigos Berenice, Karina, Andrea, Yuli todos aquellos que a través de su colaboración y voz de aliento hicieron de este proyecto y de esta etapa de mi vida una experiencia fructífera.*

**ADRIANA**

---

---

## AGRADECIMIENTOS

*Deseo expresar mi agradecimiento a todos a aquellos que estuvieron involucrados directa e indirecta en el desarrollo de esta investigación.*

- *A DIOS, por haberme dado fortaleza para seguir adelante para ver plasmado hoy y hecho realidad esta Investigación.*
- *Al director de la tesis Dr. Luis Bernardo Flores Cotera por su apoyo, confianza y por su voz de aliento para seguir con este proyecto, por compartir sus conocimientos.*
- *A la directora de la Tesis, Dra. Rosa Martha Pérez Gutiérrez, por compartir sus conocimientos, que han sido imprescindibles para la realización y la culminación exitosa de este trabajo.*
- *Al CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, CINVESTAV. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, me brindaron la oportunidad de mi formación y llegar a la culminación del presente trabajo.*
- *Así mismo deseo agradecer a los Doctores Rodolfo Marsch, Frédéric Thalasso Siret, Ricardo Aguilar López, Efrén Venancio García Báez por su asesoría y apoyo para la corrección del presente trabajo.*
- *Al Dr. Carlos Hoyo por su valiosa colaboración, asesoría en temas relacionados a la tesis, apoyo y por confiar en mí.*
- *Al Dr. Carlos Cerda, por su asesoría para el análisis de los espectros de RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H e identificación de la molécula obtenida.*
- *Al Dr. Jaime Ortega por su colaboración en el préstamo del equipo (fluorómetro).*
- *A la Dra. Giovana Granados por su valiosa colaboración y asesoría en la purificación del compuesto por HPLC- Semipreparativo.*
- *Al auxiliar de investigación Fernando Maldonado García por su amistad, apoyo, colaboración y asesoría en el aislamiento y cultivo de los Endófitos.*
- *A mi compañera y amiga estudiante de Doctorado Karina Gutiérrez por su valiosa colaboración, asesoría y apoyo para la identificación de las cepas.*
- *Al auxiliar de investigación Geiser Cuellar Rivera por su colaboración en la toma de los espectros de masas, su ayuda fue muy valiosa en los resultados obtenidos.*

- 
- 
- *A Asis. Vania Yamile Muñoz Macías, por su colaboración y asesoría.*
  - *Al auxiliar de investigación Q.F.B. Yolanda Mora Pérez por su colaboración en la toma de los de los espectros de RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H.*
  - *Al auxiliar de investigación Verónica Reyes Olivares por su colaboración en la asesoría en técnicas de laboratorio y en la toma de los espectros de IR.*
  - *Al auxiliar de investigación Q.F.B Nadia Azucena Pérez por su colaboración en la toma de los espectros de masas (GS-MS)*
  - *Al auxiliar de investigación Q.F.B. Elvia Celina Alvarez Cisneros por su colaboración en la toma de los de los espectros de RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H.*
  - *Al auxiliar de investigación Claudia Ivonne Flores Pucheta por su colaboración y asesoría de manejo del equipo (fluorómetro).*
  - *Al auxiliar de investigación Lic. Rosa Elena Flores Beltrán por su colaboración en la asesoría en técnicas de laboratorio. Laboratorio 15 Farmacología.*
  - *Al auxiliar de investigación Lic. Flor María Galván Rodríguez por su colaboración en la asesoría en técnicas de laboratorio (farmacología).*
  - *A CONACYT por el apoyo económico.*
  - *A los Estudiantes de licenciatura Marisela Jiménez Cárdenas y Javier Ayala Manriquez por su colaboración en el obtención de los extractos y purificación de los mismos de las bacterias 11-1 y 3a -1, respectivamente.*
  - *Al M. en C Zoila Mora Guzmán por su colaboración en la recolección de la planta P. auritum.*
  - *A mis compañeros de laboratorio de investigación por su colaboración.*
  - *A mis amigos Berenice, Andrea, Juli, Diego, Lilian, Liliana, Dra. Martha Ramírez, por su amistad y colaboración.*
  - *A Mis padres, mis tíos, primos por su apoyo incondicional, y a todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible la culminación de este trabajo.*

---



---

|       |   |           |
|-------|---|-----------|
|       | INDICE GENERAL.....   | i         |
|       | INDICE DE FIGURAS.....  | vi        |
|       | INDICE DE TABLAS.....   | ix        |
|       | INDICE DE ANEXOS.....   | x         |
|       | RESUMEN.....  | 1         |
|       | ABSTRAC.....  | 2         |
|       | <b>CAPITULO I. ANTECEDENTES.....</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1   | Diabetes.....   | 3         |
| 1.2   | Control de la diabetes.....   | 4         |
| 1.2.1 | Tratamiento de la diabetes.....   | 4         |
| 1.2.2 | Estudios de plantas en el tratamiento de la diabetes.....   | 5         |
| 1.3   | Efecto de hiperglicemia y el estrés oxidativo en la formación (AGEs) .....                            | 6         |
| 1.4   | Inhibición de la glicación no enzimática de las proteínas.....  | 9         |
| 1.5   | <i>Piper auritum</i> . .....  | 10        |
| 1.5.1 | Clasificación taxonómica de <i>Piper auritum</i> .....  | 10        |
| 1.5.2 | Generalidades.....  | 10        |
| 1.5.3 | Etnobotánica.....   | 12        |
| 1.5.4 | Fitoquímica y actividad biológica.....  | 12        |
| 1.6   | Endófitos fuente alternativa de metabolitos secundarios, para el control de la formación de AGEs..... | 13        |
|       | <b>CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN.....</b>  | <b>15</b> |
|       | <b>CAPÍTULO III. HIPÓTESIS.....</b>   | <b>16</b> |
| 3.1   | Objetivos.....  | 16        |
| 3.1.1 | Objetivo generales.....   | 16        |
| 3.1.2 | Objetivos específicos.....  | 16        |
|       | <b>CAPITULO IV MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>17</b> |

---



---

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 4.1          | Desarrollo experimental.....   | 17        |
| 4.2          | Materiales.....  | 18        |
| 4.2.1        | Materias primas.....   | 18        |
| 4.2.2        | Reactivos.....   | 18        |
| 4.2.3        | Equipos.....   | 19        |
| 4.3          | Métodos.....   | 20        |
| 4.3.1        | Obtención de los extractos de la planta.....   | 20        |
| 4.3.2        | Inhibición de la formación de (AGEs) <i>in vitro</i> .....   | 21        |
| <b>4.3.3</b> | <b>Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>.....</b>   | <b>22</b> |
| 4.3.3.1      | Contenido total de fenoles.....  | 22        |
| 4.3.3.2      | Actividad antioxidante por decoloración de $\beta$ -caroteno en placa....  | 22        |
| 4.3.3.3      | Atrapamiento de los radicales libres DPPH.....   | 22        |
| 4.3.3.4      | Ensayo de la actividad de barrido del radical ABTS <sup>+</sup> .....  | 23        |
| 4.3.3.5      | Actividad antioxidante de HS por el ensayo ORAC.....   | 24        |
| 4.3.3.6      | Capacidad quelante del HS.....   | 24        |
| 4.3.3.7      | Actividad del HS para atrapar el óxido nítrico.....  | 25        |
| 4.3.3.8      | Método de decoloración del $\beta$ -Caroteno.....  | 25        |
| 4.3.3.9      | Ensayo de tiocianato.....  | 26        |
| 4.3.3.10     | La actividad antioxidante por atrapamiento del anión superóxido  | 26        |
| <b>4.3.4</b> | <b>Actividad hipoglucemiante de los extractos de <i>P. auritum</i>.....</b>  | <b>27</b> |
| 4.3.4.1      | Animales.....  | 27        |
| 4.3.4.2      | Estudios de toxicidad aguda.....   | 28        |
| 4.3.4.3      | Ratas diabéticas.....  | 28        |
| 4.3.4.4      | Diseño experimental.....   | 29        |
| 4.3.4.5      | Peso corporal.....   | 30        |
| 4.3.4.6      | Prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratas por el HS.....   | 30        |
| 4.3.4.7      | Ensayo de contenido de glucógeno en el hígado y el músculo<br>esquelético y las actividades de (G6Pase), (GK) y (HK).....    | 30        |
| 4.3.4.8      | Las mediciones de Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT),<br>Glutación Reductasa (GRd) y Glutación Peroxidasa (GPx)..... | 32        |
| 4.3.4.9      | Estimación de la glicación de la hemoglobina.....  | 32        |
| <b>4.3.5</b> | <b>Efecto del HS en el páncreas.....</b>   | <b>33</b> |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 4.3.5.1      | Diseño Experimental.....   | 33        |
| 4.3.5.2      | Determinación de la insulina.....  | 33        |
| 4.3.5.3      | La peroxidación lipídica y los ensayos de las enzimas antioxidantes.....                                 | 33        |
| 4.3.5.4      | Efecto protector del HS a las células- $\beta$ pancreáticas sometidas a estrés oxidativo.....            | 34        |
| <b>4.3.6</b> | <b>Aislamiento de bacterias, hongos y actinos asociados a <i>P.auritum</i>.....</b>                      | <b>34</b> |
| 4.3.6.1      | Identificación taxonómica de las nueve cepas con actividad anti AGEs.....                                | 38        |
| <b>4.3.7</b> | <b>Cultivo de bacterias y obtención del extracto de acetato de etilo.....</b>                            | <b>40</b> |
| 4.3.7.1      | Reactivación de la bacterias.....  | 41        |
| 4.3.7.2      | Preinóculo.....  | 41        |
| 4.3.7.3      | Cultivo de la bacterias.....   | 41        |
| 4.3.7.4      | Obtención del extracto de acetato de etilo de la bacteria <i>Pseudomonas protegens</i> 8-1 (EA 8-1)..... | 42        |
| 4.3.7.5      | Purificación de EA 8-1 y obtención del compuesto activo.....   | 42        |
| <b>4.3.8</b> | <b>Técnicas instrumentales para la identificación de compuestos.....</b>                                 | <b>45</b> |
| 4.3.8.1      | Método de la espectroscopia infrarroja (IR).....   | 45        |
| 4.3.8.2      | Espectroscopia resonancia magnética nuclear RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ .....                     | 45        |
| <b>4.3.9</b> | <b>Evaluación de la formación de AGEs.....</b>   | <b>46</b> |
|              | <b>CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>47</b> |
| 5.1          | Obtención de los extractos crudos de hoja de <i>P. auritum</i> .....                                     | 48        |
| 5.2          | Inhibición de formación de AGEs de los extractos de hoja de <i>P. auritum</i> .....                      | 48        |
| <b>5.3</b>   | <b>Actividad antioxidante.....</b>   | <b>49</b> |
| 5.3.1        | Actividad antioxidante en placa.....   | 49        |
| 5.3.2        | Determinación de actividad antioxidante del HS por el ensayo DPPH.....                                   | 50        |
| 5.3.3        | Actividad antioxidante del HS por el ensayo ABTS.....  | 51        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 5.3.4      | Actividad antioxidante de HS por el ensayo ORAC.....  | 52        |
| 5.3.5      | Actividad quelante del HS.....  | 53        |
| 5.3.6      | Captura del óxido nítrico por el HS.....  | 54        |
| 5.3.7      | Método de decoloración de $\beta$ -caroteno.....  | 54        |
| 5.3.8      | Actividad antioxidante del HS mediante el ensayo de tiocianato ..   | 55        |
| 5.3.9      | Actividad captadora anión superóxido del HS.....  | 56        |
| <b>5.4</b> | <b>Actividad hipoglucemiante.....</b>   | <b>57</b> |
| 5.4.1      | Evaluación de la toxicidad de los extractos.....  | 57        |
| 5.4.2      | Evaluación del peso corporal, la ingesta de alimentos y agua en ratas.....  | 57        |
| 5.4.3      | Efecto de los extractos de (HS), (CHCL <sub>3</sub> ) y (MeOH) en ratas diabéticas y no diabéticas.....   | 59        |
| 5.4.4      | Prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratas por el HS.....  | 61        |
| 5.4.5      | Colesterol total, triglicéridos, LDL-colesterol y los niveles de TBARS en el hígado y riñón en ratas diabéticas después del tratamiento con HS..... | 61        |
| 5.4.6      | Efecto del HS sobre la actividad de Glucosa-6-fosfatasa (G6Pase), Glucoquinasa (GK), Hexoquinasa (HK) y el glucógeno.....                           | 62        |
| 5.4.7      | Efecto del HS en las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GRd y la GPx, hepáticas y renales.....   | 63        |
| 5.4.8      | Efecto del HS en la glicación de hemoglobina y en la formación de AGEs.....   | 64        |
| <b>5.5</b> | <b>Efecto del HS en el páncreas.....</b>  | <b>65</b> |
| 5.5.1      | Efecto del HS en el nivel de insulina en suero y en el páncreas....   | 65        |
| 5.5.2      | Efecto del HS sobre las enzimas antioxidantes del páncreas.....   | 66        |
| 5.5.3      | Efecto protector del HS a células- $\beta$ pancreáticas sometidas al estrés oxidativo .....   | 68        |
| <b>5.6</b> | <b>Aislamiento de Endófitos y evaluación de la actividad antiglicación de los extractos de los cultivos.....</b>                                    | <b>69</b> |
| 5.6.1      | Aislamiento de bacterias.....   | 69        |
| 5.6.2      | Aislamiento de hongos.....  | 70        |

---

|        |  |            |
|--------|--|------------|
| 5.6.3  | Cultivo de las bacterias, obtención del extracto de acetato de etilo y evaluación de la actividad anti-AGEs.....   | 70         |
| 5.6.4  | Actividad antioxidante de los extractos de los 23 cultivos.....  | 74         |
| 5.6.5  | Identificación taxonómica de las cepas con actividad anti-AGEs...  | 74         |
| 5.6.6  | Purificación del compuesto activo a partir de la fracción 8-1 2222 obtenida de EA-8-1.....   | 75         |
| 5.6.7  | Elucidación estructural del compuesto de la fracción 8-1 2222-2..  | 75         |
| 5.6.8  | Actividad antiglicación de las fracciones del extracto de cultivo de <i>P. protegens</i> 8-1 por la reacción <i>in vitro</i> BSA – glucosa.....              | 85         |
| 5.6.9  | Evaluación de DAPG en la formación de AGEs.....  | 86         |
| 5.6.10 | Purificación de los extractos de acetato de etilo de los cultivos de las bacterias <i>Pseudomonas fulva</i> 11-1 y <i>Sphingomonas mucosissima</i> 3a-1..... | 89         |
|        | <b>CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>90</b>  |
|        | <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>91</b>  |
|        | <b>CAPITULO VII. ANEXOS.....</b>   | <b>112</b> |

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1  | Esquema de reacción del proceso de glicación no enzimática de proteínas.....   | 8  |
| Figura 2  | Hojas de <i>Piper auritum</i> .....  | 11 |
| Figura 3  | Estrategia experimental para estudiar los extractos de hexano cloroformo y metanol de las hojas de <i>P. auritum</i> .....                                       | 17 |
| Figura 4  | Estrategia experimental para el aislamiento de Endófitos y purificación de los metabolitos secundarios.....  | 18 |
| Figura 5  | Obtención de los extractos de (HS), (CHCL <sub>3</sub> ) y (MeOH) de <i>P. auritum</i> .....   | 21 |
| Figura 6  | Diagrama de aislamiento de Endófitos (bacterias, hongos y actinomicetos de las hojas <i>P. auritum</i> ).....  | 37 |
| Figura 7  | Purificación por cromatografía las fracciones del extracto de acetato de etilo del cultivo de la bacteria 8-1 con actividad antiglicación.....                   | 44 |
| Figura 8  | Actividad antioxidante de los extractos de (HS), (CHCL <sub>3</sub> ) y (MeOH) de <i>P. auritum</i> . Por el método de decoloración del β-caroteno en placa..... | 49 |
| Figura 9  | Actividad antioxidante del HS, α-tocoferol, ácido ascórbico y Trolox medida por la reducción del radical DPPH.....   | 51 |
| Figura 10 | Actividad antioxidante del HS y α-tocoferol medida por la reducción del radical catión ABTS <sup>+</sup> . ....  | 52 |
| Figura 11 | Actividad antioxidante del HS por el método ORAC.....  | 53 |

---

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 12  | Actividad quelante de HS y EDTA medido por la disminución del complejo Fe <sup>2+</sup> -ferrocina.....  | 53 |
| Figura 13  | Actividad antioxidante de HS medida por la formación de radicales NO.....  | 54 |
| Figura 14  | Ensayo actividad antioxidante de HS y α-tocoferol usando el método de decoloración del β-caroteno.....   | 55 |
| Figura 15  | La inhibición de la oxidación del ácido linoleico por el HS.....   | 56 |
| Figura 16  | Actividad antioxidante de HS y SOD en la inhibición de la formación de radicales superóxido.....   | 57 |
| Figura 17  | Nivel de glucosa en ayuno de ratas normales y tratadas con STZ dentro de las 4 semanas de tratamiento.....                                     | 58 |
| Figura 18  | Bacterias aisladas de <i>P. auritum</i> en los diferentes medios de cultivo.....   | 69 |
| Figura 19  | Bacterias aisladas de <i>P. auritum</i> en los diferentes tejidos..  | 70 |
| Figura 20  | Bacterias aisladas de <i>P. auritum</i> en los dos sitios PS1 y PS2.   | 70 |
| Figura 21  | Efecto de los extractos de acetato de etilo de 8 cepas en la inhibición de la formación de AGEs.....   | 71 |
| Figura 22  | Efecto de los extractos de acetato de etilo de las cepas (9-22) en la inhibición de la formación de AGEs.....                                  | 72 |
| Figura 23  | Efecto de los extractos de acetato de etilo de los cultivos E4, E7, E8, E2 y E14 a diferentes tiempos de cultivo en la formación de AGEs ..... | 73 |
| Figura 24  | Efecto de los extractos de acetato de etilo de E4, E7, E8, E2 y E14 a 30°C.....  | 74 |
| Figura 25  | Cromatograma de la fracción 8-1 2222 purificada por HPLC – Semipreparativo.....  | 77 |
| Figura 26a | Espectro de masas de la fracción pura (8-1 2222-2) del extracto de acetato de etilo de <i>P. protegens</i> 8-1.....                            | 78 |
| Figura 26b | Resultado composición elemental de la fracción pura (8-1 2222-2).....  | 79 |

---

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| Figura 26c | Espectro de masas (GS-MS) de la fracción 8-1 2222-2 del extracto de acetato de etilo de <i>P. protegens</i> 8-1..... | 80  |
| Figura 27  | Espectro IR de DAPG aislado del extracto de acetato de etilo de <i>P. protegens</i> 8-1.....                         | 81  |
| Figura 28  | Espectro RMN <sup>1</sup> H de DAPG aislado del extracto de acetato de etilo de <i>P. protegens</i> 8-1.....         | 82  |
| Figura 29a | Espectro RMN <sup>13</sup> C de DAPG aislado del extracto de acetato de etilo de <i>P. protegens</i> 8-1.....        | 83  |
| Figura 29b | Espectro RMN <sup>13</sup> C de DAPG aislado del extracto de acetato de etilo de <i>P. protegens</i> 8-1.....        | 84  |
| Figura 30  | Estructura del DAPG.....   | 85  |
| Figura 31  | Efecto de las fracciones F 222 1 a F 2224 y F2222-2 en la actividad anti-AGEs.....                                   | 85  |
| Figura 32  | Efecto del DAPG obtenido de <i>P. protegens</i> 8-1 sobre la formación de AGEs.....                                  | 88  |
| Figura 33  | Purificación por cromatografía las fracciones del extracto de acetato de etilo del cultivo de la bacteria 11-1.....  | 119 |
| Figura 34  | Purificación por cromatografía las fracciones del extracto de acetato de etilo del cultivo de la bacteria 3a-1.....  | 123 |

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabla 1  | Efecto de los extractos de (HS), (CHCL <sub>3</sub> ) y (MeOH) de hojas de <i>P. auritum</i> en la formación de AGEs..... | 48 |
| Tabla 2  | Efecto del HS en características físico-metabólicas de ratas...   | 59 |
| Tabla 3  | Efecto del HS en el nivel de glucosa en sangre en ratas en ayuno, no diabéticas y diabéticas.....                         | 60 |
| Tabla 4  | Efecto del HS en la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT) en ratas diabéticas.....                                | 61 |
| Tabla 5  | Efecto del HS en los triglicéridos, colesterol total, HDL-colesterol y TBARS-hígado y riñón en ratas diabéticas.....      | 62 |
| Tabla 6  | Efecto del HS sobre las actividades de enzimas (G6Pase, HK y GK), el contenido de glucógeno en ratas diabéticas.....      | 63 |
| Tabla 7  | Efecto del HS sobre la actividad de enzimas antioxidantes en hígado y riñón en ratas diabéticas.....                      | 64 |
| Tabla 8  | Efecto del HS en la glicación de la hemoglobina y en la formación de AGEs en ratas diabéticas.....                        | 65 |
| Tabla 9  | AGEs renales.....   | 65 |
| Tabla 10 | Efecto del HS en los niveles de insulina en suero y en páncreas.....  | 66 |
| Tabla 11 | Efecto del HS en las enzimas antioxidantes, TBARS en el páncreas y el NO y iNOS en el suero.....                          | 67 |
| Tabla 12 | Efecto protector del HS a células- $\beta$ pancreáticas sometidas al estrés oxidativo. ....                               | 68 |

---

---

## ANEXOS

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Anexo 1   | Nomenclatura de los extractos (E1-E23) de las bacterias estudiadas .....   | 112 |
| Anexo 2   | Eluyentes y los soportes utilizados en CCF, CC, CCFP y Sephadex LH20.....  | 113 |
| Anexo 3   | Aislamiento de hongos.....   | 115 |
| Anexo 4   | Análisis de las secuencias 16S.....  | 116 |
| Anexo 5   | Árbol filogenético a partir de las secuencias del gen rpoB para la identificación de la cepa 8-1.....              | 117 |
| Anexo 6   | Purificación del extracto de acetato de etilo de la bacteria <i>Pseudomonas fulva</i> 11-1.....                    | 118 |
| Anexo 7   | Purificación del extracto de acetato de etilo del cultivo de la bacteria <i>Sphingomonas mucosissima</i> 3a-1..... | 120 |
| Anexo 7a  | Espectro de masas de la fracción F2112112 (Sustancia A)  | 124 |
| Anexo 7b  | Espectro de masas de la fracción F21212112 (Sustancia B)   | 125 |
| Anexo 7c. | Espectro de masas de la fracción F4122 (Sustancia C).....  | 126 |
| Anexo 8   | Artículo de investigación actividad antioxidante.....  | 127 |
| Anexo 9   | Artículo de investigación actividad hipoglucemiante.....   | 128 |
| Anexo 10  | Review de endófitos.....   | 129 |
| Anexo 11  | Review de alcaloides de <i>Piper</i> .....   | 130 |

---

---

## Resumen

La diabetes es una enfermedad crónica de elevada incidencia y prevalencia a nivel mundial. Los pacientes con esta enfermedad presentan altos niveles de glucosa sanguínea, causada ya sea por hiposecreción o por resistencia a la insulina. Muchas complicaciones de la diabetes (e.g., daño renal, cardiopatías) se han relacionado con la formación y acumulación de productos finales de glicación avanzada de proteínas (AGEs) y con la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). *Piper auritum* es una planta ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales de América. En la medicina tradicional se usan las hojas como hipoglucemiante. Los objetivos de esta investigación fueron: a). Evaluar las actividades antioxidante e hipoglucemiante de las hojas de la planta, y b). Aislar microorganismos Endófitos de la planta, e identificar al menos un compuesto con actividad antiglicación derivado de alguno de los Endófitos aislados.

Las hojas secas y molidas de *P. auritum*, fueron consecutivamente sometidas a extracción por reflujo en hexano, cloroformo y metanol. Se evaluó *in vitro* el efecto de los extractos en la formación de AGEs por el método BSA–glucosa. Los extractos inhibieron la formación de AGEs en 87, 99 y 44%, respectivamente, en comparación con 54% de aminoguanidina que se usó como control positivo. Adicionalmente, el extracto de hexano (HS) mostró actividad antioxidante (a 100 µg/mL) por todos los siguientes métodos a). β-caroteno en placa, b). DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracril), c). ABTS (2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), d). Tiocianato, e). Óxido nítrico, f). Actividad quelante, y g). SOD (superóxido dismutasa). El efecto hipoglucemiante del HS se evaluó en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ). El HS redujo de manera significativa de los niveles de glucosa, elevó los niveles de insulina y elevó la actividad de enzimas implicadas en la defensa antioxidante.

Se aislaron 75 bacterias a partir de diferentes tejidos de *P. auritum*. Se obtuvieron los extractos de cultivo con acetato de etilo (EA) de 23 morfotipos distintos seleccionados. La capacidad de cada uno de los 23 extractos de acetato de etilo A para inhibir la formación de AGEs fue evaluada. Nueve extractos inhibieron la formación de AGEs en más de 70%, el aislado 8-1 fue seleccionado por presentar una actividad inhibitoria de 89%. Se obtuvo el EA de 20 L de cultivo del aislado 8-1 y se purificó por medio de cromatografía en columna CC, Sephadex LH-20 y HPLC-semipreparativo. El compuesto activo, un poliquétido, fue identificado como 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) por medio de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, IR y MS. El DAPG inhibió la formación de AGEs medida por los métodos BSA-glucosa, BSA-MGO, fructosamina y la hidroxilación benzoato. Con base en las secuencias de rDNA 16S y *rpoB*, el aislado 8-1 fue identificado como *Pseudomonas protegens*.

---

---

## Abstract

Diabetes is a chronic disease of high incidence and prevalence worldwide. Patients with this disease have high blood glucose levels caused by either hyposecretion or insulin resistance. Many complications of diabetes (eg, kidney damage, heart disease) have been linked to the formation and accumulation of advanced glycation end products of protein (AGEs) and the presence of reactive oxygen species (ROS). *Piper auritum* is widely distributed in tropical and subtropical regions of America. In traditional medicine the leaves are used as hypoglycemic. The objectives of this research were: a). Evaluating antioxidant and hypoglycemic activities of plant leaves, b). Isolating plant endophytic microorganisms, and identifying at least one compound with anti-glycation activity derived from any of the isolated endophytes. The dried and ground leaves of *P. auritum*, were consecutively subjected to reflux extraction in hexane, chloroform and methanol. The effect of the extracts on AGEs formation *in vitro* was evaluated by the BSA-glucose method. The extracts inhibited the formation of AGEs in 87, 99 and 44%, respectively, compared to 54% aminoguanidine used as positive control. Additionally, the hexane extract (HS) showed antioxidant activity (100 µg/ mL) for all the following methods; a). β-carotene test plate, b). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), c). ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), d). Thiocyanate, e). Nitric oxide, f). Chelating activity, and g). SOD (superoxide dismutase). The hypoglycemic effect was evaluated with HS in STZ-induced diabetic rats. The HS significantly reduced glucose levels, elevated insulin levels and increased the activity of enzymes involved in antioxidant defense. 75 bacteria were isolated from different tissues of *P. auritum*. Culture extracts with ethylacetate (EA) selected from 23 different morphotypes were obtained. The ability of each of the 23 EA to inhibit the formation of AGEs was evaluated. Nine extracts inhibited the formation of AGEs in more than 70%, the isolated 8-1 was selected as having an inhibitory activity of 89%. EA 20 L culture of isolated 8-1 was obtained and purified by column chromatography (CC), Sephadex LH-20 and HPLC-semipreparative. The active compound, a polyketide, was identified as 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) by NMR <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, IR and MS. The DAPG inhibited the formation of AGEs measured by BSA-glucose, BSA-MGO, fructosamine and benzoate hydroxylation methods. Based on 16S rDNA and rpoB sequences, isolated 8-1 was identified as *Pseudomonas protegens*.

---

---

## **CAPITULO I. ANTECEDENTES**

### **1.1 Diabetes**

La diabetes es una enfermedad metabólica de origen endocrino, crónico-degenerativa de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria. La diabetes comprende un grupo de trastornos etiológica y clínicamente heterogéneos (autoinmunes, hormonales y metabólicos), en presencia de factores de riesgo como: hiperglicemia, hipertensión, hiperlipidemia y obesidad, lo que se ha asociado con una alta incidencia de complicaciones micro y macrovasculares, como daño a los pequeños vasos sanguíneos (microangiopatía), daño de los nervios periféricos (polineuropatía) enfermedades coronarias, daño de la retina cataratas (retinopatía diabética), daño renal e hígado graso (Brownlee y Cerami 1981; Setter *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2011).

Esta enfermedad es uno de los principales problemas de salud mundial que causa una significativa morbilidad y mortalidad. El número de personas con diabetes está aumentando en todo el mundo debido al crecimiento demográfico, envejecimiento, urbanización, aumento de la prevalencia de la obesidad, a una dieta rica en calorías e inactividad física (DCCT, The diabetes control and complications trial research group 1993; UKPDS, United kingdom prospective diabetes study 1998). En México, el registro realizado por la Encuesta Nacional de Salud 2012 estimó que existen alrededor de 6.4 millones de mexicanos mayores de 20 años que padecen de diabetes. A finales de los 90s, la diabetes ocupó el primer lugar como causa de muerte en el grupo de personas de 55 a 64 años. Los datos son alarmantes, tan sólo en el sexenio pasado murieron cerca de 500 mil personas y aproximadamente 4.5 millones de enfermos no están atendidos. En 2013 se registraron 75 mil amputaciones en México provocadas por la diabetes, desafortunadamente no hay recursos suficientes para atender al pie diabético e impedir las amputaciones. En México, las estimaciones existentes son muy variables con cálculos de costos de atención por paciente que van desde 700 hasta 3200 dólares anuales. (ENSANUT 2012).

La diabetes se caracteriza por la secreción anormal de insulina, y/o resistencia a la misma, lo que provoca un aumento de la concentración de glucosa en la sangre, es decir, hiperglucemia (Diabetes Atlas, 2013). La resistencia a la insulina se refiere

---

---

a una inadecuada captación de la glucosa dependiente de insulina por parte de los tejidos. Los mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina abarcan diversas y complejas alteraciones de la unión de la hormona con su receptor, entre otros (Diaz-Flores *et al.*, 2004; Eizirik *et al.*, 1992).

Se han descrito cuatro variedades de la enfermedad, pero la gran mayoría de los casos están relacionados a los tipos 1 y 2. Diabetes tipo 1: diabetes insulino-dependiente o diabetes juvenil. Se sabe que afecta sólo al 5% de la población diabética, es de origen autoinmune y de carácter idiopático, requiere inyecciones diarias de insulina para evitar cetoacidosis o coma y muerte. En la diabetes tipo 1, el sistema de defensas del organismo ataca las células- $\beta^1$  de los islotes de Langerhans en el páncreas, lo que ocasiona la destrucción de las mismas, a tal punto, que los niveles de secreción de insulina son insignificantes para cumplir su función (Diabetes Atlas 2013; Marles y Farnsworth 1995).

En la diabetes tipo 2, no insulino-dependiente. Se debe a una alteración funcional de las células- $\beta$ , cuya secreción de insulina es inadecuada, de menor intensidad y sin las oscilaciones normales en respuesta a la glucosa. Los niveles de insulina son muy altos al comienzo de la enfermedad, pero la eficiencia de captación de glucosa a los tejidos periféricos es baja debido a la resistencia a la insulina, lo cual impide estabilizar los niveles de glucosa (Diaz-Flores *et al.*, 2004; Marles y Farnsworth 1995; Hepburn *et al.*, 1993).

## **1.2 Control de la diabetes**

### **1.2.1 Tratamiento de la diabetes.**

Los tratamientos actuales, permiten un buen control glucémico pero hacen poco para prevenir las complicaciones (Modi 2007). La terapia médica para el control de la diabetes está enfocada principalmente a combatir la incapacidad de utilización normal de los carbohidratos, la prevención de la hiperglucemia y glucosuria. Por ejemplo a pacientes con diabetes que se les administra insulina parenteral para suplir la carencia de insulina (DCCT 1993; Hermansen y Davies 2007).

---

<sup>1</sup> Las células- $\beta$  producen y secretan la insulina, la insulina es una hormona reguladora importante para metabolismo intermediario

---

---

En años recientes se ha encontrado que en los pacientes que han utilizado diferentes antidiabéticos orales por un largo periodo se han incrementado considerablemente los trastornos cardiovasculares (Sohal y Weindruch 1996). Para el tratamiento de la diabetes, actualmente se usan hipoglucemiantes orales tales como: tolbutamida, tolazamida, acetohexamida, cloropropamida, glibenclamida y glipicida, empleados en forma simple o en combinaciones (Strongman *et al.*, 2015; Harrower 1996). Otra clase de fármacos son las biguanidas, por ejemplo, la metformina se utiliza comúnmente en el tratamiento y la prevención de la diabetes tipo 2, este fármaco incrementa la sensibilidad a la insulina, es decir, la respuesta de los tejidos a la insulina, lo que conlleva a reducir los niveles de glucosa en sangre, posteriormente reduce la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepática, también disminuye la absorción de glucosa por parte del tracto gastrointestinal (Arnouts *et al.*, 2013).

### **1.2.2 Estudios de plantas en el tratamiento de la diabetes.**

Dada la gran variedad de plantas y ecosistemas que existen, es muy factible aislar de ellas novedosos compuestos con potencial aplicación en la diabetes (Gupta *et al.*, 2005; Al-Attar y Zari 2010). Alrededor del 90% de la población mundial, sobre todo en el los países en desarrollo, utilizan las plantas y sus productos para la atención primaria de salud (medicina tradicional), debido a la su eficacia, potencia, economía y menos efectos secundarios. Los expertos de la OMS reconocieron la importancia de investigar los hipoglucemiantes de origen vegetal, que se usan en la medicina tradicional para el tratamiento de diabetes (Grover *et al.*, 2002; Andrade-Cetto y Heinrich 2005).

Se han descrito muchas plantas para el tratamiento de la diabetes en todo el mundo y, resulta difícil precisar la cantidad de especies medicinales usadas empíricamente para el control de esta enfermedad, sin embargo, se han reportado más de 1123 especies y más de 200 compuestos puros (flavonoides, esteroides, triterpenos y alcaloides) aislados de ellas (Alarcón *et al.*, 1998; Culy y Jarvis 2001). Aproximadamente la mitad de las especies reportadas han sido usadas en la medicina tradicional, pero solamente una pequeña parte de ellas han recibido evaluación experimental y clínica para determinar su eficacia (Perez-Guitérrez 2008).

---

---

Los medicamentos vegetales son con frecuencia considerados menos tóxicos, en comparación con los medicamentos de síntesis (Ernst 1998). Alarcón *et al.*, (1998) estudiaron el efecto hipoglucemiante de 28 plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de la diabetes. Los resultados mostraron que ocho de éstas disminuyen significativamente la curva de tolerancia a la glucosa y los niveles de glucosa. Estas plantas fueron: *Guazuma ulmifolia*, *Tournefortia*, *Hirsutissima lepechinia caulescens*, *Rhizophora mangle*, *Musa sapientum*, *Trigonella foenum-graceum*, *Turnera diffusa* y *Euphorbia prostrata*, y los resultados sugieren su potencial uso clínico. En otra investigación se examinó la actividad antidiabética de las hojas frescas de *Costus pictus* en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ). *C. pictus* es un miembro de la familia Zingiberacea, conocido popularmente como "espiral de jengibre", "escalera de mano" o "planta de insulina" (Jayasri *et al.*, 2008).

### **1.3 Efecto de hiperglucemia y el estrés oxidativo en la formación de AGEs.**

En gran medida las complicaciones de la diabetes inducida por la hiperglucemia crónica, se origina a través de varios mecanismos, es decir, por cambios químicos y funcionales de las proteínas, principalmente en la formación, acumulación y acción de productos finales de glicación avanzada (AGEs en inglés por *advanced glycation end products*) (Diaz-Flores *et al.*, 2004; Giacco y Brownlee 2010; DCCT 1993; Cohen y Ziyadeh 1996).

A nivel fisiológico un estado de hiperglicemia, promueve glicación de proteínas, lípidos y DNA. La formación de AGEs comprende reacciones adicionales de deshidratación, condensación cíclica, rearreglos, fragmentaciones, entrecruzamientos intermoleculares y oxidación por radicales libres, sin la participación de enzimas en las diferentes reacciones (Pérez *et al.*, 2010; Dean *et al.*, 1997; Ardestani y Yazdanparast 2007; Singh *et al.*, 2001). Se pueden identificar dos vías en la formación de AGEs que se ilustran en la Figura 1.

La formación de AGEs se inicia por el ataque nucleófilo de los grupos amino<sup>2</sup> de proteínas y ácidos nucleicos al grupo carbonilo de glucosa y otros carbohidratos, luego se produce un enlace covalente. Esto conlleva a la formación reversible de aldminas o bases de Schiff, llamadas también glicosilamina N-sustituidas.

---

<sup>2</sup> En especial con el amino terminal y el amino de residuos de lisina.

---

---

Posteriormente, por reordenamientos moleculares se generan compuestos estables conocidos como Amadori, llamados también fructosaminas, (1-amino-1-desoxi-2-cetosa). En estas reacciones el resto glucosilo se transforma en fructosilo por el desplazamiento del grupo carbonilo del carbono 1 al carbono 2 durante el reordenamiento (Khalifa *et al.*, 1999; Diaz-Flores *et al.*, 2004). A partir de compuestos Amadori, por cambios moleculares y oxidaciones, se forman compuestos  $\alpha$ -oxoaldehídos como la 3-desoxiglucosona, el metilgloxal y glixal, estos últimos son precursores conocidos de los AGEs, es decir, al reaccionar simultáneamente con dos grupos amino de proteínas forman puentes cruzados estables entre ellas produciendo su agregación y pérdida en sus funciones biológicas (Diaz-Flores *et al.*, 2004). Paralelamente, los compuestos Amadori pueden presentar arreglos moleculares irreversibles, formando compuestos dicarbonilos altamente reactivos para formar compuestos complejos, heterogéneos, fluorescentes (AGEs) (Sell y Monnier 2012; Singh *et al.*, 2001). Los AGEs incluyen compuestos muy variados muy estructuralmente que han sido identificados en pacientes diabéticos, como: argipirimidina, pentosidina, N-(carboxilmetil) lisina (Fu *et al.*, 1994) y hidroximidazolona (Actis y Rebolledo 2000; Nagasawa *et al.*, 2003a).

En la segunda etapa de la formación de AGEs, la autooxidación de la glucosa catalizada por metales, da lugar a productos dicarbonilos (e.g., 3-desoxiglucosa, glixal y metilgloxal), al mismo tiempo se produce el radical superóxido, precursor de otras especies reactivas de oxígeno. Wolff y Dean (1987) fueron los primeros en demostrar que los compuestos dicarbonil derivados de la autooxidación de la glucosa son capaces de modificar las proteínas. El glixal reacciona fácilmente con residuos de lisina y arginina en las proteínas, también se encontró que el glixal promueve la polimerización de la lisozima (Wells-Knecht *et al.*, 1995). Estas reacciones son irreversibles y las modificaciones sólo desaparecen con la degradación de la proteína modificada.

La glicación puede ocurrir en un gran número de proteínas como el colágeno, la elastina y la mioglobina. Las proteínas de la sangre como la hemoglobina, pueden glicarse en individuos sanos, pero la glicación aumenta en personas que padecen diabetes (Klein *et al.*, 1995). Hoy se conocen un sinnúmero de enfermedades que

tienen como punto de partida procesos de glicación no enzimática o la acumulación de AGEs en las células, lo que afecta funciones biológicas (Park *et al.*, 2012; Vlassara *et al.*, 2002; Goh y Cooper 2008; Vitek *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 2003).

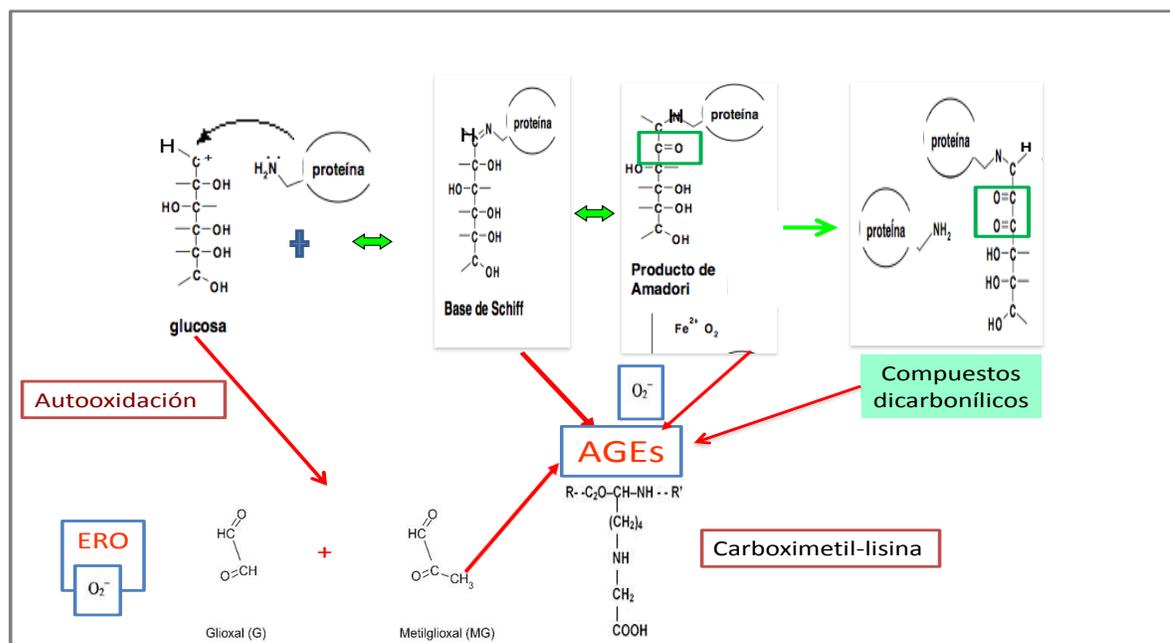


Figura 1. Esquema de reacción del proceso de glicación no enzimática de proteínas.

La hiperglucemia crónica conduce a reacciones paralelas de glicación y oxidación, se conocen como glicoxidación no enzimática de proteínas en varios tejidos y diversos órganos resultando la formación de los AGEs y EROs, los cuales se acumulan en pacientes diabéticos (Schmidt *et al.*, 2001). En el caso de las lipoproteínas (LP), debido a la presencia de grupos amino (arginina o lisina) libres pueden glicarse y también se forman compuestos Amadori. En pacientes diabéticos han sido detectados varios tipos de lipoproteínas (LP) modificadas, incluyendo LP glicadas, LP oxidadas y LP glicooxidadas (Baynes y Thorpe 1999).

La relación entre la hiperglucemia y el estrés oxidativo ha sido avalada por experimentos *in vitro* e *in vivo* (Munch *et al.*, 2012; Valabhji *et al.*, 2001; Tsubouchi *et al.*, 2004; Mohanty *et al.*, 2000). El estrés oxidativo se define como una situación de desequilibrio en donde la producción de radicales libres, es superior a la capacidad

---

---

de defensa antioxidante, de manera que ésta última resulta insuficiente. El estrés oxidativo puede dañar los sistemas celulares, ya que incrementa la oxidación de proteínas, disminuye la actividad enzimática antioxidante y finalmente, da lugar a numerosas enfermedades y trastornos, tales como: diabetes, cáncer, derrame cerebral, infarto de miocardio, shock séptico hemorrágico, Alzheimer y Parkinson (Halliwell et al., 1995). Las EROs se pueden formar a partir de varias fuentes, como son la fosforilización oxidativa, la autooxidación de la glucosa, la oxidación de NADPH, lipooxigenasa, citocromo P450 monooxigenasas y óxido nítrico sintetasa (NOS) (Valko et al., 2007; Aruoma et al., 1991). Los EROs incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el óxido nítrico (NO).

#### **1.4 Inhibición de la glicación no enzimática de las proteínas.**

Existe la necesidad de investigar compuestos con efecto hipoglucemiante, que además inhiban la formación de AGEs y el estrés oxidativo (Wang y Ng 1999; Mentreddy 2007; Frode y Medeiros 2008; Sharma et al., 2000). Pérez et al., (2010) encontraron que el extracto hidroalcohólico de *Piper auritum* (hoja santa), inhibe la formación de AGEs en el modelo BSA-glucosa ( $IC_{50}$  23.07  $\mu$ g/mL) mucho más, que un control positivo con la aminoguanidina (AG,  $IC_{50}$  27.1  $\mu$ g/mL). La AG es una hidracina de bajo peso molecular y el primer inhibidor de la formación de AGEs estudiado. Es un inhibidor de la formación de compuestos dicarbonilos y reduce la formación de radicales libres (Nagasawa et al., 2003a). El uso clínico de la aminoguanidina no fue aprobado debido a efectos secundarios, relacionados a la deficiencia en la vitamina B<sub>6</sub> en pacientes diabéticos (Brownlee 1995).

