



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO**



FACULTAD DE CIENCIAS

**Determinación del efecto inhibitor sobre α -amilasa de
fracciones del extracto metanólico de un cultivo celular
de *Arnica montana***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA
EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

VALERIA SARAHI FLORES HERNÁNDEZ

ASESORA:

DRA. MARÍA ELENA ESTRADA ZÚÑIGA

CO-ASESORA:

DRA. CARMEN ZEPEDA GÓMEZ

Noviembre 2021

I. INDICE GENERAL

Dedicatoria

Agradecimiento

	Pág.
I. Índice general.....	4
II. Índice tablas.....	6
III. Índice figuras.....	7
IV. Resumen.....	8
1. Introducción	10
2. Antecedentes	
2.1. Diabetes mellitus (DM).....	12
2.1.1. Clasificación	
2.1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1.....	13
2.1.1.2. Diabetes mellitus tipo 2	14
2.1.2. Tratamientos	14
2.1.2.1. Enzima α -amilasa.....	16
2.2. Plantas con potencial hipoglucemiante: efecto atribuible a sus metabolitos secundarios	19
2.2.1. Metabolitos secundarios.....	19
2.2.2. Plantas mexicanas con efecto hipoglucémico.....	25
2.3. <i>Arnica montana</i> , planta medicinal productora de diversos metabolitos secundarios bioactivos	31
2.3.1. Taxonomía	31
2.3.2. Descripción botánica y distribución.....	32
2.3.3. Usos	33
2.3.4. Fitoquímica	34
2.3.4.1. Producción de MS en cultivos in vitro de <i>Arnica montana</i> ...	41
3. Justificación.....	43
4. Hipótesis.....	44
5. Objetivos	45

6. Metodología	46
6.1. Extractos.....	46
6.2. Evaluación de la inhibición de α-amilasa por los extractos.....	46
6.3. Análisis estadístico.....	46
7. Resultados y discusión	48
8. Conclusión	53
9. Perspectivas	54
10. Referencias bibliográficas	55

II. ÍNDICE TABLAS.

	Pág.
Tabla 1. Grupos de fármacos empleados para el tratamiento de DM	15
Tabla 2. Especies pertenecientes a la familia Asteraceae empleadas en la medicina tradicional mexicana contra Diabetes mellitus.....	29
Tabla 3. Metabolitos secundarios identificados en <i>Arnica montana</i>	35
Tabla 4. Correlación de Pearson entre el contenido de metabolitos secundarios totales y el efecto inhibitorio sobre α -amilasa de los extractos de una línea celular de <i>A. montana</i>	52

III. INDICE FIGURAS

	Pág.
Fig.1 Estructura de la α -amilasa.....	17
Fig.2 Mecanismo de acción de la α -amilasa.....	18
Fig.3 Clasificación de terpenos y ejemplos representativos.....	21
Fig.4 Clasificación de compuestos nitrogenados y algunos ejemplos.....	22
Fig.5 Clasificación de compuestos fenólicos.....	23
Fig.6 Estructura básica de los flavonoides.....	24
Fig.7 Ácidos hidroxicinámicos.....	25
Fig.8 Ejemplos de especies utilizadas como antidiabéticos.....	27
Fig.9 Mecanismo de acción de las plantas antidiabéticas en sus órganos diana.....	28
Fig.10 <i>Arnica montana</i>	31
Fig.11 Representación de <i>A. montana</i>	32
Fig.12 Distribución mundial de <i>A. montana</i>	33
Fig.13 Número de compuestos identificados por cada categoría de metabolitos secundario en <i>Arnica montana</i>	34
Fig.14 Métodos de cultivo <i>in vitro</i> para producción de compuestos bioactivos.....	42
Fig.15 Porcentaje de inhibición de α -amilasa por fracciones del extracto metanólico de un cultivo celular de <i>A. montana</i> (4AM,5AM y 6AM) en concentraciones 2.5, 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$	49
Fig.16 Contenido total de metabolitos secundarios presentes en extractos de una línea celular de <i>A. montana</i> : compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (CFvT) y fenólicos ácidos totales (CFAT).....	51

IV. RESUMEN

Arnica montana (Asteraceae) es una planta medicinal de origen europeo que se utiliza principalmente como antiinflamatorio. De esta especie se han identificado un gran número de metabolitos, entre los que se encuentran algunos ácidos fenólicos como el ácido clorogénico y cafeico, los cuales inhiben la actividad de la enzima α -amilasa. La α -amilasa es una enzima involucrada en la digestión de carbohidratos de forma que se libera glucosa al torrente sanguíneo para su posterior absorción. Sin embargo, cuando se padece diabetes mellitus (DM), la insulina no es capaz de captar la glucosa y llevarla a las células por fallas en su secreción o acción, haciendo que el organismo permanezca en un estado de hiperglucemia crónica. Este padecimiento es una problemática de salud mundial y económica que va en aumento en la población de todo el mundo, debido a que es responsable de disfunciones en diversos órganos como en ojos, riñones, corazón, entre otros.

Por ello se requiere la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento de la DM, entre los que se encuentran el estudio de metabolitos secundarios obtenidos de plantas medicinales, con la capacidad de actuar como inductores de síntesis, secreción y sensibilizadores de insulina o como inhibidores enzimáticos, tales como los inhibidores de la α -amilasa. *Arnica montana* es una planta medicinal en la que se han identificado metabolitos secundarios tipo monoterpeno, lactona sesquiterpénica, flavonoide, cumarina y ácidos fenólicos, éstos últimos reportados en otras especies como inhibidores de α -amilasa.

En el presente trabajo, tres fracciones (4AM, 5AM y 6AM conteniendo compuestos fenólicos) de un extracto metanólico del cultivo celular de *A. montana*, fueron estudiadas para determinar si presentaban efecto inhibitorio de α -amilasa. Para ello las tres fracciones se probaron en cinco concentraciones (2.5, 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$). Se empleó ebullición para inactivar la enzima y se agregó agente colorimétrico capaz de unirse a los azúcares reductores producidos por la actividad catalítica de la enzima. Se determinó la absorbancia para estimar el porcentaje de inhibición de la enzima. Los resultados indican que únicamente la concentración de

10 µg/mL inhibió la actividad de la α -amilasa en las tres fracciones (4AM, 5AM, 6AM a 12.12%, 1.66%, 11.95% respectivamente), efecto que se correlacionó al contenido de compuestos fenólicos totales y ácidos fenólicos totales; por lo que es probable que la línea celular esté produciendo ácidos fenólicos reportados para *A. montana*, tales como el ácido cafeico, ácidos 3,4 dicafeoilquínico, 4,5 dicafeoilquínico y 3,5 dicafeoilquínico y que de acuerdo a la literatura ya han demostrado actividad inhibitoria en α -amilasa. Aun cuando esta especie no se usa ampliamente contra la DM, este es el primer estudio que reporta la capacidad inhibitoria de α -amilasa por compuestos extraídos de un cultivo celular de *A. montana*.

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que aproximadamente 173 millones de personas en el mundo padecen diabetes mellitus (DM), siendo esta una problemática a nivel mundial debido a su alta morbilidad y mortalidad (Funke y Melzig, 2005). King *et al.* (1998) mencionan que para 2025 países como Pakistán, Indonesia, Rusia, Brasil, Egipto, Japón y México podrían encabezar la lista de los 10 países con mayor prevalencia de esta enfermedad. En nuestro país actualmente es la segunda causa de muerte y a nivel mundial la quinta (Basto-Abreu *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2020).

La DM es un desorden metabólico de múltiples orígenes que se caracteriza por hiperglucemia crónica con disturbios en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, resultado de defectos en la secreción o acción de la insulina o incluso de ambos (WHO,1999). De acuerdo con el origen de la DM, esta se clasifica en DM tipo 1 en la que la destrucción de las células pancreáticas usualmente lleva a la deficiencia absoluta de la insulina (Daneman, 2006) y en DM tipo 2 en la que los pacientes presentan niveles elevados de glucosa y resistencia a la acción de la insulina, consecuencia de factores como obesidad y sobrepeso (Cervantes-Villagrana y Presno-Bernal, 2013). Por tanto, el tratamiento de la DM consiste en el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre en condiciones normales. La liberación de la glucosa se debe a las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa, que son encargadas de hidrolizar los carbohidratos (almidón) rompiendo los enlaces α -glucosídicos (Ponce *et al.*, 2018; Roy y Mahalingam, 2017). El primer paso en la digestión ocurre cuando el almidón de la dieta es catalizado por la α -amilasa del páncreas, convirtiéndolo en pequeños oligosacáridos; posteriormente la glucosa se difunde por el torrente sanguíneo. Por lo tanto, la inhibición de la α -amilasa significaría el decremento de hiperglucemia postprandial y podría ser una estrategia clave para el control de la DM (López-Martínez *et al.*, 2014; Roy y Mahalingam, 2017).

Debido a la búsqueda de otras alternativas de tratamientos, se han reportado diversos compuestos bioactivos de distintas especies de plantas con actividad inhibitoria en α -amilasa, entre ellos se encuentran los metabolitos secundarios tipo

ácido fenólico (por ejemplo: vanílico, clorogénico, cafeico, ferúlico e isómeros del ácido dicafeoilquínico) y flavonoides (por ejemplo: quercetina, kaempferol e isorhamnetina) (Mendoza y Medina, 2015; Ponce *et al.*, 2018; Mendoza y Loza, 2014; Medina-Pérez *et al.*, 2019; Monzón, 2019).

Arnica montana (Asteraceae) es una planta de origen europeo conocida como estornudadera o tabaco de montaña y con un gran valor medicinal puesto que se le atribuyen varios usos medicinales, principalmente como antiinflamatorio (Waizel-Bucay y Cruz-Juárez, 2014). De esta especie se han identificado un gran número de metabolitos aislados de las hojas, la inflorescencia y el rizoma. Entre ellos se encuentran algunos fenoles como el ácido clorogénico y cafeico, y flavonoides tales como el kaempferol, a los cuales en otras especies se les ha registrado una actividad inhibitoria en la enzima α -amilasa (Kriplani *et al.*, 2017; Waizel-Bucay y Cruz-Juárez, 2014).

El cultivo *in vitro* de plantas permite obtener sistemas de cultivo de células, protoplastos, tejidos y órganos, bajo condiciones donde se controlan diversos factores como la temperatura, el fotoperiodo y la humedad (De la Cruz y González, 2009). Esta técnica ha evidenciado la capacidad de los cultivos de tejidos/órganos, así como de células para producir metabolitos secundarios bioactivos (Arias *et al.*, 2009; De la Cruz y González, 2009; Espinosa-Leal *et al.*, 2018). Por lo tanto, metabolitos secundarios tipo fenólico producidos por un cultivo celular de *A. montana* podrían actuar como inhibidores de α -amilasa.

2. ANTECEDENTES

2.1 Diabetes mellitus (DM)

La DM es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica acompañada de modificaciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos, resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina (WHO,1999). La insulina es una hormona producida en el páncreas cuya función es ingresar la glucosa del torrente a las células del cuerpo para posteriormente convertirse en energía, por lo que, cuando existe la falta o incapacidad de acción de esta hormona, los niveles de glucosa en sangre son elevados (hiperglucemia) (International Diabetes Federation, 2019).

Esta afección/patología es responsable de múltiples complicaciones en casi todos los órganos, principalmente los ojos, riñones, corazón y vasos sanguíneos, siendo la primera causa de ceguera y amputaciones de miembros inferiores en adultos, la tercera causa de enfermedad renal terminal y de frecuentes casos de polineuropatía periférica (ADA, 2005; López *et al.*, 2005). Los síntomas que usualmente presentan las personas con DM incluyen poliuria (producción excesiva de orina), polidipsia (sed e ingesta excesiva de agua), visión borrosa, pérdida de peso e infecciones (Almaguer *et al.*, 2012; Ekoé *et al.*, 2008).

Los factores de riesgo de la DM se clasifican en: factores no modificables como los antecedentes hereditarios, edad, sexo, historia de diabetes gestacional o síndrome de ovarios poliquísticos y en factores modificables como el sobrepeso, obesidad, sedentarismo, factores dietéticos, síndromes metabólicos e hipertensión arterial (Palacios *et al.*, 2012). Se ha demostrado que el sedentarismo, sobrepeso, hipertensión arterial, obesidad y herencia familiar son los principales factores asociados a la presencia de DM (García *et al.*, 2007).

La DM se considera una problemática global debido a que el 8.8% de la población adulta mundial la padece y se estima que aproximadamente son 173 millones de personas las que presentan esta enfermedad (Funke y Melzig, 2005; Katsarou *et*

al., 2017). La incidencia de la DM en el mundo aumentó en un 102% del año 1990 al año 2017 con un valor de 22,9 millones, la tasa de prevalencia durante 2017 fue de 476 millones y la mortalidad incrementó el 125.5% para este mismo año con un valor de 1,37 millones (Lin *et al.*, 2020).

México ocupa el quinto lugar a nivel mundial en cuanto a prevalencia y mortalidad por DM, con valores de 13,1 millones y 64 mil 067 respectivamente de acuerdo con datos del 2017 (Lin *et al.*, 2020). Los cinco estados con mayor proporción de personas diagnosticadas con DM son el Distrito Federal/CDMX, Nuevo León, Veracruz, Estado de México y Tamaulipas (Hernández *et al.*, 2013). Las principales complicaciones en los diabéticos mexicanos son la visión disminuida, ardor, dolor o pérdida de sensibilidad en los pies, diálisis, amputaciones o infartos, siendo esta no solo una problemática social si no también económica (Instituto Nacional de Salud Pública, 2012).

2.1.1 Clasificación

2.1.1.1 Diabetes mellitus tipo 1

La DM tipo 1 (DM 1) o insulino dependiente es una enfermedad autoinmune crónica que implica procesos de destrucción de las células β pancreáticas productoras de insulina, lo que conduce a la deficiencia absoluta de ésta (Daneman, 2006; Ozougwu *et al.*, 2013).