El cirsilineol, un flavonoide aislado del extracto metanólico del tomillo (*Thymus vulgaris*) disminuye los niveles de los AGEs y fructosamina (Morimitsu et al., 1995). Algunos bioflavonoides con actividad antioxidante (Liao y Yin 2000) también pueden inhibir la formación de AGEs mediante la reducción de la generación de EROs.

Evaluaron *in vitro* la capacidad de inhibir la glicación de proteínas de 25 extractos etanólicos de plantas (modelo BSA-fructosa). El extracto más bioactivo fue de *Allium cepa* seguido por *Illicium religiosum*. (Kim y Kim 2003). Estudios previos han demostrado que la rutina (quercetina-3-O- $\beta$ - rhamnoglucosa) inhibe la

---

---

peroxidación de lípidos, DNA y proteínas (Nagasawa *et al.*, 2003b). Del extracto de ajo (*Allium sativum*) se aislaron varios compuestos organosulfurosos, entre los cuales la S-allilcisteína inhibió formación de AGEs (Ahmad *et al.*, 2007).

El compuesto carnosato, fue aislado del romero (*Rosmarinus officinalis* (Hsieh *et al.*, (2007) tiene un gran actividad antiglicación, mostrando que esta planta puede ser un importante coadyudante para la prevención y tratamiento de la diabetes y de enfermedades neurodegenerativas.

Del extracto acuoso de la corteza de canela, se aislaron varios compuestos fenólicos como la catequina, epicatequina, procianidina B2 y polímeros fenólicos, los cuales inhibieron la formación de AGEs (Peng *et al.*, 2008).

Los extractos de varias especias utilizadas en la comida tradicional mexicana, varias de ellas incluyendo *Allium cepa* (cebolla), *Allium sativum* (ajo) y *Eugenia caryophyllata* (clavo) inhibieron la formación de AGEs (Dearlove *et al.*, 2008).

## **1.5 *Piper auritum* (Piperaceae).**

### **1.5.1 Clasificación taxonómica de *Piper auritum***

|           |                   |
|-----------|-------------------|
| Reino:    | Vegetal           |
| División: | Magnoliofita      |
| Clase:    | Magnoliopsida     |
| Orden     | Piperales         |
| Familia:  | Piperaceae        |
| Género:   | <i>Piper</i>      |
| Especie:  | <i>P. auritum</i> |

### **1.5.2 Generalidades**

México es un país de enorme riqueza, tanto natural como cultural, estando entre los siete primeros países por su variedad de seres vivos y representa entre el 10 y 12% de biodiversidad a nivel mundial (Mittermeier y Goettsch 1992; Cox *et al.*, 2011; Conabio 1998). Se han registrado poco más de 2000 especies que se utilizan como medicinales en distintas regiones.

El género *Piper* contiene más de 1400 especies (Moreira *et al.*, 2000). La hoja santa (Figura 2) es un arbusto leñoso de hasta 4 m de altura, es una planta frondosa, sus hojas son grandes y en forma de corazón, las flores aparecen en espigas delgadas con aspecto de *cola de ratón* de color verde pálido a blanco, las ramas

---

frágiles, con hojas alternas pecioladas y textura aterciopelada, de 20 a 25 cm de largo por 14 a 18 de ancho.



Figura 2. Hojas de *Piper auritum*

*Piper auritum* se encuentra ampliamente distribuido en el trópico, es una especie originaria de México a Colombia (BDMTM 2009). En México crece en regiones tropicales y lluviosas de San Luis Potosí, Morelos, Puebla, Veracruz, Tabasco y Oaxaca, en este último Estado, se le puede encontrar en el municipio de San Juan Teponaxtla de Cuicatlán (Meckes *et al.*, 2008), Istmo de Tehuantepec (Frei *et al.*, 1998), como también en la Reserva de la Biosfera en Tehuacán-Cuicatlán (García *et al.*, 2004). Habita en climas cálido semicálido y semiseco desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm. Cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos en vegetación de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, perennifolio y bosque mixto de pino-encino de terreno semiseco. Popularmente se le conoce como Santamaría de anís o anisillo, caisimón de anís, tlanepa, tlanepaquequite acuyo, cordoncillo blanco, hoja de anís, momo, pimienta sagrada, y x-mak-ulam en lengua maya, hierba medicinal olorosa, hierba santa, hoja santa.

Es usada como condimento en países de América central, el uso frecuente en la cocina mexicana, especialmente en los tamales de ciertas zonas del sur de México. El particular sabor de la hoja santa se ha comparado al eucalipto, regaliz, anís, nuez moscada, menta, estragón y pimienta negra.

---

---

### 1.5.3 Etnobotánica

Sus hojas se emplean en la medicina tradicional como hipoglucemiante (Andrade y Heinrich 2005), antibacteriano, antifúngico y antidermatofítico emoliente, agente antirreumático, analgésico, diurético, estimulante y abortivo (García et al., 2007). Así como también como anestésico local, antiblenorrágico, eupéptico, para tratar las anginas, erisipela, fiebres, gota, reumatismo y llagas, se le atribuye propiedades diaforéticas. Pérez *et al.*, 2013 reportan usos como antiinflamatorio, para evitar infección de la matriz después del parto, como galactógeno y para acelerar el parto, dolor de estómago o espasmo, falta de apetito, en mordeduras de víbora y estreñimiento. También la hoja santa se ha reportado el uso en el tratamiento de reumatismo, riñones, para la vista, purificación de la sangre, inflamaciones, dolores musculares, cólicos, para dar baños a los recién nacidos, contra las lombrices intestinales, depresión, para quemaduras y control de la fiebre. En homeopatía se usa la tintura de la planta entera y las diluciones para el control de asma, bronquitis, laringitis aguda o crónica, disnea, para dolor en general y para resolver problemas digestivos (Gracia 2001).

### 1.5.4 Fitoquímica y actividad biológica.

Se ha reportado el análisis químico al aceite esencial obtenido por destilación al vapor a partir de las hojas frescas de *P. auritum*, lo que reveló la presencia de safrol (70%) como el componente principal (Gupta *et al.*, 1985), se estudiaron las hojas de *P. auritum* y aislaron cuatro fenoles prenilados (Ampofo *et al.*, 1987).

Nair *et al.*, (1989), estudiaron las raíces de *P. auritum*, y aislaron cuatro fenilpropanoides, 1-propenal-3,4-(metilenedioxi)-5-metoxibenzeno, 1-alil-2,3 (metilenedioxi)-5 metoxibenzeno, dilaploide y safrol. La hoja santa es una planta rica en alcaloides, la cual contiene fenilpropanoides, lignanos, sesquiterpenos y monoterpenos como borneol, alcanfor, cineol, eugenol, safrol, y una amplia variedad de componentes bencénicos como miristicina, dillapiol y apiol (García et al., 2007; Perez et al., 2013; Parmar *et al.*, 1997).

Diferentes extractos a partir de las partes aéreas de la planta mostraron actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, *Cladosporium* sp. (Misas et al., 1979;

---

---

Rahalinson *et al.*, 1993) así como también actividades hipotensora y vasodilatadora (Feng *et al.*, 1993). En otro estudio, Gracia *et al.*, (2001) evaluaron la actividad antiespasmódica del aceite esencial de *Piper auritum* (1%). El aceite posee actividad espasmolítica sobre el músculo liso intestinal de yeyuno aislado de conejo, la disminución de la amplitud de la motilidad espontánea fue significativa ( $p < 0.05$ ) y similar a la respuesta producida con la papaverina. El extracto de n-hexano y el aceite esencial de las hojas exhibieron un control contra fitopatógenos (Pineda *et al.*, 2012). Los extractos metanólico y acuoso de las hojas de *P. auritum* no presentaron actividad antioxidante (Navarro *et al.*, (2003), tampoco toxicidad frente a los nauplios de *A. salina* a dosis  $< 1000$  ppm. En otro estudio *in vitro* e *in vivo* del extracto de *P. auritum* no presentó potencial genotóxico (Vizoso *et al.*, 1999)

### **1.6 Endófitos fuente alternativa de metabolitos secundarios, para el control de la formación de AGEs.**

Los microorganismos endófitos son una fuente alternativa de compuestos bioactivos con actividad farmacológica (Strobel 2002). Los endófitos son microorganismos que pasan todo o parte de su ciclo de vida intra o intercelularmente en los tejidos sanos de las plantas. Hasta donde se sabe, todas las plantas alojan a una comunidad diversa de endófitos, estableciendo una estrecha asociación que puede ser desde simbiótica hasta cercanamente patogénica (Strobel y Daisy 2003). Particularmente, las plantas tropicales y subtropicales son ricas en su diversidad de microorganismos endófitos (Banerjee 2011). Los endófitos foliares son diversos y abundantes, por ello, muchos estudios se han centrado en ellos (Arnold *et al.*, 2000). La biodiversidad de endófitos está influenciada por varios factores como, sitio del muestreo, la edad del tejido y la vegetación asociada (González 2011). La asociación planta/microorganismo en muchos casos es asistida por la presencia de compuestos bioactivos producidos por los microorganismos (Araújo *et al.*, 2001). Los compuestos benefician a la planta huésped, en muchos casos proporcionándole protección contra infecciones y en otros, siendo cruciales para su supervivencia (Strobel 2002; Strobel *et al.*, 2004). Novedosos compuestos bioactivos como antibióticos, anticancerígenos, antimicóticos y antioxidantes son sólo algunos ejemplos de lo que se ha encontrado después de aislar y cultivar diferentes endófitos en forma individual (Castillo *et al.*,

---

---

2006; Harper *et al.*, 2003; Stierle *et al.*, 1993; Strobel *et al.*, 1997; Shrestha *et al.*, 2001). Los microorganismos endófitos pueden ser una fuente fácilmente accesible de compuestos químicos, que sin embargo, han sido muy poco estudiados, en especial, su capacidad de inhibir formación de AGEs no ha sido estudiada hasta ahora (Strobel *et al.*, 2004; Christudas *et al.*, 2013; Lillelund *et al.*, 2002).

Las importantes ventajas de los microorganismos en relación a las plantas, para producir compuestos bioactivos, incluyen: sencillez en cuanto a maquinaria metabólica por lo que se facilita su manipulación genética, se reproducen más rápido que las plantas, se pueden cultivar en fermentadores y la producción puede ser reproducible. El cultivo de bacterias presenta ventajas adicionales: las bacterias crecen en medios de cultivo simples, pueden cultivarse a alta densidad celular y de producto, también facilita la extracción y purificación del metabolito, se reproducen más rápido que las células vegetales y hongos, por ello menor tiempo de incubación. Todos estos son requisitos para la producción industrial sustentable de compuestos.

El género *Pseudomonas* comprende bacilos Gram-negativos, cuyos miembros se han estudiado ampliamente para el control biológico de patógenos de plantas, en particular son buenos productores de metabolitos secundarios (Shoda 2000; Marchand *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2001; Haas y Keel 2003). Varios compuestos antibióticos, antivirales y antifúngicos, así como sideróforos se han aislado a partir de diferentes cepas de *Pseudomonas* (De Souza *et al.*, 2003; Thomashow y Weller 1998; Dowling y Ogara 1994; Yang y Coi 2012). El metabolito poliquétido 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) es producido por varias cepas de *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas protegens*. El DAPG inhibe el crecimiento de un amplio espectro de bacterias, oomicetos y nemátodos. Es el principal compuesto responsable del control biológico de fitopatógenos (Raaijmakers *et al.*, 1997; Duffy y Défago 1999; Weller *et al.*, 2002; Bakker *et al.*, 2007; Troppens *et al.*, 2013). La producción de DAPG por *Pseudomonas fluorescens* CHA0, así como su actividad antibiótica contra la enfermedad de la podredumbre de la raíz negra del tabaco, fue reportada por primera vez por el grupo de Defago (Keel *et al.*, 1990; Keel *et al.*, 1992; Maurhofer *et al.*, 1994). El DAPG fue también aislado de *Pseudomonas sp.* F113, obtenida de la rizósfera de remolacha azucarera (Shanahan *et al.*, 1992), y más recientemente, de cultivos de *Pseudomonas*

---

---

*protegens* sp., aislada de las raíces de tabaco (Ramette *et al.*, 2011). Estos estudios también mostraron que DAPG inhibe una amplia gama de hongos fitopatógenos. Otras especies de *Pseudomonas* capaces de sintetizar DAPG se han documentado en numerosos estudios experimentales y artículos de revisión (Yang y Coi 2012; Weller *et al.*, 2007; Sonnleitner *et al.*, 2011; Schinider *et al.*, 2000; Duffy y Defago 1999; Bangera *et al.*, 1999; Sarniguet *et al.*, 1995; Fenton *et al.*, 1992). El DAPG también fue producido por *Lysobacter gummosus*, una bacteria que vive en la piel de las salamandras redback (Brucker *et al.*, 2008).

## **CAPITULO II. Justificación**

Los AGEs son considerados marcadores en la patogénesis de la diabetes, cataratas, arterioesclerosis y nefropatía diabética. Importantes esfuerzos de investigación están dedicados a la búsqueda de procedimientos que permitan revertir o evitar los efectos de los AGEs, esto es, modificando los factores que aceleran su formación. Una estrategia posible consiste en evitar la glicación de las proteínas (la formación de la base de Schiff) y bloquear la formación de compuestos carbonílicos altamente reactivos que se forman en las primeras etapas de la formación de AGEs. En la actualidad los tratamientos para la diabetes no son completamente satisfactorios, por lo que se buscan nuevas opciones terapéuticas para prevenir las complicaciones crónicas de la enfermedad.

Dada la gran variedad de plantas que existen, es muy factible aislar de ellas nuevos géneros y especies de microorganismos capaces de producir novedosos compuestos con potencial aplicación en la diabetes.

El aislamiento de bacterias capaces de producir compuestos que retarden la formación de AGEs podría ayudar a desarrollar una manera relativamente simple y potencialmente económica para producir comercialmente estos compuestos.

Esta investigación se propone estudiar los extractos de las hojas y los microorganismos endófitos de *P. auritum* (hoja santa), para evaluar las actividades hipoglucemiante, antioxidante y antiglicación y aislar e identificar un compuesto con actividad anti-AGEs. Actualmente no hay reportes de que el material vegetal de estudio o sus endófitos sean capaces de producir compuestos capaces de inhibir la formación de AGEs.

---

---

## **CAPITULO III Hipótesis**

Las hojas y microorganismos endófitos de *P. auritum* poseen actividades de antiglicación, hipoglucemiante y antioxidante y aislar al menos un compuesto con actividad antiglicación. .

### **3.1 Objetivos**

#### **3.1.1 Objetivos Generales:**

Evaluar las actividades antiglicación, antioxidante e hipoglucemiante de los extractos de hexano y metanol de las hojas de *P. auritum*.

Aislar microorganismos endófitos de *P. auritum* e identificar aquellos que son capaces de producir compuestos con actividad antiglicación.

#### **3.1.2 Objetivo Específicos:**

##### **Primera fase:**

1. Obtener extractos de hexano, cloroformo, metanol y agua de *Piper auritum*.
2. Evaluar la capacidad de los extractos para inhibir la formación de AGEs.
3. Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de *Piper auritum*.
4. Determinar la actividad hipoglucemiante de los extractos de hexano y metanol de *Piper auritum*.

##### **Segunda Fase:**

5. Aislar microorganismos endófitos de las hojas y tallo de *P. auritum*.
6. Cultivar los microorganismos aislados de *P. auritum*.
7. Obtener extractos de los cultivos y determinar su capacidad de inhibir la formación de AGEs y su actividad antioxidante.
8. A partir de los extractos, aislar los compuestos activos mediante cromatografía en columna CC, cromatografía en placa fina CCD y cromatografía HPLC semipreparativa
9. Identificar los compuestos activos mediante: infrarrojo (IR), espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ).

---

---

## CAPITULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Desarrollo experimental.

El desarrollo de la investigación se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería (Laboratorio de Metabolismo Secundario de Microorganismos) CINVESTAV, en el laboratorio de Investigación de Productos Naturales de ESIQIE-IPN y en el laboratorio de Farmacología de UPIBI-IPN. En las Figuras 3 y 4 se muestra la estrategia experimental llevada a cabo.

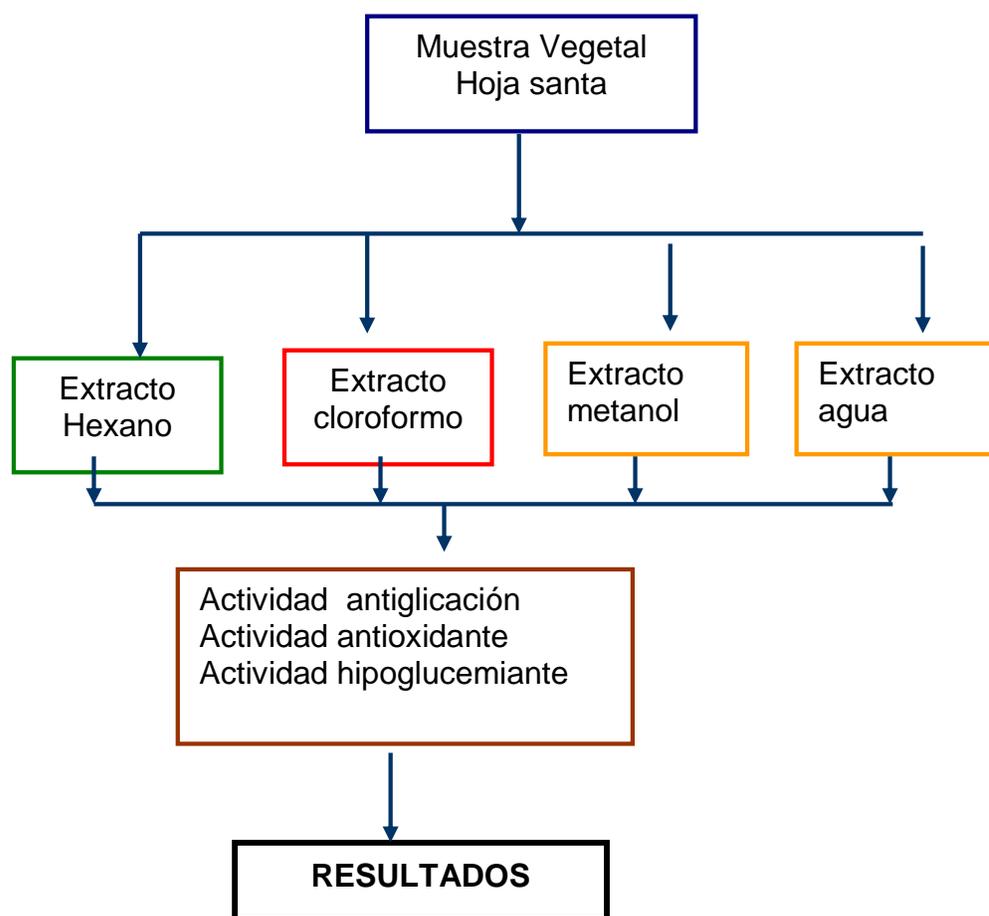


Figura 3. Estrategia experimental para estudiar los extractos de hexano, cloroformo y metanol de las hojas de *P. auritum*.

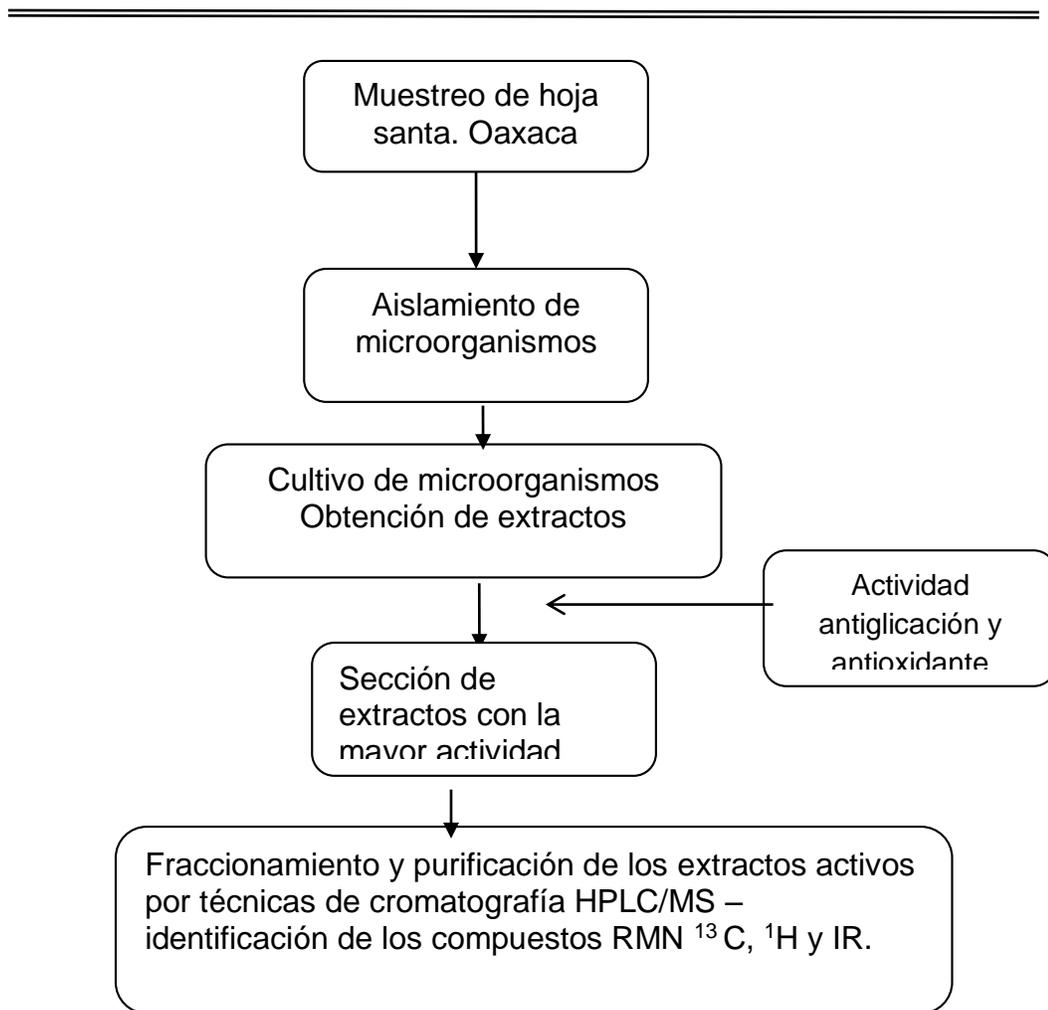


Figura 4. Estrategia experimental para el aislamiento de endófitos y purificación de los metabolitos secundarios activos.

## 4.2 Materiales.

### 4.2.1 Materias prima.

La hoja fresca de *P. auritum* (hoja santa) fue recolectada en verano, en Amecameca, Estado de México. Un ejemplar de la planta fue depositado en el Herbario de la UAM-Xochimilco, número de referencia (N<sup>o</sup> 7345).

### 4.2.2 Reactivos

Los disolventes empleados fueron: Hexano (Hex), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y metanol (MeOH), Diclorometano (DM)Fermont, Productos Químicos de Monterrey, México. Para la obtención de los extractos crudos y para los fraccionamientos iniciales se utilizaron disolventes grado comercial. Para las purificaciones finales se emplearon disolventes de grado analítico. Reactivos que se utilizaron en las pruebas de actividad

---

---

antioxidante, DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracril),  $\beta$ -caroteno, ácido linoleico, tocoferol. Reactivos para la prueba de inhibición de AGEs: aminoguanidina, dimetilsulfóxido (DMSO), azida sódica, glucosa y albumina de suero bovino (BSA). Sigma Aldrich (St. L USA), regulador de fosfatos pH= 7.4 (J.T. Baker, México). Para la purificación se utilizó gel de sílice 60 HF<sub>254</sub> (0.063– 0.200) para cromatografía en capa fina CCF y columna CC. Cromatoplasmas TLC de sílica gel 60 HF<sub>254</sub>, de Merck (Darmstadt, Germany), como reveladores cromatográficos se emplearon vapores de yodo y MeOH grado HPLC, (J.T. Baker, México).

#### **4.2.3 Equipos.**

Para la obtención de los extractos se utilizó el rotavapor (modelo R-205, BÜCHI Labortechnik AG, Suiza). Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Johns, los datos de IR se midieron en un espectrofotómetro (Buck-500), los espectros de RMN se registraron en un equipo VARIAN Mercury DPX – 300 MHz (EquipNet LabX Member, USA) (<sup>1</sup>H 300 MHz y <sup>13</sup>C 75.4 MHz) usando acetona-*d*<sub>6</sub> como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico se expresan en partes por millón. Los espectros de masas (LRMS) se midieron en un sistema de GC-MS (Varian Saturn 2000 series, Varian, Inc, California USA) mientras que HRESI-MS se obtuvieron usando un espectrómetro de masas (LCMSTOF 1100 series Agilent Technologies, Santa Clara, California). Para realizar las mediciones fluorescencia se usó el espectrofluórometro (modelo Fluoromax 3X, Jobin-Yvon/Horiba, E. Setauket, New York, USA). Para la purificación del compuesto obtenido se utilizó un HPLC analítico (Agilent Technologies 6200 Serie Single Quad LC/MS System con un detector de matriz de diodos G1315D) utilizando una columna analítica ZORBAX - Eclipse XDB C18 4,6 x250 mm x 5 m) también se utilizó HPLC semipreparativo se realizó en un sistema de HPLC Waters Delta 600 con un detector de UV ( $\lambda$ =270 nm), utilizando una columna semipreparativa, ZORBAX - Eclipse XDB C18 9,4x250 mm x5 m, y caudal de 20 mL/min. Otros equipos utilizados fueron: balanza analítica, (modelo AR3130, OHAUS Adventure Cor. Pine Brock, NJ), mufla (modelo 4800 Furnace BI Airtec Thermoprocess. Germany). Vortex Daigger Genie 2. Modelo G-560. Manufacturado por Scientific Industries, Inc. Bhoemia, N.Y., 11716. USA. Termociclador (Termal

---

---

cycler, modelo T-100 marca. Bio-Rad, serie no. 621 Br07359. Singapor). Centrífuga Refrigerada. (Modelo 5415R. Marca Eppendorf. Serie no.5426am036285. Max. Speed. 13200 rpm. Alemania) Centrífuga no Refrigerada (modelo 5424. Marca Eppendorf. Serie no. 0005901. Max. Speed. 15000 rpm. Alemania) Ultracongelador (Series Vip. Marca. Sanyo. Serie no. 08100263 Temperatura -85°C) Liofilizador (modelo Freezone 2.5, Labconco. Kansas. USA), Microscopio (modelo Olympus CX31, New York Microscope Company, Inc. N. Y. USA).

### **4.3 Métodos**

#### **4.3.1 Obtención de extractos de la planta.**

Se secaron 6 kg de las partes aéreas de *P. auritum* a temperatura ambiente por cinco días con movimiento continuo y se pulverizaron en un molino mecánico. El material molido se extrajo consecutivamente en reflujo con hexano, cloroformo y metanol (35 L de c/u). Estos extractos se filtraron y se concentraron en un rotavapor como se muestra en la Figura 5.

#### **4.3.2 Inhibición de la formación de AGEs *in vitro***

Se llevó a cabo empleando el modelo albúmina sérica bovina (BSA)–glucosa (Brownlee 1986; Kim y Kim 2003). La reacción se llevó en un volumen final de 5 mL que contenían; 1 mL de BSA (10 mg/mL) en buffer fosfato salino (PBS) a pH de 7.4; 1 mL de los posibles inhibidores (conteniendo 50 mg de los extractos o 1 mg de las fracciones); 1 mL de glucosa 500 mM en agua destilada y 100 µL de azida sódica al 0.02%. Como control positivo se empleó aminoguanidina (10 mM equivalente a 0.6 mg/mL). Las mezclas de reacción se incubaron (incubadora modelo KBLee 1001, Daiki Sciences Co., Ltd Korea) durante 15 días a 37 °C, el ensayo se llevó a cabo por triplicado. La fluorescencia de los AGEs se evaluó (excitación a 370 nm y de emisión a 440 nm) en un fluorómetro.

Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

% de formación de AGEs en BSA = (fluorescencia control - fluorescencia problema) / (fluorescencia control) x 100).

A los extractos se les determinó la concentración inhibitoria del 50% (EC<sub>50</sub>). Las pruebas y análisis se realizaron por triplicado y se calcularon los valores medios.

La inhibición de la formación de AGEs se expresó como los  $\mu\text{g/mL}$  de sustancia necesarios para disminuir la concentración en un 50% ( $\text{EC}_{50}$ ). Para determinar  $\text{EC}_{50}$  se construyó una curva tipo con los valores de porcentaje de inhibición y concentración de las muestras evaluadas y se interpoló el valor 50 % de inhibición donde se determinó la concentración por el programa ED50V10.

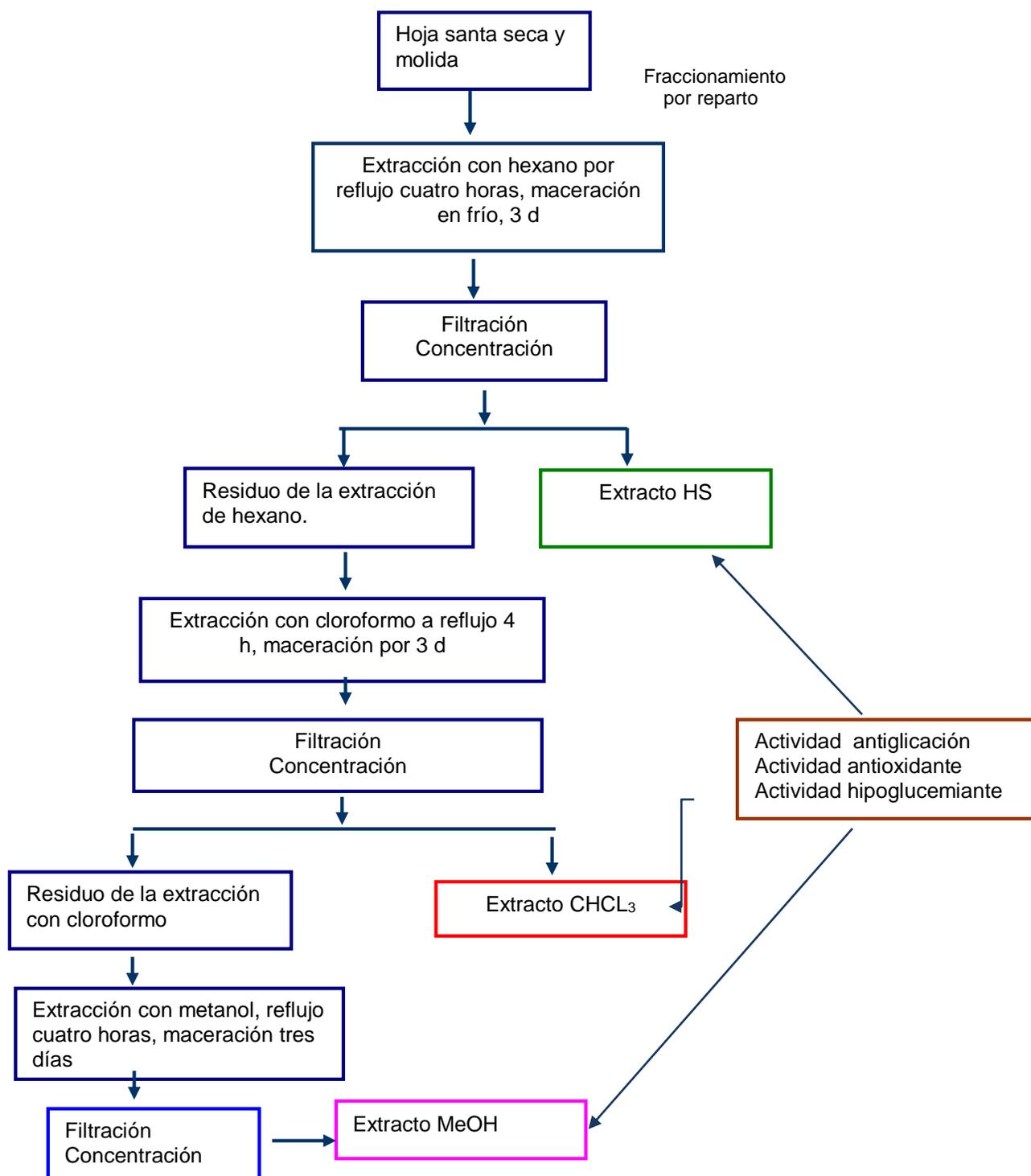


Figura 5. Obtención de los extractos de (HS), ( $\text{CHCl}_3$ ) y (MeOH) de *P. auritum*.

---

---

### **4.3.3 Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*.**

#### **4.3.3.1 Contenido total de fenoles.**

El contenido total de fenoles se determinó mediante el reactivo Folin-Ciocalteu (FC) de acuerdo con el método de Singleton y Rossi (1965). El extracto de MeOH (0.1 mL) se mezcló con 0.75 mL de reactivo FC (previamente diluido 1000 veces con agua destilada) y se incubó durante 5 min a 22 °C, y luego se añadió 0.06% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a la solución. Después se incubó a 22 °C durante 90 min, la absorbancia se midió a 725 nm. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. El contenido fenólico fue evaluado partir de una curva estándar de ácido gálico. Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (ácido gálico en mg/extracción seca).

#### **4.3.3.2 Actividad antioxidante por decoloración de β-caroteno en placa.**

Se tomaron 0.5 µL de los extractos de hexano (HS), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y metanol (MeOH), se disolvieron 10 mL de metanol y se aplicaron en placas de gel de sílice, posteriormente se rociaron con una mezcla de (1 mL de ácido linoleico y 0.02 g β-caroteno disuelto en 10 mL de cloroformo). Después de 30 min se rociaron con una solución al 0.2% del radical estable DPPH, el cual produjo una coloración violeta. La placa se expuso a la luz hasta que los colores de fondo se convierten en zonas decoloradas la coloración amarilla indica una prueba positiva de actividad antioxidante (Burits y Burcar 2000; Cuendet *et al.*, 1997).

#### **4.3.3.3 Atrapamiento de los radicales libres DPPH.**

El uso del radical DPPH• proporciona una manera fácil y rápida para evaluar la actividad antioxidante de los extractos, los antioxidantes reaccionan con el radical DPPH• reduciéndolo, la capacidad de atrapar el radical depende del número de sus grupos hidroxilo disponibles en el extracto, que es equivalente al número de moléculas de DPPH•. Se empleó el método según Brand-Williams *et al.*, (1995) con algunas modificaciones (Prior *et al.*, 2005). Se determinó la capacidad de los extractos de (HS) y (MeOH) para atrapar el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracril (DPPH). Los extractos que dieron positivo a la prueba decoloración de β-caroteno fueron ensayados, 0.1 mL de los extractos disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) (a concentraciones de 50, 100, 500, 1000 µg/mL) se adicionaron a 3.9 mL de una

---

---

solución de DPPH a 0.1 mM en metanol. Se dejaron en incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos de reacción en la oscuridad. Para evaluar la velocidad de reacción, se determinó la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro (Lamba 11, Perkin Elmer), a los 0, 1 y 15 min, hasta que se alcanzó un estado estacionario. La absorbancia es proporcional a la cantidad de DPPH residual. Se utilizó como control DPPH (1.5 mL solución DPPH 0.1 mM + 1.5 mL de metanol), como estándares se utilizaron ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol (3.9 mL de solución DPPH 0.1 mM + 0.1 mL de estandar). Para cada extracto se calculó su capacidad (%) para reducir el radical, a los más activos se les determinó la concentración el EC<sub>50</sub>. Es decir, la capacidad de atrapar radicales se expresó como los  $\mu$ g/mL de sustancia antioxidante necesarios para disminuir la concentración inicial del radical a la mitad (Sanchez-Moreno 1998; Huang et al., 2005). Las pruebas y análisis se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición del DPPH<sup>\*</sup> se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$(\% \text{ inhibición}) = [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{muestra}})/(Abs_{\text{control}})] \times 100.$$

#### **4.3.3.4 Ensayo de la actividad de barrido del radical ABTS.**

Este método se basa en la capacidad de los antioxidantes para reducir el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>. La reducción del radical ABTS<sup>•+</sup> se determinó de acuerdo con Re et al., 1999. Una solución de ácido 2,2,9-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, 7.4 mM) se preparó en buffer fosfato salino (PBS) 100 mM a pH 7.4. Se agregó cloruro sódico (0.15 M), y se oxidó con persulfato potásico (2.45 mM) durante al menos 12-16 horas en la oscuridad, para obtener el catión ABTS<sup>•+</sup>. La solución fue diluida mezclando 1 mL de solución de ABTS<sup>•+</sup> con 60 mL de metanol para obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.05$  unidades a 734 nm usando un espectrofotómetro. Una solución fresca de ABTS<sup>•+</sup> fue preparada para cada ensayo. Para medir la capacidad antioxidante de la muestra se mezcló 1.5 mL de los extractos a 100  $\mu$ g/mL con 1.5 mL de solución de ABTS<sup>•+</sup>. La absorbancia de la mezcla anterior se midió a 734 nm después de 7 min. La capacidad del extracto para reducir el radical ABTS<sup>•+</sup> fue comparada con un estándar de Trolox. La disminución de la absorción a 734 nm se utilizó para calcular el porcentaje de reducción del radical en comparación con el control ( $\alpha$ -tocoferol).

$$(\%) = [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{muestra}})/(Abs_{\text{control}})] \times 100$$

---

---

#### 4.3.3.5 Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) del HS.

El ensayo de ORAC es una reacción para determinar y cuantificar radicales peróxido. El ensayo ORAC usa fluoresceína como reactivo fluorescente y fue propuesto por (Ou *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; y Cao *et al.*, 1993). Se utilizó fluoresceína de sodio (67 $\mu$ M) (Sigma, St. Louis, MO) en solución buffer de fosfato (PBS) (75 mM, pH 7.4) denominada solución madre. La solución de trabajo con 60 nM de fluoresceína se obtuvo por dilución de la anterior solución en PBS. Por otra parte, se prepararon 10 mL de una solución (fresca) 12 mM de AAPH (diclorhidrato de 2,2-azinobis(2-amidinopropano)) y se mantuvo en hielo. Se utilizó como curva patrón (8, 16, 24, 32 y 40 mM) de Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma, St. Louis, MO). La reacción se realizó en 3 mL con 0.25 mL de extracto, 2.5 mL de fluoresceína (60 nM) y 0.25 mL de AAPH, luego se incubó durante 10 min a 37 °C. La fluorescencia (excitación= 485 nm, emisión= 520 nm) se registró cada 5 min durante 50 min. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y el valor medio fue tomado para calcular el valor de ORAC, según lo recomendado por Huang *et al.*, (2002). La actividad antioxidante ORAC se expresó como moles de equivalentes Trolox (TE) por gramo de peso de planta y se calculó a partir del área bajo la curva, según lo propuesto por Cao y Prior, 1999. El área bajo la curva (AUC) se calculó como:  $AUC = (f_0 + f_1 + f_2 + \dots + f_n)/f_0$ . Dónde  $f_0$  es la lectura inicial de fluorescencia a 0 min y  $f_n$  es la lectura “n” de fluorescencia. El AUC se con la ecuación;

$$AUC_{net} = AUC_{muestra/standard} - AUC_{blanco}$$

#### 4.3.3.6 Capacidad quelante del HS.

En presencia de agentes quelantes, la formación del complejo ferrocina-Fe<sup>2+</sup> presenta coloración roja. El hierro es un prooxidante en los lípidos. La capacidad de los extractos para quelar el ion ferroso se estimó por el método de Dinis *et al.*, (1994). A una solución de FeCl<sub>2</sub> (0.1 mL a 2 mM) se le adiciona ferrocina (0.2 mL a 5 mM) y el extracto (1 mL a 100  $\mu$ g/mL). La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min. La absorbancia de la solución se midió a 562 nm. El porcentaje de inhibición de la formación del complejo ferrocina-Fe<sup>2+</sup> se calculó como  $\% = [(A_0 - A_s)/A_s] \times 100$ , donde  $A_0$  es la absorbancia del control (sin

---

---

extracto y sin EDTA),  $A_s$  absorbancia del extracto/estándar. Se utilizó como control estándar ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA).

#### **4.3.3.7 Actividad del HS para atrapar el óxido nítrico.**

El ensayo del óxido nítrico se realizó según lo reportado en la literatura (Sreejayan y Rao 1997). El nitroprusiato de sodio en solución acuosa a pH fisiológico genera espontáneamente óxido nítrico (NO), el cual interactúa con el oxígeno para producir iones de nitrito que se pueden cuantificar con el reactivo de Griess (Green et al., 1982). A 0.5 mL del extracto se le agregó 2 mL de nitroprusiato de sodio (10 mM) en regulador fosfatos. Los tubos de ensayo fueron incubados a 25 °C durante 150 min. Después se tomó una alícuota de 1.5 mL y se agregó 1.5 mL de reactivo de Griess (1% de orto-sulfanilamida, 5% de ácido fosfórico y 0.01% de naftil-etilendiamina, Sigma, St. Louis, USA). La absorbancia del cromóforo formado durante diazotización de nitrilosulfanilamida y su posterior acoplamiento con etilendiamina, se leyó a 546 nm. Como control positivo se empleó  $\alpha$ -tocoferol. El experimento se realizó por triplicado, el porcentaje de inhibición del óxido nítrico generado, se midió y se comparó con la absorbancia del control blanco (10 mM de nitroprusiato de sodio + regulador fosfato + reactivo Griess).

#### **4.3.3.8 Método de decoloración del $\beta$ -Caroteno.**

El método se encuentra reportado en la literatura (Moure *et al.*, 2000) y modificado por Peterson *et al.*, (2002) y Tepe *et al.*, (2005). Se basa en la capacidad de los extractos en disminuir la decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno en una emulsión ácida de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Se disolvió una muestra de 2 mg de  $\beta$ -caroteno cristalino en 10 mL de cloroformo, 1 mL de esta solución se introdujo en un frasco de fondo redondo que tenía 20 mg de ácido linoleico y 200 mg de Tween 40. El cloroformo se retiró por evaporación. Se adicionaron 50 mL de agua destilada al frasco con agitación. Se colocaron 5 mL de la mezcla anterior en tubos de ensayo que contenían 0.2 mL de los extractos y se agitó. La absorbancia (470 nm) se midió inmediatamente y luego a los 10, 20, 30, y 90 min. Los tubos se dejaron en incubación a baño maría a 50 °C durante todo el ensayo (Marco 1968).

---

---

Se preparó un blanco sin  $\beta$ -caroteno, se midió la absorbancia y se comparó con las muestras problema. Para corregir la influencia de color del aceite en el cálculo de la velocidad de degradación del  $\beta$ -caroteno, se añadieron cuatro alícuotas (50  $\mu$ l) de cada muestra a 5 mL del blanco. Se adicionaron 50  $\mu$ L de agua destilada a 5 mL de emulsión de  $\beta$ -caroteno y se trataron como la muestra correspondiente

La actividad antioxidante (AA) de las muestras fue evaluada en términos de decoloración del  $\beta$ -caroteno, y se expresó como porcentaje de inhibición mediante la ecuación:  $AA = 100[1 - A_0 - A_t] / A_0^* - A_t^*$

Donde  $A_0$  y  $A_0^*$  son los valores de absorbancias medidas a tiempo cero de incubación de la muestra y el control respectivamente,  $A_t$  y  $A_t^*$  son los valores de absorbancias de la muestra y el control respectivamente, después de incubar 90 min.