Usualmente, los afectados son niños y adolescentes por lo que también es denominada DM juvenil, y se estima que más de 5000 niños (<15 años) viven con esta condición a nivel mundial (Conget, 2002; Katsarou *et al.*, 2017). Los países con mayor incidencia de DM 1 en niños son Canadá, Irlanda, Inglaterra, Noruega, Suecia y Finlandia, mientras que Venezuela, Colombia, Tanzania, Zambia, Pakistán entre otros reportan una menor incidencia de acuerdo con datos de 2005 (Katsarou *et al.*, 2017).

Este tipo de DM es subdividida en DM 1A o autoinmune y DM 1B o idiopática (Conget, 2002). La DM 1A se asocia a la destrucción de las células β en el páncreas resultado de un ataque autoinmunitario, lo que puede servir como un marcador para

su diagnóstico (Canivell y Gomis, 2014; Rojas *et al.*, 2012). En cambio, la DM 1B no presenta marcadores inmunitarios por lo que la causa de destrucción de las células β aún se desconoce, y su presencia es más frecuente en poblaciones africanas y asiáticas (ADA, 2014)

2.1.1.2 Diabetes mellitus tipo 2

La DM tipo 2 (DM 2) también conocida como DM no insulino dependiente, es un desorden ocasionado por fallas en la secreción y la resistencia a la insulina, consecuencia de factores como la obesidad, hipertensión arterial, sedentarismo, estrés y envejecimiento (Cervantes-Villagrana y Presno-Bernal, 2013; Kaku, 2010).

Las personas con DM 2 se encuentran en un rango de edad mayor a 30 años, por lo que también es conocida como DM del adulto, sin embargo, cada vez son más frecuentes los casos en adolescentes y niños (Conget, 2002; Ozougwu *et al.*, 2013). En México los principales factores de riesgo asociados a la presencia de DM 2 son la obesidad y los antecedentes hereditarios (Sarabia *et al.*, 2015).

2.1.2 Tratamientos

El manejo de la DM consiste en prevenir complicaciones crónicas/agudas y actualmente existe una amplia variedad de fármacos y productos naturales como tratamientos que controlan los niveles de glucosa en sangre como lo son la insulina, las sulfonilureas, biguanidinas, tiazolidinedoinas, meglitinidas e inhibidores de α -glucosidasa y α -amilasa. El mecanismo de acción depende del fármaco y pueden mejorar la sensibilidad a la insulina o aumentar la secreción de esta en el páncreas, así como disminuir la absorción de la glucosa y/o su captación por las células de los tejidos (Tabla 1) (Alfaro *et al.*, 2000; Bastaki, 2005; Santa y Zacarías, 2002). Sin embargo, la mayoría de los medicamentos pueden tener efectos secundarios adversos que incluyen náuseas, vómito, diarrea, cefalea, retención de líquidos, mareos, entre otros.

Dependiendo del tipo de DM será el tratamiento y con ello la administración de los diferentes fármacos. La DM 1 se basa en la administración de insulina, sin embargo,

se pueden usar algunos otros fármacos, mientras que el tratamiento de la DM 2 es progresivo y combinado, desde el manejo adecuado de la dieta y el ejercicio hasta el uso de fármacos combinados con insulina (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidar, 2003).

Tabla 1. Grupos de fármacos empleados para el tratamiento de Diabetes mellitus según Alfaro *et al.* (2000), Bastaki (2005) y Santa y Zacarías (2002).

Grupo	Medicamentos	Descripción	Mecanismo de acción	Efectos adversos
INSULINA	Insulina	Es una proteína de 51 aminoácidos encuadrados en dos cadenas (por ingeniería genética).	Imitación de insulina humana para limitar la hiperglucemia postprandial.	-
SULFONILUREAS	Cloropropamida Tolbutamida Glipizida Glibornurida	Son ácidos débiles cuya estructura se relaciona con las sulfonamidas.	Aumentan la liberación de insulina. Se unen a los receptores de sulfonilureas en la membrana de las células β provocando el cierre de canales de potasio dependiente de ATP (Adenosin Trifosfato). Lo que lleva a una despolarización de la membrana celular para abrir canales que permitirán la entrada de iones de calcio para posteriormente secretar insulina.	Dispepsia, náuseas, trombocitopenia, hiperinsulinemia, aumento de peso, agranulocitosis y anemia hemolítica.
BIGUANIDINAS	Buformina Fenformina Metformina	Son compuestos con dos moléculas de guanidina.	Reduce la absorción de glucosa en tejido muscular y gastrointestinal, inhibe la gluconeogénesis, estimula la captación celular de glucosa e incrementa la unión de insulina-receptor y disminuye la producción hepática de glucosa mejorando su tolerancia.	Anorexia, náuseas, vómito, diarrea, malestar abdominal, anemia macrocítica y acidosis láctica.
TIAZOLIDINEDOINAS	Pioglitazona Rosiglitazona Troglitazona	Glitazonas o sensibilizadores de insulina con estructura común tiazolidina-2,4-diona.	Aumentan la sensibilidad y captación de glucosa en músculo esquelético, tejido adiposo y en hígado a través de los receptores gamma proliferador activado del peroxisoma.	Aumento de peso, sinusitis, infección del tracto respiratorio, faringitis, cefalea, retención de líquido, anemia y fallo hepático.
MEGLITINIDAS	Repaglinida Nateglinida	Son derivados de ácido benzoico e isómeros de D-fenilalanina. No son	Restauran los defectos de la función de la célula β y aporte fisiológico de la insulina, cerrando en la célula β el canal	Náuseas, diarrea, dolor abdominal, cefalea, mareo y fosfenos.

		propia- mente sulfonilureas.	de ATP, similar a las sulfonilureas, sin embargo difieren en los receptores, para llevar a la secreción de insulina.	
INHIBIDORES DE α - GLUCOSIDASA	Acarbosa Miglitol Voglibosa	Agentes que retrasan la digestión de carbohidratos complejos y disminuye el aumento de glucosa plasmática postprandial.	Estos inhibidores bloquean competitivamente las enzimas del intestino delgado que son necesarias para hidrolizar oligo y polisacáridos en monosacáridos. El efecto de esta inhibición es el retraso de la absorción de polisacáridos complejos.	Flatulencias, dolor abdominal y diarrea.

Recientemente se incrementó el interés de la obtención de nuevos compuestos para el tratamiento de la DM, por lo que se ha recurrido a la investigación de productos naturales derivados de plantas. Hay estudios que mencionan que extractos con componentes bioactivos obtenidos de diferentes especies, tienen el potencial inhibidor de las actividades enzimáticas de α -glucosidasa y α -amilasa (Medina *et al.*, 2019; Tundis *et al.*, 2010).

2.1.2.1 Enzima α -amilasa

Las amilasas son un grupo de enzimas distribuidas en animales, plantas y microorganismos, particularmente en mamíferos se encuentra en secreciones pancreáticas y salivales (Qian *et al.*, 1994). Estas enzimas requieren de un ion calcio para mantener su estructura y son activados por iones cloruro (Payan, 2004). La α -amilasa tiene una estructura dividida en tres dominios (Fig. 1): el dominio A posee una estructura de barril TIM (β/α) y es un dominio catalítico N-terminal, este se une al dominio C que consta de láminas β dobladas (participa en la unión al sustrato) y de un asa en la tercera hebra- β , y por último el dominio B que es una tercera hélice α , que también participa en la unión al sustrato y al Ca^{2+} estructural (Salgado, 2017).



Fig1. Estructura de la α -amilasa. Dominio A en rojo; dominio B en amarillo y dominio C en morado; iones calcio en esfera azul; cloruro en esfera amarilla (los iones unidos al dominio A); moléculas verdes, son el sustrato unido al sitio activo.

Imagen tomada de Payan (2004).

El mecanismo de acción de la α -amilasa consiste en hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1,4- en polímeros de cadena grande como el almidón (Fig. 2A), glucógeno y otros carbohidratos, para producir oligosacáridos que posteriormente se convertirán en glucosa por acción de la α -glucosidasa (Fig. 2B) (Franco *et al.*, 2002; Merrit y Karn, 1977; Reddy *et al.*, 2003). Por lo que la inhibición de esta enzima representa un bloqueo en la digestión de los carbohidratos, y por tanto un retraso en la absorción de glucosa, reduciendo así la hiperglucemia postprandial en DM 2 (Roy y Mahalingam, 2017).

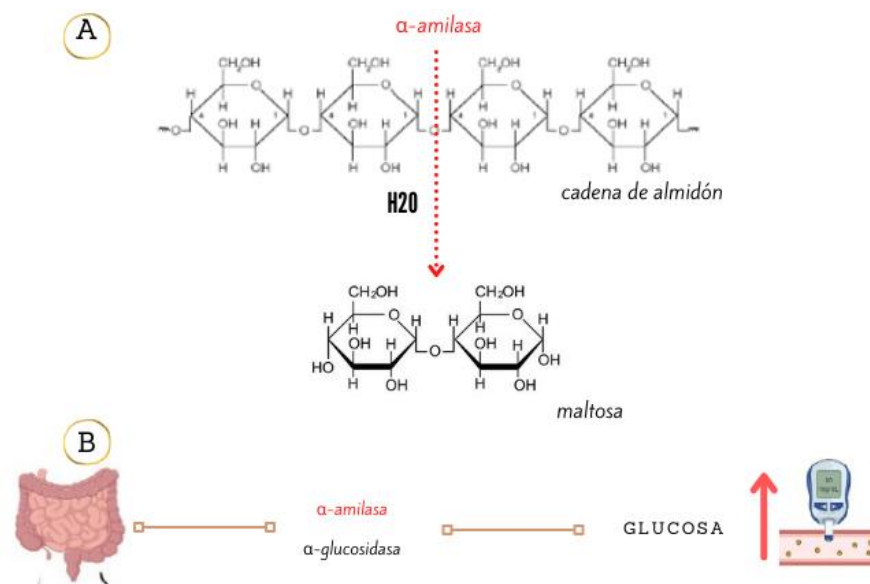


Fig 2. Mecanismo de acción de la α -amilasa. A. La enzima α -amilasa hidroliza la cadena de almidón para obtener oligosacáridos por ejemplo maltosa. B. En el intestino delgado, la α -amilasa pancreática y la α -glucosidasa, trabajan en conjunto para liberar glucosa al torrente sanguíneo, llevándose a un estado de hiperglucemia. Modificado de Shehadeh *et al.* (2021).

Actualmente se estudia la capacidad que componentes bioactivos obtenidos de las plantas tienen para inhibir la α -amilasa. Mendoza y Loza (2014) reportaron una concentración inhibidora media máxima (IC₅₀) para α -amilasa de $5.77 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ por extractos obtenidos de *Smallanthus sonchifolius* (Yacón), una inhibición que posiblemente se atribuye a ácidos fenólicos y flavonoides. Nair *et al.* (2013) realizó una comparación de extractos metanólicos obtenidos de cuatro especies de plantas destacando que la especie con la máxima actividad inhibidora de α -amilasa fue *Artocarpus heterophyllus* con una inhibición del 60% a una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$, y cuyos componentes bioactivos podrían ser de tipo flavonoles y ácidos fenólicos. Momina y Rani (2020) evaluaron la actividad de extractos metanólicos de *Lindernia ciliata*, *Phyllanthus reticulatus* y *Bambusa vulgaris* sobre la α -amilasa, además de determinar y cuantificar compuestos fenólicos y flavonoides, de las tres especies *L. ciliata* fue la que presentó la mayor inhibición con valor del 83.1% a una concentración de 10 mg/ml y cuya actividad se asoció a la presencia y mayor contenido de fenoles y flavonoides.

De forma general, esta actividad inhibitoria sobre la α -amilasa se asocia a componentes de tipo fenólicos tales como los ácidos hidroxicinámicos (vanílico, clorogénico, cafeico, ferúlico e isómeros del ácido dicafeoilquínico), flavonoides (quercetina, kaempferol, luteolin, eupafolin, isorhamnetina) y algunos terpenos (ácido arjunolico, ácido tánico y taninos condensados e hidrolizables) (Funke y Melzing, 2005; Medina *et al.*, 2019; Mendoza y Loza, 2014; Mendoza y Medina, 2015; Monzón,2019; Ponce *et al.*, 2018; Sales *et al.*,2012; Shehadeh *et al.*, 2021).

2.2 Plantas con potencial hipoglucemiante: efecto atribuible a sus metabolitos secundarios

2.2.1 Metabolitos secundarios

Las diferentes propiedades terapéuticas que exhiben las plantas medicinales se pueden atribuir a los componentes fitoquímicos conocidos como metabolitos secundarios. Actualmente numerosas moléculas de este tipo se han identificado y obtenido de varias especies de plantas y representan una alternativa de gran utilidad para tratamientos y la identificación de nuevos fármacos seguros y económicos (Ghorbanpour *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2015).

Los metabolitos secundarios son moléculas resultado de la asimilación del carbono y energía en las plantas, que no tiene una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, de transporte de nutrientes/solutos, o de síntesis de proteínas, carbohidratos y lípidos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). La síntesis de estas moléculas se debe principalmente a que tienen funciones ecológicas, tales como la atracción de polinizadores, para repeler a animales o incluso de adaptación a factores ambientales (Ringuelet y Viña, 2013).

Se ha comprobado que los metabolitos secundarios presentan algunas actividades biológicas por ejemplo como protectores UV, antifúngicos, antiinflamatorios, antibióticos, antivirales, entre otros, siendo así la base científica de la medicina herbolaria tradicional (Hussein y El-Anssary, 2019; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Los metabolitos secundarios se clasifican en tres grandes grupos que difieren en estructuras químicas: **los terpenos, compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos.**

- **Terpenos.**

Los terpenos son el grupo con mayor número de compuestos, y su síntesis en las plantas tiene diversas funciones tales como defensa contra herbívoros o atrayentes de polinizadores (Verma y Chaturvedi, 2019). Se clasifican según su organización y el número de unidades de isopreno que contienen, de acuerdo con esto pueden ser monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, etc. (Fig. 3) (Cox-Georgian *et al.*, 2019). Se conocen dos rutas de biosíntesis, la ruta del ácido mevalónico para los sesquiterpenos y triterpenos y la ruta del metileritritol fosfato para monoterpenos, diterpenos, carotenoides, etc. (Tholl, 2015). Varios de estos compuestos podrían tener aplicaciones terapéuticas debido a que se ha evidenciado que tienen actividades como anticancerígenos, antibacterianos, antivirales, antiinflamatorios, antihiperoglucemiantes, entre otras (Brahmkshatriya y Brahmkshatriya, 2013).