#### **4.3.3.9 Ensayo de tiocianato.**

El grado de oxidación del ácido linoleico se midió de acuerdo con el método de tiocianato férrico (FTC), (Kikuzaki y Nakatani 1993). La actividad antioxidante se define como la capacidad de un compuesto para inhibir la degradación oxidativa, en este caso la peroxidación de lípidos (Roginsky y Lissi 2005). Medio mililitro de extracto (a 50, 100 y 500  $\mu$ g/mL en etanol) fue mezclado con 2.5 mL de una emulsión de ácido linoleico (0.02 M en buffer de fosfatos (0.04 M) a pH 7.4) y se mantuvo a 37 °C en la oscuridad (24 h). Se tomaron alícuotas (0.11 mL) de la mezcla anterior y se diluyeron con 9.7 mL de etanol al 75 %. Luego se colocó 0.1 mL de tiocianato de amonio (al 30 %), y exactamente 3 min después se añadió a la mezcla de reacción 0.1 mL de cloruro ferroso (20 mM) en ácido clorhídrico al 3.5%. Después de 24 y 48 h de reacción, se midió la absorbancia a 500 nm. El  $\alpha$ -tocoferol sirvió como antioxidante de referencia. Como control se utilizó una mezcla de ácido linoleico (sin muestra y sin  $\alpha$ -tocoferol). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

#### **4.3.3.10 La actividad antioxidante por atrapamiento del anión superóxido.**

La actividad antioxidante del HS se determinó por el método descrito por Nishimiki (1972) con modificaciones, que se basa en la reducción del NTB por el anión superóxido generado por la enzima xantinaoxidasa. La mezcla de reacción (volumen total 3 mL) contenía: 50  $\mu$ L de una solución de nitroazul de tetrazolio (NBT

---

---

a 0.06 mM en regulador fosfato (50 mM), pH 7.4), 0.5 mL de solución de xantina (0.1 mM), 0.5 mL de EDTA (0.3 mM), 0.1 mL de extracto (25, 50 ó 100 µg/mL) y se completa a 2.5 mL con PBS. La reacción se inicia adicionando 0.5 mL de solución de xantina oxidasa (0.02 U/mL). La reducción del NTB por el extracto se determinó a 560 nm. Se usó como control positivo superóxido dismutasa (SOD, 100 U/mL) y se comparó con la absorbancia del blanco (xantinaoxidasaxantina + regulador fosfato + NTB). La capacidad de un extracto para atrapar el anión superóxido se determinó mediante la ecuación:

% actividad antioxidante =  $[(A_0 - A_s) / A_s] \times 100$ , donde  $A_0$  es la absorbancia del control (sin extracto y sin SDO),  $A_s$  absorbancia del extracto/estándar. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

### **Análisis estadístico**

Todos los valores obtenidos en este estudio se expresan como media  $\pm$  S.E.M y la desviación estándar. Las diferencias individuales entre los ensayos fueron analizados por la prueba t de Student. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

#### **4.3.4 Actividad hipoglucemiante de los extractos de *P. auritum*.**

##### **4.3.4.1 Animales.**

El estudio se realizó en ratas Wistar macho (libres de patógenos), que fueron proporcionadas por el Bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. Las ratas presentaron un peso de 180 a 225 g. Los animales fueron alojados en cajas de microlón en un ambiente controlado (temperatura de  $25 \pm 2$  °C) con dieta estándar de laboratorio (ratón 5015, Purina) y agua *ad libitum*. La basura fue removida tres veces por semana para garantizar la higiene y el máximo confort para los animales. Las ratas se aclimataron por un periodo de tres días en su nuevo entorno antes de la iniciación de los procedimientos experimentales. Se observaron en todo momento las normas éticas para el manejo de los animales (National Institutes of Health (NIH) publicación N ° 85-23 Revisión de 1985 y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999).

---

---

#### **4.3.4.2 Estudios de toxicidad aguda.**

Se utilizaron ratas Wistar albinas adultas sanas de ambos sexos, con un peso entre 180 y 230 g, en ayuno durante la noche, se dividieron en cuatro grupos (n = 6 por grupo). Las ratas fueron alimentados por vía oral con la solución acuosa de *P. auritum* a la dosis de 1, 2 y 3 g/kg de peso corporal para los grupos 1 a 3, respectivamente (Ghosh 1984). Al grupo control se le dio sólo agua. Los animales fueron observados de forma continua durante 2 h en busca de sus perfiles de comportamiento, neurológicos y autonómicos, y se observó de nuevo después de un período de 24 y 72 h para detectar cualquier letalidad (Turner 1965; OECDiLibrary 2002).

#### **4.3.4.3 Ratas diabéticas.**

La diabetes severa fue inducida en ratas en ayunas con una sola inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich, St. L USA), a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal disuelta en buffer de citrato de sodio frío (0.1 M, pH 4.5) (Maghrani et al., 2004; Like y Rossini 1976). La hiperglucemia fue corroborada por la medición de la glucosa en ayunas a las 72 h, y confirmada por un nivel de glucosa superior a 13 mM después de siete días de la inyección de STZ. Las ratas con un nivel alto de glucosa permanente en sangre en ayunas >300 mg/dl y otros síntomas de la diabetes, tales como la polidipsia y poliuria, se seleccionaron para su uso como animales de experimentación.

En algunos casos, una inyección de STZ puede desencadenar la liberación masiva a la insulina y dar lugar a hipoglucemia. La hipoglucemia generalmente es seguida por hiperglucemia que luego se hace permanente. Para evitar la muerte inducida por STZ, las ratas fueron alimentadas con una solución de glucosa al 3% durante 24 h. El consumo de alimento y agua, así como el peso corporal, se midieron diariamente durante cuatro semanas. Las concentraciones de glucosa en sangre se midieron cada semana.

---

---

#### 4.3.4.4 Diseño experimental

En el experimento se usaron un total 66 ratas (36 ratas diabéticas y 30 ratas normo glucémicas). Las ratas fueron divididas en 11 grupos de seis animales cada uno, los tratamientos programados fueron como se muestra:

1. Grupo I control normal recibió solamente solución de Tween 80 al 2%.
2. Grupo II ratas normales tratadas con extracto (100 mg/Kg peso del animal).
3. Grupo III ratas normales tratadas con extracto (200 mg/Kg peso del animal).
4. Grupo IV ratas normales tratadas con extracto (400 mg/Kg peso del animal).
5. Grupo V ratas normales tratadas con tolbutamida (40 mg/Kg peso de animal).
6. Grupo VI control diabético recibió solamente solución de Tween 80 al 2%.
7. Grupo VII ratas diabéticas tratadas con extracto (100 mg/Kg peso del animal).
8. Grupo VIII ratas diabéticas tratadas con extracto (200 mg/Kg peso del animal).
9. Grupo IX ratas diabéticas tratadas con extracto (400 mg/Kg peso del animal).
10. Grupo X ratas diabéticas tratadas con tolbutamida (40 mg/Kg peso de animal).
11. Grupo XI ratas diabéticas tratadas con glibenclamida (0.5 mg/Kg peso de animal).

Las suspensiones acuosas de los extractos de hexano, cloroformo y metanol de hoja santa fueron preparadas con 2% (v/v) de Tween 80, se administraron oralmente por medio de tubo gástrico diariamente a las 9:00 am (por una vez) durante 28 días. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron en ayuno el día 27 a las 2, 4, 6, 8, 12 h, a los grupos del tratamiento).

Se evaluó el efecto de cada extracto por medio de la determinación de los parámetros bioquímicos a cada grupo experimental empleando las siguientes técnicas: De la vena de la cola de las ratas se obtuvo muestras de sangre, de las cuales se obtuvo el suero, a partir del suero se determinó el colesterol total (CT), triglicéridos (TG) y lipoproteínas de alta densidad (HDL), utilizando un kit comercial de diagnóstico (Genzyme Diagnostics, USA) y el LDL-colesterol se calculó como la diferencia de colesterol total y HDL. Los niveles de glucosa en sangre se midieron utilizando el método glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD-POD) (Sang-Eun et al., 2007; Trinder 1969). La peroxidación de los lípidos, es decir, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se estimó por el método de Fraga et al., (1988) y se expresa como  $\mu\text{M/g}$  de TBARS en hígado y en el tejido renal.

---

---

#### **4.3.4.5 Peso corporal**

El peso corporal de las ratas (normales y diabéticas tratadas con los extractos), la ingesta de alimentos y agua fueron tomadas antes y durante las cuatro semanas subsecuentes a la inducción de hiperglucemia.

#### **4.3.4.6 Prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratas por el HS**

A las ratas de cada grupo se les administró por vía oral una suspensión acuosa de HS en dosis de 100, 200 y 400 mg/kg de peso corporal (diariamente durante 28 días). Para evaluar la sensibilidad de los animales a una sobrecarga de glucosa, al final del experimento se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa por vía oral (OGTT; Patrity et al., 2005). Para ello, en ayunas las ratas fueron alimentadas por vía oral con 2 g de glucosa/kg de peso corporal, luego se tomaron muestras de sangre de la vena caudal a partir de una pequeña incisión en el extremo de la cola (inmediatamente después de la carga de glucosa y a los 30, 60 90 y 120 min).

#### **4.3.4.7 Ensayo de contenido de glucógeno en el hígado y el músculo esquelético y actividades de glucose-6-fosfatasa (G6Pase), glucocinasa (GK) y hexocinasa (HK) en el hígado.**

Al final del experimento, las ratas fueron anestesiadas por inhalación con éter y subsecuentemente se sacrificaron por decapitación, el hígado y los riñones, fueron extraídos y congelados hasta su análisis.

La actividad de HK se midió por el método descrito por Kinney y Rodnick (2001; Panserat et al 2001). Los órganos de las ratas anteriormente descritos, se pesaron y se homogeneizaron (500 mg c/u; dilución 1/20) en (Tris·HCl (5 mmol/L), buffer que contiene 1 mmol/L de EDTA, 2 mmol/L cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 2 mmol/L ditioneitol (DTT), 1 mmol/L benzamida, pH 7.4, J.T Baker, México) en un baño de hielo. Los homogenizados fueron centrifugados a 1000 x g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se mezcló con 0.7 IU/mL de G6Pase y 0.4 mmol de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP, pH 7.4, Sigma-Aldrich, USA). De la mezcla anterior se tomaron 20 µL y luego fue iniciada la reacción por la adición de 0.1 mL de 10 mmol D-glucosa. La actividad de la enzima se determinó por el acoplamiento de la formación de 6-fosfogluconolactona a partir de la glucosa-6-fosfato por la reducción

---

---

de NADP usando la G6Pase, a 37°C y mediante el seguimiento de la absorbancia a 340 nm durante 3 min a intervalos de 30 s, una unidad de la actividad de la enzima fue definida como la cantidad que fosforila 1  $\mu$ mol de glucosa/min (Morgan et al., 2002).

El contenido de glucógeno hepático se midió por el método de antrona-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Davis y Granner 1996). Brevemente, el tejido del hígado (64 a 144 mg) se homogeneizó en cinco volúmenes de una solución de KOH al 30%, la mezcla se mantuvo en hielo. El homogeneizado se colocó en un baño maría (92°C) durante 20 minutos. El glucógeno del homogeneizado se volvió a disolver en agua destilada y se trató con reactivo de antrona (2 g de antrona/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 95% (v/v), Sigma-Aldrich, USA), la absorbancia se midió a 620 nm.

La actividad de G6Pase hepática (glucosa-6-fosfatasa) fue medida por el método de Baginski et al., (1969). La glucosa-6-fosfato en el extracto de hígado es convertida a glucosa y fosfato inorgánico por la G6Pase. El fosfato inorgánico liberado en presencia de molibdato de amonio (Sigma-Aldrich, USA) forma un complejo azul de fósforo-molibdato que se determinó a 700 nm. El contenido de proteína del extracto de hígado fue cuantificado por la reacción de Bradford (Bio-rad protein assay kit, USA) (Bradford 1976). La actividad G6Pase (mU) se expresó como mmol de fosfato liberado/mg de proteína/min.

La actividad de glucocinasa (GK) fue medida por el método descrito por Panserat et al., (2001). Los tejidos del hígado se homogeneizaron (dilución 1/20) en buffer (Tris-HCl (5 mmol/L), que contiene 1 mmol/L de EDTA, 2 mmol/L cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 2 mmol/L ditioneitol (DTT), 1 mmol/L benzamidina, pH 7.4, J.T Baker, México) en un baño de hielo y luego se centrifugaron, el sobrenadante obtenido fue mezclado con; adenosina trifosfato (ATP hasta 7 mmol/L), NADP hasta 2 mmol/L, y glucosa (100 mmol/L) a un pH de 7.5. La reacción enzimática se inició mediante la adición de 0.2 unidades de G6Pase y se incubó durante 5 min a 37 °C. El NADPH generado se midió mediante el seguimiento de la absorbancia a 340 nm. La actividad de GK fue estimada restando la tasa de formación de NADPH en presencia de glucosa 0.5 mmol/L con la de glucosa de 100 mmol/L (Tranulis et al., 1991). La concentración de proteína se cuantificó por Bradford y una unidad de

---

---

actividad enzimática (mU) se definió como los mmol de moléculas de sustrato convertido por 1 mg de proteína por minuto.

#### **4.3.4.8 Actividades de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GRd) y glutatión peroxidasa (GPx).**

Los hígados y riñones se mezclaron cada uno por separado, en un homogeneizador (Ultra Turrax T25, Rose Scientific Ltd., Edmonton, Canadá), con 10 volúmenes de buffer fosfato de sodio 50 mmol/L (pH 7.4) a 4 °C. Después de centrifugar a 6000 rpm el sobrenadante obtenido fue utilizado para evaluar las actividades de las enzimas antioxidantes usando los siguientes kits comerciales: El kit Bioxytech SOD-525 (Oxis Internacional, USA) para la actividad de la SOD, el kit de catalasa (Cayman Chemical, USA) para la actividad de CAT, el kit Bioxytech GR-340 (Oxis Internacional, USA) para la actividad de GR, y el kit GPx-340 (Oxis Internacional, USA) para la GPx.

#### **4.3.4.9 Estimación de la glicación de la hemoglobina.**

Se utilizó el método del ácido fenol-sulfúrico descrito por Nayak y Pattabiraman (1980). Se tomaron muestras de sangre a las ratas sacrificadas y se les agregó EDTA, se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y el plasma se decantó. Los hematíes se lavaron dos veces en solución salina normal y se almacenaron a -20°C durante 14 días (Stafender y Eaton 1983). Justo antes del ensayo, la muestra se descongeló a 30 °C, se tomaron 100 µL en un tubo de ensayo de vidrio, se le agregó 1.4 mL de agua destilada, fue mezclada durante 2 min en un vortex, se adicionó 0.5 mL de ácido oxálico (0.5 M), y fue calentado por 2 h en un baño de agua hirviendo. Los tubos se dejaron durante 10 minutos en un baño de hielo, posteriormente se añadió 1 mL de ácido tricloroacético (TCA, al 40%), luego la solución fue mezclada en un vortex durante 2 min y se centrifugó a 2000 rpm durante 1 min. Se tomó 1 mL del sobrenadante, el cual se trató con 3 mL de ácido sulfúrico concentrado y 0.05 mL de fenol (80%), se dejó en reposo durante 30 minutos para el desarrollo del color. Al finalizar este periodo la concentración del 5-hydroxymethylfurfural (5HMF) generado se determinó a 480 nm.

---

---

## **Análisis estadístico**

El efecto del HS de *P. Auritum* en cada parámetro se examinó mediante análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias individuales entre los grupos fueron analizados por la prueba de Dunnett utilizando el software SPSS versión 10. Valores con  $p < 0.05$  se consideran estadísticamente significativos. Los datos se expresan como media  $\pm$  S.E.M y la desviación estándar (n=6 ratas en cada grupo).

### **4.3.5 Efecto del HS en el páncreas**

#### **4.3.5.1 Diseño Experimental.**

De los mismos grupos de ratas (normal, diabéticas y diabéticas tratadas con el HS) utilizadas en el tratamiento para el ensayo de hipoglucemiante, se tomaron los páncreas de cada grupo, los cuales fueron retirados inmediatamente después de ser sacrificadas, se colocaron en solución salina con baño de hielo. A los páncreas se les eliminó el tejido adiposo, se pesaron, se picaron finamente y se homogeneizaron en buffer fosfato (50 mM, pH 7.4), luego se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de insulina (Davis y Granner 2001).

#### **4.3.5.2 Determinación de la insulina.**

La insulina en sangre y páncreas de las ratas diabéticas se midió mediante el inmunoreactivo de la prueba de insulina Glazyme Insulina-EIA (Wako Pure Chemical, USA) de acuerdo a Hissin et al., 1992. El nivel de insulina en suero se expresa en mIU/mL.

#### **4.3.5.3 La peroxidación lipídica y los ensayos de las enzimas antioxidantes.**

El tejido páncreas homogenizado que se describió en el inciso anterior se centrifugó (3000 rpm) en buffer fosfato (50 mM, pH 7.4) a 4 °C según el método de Johnson y Lardy (1967). La peroxidación de los lípidos, es decir, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y las actividades de enzimas antioxidantes en el páncreas se analizaron utilizando kits comerciales como se presentó en el apartado 4.3.4.8.

---

---

#### **4.3.5.4 Efecto protector del HS a las células- $\beta$ pancreáticas sometidas a estrés oxidativo.**

Los AGEs se generaron a partir de la coincubación de la BSA, con D-glucosa (AGE1) 0.1 mmol/L o D-gliceraldehído (AGE2) 0.2 mmol/L de acuerdo con el método de Kume et al., (2005). Las soluciones de BSA en presencia de AGE1 y AGE2 se incubaron a 37 °C durante ocho semanas y siete días, respectivamente. Como control se utilizó BSA sin glucosa, el cual se incubó a 37°C durante siete días (Chick et al., 1977; Lim et al 2008).

Las células- $\beta$  son vulnerables al estrés oxidativo. Se examinó el efecto del HS sobre las células- $\beta$  de páncreas sometidas a estrés oxidativo. Para ello, se cultivaron células ( $5 \times 10^5$  células/pozo) RIN-5F (ATCC: CRL-2058, línea celular derivada de células- $\beta$  pancreáticas de rata) en una placa de 12 pozos. Después de ser cultivadas por 72 h en 1 mL de medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. L USA) suplementado con 10% de FBS (suero bovino fetal), el medio de cada pozo fue eliminado. A las células RIN-5F adheridas a la placa, se les agregó 1 mL de medio fresco (RPMI 1640/1% de FBS) y fueron tratadas con el HS (50  $\mu$ g/mL), (Glu1, 500  $\mu$ L) y (Gli2 500  $\mu$ L) (preparados como se indica anteriormente), por otras 4 h. Después de 4 h de incubación, las células RIN-5F tratadas se incubaron a 37 °C por 20 min en DCFH-DA (diacetato de 2,7'-dicloro-dihidrofluoresceína) a una concentración final de 25  $\mu$ M (en RPMI 1640/1% de FBS). Finalmente, el nivel de peróxido intracelular se midió por la fluorescencia del DCFH (2,7diclorodihidrofluoresceína) en las células de cada pozo a una emisión de 530 nm y excitación de 488 nm (Son et al., 2013; Marina et al., 2000). La intensidad de fluorescencia es proporcional al estrés oxidativo.

#### **4.3.6. Aislamiento de bacterias, hongos y actinomicetos asociados a *P. auritum*.**

##### **Recolección de muestras de *P. auritum*.**

Diferentes tejidos de *P. auritum* se recolectaron el 1 de noviembre de 2012 en los sitios conocidos como Chilocuabe y Trapiche viejo en la parte noroeste del Estado de Oaxaca (Oax), Distrito de Cuicatlán en el Municipio de Chiquihuitlán de Benito Juárez, en la región de la Cañada (Sierra Madre-Norte). En Chilocuabe, se recolectaron muestras de una planta a la que se le denominó PS1, y en Trapiche

---

---

Viejo se recolectó material vegetal de una planta a la que se le denominó PS2. La primera recolección se localiza entre las coordenadas 17° 89' 6.7'' N y 96° 98' 7.3'' W, altitud 792 (msnm), la segunda recolección se localiza entre las coordenadas 17° 89' 1.7'' N y 96° 98' 7.8'' W, altitud 704 (msnm). Estos sitios presentaron un clima cálido húmedo, con temperatura de 20 a 26°C.

Se tomaron muestras de diferentes partes (hoja, tallo y flor). Las muestras, se colocaron en bolsas de polipropileno estériles, se etiquetaron y se transportaron inmediatamente al laboratorio, se mantuvieron en refrigeración a 4°C, y se procesaron al día siguiente. Un ejemplar de la planta fue depositado en el Herbario de Nacional de la UNAM, con el código de registro (No. 1340281).

#### **Lavado de muestra de tejido vegetal de *P. auritum*.**

Se tomaron 10 g de los diferentes tejidos, se lavaron por separado con espuma de jabón y se enjuagó con abundante agua, para eliminar del tejido las células muertas y la tierra.

#### **Aislamiento de bacterias**

Los tejidos previamente lavados, se sumergieron en etanol al 70% por 3 min con el fin de eliminar la mayoría de microorganismos epífitos. Las muestras se lavaron con agua destilada estéril, se cortaron en pedazos pequeños (1 cm) y se colocaron en cajas Petri (cinco pedazos/caja) con los siguientes medios de cultivo: Agar nutritivo (AN), agar R2A (R2A) y agar-tripticosa-soya (TSA) (Medios de cultivo Difco, Becton Dickinson, USA) y se incubaron a 22 °C (Zinniel *et al.*, 2002). Los aislados se purificaron por dilución y resiembra en los medios en que inicialmente fueron aislados. La pureza se confirmó por observación microscópica de la morfología y utilizando tinción de Gram (Figura 6).

#### **Aislamiento de actinomicetos**

Una muestra de hojas (1 g) se mezcló con 99 mL de agua destilada estéril y se mantuvo en baño maría por 1 h a 50°C. Este tratamiento es efectivo para reducir el número de bacterias no deseadas, favoreciendo el crecimiento de los actinomicetos. Después de sedimentar las hojas, se hicieron diluciones,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$

---

---

del sobrenadante y se sembraron por duplicado en placas de agar almidón caseína nitrato (SCNA) suplementadas con nistatina, cicloheximida y ácido nalidíxico (c/u a 10 µg/mL) para inhibir el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias Gram negativas. Las placas se incubaron a 28°C por al menos tres semanas. (Figura 6). Los aislados se resembraron en el medio correspondiente, hasta obtener cepas puras, lo que se confirmó por morfología y observación microscópica. Se realizó tinción de Gram a cada cepa aislada, para confirmar que eran Gram positivas.

### **Aislamiento de hongos**

Los tejidos lavados se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % por 5 min. Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril y se cortaron en pedazos pequeños con una navaja estéril. Los pedazos de tejido se colocaron sobre agar-papa-dextrosa (PDA marca Difco) y se incubaron a 22 °C (Strobel et al., 2004; Strobel et al., 1997). Los hongos que crecieron sobre o en la periferia de las muestras, se resembraron sucesivamente en PDA, hasta obtener cepas puras. La pureza de cada cepa aislada se comprobó por morfología colonial y microscópica (Figura 6).

### **Conservación de microorganismos.**

#### **Conservación de bacterias en glicerol al 10 %.**

A 25 mL de caldo nutritivo (bacteria) y caldo almidón caseína nitrato (actinomicetos), contenido en un matraz Erlenmeyer de 125 mL se le colocó una asada de las colonias de bacteria o de actinomicetos. Se incubó a 25 °C y 120 rpm hasta una densidad óptica DO = 0.6. Todo el caldo de cultivo se centrifugó durante 5 min a 10.000 rpm, se descartó el sobrenadante. Al paquete celular se le adicionaron 2.5 mL de glicerol al 10 % estéril y se agitó en un vortex por 30 segundos, se centrifugó por 5 min a 10.000 rpm (lo anterior se realizó dos veces, todo a 4 °C). El tercer sobrenadante se descartó y el paquete celular se resuspendió en 2.5 mL de glicerol estéril al 10%, alícuotas de 0.8 mL de la suspensión bacteriana se colocaron en tubos para criogénesis. Los tubos se introdujeron en nitrógeno líquido (-195,8 °C) hasta que el contenido se congeló y se almacenó a -80 °C. Nota: Mantener las células

a 4 °C, después de eliminar el medio de cultivo y hasta antes de congelar (Day y Stacey 2007; Dewald 1966).

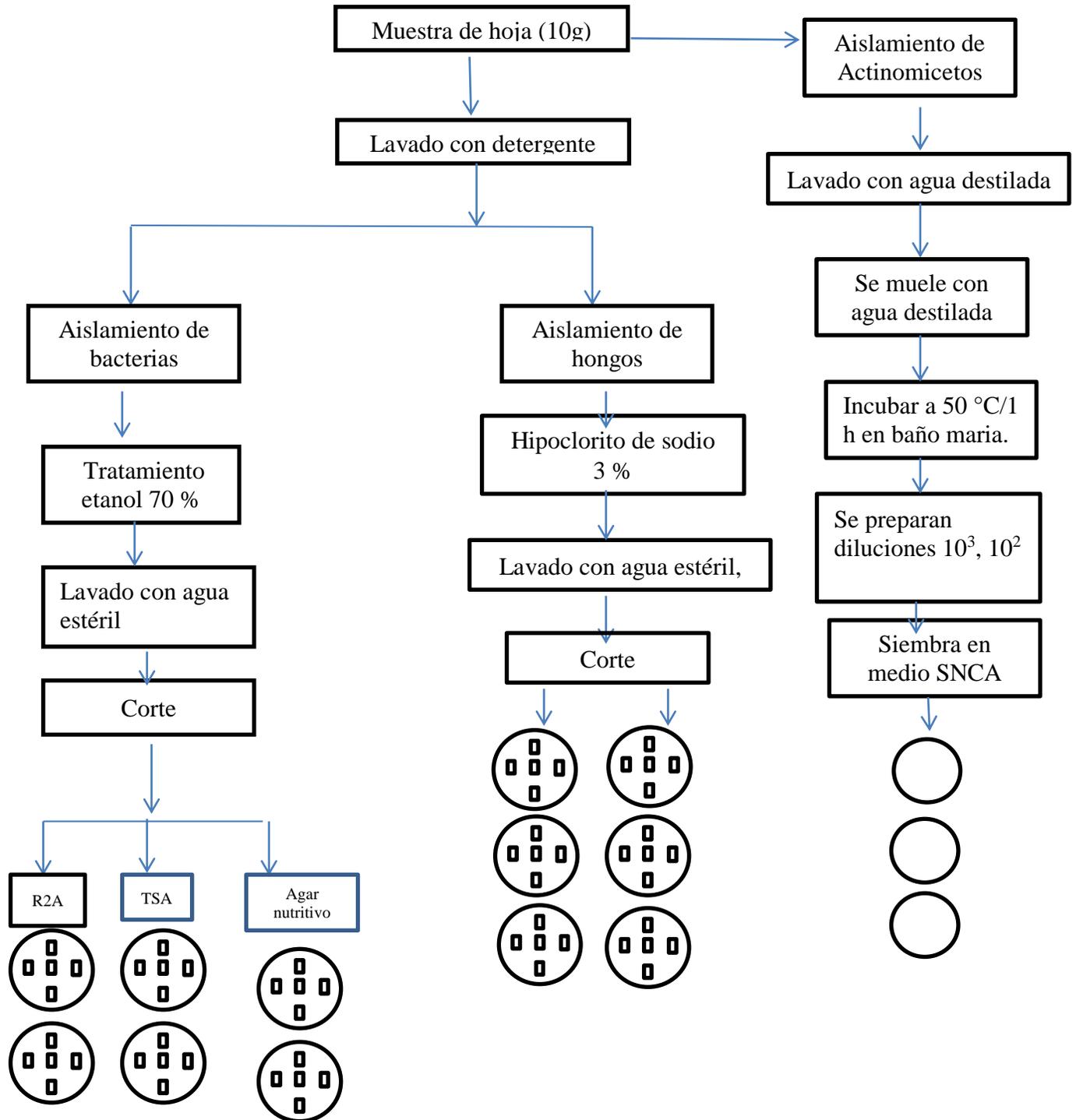


Figura 6. Diagrama de aislamiento de endófitos (bacterias, hongos y actinomicetos de las hojas *P. auritum*).

---

---

### **Conservación de cepas bacterianas por liofilización.**

Para obtener el paquete celular, se procedió como se describió en el párrafo anterior, pero en lugar de usar glicerol (10%) para los lavados se usó NaCl estéril al 0.09% y el paquete celular final se resuspendió en 1 mL de leche ultrapasteurizada, semidescremada. Alícuotas de 0.2 mL de la suspensión bacteriana se colocaron en ampolletas de vidrio estériles que se taparon con tela quirúrgica estéril, se congelaron con acetona fría y se liofilizaron. Se sellaron las ampolletas de vidrio con fuego y se almacenan a temperatura de refrigeración.

### **Conservación de hongos en agua estéril a 2-5 °C.**

Utilizando el extremo redondo de una pipeta Pasteur estéril, se cortaron cilindros de la periferia del crecimiento de cada hongo que presentó un crecimiento de 3-5 cm de diámetro en cajas Petri con medio PDA. Los cilindros (5/vial) se depositaron dentro de un vial con 2 mL de agua estéril. Después cerrar y sellar el vial con Parafilm, se almacenaron en refrigeración a 2-5 °C.

#### **4.3.6.1 Identificación taxonómica de las nueve cepas con actividad anti AGEs.**

Los aislados E2, E4, E7, E8, E9, E11, E13, E14 y E16 se cultivaron en medio BHI por 24 h. Una alícuota (2 mL) de cada cultivo se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min y el paquete celular se resuspendió en 200 µL de agua destilada estéril. Las muestras se procesaron con el Kit QIAamp DNA Mini QIAcube (240, Qiagen, Venlo, The Netherlands) y el DNA total se extrajo utilizando un equipo QIAcube (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Posteriormente el DNAg obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % (w/v), con un voltaje de 95 V, luego se reveló con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/mL). El DNA se visualizó con un transiluminador UV (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories Inc., Carlsbad, CA). El DNAg extraído se almacenó a -20°C hasta que se usó para la amplificación por PCR.

(Guitierrez 2014) diseñó los *primers* que se usaron para amplificar, un fragmento de 1500 pb del rDNA 16S y 1247 pb para el gen *rpoB*, además de asesorarnos en el desarrollo de este inciso.

Utilizando el DNAg como molde, se amplificó el rDNA 16S usando los *primers* universales.

(F27: 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3')

(R1492 5 'TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3').

La mezcla de reacción fue la siguiente:

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| Oligonucleótido F27          | 1 mL    |
| Oligonucleótido R1492        | 1 µL    |
| dNTP's                       | 0.5 µL  |
| Buffer con MgCl <sub>2</sub> | 2.5 µL  |
| Kapa Taq™                    | 0.5 µL  |
| DMSO                         | 2.5 µL  |
| DNA (100 ng/ µL)             | 1 µL    |
| Agua                         | 15.5 µL |

- La amplificación se llevó a cabo en las condiciones siguientes:

|                   |                   |       |        |
|-------------------|-------------------|-------|--------|
| <u>1 ciclo:</u>   | Desnaturalización | 95 °C | 5 min  |
| <u>25 ciclos:</u> | Desnaturalización | 95 °C | 30 seg |
|                   | Hibridación       | 55 °C | 30 seg |
|                   | Elongación        | 72 °C | 25 s   |
| <u>1 ciclo:</u>   | Elongación        | 72 °C | 7 min  |
| 1 ciclo           |                   | 4 °C  |        |

El producto de PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Los amplicones esperados de 1500 pb, se purificaron usando el kit Gene All Expin PCR y después fueron visualizados en gel de agarosa al 0.8 %. Los productos puros se cuantificaron en un equipo NanoDrop 8000 Thermo Scientific (USA) y se secuenciaron en Macrogen (Corea).

Las secuencias del rDNA 16S de la cepa 8-1 (forward y reverse) fueron alineadas y editadas a través del programa Geneius. Las secuencias fueron comparadas con las existentes en base de datos del GeneBank (NCBI).

---

---

El gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la RNA polimerasa se usó como *housekeeping* para confirmar la identidad de la cepa 8-1. Para ello, se diseñaron *primers* específicos a partir de un alineamiento múltiple de secuencias del gen *rpoB* de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli* obtenidas del GeneBank (NCBI). La amplificación del gen *rpoB* fue similar a como se describió para amplificar el rDNA 16S.

Los *primers* que se usaron para amplificar un fragmento de 1247 pb del gen *rpoB* fueron:

- LAPS 5'-TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT-3'
- LAPS27 5'-CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG-3

La secuencia parcial del gen *rpoB* (1200 pb aproximadamente), fue alineada utilizando el programa CLUSTAL W (alineación de secuencias múltiples) y EMBL-EBI, por sus siglas en inglés (The European Bioinformatics Institute, Part of the European Molecular Biology Laboratory). La secuencia al ser comparada con secuencias del Genebank mostró un porcentaje de similitud del 97 % con respecto a la especie *protegens*.

Con la secuencia alineada de la cepa 8-1, se obtuvo la agrupación de variantes genéticas el árbol filogenético mediante el análisis dentro del género de *Pseudomonas*, que fue construido utilizando el software MrBayes con la secuencia y secuencias muestreadas del GeneBank. El programa MrBayes es un programa para la inferencia bayesiana y la elección del modelo a través de una amplia gama de modelos filogenéticos y evolutivos. La cepa *Pseudomonas protegens* 8-1 se mantiene en nuestro laboratorio y en el proceso de registro en la Colección Nacional de Cultivos Microbianos. CINVESTAV, México.

#### **4.3.7 Cultivo de las bacterias, obtención del extracto de acetato de etilo y evaluación de la actividad anti-AGEs.**

En este trabajo se estudió la actividad anti-AGEs de 23 de las bacterias aisladas, las cuales se seleccionaron por su diferencia morfológica y el medio de cultivo en el que

---

---

fueron aisladas (Anexo 1). Cada aislado se cultivó por separado y se obtuvieron, en cada caso, los extractos de acetato de etilo (E1 a E23) de cada cultivo. Después se evaluó la inhibición de formación de AGEs de cada extracto usando el modelo BSA-glucosa.

#### **4.3.7.1 Reactivación de las bacterias**

Las suspensiones bacterianas se descongelaron, posteriormente de cada una de ellas se tomó una asada para inocular 5 mL de caldo nutritivo contenidos en un matraz Erlenmeyer de 125 mL de capacidad, y se incubaron a 22 °C a 120 rpm por 24 h. Se tomaron 0.5 mL del cultivo para inocular seis matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio líquido de caldo nutritivo y se incubaron a 22 °C a 120 rpm (24 h). De este último cultivo se tomaron 100 µL para sembrar placas que contenían medio BHI, las cuales se incubaron a 22 °C por 24 h.

#### **4.3.7.2 Preinóculo**

De cada cepa en caja, se tomaron cuatro colonias con un asa, se inocularon en 25 mL caldo S-7 contenidos en un matraz de 125 mL, el cual se incubó a 22 °C, 120 rpm y 24 h, en un incubadora refrigerada (modelo Innova 4330, New Brunswick Scientific Co., Inc. N.J., USA). El medio S7 contenía por litro (g/l); glucosa 1, fructosa 3, sacarosa 6, extracto de levadura 0.5, peptona de soya 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0036, buffer de fosfato 1 M (pH 6.8), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0025, MnCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.005, FeCl<sub>3</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.002, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.002, Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.0065, acetato de sodio 1, benzoato sódico 0,1 y fenilalanina 0.005. El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 min.

#### **4.3.7.3 Cultivo de las bacterias**

Con 1 mL del preinóculo se inocularon 100 mL de caldo S-7 contenidos en un matraz de 250 mL, se dejaron incubar por 24 h y 48 h a 22 °C a 120 rpm, en la incubadora.

---

---

#### **4.3.7.4 Obtención del extracto de acetato de etilo de la bacteria *Pseudomonas protegens* 8-1.**

El caldo de cultivo (20 L) obtenido de acuerdo con el inciso anterior se mezcló con acetato de etilo (7 L) en una licuadora por 3 min, la extracción se realizó tres veces. La fase orgánica se separó en un embudo de separación y se secó con sulfato de sodio anhidro. El extracto se concentró hasta sequedad en un rota vapor Büchi R-205/20 con temperatura del baño de 37 °C, temperatura de vapor 39 °C y presión de vacío 240 mbar. El extracto se disolvió en 5 mL de cloroformo, se colocó en un vial ámbar de 20 mL y el disolvente se evaporó en atmósfera de nitrógeno. El vial, una vez cerrado y sellado con Parafilm, se guardó en refrigeración a 4-7 °C hasta su análisis. A este extracto se le denomina de aquí en adelante EA 8-1.

#### **4.3.7.5 Purificación de EA 8-1 y obtención del compuesto activo.**

El EA 8-1 (5 g) presentó una consistencia aceitosa, color café oscuro. Se realizó un estudio de cromatografía en capa fina (CCF), con varios sistemas de eluyentes (ver anexo 2), resultando el mejor perfil de separación la mezcla de Hex:Me<sub>2</sub>CO (acetona) 2:1.5, con este sistema de eluyente se hizo un fraccionamiento inicial al EA en una columna empacada con gel de sílice 100 g. Se recolectaron 45 fracciones de 5 mL cada una, a las cuales se les realizó un estudio por CCF utilizando el mismo eluyente de la cromatografía en columna (CC), se reunieron las fracciones similares en cromatografía de placa fina, se obtuvieron seis fracciones denominadas F8-1-1 a F8-1-6. Se realizó la prueba de antiglicación a cada una de las fracciones obtenidas. Las fracciones F8-1-1, F8-1-2 y F8-1-4 tuvieron actividad de un 90%, por lo que se siguió la purificación de la fracción 8-1-2, como se puede observar en la Figura 7.

La purificación de la fracción 8-1-2 se realizó usando una CC y como eluyente CHCl<sub>3</sub>:MeOH:Hex 7:1:1.5, se obtuvieron cinco fracciones denominadas F812-1 a F812-5. La subfracción F812-2 presentó actividad anti-AGEs del 98% comparada con aminoguanidina del 57%. A la subfracción F81-22 se realizó una CC empacada con silica gel con sistema de elución (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:Hex 7:1.5:1.5). Se recolectaron cinco subfracciones denominadas F8122-1 a F8122-5, la fracción F8122-2 presentó actividad anti-AGEs de alrededor del 97%, por consiguiente se siguió la purificación

---

---

la fracción activa F8-1 222 se purificó a través de Sephadex LH-20 CC con MeOH, para dar las fracciones (F222-1 a F222-4). Finalmente, la fracción F222-2 (239 mg) se purificó por HPLC en fase inversa en C18, se eluyó con MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40) a 3 mL/min para dar 16.6 mg del compuesto A, como se muestra a continuación:

Se utilizó la técnica de HPLC analítico, se realizó en un Agilent Technologies 6200, utilizando una columna analítica ZORBAX-Eclipse XDB C18 4,6 x 250 mm x 5 m) para establecer las condiciones de purificación como la fase móvil MeOH o acetonitrilo:H<sub>2</sub>O, en modo isocrático o gradiente.

**Método:**

1. Se pesó 1 mg de las fracciones 8-1
2. Se realizó la prueba de solubilidad con los disolventes como MeOH-HPLC
3. Se realizó el filtrado de las fracciones y los disolventes.
4. Se realizó las alícuotas
5. Se estandarizó las condiciones como tiempo de retención, gradiente y se probó diferentes longitudes de onda detector UV, como diferentes fases móviles todo lo anterior en el equipo analítico de HPLC.
6. Se analizó los cromatogramas y se compararon con la línea base
7. Se realizó un ensayo en la columna analítica con una fase móvil en modo isocrático.
8. Teniendo ya las condiciones establecidas se realizó la purificación de la fracción 8-1222-2 en el equipo HPLC–Semipreparativo. Tipo de Columna (Semipreparativa ZORBAX–Eclipse XDB C18 9.4 x 250 mm x 5 µm). El Modelo del equipo que se utilizó es WATERS Delta 600 Delta.

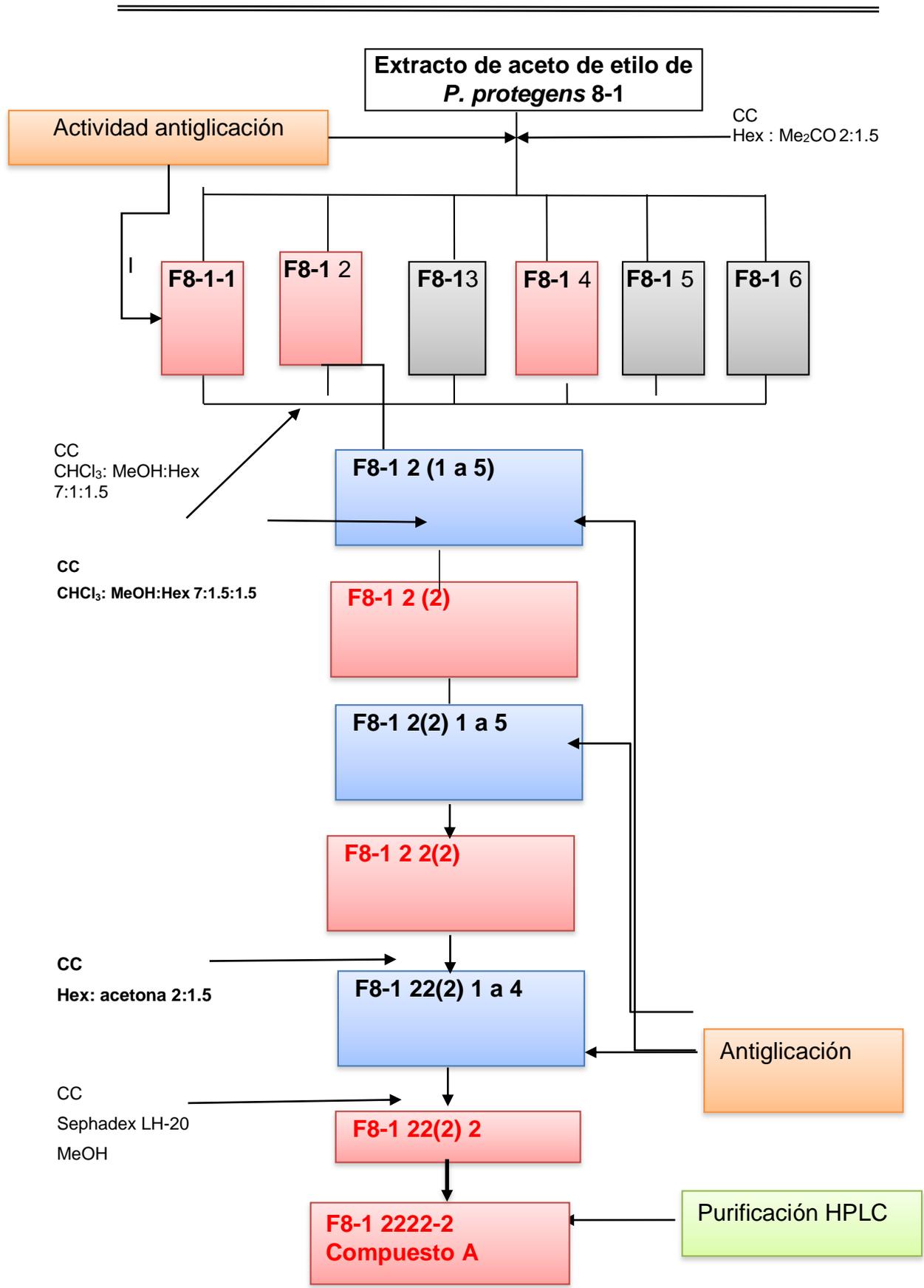


Figura 7. Purificación por cromatografía las fracciones del extracto de acetato de etilo del cultivo de la bacteria 8-1 con actividad anti-AGEs.

---

---

### **4.3.8 Técnicas instrumentales para la identificación de compuestos.**

#### **4.3.8.1 Método de la espectroscopia infrarroja (IR)**

- Los espectros de infrarrojo (IR) fueron tomados en película de bromuro de potasio en un equipo Buck-500.
- A continuación se presentan las indicaciones de cómo se prepararon las muestras para la obtención del espectro.
- Lo primero que se aconseja es limpiar todo el material a utilizar con acetona.
- La muestra sólida se mezcló con KBr puro y seco en un mortero hasta obtener un polvo fino. Las proporciones de muestra a KBr pueden variar y ello constituye uno de los pasos para optimizar en el procedimiento. Se sugiere comenzar en valores intermedios como una relación en peso de 1/100 muestra/KBr.
- Una pequeña porción del polvo obtenido, se colocó en un portador de muestra para preparar pastillas empleando para ello una prensa. La pastilla, que debe ser homogénea y finísima, se colocó en una placa para muestras. Es importante evitar la contaminación de la muestra y seguir las indicaciones sobre el uso de la prensa para hacer la pastilla.
- Una vez que la muestra sólida se ha preparado y colocado apropiadamente en la portamuestra se insertó en el espectrómetro.
- El espectro de cada muestra se corre bajo diferentes condiciones hasta la obtención del mejor espectro, el cual debe presentar en lo posible bandas finas e intensas.

#### **4.3.8.2 Espectroscopia Resonancia Magnética Nuclear RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ .**

La resonancia magnética nuclear (RMN) es un fenómeno físico basado en las propiedades magnéticas que poseen los núcleos atómicos. La RMN permite alinear los campos magnéticos de diferentes núcleos en la dirección de un campo magnético externo. La respuesta a este campo externo depende del tipo de núcleos atómicos, por lo que esta técnica puede utilizarse para obtener información sobre una muestra (Creswell 1979).

Los espectros (RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  300 y 75.4 MHz) fueron hechos en un equipo VARIANT Mercury DPX-300 MHz. (Acetona-  $d_6$ ), como referencia interna se usó

---

---

tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos se reportan en escala delta ( $\delta$ ) en unidades partes por millón (ppm).

- Para obtener un espectro de RMN, se colocó 10 mg del compuesto orgánico disuelto en 5 mL acetona deuterada en un tubo de vidrio largo (específico para RMN) que se coloca dentro del campo magnético del aparato.
- En los equipos modernos el campo magnético se mantiene constante mientras un breve pulso de radiación rf excita a todos los núcleos simultáneamente.
- Como el corto pulso de radiofrecuencia cubre un amplio rango de frecuencias los protones individualmente absorben la radiación de frecuencias necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín). A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín.

La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial. Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT-RMN) (Skoog 1989; Olsen 1990; Silverstein et al., 1991).

#### **4.3.9 Evaluación de la formación de AGEs**

##### **Ensayo de BSA-MGO.**

El ensayo BSA-metilglioxal (BSA-MGO) se realizó de acuerdo con Lee et al., 1998. Una solución de BSA (50 mg/mL) se incubó a 37 °C durante nueve días con MGO (100 mM) y azida de sodio (0.02%), en condiciones asépticas en 0.1 M de tampón fosfato (pH 7.4) y DAPG (4.8 mM, 1 mg/ml). La fluorescencia de la muestra se midió a (Ex 330 nm, Em 410 nm) también se midió un blanco sin la muestra problema. El % de inhibición de la formación de AGEs se determinó con la siguiente formula; como % =  $[(Ab - As)/Ab] \times 100$ , donde As es la absorbancia de la mezcla de reacción con la muestra problema, y Ab la absorbancia de la mezcla de reacción sin muestra problema (control blanco).. AG (10 mM) se utilizó como control positivo.

---

---

### **Ensayo fructosamina**

BSA glicada se ensayó para determinar la formación de los productos de Amadori como se describe por Johnson et al., 1983. Brevemente, una mezcla de reacción (5 mL) que comprende; BSA (10 mg/mL), solución de glucosa (500 mM), NBT reactivo (NBT 0.5 mM, 0.2 M en regulador de carbonato sódico a pH 10.4) y DAPG (4.8 mM, 1 mg/ml) se incubó a 37 °C durante siete días. El grado de reducción de NBT en la mezcla de reacción, frente a un blanco sin DAPG, se calculó midiendo la absorbancia (530 nm) a 5, 10 y 15 min para el blanco; y luego a los siete días para la muestra problema y el blanco. El porcentaje (%) de la inhibición de la reducción del NTB se calculó como  $\% = [(Ab - As)/Ab] \times 100$ , donde As es la absorbancia de la mezcla de reacción con la muestra problema, y Ab la absorbancia de la mezcla de reacción sin muestra problema (control blanco).

### **Radical hidroxilo generado por la autooxidación de azúcar**

La generación de radicales hidroxilo se evaluó mediante la inhibición de la hidroxilación benzoato, como se describe por Hunt et al., 1988. Brevemente, la mezcla de reacción contiene benzoato de sodio (1 mM), buffer de fosfato (100 mM, pH 7.2), ribosa (50 mM) y CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.1 mM), ya sea en presencia o ausencia de DAPG (4.8 mM, 1 mg/ml). La mezcla se incubó durante cuatro días a 37 °C y la fluorescencia se midió a (Ex 308 nm, Em 440 nm). El porcentaje (%) de la inhibición de la hidroxilación benzoato de metilo se calculó como  $\% = [(Ab - As)/Ab] \times 100$ , donde As es la fluorescencia de la mezcla de reacción con la muestra problema, y Ab la fluorescencia de la mezcla de reacción sin muestra problema (control blanco).

## **CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Este trabajo consiste en dos etapas. La etapa I: Actividades antiglicación, antioxidante e hipoglucemiante de extractos de hojas de *P. auritum*. La etapa II: Evaluar el efecto de los extractos de bacterias endofítas *P. auritum* para la inhibir la formación de AGEs y el aislamiento de un compuesto con actividad.

---

---

## Etapa I.

### 5.1 Obtención de los extractos crudos de hoja de *P. auritum*.

Los extractos de hexano, cloroformo, metanol y agua una vez secos, presentaron una consistencia semisólida (color café claro y verde negruzco) y olor característico. Los rendimientos de extractos fueron; de hexano (HS 6.5%), de cloroformo (CHCl<sub>3</sub> 4.6%) y metanol (MeOH 10%).

### 5.2 Inhibición de formación de AGEs de los extractos

La fluorescencia es una característica de los AGEs y ésta se incrementa con el tiempo de incubación en el modelo BSA-glucosa. En este modelo, los extractos de (CHCl<sub>3</sub>) y (HS) a 50 mg/mL reducen la fluorescencia de manera significativa, presentaron mayor a 80% la inhibición de formación de AGEs, como se observa en la (Tabla 1), comparada con el control positivo con aminoguanidina (AG 10 mM) que presentó 53.8% de inhibición. Los extractos HS y CHCl<sub>3</sub> mostraron EC<sub>50</sub> de 0.15 µg/mL y 0.93 µg/mL, respectivamente, mientras que el extracto hidroalcohólico exhibió un EC<sub>50</sub> de 20.1 µg/mL (Pérez et al., 2010). El extracto de hexano (HS) inhibe la formación de AGEs en mayor medida que los extractos de otras plantas (Kim y Kim 2003). Por ejemplo, los extractos etanólicos de las hojas de *Origanum officinalis* y *Eugenia caryophyllata* (a 50 µg/mL) presentaron 53% y 47% de inhibición respectivamente.

Tabla 1. Efecto de los extractos (CHCl<sub>3</sub>), (HS) y (MeOH) de *P. auritum* en la formación de AGEs.

| Extracto <sup>b</sup> | AGEs % <sup>c</sup><br>Inhibición |
|-----------------------|-----------------------------------|
| Metanol               | 45.9 ± 1.17                       |
| Hexano                | 87.4 ± 0.31                       |
| Cloroformo            | 98.6 ± 0.81                       |
| Aminoguanidina        | 53.8 ± 2.7                        |

Los valores fueron medidos por triplicado, <sup>b</sup> B.S = base seca, <sup>c</sup> % de inhibición de la formación de AGEs a 50 mg/mL, se muestra la media y la desviación estándar.

---

### 5.3 Actividad antioxidante.

#### 5.3.1 Actividad antioxidante en placa

Después de los 30 min de reacción, los extractos HS y MeOH fueron positivos en esta prueba rápida, a juzgar por la presencia de manchas amarillas. Es decir, los extractos HS y MeOH se oxidan en presencia del DPPH reduciéndolo, protegiendo así al  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (Figura 8).

| HS   | Hoja metanol   | Resultado |
|--|--|-----------|
|   |   | ++        |
| CHCL <sub>3</sub>  | Hojas agua   |           |
|  |  | --        |

Figura 8. Actividad antioxidante de los extractos de hexano, cloroformo y metanol de *P. auritum*. Por el método de decoloración del  $\beta$ -caroteno en placa.

Sin embargo, debido a la naturaleza compleja de los extractos de *P. auritum*, es insuficiente evaluar la actividad antioxidante de los extractos por un único método. Por lo tanto, se llevaron a cabo varios métodos adicionales para evaluar la capacidad de los extractos que fueron positivos a la prueba rápida. El contenido de fenoles totales en el extracto MeOH fue muy bajo, sólo el 0.3%, es decir, no hay correlación entre la actividad antioxidante con el contenido de fenoles totales en el extracto HS, lo que implica que dicha actividad no se basa en la presencia de antioxidantes polifenólicos.

---

---

### 5.3.2 Determinación de actividad antioxidante del HS por el ensayo DPPH.

El método DPPH se basa en el uso de el radical 1,1-difenil-2-picrilhidracril (DPPH•). La capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH. El DPPH es un radical estable, oxidante y comercialmente disponible que extrae un electrón del antioxidante. La reacción es visualmente perceptible por el cambio de coloración de violeta a amarillo por la reducción del radical. Los antioxidantes se pueden clasificar, según el tiempo necesario para alcanzar una cierta absorbancia como; rápido <5 min, 15 min intermedio y lento >30 min (Sánchez-Moreno et al., 1998). La Figura 9 ilustra el comportamiento cinético del HS y otros antioxidantes de referencia ( $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico y Trolox). Una caída rápida de la absorbancia se produjo en el ensayo con el HS en los primeros cinco minutos, pero después de 10 min la absorbancia disminuyó lentamente y se mantuvo constante hasta los 50 min. Por lo tanto, la actividad antioxidante del HS se puede considerar intermedia (Sánchez-Moreno et al., 1998). El radical DPPH• reaccionó rápidamente con los tres antioxidantes control: con el ácido ascórbico, Trolox y  $\alpha$ -tocoferol, los dos primeros presentaron un estado estacionario en cinco minutos, mientras que la absorbancia de  $\alpha$ -tocoferol se mantuvo estable después de 15 min (Figura. 9). Este resultado concuerda con los datos reportados por Sánchez-Moreno, quien identificó los dos primeros antioxidantes como rápidos y  $\alpha$ -tocoferol como intermedio.

El HS (a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inhibió 40% la reducción del radical DPPH•, comparado con el control de  $\alpha$ -tocoferol de 97%. El extracto HS presentó una actividad antioxidante similar a la del ácido ascórbico (50%). El HS presento similiar actividad antioxidante a las dihidrochalconas obtenidas de las hojas de manzana (*Malus domestica*) (Bernonville et al., 2010).

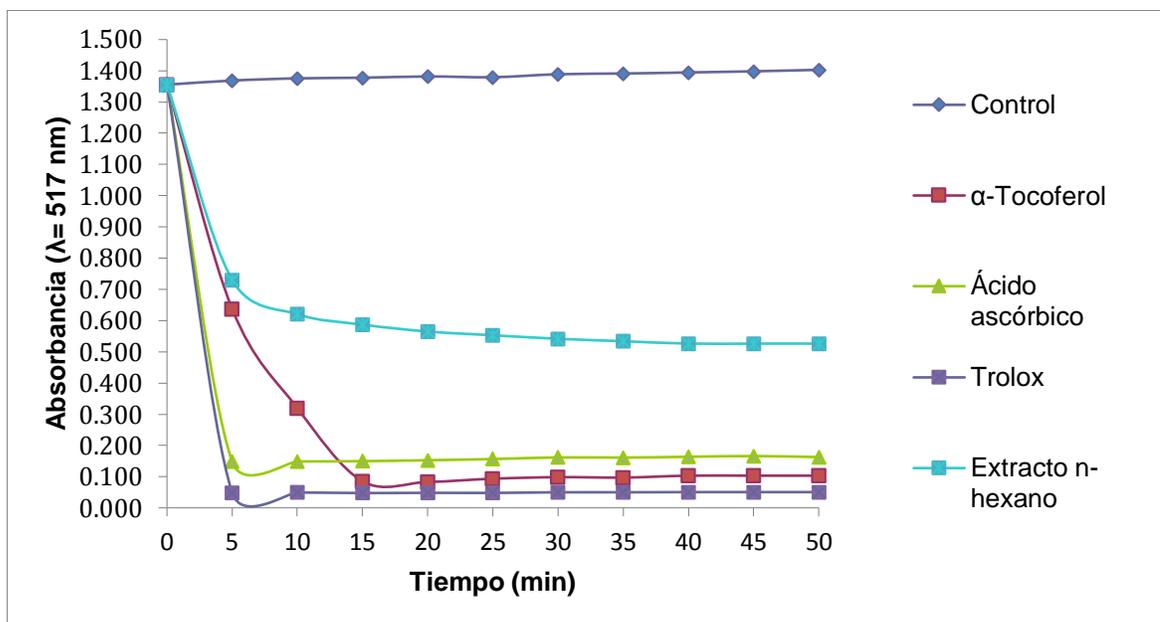


Figura. 9. Actividad antioxidante de HS,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico y Trolox medida por la reducción del radical DPPH. Los valores se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar y  $^a p < 0.05$  en comparación con el grupo control.

### 5.3.3 Actividad antioxidante de HS por el ensayo ABTS.

El ensayo se considera un modelo de radical hidrofílico y lipofílico, que usa radicales libres de  $ABTS^+$  generados por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio. Mediante el ensayo se evalúa la capacidad de un antioxidante para reducir el radical catión  $ABTS^+$  por transferencia de electrones (Re et al., 1999). La Figura 10 muestra el curso temporal de la absorbancia durante el ensayo con el HS. El HS reduce el radical  $ABTS^+$  a los 7 min, esta reducción se mantiene a los 30 minutos. La reducción fue de 62.7% para el HS y 70.5 % para  $\alpha$ -tocoferol, ambos a 100  $\mu g/mL$ . Entonces, el HS puede considerarse rápido y eficaz para atrapar el radical  $ABTS^+$ . El HS tiene más capacidad de atrapar el radical  $ABTS^+$ , que al radical  $DPPH^{\bullet}$ , lo cual es significativo, factores como la estereo selectividad de los radicales o la solubilidad del extracto en los diferentes sistemas de prueba pueden afectar la capacidad de los extractos de reaccionar e inhibir los diferentes radicales. De manera similar, Van et al., 1999, encontraron que algunos extractos de plantas tienen actividad antioxidante en ABTS y no en DPPH.

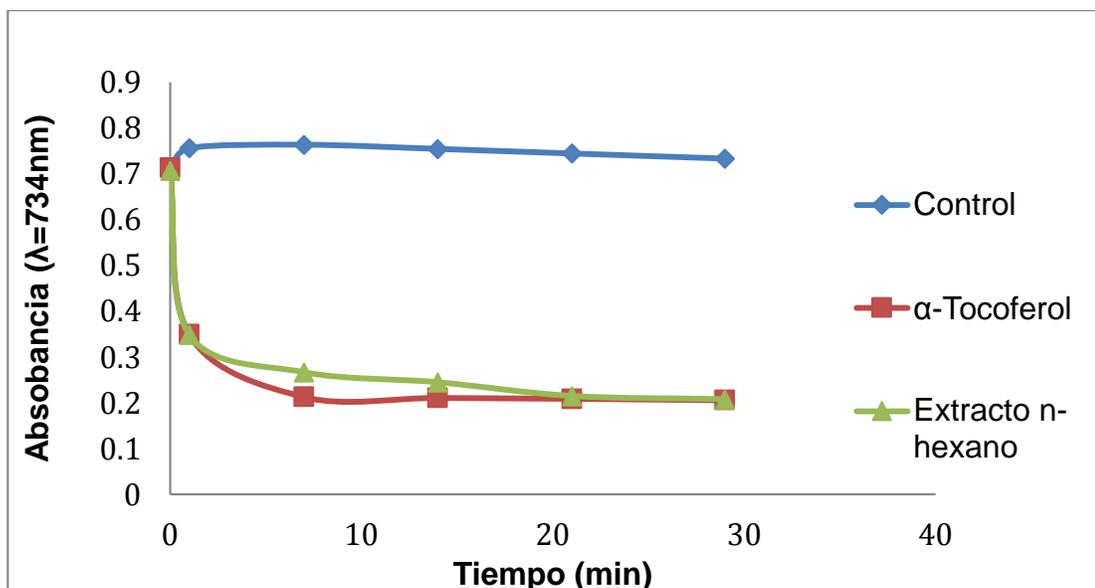


Figura.10. Actividad antioxidante del HS y  $\alpha$ -tocoferol medida por la reducción del radical catión  $ABTS^+$ . Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar  $^a p < 0.05$  en comparación con el grupo control.

#### 5.3.4 Actividad antioxidante de HS por el ensayo ORAC.

El ensayo ORAC se considera un modelo de radical hidrofílico y lipofílico. Este ensayo se basa en la reacción de radicales peroxilo con la fluoresceína, ocasionando una disminución concomitante de la fluorescencia de ésta (Frankel y Meyer 2000). El reactivo AAPH (2,2-azinobis (2-amidinopropano)-diclorhidrato) se usa para producir los radicales peroxilo. La actividad del antioxidante se expresa mediante valores  $ORAC_{ROO^+}$  que se representan como equivalente a Trolox. El HS mostró actividad antioxidante significativa, con  $ORAC_{ROO^+}$  de  $48.3 \pm 4.28 \mu\text{molTE/gMS}$  (Figura 11). Los componentes antioxidantes del HS compiten con la fluoresceína para reaccionar con los radicales libres, lo cual se refleja en la protección contra un cambio en la fluorescencia. Los ensayos ORAC y TEAC (Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox, por sus siglas en inglés) son métodos de que se basan en inhibir cambios en la fluorescencia y coloración, respectivamente. TEAC refleja la capacidad de compuestos antioxidantes para donar electrones (ET) por ejemplo el radical ABTS. El ORAC representa la capacidad de los antioxidantes en realizar la transferencia de átomos de hidrogeno (HAT) al radical (Prior et al., 2005). Los valores ORAC, ABTS y DPPH indicaron que el HS posee una capacidad antioxidante significativa por la reducción de los diferentes tipos de radicales analizados.

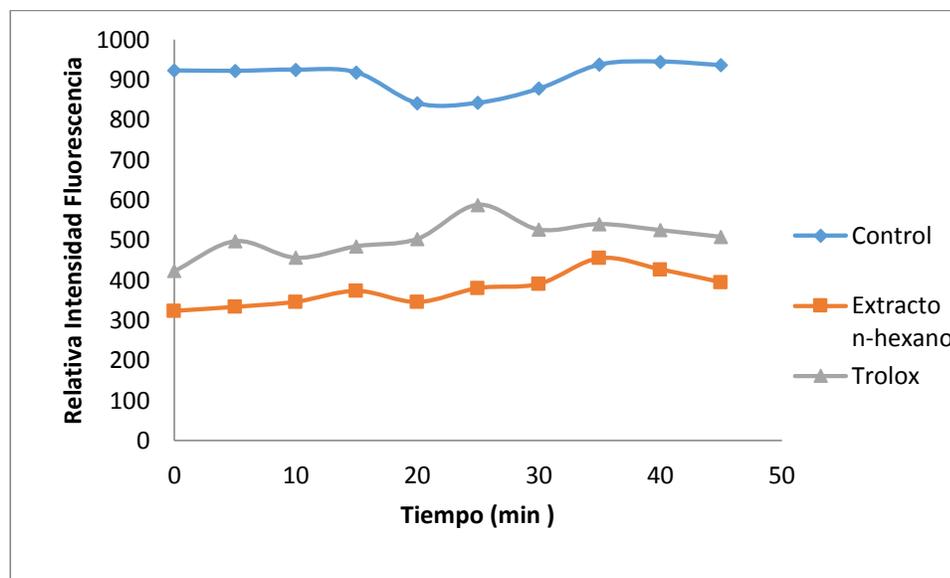


Figura 11. Actividad antioxidante del HS por el método ORAC. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar y  $p < 0.05$  en comparación con el grupo control.

### 5.3.5 Actividad quelante del HS

La actividad quelante del HS fue medida por la inhibición de la formación del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrocina, el cual puede ser medido por absorbancia a 562 nm. La formación del complejo de  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrocina fue incompleta en la presencia de HS, ya que el HS compite por el metal con la ferrocina. A los 20 min de reacción, el HS mostró una actividad quelante de 37.32%, en comparación con 38.59% del EDTA (Figura 12). Es decir el HS tiene una actividad quelante muy significativa y similar a la del EDTA.

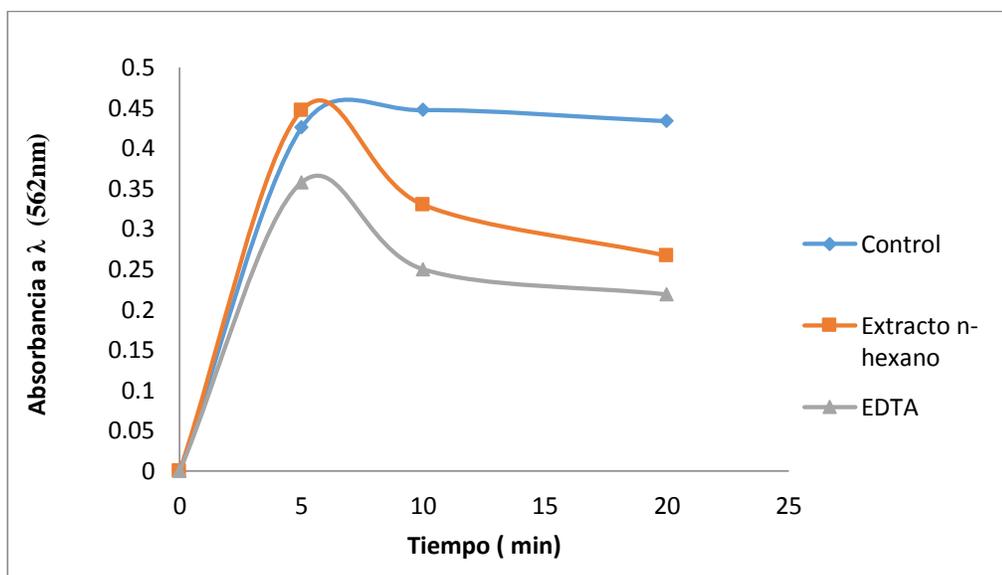


Figura 12. Actividad quelante del HS y EDTA medido por la disminución del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrocina. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar y  $p < 0.05$  en comparación con el grupo control.

### 5.3.6 Captura del óxido nítrico por el HS.

La actividad antioxidante del HS se midió por la disminución de la producción del radical óxido nítrico (NO). El nitroprusiato de sodio en solución acuosa a pH fisiológico genera espontáneamente NO, el cual en presencia de oxígeno reacciona para producir iones de nitrito, los cuales se pueden cuantificar con el reactivo de Griess (Sreejayan 1997). La Figura 13, muestra que el HS tiene una actividad antioxidante significativa. El HS y el  $\alpha$ -tocoferol inhibieron la formación de NO en 74% y 70.45%, respectivamente. El óxido nítrico es un radical libre producido en células vivas, participa en la regulación de diversos procesos fisiológicos, sin embargo, su producción en exceso juega un papel importante en la patogénesis del dolor e inflamación (Reichenbach et al., 2005).



Figura 13. Actividad antioxidante de HS medida por la formación de radicales NO. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar y  $^a p < 0.05$  en comparación con el grupo control positivo.

### 5.3.7 Método de decoloración de $\beta$ -caroteno.

La prueba de decoloración del  $\beta$ -caroteno se basa en la pérdida del color amarillo de  $\beta$ -caroteno debido a su reacción con radicales formado por la oxidación de ácido linoleico en una emulsión. La prueba de decoloración del  $\beta$ -caroteno es usada para medir la capacidad antioxidante de un compuesto o una mezcla, es decir, de inhibir la oxidación de  $\beta$ -caroteno en la fase de iniciación, así como en la fase de propagación (Koleva *et al.*, 2002). En este ensayo se determina la actividad de antioxidantes hidrofóbicos, ya que estos tienen afinidad por la fase lipídica, donde

---

---

pueden reaccionar con los radicales peroxilo evitando la oxidación del  $\beta$ -caroteno (Frankel y Meyer 2000). El HS fue más activo comparado con el extracto MeOH. El HS inhibió 79% la oxidación del  $\beta$ -caroteno a los 90 min de reacción (Figura 14). La actividad antioxidante del HS fue mayor que la reportada para los extractos de otras plantas (Materska y Perucka 2005).

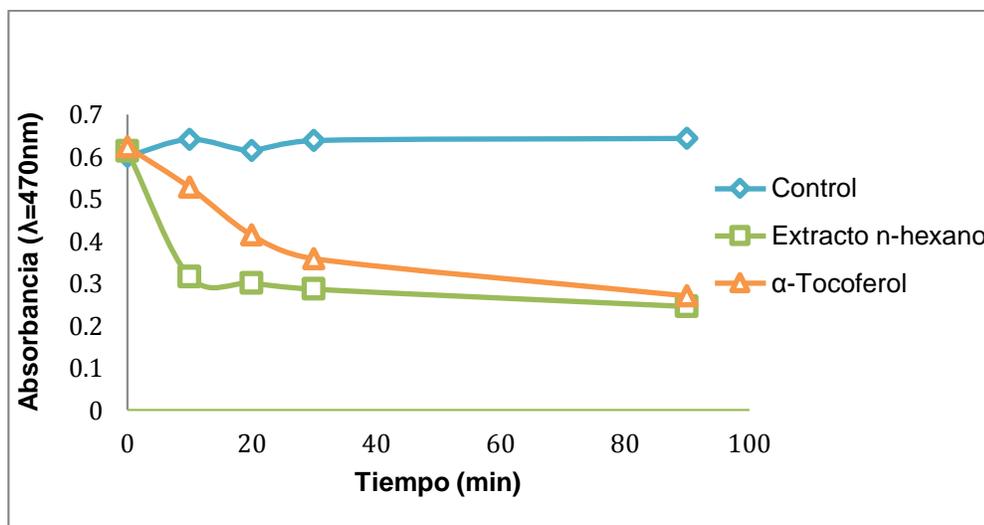


Figura. 14. Ensayo actividad antioxidante del HS y  $\alpha$ -tocoferol usando el método de decoloración del  $\beta$ -caroteno. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar y  $^a p < 0.05$  en comparación con el grupo control.

### 5.3.8 Actividad antioxidante del HS mediante el ensayo de tiocianato (FTC).

En este ensayo, el ion ferroso se oxida por los radicales linoleato (hidroperóxidos) para formar el ion férrico que forma un complejo tiocianato-férrico (FTC) que es medido a 500 nm. La Figura 15 muestra que el HS inhibe la oxidación de ión ferroso significativamente ( $p < 0.05$ ). Por lo tanto, inhibió 91.89% a las 24 h comparado con el  $\alpha$ -tocoferol del 92.1% de inhibición. Los compuestos antioxidantes del HS protegen al ácido linoleico de la peroxidación. El HS mostró una alta actividad antioxidante por la inhibición de la formación de ion férrico.

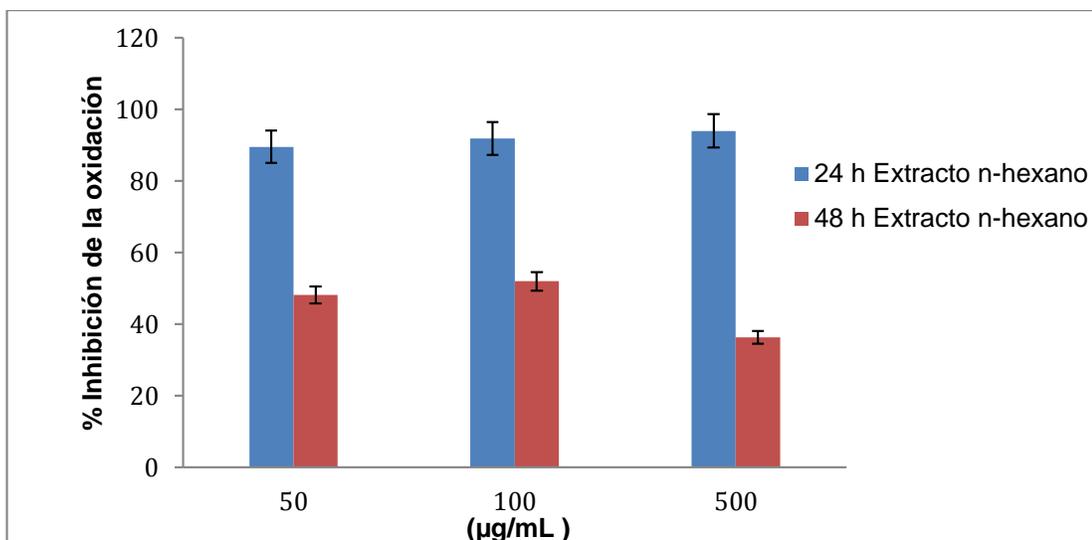


Figura 15. La inhibición de la oxidación del ácido linoleico por el HS, se expresan como media  $\pm$  desviación estándar y <sup>a</sup> $p < 0.05$  en comparación con el grupo control.

### 5.3.9 Actividad captadora del anión superóxido del HS.

El anión superóxido es un precursor de la formación de EROS (e.g., peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo) en los sistemas vivos. Para determinar la actividad antioxidante del HS se usó el sistema xantina/xantina oxidasa que produce el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), este último reduce al NBT (las sales de tretrazolio son indicadores coloridos muy sensibles a reacciones enzimáticas redox), y se forman un producto insoluble azul, es decir, el formazan. Una disminución de la absorbancia a 560 nm por antioxidantes, indica el consumo de anión superóxido en la mezcla de reacción.

En la Figura 16 se muestra que el HS tiene una actividad antioxidante significativa (a 100 µg/mL),  $97.9 \pm 2.88\%$  de inhibición de la reducción del reactivo NTB, comparado con el control superóxido dismutasa  $42.2 \pm 0.54\%$  de inhibición ( $p < 0.05$ ). El superóxido se ha implicado en las reacciones de oxidación relacionadas con la diabetes y el envejecimiento. Por lo tanto, la disminución de la formación del anión superóxido es importante para evitar la propagación de la formación de EROs.

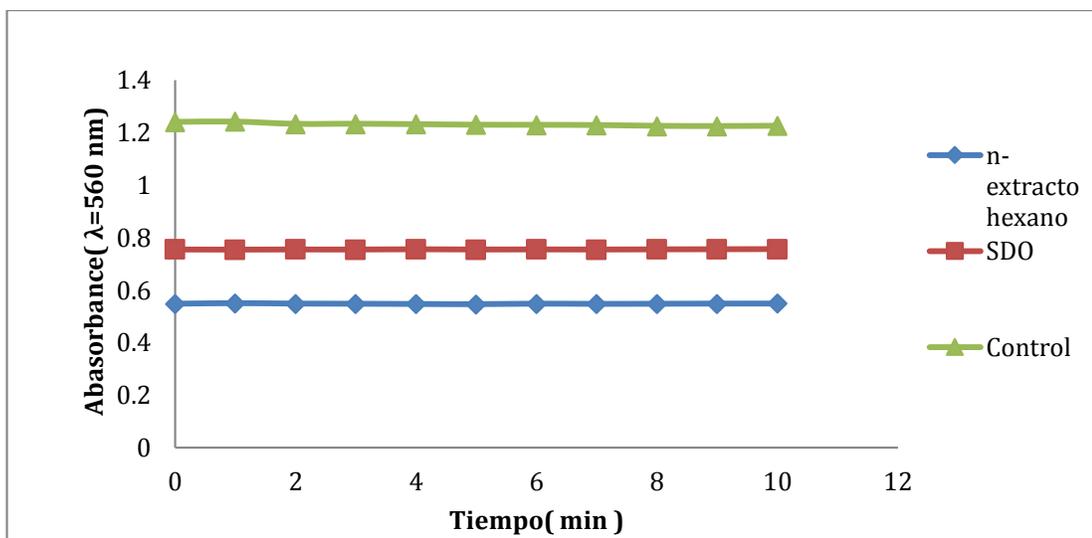


Figura 16. Actividad antioxidante del HS y SOD en la inhibición de la formación de radicales superóxido. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ) y  $^a p < 0.05$  en comparación con el grupo control.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la elección de los disolventes de extracción no puede ser arbitraria, por lo tanto, un paso muy importante es la búsqueda de un disolvente que pueda extraer los componentes con capacidad para inhibir los radicales libres. Además, un disolvente puede ser el más adecuado para una especie de planta y no para otra. Como ejemplo, en esta investigación el uso del hexano como disolvente, es el más adecuado para la extracción de componentes con actividad antioxidante.

## 5.4 Actividad hipoglucemiante.

### 5.4.1 Evaluación de la toxicidad de los extractos.

Las suspensiones acuosas de los extractos de hexano, cloroformo y metanol de *P. auritum* no causaron ninguna mortalidad en las ratas a dosis de 3 g/kg de peso corporal, tampoco se encontraron reacciones tóxicas a ninguna de las dosis usadas en este estudio.

### 5.4.2 Evaluación del peso corporal, la ingesta de alimentos y agua en ratas.

Cuando las ratas son inyectadas con estreptozotocina (STZ) rápidamente se observan los signos característicos de la diabetes: destrucción de las células- $\beta$ ,

---

---

trastorno de la secreción de insulina lo que causa alteraciones físico-metabólicas, aumento de los niveles de glucosa, menor peso corporal, aumento de la ingesta de alimentos y agua en comparación con el control normal. En la Tabla 2 se muestran el peso corporal, el consumo de comida y agua en el grupo control, y en el grupo de animales diabéticos. La inducción de diabetes por STZ (50 mg/kg) dio como resultado una elevada ingesta en ambos controles. Como se muestra en la Figura 17 la tasa de éxito de la inducción de diabetes (definida como una concentración de glucosa en sangre de 13 mM y un consumo de agua mayor de 100 mL/d en el séptimo día) fue de aproximadamente 90%. Todos los controles de ratas Wistar sobrevivieron a cuatro semanas después de la inyección de STZ. En control diabético la concentración de glucosa en sangre se mantuvo elevada (> 13 mM) durante las cuatro semanas de evaluación.

Se observó una disminución significativa del peso corporal en las ratas diabéticas en comparación con las ratas control durante los 28 días que duró el estudio. Sin embargo, la administración diaria del HS a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg a ratas diabéticas aumentó el peso corporal, por ejemplo a 400 mg HS/kg presento la mayor ganancia de 192.4g de 225.1g,  $p < 0.05$ . También la administración de HS dio lugar a una disminución de la ingesta de agua y alimentos en comparación con las ratas normales de los grupos experimentales. Estas observaciones podrían deberse al efecto de HS en los niveles de glucosa en sangre.

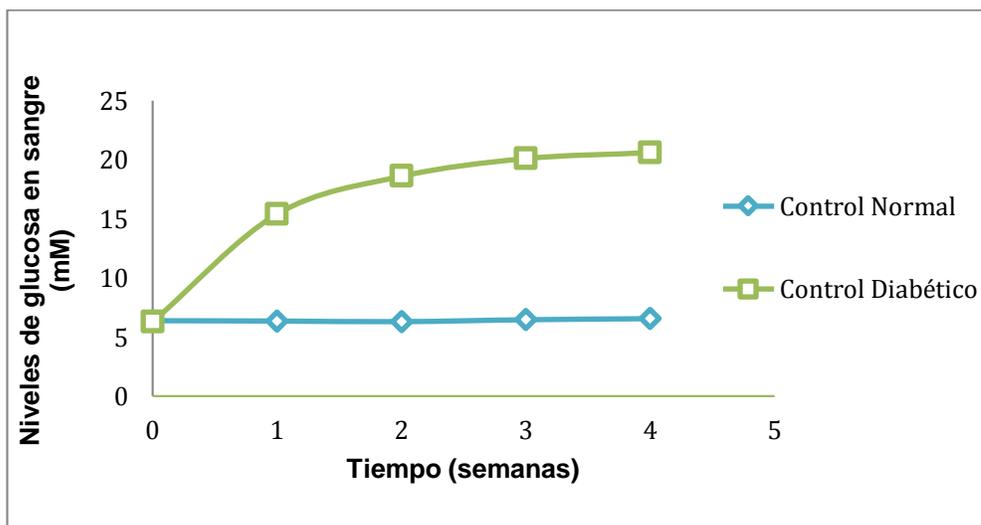


Figura 17. Nivel de glucosa en ayuno de ratas normales y tratadas con STZ dentro de las 4 semanas de estudio.

Tabla 2. Efecto del HS en características físico-metabólicas de ratas.

| Grupo<br>(mg/kg) | Peso del cuerpo (g) |                          |                         | Consumo                 |                          |
|------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                  | Inicial             | Final                    | Ganancia                | Alimento (g/d)          | Agua (mL/d)              |
| Normal           | 232.6 ± 5.0         | 284.4 ± 7.4              | 51.8 ± 4.8              | 20.7 ± 1.8              | 40.6 ± 3.1               |
| Diabético        | 189.4 ± 5.2         | 158.7 ± 6.3              | 30.7 ± 2.6              | 31.4 ± 1.2              | 139.8 ± 5.7              |
| HS 100           | 165.4 ± 2.9         | 180.8 ± 4.4 <sup>a</sup> | 15.4 ± 1.6 <sup>a</sup> | 29.6 ± 1.2              | 120.3 ± 3.9              |
| HS 200           | 177.3 ± 4.2         | 186.4 ± 3.1 <sup>a</sup> | 19.1 ± 1.9 <sup>a</sup> | 27.8 ± 1.2              | 117.3 ± 3.6 <sup>a</sup> |
| HS 400           | 192.4 ± 6.5         | 225.1 ± 3.7 <sup>a</sup> | 32.7 ± 3.0 <sup>a</sup> | 24.7 ± 0.7 <sup>a</sup> | 101.3 ± 2.4 <sup>a</sup> |

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n=6), <sup>a</sup> ( $p < 0.05$ ) diferentes al control diabético.

#### 5.4.3 Efecto de los extractos de (HS), (CHCL<sub>3</sub>) y (MeOH) en ratas diabéticas y no diabéticas.

Al final del experimento se evaluó el efecto de los extractos HS, CHCL<sub>3</sub> y MeOH en los niveles de glucosa en sangre en los grupos normal y diabético. La Tabla 3 muestra los niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas y ratas normales a diferentes tiempos. Las ratas diabéticas presentaron un aumento significativo en el nivel de glucosa en sangre ( $p < 0.01$ ) a las 24 h luego de la inyección de STZ. La administración oral de HS a dosis de 400 mg/kg produjo efecto hipoglucemiante significativo en el grupo normal después de 4 h, en comparación con el control no diabético ( $p < 0.05$ ). La administración oral del HS a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg, produjo efecto hipoglucemiante, porque disminuyó significativamente los niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas después de 6 h, en comparación del control diabético. Es decir, HS (200 y 400 mg/kg) disminuyó los niveles de glucosa en sangre en 37.7 y 50.9% respectivamente, comparado con los controles positivos de tolbutamida (40 mg/kg) y glibenclamida (0.5 mg/kg), que produjeron reducciones de glucosa de 48.8% y 42.1%, respectivamente. Sin embargo, el extracto de cloroformo a la misma dosis no produjo ningún efecto hipoglucémico. El extracto de metanol produce sólo un efecto pequeño por lo que los resultados no se presentan aquí. En este estudio, se encontró que la suspensión acuosa del HS redujo significativamente los niveles de glucosa en plasma en las ratas diabéticas de unamaneradosis-dependiente.

Tabla 3. Efecto del HS en el nivel de glucosa en sangre en ratas en ayuno, no diabéticas y diabéticas

| Grupo (mg/kg)      | En el momento de la agrupación | Los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) en diferentes intervalos de tiempo (horas) |                             |                             |                             |                             |
|--------------------|--------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                    |                                | 2 h   | 4 h                         | 6 h                         | 8 h                         | 12 h                        |
| Control Normal     | 100.22 ± 4.67 <sup>a</sup>     | 100.30 ± 1.26   | 101.61 ± 1.38               | 104.38 ± 1.42               | 99.59 ± 1.75                | 100.68 ± 0.90               |
| Normal + HS 100    | 107.39 ± 2.64 <sup>a</sup>     | 91.18 ± 3.67 <sup>b</sup>   | 82.28 ± 1.95 <sup>b</sup>   | 79.36 ± 2.59 <sup>a</sup>   | 83.59 ± 3.51 <sup>a</sup>   | 91.49 ± 0.78 <sup>a</sup>   |
| Normal + HS 200    | 106.01 ± 3.12                  | 83.37 ± 5.37 <sup>a,c</sup>   | 64.45 ± 2.48 <sup>a,c</sup> | 60.13 ± 1.63 <sup>a,b</sup> | 61.29 ± 2.37 <sup>a,c</sup> | 72.21 ± 1.50 <sup>b</sup>   |
| Normal + HS 400    | 100.17 ± 4.67                  | 79.24 ± 4.38 <sup>a,c</sup>   | 57.36 ± 2.38 <sup>a,c</sup> | 54.19 ± 1.80 <sup>b,c</sup> | 56.43 ± 2.85 <sup>a,c</sup> | 69.89 ± 1.34 <sup>b</sup>   |
| Normal + TB 40     | 103.56 ± 3.27                  | 82.48 ± 4.75 <sup>a,c</sup>   | 64.30 ± 2.58 <sup>a,c</sup> | 60.27 ± 1.48 <sup>a,b</sup> | 63.18 ± 2.39 <sup>a,c</sup> | 70.42 ± 2.31 <sup>b,c</sup> |
| Diabético          | 343.68 ± 3.56 <sup>a</sup>     | 349.32 ± 4.17 <sup>a</sup>  | 345.29 ± 4.10 <sup>b</sup>  | 346.71 ± 5.16               | 342.39 ± 4.47               | 348.42 ± 5.33               |
| Diabético + HS 100 | 361.28 ± 4.19                  | 346.12 ± 4.46 <sup>a</sup>  | 317.67 ± 4.75 <sup>a</sup>  | 284.32 ± 4.36 <sup>a</sup>  | 301.16 ± 4.29 <sup>a</sup>  | 310.21 ± 3.19 <sup>a</sup>  |
| Diabético + HS 200 | 342.75 ± 3.81 <sup>a</sup>     | 318.57 ± 2.98 <sup>b</sup>  | 228.37 ± 2.58 <sup>c</sup>  | 215.78 ± 4.21 <sup>b</sup>  | 228.39 ± 1.39 <sup>c</sup>  | 242.11 ± 4.12 <sup>b</sup>  |
| Diabético + HS 400 | 309.78 ± 2.80 <sup>a</sup>     | 287.15 ± 5.53 <sup>b</sup>  | 221.35 ± 2.52 <sup>a</sup>  | 170.21 ± 2.34 <sup>c</sup>  | 188.18 ± 1.78 <sup>a</sup>  | 219.42 ± 3.57 <sup>b</sup>  |
| Diabético +TB      | 329.73 ± 5.72                  | 254.17 ± 6.36 <sup>c</sup>  | 193.20 ± 4.23 <sup>a</sup>  | 169.42 ± 2.09 <sup>c</sup>  | 190.47 ± 2.19 <sup>a</sup>  | 220.75 ± 5.26 <sup>b</sup>  |
| Diabético + GB     | 335.90 ± 5.18 <sup>a</sup>     | 263.68 ± 6.21 <sup>c</sup>  | 220.47 ± 2.71 <sup>a</sup>  | 200.47 ± 2.83 <sup>c</sup>  | 208.38 ± 1.56 <sup>a</sup>  | 252.37 ± 2.48 <sup>b</sup>  |

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 6), <sup>a</sup>p <0,05, en comparación con el grupo de control normal; <sup>b</sup> p <0,05, en comparación con el grupo control diabético, como controles tolbutamida (TB) y gibenclamida (GB).

#### 5.4.4 Prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratas tratadas con HS.

Después de la administración de HS por 28 días a las ratas, se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) para evaluar la sensibilidad en los animales a una sobrecarga de glucosa. En la Tabla 4 se muestran los niveles de glucosa en sangre postprandial en ratas. Se observa un aumento rápido (dentro de 30 min) y significativo del nivel de glucosa en todos los grupos de ratas después de la carga de glucosa, y en las ratas diabéticas permanece alto hasta los 120 min. El tratamiento con HS a 200 y 400 mg/kg a ratas diabéticas produjo una disminución de glucosa en la sangre de un 50.3% y 57.9%, respectivamente a los 120 minutos con respecto al grupo control diabético, también se comparó con los controles positivos de TB (40 mg/kg) y GB (0.5 mg/kg), que produjeron reducciones de glucosa de 45.7% y 52%, respectivamente. Estos resultados reflejan la eficacia del extracto HS para controlar los niveles de glucosa en la sangre.

Tabla 4. Efecto del HS en la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT) en ratas diabéticas.

| Grupos            | Los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) |                            |                            |                            |                            |
|-------------------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                   | 0 min                                    | 30 min                     | 60 min                     | 90 min                     | 120 min                    |
| Normal            | 91.46 ± 1.82                             | 179.65 ± 3.17              | 160.43 ± 2.83              | 127.49 ± 2.49              | 95.90 ± 1.53               |
| Control Diabético | 268.78 ± 3.42 <sup>c</sup>               | 344.16 ± 1.36 <sup>a</sup> | 409.23 ± 5.21 <sup>a</sup> | 373.41 ± 5.12 <sup>a</sup> | 348.53 ± 3.71 <sup>a</sup> |
| Diabético HS 200  | 277.01 ± 4.06 <sup>a</sup>               | 339.11 ± 2.38 <sup>a</sup> | 284.53 ± 2.51 <sup>c</sup> | 222.41 ± 3.19 <sup>c</sup> | 173.13 ± 2.49 <sup>c</sup> |
| Diabético HS 400  | 271.23 ± 4.71 <sup>a</sup>               | 332.40 ± 5.12 <sup>a</sup> | 252.27 ± 4.71 <sup>c</sup> | 205.51 ± 3.14 <sup>c</sup> | 146.89 ± 1.45 <sup>c</sup> |
| Diabético +TB     | 255.65 ± 4.35                            | 322.13 ± 5.45 <sup>a</sup> | 275.05 ± 3.6 <sup>c</sup>  | 287.12 ± 2.5 <sup>c</sup>  | 189.34 ± 1.69 <sup>c</sup> |
| Diabético +GB     | 265.30 ± 8.00                            | 315.25 ± 2.25 <sup>a</sup> | 295.05 ± 4.4 <sup>c</sup>  | 263.11 ± 4.78 <sup>c</sup> | 167.36 ± 1.69 <sup>c</sup> |

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 6), <sup>a</sup>(p <0.05) en comparación con el grupo normal, <sup>b</sup>(p <0.05) en comparación con el grupo diabético, <sup>c</sup>(p <0.05) en comparación con los grupos normal y diabético.