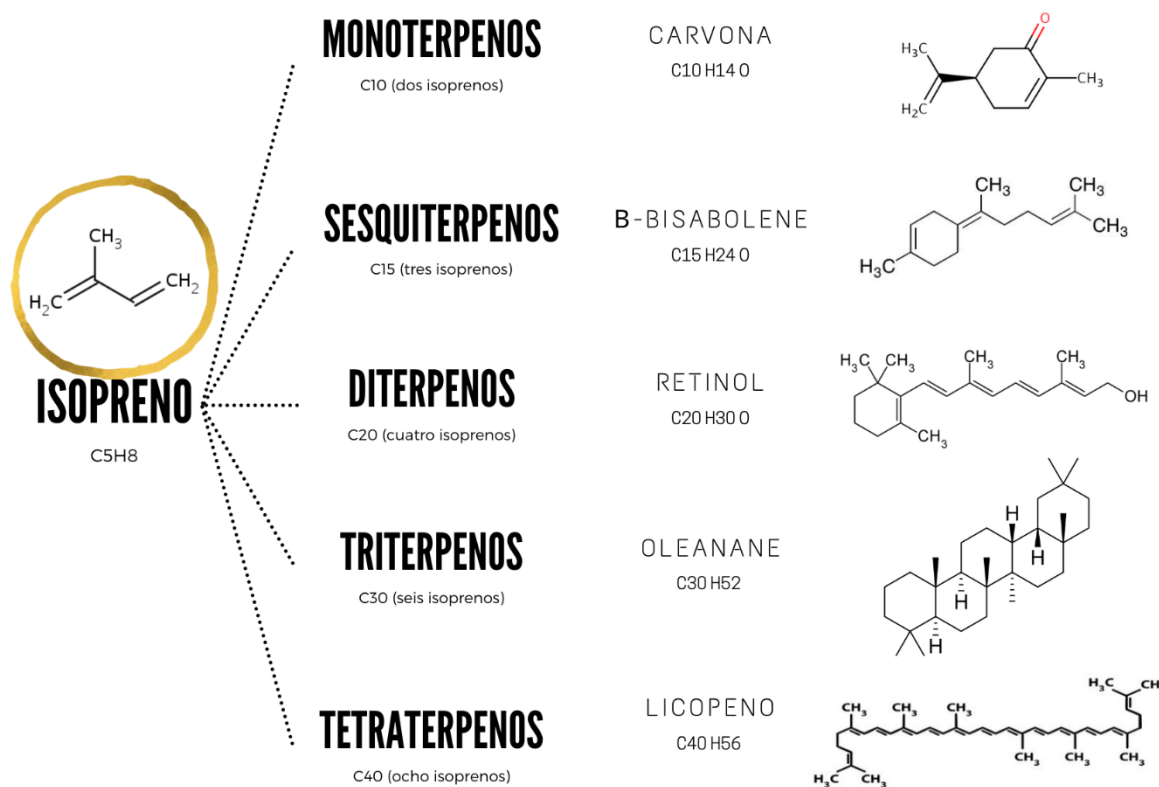


Fig. 3 Clasificación de terpenos y ejemplos representativos.

- **Compuestos nitrogenados.**

Los compuestos pertenecientes a este grupo contienen nitrógeno (N) en sus estructuras y se clasifican en alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos y algunos aminoácidos no proteicos (Fig. 4) (Bhatla, 2018). Los principales son los compuestos de tipo alcaloide cuyas moléculas tienen uno o varios átomos de N regularmente en un anillo heterocíclico (Henning, 2013). Su estudio e importancia radica en que tienen efectos farmacológicos, estimulantes, narcóticos y tóxicos, tal como la nicotina, un componente neuroactivo producido por la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) o la morfina, un alcaloide obtenido del opio (*Papaver somniferum*) y que es usado en la medicina como analgésico y anestésico (Zulak *et al.*, 2006; Hanson, 2003). La síntesis de los compuestos nitrogenados deriva de aminoácidos como lisina, fenilalanina, ornitina, tirosina o triptófano, y se encuentra

asociada a mecanismos de defensa que la planta tiene principalmente contra mamíferos (Bhatla, 2018).

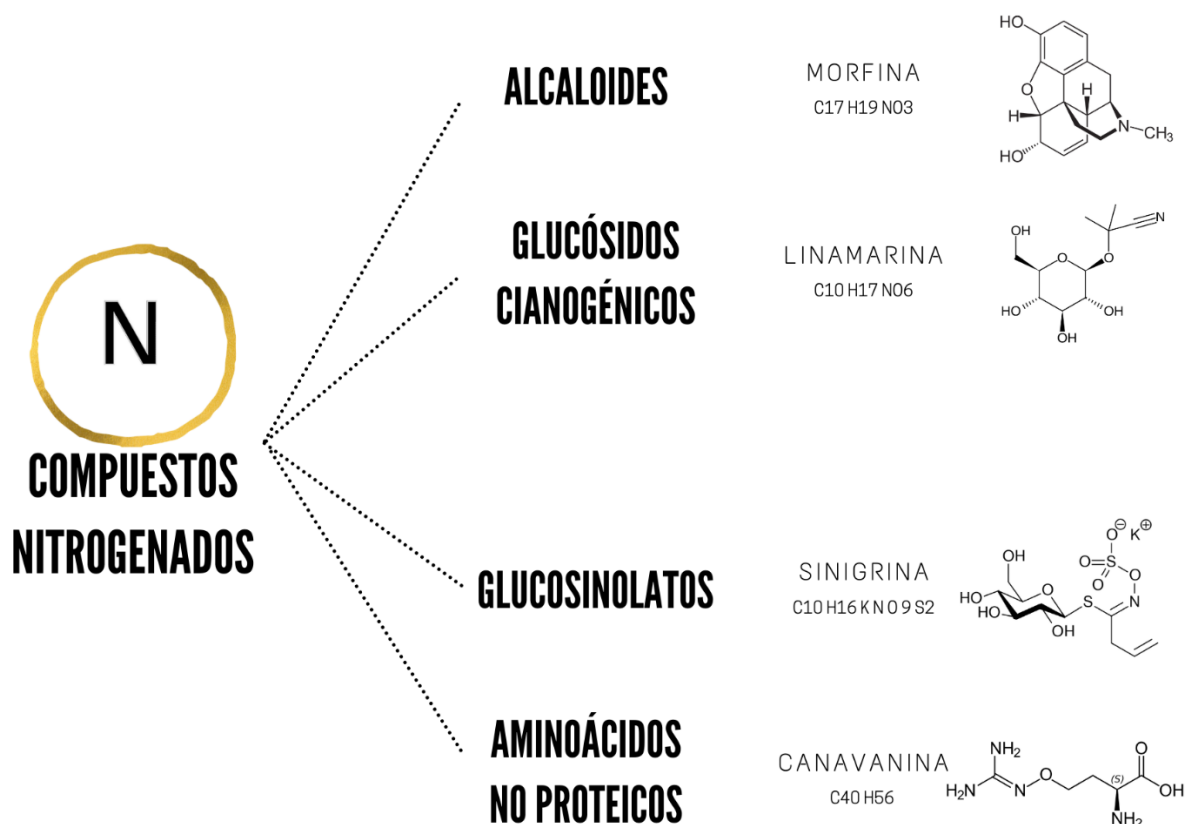


Fig. 4 Clasificación de compuestos nitrogenados y algunos ejemplos.

- **Compuestos fenólicos.**

Los compuestos fenólicos son un grupo de aproximadamente 8,000 estructuras que se caracterizan por la presencia de una molécula básica conocida como fenol (un anillo aromático con un grupo hidroxilo –OH) (Peñarrieta *et. al.*, 2014). Su biosíntesis se asocia a funciones de defensa contra patógenos o estrés, y metabólicas tales como el crecimiento o reproducción, además de que en alimentos vegetales es responsable de algunas propiedades organolépticas (Dai y Mumper, 2010; Lin *et. al.*, 2016).

De acuerdo con el número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales que se unen a ellos se clasifican en subgrupos como ácidos fenólicos, cumarinas,

curcuminoides, estilbenos, flavonoides, lignanos, quinonas y taninos (Fig. 5) (Gan *et al.*,2018; Huang *et al.*,2010). Por lo que a cada uno de ellos de les asocia actividades farmacológicas diferentes.

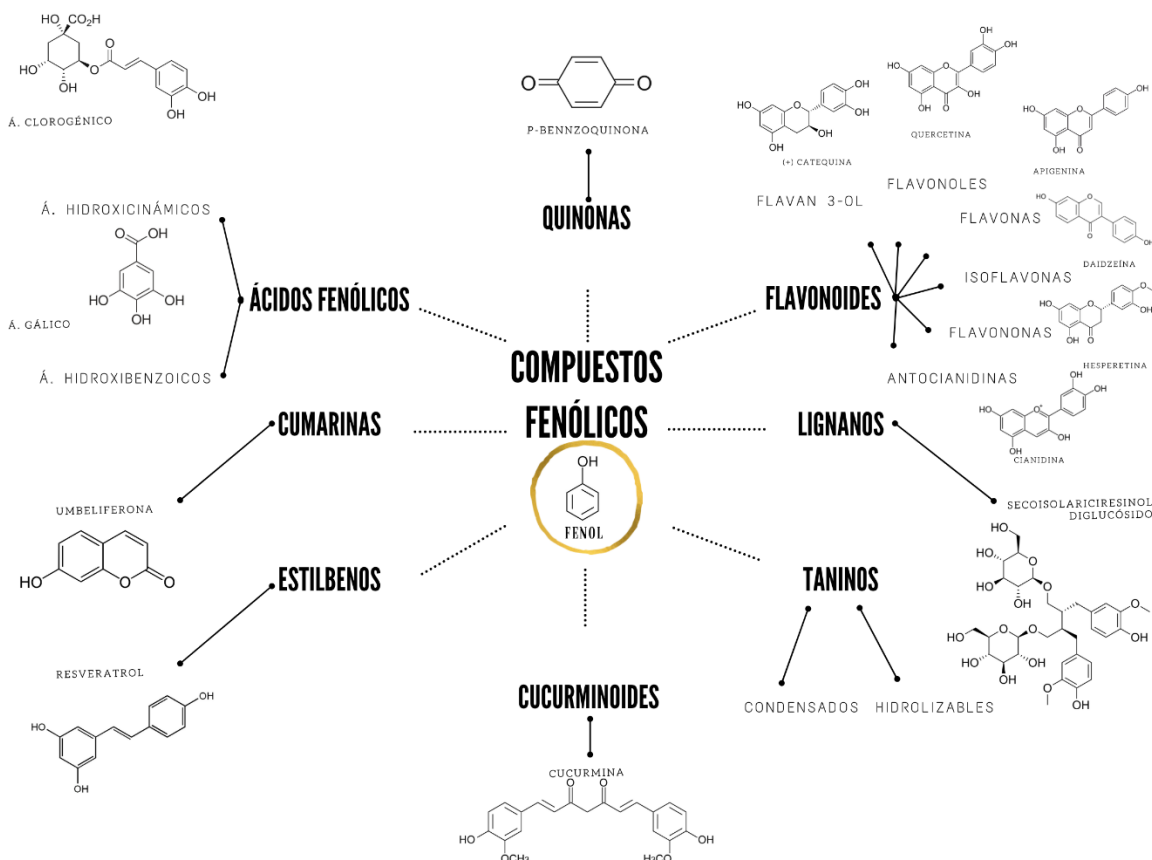


Fig.5 Clasificación de compuestos fenólicos. Modificado de Gan *et al.*, (2018).

-Flavonoides

Se estima que esta familia de compuestos tiene aproximadamente 10,000 moléculas con actividades antibacteriales, antivirales, antialérgicos, antiinflamatorios y antiplaquetarios (Teoh, 2016). Estos a su vez se subdividen en flavan-3-ol, flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavononas y antocianidinas, grupos que comparten una estructura básica constituida por un esqueleto de 15 C (Fig. 6). La biosíntesis de la estructura básica proviene de dos vías: la vía del ácido malónico y del ácido shikímico (Habtemariam, 2019).

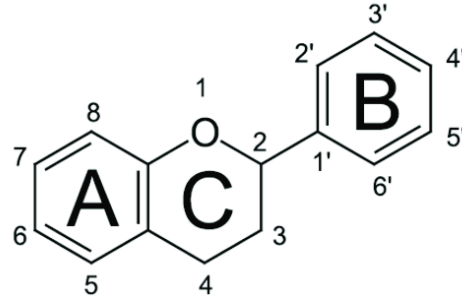


Fig.6 Estructura básica de los flavonoides.

-Ácidos fenólicos

Estos compuestos son fenoles que en su estructura tiene un anillo fenólico y al menos un ácido carboxílico orgánico. A su vez, dependiendo de las unidades de carbono en su cadena lateral unida al anillo fenólico pueden ser ácidos hidroxicinámicos o ácidos hidroxibenzoicos (Goleniowski *et al.*, 2013). Entre ellos se encuentran el ácido vanílico, clorogénico, cafeico, ferúlico y dicafeoilquínico, que pertenecen a los ácidos hidroxicinámicos (Fig 7.). Es una familia reconocida principalmente por su actividad antioxidante, sin embargo, también tiene efecto antiinflamatorio, anticancerígeno, antimicrobiano, antihistamínico y neuroprotector (Kaurinovic y Vastag, 2019). La biosíntesis de los ácidos fenólicos en las plantas se encuentra relacionada a funciones de regulación de crecimiento, así como de resistencia a enfermedades y derivan de fenilpropanoides, isopropanoides, alcaloides y ácidos grasos (Kumar y Goel, 2019).

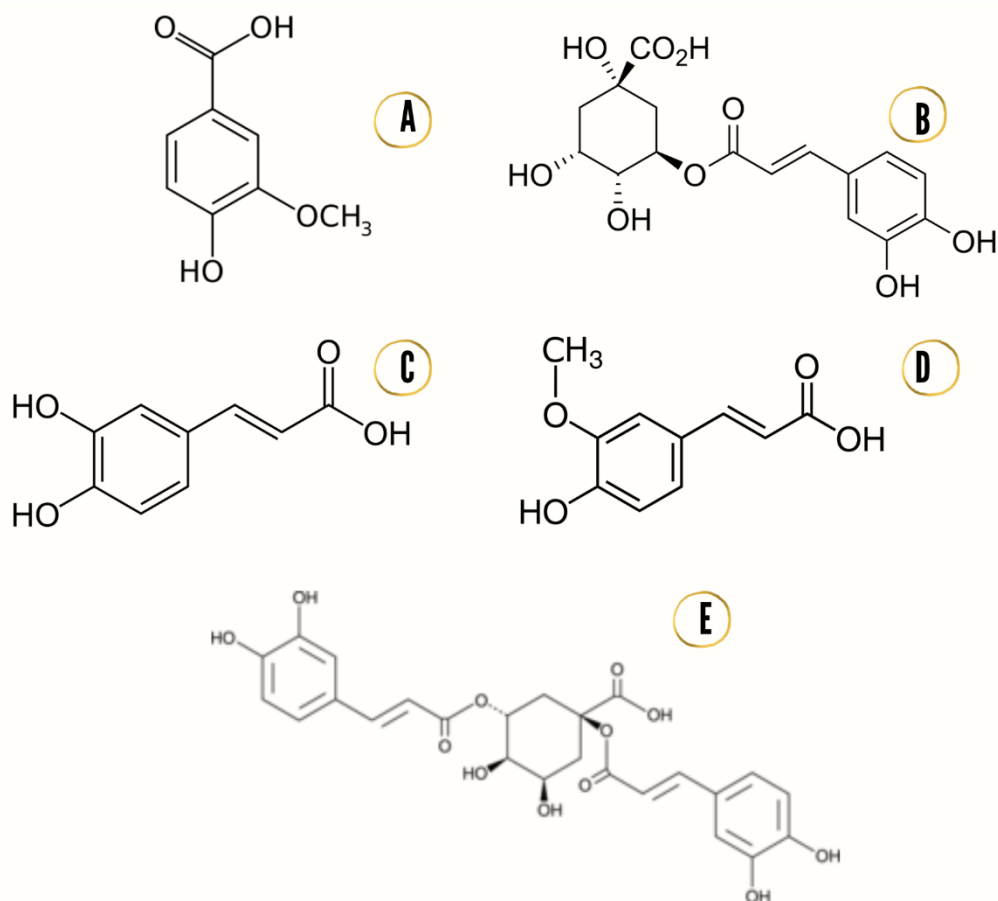


Fig. 7 Ácidos hidroxicinámicos. Se muestran las estructuras de algunos ácidos hidroxicinámicos que han evidenciado tener efecto inhibidor de α -amilasa: A) Á. vanílico, B) Á. clorogénico, C) Á. cafeico, D) Á. ferúlico y E) Á.1,5-dicafeoilquinico. Imágenes tomadas de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, <https://es.wikipedia.org/wiki> y <https://www.caymanchem.com/product/25050>

2.2.2 Plantas mexicanas con efecto hipoglucémico

En México el uso de plantas en la medicina tradicional ha estado presente desde tiempos prehispánicos, prueba de ello es el código de la Cruz-Badiano, una obra que describe las propiedades y los usos que se les atribuyen a diversas plantas para tratar múltiples padecimientos (Somolinos,1990). En la actualidad el uso de plantas para remedios está relacionado con el bajo costo de su adquisición y la efectividad que tienen para tratar diversos desordenes en sistemas como el gastrointestinal, digestivo, respiratorio, musculoesquelético, urinario, cardiovascular, entre otros y enfermedades crónico degenerativas (Lara *et al.*, 2019; Lara *et al.*, 2018; Alonso-Castro *et al.*, 2017).

Una de las enfermedades de importancia clínica y económica en México es la DM, por lo que también se ha registrado que las personas recurren a plantas medicinales como un tratamiento complementario o preventivo. Aproximadamente se conocen 300 especies de plantas que son utilizadas como antidiabéticos por la medicina tradicional mexicana. Muchas de las especies se encuentran principalmente distribuidas en las familias Asteraceae, Fabaceae, Cactaceae, Solanaceae, Euphorbiaceae y Lamiaceae (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2013; Hernández-Galicia *et al.*, 2002; Romero-Cercero *et al.*, 2009).

Entre estas se encuentran *Momordica charantia* L. (cun-deamor), *Aloe vera* (L.) Burm. f. (sábila), *Opuntia ficus-indica* L. (nopal), *Medicago sativa* L. (alfalfa), *Avena sativa* L. (avena), *Equisetum* sp (cola de caballo), *Musa paradisiaca* L. (flor de plátano), *Plumeria rubra* L. (cacaloxochitl), por mencionar algunas (Fig. 8) (Alonso-Castro *et al.*, 2017; Castro *et al.*, 2014).

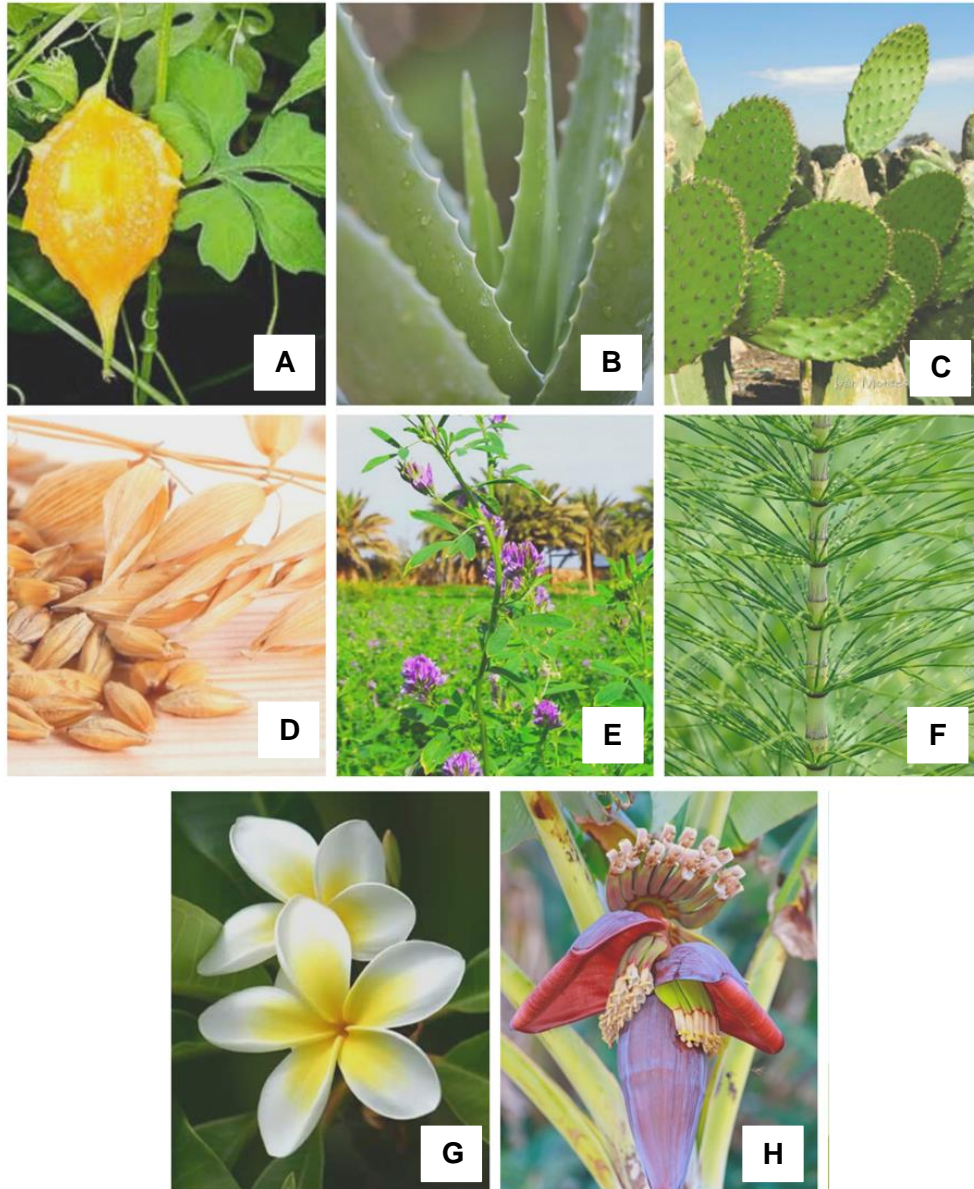


Fig.8 Ejemplos de especies utilizadas como antidiabéticos. Se muestran las partes usadas A. Frutos de *Momordica charantia* L. B. Planta de *Aloe vera* (L.) Burm. f. C. Cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. D. Semillas de *Avena sativa* L. E. Planta de *Medicago sativa* L. F. Planta de *Equisetum* sp . G. Flores de *Plumeria rubra* L. H. Flores de *Musa paradisiaca* L. Imagenes tomadas de <https://www.monaconatureencyclopedia.com/>, <http://bdi.conabio.gob.mx/> y <https://www.flordeplanta.com.ar/>

Los mecanismos de acción contra la DM por parte de las plantas medicinales son variables debido a que los efectos van dirigidos a órganos específicos tal como el páncreas, intestino delgado, tejido adiposo, músculo o hígado por lo que, dependiendo del sitio, tendrán efectos diferentes (Fig. 9). Cuando se dirigen al

hígado, musculo o tejido adiposo habrá un decremento en la producción y liberación de la glucosa, además de incrementar su captación aumentando la sensibilidad a insulina en los tejidos (Al-Snafi *et al.*, 2019). En el intestino, habrá un decremento en la absorción de glucosa por diferentes efectos tal como la inhibición enzimática de α -amilasa y α -glucosidasa, mientras que en el páncreas se inducirá un incremento en la síntesis y secreción de insulina por las células β (Fig. 9) (Saad *et al.*, 2017)

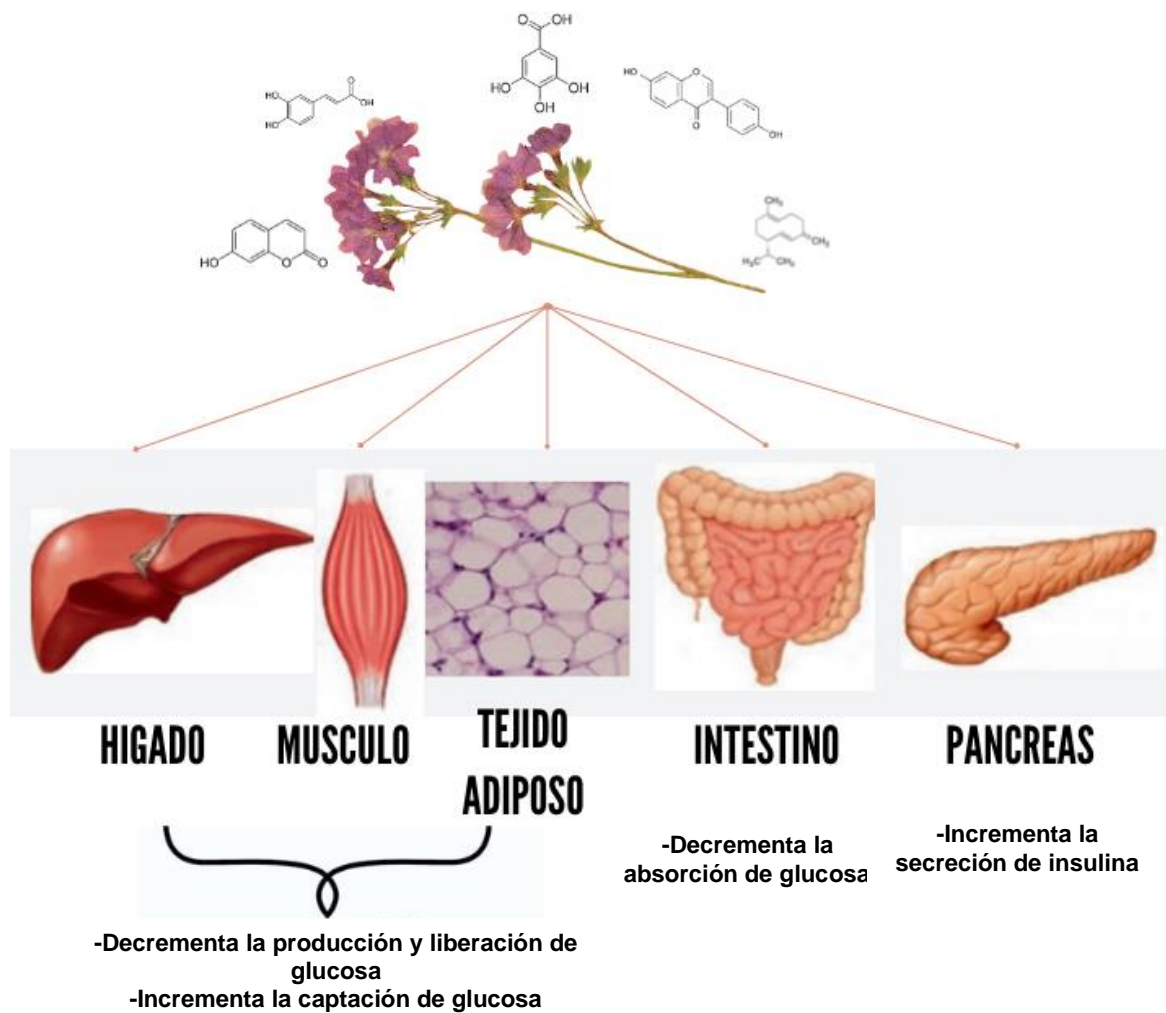


Fig.9 Mecanismo de acción de las plantas anti-diabéticas en sus órganos diana. Modificado de Saad *et al.*, (2017)

En nuestro país, Asteraceae es una de las familias más diversas pues se han reportado aproximadamente 3,000 especies de las cuales cerca de 60% son endémicas (Villaseñor, 2018). De acuerdo con Hernández-Galicia (2002) se conocen aproximadamente 30 especies pertenecientes a la familia Asteraceae que son utilizadas para el control de la DM, siendo mayoría con respecto a otras familias. Debido al interés terapéutico que tienen, se han evaluado los componentes de muchas de estas especies y se ha encontrado que los MS más abundantes son de tipo fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos y flavonas, así como terpenos tal como las lactonas sesquiterpénicas y diterpenos (Tabla 2), muchos asociados al efecto antidiabético.