#### 5.4.5 Colesterol total, triglicéridos, LDL-colesterol y los niveles de TBARS en el hígado y riñón en ratas diabéticas después del tratamiento con HS.

La Tabla 5 muestra que en comparación con las ratas normales, las ratas diabéticas mostraron una elevación significativa de: los triglicéridos en suero, el colesterol total y los niveles de TBARS en el hígado y riñón, mientras que el HDL disminuyó. La

administración diaria del HS a una dosis de 400 mg/kg durante 28 días redujo significativamente el colesterol total y los triglicéridos en 47% y 51%, respectivamente. Es decir, el HS tiene un efecto positivo en los perfiles de lípidos séricos de las ratas con diabetes, el efecto fue semejante al que se obtiene con GB. La diabetes conduce a la peroxidación lipídica, los TBARS son un índice de la peroxidación lipídica endógena en diabéticos. Por lo tanto, la medición de TBARS se utiliza para determinar el nivel de estrés oxidativo que se produce cuando la producción de radicales libres supera a las defensas antioxidantes (Narváez et al., 2007; Goh y Cooper 2008). Los niveles de TBARS disminuyeron en 37% en hígado y 32% en riñón en el grupo diabético tratado con HS a 400 mg/Kg. La administración de HS tiene un efecto en disminuir la hiperlipidemia asociada con la hiperglucemia.

Tabla 5. Efecto del HS en los triglicéridos, colesterol total y HDL-colesterol en plasma, y TBARS en hígado y riñón en ratas diabéticas.

| Grupo<br>(mg/kg)  | Triglicéridos<br>(mg/dL)    | Colesterol total<br>(mg/dL) | Colesterol                 |                            |                           |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                   |                             |                             | HDL<br>(mg/dL)             | TBARS (μM/g)               |                           |
|                   |                             |                             |                            | Hígado                     | Riñón                     |
| Control Normal    | 91.12 ± 5.23                | 129.46 ± 3.29               | 69.11 ± 2.19               | 0.99 ± 0.005               | 1.6 ± 0.008               |
| Control Diabético | 187.45 ± 4.35 <sup>a</sup>  | 247.23 ± 1.67 <sup>a</sup>  | 35.36 ± 1.57 <sup>a</sup>  | 1.61 ± 0.007 <sup>a</sup>  | 2.5 ± 0.007 <sup>a</sup>  |
| HS 200            | 127.25 ± 4.12 <sup>ab</sup> | 152.36 ± 2.98 <sup>ab</sup> | 52.40 ± 2.80 <sup>ab</sup> | 1.26 ± 0.003 <sup>ab</sup> | 1.9 ± 0.003 <sup>ab</sup> |
| HS 400            | 91.78 ± 6.03 <sup>ab</sup>  | 130.21 ± 3.17 <sup>ab</sup> | 58.12 ± 1.95 <sup>ab</sup> | 1.01 ± 0.006 <sup>ab</sup> | 1.7 ± 0.005 <sup>ab</sup> |

Todos los valores se expresan como media ± SEM, n = 6 valores. <sup>a</sup>p < 0.05 en comparación con el grupo control normal, <sup>b</sup>p < 0.01 en comparación con el grupo control diabético.

#### 5.4.6 Efecto del HS sobre la actividad de glucosa-6-fosfatasa (G6Pase), glucosacinasasa (GK), hexocinasasa (HK) y el glucógeno.

En el estado diabético las células experimentan un descenso de glucosa, lo cual dispara otras rutas metabólicas para el uso de fuentes de carbono alternas como glucógeno, ácidos grasos y lactato entre otras. El paso final para la formación de glucosa a partir de fuentes de carbono alternas implica la desfosforilación de la glucosa-6-fosfato mediante la G6Pase. La Tabla 6 muestra el efecto del HS en las actividades de G6Pase, GK y HK, además del contenido de glucógeno en hígado y en músculo esquelético. La administración de HS, a dosis de 400 mg/kg de peso corporal a las ratas diabéticas, aumentó el contenido de glucógeno hepático en 89% y las

actividades GK (59%) y HK (18.9%), mientras que la actividad G6Pase disminuyó (41.2%) casi a los valores normales. Efendic et al., 1988 mencionan que una de las enzimas clave en el catabolismo de la glucosa es la hexocinasa, el cual fosforila la glucosa y la convierte en glucosa-6-fosfato. Por lo tanto, el aumento de la actividad de la hexocinasa puede promover la glucólisis y aumentar la utilización de la glucosa para producir energía. El HS tuvo un efecto positivo en términos de uso de la glucosa para formar glucógeno, lo que sugiere una mayor utilización de glucosa periférica. Las ratas normales no mostraron ninguna alteración significativa.

Tabla 6. Efecto del HS sobre las actividades de enzimas (G6Pase, HK y GK), el contenido de glucógeno en ratas diabéticas.

| Grupos<br>(mg/kg) | G6Pase<br>(mU)             | GK<br>(mU)                | Glucógeno (mg/g)          |                           | HK<br>(U/mg proteína)     |
|-------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                   |                            |                           | Hígado                    | Músculo esquelético       |                           |
| Control Normal    | 0.39 ± 0.005               | 3.25 ± 0.06               | 19.57 ± 3.12              | 11.56 ± 2.74              | 1.61 ± 0.01               |
| Control Diabético | 0.68 ± 0.003 <sup>a</sup>  | 1.20 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 9.22 ± 2.24 <sup>a</sup>  | 4.39 ± 1.24 <sup>a</sup>  | 1.29 ± 0.04 <sup>a</sup>  |
| Diabético+HS 200  | 0.47 ± 0.005 <sup>ab</sup> | 2.60 ± 0.08 <sup>ab</sup> | 13.38 ± 1.28 <sup>b</sup> | 9.32 ± 1.69 <sup>b</sup>  | 1.53 ± 0.01               |
| Diabético+HS 400  | 0.40 ± 0.007 <sup>b</sup>  | 2.89 ± 0.05 <sup>ab</sup> | 17.49 ± 1.47 <sup>b</sup> | 10.74 ± 2.16 <sup>b</sup> | 1.59 ± 0.02 <sup>ab</sup> |
| Diabético +GB     | 0.36 ± 0.009 <sup>b</sup>  | 3.11 ± 0.07 <sup>b</sup>  | 17.78 ± 1.30 <sup>b</sup> | 11.01 ± 1.98 <sup>b</sup> | 1.60 ± 0.03 <sup>b</sup>  |

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 6), <sup>a</sup>p <0,01, en comparación con el control normal y <sup>b</sup>p <0.001 comparado con el grupo de control de la diabetes.

#### 5.4.7 Efecto del HS en las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa hepáticas y renales.

La hiperglucemia induce estrés oxidativo, el cual puede causar daño a las células hepáticas y renales. Una excesiva producción de EROs puede inactivar las enzimas antioxidantes tales como SOD, GRd, GPx, CAT. Lo anterior juega un papel clave en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes (Mora et al., 2009). El efecto antioxidante del HS se muestra en la Tabla 7. Las ratas diabéticas mostraron una reducción significativa en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GRd y la GPx en los tejidos hepáticos y renales. La administración crónica de HS a 400 mg/kg aumentó los niveles SOD en 76.6%, CAT 56.4%, GRd 92.8% y GPx 34% en hígado de ratas diabéticas. Los niveles de actividad de los dos grupos tratados con HS fueron comparables a los de las ratas tratadas con el medicamento estándar glibenclamida.

La administración HS a ratas diabéticas aumentó las actividades de las enzimas antioxidantes en el hígado y el riñón, a niveles cercanos a los normales. Esto muestra que *P. auritum* estimula la defensa antioxidante de las células de hígado y riñón.

Tabla 7. Efecto del HS sobre la actividad de enzimas antioxidantes en hígado y riñón en ratas diabéticas.

| Parámetros   | Control Normal | Control Diabético         | Diabético+HS<br>(200 mg/kg) | Diabético+ HS<br>(400 mg/kg) | Diabético+ GB<br>(5 mg/kg) |
|--------------|----------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| SOD-Higado   | 7.56 ± 2.29    | 3.81 ± 0.87 <sup>a</sup>  | 5.49 ± 0.59                 | 6.73 ± 0.49 <sup>b</sup>     | 6.81 ± 0.32                |
| SOD-Riñón    | 13.84 ± 2.43   | 7.14 ± 1.64 <sup>a</sup>  | 10.21 ± 2.98 <sup>b</sup>   | 12.76 ± 1.38 <sup>b</sup>    | 13.08 ± 0.87 <sup>b</sup>  |
| CAT-Higado   | 82.13 ± 5.21   | 44.61 ± 2.72 <sup>a</sup> | 61.32 ± 1.54 <sup>c</sup>   | 69.79 ± 2.37 <sup>b</sup>    | 70.21 ± 2.16 <sup>b</sup>  |
| CAT-Riñón    | 34.98 ± 1.65   | 20.73 ± 0.76 <sup>a</sup> | 30.20 ± 2.54 <sup>a</sup>   | 33.45 ± 2.51                 | 34.08 ± 1.58 <sup>b</sup>  |
| GRd –Higado  | 47.03 ± 1.43   | 21.78 ± 1.28 <sup>a</sup> | 36.84 ± 1.17 <sup>b</sup>   | 42.01 ± 1.34 <sup>b</sup>    | 42.57 ± 2.19 <sup>b</sup>  |
| GRd –Riñón   | 24.16 ± 0.62   | 5.78 ± 1.38 <sup>a</sup>  | 16.81 ± 1.41 <sup>b</sup>   | 19.10 ± 2.03 <sup>b</sup>    | 19.79 ± 0.90 <sup>b</sup>  |
| GPx – Higado | 7.28 ± 4.27    | 4.29 ± 1.31 <sup>a</sup>  | 5.11 ± 1.85                 | 5.75 ± 4.06 <sup>b</sup>     | 5.90 ± 1.68 <sup>b</sup>   |
| GPx –Riñón   | 5.94 ± 1.42    | 3.51 ± 1.84 <sup>a</sup>  | 4.16 ± 1.21 <sup>b</sup>    | 4.71 ± 2.46 <sup>b</sup>     | 4.73 ± 2.87 <sup>b</sup>   |

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 6), <sup>a</sup>p <0.01, en comparación con el control normal y <sup>b</sup>p <0.001 comparado con el grupo de control de la diabetes. Gibenclamida (GB). Los valores se dan en U/mg de proteína.

#### 5.4.8 Efecto del HS en la glicación de la hemoglobina y en la formación de AGEs.

La hiperglucemia conduce a la sobreproducción de EROs. Además, la glicación no enzimática de proteínas en presencia de EROs altera la función de muchas proteínas y en consecuencia la función de las células-β (Njoroge y Monnier 1989). La Tabla 8 muestra el efecto del HS en la glicación de hemoglobina y en la formación de AGEs. El HS a 400 mg/kg inhibió la formación de AGEs, con un valor de IC<sub>50</sub> de 34.6 µg/mL, comparado con la GB de IC<sub>50</sub> 39.32 µg/mL. La concentración de hemoglobina glicada fue significativamente más alta en el grupo control diabético, en comparación con ratas normales. Las ratas diabéticas tratadas con HS presentaron una disminución significativa (p < 0.05) de la hemoglobina-glicada (36.4%), comparado con los controles de AG y GB que presentaron 46.2 y 37% de inhibición. Por lo tanto, el HS de alguna manera inhibe la formación de AGEs de manera similar a los controles.

Tabla 8. Efecto del HS en la glicación de la hemoglobina y en la formación de AGEs de ratas diabéticas.

| Tratamiento (mg/kg) | Glicosilación Hemoglobina (absorbancia de 5-HMF) | Inhibición (%) | AGEs IC <sub>50</sub> µg/mL |
|---------------------|--|----------------|-----------------------------|
| Control Normal      | 0.86 ± 0.05                                      | -              | -                           |
| Control Diabético   | 1.43 ± 0.27                                      | -              | -                           |
| Diabético HS 200    | 1.12 ± 0.46 <sup>a</sup>                         | 21.7           | 45.1                        |
| Diabético HS 400    | 0.91 ± 0.07 <sup>b</sup>                         | 36.3           | 34.6                        |
| Diabético + AG      | 0.77 ± 0.01 <sup>b</sup>                         | 46.2           | 27.5                        |
| Diabético + GB      | 0.89 ± 0.08 <sup>b</sup>                         | 37.0           | 39.32                       |

Cada valor representa la media ± desviación estándar (n = 6), <sup>a</sup>p <0.01, en comparación con el grupo normal y <sup>b</sup>p <0.001 comparado con el grupo diabético. % de inhibición de la glicación de la hemoglobina se calculó en relación al control diabético.

La Tabla 9 muestra el efecto del HS sobre la formación de AGEs renales. Los niveles de AGEs renales en ratas diabéticas fueron significativamente mayores que en las ratas normales. La administración oral del HS a dosis de 200 y 400 mg/kg redujo los niveles de AGEs similares a los valores grupo normal.

Tabla 9. AGEs renales

| Grupo         | Dosis mg/kg | AGEs (AU)                |
|---------------|-------------|--------------------------|
| Normal        | -           | 0.76 ± 0.05              |
| Diabético     | -           | 0.98 ± 0.07 <sup>a</sup> |
| Diabético +HS | 200         | 0.85 ± 0.03 <sup>b</sup> |
| Diabético+ HS | 400         | 0.79 ± 0.01 <sup>b</sup> |

Los valores se expresan como media ± desviación estándar (n = 6), <sup>a</sup>p <0.01, en comparación con el control normal y <sup>b</sup>p <0.001 comparado con el grupo diabético.

## 5.5 Efecto del HS en el páncreas

### 5.5.1 Efecto del HS en el nivel de insulina en suero y en el páncreas.

La diabetes inducida por STZ, se acompaña de resistencia a la insulina (Liu et al., 2010). El efecto del extracto HS sobre los niveles de insulina se muestra en la Tabla 10. En las ratas diabéticas, los niveles de insulina en suero (11.23 mIU/mL) y en el

páncreas (17.23 mU/g proteína) se redujeron significativamente con respecto al grupo control normal (14.10 mIU/mL en suero y 27.12 mU/g proteína en páncreas) ( $p < 0.01$ ). Tres semanas de administración del HS (200 y 400 mg/kg) elevaron significativamente ( $p < 0.05$ ) los niveles de insulina en suero y en páncreas en relación al control diabético. Por ejemplo, dosis de 400 mg/kg de HS elevaron en las ratas diabéticas los niveles de insulina en 16.5%, casi a los valores normales. Qin et al., 2003b encontraron efectos similares del extracto de canela, éste presenta una disminución de glucosa por efecto del aumento de insulina en el páncreas (células- $\beta$ ). (Qin et al., 2003a) explica que el aumento del contenido de insulina en el páncreas podría ser por la sensibilización de los receptores de insulina o por inhibición de la actividad insulinasa en el hígado y riñón, también puede ser debido a un aumento de la tasa de glucólisis y la disminución de la tasa de la gluconeogénesis. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de otros mecanismos por los que el HS ejerce sus efectos.

Tabla 10. Efecto del HS en los niveles de insulina en suero y en páncreas.

| Grupos (mg/kg)    | Insulina Suero (mIU/mL)      | Insulina Pancreática (mU/g proteína) |
|-------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Control Normal    | 14.10 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup> | 27.12 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>         |
| Control Diabético | 11.23 $\pm$ 7.3 <sup>b</sup> | 17.23 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>         |
| Diabético+HS 200  | 12.15 $\pm$ 6.5              | 20.45 $\pm$ 1.9                      |
| Diabético+HS 400  | 13.08 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup> | 25.89 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>         |

Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (n = 6), <sup>a</sup> $p < 0.05$ , en comparación con el control normal y <sup>b</sup> $p < 0.05$  comparado con el grupo diabético.

### 5.5.2 Efecto del HS sobre las enzimas antioxidantes del páncreas.

La sobreproducción de EROs es un factor de riesgo importante en el desarrollo de las enfermedades del páncreas. Estudios previos han informado un aumento de la peroxidación de lípidos en páncreas de ratas diabéticas (Yilmaz et al., 2004). Al parecer esto se debe a un aumento del estrés oxidativo en células como resultado del agotamiento de los sistemas antioxidantes, así como también por la glicación no enzimática de las enzimas antioxidantes (Son et al., 2013; Eizirik et al., 1992). La Tabla 11 muestra el nivel de peroxidación lipídica expresada como TBARS, las actividades de las enzimas CAT, SOD, GRd, GPx en el páncreas y los niveles de NO,

y actividad de NO sintasa (iNOS) en suero en ratas normales y diabéticas. La enzima iNOS, es una fuente de radicales hidroxilo en la diabetes, conduce a la peroxidación de lípidos (Stadler et al., 2008). En el grupo de ratas con diabetes hubo un aumento significativo en la concentración de TBARS y de NO en el suero. El tratamiento de las ratas con HS disminuyó significativamente la peroxidación lipídica. Además, el HS restauró la actividad de iNOS a los niveles normales. En el grupo diabético las actividades de las enzimas antioxidantes CAT, SOD, GRd y la GPx disminuyeron, en comparación con el grupo control normal. El HS aumentó significativamente las actividades SOD, CAT, GRd y GPx en comparación con el grupo de control diabético. El HS al reducir los niveles de glucosa en sangre y elevar la defensa antioxidante en páncreas ayuda a proteger las células contra un potencial daño oxidativo producido por EROS. Un páncreas saludable estará en mejores condiciones para producir insulina de acuerdo a lo que las células requieren. Estos resultados sugieren que *P. auritum* puede inhibir el desarrollo de disfunciones del páncreas inducidas por la hiperglucemia crónica.

Tabla 11. Efecto del HS en las enzimas antioxidantes, TBARS en el páncreas y el NO y iNOS en el suero.

| Parámetros               | Control Normal | Control Diabético         | Diabético+HS<br>(200 mg/kg) | Diabético+HS<br>(400 mg/kg) |
|--------------------------|----------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| SOD                      | 54.14 ± 2.43   | 37.41 ± 1.64 <sup>a</sup> | 44.21 ± 2.98 <sup>b</sup>   | 49.76 ± 1.38 <sup>b</sup>   |
| CAT                      | 59.98 ± 1.65   | 25.73 ± 0.76 <sup>a</sup> | 46.20 ± 2.54 <sup>a</sup>   | 51.45 ± 2.51                |
| GRd                      | 12.16 ± 0.62   | 5.78 ± 1.38 <sup>a</sup>  | 8.91 ± 1.41 <sup>b</sup>    | 11.10 ± 2.03 <sup>b</sup>   |
| GPx                      | 4.28 ± 1.42    | 2.51 ± 1.84 <sup>a</sup>  | 3.16 ± 1.21 <sup>b</sup>    | 3.89 ± 2.46 <sup>b</sup>    |
| TBARS (mM/mg<br>proteína | 1.93 ± 0.18    | 2.84 ± 0.17 <sup>a</sup>  | 1.99 ± 0.13 <sup>ab</sup>   | 1.56 ± 0.15 <sup>ab</sup>   |
| NO (µM)                  | 25.76 ± 3.18   | 40.38 ± 2.94 <sup>a</sup> | 35.59 ± 3.78 <sup>ab</sup>  | 30.12 ± 1.98 <sup>ab</sup>  |
| iNOS (U/mL)              | 10.98 ± 2.6    | 20.31 ± 4.32 <sup>a</sup> | 16.27 ± 1.76 <sup>b</sup>   | 13.05 ± 1.90 <sup>b</sup>   |

Todos los valores se expresan como media ±, desviación estándar (n = 6) <sup>a</sup>p<0.01 en comparación con el grupo control normal; <sup>b</sup>p<0.01 en comparación con el grupo control de la diabetes. Las actividades de las enzimas antioxidantes se expresan en U/mg de proteína.

---

---

### 5.5.3 Efecto protector del HS a células- $\beta$ pancreáticas sometidas al estrés oxidativo.

La oxidación de las proteínas ha sido estudiada ampliamente, el daño de las proteínas inicia por una fuga de electrones, reacciones de ión-metal y autooxidación de lípidos y azúcares (Dean et al., 1997). A largo plazo se cree que EROs y AGEs desempeñan un papel importante en el desarrollo de las complicaciones diabéticas y pueden alterar la función de las células- $\beta$  del páncreas y conllevar al incremento de la resistencia a la insulina en pacientes con diabetes tipo 2. En las células RIN-5F tratadas con AGE1 (glucosa) y AGE2 (gliceraldehído), la fluorescencia después de 4 h, fue significativamente mayor a la de las células tratadas solo con BSA (controles). La intensidad de la fluorescencia de las muestras del grupo tratado con HS y ya sea AGE1 o AGE2 fue significativamente más bajo que la de los controles (Tabla 12). Las células RIN-5F (AGE1, AGE2) tratadas con HS durante cuatro horas, dio como resultado una reducción de 59.8% (RIN-5F+AGE1+HS) y 51.82% (RIN-5F+AGE2+HS) de la fluorescencia con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Por lo tanto, nuestros datos demostraron que HS protege a las células RIN-5F de la oxidación por los radicales libres que reaccionan con el reactivo HDCCF. Este resultado sugiere que el HS puede reducir el estrés oxidativo en las células RIN-5F.

Tabla 12. Efecto protector del HS a células- $\beta$  pancreáticas sometidas al estrés oxidativo.

| Grupos             | Fluorescencia<br>niveles intracelulares EROs |
|--------------------|--|
| BSA                | 12.1 $\pm$ 3.48 <sup>a</sup>                 |
| BSA+ HS + RIN-5F   | 5.3 $\pm$ 1.76 <sup>b</sup>                  |
| AGE1 + RIN-5F      | 19.45 $\pm$ 3.21 <sup>a</sup>                |
| AGE1+ RIN-5F + HS  | 7.82 $\pm$ 1.63 <sup>b</sup>                 |
| AGE2 + RIN-5F      | 30.45 $\pm$ 4.50 <sup>a</sup>                |
| AGE2 + RIN-5F + HS | 14.67 $\pm$ 3.24 <sup>b</sup>                |

Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (n = 3), a, b  $p < 0.05$

En resumen, el HS mostró actividad hipoglucemiante a través de la disminución de los niveles de glucosa y aumento de los niveles de insulina, como también el HS presentó

---

---

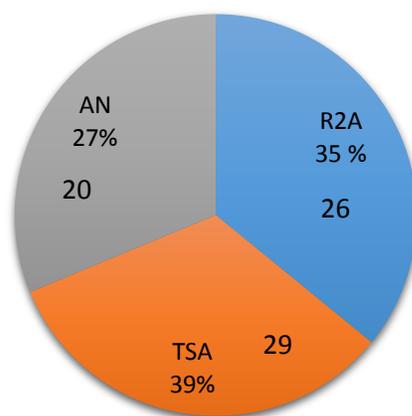
un efecto positivo en la reducción en los niveles de colesterol y triglicéridos, y el aumento del sistema de defensa antioxidante. Todo esto indica que el HS a través de la inhibición del estrés oxidativo y la formación de AGEs sería útil en la prevención de complicaciones de la diabetes.

## **Etapa 2.**

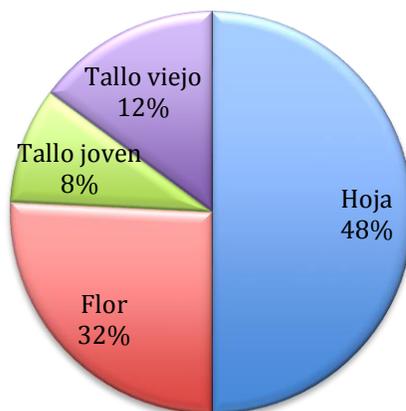
### **5.6. Aislamiento de endófitos y evaluación de actividad antiglicación de los extractos de los cultivos.**

#### **5.6.1 Aislamiento de bacterias.**

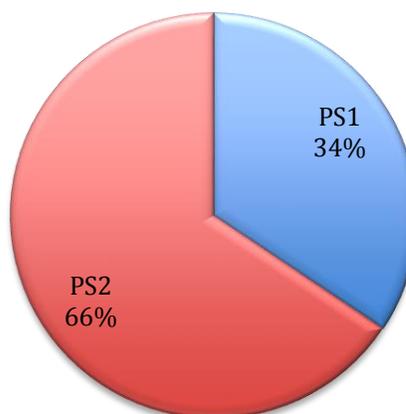
Se aislaron 75 bacterias y siete actinomicetos. La Figura 18 muestra el porcentaje de bacterias aisladas en los diferentes medios de cultivo (R2A, TSA, AN) utilizados. La Figura 19 presenta el porcentaje de aislados por tejido (hoja, flor, tallo joven, tallo viejo) de *P. auritum*, mientras que la Figura 20 muestra los aislados por localidad (PS1 y PS2). El mayor número de aislados fue a partir de hojas, en el medio TSA y en el sitio PS2.



**Figura 18. Bacterias aisladas de *P. auritum* en los diferentes medios de cultivo.**



**Figura 19. Bacterias aisladas de *P. auritum* en los diferentes tejidos.**



**Figura 20. Bacterias aisladas de *P. auritum* en los dos sitios PS1 y PS2.**

### **5.6.2 Aislamiento de hongos.**

Se aislaron 43 hongos. El mayor número de aislados se obtuvieron de hojas y en el sitio PS2, como se puede observar en el anexo 3.

### **5.6.3 Cultivo de las bacterias, obtención del extracto de acetato de etilo y evaluación de la actividad anti-AGEs.**

En este trabajo se estudiaron 23 aislados bacterianos seleccionados. Cada aislado se cultivó por separado y se obtuvieron los extractos de acetato de etilo (E1 a E23) de cada cultivo.

Se realizaron dos cultivos de cada una de las cepas 1 a 8. El primer cultivo con una duración de 24 h y el segundo de 48 h. En la Figura 21 se observa el porcentaje de inhibición de la formación de AGEs *in vitro*, de los extractos de acetato de etilo de cada cultivo. Los extractos del cultivo de 24 h de las cepas E2, E7 y E8 inhibieron la formación de AGEs en 93.22 %, 83.74% y 88.73%, respectivamente. Los extractos de cultivo de 48 h de las cepas E4, E7 y E8 inhibieron la formación de AGEs en 93.87 %, 89.46% y 92.93 %, respectivamente. Es decir los extractos de cultivos de 24 y 48 h de las cepas E7 y E8 presentaron actividad.

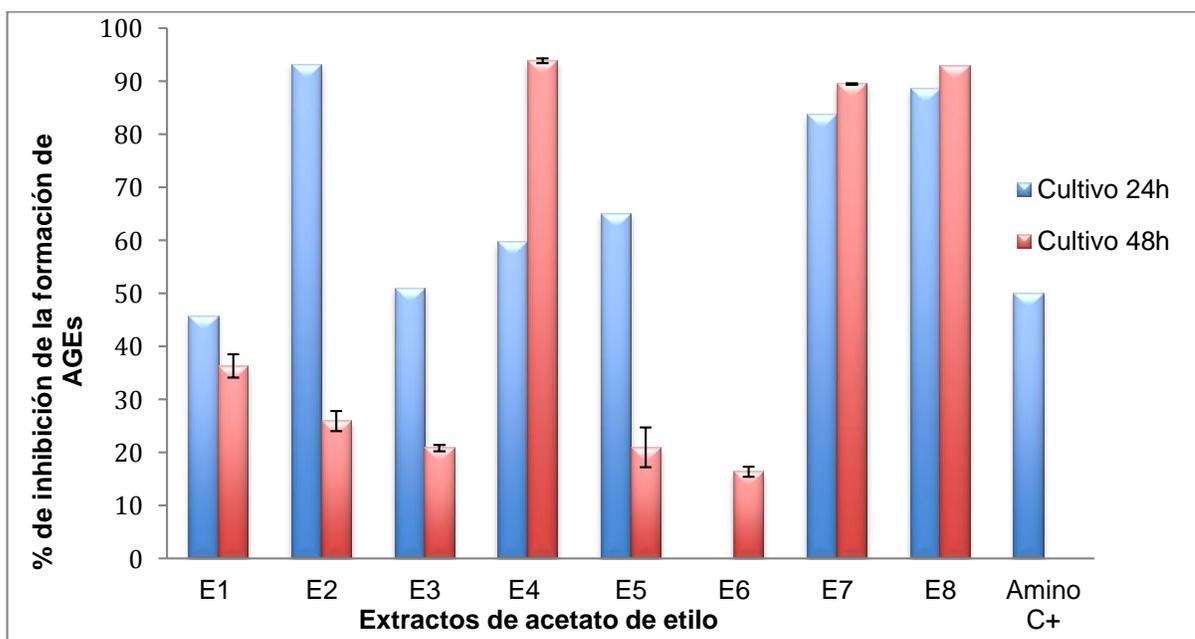


Figura 21. Efecto de los extractos de acetato de etilo de 8 cepas en la formación de AGEs. Los valores fueron medidos por triplicado, base seca los extractos, % de inhibición de los extractos a 10 mg/mL, aminoguanidina 10 mM, se muestra la media y la desviación estándar.

Las 15 cepas restantes se cultivaron únicamente por 48 h. En la figura 22 se observa el porcentaje de inhibición de la formación de AGEs de los 12 extractos que mostraron alguna actividad. Los extractos E13, E14, E11, E9, y E16 inhibieron en mayor grado la formación de AGEs (94.6%, 92.3%, 76.06%, 77.51%, 78.96%, respectivamente) y tres cepas no presentaron actividad.

---

Nueve (E2, E4, E7, E8, E9, E11, E13, E14 y E16) de los 23 extractos evaluados mostraron una alta (>50%) actividad anti-AGEs. Entre estos extractos se seleccionaron cinco extractos (E2, E4, E7, E8, E14) para estudios posteriores, es decir, los que presentaron actividad mayor al 90 %.

Se realizó un nuevo cultivo de los aislados E4, E7, E8, E2 y E14 a diferentes tiempos de incubación (0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 60 h). En la Figura 23 se observa el porcentaje de inhibición de la formación (AGEs) de los extractos de acetato de etilo de los cultivos anteriores. Los extractos de E4, E7, E8, E2 y E14 inhibieron la formación de AGEs desde las 12 h y fue aumentando durante las primeras 48 h, hasta alcanzar alrededor del 90% de inhibición. El control positivo con aminoguanidina inhibió la formación de AGEs en alrededor del 53%.

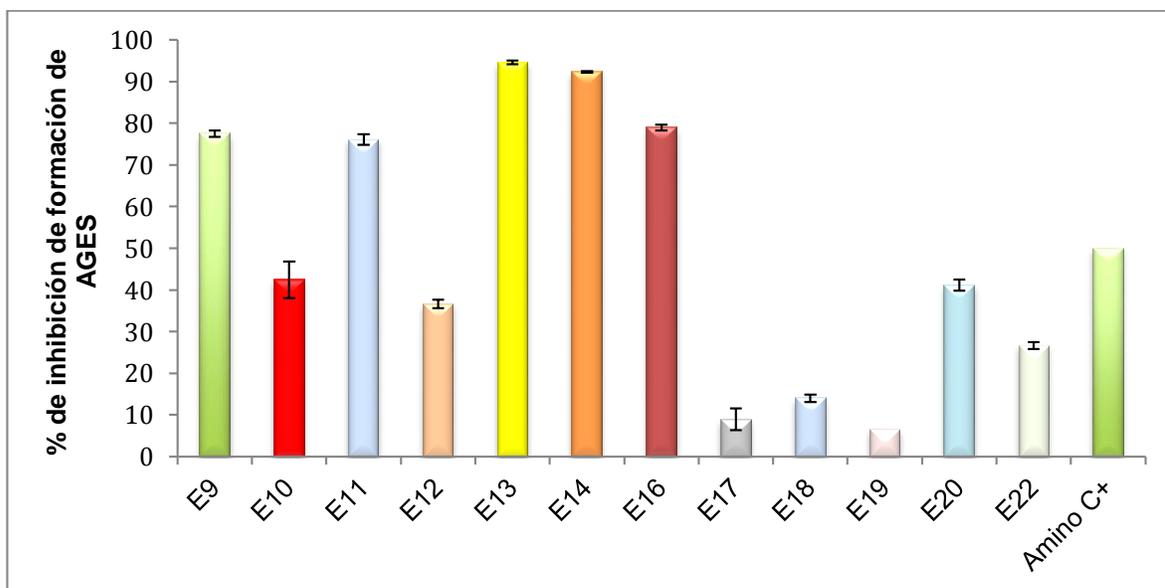


Figura 22. Efecto de los extractos de acetato de etilo de las cepas (9-22) en la inhibición de la formación de AGEs. Los valores fueron medidos por triplicado, los extractos en base seca, % de inhibición extractos a 10 mg/mL, aminoguanidina 10 mM, se muestra la media y la desviación estándar.

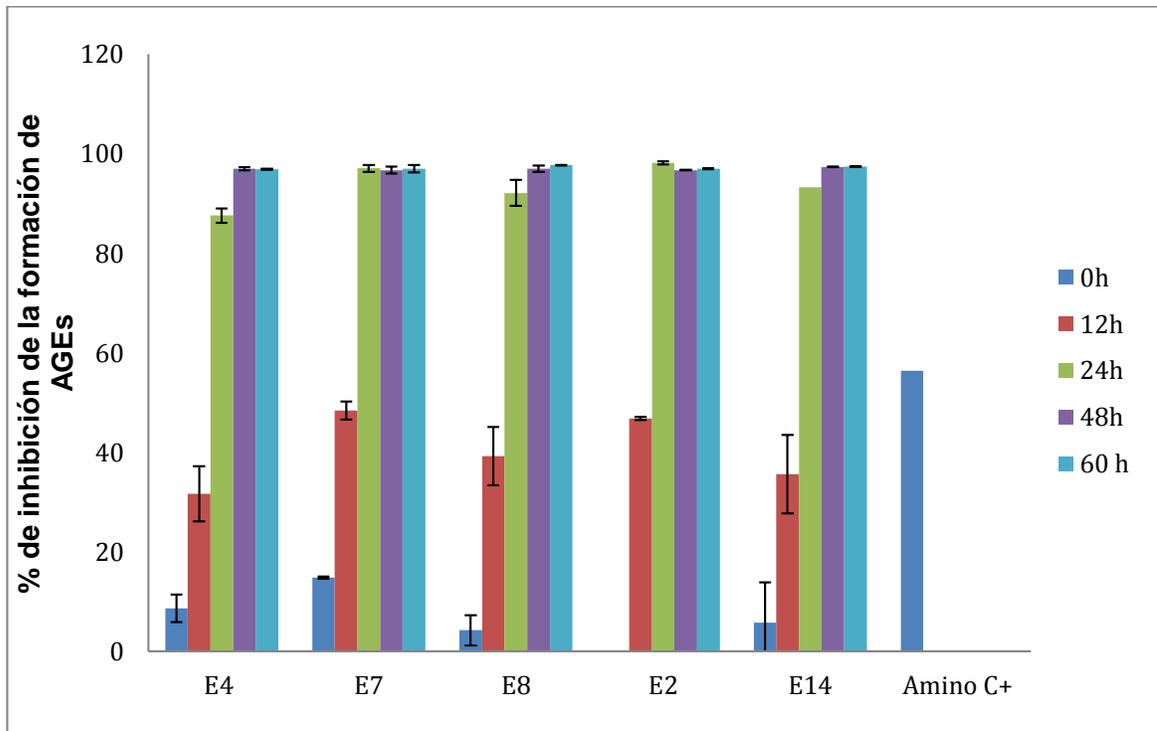


Figura 23. Efecto de los extractos E4, E7, E8, E2 y E14 obtenidos a diferentes tiempos de cultivo en la formación de AGEs, usando el modelo de reacción *in vitro* BSA–glucosa. Los valores fueron medidos por triplicado, los extractos en base seca, ° % de inhibición a 1 mg/mL, aminoguanidina a 10 mM, se muestra la media y la desviación estándar.

Para evaluar el efecto de la temperatura de cultivo en la actividad anti-AGEs de los extractos, se obtuvieron extractos de cultivos seleccionados a 30 °C. En la Figura 24 se observa el porcentaje de inhibición de la formación (AGEs) de los extractos de las cinco cepas cultivadas a 30°C. Todos los extractos mostraron actividad anti-AGEs alrededor del 90%, en comparación con el control positivo con aminoguanidina que presenta un 53%. Se puede observar que la temperatura no tiene un efecto significativo en la inhibición de formación de los AGEs, al menos a las temperaturas ensayadas (22 y 30 °C).

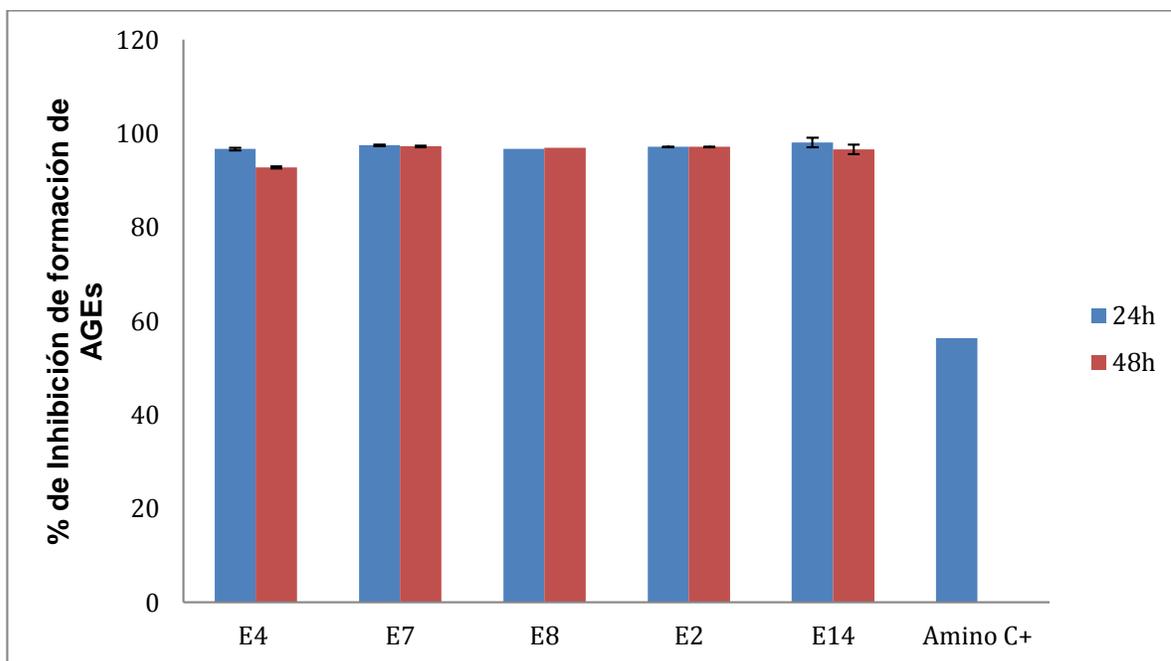


Figura 24. Efecto de los extractos E4, E7, E8, E2 y E14 obtenidos de cultivos a 30 °C. Los valores fueron medidos por triplicado, los extractos en base seca, % de inhibición a 1 mg/mL, aminoguanidina 10 mM, se muestra la media y la desviación estándar.

#### 5.6.4 Actividad antioxidante de los extractos de los 23 cultivos.

Se realizó una prueba rápida de actividad antioxidante (decoloración de  $\beta$ -caroteno en placa fina) a los extractos obtenidos de cultivos de los 23 aislados. Los extractos de los aislados E2, E6, E9, E11, E14 y E16 fueron positivos (coloración amarilla) en el ensayo de actividad antioxidante. Los extractos de las cepas que presentaron tanto actividad antiglicación, como actividad antioxidante fueron E2, E9, E11, E14, E16.

#### 5.6.5 Identificación taxonómica de las cepas con actividad anti-AGEs

A partir del DNAG de las cepas E2, E4, E7, E8, E9, E11, E13, E14 y E16, cuyos extractos presentaron actividad anti-AGEs mayor del 50%, se amplificaron por PCR las regiones del rDNA 16S y se secuenciaron. Las secuencias fueron comparadas con las existentes en base de datos de GeneBank (NCBI) y se recolectaron las secuencias similares (Anexo 4).

De manera similar, el gen *rpoB* se usó como *housekeeping* para confirmar la identidad de la cepa 8-1. La secuencia al ser comparada con secuencias del Genebank mostró un porcentaje de similitud del 97% con respecto a la especie *protegens*. El

---

---

árbol filogenético (Anexo 5) fue construido a través del software Mr Bayes con la secuencia de la cepa 8-1 y un muestreo de secuencias depositadas en la base de datos del GenBank (NCBI). Con base en las secuencias del rDNA 16S y *rpoB*, el aislado 8-1 fue identificado como *Pseudomonas protegens*.

#### **5.6.6 Purificación del compuesto activo a partir de la fracción 8-1 2222 obtenida del extracto de cultivo de la bacteria *Pseudomonas protegens* 8-1.**

La purificación del HS se realizó por cuatro fraccionamientos por CCF y CC, que fueron explicados en el inciso (4.3.7.5), se obtuvo la fracción 8-1 2222. La fracción 8-1 2222 se purificó mediante HPLC-Semipreparativo, se realizaron 30 purificaciones de la siguiente forma: Se inyectaron 3 mL de la fracción 81222-2 (2 mg/mL), y se eluyó en modo isocrático con la fase móvil de MeOH grado HPLC: H<sub>2</sub>O MilliQ (60:40%), a flujo de 3 mL/min, UV 270 – 220 nm. Se obtuvieron en cada caso 45 fracciones. Como ejemplo, la Figura 25 muestra un cromatograma de la purificación (16) de la fracción 8-1 2222. Se observan los picos 1 a 3, con tiempos de retención de 7.5 min, 27.23 min y 45.050 min respectivamente. En el HPLC-analítico se analizaron los perfiles de cada fracción, así las 45 fracciones originales se agruparon en tres. El pico de mayor abundancia (a 270 nm) se encontró en las fracciones 17- 23 correspondiente al tiempo de retención del pico 2. Después de eliminar el metanol por evaporación (rotavapor) la fase acuosa se liofilizó, la fracción pura fue denominada 8-1 2222-2, con un peso de 16.6 mg, sólido blanco, se analizó mediante RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, IR, MS.

#### **5.6.7 Elucidación estructural del compuesto de la fracción (8-1 2222-2).**

La fracción 8-1 2222-2 (polvo blanco), después del análisis de los espectros se obtuvieron los siguientes datos.

2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)

M. p.: 161-163 °C, Lit (168 – 170°C) [Zakrzewski *et al.*, 1997] (161 – 163 °C [Tada *et al.*, 1992], 173 – 174 °C [Sato *et al.*, 2005]).

IR  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>): 3390 (OH br), 1598, 1562, 1429 (conjugado aromático C=O con puentes de hidrógeno intramoleculares C=C), 1364 (C-OH), 1223 (C-O). <sup>1</sup>H NMR (Acetona-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz): 5.96 (s, 1H, Ar-H), 3.32-3.30 (br s, 3H, OH) 2.65 (s, 6H, 2 COCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-

---

---

NMR (Acetona-*d*<sub>6</sub>, 75.4 MHz): 206.1 (2 C=O), 173.5 (2 Car- OH), 171.1 (Car-OH), 105.8 (2 C-COCH<sub>3</sub>), 96.5 (Ar-H), 32.9 (2 CH<sub>3</sub>). ESITOFMS *m/z* 211.0601 [M + H]<sup>+</sup>, Calc: para C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>, 211.0601; MS (EI, 70 eV, *m/z*, int%): 210 (41, [M]<sup>+</sup>), 195 (100, [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 177 (66, [M - H<sub>2</sub>O - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 149 (7, [M - H<sub>2</sub>O - COCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>).

La fórmula molecular se determinó, como C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> calculada a partir del ion en *m/z* 211.0601 en el HR-ESIMS (Figura 26 a,b,c). Los espectros de IR revelaron la presencia de bandas en 1598, 1562, 1468 cm<sup>-1</sup> atribuibles al arilcetona conjugado y con puentes de hidrógeno intramoleculares. Las bandas anchas en 3390 corresponden a la vibración O-H y la 1364 a la vibración (C-OH). (Figura 27).

Datos de RMN <sup>1</sup>H de DAPG, la ampliación de las señales del espectro de RMN <sup>1</sup>H para DAPG (Figura 28) indica la presencia de una señal característica de un protón aromático que aparece a δ 5.96 (1H, singulete, H-6), dos señales de grupos de hidroxilo en un intervalo de δ 3.32- 3.30 (3H, s, OH-1, OH-5 y OH-3) y una señal de los grupos metilo δ 2.65 (s, 6H, 2 COCH<sub>3</sub>- H8 y H10).

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 29a,b) se indica la presencia de cinco señales correspondientes a los carbonos aromáticos δ 206.1 (C7, C9), 173.5 (C-3), 171.1 (C-1, C5), 105.8 (C-2, C4), 96.5 (C-6), 32.9 (C-8, C10). La señal en 32.9 corresponde a los carbonos metilos (CH<sub>3</sub>) (C-8, C10) y las señales en 105.8 (C-2, C4) correspondientes a los carbonos unidos a los grupos carbonilos y la de 96.5 que corresponde al CH aromático sustituyentes en la estructura.