Tabla 2. Especies pertenecientes a la familia Asteraceae empleadas en la medicina tradicional mexicana contra Diabetes mellitus.			
Especie	Nombre común	Compuestos aislados	Parte usada de la planta
<i>Achillea millefolium</i> L.	-	Flavonoides y lactonas sesquiterpénicas	-
<i>Acourtia thurberi</i> (A. Gray) Reveal & R.M. King	Matarique	Perezona; α -pipitzol y β -pipitzol; y 8- β -D-glucopyranosyloxy-4D-methoxy-5-methyl-coumarin -Sesquiterpenos y compuestos aromáticos	Partes aéreas y raíz
<i>Ageratina petiolaris</i> (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Robinson	Hierba de ángel o Yolochichotl	Chlorogenic acid; L- <i>chiro</i> -inositol; 2- α -isovaleroyloxyperuic acid; benzyl-2-hydroxy-6-methoxybenzoate; benzyl 2,6-dimethoxybenzoate; 3-methoxybenzyl 2,6-dimethoxybenzoate; benzyl 2-hydroxy-3,6 dimethoxybenzoate, y 2 α -tigloyloxyperuic acid -Terpenos, compuestos aromáticos, polialcohol	Partes aéreas
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Hierba dulce	Flavonoides, aceites esenciales y terpenos	Partes aéreas
<i>Alloispermum integrifolium</i> (D.C.) H. Rob.	Prodijiosa	Compuestos sulfúricos	Partes aéreas
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	Artemisa	Lactonas sesquiterpénicas	Partes aéreas
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Ajenjo	Flavonoides y lactonas sesquiterpénicas	Hojas, partes aéreas
<i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt.	Estafiate, maestra	Eupatilin; jaceosidin; arglanin; salvinine; 3 5-di-o-caffeoylquinic acid -flavonas, lactonas sesquiterpénicas, diol acíclico	Partes aéreas, hojas
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Ajenjo	Sesquiterpenos y flavonoides	Hojas
<i>Baccharis salicifolia</i> (Ruíz & Pav.) Pers.	Azumiate	-	Hojas
<i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff	Té de milpa	Aceites esenciales	Partes aéreas
<i>Bidens leucantha</i> (L.) Willd.	Rosilla	-	Partes aéreas
<i>Bidens odorata</i> Cav.	Aceitilla, mosote blanco	Triterpenos y flavonoides	Partes aéreas
<i>Bidens pilosa</i> L.	Aceitilla	Flavonoides y triterpenos	Partes aéreas, fruto
<i>Brickellia cavanillesii</i> (Cass.) A.Gray	Prodigiosa	Brikelin y aceites esenciales	Partes aéreas
<i>Brickellia squarrosa</i> B.L. Rob. & Seaton	Amula	Flavonoides	Partes aéreas
<i>Brickellia veronicaefolia</i> (Khunt) Gray	-	5,7,30-Trihydroxy-3,6,40-trimethoxyflavone -Flavonol	Partes aéreas
<i>Cacalia decomposita</i> A. Gray	Matarique	Alcaloides y polisacáridos	Raíz
<i>Cacalia peltata</i> Kunth	Matarique	Polisacáridos	Raíz

<i>Calea hypoleuca</i> B.L. Rob. & Greenm.	Prodigiosa	-		Partes aéreas
<i>Calea integrifolia</i> (DC.) Hemsl.	Prodigiosa		Lactonas sesquiterpénicas	Tallo
<i>Calea oliveri</i> B.L. Rob. & Greenm	-		6-Acetyl-5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene; 6-hydroxyacetyl-5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene; 6-acetyl-5-hydroxy-2-methyl-2-hydroxymethyl-2H-chromene; caleins A y C; genkwanin; isorhamnetin; kaempferol; quercetin; herniarin; scoparone; 40,7-dimethylapigenin; curcumene; spathulenol; caryophyllene oxide. acacetin; 3,5-di-O-caeoylquinic acid.	Partes aéreas
			-Flavonoles, flavonas, ácidos hidroxcinámicos, chromenes, Lactonas sesquiterpénicas,	
<i>Calea ternifolia</i> Oliv. Thurn	Ex Zacate chichi	-		Hojas, tallo y flores
<i>Calea zacatechichi</i> Schltld.	Prodigiosa		Demethylisoencecalin, caleins A and C, 6-acetyl-5-hydroxy-2,2-dimethyl-2Hchromene, and 6-hydroxyacetyl-5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene	Hojas
<i>Chromolaena bigelovii</i> (A. Gray) R.M. King & H. Rob.	Ambula	-		Partes aéreas
<i>Cirsium mexicanum</i> DC.	Cardo santo	-		Raíz
<i>Cirsium raphilepis</i> (Hemsl.) Petr.	Cardo santo	-		Flores
<i>Conyza filaginoides</i> (DC.) Hieron.	Simonillo		Alcaloides y lenecin	Partes aéreas
<i>Conyza gnaphalioides</i> Kunth	Cimonillo, zacachichitl		Terpenos	Hojas
<i>Cynara scolymus</i> L.	Alcachofa		Flavonoides, lactonas sesquiterpénicas y ácidos fenólicos	Flores y fruto
<i>Dyssodia micropoides</i> (DC.) Loes.	Hierba pelotazo	-		Partes aéreas
<i>Gnaphalium oxyphyllum</i> DC.	Gordolobo		Diterpenos y flavonoides	-
<i>Guardiola angustifolia</i> (A. Gray ex S. Watson) B. L. Rob.	Chintuza	-		-
<i>Guardiola tulocarpus</i> A. Gray	Chintuza	-		Hojas
<i>Haplopappus venetus</i> (Kunth) S.F. Blake	Xapulli	-		Partes aéreas
<i>Heterotheca inuloides</i> Cass.	Árnica		Flavonoides y aceites esenciales	Hojas
<i>Hidalgoa ternata</i> La Llave	Mozote de monte	-		Partes aéreas
<i>Melampodium perfoliatum</i> (Cav.) Kunth	-		Perfoliatin A	Partes aéreas
			-Lactonas sesquiterpénicas	
<i>Packera candidissima</i> (Greene) W. A. Weber & Á. Löve	Lechuguilla	-		Partes aéreas
<i>Parthenium hysterophorus</i> L.	Escobilla, chuchullate o tres hojitas		Alcaloides y partenin	Partes aéreas, hojas
<i>Porophyllum punctatum</i> (Mill.) S.F. Blake	Piojillo	-		Flores
<i>Psacalium decompositum</i> (A.Gray) H. Rob. & Brettell	-		Cacalol; cacalol acetate; cacalone; maturin y maturinone.	Raíz
			-Sesquiterpenos	
<i>Psacalium paucicapitatum</i> (B.L. Rob. & Greenm.) H. Rob. & Brettell	-		Kestose; nystose y fructofuranosyl-nystose.	Bulbo
			-Sesquiterpenos	
<i>Psacalium sinuatum</i> (Cerv.) H. Rob. & Brettell	Matarique	-		Raíz
<i>Samvitalia procumbens</i> Lam.	Ojo de gallo		Terpenos	Partes aéreas
<i>Selloa plantaginea</i> Kunth	Diente de elefante	-		Partes aéreas

<i>Senecio albo-lutescens</i> Sch. Bip.	Matarique	-	Raíz
<i>Senecio palmeri</i> A. Gray	Matarique	-	Raíz
<i>Senecio peltiferus</i> Hemsl.	Matarique	-	Raíz
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Lechuguilla	Flavonoides	Hojas
<i>Tagetes erecta</i> L.	Cempasuchil, flor de muerto	Terpenos y aceites esenciales	Partes aéreas, hojas y flores
<i>Taraxacum officinale</i> Weber ex F.H. Wigg.	Diente de león	Terpenos	Hojas
<i>Verbesina crocata</i> (Cav.) Less.	Capitaneja	-	Hojas
<i>Verbesina persicifolia</i> D.C.	Huichin	Sesquiterpenos	Partes aéreas
<i>Zaluzania angusta</i> (Lag.) Sch. Bip.	Limpia tuna	-	Raíz
<i>Zexmenia gnaphalioides</i> A. Gray	Peonia	-	Raíz

La información mostrada en la Tabla 2 comprende la integración de la información consultada en: Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Escandón-Rivera, Mata y Andrade-Cetto, 2020; Mata *et al.*, 2019; Romero-Cerecero *et al.*, 2009.

2.3 *Arnica montana*, planta medicinal productora de diversos metabolitos secundarios bioactivos

2.3.1 Taxonomía

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Tracheophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Asterales
FAMILIA	Asteraceae
GENERO	<i>Arnica</i>
ESPECIE	<i>A. montana</i> L.



Fig. 10 *Arnica montana*. Imagen tomada de <https://www.homeremediess.com/arnica-montana-medicinal-benefits-and-pictures/>

2.3.2 Descripción botánica y distribución

Arnica montana (Asteraceae), comúnmente conocida como “tabaco de montaña”, es una planta herbácea perenne que mide aproximadamente de 30 a 60 cm de altura, tiene hojas basales adheridas en grupo al tallo, con forma obovada o elíptica a oblanceolada, bordes lisos, un color verde oscuro y ligeramente pilosas. Las hojas superiores tienen forma lanceolada y se encuentran adheridas al tallo subterráneo. Presenta de 1 a 3 inflorescencias hermafroditas de tipo cabezuela que mide aproximadamente 8 cm de diámetro y cuyas flores son de color amarillo. Las flores periféricas se encuentran liguladas, y están constituidas por un cáliz con cerdas erizadas y puntas afiladas, una corola de 3 pétalos fusionados y un ovario con un estigma bifurcado. Las flores masculinas presentan una corola tubulosa con 5 estambres adheridos en la parte superior (Ortega, 2013; Waizel-Bucay y Cruz-Juárez, 2014) (Fig. 10,11).



Fig.11 Representación de *Arnica montana*. Se observa la unión al tallo de las hojas y su forma, la disposición de las inflorescencias, así como de las flores y los aparatos reproductores masculino y femenino. Imagen tomada de <http://www.maplestreethealthhub.com.au/herb-of-the-month-arnica-montana/>

Las semillas son alargadas y cilíndricas que miden de 4 a 5 mm con un vilano constituido por las sedas blancas y plumosas persistentes del cáliz. (Kriplani *et al.*, 2017).

Arnica montana es una especie endémica de Europa, por lo que se distribuye ampliamente en países como Dinamarca, Australia, Suiza, Ucrania, Italia, Francia, España, entre otros en altitudes aproximadamente de 700-2500 msnm (Waizel-Bucay y Cruz-Juárez, 2014). Además de la presencia en el continente europeo, se ha registrado en Indonesia, Rusia, algunas partes de África, así como al sur de Estados Unidos y en Canadá (Fig. 12) lo cual podría tratarse de una introducción para su cultivo. En México, diversos estudios etnobotánicos han reportado el conocimiento y uso de esta especie por pobladores de estados como Zacatecas y Puebla, sin embargo, su distribución en el país no ha sido estudiada (Lara *et al.*, 2018; Velázquez-Vázquez *et al.*, 2019).

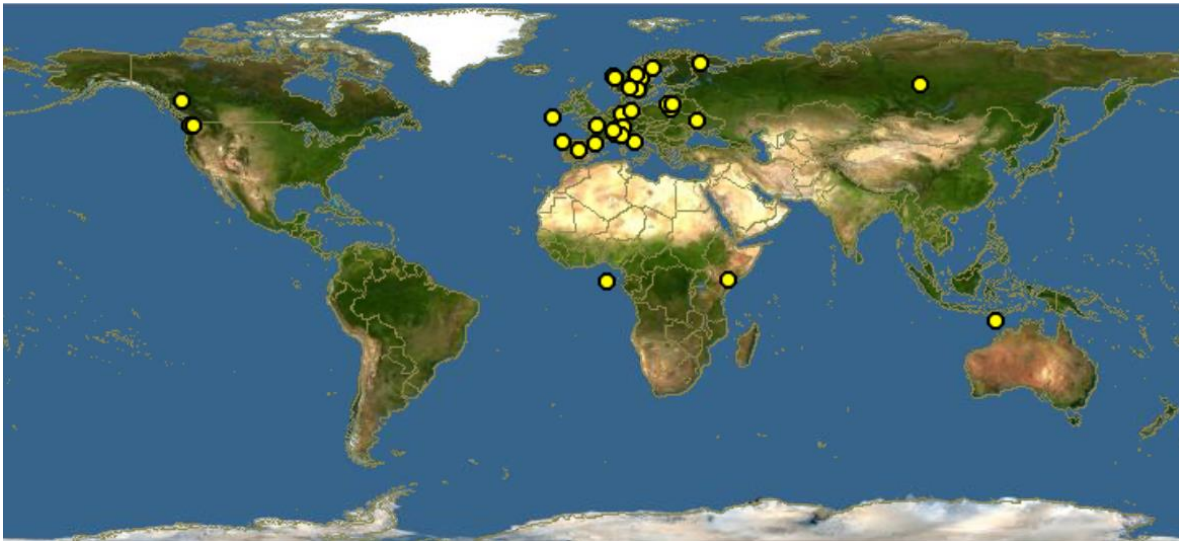


Fig.12 Distribución mundial de *A. montana*. Los puntos amarillos indican los registros de *Arnica montana*, señalizando una mayor presencia en Europa. Imagen tomada de <https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Arnica+montana>.

2.3.3 Usos

Es una especie a la que se le atribuyen múltiples usos principalmente como analgésico y antiinflamatorio, no obstante, se ha reportado su uso como febrífugo,

estimulante, para refriado común, tos, cortes y heridas, dolor en el intestino, estómago y cabeza, reumatismo, osteoartritis, para tratar infecciones de la piel, vaginales y del tracto urinario, quemaduras, estrías, gastritis y hematomas (Lara *et al.*, 2018; Obón *et al.*, 2012; Shiffman, 2012).

Se utilizan las partes aéreas tal como lo son las hojas e inflorescencias, y la forma de preparación es por medio de infusión, decocción, maceración, destilación o en fresco. La vía de administración puede ser externa en cataplasmas, por fricción, lavado de las áreas afectadas, compresas y directamente, o interna de forma bebible (Obón *et al.*, 2012; Velázquez-Vázquez *et al.*, 2019).

2.3.4 Fitoquímica.

Debido al interés farmacológico que *A. montana* tiene, se han identificado un gran número de compuestos en hojas, tallos e inflorescencias tales como alcaloides de pirrolizidina, ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, flavonoides, monoterpénos, lactonas sesquiterpénicas y triterpenos pentacíclicos (Tabla 3. y Fig. 13). Siendo las lactonas sesquiterpénicas y los flavonoides los más abundantes en esta especie, de acuerdo con la literatura (Kriplani *et al.*, 2017; Clauser *et al.*, 2014; Spitaler *et al.*, 2006; Merfort, 1984).

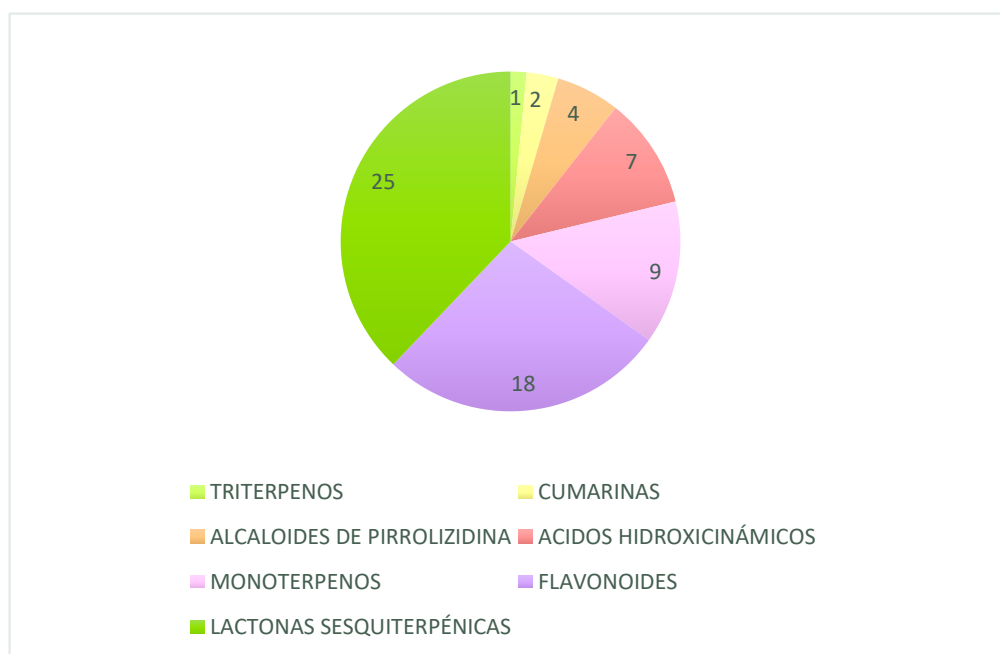
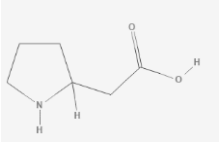
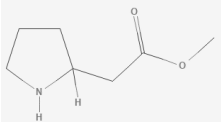
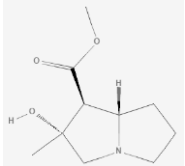
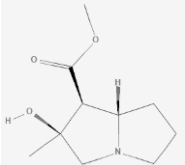
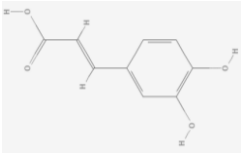
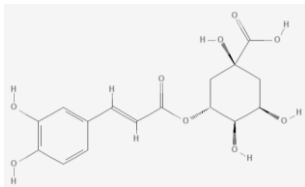
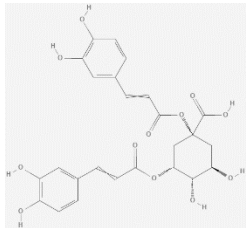
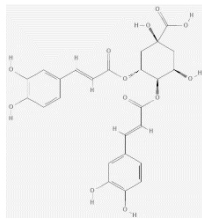
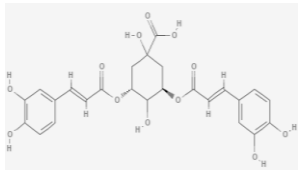
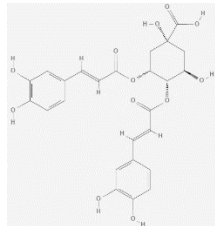
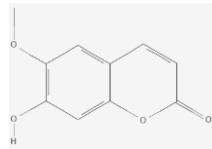
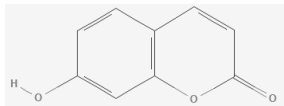
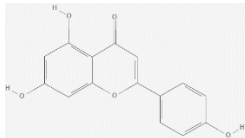


Fig.13. Número de compuestos identificados por cada categoría de metabolitos secundario en *Arnica montana*.

A cada metabolito se le atribuyen actividades diferentes, por lo que estudiarlos para posteriormente aislarlos ha tenido gran relevancia. *Arnica montana* es utilizada como antiinflamatorio, actividad que se encuentra relacionada con los compuestos terpenoides, en específico las lactonas sesquiterpénicas tal como la helenalina y sus derivados (Klaas *et al.*, 2002; Ruiz-Reyes y Suarez, 2015). Aun cuando esta especie no se caracteriza por su uso en algunos otros padecimientos, varios de estos compuestos en otras especies han evidenciado actividades tal como capacidad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa atribuida a compuestos como el ácido clorogénico y cafeico (Chiou *et al.*, 2017).

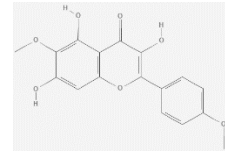
Tabla 3. Metabolitos secundarios identificados en *Arnica montana*.

CLASIFICACION	CATEGORIA	COMPUESTO	ESTRUCTURA QUIMICA
COMPUESTOS NITROGENADOS	ALCALOIDES DE PIRROLIZIDINA	Ácido 2-pyrrolidineacético	
		Methyl ester de ácido 2-pyrrolidineacético	
		Isotusilagina	
		Tusilagina	
FENÓLICOS	ACIDOS HIDROXICINÁMICOS	Ácido cafeico	

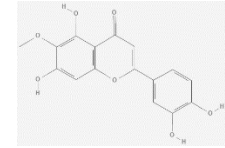
FENÓLICOS	Ácido clorogénico	
	Ácido 1,5-dicafeoilquinico	
	Ácido 3,4- dicafeoilquinico	
	Ácido 3,5-dicafeoilquinico	
	Ácido 1- metoxioxaloil - 3, 5- dicafeoilquinico	-
	Ácido 4,5-dicafeoilquinico	
CUMARINAS	Escopoletina	
	Umbeliferona	
FLAVONOIDES	Apigenina	

FENÓLICOS

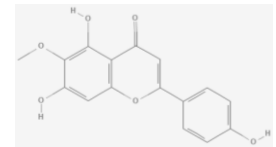
Betuletol



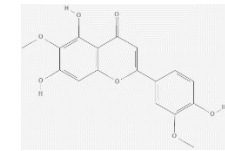
Eupafolina



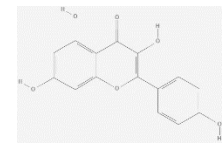
Hispidulina



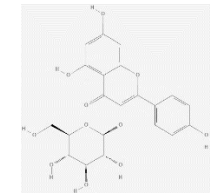
Jaceosidin



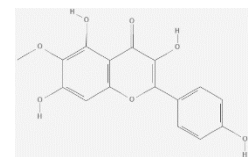
Kaempferol



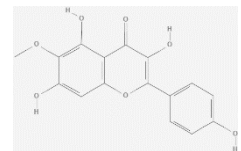
Kaempferol 3-O-β-D-glucosido



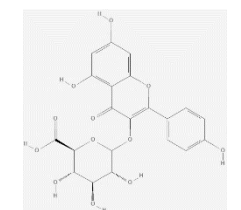
6-Methoxy kaempferol



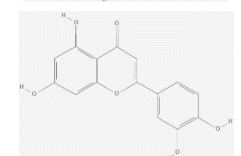
6-Methoxy kaempferol 3-O-β-D-glucosido

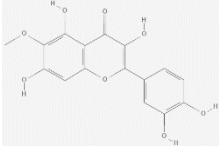
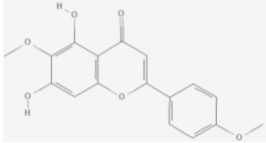
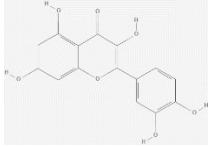
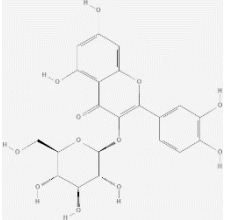
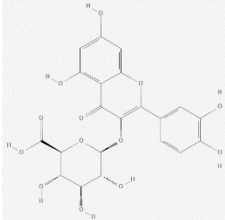
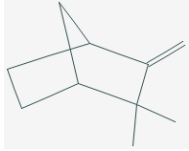
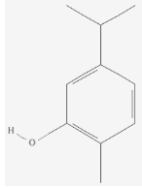
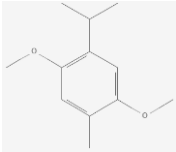


Kaempferol 3-O-β-D-glucuronido



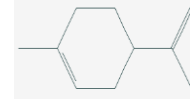
Luteolina



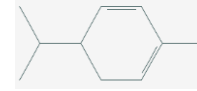
FENÓLICOS		Patuletina	
		Patuletina 3-O-β-D-glucosido	-
		Pectolinarigenina	
		Quercetina	
		Quercetina 3-β-D-glucosido	
		Quercetina-3-β-glucoronido	
	Quercetina 3-O- ácido glucorónico	-	
TERPENOS	MONOTERPENOS	Camfeno	
		Carvacrol	
		2,5-Dimethoxy-p-cimeno	

TERPENOS

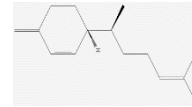
Limoneno



Felandreno



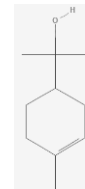
β - Sesquifelandreno



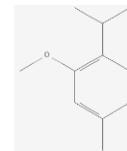
p-Mentha-2,4-diene



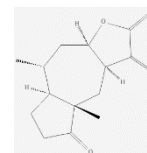
Terpineol



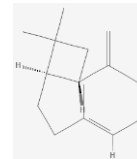
Thymol methyl ether



2,3-Dihydroaromaticin



Trans-Cariofileno

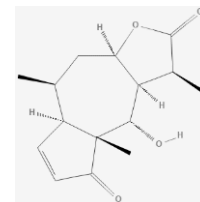


LACTONAS
SESQUITERPÉNICAS

Chamissonoid

-

Dihydrohelenalina



2- β -etoxi-6-o-isobutyryl-2,3-dihydrohelenalina
2-methyl butyryl 11,13-dihydrohelenalin

-

-

TERPENOS

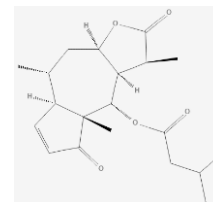
Acetyl 11,13-dihydrohelenalin

-

Isovaleryl 11,13-dihydrohelenalin

-

Isovaleryl-dihydrohelenalin



Metacryl 11,13-dihydrohelenalin

-

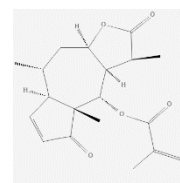
Methacryloyl-dihydrohelenalin

-

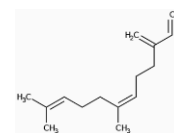
Methacryloyl-helenalin/isobutyryldihydrohelenalin

-

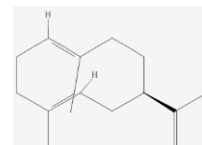
Tigloyl-dihydrohelenalin



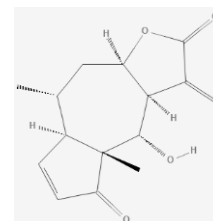
β -Cis-Farnesene



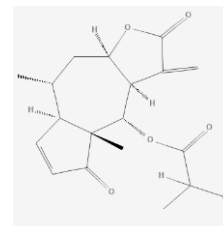
Germacreno



Helenalina



2-Methylbutyryl-helenalin



Acetyl helenalin

-

Isobutyryl helenalin

-

Isovaleryl helenalin

-

Metacryl helenalin

-

TRITERPENOS PENTACÍCLICOS	Tigloyl-helenalin	-
	6-o-isobutyryl-tetrahidrohelenalina	-
	Mexinanin I	-
	7-epi-Silphiperfol-5-ene	-
	Arnidiol	



La información mostrada en la Tabla 3 comprende la integración de la información consultada en: Clauser *et al.*, 2014; Kriplani *et al.*, 2017; Merfort, 1984; Spitaler *et al.*, 2006. Imágenes tomadas de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

2.3.4.1 Producción de MS en cultivos *in vitro* de *Arnica montana*

El cultivo de células de plantas es una herramienta con el objetivo obtener una alta producción del compuesto, alta productividad y un alto rendimiento del producto (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). Las ventajas que tienen las suspensiones celulares es el manejo similar de los microorganismos y la multiplicación celular rápida. Permite obtener sistemas (cultivos de células, tejidos u órganos; Fig. 14) en los que se controlan diversos factores como la temperatura, el fotoperíodo y la humedad (De la Cruz y González, 2009).