El espectro también pone en evidencia que en el anillo hay una sustitución simétrica en los carbonos C-2 y C-4 con respecto al enlace bencílico observada por el singulete para seis protones.

La estructura DAPG (Figura 30) fue confirmada por RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, MS, HRMS e IR. Todas las señales obtenidas a partir de los espectros fueron consistentes con los datos descritos en la literatura sobre el compuesto en cuestión (Campbell y Coppinger 1951; Keel *et al.*, 1992; Harrison *et al.*, 1993; Marchand *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2005).

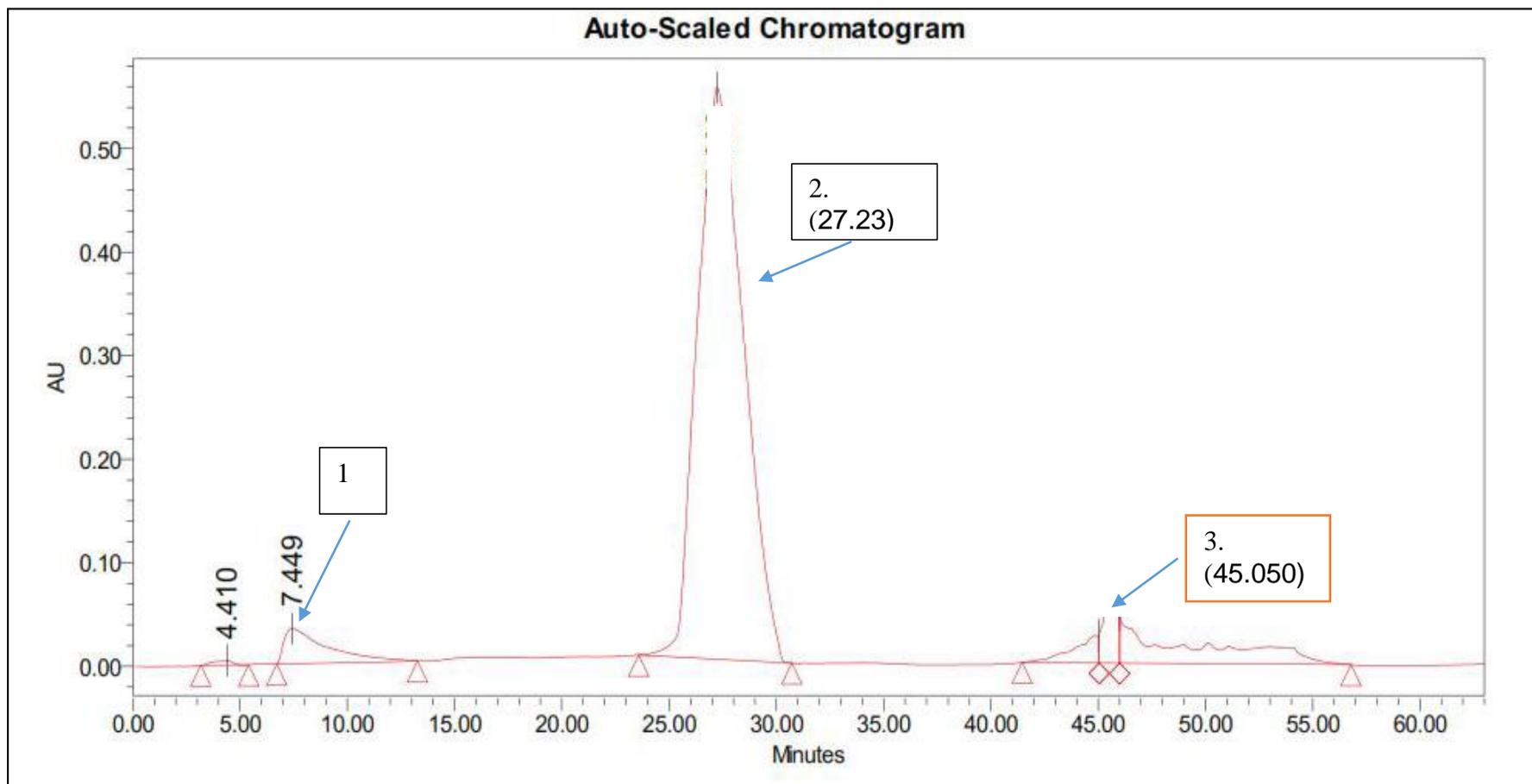


Figura 25. Cromatograma de la fracción 8-1 2222 purificada por HPLC -Semipreparativo, isocrático (fase móvil MeOH: H<sub>2</sub>O 60:40) 3 min/mL, a 270 nm.

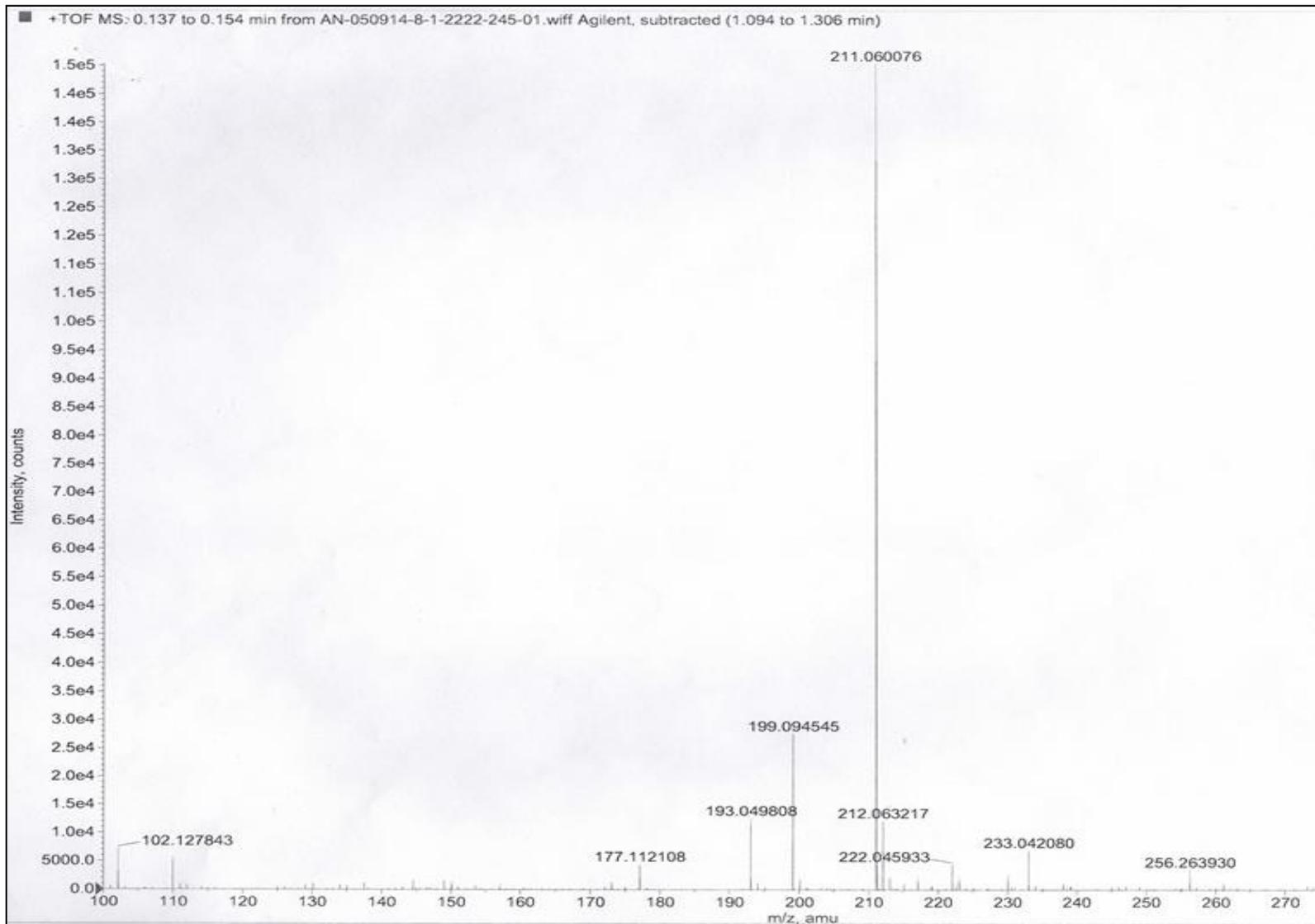


Figura 26a. Espectro de masas de la fracción pura (8-1 2222-2) aislada del extracto de acetato de etilo de *P. protegens* 8-1

### Elemental composition calculator

Target m/z: +211.0601 amu  
 Tolerance: +5.0000 ppm  
 Result type: Elemental  
 Max num of results: 100  
 Min DBE: -0.5000 Max DBE: +300.0000  
 Electron state: Even  
 Num of charges: 1  
 Add water: N/A  
 Add proton: N/A

|   | Elements | Min Number | Max Number |
|---|----------|------------|------------|
| 1 | C        | 0          | 50         |
| 2 | H        | 0          | 50         |
| 3 | N        | 0          | 10         |
| 4 | O        | 0          | 10         |

|   | Formula    | Calculated m/z (amu) | mDa Error | PPM Error | DBE |
|---|------------|----------------------|-----------|-----------|-----|
| 1 | C10 H11 O5 | 211.060100           | -0.024060 | -0.113995 | 5.5 |

Figura 26b. Resultado composición elemental de la fracción pura (8-1 2222-2) por la comparación con la base de datos

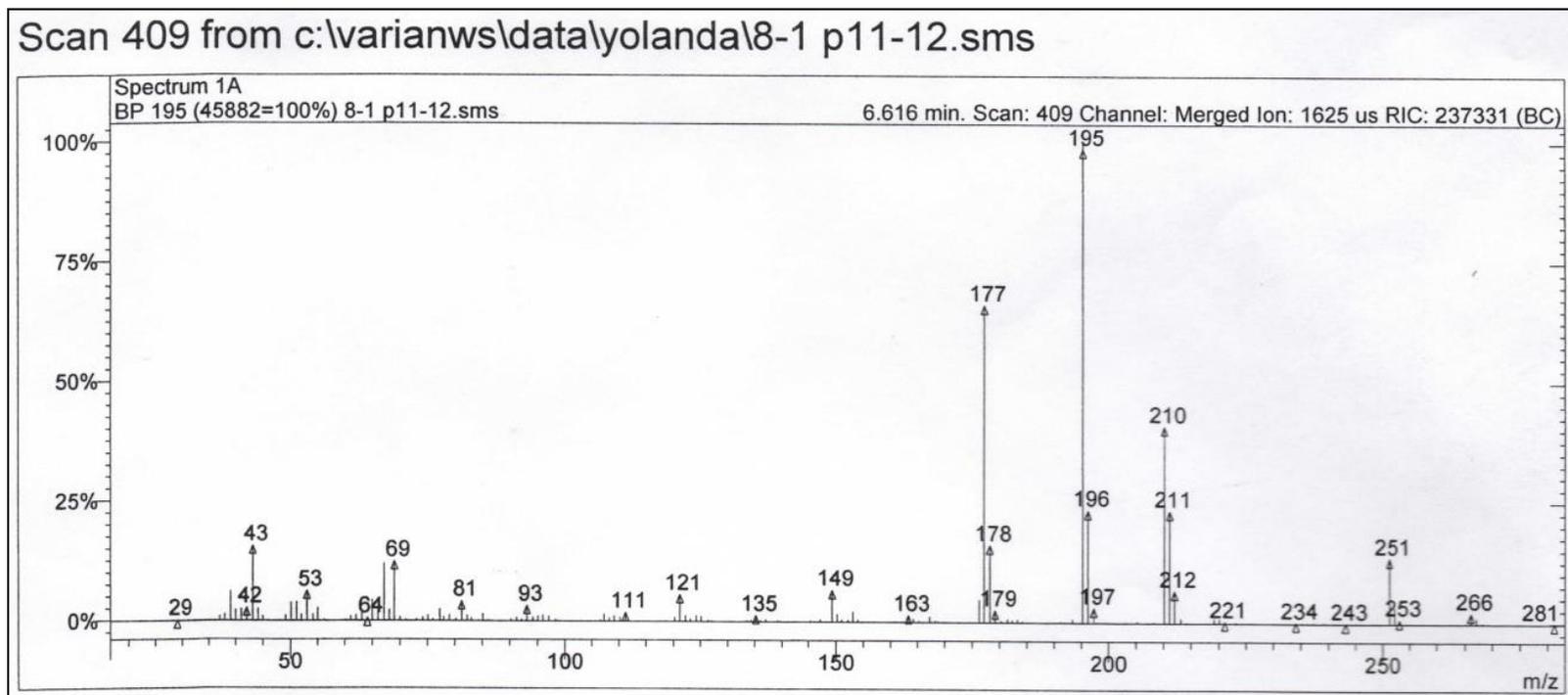


Figura 26c. Espectro de masas (GS-MS) fragmentación de la fracción 8-1 2222-2 del extracto de acetato de etilo de *P. protegens* 8-1.

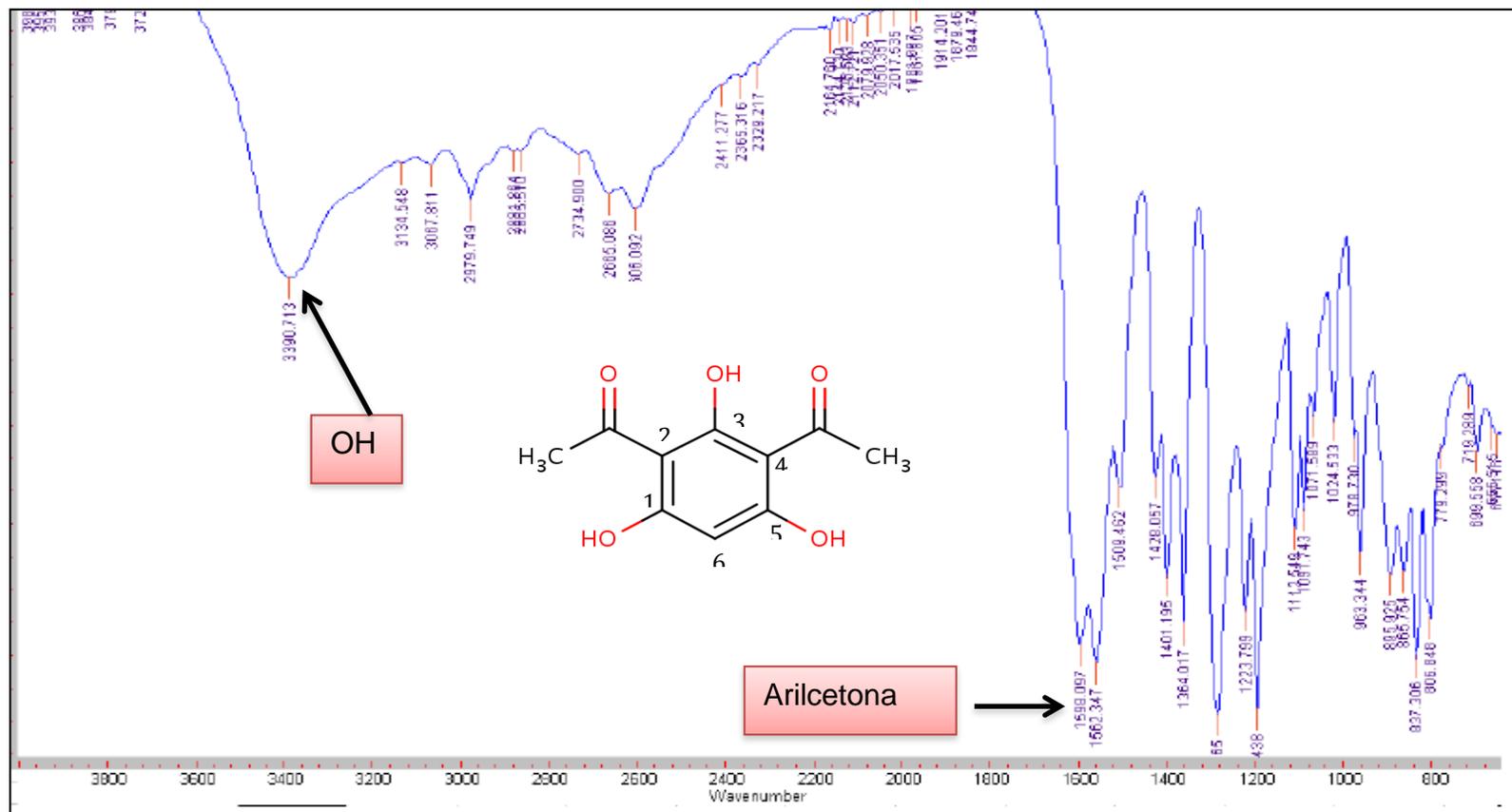


Figura 27. Espectro IR de DAPG aislado del extracto de acetato de etilo de *P. protegens* 8-1. Las bandas en 1598,1562, 1429 cm<sup>-1</sup>, características de conjugado aromático C=O, además de la banda ancha a 3390 cm<sup>-1</sup> (grupo hidroxilo).

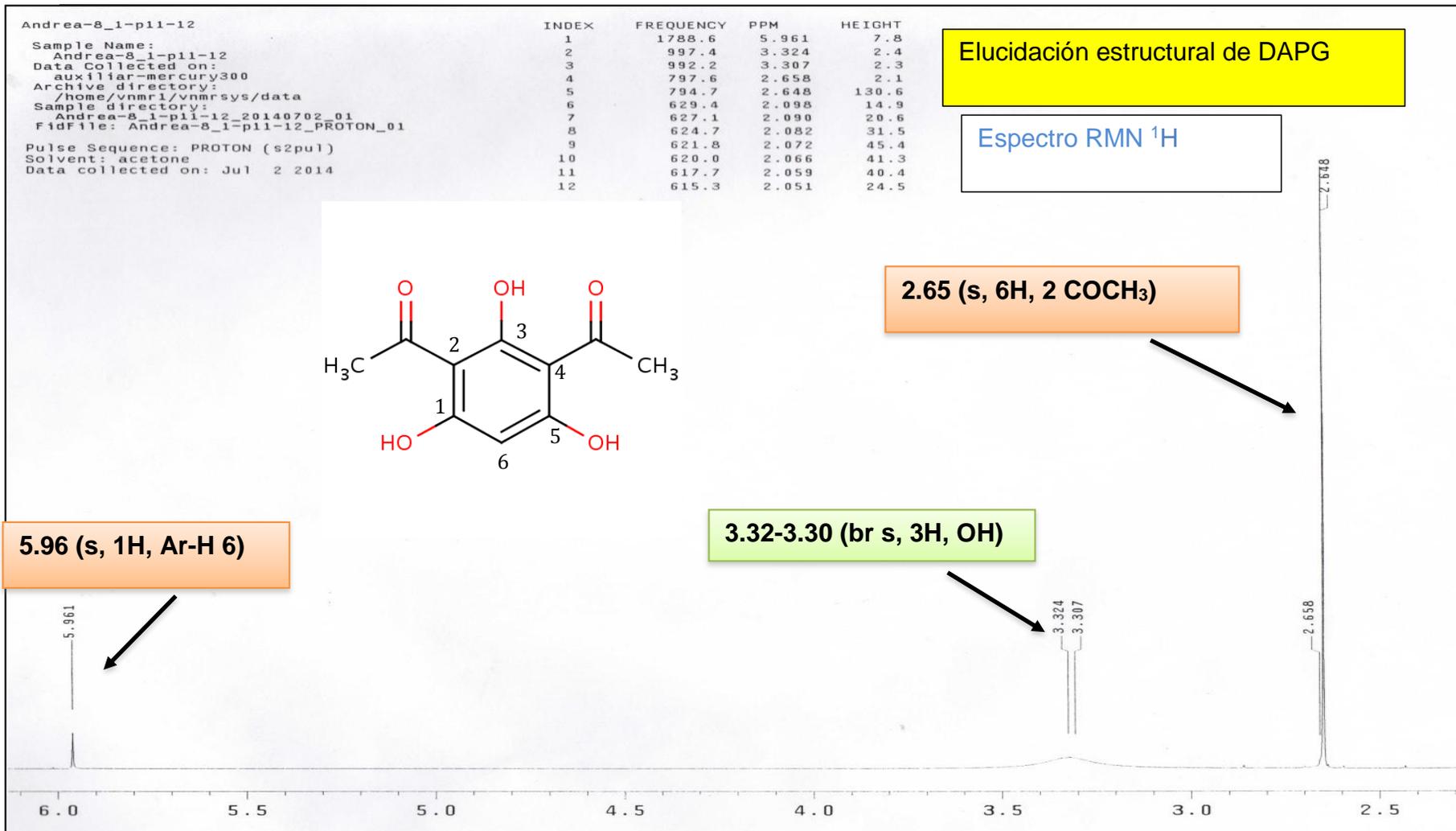


Figura 28. Espectro RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) de DAPG aislado del extracto de acetato de etilo de *P. protegens* 8-1, acetona-*d*<sub>6</sub>

Elucidación estructural de DAPG

Espectro RMN  $^{13}\text{C}$

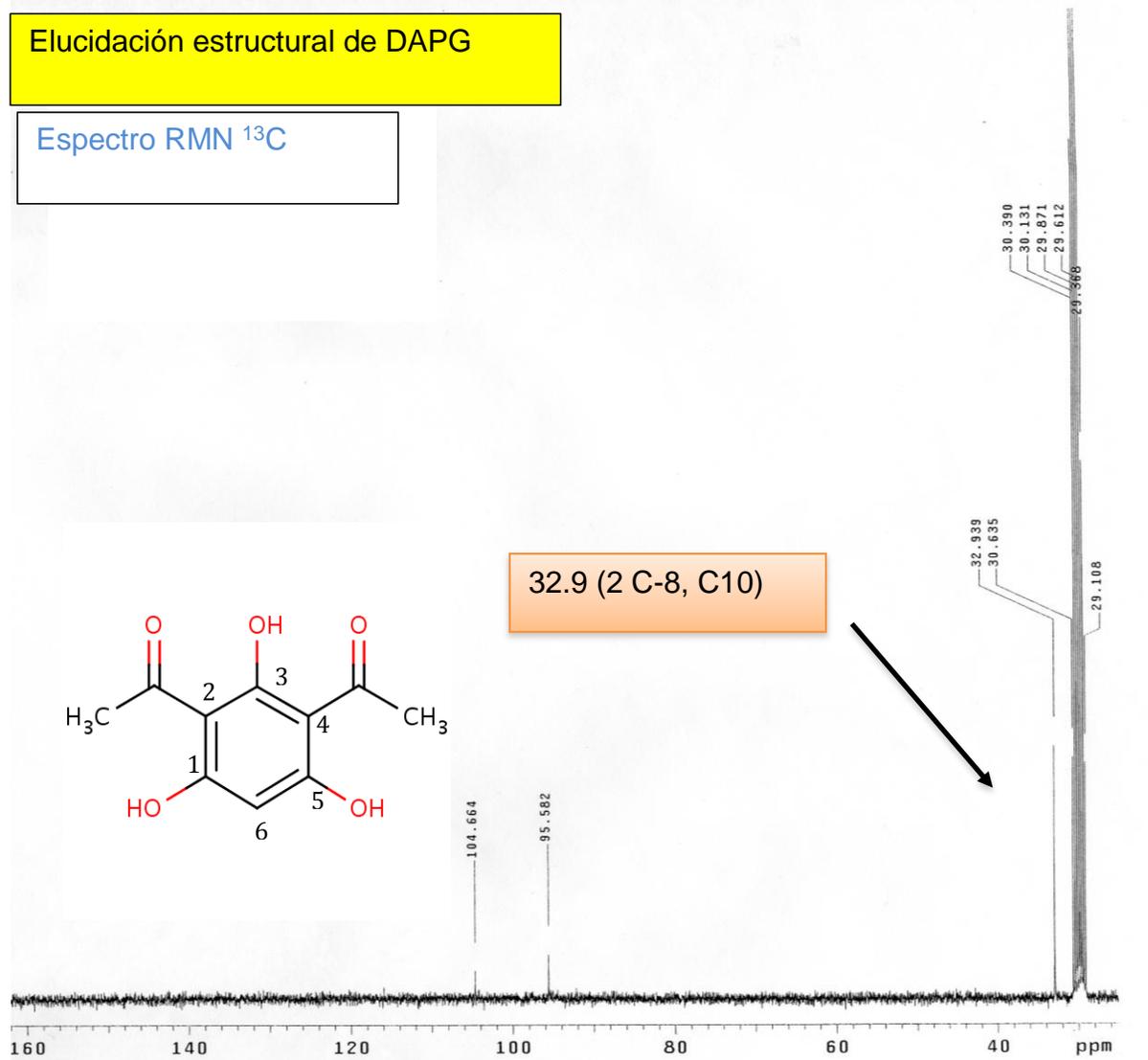


Figura 29a. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (75.4 MHz) de DAPG aislado del extracto de acetato de etilo de *P. protegens* 8-1, acetona- $d_6$

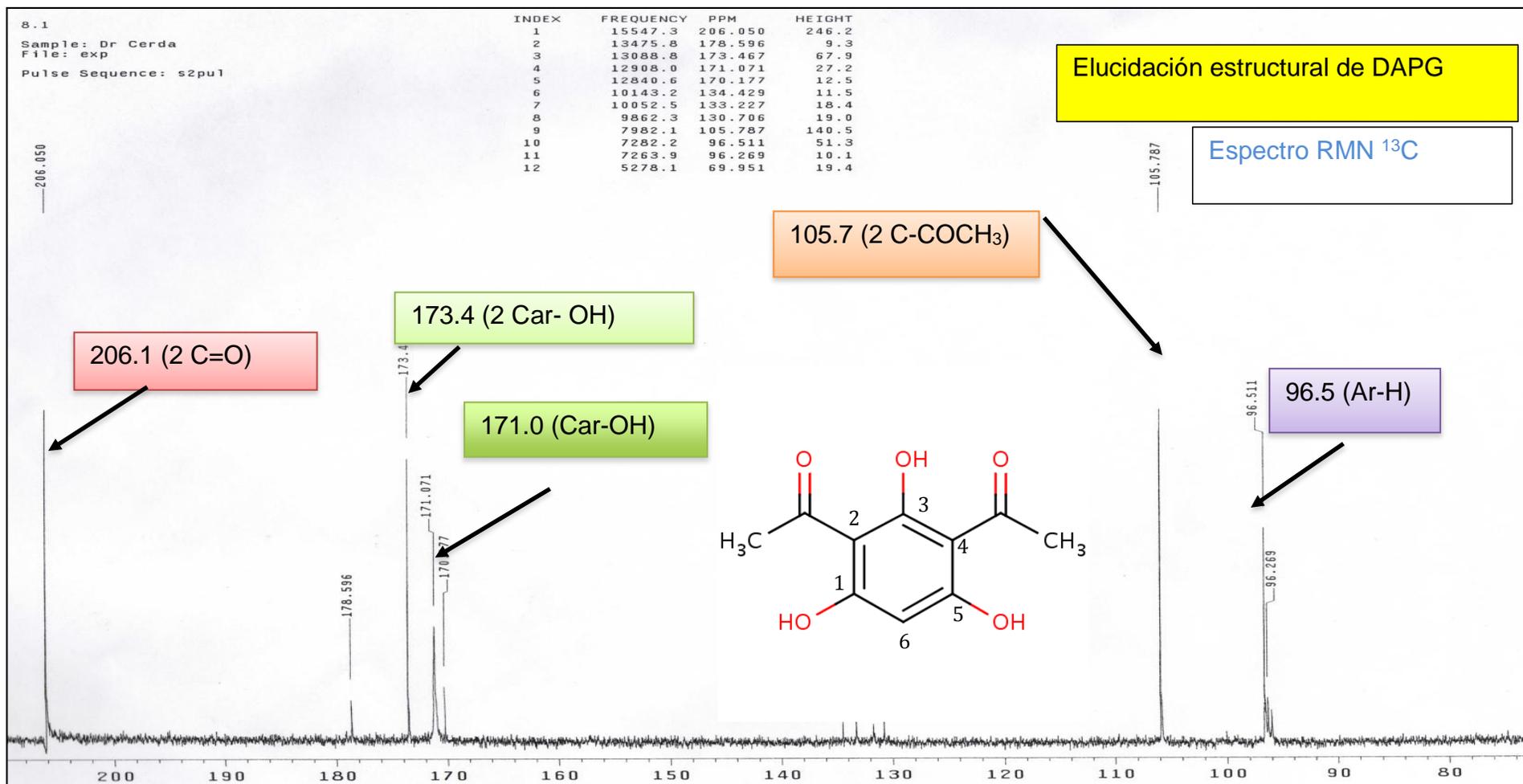


Figura 29b. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (75.4 MHz) de DAPG aislado del extracto de acetato de etilo de *P. protegens* 8-1, acetona- $d_6$

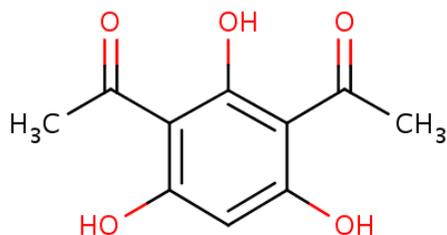


Figura 30. Estructura del DAPG

### 5.6.8 Actividad antiglicación de las fracciones del extracto de cultivo de *P. protegens* 8-1 por la reacción *in vitro* BSA–glucosa.

En la Figura 31 se muestra el efecto inhibitorio en la formación de AGEs de las fracciones F222-1 a F222-4, y del DAPG (fracción 81222-2). La mayoría de las fracciones y el DAPG inhibieron alrededor del 90% la formación de AGEs, en comparación con 68.09% de inhibición obtenido con el control positivo de aminoguanidina.

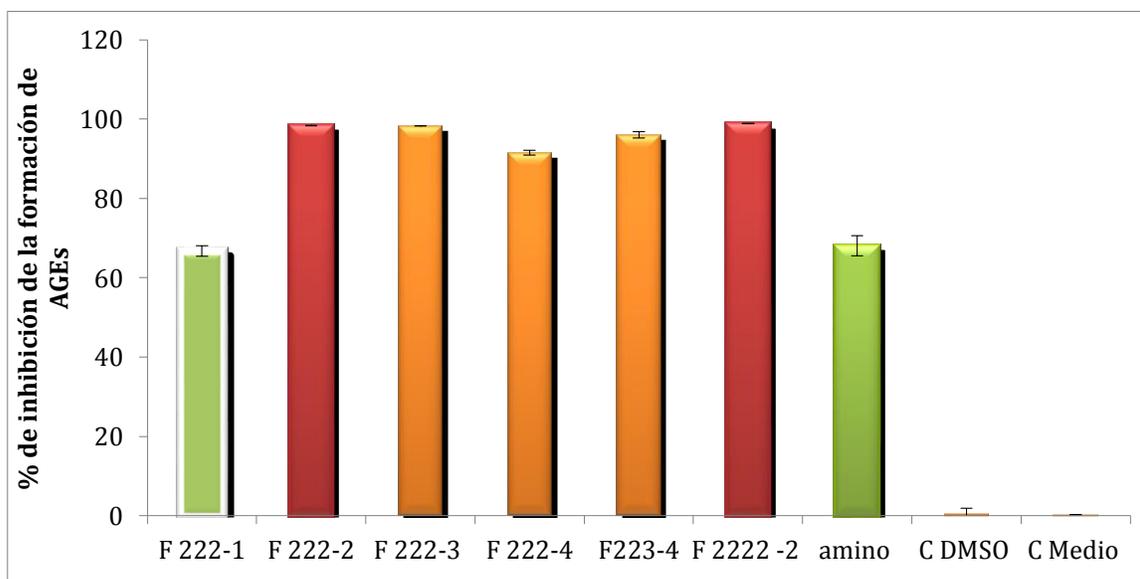


Figura 31. Efecto de las fracciones F 222 1 a F 2224 y F2222-2 en la actividad anti-AGEs. Los valores fueron medidos por triplicado, los extractos en base seca, % de inhibición a 1 mg/mL, aminoguanidina 10mM, se muestra la media y la desviación estándar.

---

---

### 5.6.9 Efecto del DAPG en la formación de AGEs (por varios mecanismos).

Adicionalmente, se evaluó la inhibición de la formación de AGEs por DAPG, *in vitro*, utilizando el modelo metilglioxal (MGO) de acuerdo a Brownlee et al., 1986. Además, para evaluar la inhibición de formación de compuestos de Amadori, se realizó el ensayo de fructosaminas, basado en la reducción de NTB (Johnson et al., 1983). Dado que la fragmentación y los cambios conformacionales de proteínas que conducen a la formación de aductos fluorescentes, pueden depender de los radicales hidroxilo producidos por la autooxidación de azúcares, se evaluó la capacidad del DAPG de inhibir la hidroxilación del benzoato de sodio, por la autooxidación de la ribosa de acuerdo con Hunt et al., 1988.

En la Figura 32 se muestra el efecto del DAPG en la formación de AGEs medida por diferentes mecanismos. El ensayo de BSA-glucosa mide la capacidad de un compuesto dado para inhibir la adición nucleófila de un grupo amino de proteínas para el grupo carbonilo de la glucosa, es decir, su capacidad para inhibir el primer paso de la formación de AGEs (la formación de base de Schiff). En este modelo, DAPG a 4.8 mM inhibió la formación de AGEs 98.8%, en comparación con el control positivo aminoguanidina (AG) a 10 mM que inhibió 60.5%. El DAPG inhibió la glicación con  $EC_{50}$  48.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que se compara favorablemente con la de la aminoguanidina con  $EC_{50}$  236.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Es decir, el DAPG mostró significativamente mayor actividad inhibidora de la glicación que la aminoguanidina. Según Pérez et al., 2010, el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. auritum* exhibió  $EC_{50}$  20.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . DAPG también inhibe la formación de AGEs en mayor medida que otros compuestos aislados de plantas, e.g., Suzuki et al., 2002, aisló dos flavonas C-glicósidos de *Zea mays* las cuales inhibieron la formación de AGEs 53% y 64%. Yokozawa y Nakagawa 2004, aislaron compuestos del té (Luobuma) fueron más activos que la aminoguanidina.

El ensayo de BSA-MGO es un método destinado a estudiar los inhibidores de la formación de AGEs en una etapa intermedia. MGO se une fácilmente a los grupos amino de las proteínas y promueve la formación de productos agregados (Finotti et al., 2001). Los pacientes diabéticos, así como ratas diabéticas muestran característicamente niveles elevados de MGO, lo que conduce a un aumento de los

---

---

niveles de carboximetil-lisina en sangre (Thornalley *et al.*, 1999; Kalapos 1999). Así, el nivel de carboximetil-lisina se utiliza con frecuencia como un marcador de la formación de AGEs y de disfunción en la diabetes. El ensayo de BSA-MGO es una medida de la capacidad de un compuesto dado para bloquear los grupos carbonilo altamente reactivos de MGO, y de esta manera inhibir la formación de AGEs. Como se muestra en la Figura 32, DAPG a 4.8 mM inhibió 94,7% la glicación de proteínas mediada por MGO, en un grado mayor que la AG a 10 mM (81,6%). Se encontró que el DAPG previene la glicación de proteínas por MGO en grado mayor que varios flavonoides reportados por Wu y Yen 2005.

Por otra parte, las modificaciones mediadas por la glucosa en BSA también se evaluaron mediante el ensayo de fructosaminas, que mide reordenamientos de Amadori, compuestos intermedios en la formación de AGEs que se forman rápidamente a partir de una base de Schiff. El grado de reducción de NTB (tretazinolil radical) a monoformazan se determinó y es proporcional a la formación de fructosaminas. El DAPG a 4.8 mM inhibió 26% la reducción de NTB, en comparación con la AG a 10 mM, que inhibe 63,4%. Es decir, el DAPG inhibe la formación de los compuestos Amadori, y al hacerlo, reduce la formación de AGEs (Khalifa *et al.*, 1999).

Las reacciones de hidroxilación se vuelven más prominentes en la diabetes debido a un aumento del estrés oxidativo que se produce a menudo en condiciones de hiperglicemia (Harman 1965; Noto *et al.*, 1983). La autooxidación de azúcares en presencia de metales de transición y oxígeno da compuestos dicarbonilos que aceleran la glicación de proteínas. Además, la producción concomitante de radicales hidroxilo estimula la oxidación de proteínas y proteínas glicosiladas para iniciar y propagar la formación de AGEs (Hunt *et al.*, 1998; Wolff y Dean 1987; Yamaguchi *et al.*, 2000). La producción de radicales hidroxilo a partir de la autooxidación de azúcares se determinó, *in vitro*, a través de la hidroxilación de ácido benzoico (no fluorescente) para formar dihidroxibenzoato, un compuesto altamente fluorescente, en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  como catalizador (Dean *et al.*, 1997). El DAPG a 4.8 mM inhibió la hidroxilación del benzoato en un 93%, mientras que un control positivo con

aminoguanidina a 10 mM, mostró 58.7% de inhibición (Figura 32). Por lo tanto, una disminución significativa en la hidroxilación del benzoato tuvo lugar en presencia de DAPG. Esto puede implicar que DAPG puede o bien eliminar los radicales hidroxilo o, quelar los metales de transición, o ambos (Yokosawa y Nakagawa, 2004).

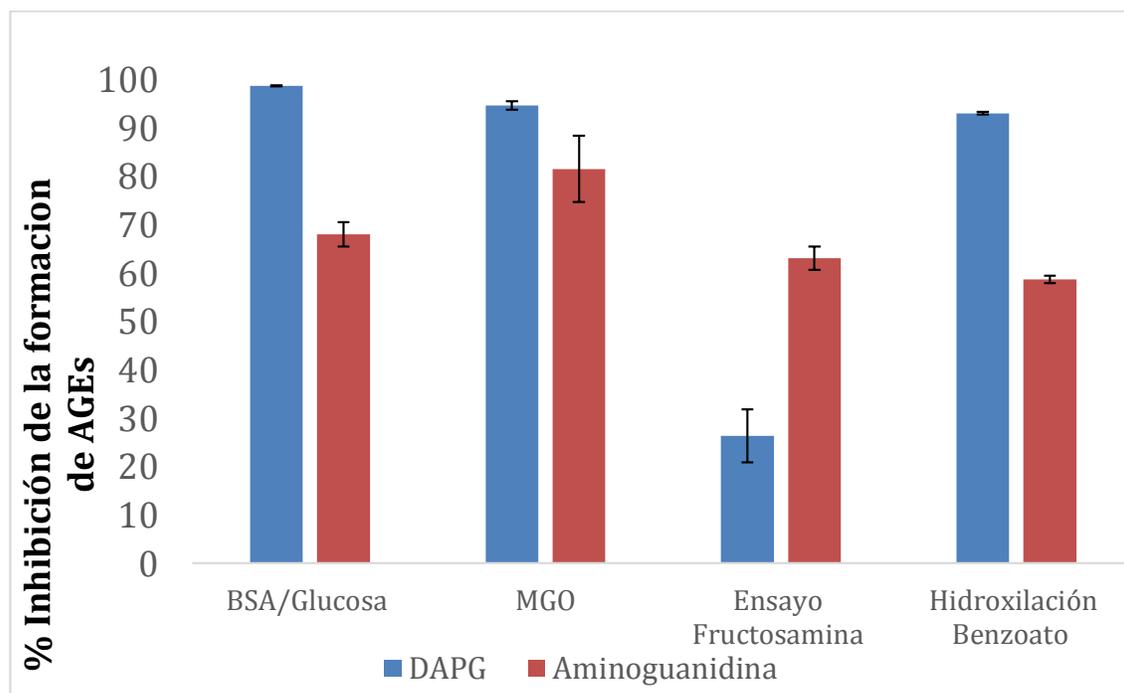


Figura 32. Efecto del DAPG obtenido de *P. protegens* 8-1 sobre la formación de AGEs. Los valores fueron medidos por triplicado, se muestra la media y la desviación estándar. DAPG a 4.8 mM en el modelo (BSA/glucosa, MGO, ensayo de fructosaminas y la hidroxilación benzoato). La AG a 10 mM se usó como control positivo.

Nuestro estudio muestra que la DAPG aislada del endófito bacteriano, *P. protegens*, inhibe la formación de AGEs por varios mecanismos. DAPG es tóxico para varios organismos, en particular a ciertos nematodos que se alimentan de bacterias, pero no es tóxico para todos los nematodos (Meyer et al., 2009). Más recientemente, Troppens et al., 2013 utilizaron una combinación de enfoques genéticos y fisiológicos, para demostrar que DAPG desacopla la respiración y la síntesis de ATP en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en última instancia conduce a la inhibición del crecimiento. DAPG podría atraer la atención para su uso en el tratamiento de la diabetes, pero se sabe poco acerca de cómo puede afectar a los mamíferos. La evaluación del potencial de DAPG como ayuda diabética requiere el conocimiento de cómo DAPG afecta a los humanos, y cómo los organismos tolerantes frente a DAPG

---

---

para ganar la tolerancia. También serán necesarios más estudios para evaluar el uso potencial.

Producto de este trabajo de investigación se realizaron las publicaciones que se muestran en los anexos 8 a 11. El anexo 8 presenta la publicación relacionada al tema sobre actividad antioxidante del HS de la planta, el anexo 9 la publicación de los resultados de la evaluación de la actividad hipoglucemiante del HS de la planta, los anexos 10 y 11 son revisión de los temas de endófitos y alcaloides en el genero *Piper*.

#### **5.6.10 Purificación de los extractos de acetato de etilo de los cultivos de las bacterias *Pseudomonas fulva* 11-1 y *Sphingomonas mucosissima* 3a-1.**

A partir de los resultados de actividad anti-AGEs de las 23 cepas, de las nueve con actividad superior a 50% se escogieron dos cepas adicionales (11-1 y 3a-1) para estudios adicionales de sus extractos de acetato de etilo y purificación de los compuestos activos. Se realizó el cultivo a cada cepa y se obtuvieron los extractos. A partir de 12 L de cultivo de la bacteria 11-1 se obtuvo 1.097 g de extracto y a partir de 28 L de cultivo de la bacteria 3a-1 se obtuvo 3.6 g de extracto. Posteriormente, se purificaron los extractos por medio de técnicas de cromatografía. Esta parte de la tesis fue en colaboración de los estudiantes de licenciatura Marisela Jiménez Cárdenas y Javier Ayala Manriquez. En los Anexos 6 y 7 se presenta el resumen de cada una de las purificaciones realizadas.

---

---

## CAPITULO VI. CONCLUSIONES

- El HS de hojas de *P. auritum* posee actividad antioxidante significativa y actividad quelante *in vitro*.
- El extracto de hexano presentó actividad hipoglucemiante a través de la disminución de los niveles de glucosa en sangre, la hiperlipidemia, y el aumento del sistema de defensa antioxidante.
- El HS de hojas de *P. auritum* eleva significativamente los niveles de insulina en suero y en páncreas de ratas diabéticas en comparación al relación control diabético. El HS protege al páncreas a través de la mejora del sistema de defensa antioxidante.
- El HS disminuye el estrés oxidativo y el nivel de peroxidación lipídica en el hígado y riñón. Es por todas estas razones que, *Piper auritum* puede ser considerada como una planta con un potencial muy interesante y prometedor como un agente antidiabético, lo cual sería también útil en la prevención de las complicaciones diabéticas.
- El extracto de *P. auritum* eleva los niveles de las enzimas antioxidantes a casi a los valores normales, por lo tanto, *P. auritum* previene el estrés oxidativo, actuando como un supresor del daño celular hepático.
- El HS protege las células RIN-5F del estrés oxidativo.
- El HS posee un potente efecto inhibitor sobre la formación de los AGEs Utilizando diferentes modelos *in vitro* y en *in vivo*.
- Los extractos de nueve bacterias aisladas de *P. auritum*, inhiben alrededor de 90% la formación de AGEs.
- Se aisló e identificó el compuesto 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) del extracto de cultivo de *Pseudomonas protegens* 8-1, una bacteria endofita de *Piper auritum*.
- El DAPG inhibe significativamente la formación de AGEs y presentó una inhibición superior a la de la aminoguanidina.

---

---

## BIBLIOGRAFIA

- Ahmad M., Pischetsrieder M., Ahmed N. (2007) Aged garlic extract and S- allyl cysteine prevent formation of advanced glycation end products. *Eur J. Pharmacol.* **561**: 32 -38.
- Al-Attar A.M., Zari T.A. (2010) Influences of crude extract of tea leaves, *Camellia sinensis*, on streptozotocin diabetic male albino mice. *Saudi J. Biol. Sci.* **17**: 295–301.
- Alarcón-Aguilara F., Roman R., Perez S., Aguilar A., Contreras C., Flores J. (1998) Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J Ethnopharmacol.* **61**(2): 101-110.
- Ampofo S., Roussis V., Wiemer D. (1987) New prenylated phenolics from *Piper auritum*. *Phytochemistry.* **26**, 8: 2367-2370.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M. (2005) Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* **99**: 325 -348.
- Araújo, W. L., Saridakis H. O., Barroso P. A. V., Aguilar-Vildoso C. I., and Azevedo. J. L.(2001) Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* **47**:229-236.
- Ardestani A., Yazdanparast R. (2007) Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycooxidation. *Food Chem. Tox.* **45**: 2402-2411.
- Arnold A.E., Maynard Z., Gilbert G.S. and Coley P.D. (2000) Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. *Ecol. Lett.* **3**: 267-274.
- Arnouts P., Bolignano D., Nistor I., Bilo H., Gnudi L., Heaf J., Biesen W. (2013) Glucose-lowering drugs in patients with chronic kidney disease: a narrative review on pharmacokinetic properties. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29** (7): 1284-300.
- Aruoma O.I., Kaur H., Halliwell B. (1991) Oxygen free radicals and human diseases. *J. Roy. Soc. Promot. Health.* **111**: 172-177.