En *A. montana*, la mayoría de los trabajos sobre cultivo *in vitro* se relacionan con procesos de micropropagación (Petrova *et al.* 2016). Recientemente, Nieto-Trujillo (2020) estableció un cultivo de células en suspensión de *A. montana* y demostró que éste tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios tipo fenólico y lactonas sesquiterpénicas. Asimismo, tres fracciones del extracto metanólico, al contener dichos metabolitos secundarios mostraron un efecto citotóxico contra una línea celular de cáncer. No obstante, dichas fracciones, al contener compuestos fenólicos podrían actuar como inhibidores de α -amilasa.

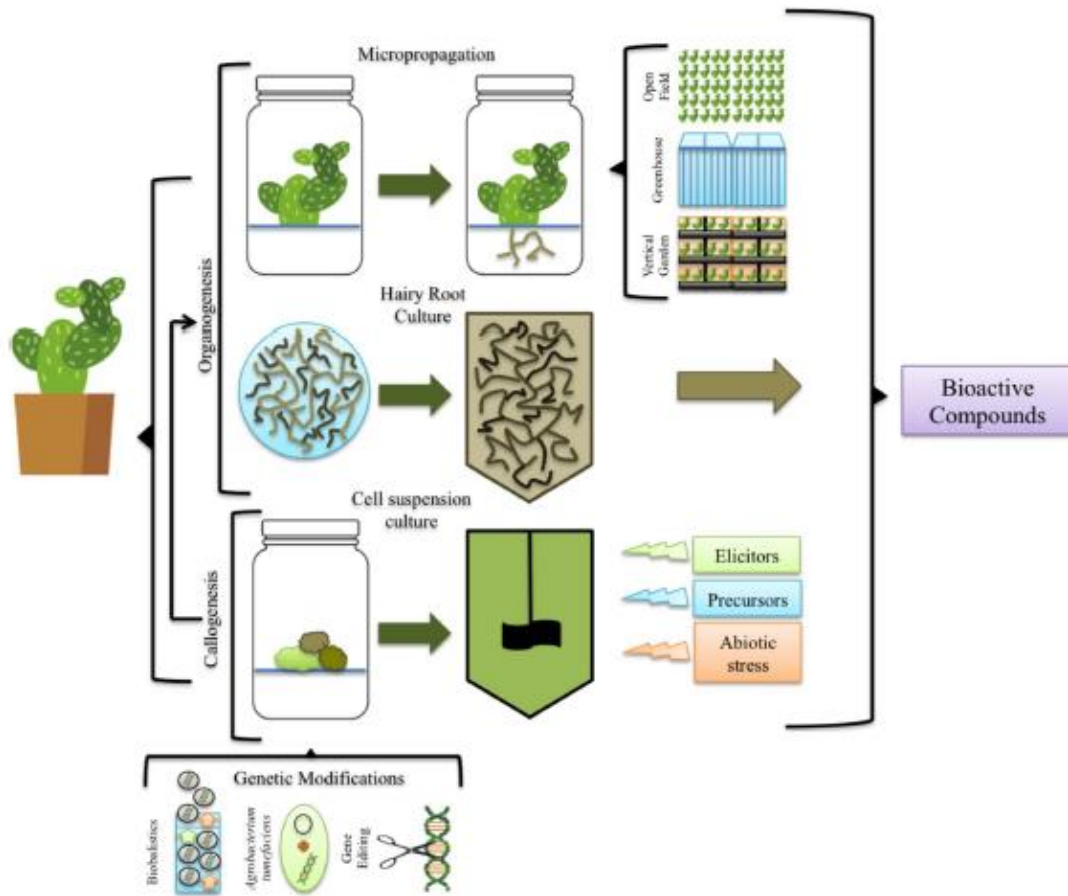


Fig.14. Métodos de cultivo *in vitro* para producción de compuestos bioactivos. Imagen tomada de Espinosa-Leal *et al.*, (2018).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento acelerado de la diabetes mellitus en nuestra población es necesaria la búsqueda e investigación de nuevas alternativas de tratamiento y control diabético. La diabetes mellitus es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de hiperglucemia crónica, en la que la liberación de la glucosa se debe a dos enzimas la α -glucosidasa y la α -amilasa cuya función es hidrolizar a los carbohidratos. La acarbosa es un fármaco utilizado como un tratamiento contra la diabetes mellitus y que inhibe a la enzima α -glucosidasa, sin embargo, la investigación de la inhibición de α -amilasa como un tratamiento de esta enfermedad aun es reducida. Se han registrado artículos donde diversas especies de plantas tienen un potencial inhibitorio de la α -amilasa, atribuido a compuestos fenólicos y flavonoides. *Arnica montana* es una especie de la que se han aislado componentes con usos antiinflamatorios, no obstante, también se ha evidenciado la presencia de compuestos que otras especies producen y que inhiben a la α -amilasa. Por ello realizar la evaluación del efecto inhibitorio de los extractos de *A. montana* permitirá contribuir con más información acerca de los metabolitos secundarios con capacidad inhibidora de α -amilasa, así como continuar con la identificación de los metabolitos responsables de esta inhibición.

4. HIPOTESIS.

Las fracciones del extracto metanólico de un cultivo celular de *Arnica montana* con compuestos fenólicos, tendrán un efecto inhibitor sobre la enzima α -amilasa

5. OBJETIVOS

- **General**

-Evaluar el efecto inhibitor de fracciones del extracto metanólico con compuestos fenólicos de un cultivo de *Arnica montana* sobre la α -amilasa.

- **Particular**

- Determinar la relación entre el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en las fracciones del extracto metanólico de un cultivo celular de *Arnica montana* y su efecto sobre la inhibición de la enzima α -amilasa.

6. METODOLOGÍA

6.1. Extractos

Fracciones secas (4AM, 5AM, 6AM caracterizados fitoquímicamente sobre el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y fenólicos ácidos totales por Nieto-Trujillo 2020) del extracto metanólico del cultivo celular de *A. montana* fueron proporcionados por el Laboratorio de Cultivos *in vitro* y Fitoquímica, los cuales fueron solubilizados en agua para preparar disoluciones bajo las siguientes concentraciones: 2.5, 10, 20, 50 y 100 µg/mL.

6.2. Evaluación de la inhibición de α-amilasa por los extractos

Para evaluar la inhibición de la α-amilasa se utilizó la metodología propuesta por Jimoh (2018), con algunas modificaciones. Se mezclaron 500 µL de la enzima α-amilasa porcina (2U) con 500 µL de muestra de fracciones; se incubaron por 20 minutos a 32°C. Posteriormente se agregaron 500 µL de almidón solubilizado en agua al 0.5%, dejándose reposar 20 minutos a 32°C. Después se detuvo la reacción con 1 mL de ácido dinitrosalicílico, y se colocaron los tubos en ebullición por 15 minutos; pasado ese tiempo se sumergieron los tubos en agua con hielo. La mezcla fue diluida con 10 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Se empleó acarbosa (1 µg/mL) como control positivo, buffer de fosfato como control negativo y disolución de DMSO como blanco. Se determinó el porcentaje de inhibición de la enzima en función de la absorbancia (Jimoh, 2018), acorde a la siguiente ecuación.

$$\text{INHIBICION (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

6.3. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados en lotes de 5 unidades experimentales bajo tres o cuatro repeticiones (n=15-20). Los resultados sobre la inhibición de la

enzima fueron analizados estadísticamente a través de un análisis de varianza (ANOVA), seguido de prueba de comparaciones múltiples. Además, se realizó una prueba estadística de correlación de Pearson entre el porcentaje de inhibición enzimático y el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y de contenido de fenoles ácidos totales (CFAT). Ambos análisis se realizaron con un nivel de significancia del 5%, en el software NCSS versión 12.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

Las fracciones del extracto metanólico de una línea celular de *A. montana* inhibieron a la enzima α -amilasa

Las fracciones del extracto metanólico (4AM, 5AM y 6AM) obtenido de la línea celular de *A. montana* y probadas a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentaron un efecto inhibitorio significativo (12.12%, 1.66%, 11.95%, respectivamente) sobre la enzima α -amilasa, mientras que el resto de las concentraciones evaluadas (2.5, 20, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no mostraron un efecto inhibitorio (Fig. 15). El presente estudio, es el primero en reportar el potencial de una línea celular de *A. montana* para producir compuestos capaces de inhibir a la enzima α -amilasa, por lo que aun cuando la inhibición de los extractos 4AM, 5AM y 6AM fue en un menor porcentaje con respecto al control positivo (acarbosea 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 50% de inhibición), resulta importante e innovador para la investigación de los compuestos inhibidores de la α -amilasa, así como del cultivo *in vitro* de *A. montana*.

El efecto inhibitorio entre las fracciones 4AM y 6AM no fue estadísticamente diferente entre sí, y mostraron un mayor efecto inhibitorio comparado con la fracción 5AM. Los extractos de plantas como *Smallanthus sonchifolus* (Asteraceae) y *Artocarpus heterophyllus* (Moraceae) inhibieron la enzima α -amilasa en un 97% y 60% (respectivamente) a una concentración de 0.1 mg/mL (= 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), este efecto se ha atribuido a la acción de ácidos fenólicos y flavonoides (Mendoza y Loza, 2014; Nair *et al.*, 2013). Por otro lado, la inhibición de la α -amilasa con extractos de *Lindernia ciliata* (Scrophulariaceae), *Phyllanthus reticulatus* (Phyllanthaceae) y *Bambusa vulgaris* (Poaceae) requirió de una concentración de 1.25 mg/ml (= 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para tener una inhibición de aproximadamente 5-10% (Momina y Rani, 2020). Esto permite inferir que las concentraciones a la cuales se tiene el efecto inhibitorio son variables con respecto al contenido de compuestos bioactivos de cada especie.

El cultivo celular representa una alternativa para la producción y aprovechamiento de los metabolitos secundarios de las plantas, por lo que se ha vuelto muy relevante en los últimos años (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

La línea celular de *A. montana* podría estar produciendo algunos compuestos como ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, flavonoides, monoterpenos, lactonas sesquiterpénicas y triterpenos pentacíclicos, ya que de acuerdo con la literatura ya han sido aislados de hojas, flores y raíces de esta especie (Clauser *et al.*, 2014; Kriplani *et al.*, 2017; Merfort,1984; Spitaler *et al.*, 2006). *Arnica montana* es ampliamente utilizada como analgésico y antiinflamatorio, sin embargo, algunos componentes que también la literatura ha registrado en *A. montana* tales como los ácidos hidroxicinámicos, flavonoides y algunos terpenos han demostrado ser inhibidores de α -amilasa (Mendoza y Medina, 2015; Ponce *et al.*, 2018; Mendoza y Loza, 2014; Medina *et al.*, 2019; Monzón,2019; Sales *et al.*,2012; Funke y Melzing, 2005; Shehadeh *et al.*, 2021).

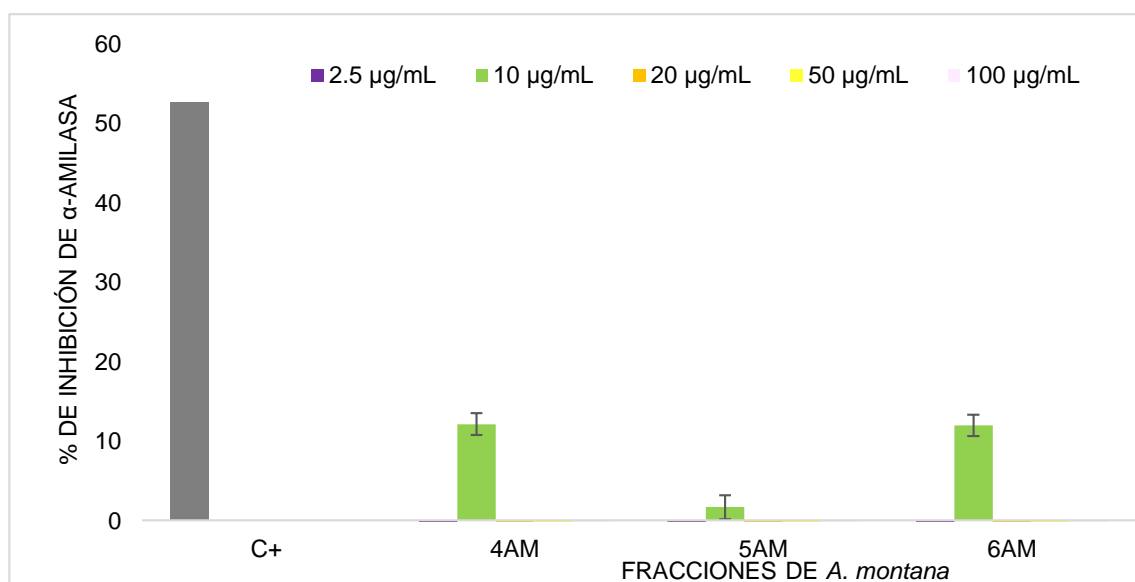


Fig.15. Porcentaje de inhibición de α -amilasa por fracciones del extracto metanólico de un cultivo celular de *A. montana* (4AM,5AM y 6AM) en concentraciones 2.5, 10, 20, 50 y 100 μ g/ml.

Los extractos de una línea celular de *A. montana* presentaron compuestos fenólicos en diferentes concentraciones.

La información del cultivo celular de *A. montana* así como de las evaluaciones fitoquímicas, en comparación con otras especies de interés farmacéutico, aún es reducida. Surmacz-Magdziak y Sugier (2012) son de los pocos autores que han publicado sobre la propagación *in vitro* de *A. montana* examinando la concentración

y el tipo de citoquininas, así como la concentración de auxinas. En cuanto a la información fitoquímica de *A. montana* autores como Clauser *et al.* (2014), Kriplani *et al.* (2017), Merfort (1984) y Spitaler *et al.* (2006) han reportado la presencia de alcaloides de pirrolizidina, ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, flavonoides, monoterpenos, lactonas sesquiterpénicas y triterpenos pentacíclicos.