- 
- Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM) 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=acoyo&id=7084>. Consultado 29/05/15.
  - Baginski E.S., Foa P.P., Zak B. (1974) Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer HU (eds) Vol. 2. New York, Academic Press, pp 876-880.
  - Banerjee D. (2011) Endophytic fungal diversity in tropical and subtropical plants. Res. J. Microbiol. **6**: 54-62.
  - Baynes J.W., Thorpe S.R. (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. Diabetes. **48**(1):1-9.
  - Bangera M., Thomashow L. (1999) Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. J Bacteriol. **181**:3155–3163.
  - Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J., Van Loon L. C. (2007) Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology. **97**: 239–243.
  - Bernonville T.D de., Guyot S., Paulin J.P., Gaucher M., Loufrani L., Henrion D., Derbre S., Guilet D., Richomme P., Dat J. F., Brisset M.N. (2010) Dihydrochalcones: Implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. Phytochemistry. **71**: 443-452.
  - Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.
  - Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Sci. Technol. **28**: 25-30.
  - Brownlee M., Cerami A. (1981) The Biochemistry of the complications of diabetes mellitus. Annu. Rev. Biochem. **50**: 335-432.
  - Brownlee M., Vlassara H., Kooney A., Ulrich P., Cerami A. (1986) Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. Science. **232** (4758): 1629-1632.

- 
- 
- Brownlee M. (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu. Rev. Med.* **46**: 223-234.
  - Brucker R.M., Baylor C.M., Walters R.L., Lauer A., Harris R.N. (2008) The identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *Plethodon cinereus*. *J. Chem. Ecol.* **34**: 39–43.
  - Burits M., Bucar F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* **14**: 323 -328.
  - Campbell T. W., Coppinger G. M. (1951) The Spectrophotometric examination of some derivatives of pyrogallol and phloroglucinol *J. Am. Chem. Soc.* **73**: 2708–2712.
  - Cao, G.; Alessio, H.M., Cutler, R.G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **14**:303–31.
  - Castillo U.F., Strobel G.A., Mullenberg K., Condrón M.M., Teplow D.B., Folgiano V., Gallo M., Ferracane R., Mannina L., Viel S., Codde M., Robison R., Porter H., Jensen J. (2006) Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**: 296-300.
  - Christudas I. V. S. N., Kumar P. P., Agastian P. (2013) *In vitro* alpha-glucosidase inhibition and antioxidative potential of an endophyte species (*Streptomyces* sp Loyola UGC) Isolated from *Datura stramonium* L. *Curr. Microbiol.* **67**: 69-76.
  - Cohen M.P., Ziyadeh F.N. (1996) Role of Amadori-modified nonenzymatically glycosylated serum proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **7**:183-190.
  - Crewswell C.J., Runquist O.A., Campbell M.M. (1979) Análisis espectral de compuestos orgánicos. Ed. Diana México. 134- 136 pp.
  - Conabio. (1998) La diversidad biológica de México: Estudio de país. Conabio, México.

- 
- 
- Cox R.L., Underwood E.C. (2011) The importance of conserving biodiversity outside of protected areas in Mediterranean ecosystems. PLoS One. **6**(1): e14508.
  - Cuendet M., Hostettmann K., Potterat O. (1997) Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *fragrae blumie*. Helv. Chim. Acta. **80**: 1144 – 1152.
  - Culy C., Jarvis B. (2001) Repaglinide: a review of its therapeutic use in type 2 diabetes mellitus. Drugs. **61**(11): 1.625-1.660.
  - Day J.G., Stacey G. N. (2007) Cryopreservation and freeze-drying protocols.(eds) methods in molecular biology, vol. 368, 2nd ed. Totowa, New Jersey, pp 15-60.
  - DCCT. (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. The diabetes control and complications trial research group. N. Engl. J. Med. **329**(14): 977-986.
  - Dean R.T., Fu S.L., Stocker R., Davies M.J. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem. J. **324**: 1-18.
  - Dearlove R., Greenspan P., Hartle D., Swanson R., Hargrove J. (2008) Inhibition of protein glycation by extracts of culinary herbs and spices. J Med Food. **11** : 275 – 281.
  - Davis S.N., Granner D.K. (2001) Insulin, oral hypoglycemic agents and the pharmacology of the endocrine pancreas. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw Hill Professional, pp. 1679–714.
  - De Souza J.T., Weller D.M., Raaijmakers J. (2003) Frequency, diversity and activity of 2,4- diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in dutch take-all decline soils. Phytopathology. **93**: 54-63.
  - Dewald R. R. (1966) Preservation of *Serratia marcescens* by high-vacuum lyophilization. Appl. Microbiol. **14** (4): 561-567.
  - Diabetes atlas, 2013 sexta edición.

- 
- 
- Dinis T.C.P., Madeira V.M.C., Almeida L.M. (1994) Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**: 161–169.
  - Diaz M., Baiza L. A., Ibáñez M. Á., Pascoe D., Guzmán A. M., Kumate J. (2004) Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac. Méd. Méx.* **140**(4):437-447.
  - Dowling D.N., Ogara F. (1994) Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* **12**:133-141.
  - Duffy B.K., Défago G. (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 2429-2438.
  - Eizirik D.L., Korbitt G.S., Hellerström C. (1992) Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations *in vitro* impairs the cell function. *J. Clin. Invest.* **90**:1263–1268.
  - Ernst E. (1998) Harmless herbs? A review of the recent literature. *Am. J. Med.* **104** (2): 170–178.
  - Feng P.C., Haynes L.J., Magnus K.E., Plinner J.R., Sherrat H.S. (1993) Pharmacological screening of some West Indian medical plants. *J Pharmacol.* **14**: 556-61.
  - Fenton A.M., Stephens P.M., Crowley J., Ocallaghan M., Ogara F. (1992) Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microb.* **58** (12): 3873-3878.
  - Finotti P., Pagetta A., Ashton T. (2001) The oxidative mechanism of heparin interferes with radical production by glucose and reduces the degree of glycooxidative modifications on human serum albumin. *Eur. J. Biochem.* **268**: 2193-2200.

- 
- 
- Fraga C. G., Leibovitz B. E., Toppel A. L. (1988) Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic. Biol. Med.* **4**:155-161.
  - Frei B., Baltisberger M., Sticher O., Heinrich M. (1998) Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigenous Uses. *J. Ethnopharmacol.* **62**: 149–165.
  - Frode T.S., Medeiros Y.S. (2008) Review Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J. Ethnopharmacol.* **115**: 173–183
  - Frankel E.N., Meyer A.S. (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1925–1940.
  - Fu M.X., Wells-Knecht K.J., Blackledge J.A., Lyons T.J., Thorpe S.R., Baynes J.W. (1994) Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes.* **43**(5):676–683.
  - Garcia A., Leyva M., Martinez J., Stashenko E. (2007) Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum kunth* (piperaceae). difundida en la costa Colombiana. *Scientia et Technica.* **33**: 439-442.
  - García-Mendoza, A.J., Ordóñez M. de J., Briones-Salas M. (2004) Biodiversidad de Oaxaca. IB-UNAM, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, WWF. Eds pp 19-25
  - Ghosh M.N. (1984) *Fundamentals of experimental pharmacology.* Scientific Book Agency, 2nd ed. Calcutta, pp 153-158.
  - Giacco F., Brownlee M. (2010) Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ.Res.* **107**(9):1058-1070.
  - Goh S., Cooper M.E. (2008) The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**: 1143-1152.
  - Gohil T., Pathak N., Jivani N., Devmurari Y., Atel, J. (2010) Treatment with extract of *Eugenia jambolana* seed and *Aegle marmelos* leaf extracts prevents

---

---

hyperglycemia and hyperlipidemia in alloxan-induced diabetic. African. J. Pharm. Pharmacol. **4**: 270-275.

- González V., Tello M.L. (2011) The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. Fungal Divers. **47**: 29-42.
- Gonzalez Flecha F.L., Castello P.R., Caride A.J., Gagliardino J.J., Rossi J.P. (1993) The erythrocyte calcium pump is inhibited by nonenzymic glycation: studies in situ and with the purified enzyme. Biochem J. **293**: 369 – 375.
- Gracia A., Martínez M., Morón F., Pinedo Z. (2001) Efecto espasmolítico del aceite de *Piper auritum* en el músculo liso intestinal. Rev Cubana Plant Med. **1**:12-5.
- Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannubaum S.R. (1982) Analysis of nitrate and N15 in biological fluids. Anal Biochem. **126**:131-134.
- Grover J.K., Yadav S., Vats V. (2002) Medicinal plants of India with anti-diabetic potential J. Ethnopharmacol. **81**: 81-100.
- Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 85-23. Revised 1985.
- Gupta M.P., Tomas D.A., Norris H., Williams R., Bos D.H.E. (1985) Safrole: the main component of essential oil from *Piper auritum*. h.k.b. of Panamá. J. Nat. Prod. **48**:330-330.
- Gupta, R.K., Kesari, A.N., Murthy, P.S., Chandra, R., Tandon, V., Watal, G. (2005) Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. J. Ethnopharmacol. **99**: 75–81.
- Halliwell B., Aeschbach R., Loliger I., Aruoma O.I. (1995) The characterization of antioxidants. Food.Chem.Toxicol. **33**: 601-617.
- Harman D. (1968) Free radical theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice. J. Gerontol. **23**: 476-482.
- Harper J.K., Arif A.M., Ford E.J., Strobel G.A., Porco J.A., Tomer D.P., Oneill K.L., Heider E.M., Grant D.M. (2003) Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. Tetrahedron. **59**: 2471-2476.

- 
- 
- Harrison L. A., Letendre L., Kovacevich P., Pierson E., Weller D. (1993) Purification of an antibiotic effective against *Gaeumannomyces graminis var. tritici* produced by a biocontrol agent, *Pseudomonas-aureofaciens*. Soil Biol. Biochem. **25**: 215-221.
  - Harrower A.D. (1996) Pharmacokinetics of oral antihyperglycaemic agents in patients with renal insufficiency. Clin Pharmacokinet. **31**:111–119.
  - Haas D., Keel C. (2003) Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Ann. Rev. Phytopathol. **41**:117-153.
  - Hernández J., Volpato G. (2004) Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. J. Ethnopharmacol. **90**: 293–316.
  - Hermansen K., Davies M. (2007) Does insulin detemir have a role in reducing risk of insulin-associated weight gain?. Diabetes Obes Metab. **9**:209–217.
  - Hepburn D.A., MacLeod K.M., Pell A.C., Scougal I.J., Frier B.M. (1993) "Frequency and symptoms of hypoglycaemia experienced by patients with type 2 diabetes treated with insulin." Diabet Med. **10**. 231-237.
  - Hissin P.J., Foley J.E., Wardzala L.J., Karnieli E., Simpson I.A., Salans L.B., Cushman S.W. (1992) Mechanism of insulin-resistant glucose transport activity in the enlarged adipose cell of the aged, obese rat. J. Clin. Invest. **70**:780–790.
  - Hsieh C., Peng C., Chyau C., Lin Y., Wang H., Peng R. (2007) Low density lipoprotein, collagen, and thrombin models reveal that *Rosemarinus officinalis* L exhibits potent antiglycative effects J. Agric Food Chem. **55**: 2884 – 2891.
  - 
  - Huang D., Ou B., Hampsch M., Flanagan J., Prior R. (2002) High-Throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. J. Agric. Food Chem. **50**: 4437-4444.
  - Huang D.J., Ou B.X., Prior R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem. **53** (6) 1841-1856.
  - Hunt J. V., Dean R.T., Wolff S. P. (1988) Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation: glucose autoxidation as the cause of protein damage

---

---

in the experimental glycation model of diabetes-mellitus and aging. *Biochem. J.* **256**: 205-212.

- Jayasri S., Gunasekaran A., Mathew T. (2008) Anti-diabetic effect of *Costus pictus* leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Diabetes and Metabolism.* 16: 117-122.
- Johnson D., Lardy H. (1967) Isolation of liver or kidney mitochondria. In *Methods in Enzymology*, Eds. R. W. Estabrook and M. E. Pullman. Academic Press, NewYork, 10: 94-96.
- Johnson N.R., Metcalf P.A., Baker J.R. (1983) Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta.* **127**(1):87-95.
- Kalapos M. P. (1999) Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* **110**: 145-175.
- Keel C., Wirthner P., Oberhansli T., Voisard C., Burger U., Haas D., Défago G. (1990) *Pseudomonads* as antagonists of plant-pathogens in the rhizosphere - role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root-rot of tobacco. *Symbiosis.* **9**, 327-341.
- Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger U., Wirthner P., Haas D., Défago G. (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0- importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant. Microbe. In.* **5**, 4-13.
- Khalifa R., Baynes J., Hudson B. (1999) Amadorins: Novel post – Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Bioch Biophys Res. Commun.* **257**: 251 -258.
- Kim H.Y., Kim K. (2003) Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts *in vitro*. *J. Agric. Food. Chem.* **51**: 1586-1591.
- Kinney L.T.L., Rodnick K.J. (2001) Effects of aerobic exercise on energy metabolism in the hypertensive rat heart. *Phys. Ther.* **81**: 1006-1017.
- Kikuzaki H., Nakatani N. (1993) Antioxidant effects of some ginger constituents. *J. Food Sci.* **58**: 1407–1410.

- 
- 
- Klein R., Klein B., Moss S.E., Cruickshanks K.J. (1995) The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy XV: The long-term incidence of macular edema. *Ophthalmology*. **10** (2):17-16.
  - Koleva I.I., van Beek T.A., Linssen J.P.H., de Groot A., Evstatieva L.N. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study of three testing methods. *Phytochem. Anal.* **13**: 8–17.
  - Kume S., Kato S., Yamagishi S., Inagaki Y., Ueda S., Arima N., Okawa T., Kojiro M., Nagata K. (2005) Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *J. Bone Miner. Res.* **20**: 1647– 1658.
  - Lee C., Yim M. B., Chock P. B., Yim H. S., Kang S. O. (1998) Oxidation-reduction properties of methylglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. *J. Biol. Chem.* **273**: 25272-25278.
  - Lillelund V. H., Jensen H. H., Liang X., Bols M. (2002) Recent developments of transition-state analogue glycosidase inhibitors of non-natural product origin. *Chem. Rev.* **102**: 515-553.
  - Lim M., Park L., Shin G., Hong H., Kang I., Park Y. (2008) Induction of apoptosis of beta cells of the pancreas by advanced glycation end-products, important mediators of chronic complications of diabetes mellitus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1150**: 311-315.
  - Like A.A., Rossini A.A. (1976) Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*. **193**(4251):415-7.
  - Maghrani M., Zeggwagh N.A., Lemhadri A. (2004) Study of the hyperglycemic activity of *fraxinus excelsior* and *silybum marianum* in an animal model of type 2 diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* **91**: 309- 316.
  - Marco G.J. (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.* **45**: 594-598.
  - Marina C., Aldini G., Piccone M., Facino M.N. (2000) Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *Farmacol.* **55**:526-534.
  - Marles R. J., Farnsworth N. R. (1995) Antidiabetic plants and their active constituents *Phytomedicine*. **2**(2):137-189.

- 
- 
- Marchand P.A., Weller D.M., Bonsall R.F. (2000) Convenient synthesis of 2,4-diacetylphloroglucinol, a natural antibiotic involved in the control of take-all disease of wheat. *J. Agric. Food. Chem.* **48**: 1882–1887.
  - Materska M., Perucka I. (2005) Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.) *J. Agric. Food Chem.* **53**( 5): 1750-1756.
  - Maurhofer M., Hase C., Meuwly P., Mettraux J.P., Defago G. (1994) Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas-fluorescens* strain CHA0 - influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology.* **84** (2): 139-146.
  - Meckes M., Rivera D., Nava J. A. (2004) Activity of some mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine* **11**: 446–451.
  - Mentreddy S. R. (2007). Review Medicinal plant species with potential antidiabetic properties. *J. Sci. Food Agric.* **87**(5):743-750.
  - Meyer S.L.F., Halbrecht J.M., Carta L.K., Skantar A.M., Liu T., Abdelnabby H.M.E., Vinyard B.T. (2009) Toxicity of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) to plant-parasitic and bacterial-feeding nematodes. *J. Nematol.* **41**: 274-280.
  - Misas C.A., Hernández M.N., Abraham A.M. (1979) Contribution to the biological evaluation of Cuban plants. *Rev. Cubana. Med. Trop.* **31**: 5-12.
  - Mittermeier R., Goettsch C. (1992) La importancia de la diversidad biológica de México. En: Sarukhán, J. y R. Dirzo (comps.). México ante los retos de la biodiversidad. Conabio. México.
  - Modi P. (2007) Diabetes beyond insulin: review of new drugs for treatment of diabetes mellitus. *Curr. Drug. Discov. Technol.* **4**(1): 39-47.
  - Mohanty P., Hamouda W., Garg R., Aljada A., Ghanim H., Dandona P. (2000) Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metabol.* **85**(8): 2970-3.
  - Mora Á., Aragón D.M., Ospina L. F. (2009) Oxidative stress characterization in streptozotocin-diabetic wistar rats. *Vitae.* **16**: 311-319.

- 
- 
- Moreira D., Souza P., Kaplan M., Pereira N., Cardoso G., Guimaraes E. (2001) Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* c.dc. In mice behavior. An. Acad.Bras. **73**: 234-237.
  - Morimitsu Y., Yosmda K., Esaki S., Hirota A. (1995) Protein glycation inhibitors from thyme ( *Thymus vulgaris* ). Biosci. Biotech. Biochem. **59**: 2018-2021.
  - Morgan P.E., Dean R.T., Davies M.J. (2002) Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycoxidation products. Arch Biochem Biophys. **403**: 259-269.
  - Moure A., Franco D., Sineiro J., Domínguez H., Núñez M. J., Lema J. M. (2000) Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* Hulls as antioxidants. J. Agric. Food. Chem. **48**(9): 3890–3897.
  - Munch G., Westcott B., Menini T., Gugliucci A. (2012) Advanced glycation endproducts and their pathogenic roles in neurological disorders. Amino Acids. **42** (4): 1221-1236.
  - Nagasawa T., Tabata N., Ito Y., Nishizawa N., Aiba Y., Kitts D.D. (2003 a) Inhibition of glycation reaction in tissue protein incubations by water soluble rutin derivatives. Mol Cell Biochem. **249**: 3-10.
  - Nagasawa T., Tabata N., Ito Y., Aiba Y., Nishizawa N., Kitts D. (2003 b) Dietary G-rutin suppresses glycation in tissue proteins of streptozotocin-induced diabetic rats. Mol Cell Biochem. **252**: 141–147.
  - Nair G., Sommerville J., Burke B. (1989) Phenyl propenoids from roots of *Piper auritum*. Phytochemistry. **28** (2): 654-655.
  - Navarro M., Montilla M., Cabo M., Galisteo M., Cáceres M., Morales C., Berger I. (2003) Antibacterial, antiprotozoal and antioxidant activity of five plants used in izabal for infectious diseases. Phytother. Res. **17**: 325–329.
  - Narvaez J.M., Soto C., Delgado G. (2007) Antioxidant evaluation of *eysenhardtia* species (fabaceae): relay synthesis of 3-o-acetyl-11 $\alpha$ ,12  $\alpha$ -epoxy- oleanan-28,13  $\beta$ -olide isolated from *e. platycarpa* and its protective effect in experimental diabetes. Biol. Pharm. Bull. **30**: 1503-1510.
  - Nayak S.S., Pattabiraman T.N. (1980) A new colorimetric method for the estimation of glycosylated hemoglobin. Clin. Chim. Acta. **109**: 267-274.

- 
- 
- Njoroge F.G., Monnier V.M. (1989) The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. *Prog Clin Biol Res.* **304**:85-107.
  - Nishimiki M., Rao N.A., Vagi K. (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**: 849-853.
  - Noto, R.; Alicata, R.; Sfogliano, L.; Neri, S.; Bifarella, M. (1983) A study of cupremia in a group of elderly diabetics. *Acta Diabetol. Lat.* **20**: 81-85.
  - Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R. L. (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4619-4626.
  - OECDiLibrary, 2002. OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4: Health Effects. ISBN: 9789264071001(PDF). <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071001-en>.
  - Olsen, E.O 1990. Métodos ópticos de análisis "Ed. Reverte, Barcelona, 163 - 213 pp.
  - Panserat S., Capilla E., Gutierrez J. (2001) Glucokinase is highly induced and glucose 6-phosphatase 6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comp.Biochem.Physiol.B.* **128**:275-283.
  - Park L., Raman K., GLee K. J., Lu Y., Ferran L. J., Chow W.S., Stern D., Schmidt A. M. (2012) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation end products. *Nat. Med.* **4**: 1025 – 1031.
  - Parmar V., Jain S., Bisht K., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O., Prasad A., Wengel A., Olsen C., Boll P. (1997) Phytochemistry of the genus piper. *Phytochemistry.* **46** (4): 591-673.
  - Patrìti A., Facchiano E., Annetti C., Aisa M.C., Galli F., Fanelli C., Donini A. (2005) Early improvement of glucose tolerance after ileal transposition in a non-obese type 2 diabetes rat model. *Obes Surg.* **15**(9): 1258-64.

- 
- 
- Peng X., Cheng K., Ma J., Chen B., Ho C., Lo C., Chen F., Wang M. (2008) Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation end products. *J. Agric. Food. Chem.* **56**: 1907–1911.
  - Pineda R., Vizcaíno S., García C.M., Gil J.H., Durango D.L. (2012) Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. *Chil J Agr Res.* **72**: 507 - 515.
  - Perez–Guitérrez R.M. (2008) Recent Progress in Medicinal Plants: Phytopharmacology and Therapeutic Values IV. “Antihyperglycemic Agents from Plants”, Chapter 15; Vol. 22. Edit, Studium Press, pp 243- 293.
  - Pérez R., Lugardo S., Cordova I., Neira A. (2010) Anti-glycation effect of spices and chilies uses in traditional mexican cuisine. *J. Nat. Prod.* **3**: 95 -102.
  - Perez R. M., Neira A.M., Hoyo-Vadillo C. (2013) Alkaloids from piper: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Mini Rev Med Chem.* **13**: 163-193.
  - Peterson D. M., Emmons C. L., Hibbs A. H. (2001) Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. *J. Cereal Sci.* **33**: 97–103.
  - Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* **53**(10):4290-302.
  - Pushparaj P.N., Low H.K., Mmanikandan J., Tan B.K., Tan C.H. (2007) Antidiabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **111**: 430-434.
  - Qin B., Nagasaki M., Ren M., Bajotto G., Oshida Y., Sato Y. (2003a) Effects of Keishi-ka-jutsubu-to (traditional herbal medicine: Gui-zhi-jia-shu-fu-tang) on *in vivo* insulin action in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* **73**: 2687-2701.
  - Qin B., Nagasaki M., Ren M., Bajotto G., Oshida Y., Sato Y. (2003b) Cinnamon extract (traditional herb) potentiates *in vivo* insulin- regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res Clin Pract.* **62**: 139-148.
  - Ramette A., Frapolli M., Fischer-Le S. M., Gruffaz C., Meyer J., Défago G., Sutra L., Moënne-L. (2011) *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread

- 
- 
- plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**: 180–188.
- Raaijmakers J.M., Weller D.M., Thomashow L.S. (1997) Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl Environ Microbiol.* **63** (3) 881-887.
  - Rahalinson L., Hamburger M., Hostetiman K., Monod M., Frenk E., Gupta M.P. (1993) screening for antifungal activity of Panamanian plants. *Int J Pharmacognosy.***31**:68-76.
  - Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improvement ABTS radical cation decolourization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 1232–123.
  - Reichenbach G., Momi S., Gresele P. (2005) Nitric oxide and its antithrombotic action in the cardiovascular system. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* **5**: 65–74.
  - Sánchez M. S., Bills G.F., Zabalgoceazcoa I. (2007) The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Divers.* **27**: 171-195.
  - Sang-Eun P., Mee-hyun C., Jin-kyu L., Jong-sang K., Jeong-hwan K., Dae Y.K. Cheon-seok P. (2007) A new colorimetric method for determining the isomerization activity of sucrose isomerase. *Bioscience Biotech.Bioch.* **71**: 583-586.
  - Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* **76**: 270–276.
  - Sarniguet A., Kraus J., Henkels M.D., Muehlchen A.M., Loper J.E. (1995) The sigma factor rS affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**:12255–12259.
  - Sato S., Kusakari T., Suda T., Kasai T., Kurnazawa T., Onodera J., Obara H. (2005) Efficient synthesis of analogs of safflower yellow B, carthamin, and its precursor: two yellow and one red dimeric pigments in safflower petals. *Tetrahedron.* **61**: 9630–9636.

- 
- 
- Schmidt A.M., Yan S.D., Yan S.F., Stern D.M. (2001) The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* **108**: 949–955
  - Schnider-Keel U., Seematter A., Maurhofer M., Blumer C., Blumer C., Duffy B., Gigot-Bonnefoy C., Reimmann C., Notz R., Defago G., Haas D., Keel C., (2000) Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J. Bacteriol.* **182** (5): 1215-1225.
  - Setter S.M., Campbell R.K., Cahoon C.J. (2003) Biochemical pathways for microvascular complications of diabetes mellitus. *Ann. Pharmacother.* **37**: 1858– 1866.
  - Sharma A., Kharb S., Chugh S.N., Kakkar R., Singh G.P. (2000) Evaluation of oxidative stress before and after vitamin E supplementation in diabetic patients. *Metabolism.* **49**: 160–162.
  - Shrestha K., Strobel G.A., Shrivastava S.P., Gewali M.B. (2001) Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan Yew of Nepal. *Planta Med.* **67**: 374-376.
  - Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.* **16**: 144-158.
  - Sell D.R. Monnier V.M. (2012) Molecular basis of arterial stiffening: role of glycation - a mini-review. *Gerontology.* **58** (3): 227-237.
  - Shanahan P., O’Sullivan D., Simpson P., Glennon J., O’Gara F. (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (1): 353–358.
  - Skoog D.A. y West D.M. (1989). “Análisis Instrumental” Ed. Mc Graw Hill, México.
  - Srivastava S.K., Yadav U.C., Reddy A.B., Saxena A., Tammali R., Shoeb M., Ansari N.H., Bhatnagar A., Petrash M.J., Srivastava S., Ramana K.V. (2011)

---

---

Aldose reductase inhibition suppresses oxidative stress-induced inflammatory disorders. *Chem Biol Interact.* **191**: 330–338.

- Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L., (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.* **44** (2): 129-146.
- Silverstein, R.M., Bassier G.C., Morrill, C. Terence. (1991) "Spectrometric Identification of Organic Compounds. Fifth Edition. John Wiley and Sons, INC ISBN 0-47163404-2 pp. 91 -142, 165 -169, 227- 248.
- Shoda M. (2000) Bacterial control of plant diseases review. *J. Biosci Bioeng.* **89** (6): 515–521.
- Sonnleitner E., Haas D. (2011) Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**(1): 63–79.
- Stadler K., Bonini M.G., Dallas S. (2008) Involvement of inducible nitric oxide synthase in hydroxyl radical-mediated lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* **45**: 866-874.
- Sohal R.S., Weindruch R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* **273**: 59-63.
- Son M.J., Minakawa M., Miura Y., Yagasaki K. (2013) Aspalathin improves hyperglycemia and glucose intolerance in obese diabetic ob/ob mice. *Eur. J. Nutr.* **52**:1607–1619.
- Sreejayan N., Rao M.N.A. (1997) Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol.* **49**: 105-108.
- Stafender J.C., Andeaton R.P. (1983) Evaluation of a colorimetric method for determination of glycosylated hemoglobin. *Clin. Chem.* **29**: 135-140.
- Stierle A., Strobel G., Stierle D. (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science.* **260**: 214-216.
- Strobel G.A., Torczynski R., Bollon A. (1997) *Acremonium* sp. - a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant. Sci.* **128**: 97-108.

- 
- 
- Strobel G.A. (2002) Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**: 315-333.
  - Strobel G., Daisy B. (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 491-493.
  - Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J., (2004) Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* **67**: 257- 268.
  - Strongman H., D'Oca K., Langerman H., Das R. (2015) Comparison of diabetes-associated secondary healthcare utilization between alternative oral antihyperglycaemic dual therapy combinations with metformin in patients with type 2 diabetes: an observational cohort study. *Diabetes Obes Metab.* **17**(6):573-80.
  - Suzuki R., Okada Y., Okuyama, T. (2003) Two flavone C-glycosides from the style of *Zea mays* with glycation inhibitory activity. *J. Nat. Prod.* **66**: 564-565.
  - Tada K., Chiba K., Kojima H., Yamaura T. (Fuji Rebio) *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 04108730*. 1992, [Chem. Abstr. 1992, 117, 143451].
  - Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M. (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae) *Food Chemistry*. **90**: 333–340.
  - Thomashow L.S., Weller D.M. (1998) Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* **170**: 3499-3508.
  - Thornalley P.J., Langborg A., Minhas H.S. (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J.* **344**: 109- 16.
  - Troppens D.M., Chu M., Holcombe L.J., Gleeson O., O’Gara F., Read N.D., Morrissey J.P.(2013). The bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol impairs mitochondrial function and affects calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **56**:135-146.
  - Tranulis M.A., Christophersen B., Blom A.K., Borrebaek K.B. (1991) Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver

- 
- 
- of rainbow trout (*salmo gairdneri*). effects of starvation and temperature variations. *Comp. Bioch. Physiol. B.* **99**: 687-691.
- Trinder P. (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* **6**: 24-27.
  - Tsubouchi H., Inoguchi T., Inuo M., Kakimoto M., Sonta T., Sonoda N. (2004) Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic beta cell line, MIN6- a role of NAD(P)H oxidase in beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **326**(1):60-5
  - Turner R.A. (1965) Analgesics: screening methods in pharmacology. Turner R., Ebborn P., editors. Academic Press; New York, p. 100.
  - United Kingdom Prospective Diabetes Study. UK prospective diabetes study (UKPDS) group. (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas and insulin compared with conventional treatment and risk complications in patients with type 2 diabetes (UKDPS33). *Lancet.* **352** (9139): 837-853.
  - Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Mark C.T., Mazur M., Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39** (1): 44-84.
  - Valabhji J., McColl A.J., Richmond W., Schachter M., Rubens M.B., Elkeles R.S. (2001) Total antioxidant status and coronary artery calcification in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* **24**: 1608-1613.
  - Vitek M.P., Bhattacharya K., Glendening J.M., Stopa E., Vlassara H., Bucala R., Manogue K., Cerami A. (1994) Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 4766-4770.
  - Vizoso A., García A., Ramos A. (1999) Ausencia de potencial genotóxico *in vitro* e *in vivo* de un extracto fluido de *Piper auritum*. *Rev cubana plant med.* **3**(2):57-64.
  - Vlassara H., Palace M.R. (2002) Diabetes and advanced glycation end products. *J. Intern. Med.* **251**(2): 87-101.

- 
- 
- Walsh U.F., Morrissey J.P., Morrissey J.P., O'Gara F. (2001) *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12** (3): 289-295.
  - Wang H.X., Ng T.B. (1999) Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life. Sci.* **65**(25): 2663-77.
  - Weller D.M., Raaijmakers J.M., Gardener B.B.M., Thomashow L.S. (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**: 309–48.
  - Weller D., Landa B., Mavrodi O., Schroeder K., Fuente L., Bankhead S., Molar R., Bonsall R., Mavrodi D., Thomashow L. (2007) Role of 2,4 diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas spp.* in the defense of plant roots. *Plant. Biology.* **9**(1): 4–20.
  - Wells-Knecht K.J., Zyzak D.V., Litchfield J.E., Thorpe S.R., Baynes J.W. (1995) Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry.* **34**(11):3702–3709.
  - Wolff S. P., Dean R. T. (1987) Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem. J.* **245**: 243-250.
  - Wu C.H., Yen G.C. (2005) Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J. Agric. Food. Chem.* **53**: 3167-3173
  - Yang F.,Y. (2012) Biosynthesis of phloroglucinol compounds in microorganisms—review MINI-REVIEW. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**: 487–495.
  - Yan S.F., Ramasamy R., Naka Y., Schmidt A.M. (2003) Glycation, inflammation, and RAGE: A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ. Res.* **93**: 1159–1169.

- 
- 
- Yamaguchi L.F., Lago J.H.G., Tanizaki M.T., Mascio, P.D. Kato M.J. (2006) Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*. **67**: 1838–1843.
  - Yilmaz H.R., Uz E., Yucel N., Altuntas L., Ozcelik N. (2004) Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **18**: 234-238.
  - Yokozawa T., Nakagawa T. (2004) Inhibitory effects of *Luobuma tea* and its components against glucose-mediated protein damage. *Food.Chem.Toxicol.* **42**:975–98.
  - Zakrzewski J., Karpinska M., Malinski Z. (2007) A large scale synthesis of a natural antibiotic 2,4 diacetylophloroglucinol (DAPG). *Arch. Pharm.* **340**(2): 103–106.
  - Zinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B. (2002) Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (5): 2198-2208.  
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2004/sem36/pdf/edit3604.pdf>  
<http://www.sefap.org/revista/pdf/3.3.5.pdf>

---

---

## VII. ANEXOS

### ANEXO 1. Nomenclatura de los extractos (E1-E23) de las bacterias estudiadas

| Número de extracto | Código cepa |
|--------------------|-------------|
| E1                 | 6bl         |
| E2                 | AN3         |
| E3                 | 2851        |
| E4                 | 8-4         |
| E5                 | 6111        |
| E6                 | 5-5         |
| E7                 | 9-1         |
| E8                 | 8-1         |
| E9                 | 12-4        |
| E10                | TSA8        |
| E11                | 7-3         |
| E12                | 3a-2        |
| E13                | 3a-1        |
| E14                | 11-1        |
| E15                | 11-4        |
| E16                | 2851b       |
| E17                | 7-4         |
| E18                | 432         |
| E19                | 39-3        |
| E20                | 6b3         |
| E21                | 2714        |
| E22                | 12-6        |
| E23                | 42-5        |

**ANEXO 2. Eluyentes y los soportes utilizados en CCF, CC, CCFP y Sephadex LH20**

| ELUENTE                                | RELACIÓN V/V                  | SOPORTE                 | ELUENTE   | RELACIÓN V/V   | SOPORTE                 |
|--|-------------------------------|-------------------------|---|--|-------------------------|
| CHCl <sub>3</sub>                      |                               | Silica gel              | CHCl <sub>3</sub> : MeOH                                      | 10: 0.5, 8:2, 8: 1,<br>10: 0.3, 10: 1, 9.5 :<br>0.5, 9: 1, 7: 1                | Silica gel              |
| AcOEt                                  |                               | Silica gel              | CHCl <sub>3</sub> : MeOH:<br>Me <sub>2</sub> CO               | 7: 1: 3, 4: 1: 0.5, 6:<br>1:1, 8:2:2, 1:1:5,<br>9.5:0.5:0.5,                   | Silica gel              |
| Et <sub>2</sub> O                      |                               | Silica gel              | CHCl <sub>3</sub> : Et <sub>2</sub> O                         | 7: 1, 3: 1, 8:1, 2:1   | Silica gel              |
| Hex                                    |                               | Silica gel              | MeOH: Me <sub>2</sub> CO                                      | 4: 1   | Silica gel              |
| Me <sub>2</sub> CO                     |                               | Silica gel <sup>o</sup> | EtOH: Hex:<br>CHCl <sub>3</sub>                               | 0.5: 3: 9, 1:6:18  | Silica gel <sup>o</sup> |
| EtOH                                   |                               | Silica gel              | CHCl <sub>3</sub> : MeOH:<br>Et <sub>2</sub> O                | 8: 2:0.5., 8:1:0.5, 8:<br>0.5: 0.5, 9:1:0.5,<br>6:1:0.5, 8:1.5:0.5,<br>7:0.5:1 | Silica gel              |
| MeOH                                   |                               | Silica gel              | CHCl <sub>3</sub> : Et <sub>2</sub> O :<br>Me <sub>2</sub> CO | 7:1:0.5, 3:1:0.5   | Silica gel              |
| CHCl <sub>3</sub> : Me <sub>2</sub> CO | 7: 1, 8:1, 8:2,<br>7:0.5, 7:2 | Silica gel              | AcOET: Et <sub>2</sub> O                                      | 7: 1, 8:1, 1:1   | Silica gel              |
| CHCl <sub>3</sub> : AcOET              | 7: 1, 12: 2,<br>3:1           | Silica gel              | CHCl <sub>3</sub> : AcOET:<br>Me <sub>2</sub> CO              | 7: 1:0.5   | Silica gel              |
| AcOET: TO                              | 7: 3                          | Silica gel              | Hex: Me <sub>2</sub> CO                                       | 1.3, 5:1, 5:2, 1:1   | Silica gel              |

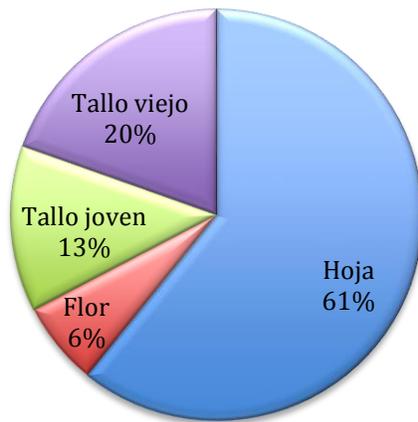
| ELUENTE   | RELACIÓN V/V  | SOPORTE      | ELUENTE  | RELACIÓ<br>N V/V    | SOPORTE    |
|---|---|--------------|--|---------------------|------------|
| CHCl <sub>3</sub> : AcOEt:<br>Et <sub>2</sub> O | 1:1:0.5   | Silica gel   | Hex : MeOH   | 8:1, 2:1            | Silica gel |
| CHCl <sub>3</sub> : MeOH:<br>Hex                | 7: 1:1, 7:1:2, 7:1:<br>2.5, 7.5:1:2,<br>7.5:1:2.5, 7:1:3,<br>8:1:1, 8:1:2,<br>8:1:1.5, 8:1:0.5,<br>6.1:0.5, 6:1:1 | Silica gel   | Éter isopropílico:<br>CHCl <sub>3</sub>                  | 7: 1, 7:3           | Silica gel |
| Me <sub>2</sub> CO: MeOH:<br>Hex                | 1:1:6, 1:1:4  | Silica gel   | Éter etílico :<br>CHCl <sub>3</sub> : Me <sub>2</sub> CO | 7: 1:1,<br>7:1:2    | Silica gel |
| AcOET: Hex                                      | 125: 25   | Silica gel   | CHCl <sub>3</sub> : Et <sub>2</sub> O                    | 6:7                 | Silica gel |
| CHCl <sub>3</sub> : Me <sub>2</sub> CO:<br>Hex  | 7: 1:1.5, 7:1:1,<br>7:2:1   | Silica gel ° | MeOH   |                     | Sephadex   |
| Hex: MeOH                                       | 7: 1, 8:3   | Silica gel   | CHCl <sub>3</sub>  |                     | Sephadex   |
|   | 7: 3  | Silica gel   | CHCl <sub>3</sub> : Et <sub>2</sub> O: Hex               | 4:1:1               | Silica gel |
|   | 7:3   | Silica gel   | CHCl <sub>3</sub> : MeOH:<br>Hex                         | 7: 2:5              | Silica gel |
| CHCl <sub>3</sub> : Me <sub>2</sub> CO          | 1:8, 1.5:9, 4:9, 6:9,   | Silica gel   | Me <sub>2</sub> CO: Et <sub>2</sub> O :<br>Hex           | 3:1:0.5,<br>7:1:0.5 | Silica gel |
| Me <sub>2</sub> CO: CHCl <sub>3</sub> :<br>Hex  | 9:1:3, 2:1:7  | Silica gel   | CHCl <sub>3</sub> : MeOH:<br>Hex: Me <sub>2</sub> CO     | 7: 2:3:0.5          | Silica gel |

---

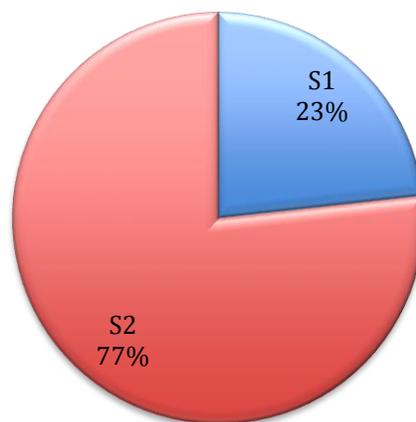
---

### ANEXO 3. Aislamiento de hongos.

Se obtuvieron 43 hongos, con el tratamiento de NaCl (3%, 5 min) se obtuvieron el 65% de los aislados y con el tratamiento etanol (70%) el 35% aislados. Se presenta el porcentaje de hongos aislados de los diferentes tejidos (hoja, flor, tallo joven, tallo viejo) de *P. auritum* y de las dos localidades denominadas PS1 y PS2, respectivamente. El mayor número de aislados lo presentó en el tejido de hoja y en el sitio PS2



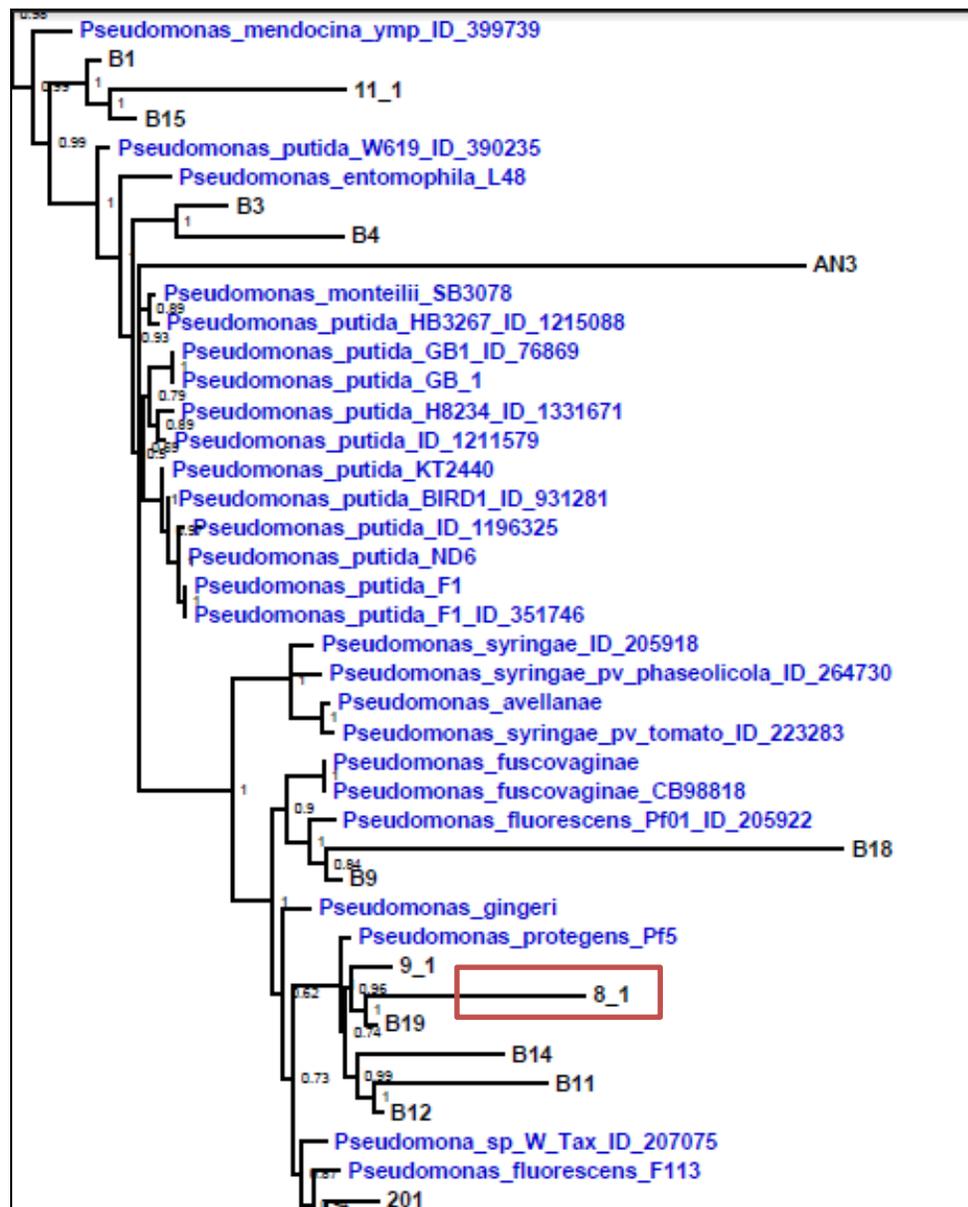
### Hongos aislados de diferentes tejidos de *P. auritum*.



Distribución de hongos aislados de *P. auritum* proveniente los sitios PS1 y PS2.



ANEXO 5. Árbol filogenético a partir de las secuencias del gen *rpoB* para la identificación de la cepa 8-1.



---

---

## ANEXO 6. Purificación del extracto de acetato de etilo de la bacteria

### *Pseudomonas fulva* 11-1.

A partir 12 L de cultivo (medio S-7) de la bacteria *Pseudomonas fulva* 11-1 de las hojas de *P. auritum* se extrajeron tres veces consecutivas con acetato de etilo a temperatura ambiente por medio de licuadora durante 3 min. El extracto de acetato de etilo (EA11-1) se concentró a presión reducida. El EA11-1 presentó una consistencia aceitosa color café oscuro con un peso de 1.097g, al EA11-1 se le realizó un estudio por cromatografía en capa fina CCF con varios sistemas de eluyentes, resultando el mejor perfil de separación fue (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 9:1), con este sistema se hizo un fraccionamiento inicial al EA11-1 y se desarrolló en una columna empacada de gel de sílice, se recolectaron 20 fracciones de 5 mL cada una, a las cuales se les realizó un estudio por CCF, utilizando el mismo eluyente de la CC, dependiendo de los R<sub>f</sub> de las manchas de las 20 fracciones se reunieron en cinco fracciones denominadas F11-1 -1 a 5, se reunieron las fracciones F11-1-2 y 3, por presentar los mismos R<sub>f</sub>, se siguió purificando la fracción F11-1 2, por presentar actividad anti-AGEs. Se realizó la CCF de la fracción F11-1 2 con varios sistemas de eluyentes, el mejor perfil de separación fue (CHCl<sub>3</sub>:Hex:MeOH 1.5:1:7) y se desarrolló en columna empacada de gel de sílice, se recolectaron 24 fracciones y se reunieron en seis fracciones F11-1 (2 -1 a 6), las fracciones que presentaron mayor cantidad y actividad fueron F11-1(2-1 y 2). Se desarrolló en una columna empacada con Sephadex LH-20 a la fracción 11-1 (2-1) utilizando DM y luego con (MeOH:H<sub>2</sub>O 80:20) y se obtuvieron seis fracciones F11-1 (2 -1- 1 a 6). En un columna con sílica gel, se corrió la fracción 11-1 (2-1--1) con el sistema de elución (CHCl<sub>3</sub>:Hex:MeOH 7:1:1.5). La fracción 11-1 (2--1-1-2) se fraccionó utilizando (CHCl<sub>3</sub>:Hex:MeOH 7:1.5:1), se obtuvieron tres fracciones F11-1 (2 -1- 1-2 1 a 3). La F11-1 (2 -1- 1-2 -2) se desarrolló en una CC en sílica gel (5g) eluyendo con (Hex:Me<sub>2</sub>CO 2:1.5). Se recogieron dos fracciones F11-1 (2 -1- 1-2 2 1 a 2). La fracción pura de 5 mg F11-1 (211221) presentó una mancha en CCF con diferentes sistemas de eluciones (Figura 33).

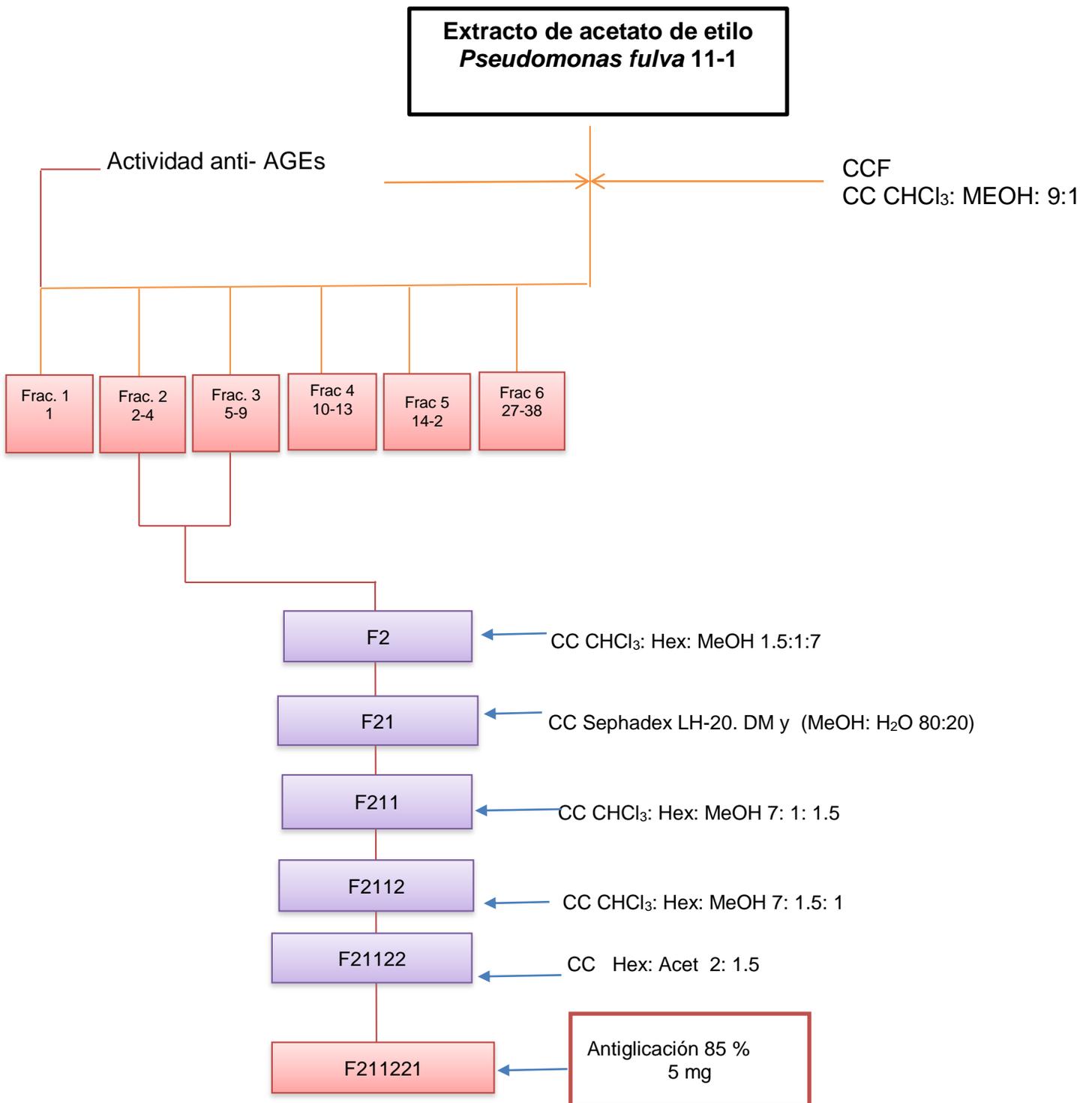


Figura 33. Purificación por cromatografía las fracciones del extracto de acetato de etilo del cultivo de la bacteria 11-1.

---

---

## **ANEXO 7. Purificación del extracto de acetato de etilo del cultivo de la bacteria *Sphingomonas mucosissima* 3a-1.**

A partir de 28 L de cultivo (medio S-7) de la bacteria *Sphingomonas mucosissima* 3a-1 se obtuvo el extracto de acetato de etilo (EA3a-1) de 3.6 g, se realizó un estudio por CCF a EA3a-1 con varios sistemas de eluyentes, resultando el mejor perfil de separación con CHCl<sub>3</sub>:MeOH:Hex 7:1.5:1.5. Con este sistema de elución se hizo una purificación inicial colocando 3.5 g del extracto, macerado con sílica gel (seco), en una columna empacada con 80 g de sílica gel para columna, humedecida con la elución escogida. Se recolectaron 117 fracciones de 15 mL c/u. a las cuales se les hizo un estudio por CCF utilizando el mismo eluyente de la (CC). Dependiendo de los R<sub>f</sub> de las 117 fracciones se reunieron en 12, denominadas F1- F12 (Figura 34).

### **Purificación de la F2.**

La fracción F2 presentó 92% de inhibición de la formación de AGEs, por lo tanto, se siguió purificando la F2 (298 mg), se analizó mediante CCF con varias mezclas de disolventes, después se sometió a una segunda CC (sílica gel) usando una mezcla Hex: ETOAc 2:1, seguido con Me<sub>2</sub>CO y MeOH. Se obtuvo 35 fracciones de 3 mL cada una, las cuales luego del estudio de CCF usando el mismo eluyente de la CC se agruparon 4 fracciones (F21, F22, F23 y F24) La fracción F21 inhibió la formación de AGEs en mayor grado, por lo que continuó su purificación.

La fracción F21 se fraccionó por CC (sílica gel) usando una mezcla Hex: ETOAc (2.3:1) para la eluir inicialmente y luego con Me<sub>2</sub>CO. Se obtuvieron 5 fracciones (F211, F212, F213, F214 y F215). Las fracciones F211 (un líquido aceitoso amarillo) y F212, ambas inhibieron la formación de AGEs.

La fracción F211 se fraccionó por CC (sílica gel) usando una mezcla CHCl<sub>3</sub>: MeOH (9:1) y después con MeOH. Se obtuvieron 3 fracciones (F2111, F2112, F2113), la fracción F2112, un líquido aceitoso amarillo, presentó inhibición en la formación de AGEs.

La fracción F2112 se fraccionó por CC (sílica gel) con DM:Hex (2:1.5) y en seguida con MeOH. Se obtuvieron 3 fracciones entre las cuales, la fracción F21121 inhibió en mayor grado la formación de AGEs.

---

---

La fracción F21121 se fraccionó en una columna de Sephadex LH-20, utilizando DM:Hex (1:1) y en seguida MeOH. Se obtuvieron 4 fracciones. La fracción F211211 presentó actividad anti-AGEs.

CC7. La fracción F211211 fue fraccionada por CC (sílica gel), utilizando ETP: ETOAc (7:3) y seguido con MeOH. Se obtuvieron 3 fracciones (F2112111, F2112112, F2112113). Análisis por CCF de la F2112112, en varias mezclas de solventes, reveló en todos los casos la presencia de una sola mancha. En resumen, a partir del extracto de cultivo de *Sphingomonas* sp. 3a-1 y después de 7 purificaciones CC, se obtuvo la **fracción pura A** F2112112 (28 mg) con las características siguientes; apariencia aceitosa, color amarillo, soluble en MeOH, inhibe la formación de AGEs en 87.6% (a 1 mg/mL).

Purificación de la F212

**La fracción F212** presentó actividad anti- AGEs. Se desarrolló una (CC) con sílica gel con el sistema de elución Hex: Me<sub>2</sub>CO 2:1. Se obtuvieron 5 fracciones. La fracción F2121, por presentar actividad anti-AGEs. Se desarrolló una (CC) con Sephadex LH-20, con el sistema de elución ETP: ETOAc 7:3. Se obtuvieron 3 fracciones. La fracción F21212 se continuó purificando por presentar la mayor actividad anti-AGEs, en una columna de Sephadex LH-20 con el sistema de elución ETP: ETOAc (7.5:3), seguido con MeOH, se obtuvieron 3 fracciones. La fracción F212121 se sometió a CC con Sephadex LH-20 con el sistema de elución ETP: ETOAc (7.5:3), seguido con MeOH, se obtuvieron 2 fracciones. La fracción F2121211 se sometió a CC con Sephadex LH-20 con el sistema de elución Hex: ETOAc 3:1, seguido con MeOH, se obtuvieron 2 fracciones. Se realizó un estudio CCF a la fracción F21212112 con diferentes sistemas de eluyentes, la cual presentó solo 1 mancha, de esta forma se obtuvo la **fracción Pura B**, presentó un 87% de inhibición de formación de AGEs.

**Purificación de la fracción F4.**

La fracción F4 (164mg) presentó actividad anti-AGEs. Se desarrolló una (CC) con sílica gel con el sistema de elución Hex: ETOAc 2:1. Se obtuvieron 3 fracciones. La fracción F41 se continuó purificando por presentar actividad anti-AGEs. Se desarrolló una (CC) con sílica gel, con el sistema de elución DM: Hex 2:1.5. Se obtuvieron 3 fracciones. La fracción F412 se continuó purificando por presentar la mayor actividad

---

---

anti-AGEs, en una columna de Sephadex LH-20 con el sistema de elución Hex: ACE 2.5:1, seguido de una elución final con MeOH, se obtuvieron 2 fracciones. Se realizó un estudio CCF a la fracción F4122 con diferentes sistemas de eluyentes, la cual presentó solo 1 mancha, de esta forma se obtuvo la **fracción pura C**, presentó un 86 % de inhibición de formación de AGEs.

Las fracciones puras A, B, C, se analizaron en HR-ESIMS y se obtuvieron los espectros de masas. Se comparo cada ión molecular con la base de datos (calculadora) equipo respectivamente. Para A: presentó un ión molecular de 282.279301 m/z, calculada 282.979141 m/z con una formula molecular C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>NO, con 0.565013 ppm de error. Para B: presentó un ión molecular de 424.263424 m/z, calculada 424.263491 m/z con la formula molecular C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>NO, con -0.135359 ppm de error. Para C: presentó un ión molecular de 353.266418 m/z, calculada 353.266231 m/z con la formula molecular C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>Na, con 0.528778 ppm de error. (Anexos 5, 6 y 7)

**Extracto de acetato de etilo  
*Sphingomonas sp. 3a-1*  
(90%)**

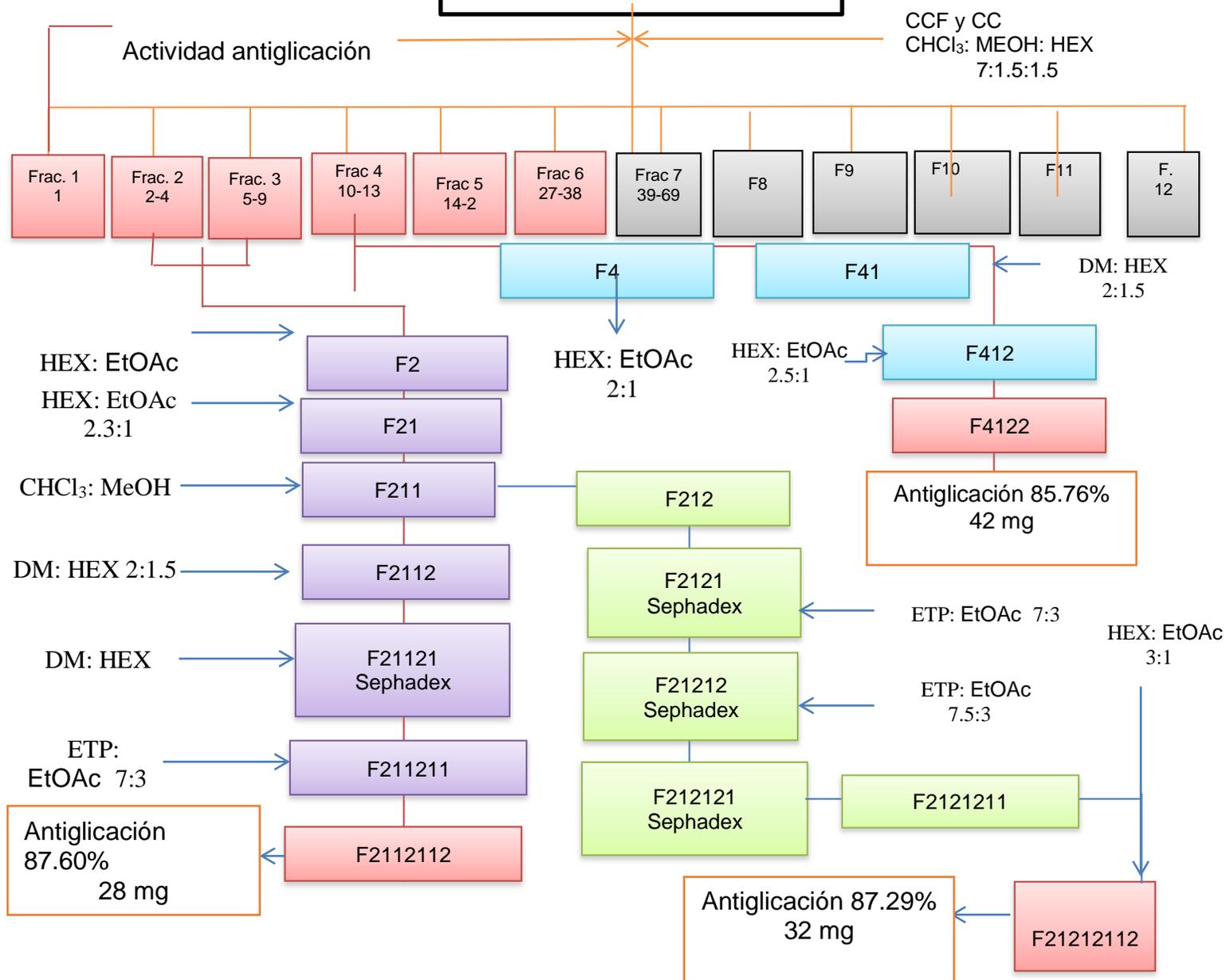
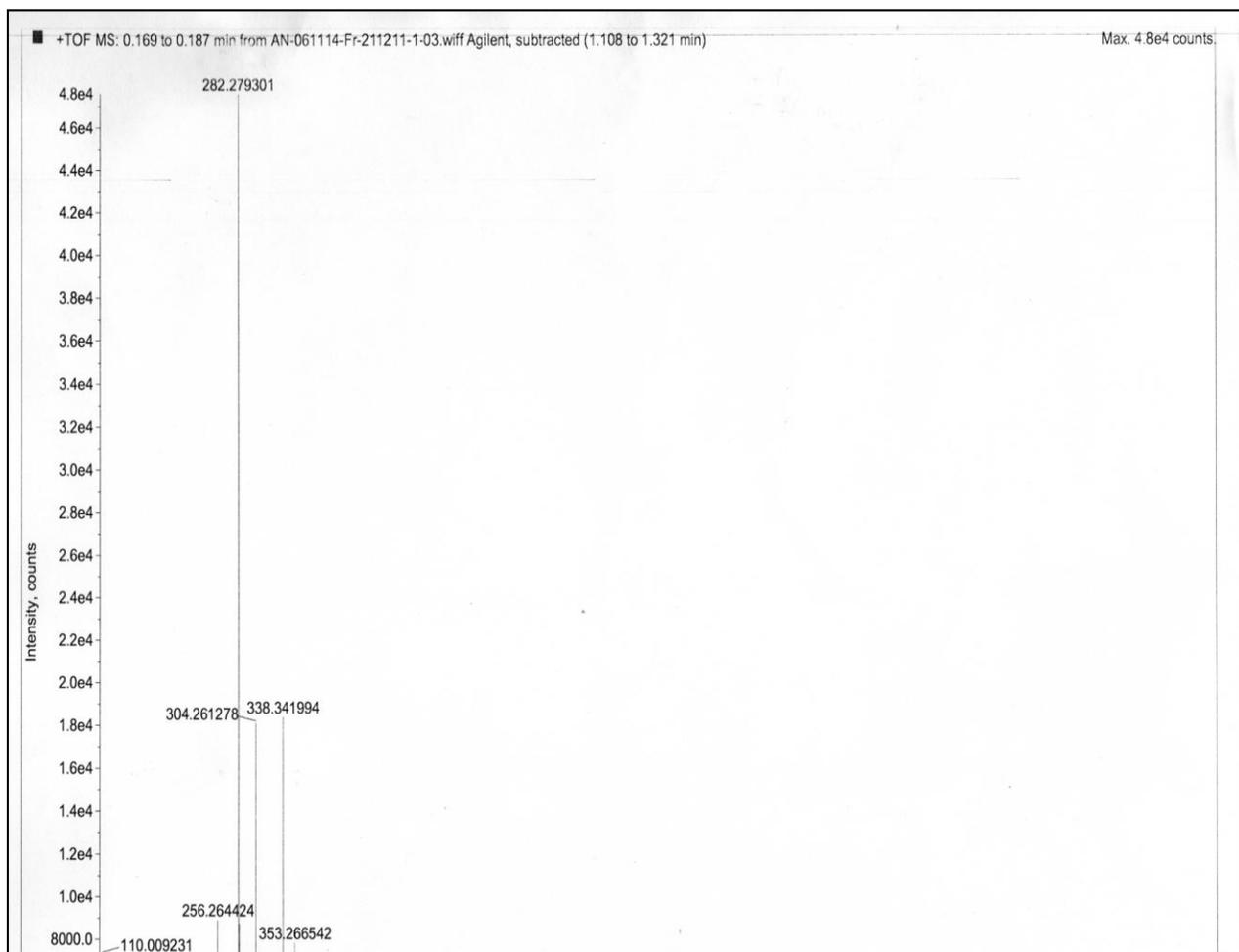


Figura 34. Purificación por cromatografía las fracciones del extracto de acetato de etilo del cultivo de la bacteria 3a-1.

## ANEXO 7a. Espectro de masas de la fracción F2112112 (Sustancia A)



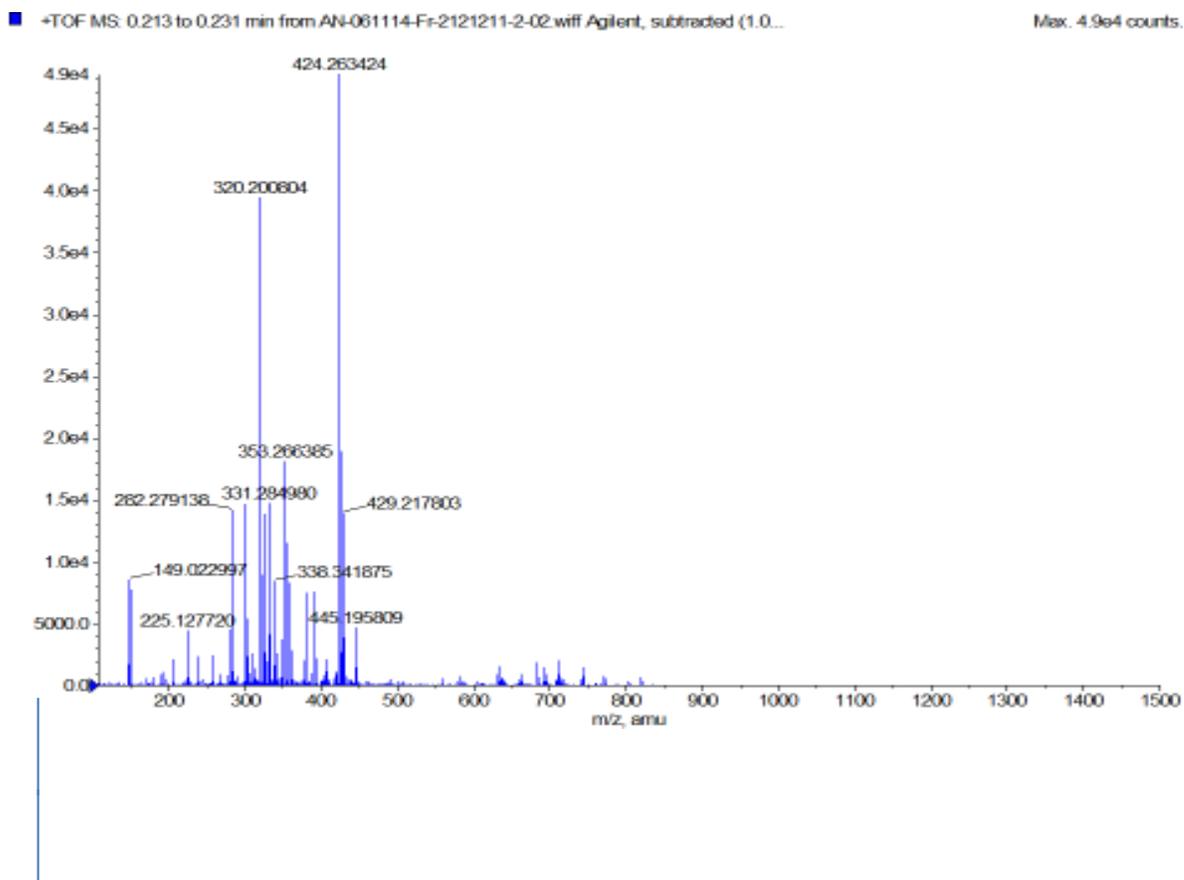
### Elemental composition calculator

Target m/z: +282.2793 amu  
 Tolerance: +5.0000 ppm  
 Result type: Elemental  
 Max num of results: 100  
 Min DBE: -0.5000 Max DBE: +300.0000  
 Electron state: Even  
 Num of charges: 1  
 Add water: N/A  
 Add proton: N/A

|   | Elements | Min Number | Max Number |
|---|----------|------------|------------|
| 1 | C        | 0          | 50         |
| 2 | H        | 0          | 50         |
| 3 | N        | 0          | 5          |
| 4 | O        | 0          | 8          |

|   | Formula     | Calculated m/z (amu) | mDa Error | PPM Error | DBE |
|---|-------------|----------------------|-----------|-----------|-----|
| 1 | C18 H36 N O | 282.279141           | 0.159491  | 0.565013  | 1.5 |

## Anexo 7b. Espectro de masas de la fracción F21212112 (Sustancia B)



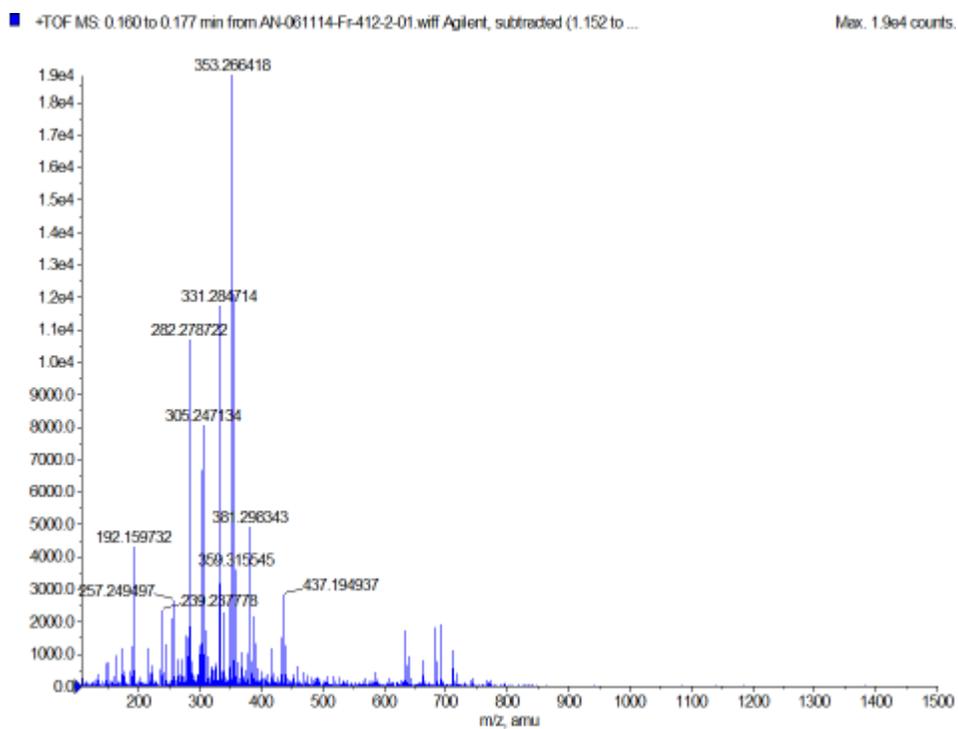
Elemental composition calculator

Target m/z: +424.2634 amu  
Tolerance: +5.0000 ppm  
Result type: Elemental  
Max num of results: 100  
Min DBE: -0.5000 Max DBE: +300.0000  
Electron state: Even  
Num of charges: 1  
Add water: N/A  
Add proton: N/A

|   | Elements | Min Number | Max Number |
|---|----------|------------|------------|
| 1 | C        | 0          | 50         |
| 2 | H        | 0          | 50         |
| 3 | N        | 0          | 5          |
| 4 | O        | 0          | 8          |

|   | Formula       | Calculated m/z (amu) | mDa Error | PPM Error | DBE  |
|---|---------------|----------------------|-----------|-----------|------|
| 1 | C30 H34 N O   | 424.263491           | -0.057427 | -0.135359 | 14.5 |
| 2 | C18 H38 N3 O8 | 424.265342           | -1.908084 | -4.497398 | 1.5  |

## Anexo 7c. Espectro de masas de la fracción F4122 (Sustancia C)



---

---

## ANEXO 8. Artículo de investigación actividad antioxidante.

*Molecules* **2012**, *17*, 11897-11919; doi:10.3390/molecules171011897

OPEN ACCESS

*molecules*

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

### **Evaluation of the Antioxidant and Anti-glycation Effects of the Hexane Extract from *Piper auritum* Leaves *in Vitro* and Beneficial Activity on Oxidative Stress and Advanced Glycation End-Product-Mediated Renal Injury in Streptozotocin-Treated Diabetic Rats**

Rosa Martha Perez Gutierrez <sup>1,\*</sup>, Luis B. Flores Cotera <sup>2</sup> and Adriana Maria Neira Gonzalez <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional S/N, Unidad Profesional Adolfo Lopez Mateos, cp. 07708, Mexico D.F., Mexico

<sup>2</sup> Laboratorio de Metabolitos Secundarios de Microorganismos, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav, Av. no. 2508, cp. 07360, Mexico D.F., Mexico

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: rmpg@prodigy.net.mx; Tel.: +55-5729-6000 (ext. 55142).

Received: 15 September 2012; in revised form: 21 September 2012 / Accepted: 7 October 2012 /

Published: 9 October 2012

---

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of hexane extracts from leaves of *Piper auritum* (HS). Eight complementary *in vitro* test methods were used, including inhibition of DPPH· radicals, nitric oxide, superoxide anion, ion-chelating, ABTS, oxygen radical absorbance capacity, β-carotene bleaching and peroxy radical scavenging. The results indicated that HS possesses high antioxidant activity. To add to these finding we tested the effect against oxidative stress in liver, pancreas and kidney in diabetic rats. Low levels of SOD, CAT, GPx and GSH in diabetic rats were reverted to near normal values after treatment with HS. These results suggest that *P. auritum* prevents oxidative stress, acting as a suppressor of liver cell damage. Given the link between glycation and oxidation, we proposed that HS might possess significant *in vitro* antiglycation activity. Our data confirmed the inhibitory effect of HS on bovine serum albumin, serum glycosylated protein, glycation of LDL, and glycation hemoglobin. The effect of HS on diabetic renal damage was investigated using streptozotocin-induced diabetic rats. The oral administration of HS at a dose of 200 and 400 mg/kg body weight/day for 28 days significantly reduced advanced glycation endproduct (AGE)

## ANEXO 9. Artículo de investigación actividad hipoglucemiante.

Chin J Integr Med

• 1 •

### ORIGINAL ARTICLE

## Antidiabetic Activity of *Piper Auritum* Leaves in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat, Beneficial Effect on Advanced Glycation Endproduct

Adriana María Neira Gonzalez<sup>1</sup>, Rosa Martha Perez Gutierrez<sup>2</sup>, and Luis Bernardo Flores Cotera<sup>1</sup>

**ABSTRACT** **Objective:** To investigate the effect of hypoglycaemic, hypolipidemic, oxidative stress, insulin resistance and advanced glycation endproducts (AGEs) formation of hexane extract from *Piper auritum*. **Methods:** The streptozotocin (STZ)-induced diabetic Wistar rats were treated with the hexane extract from *Piper auritum* leaves for 28 days and a set of biochemical parameters were studied including glucose level, total cholesterol, triglycerides, lipid peroxidation, liver and muscle glycogen, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. The liver function was observed by determining glucose-6-phosphatase, glucokinase and hexokinase activities, and the effect of the hexane extract on insulin level and protein glycation. **Results:** There was a significant increase in blood glucose level ( $P < 0.05$ ) in diabetic rats after 24 h of STZ injection. There was a significantly decreased in blood glucose in diabetic rats with hexane extract treatment ( $P < 0.05$ ). The serum biochemical parameters, hepatic enzymes, thiobarbituric acid reactive substances, glycosylated hemoglobin, AGEs, and insulin level ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ) were restored to normal levels in STZ-diabetic rats treated with hexane extract. **Conclusion:** The hexane extract from *Piper auritum* leaves can efficiently inhibit insulin resistance, AGEs formation, improvement of renal function, lipid abnormalities and oxidative stress, indicating that its therapeutic properties may be due to the interaction of hexane extract components with multiple targets involved in diabetes pathogenesis.

**KEYWORDS** *Piper auritum*, hypoglycaemic, hypolipidemic, oxidative stress, insulin resistance, advanced glycation endproducts formation

Diabetes is a serious metabolic disorder with micro- and macro-vascular complications resulting in significant morbidity and mortality. Diabetes is characterized by hyperglycemia, abnormal lipid and protein metabolism, along with specific long-term complications affecting the retina, the kidney and the nervous system mainly.<sup>(1)</sup> Oxidative stress and advanced glycation endproducts (AGEs) formation induced by hyperglycemia are known to influence diabetic renal changes and nephropathy.<sup>(2)</sup> The number of people with diabetes is increasing worldwide due to population growth, aging, urbanization, increasing prevalence of obesity, calorie rich diet and physical inactivity. Current treatments, although provide a good glycaemic control but do little with preventing complications.<sup>(3)</sup> Besides, most of the prescribed hypoglycaemic drugs or insulin is associated with unwanted side effects. Therefore, there is an increasing demand to research for natural products with antidiabetic activity.<sup>(4)</sup> Herbal medicines are an option because of their comparably therapeutic effects and nontoxic side effects.<sup>(5)</sup>

The large-leaved perennial plant *Piper auritum*

known by the name of Hoja Santa, is used for their spicy aromatic scent and flavor. It has an important presence in Mexican cuisine, and is known for its therapeutic properties. It has been used traditionally as an emollient, antirheumatic, diuretic, stimulant and abortifacient, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal and antidermatophytic.<sup>(6)</sup> Phytochemically, the main components of the essential oil of leaves of *Piper auritum* are safrol and myristicin.<sup>(6)</sup> It has been reported to possess pharmacological properties like antioxidant.<sup>(7)</sup> A search of the literatures revealed that no studies of the potential hypoglycaemic effects of this plant have ever made. The aim of this study was to test the effect of *Piper auritum* on antidiabetic,

©The Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine Press and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

1. Laboratory of Microbial Secondary Metabolites, Department of Biotechnology and Biengineering, Cinvestav, México DF (07360), México; 2. Laboratory of Natural Products Research School of Chemical Engineering and Extractive Industries, México DF (07758), México

Correspondence to: Dr. Rosa Martha Perez Gutierrez, Tel: 5257-29-60-00 Ext. 55142, E-mail: rmpg@prodigy.net.mx  
DOI: 10.1007/s11655-014-1753-2

## ANEXO 10. Review de Endófitos

Current Medicinal Chemistry, 2012, 19, 1-10

1

### Compounds Derived from Endophytes: A Review of Phytochemistry and Pharmacology

R.M.P. Gutierrez<sup>\*1</sup>, A.M.N. Gonzalez<sup>2</sup> and A.M. Ramirez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias extractivas IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional S/N, Unidad Profesional Adolfo Lopez Mateos cp 07708, D.F. Mexico; <sup>2</sup>Laboratory of Research Biotechnology, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav, Av. no. 2508, cp. 07360, D.F. Mexico

**Abstract:** *Objective:* Endophytes, microorganisms that reside in the tissues of living plants, are a promising source of novel compounds with biological activity, or an alternative source of compounds originally isolated from higher plants. The intent of this review is to provide insights into their occurrence in nature, the products that they make, and how some of these organisms are beginning to show some potential for human use.

*Methods:* Information for analysis of endophytic microorganisms was obtained from libraries and Internet scientific databases such as Scirus, Google Scholar, CAB-Abstracts, MedlinePlus, PubMed, SciFinder, Scopus and Web of Science.

*Results:* Many of the compounds reported here were isolated exclusively from endophytes in culture, while other compounds had been previously reported as chemical constituents of higher plants. A survey of the literature shows endophytic microorganisms are mainly known for their alkaloids with cytotoxic, chemopreventive, anti-metastatic and antitumor properties used in the treatment of several types of cancer. The studies of these alkaloids highlight the existence of various potential leads for the development of novel anti-cancer agents. Modern pharmacology studies demonstrated that their crude extracts and active compounds possess wide pharmacological actions, especially for anti-microbial drug discovery, with neuroprotective, antioxidant, nematocidal, antiplasmodium, anti-inflammatory activities.

*Aim of the Review:* This review summarizes the up-to-date and comprehensive information on compounds from endophytes fungi from 1995 to 2011 that relates to 313 compounds isolated from endophytic microorganisms, together with the botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology, and discusses possible trends and the scope for future research of endophytes.

**Keywords:** Endophytes, complementary medicine, phytochemical constituents, pharmacological actions.

#### 1. INTRODUCTION

##### 1.1. Endophytic Microorganisms

The term endophyte refers to a bacterial or a fungal microorganism that colonizes interior organs of plants, but does not have pathogenic effects on its host(s). In their symbiotic association, the host plant (macrophyte) protects and feeds the endophyte, which "in return" produces bioactive metabolites to protect it from herbivores and plant pathogens. Endophytic fungi are an interesting group of microorganisms inhabiting plant communities in their symptomless tissues. They are responsible for the adaptation of plants to abiotic stresses such as drought, light and metals, as well as to biotic ones such as herbivores, insects and pathogens [1]. Microbial natural products represent a huge and largely untapped resource of unique chemical structures that have been optimized by evolution and are produced for communication and in response to changes in plant habitats, including environmental stress. Endophytes include bacteria, fungi and actinomycetes which act as a reservoir of genetic diversity, and have been proven to be a rich source of new biologically active natural products because as a group they inhabit a relatively untapped ecological environment, and their secondary metabolism is activated by their metabolic interactions with their hosts [2] with wide applications in pharmacy [3]. Endophytic fungi have also been found to produce the same important natural products produced by the host plant, such as alkaloids, steroids, terpenoids and peptides, etc. [4]. The need for new and useful compounds to provide assistance and relief in all aspects of the human condition is ever-growing. Drug resistance in bacteria, the appearance of life-threatening viruses, the recurrent problems of diseases in persons with organ transplants, and the tremendous

increase in the incidence of fungal infections in the world's population all underscore our inadequacy in coping with these medical problems. Endophytes, microorganisms that reside in the tissues of living plants, are relatively unstudied as potential sources of novel natural products for exploitation in medicine, agriculture, and food. Of the approximately 300,000 higher plant species that exist on the earth, each individual plant, of the billions that exist here, is host to one or more endophytes [5]. Consequently, the opportunity to find new and interesting endophytic microorganisms among myriads of plants in different settings and ecosystems is very great. One hundred anticancer compounds belonging to 19 different chemical classes, with activity against 45 different cell lines, have been isolated from over 50 different fungal species belonging to six different endophytic fungal groups. Of the total compounds isolated from endophytic fungi, 57% were novel or were analogues of known compounds [6]. Paclitaxel, or taxol, a potent anticancer drug, is the prototypical taxane, isolated from the bark of the Northwest Pacific yew tree *Taxus brevifolia* for the first time by Wani et al. in 1971 [7] (When it was developed commercially by Bristol-Myers Squibb, the generic name was changed to 'paclitaxel' and Taxol was trademarked). Paclitaxel showed early promise against a series of human solid tumor xenografts in nude mice including CX-1 colon and MX-1 breast xenografts. A real turning point in the paclitaxel saga, however, was the discovery of its unique activity as a promoter of tubulin polymerization [8]. Although other clinically useful drugs were known to act as anti-mitotic agents and inhibitors of tubulin polymerization, paclitaxel was the first compound to exhibit the opposite effect on tubulin-stabilization of its polymer.

The most studied fungal endophytes belong to the Ascomycetous family Clavicipitaceae. Several endophyte-derived natural products have shown potential as antifungal agents against a variety of plant and human pathogens. However, the focus of most of the reports is anticancer agents produced by fungal endophytes. Current interest in natural products from endophytic microorganisms is evident from the

\*Address correspondence to this author at the Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias extractivas IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional S/N, Unidad Profesional Adolfo Lopez Mateos cp 07708, D.F. Mexico; Tel: 055 57296000 ext 55142; Fax: + 215-3109757; E-mail: rmpg@prodigy.net.mx; martharosa2743@hotmail.com

## ANEXO 11. Review de Alcaloides de *Piper*

### Alkaloids from *Piper*: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology

Rosa Martha Perez Gutierrez<sup>1,\*</sup>, Adriana Maria Neira Gonzalez<sup>2</sup> and Carlos Hoyo-Vadillo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco, cp 07758, Mexico D.F.;

<sup>2</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav, Av. no. 2508, cp. 07360, Mexico D.F.; <sup>3</sup>Departamento de Farmacología Cinvestav, Av. no. 2508, cp. 07360, Mexico D.F.

**Abstract:** *Objective:* Piper has been used for long timelike condiment and food, but also in traditional medicine around of the world. This work resumes the available and up to date work done on members of the Piperaceae family and their uses for therapeutic purposes. *Methods:* Information on Piper genus was gathered via internet using scientific databases such as Scirus, Google Scholar, CAB-abstracts, MedlinePlus, Pubmed, SciFinder, Scopus and Web of Science. *Results:* The large-leaved perennial plant *Piper* is used for its spicy aromatic scent and flavor. It has an important presence in the cuisine of different cultures. Another quality of these plants is their known medicinal properties. It has been used as emollient, anti-rheumatic, diuretic, stimulant, abortifacient, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal and antidermatophytic. A survey of the literature shows that the genus *Piper* is mainly known for its alkaloids with cytotoxic, chemopreventive, anti-metastatic and antitumor properties in several types of cancer. Studies of its alkaloids highlight the existence of various potential leads to develop new anti-cancer agents. Modern pharmacology studies have demonstrated that its crude extracts and active compounds possess wide pharmacological activities, especially antioxidant, anti-depressive, hepatoprotective, antimicrobial, anti-obesity, neuropharmacological, to treat cognitive disorders, anti-hyperlipidemic, anti-feedant, cardioactive, immuno-enhancing, and anti-inflammatory. All this evidence supporting its traditional uses. *Aim of the review:* This review summarizes the up-to-date and comprehensive information concerning the botany, traditional use, phytochemistry and pharmacology of Piper together with its toxicology, and discusses the possible trend and scope for further research on Piper in the future.

**Keywords:** *Piper*, Piperaceae, complementary medicine, phytochemical constituents, pharmacological actions.

#### 1. INTRODUCTION

Traditional Medicine is still being used nowadays in all parts of the world and has been growing in economic importance particularly by the use of medicinal plants that have a respectable position today, especially in developing countries, where modern health services are limited and represent the only accessible treatment. According to the World Health Organization, the current estimative suggests that many developed countries have a big proportion of the population making use of some sort of traditional practice, especially the use of the medicinal plants. Although the access to the modern medicine is not the problem in these countries, the use of medicinal herbs has kept its popularity for historical and cultural reasons [1]. Medicinal plants represent an important health and economic component of biodiversity and conservation and sustainable use, according to Rhaman *et al.* [2]. Information of the traditional knowledge of medicinal plants and their uses would represent a vital role in the discovery of novel products from plants as chemotherapeutic agents [3]. Members of the *Piper* genus are of commercial, economical, and medicinal importance.

Economically, the Piperaceae is employed for the production of pepper in worldwide spice markets. Plants from the genus *Piper* have been used for a number of practical applications, including as remedies in many traditional medicinal systems, such as traditional Chinese medicine, the Indian Ayurvedic system, and folklore medicines of Latin America and West Indies. *P. methysticum* has been shown to contain insect antifeedant activity. *P. amalago*, distributed from Mexico to Brazil, is used for several conditions, including gastrointestinal and chest pain. Phytochemical investigations of many *Piper* species have resulted in the isolation of numerous biologically active natural products including alkaloids, lignans, unsaturated amides, flavones, aristolactams, long and short chain esters, monoterpenes, sesquiterpenes, arylpropanoids, aldehydes, ketones, propenylphenols and chalcones. Amide alkaloids are typical constituents in the Piperaceae family, most of the compounds known being based on piperidine, pyrrolidine or isobutylamine [4]. Therefore, the genus *Piper* is known to contain molecules of therapeutic importance. In the last few decades, several studies have been carried out on these medicinal plants that also provide evidence in favor of their conventional uses. The purpose of this review is to provide comprehensive information on the botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacological research and toxicology of

\*Address correspondence to this author at the Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateos cp 07758, Mexico D.F.; Tel: 57296000; E-mail: rmpg@prodigy.net.mx