De acuerdo a la literatura los compuestos de tipo fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos, flavonoides y algunos terpenos, en otras especies se han asociado a la actividad inhibitoria de α -amilasa, por tanto, conocer el contenido de estos compuestos nos permite relacionarlo con la capacidad de inhibición (Funke y Melzing, 2005; Medina *et al.*, 2019; Mendoza y Loza, 2014; Mendoza y Medina, 2015; Monzón, 2019; Ponce *et al.*, 2018; Shehadeh *et al.*, 2021). La cuantificación del contenido de compuestos fenólicos en los extractos de *A. montana* aquí usados para evaluar el efecto inhibitorio ya fue descrita previamente por Nieto-Trujillo (2020). Este autor encontró que la fracción 5AM presentó un mayor contenido de compuestos fenólicos totales (CFT de 270 ± 4.84 mg Equivalentes de ácido gálico/gramo de fracción; mg EAG/g) en comparación a las fracciones 6AM (170.16 ± 4.19 mg EAG/g) y 4AM (28.07 ± 1.86 mg EAG/g). Además, encontró que el contenido de flavonoides totales (CFvT) de las fracciones 5AM y 6AM mostraron concentraciones superiores (201.05 ± 3.83 mg equivalentes de quercitina/gramo de fracción; EQ/g y 188.53 ± 3.92 mg EQ/g respectivamente) a la fracción 4AM (9.98 ± 0.14 mg EQ/g). Para el caso de del contenido de fenoles ácidos totales (CFAT) Nieto-Trujillo (2020) encontró que la fracción con mayor contenido fue 5AM (83.31 ± 0.95 mg equivalentes de verbascósido/gramo de fracción; mgEV/g), seguido de 6AM (45.24 ± 0.23 mg EV/g) y la menor concentración fue para 4AM (26.51 ± 0.19 mg EV/g) (Fig. 16).

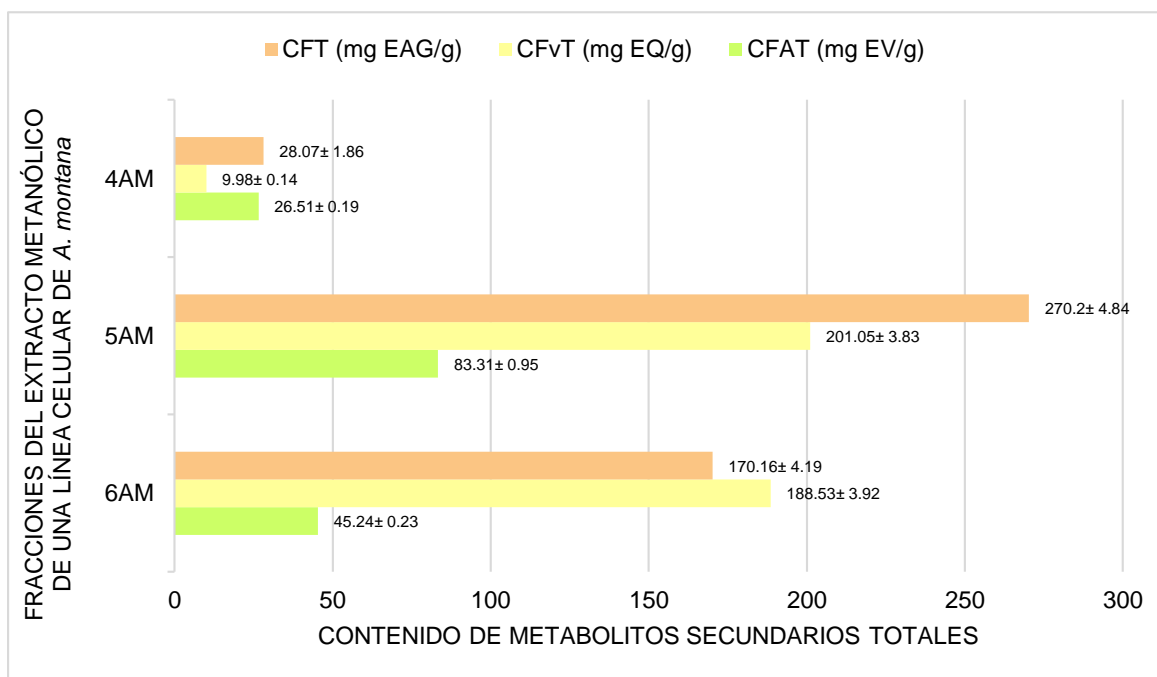


Fig.16 Contenido total de metabolitos secundarios presentes en extractos de una línea celular de *A. montana*: compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (CFVT) y fenólicos ácidos totales (CFAT). Datos tomados de Nieto-Trujillo (2020). EAG = Equivalente de ácido gálico; EQ = equivalente de quercitina; EV = Equivalente de verbascósido.

Los compuestos fenólicos ácidos presentes en las fracciones del extracto metanólico de una línea celular de *A. montana* se asocian al efecto inhibitor sobre α -amilasa

Por medio de la correlación de Pearson se observó una relación moderada negativa entre el contenido de CFT y la actividad inhibitoria sobre α -amilasa, siendo el contenido de CFAT el que mayormente se relacionó a la inhibición sobre la enzima (Tabla 4). Únicamente el valor de p de estas dos variables fue significativo.

La relación que el CFAT tienen con la inhibición de la enzima, puede estar relacionada a compuestos como los ácidos 3,4 dicafeoilquinico, 4,5 dicafeoilquinico y 3,5 dicafeoilquinico, ya que se ha demostrado la capacidad inhibitoria que tienen sobre la enzima (Narita y Inouye, 2015). Oboh *et al.* (2015) demostraron que ácidos fenólicos como el ácido cafeico y el ácido clorogénico inhiben a la α -amilasa, siendo el ácido cafeico quien presenta mayor inhibición, argumentando que se debe a las diferencias estructurales de unión al sitio activo entre estos dos ácidos fenólicos

(sustitución de OH por ácido quínico), cuyos metabolitos secundarios tipo ácidos fenólicos también se han reportados en *A. montana*.

Compuestos de tipo flavonoide como la apigenina, quercetina, kampferol y luteolina, obtenidos de otras especies, se han reportado como inhibidores de la α -amilasa (Lin *et al.*, 2016). Estos compuestos también han sido registrados en la literatura para *A. montana*. Sin embargo, aun cuando los compuestos fenólicos de tipo flavonoide se han reportado como inhibidores de la enzima su actividad puede ser afectada por grupos sustituyentes en el núcleo flavonoide (Mendoza y Medina, 2015).

Tabla 4. Correlación de Pearson entre el contenido de metabolitos secundarios totales y el efecto inhibitorio sobre α -amilasa de los extractos de una línea celular de *A. montana*

Variables respuesta	Valor de p	R
Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) vs actividad inhibitoria sobre α -amilasa	0.0068	-0.58
Contenido de compuestos fenólicos ácidos totales (CFAT) vs actividad inhibitoria sobre α -amilasa	0.0001	-0.95

8. CONCLUSION

Este es el primer estudio que indica la capacidad inhibitoria (12.12%, 1.66%, 11.95% a una concentración de 10 µg/mL) contra α-amilasa que tienen las fracciones 4AM, 5AM y 6AM respectivamente, del extracto metanólico de un cultivo celular de *A. montana*, aun cuando esta especie no se usa ampliamente como un tratamiento contra la DM. El efecto inhibitorio contra α-amilasa se correlacionó principalmente con el contenido de ácidos fenólicos totales, por lo que la línea celular podría estar produciendo ácidos fenólicos como ácido cafeico, ácidos 3,4 dicafeoilquínico, 4,5 dicafeoilquínico y 3,5 dicafeoilquínico, que produce *A. montana*, y que en la literatura han sido reportados como inhibidores de α-amilasa.

9. PERSPECTIVAS

Es necesario continuar con la identificación precisa de los MS responsables del efecto inhibitor contra α -amilasa que se observó en las distintas fracciones del extracto metanólico del cultivo celular de *A. montana*. Así como con la validación de que los compuestos de *A. montana* podrían usarse como un tratamiento para la DM sobre todo considerando que la información de los compuestos inhibidores de esta enzima y sus concentraciones suelen ser variables y dependen de la especie.

El cultivo celular de *A. montana* presenta una concentración elevada de compuestos fenólicos y de acuerdo a la literatura algunos compuestos fenólicos tienen actividades antibacterianas, por lo que es recomendable estudiar la capacidad antibacteriana que tendrían los compuestos presentes en este cultivo celular.

Aprovechar el cultivo celular de *A. montana* contribuiría con más información de esta especie para su estudio ecológico, así como farmacológico.

10. REFERENCIAS

- Al-Snafi, A.E.; Majid, W.J.; Talab, T.A. Medicinal plants with antidiabetic effects- An overview (Part 1). *IOSR J. Pharm.* **2019**, *9*, 9-46.
- Alfaro, J.; Simal, A.; Botella, F. Tratamiento de la diabetes mellitus. *Inf. ter. Sist. Nac. Salud.* **2000**, *24*, 33-43.
- Almaguer, A.; Miguel, P.E.; Reynaldo, C.; Mariño, A.L.; Oliveros, R. C. Actualización sobre diabetes mellitus. *CCM* **2012**, *16*, 1-16.
- Alonso-Castro, A.J.; Domínguez, F.; Maldonado-Miranda, J.J.; Castillo-Pérez, L.J.; Carranza-Álvarez, C.; Solano, E.; Isiordia-Espinoza, M.A.; Juárez-Vázquez, M. del C.; Zapata-Morales, J.R.; Argueta-Fuertes, M.A.; Ruiz-Padilla, A.J.; Solorio-Alvarado, C.R.; Rangel-Velázquez, J.E.; Ortiz-Andrade, R.; González-Sánchez, I.; Cruz-Jiménez, G.; Orozco-Castellano, L.M. Use of medicinal plants by health professionals in Mexico. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *198*, 81-86.
- Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *99*, 325-348.
- Arias, M.; Aguirre, A.; Angarita, M.; Montoya, C.; Restrepo, J. Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna.* **2009**, *76*, 109-121.
- Ávalos, A.; Pérez-Urria, E. Metabolismo secundario en plantas. *Reduca* **2009**, *2*, 119-145.
- Bastaki, S. Diabetes mellitus and its treatment. *Int. J. Diabetes & Metabolism* **2005**, *13*, 111-134.
- Basto-Abreu, A.; Barrientos-Gutiérrez, T.; Rojas-Martínez, R.; Aguilar-Salinas, C.A.; López-Olmedo, N.; De la Cruz-Góngora, V.; Rivera-Dommarco, J.; Shamah-Levy, T.; Romero-Martínez, M.; Barquera, S.; López-Ridaura, R.; Hernández-Ávila, M.; Villalpando, S. Prevalencia de diabetes y descontrol glucémico en México: resultados de la Ensanut 2016. *Salud Públ.Méx.* **2020**, *62*, 50-59.
- Bhatla, S.C. Secondary metabolites. In *Plant physiology, development and metabolism*, 1^a ed.; Bhatla, S., Lal, M., Eds.; Springer, Singapore, 2018; 34, pp. 1099-1166.
- Brahmkshatriya, P.; Brahmkshatriya, P. Terpenes: general biology and biotechnology applications. In *Natural products-phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*, 1st ed.; Ramawat, K., Merillon, J.-M. Eds : Springer, Berlin, 2013; pp 2665-2691.

- Canivell, S.; Gomis, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 403-407.
- Castro, C.J.; Villa, N.; Ramírez, S.A.; Mosso, C. Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2014**, *19*, 101-120.
- Cervantes-Villagrana, R.D.; Presno-Bernal, J.M. Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas. *Rev. Endocrinol. Nutr.* **2013**, *21*, 98-106.
- Chiou, S-Y.; Sung, J-M.; Huang, P-W.; Lin, S-D. Antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive properties of *Echinacea purpurea* flower extract and caffeic acid derivatives using *in vitro* models. *J. Mod. Food* **2017**, *20*, 171-179.
- Clauser, M.; Aiello, N.; Scartezzini, F.; Innocenti, G.; Acqua, S. D. Differences in the chemical composition of *Arnica montana* flowers from wild populations of North Italy. *NPC* **2014**, *9*, 3-6.
- Conget, I. Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Rev. Esp. Cardiol.* **2002**, *55*, 528-535.
- Cox-Georgian, D.; Ramadoss, N.; Dona, C.; Basu, C. Therapeutic and medicinal uses of terpenes. In *Medicinal Plants*; Joshee, N., Dhekney, S., Parajuli, P. Eds.; Springer, Cham, 2019; 215-241.
- Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313-7352.
- Daneman, D. Type 1 diabetes. *Lancet* **2006**, *367*, 847-858.
- De la Cruz, I.; González, A.R. Biotecnología aplicada a los metabolitos secundarios. *Lacandonia, Rev. Ciencias UNICACH.* **2009**, *3*, 59-65.
- Ekoé, J.-M.; Zimmet, P.Z.; Yale, J.-F. The clinical syndrome and the biochemical definition. In *the epidemiology of diabetes mellitus*, 2nd ed.; Ekoe, J.-M., Rewers, M., Williams, R., Zimmet, P.; John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, UK, 2008; pp 5-7.
- Escandón-Rivera, S.M.; Mata, R.; Andrade-Cetto, A. Molecules isolated from mexican hypoglycemic plants: a review. *Molecules* **2020**, *25*, 1-33.
- Esquivel-Gutiérrez, E.R.; Noriega-Cisnero, R.; Saavedra-Molina, A.; Salgado-Garciglia, R. Plants used in Mexican folk medicine with antidiabetic and hypertensive properties. *Pharmacologionline* **2013**, *2*, 15-23.
- Espinosa-Leal, C.A.; Puente-Garza, C.A.; García-Lara, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* **2018**, *248*, 1-18.

- Franco, O.L.; Rigden, D.J.; Melo, F.R.; Grossi-de-Sá, M.F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. Structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 397-412.
- Funke, I.; Melzing, M.F. Effect of different phenolic compounds on α -amylase activity: screening by microplate-reader based kinetic assay. *Pharmazie* **2005**, *60*, 796-797.
- Gan, R.-Y.; Chan, C.-L.; Yang, Q.-Q.; Li, H.-B.; Zhang, D.; Ge, Y.-Y.; Gunaratne, A.; Ge, J.; Corke, H. Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. In *Sprouted Grains. Nutritional value, production and applications*, 1st ed.; Feng, H., Nemzer, B., Devries, J.; Charlotte Cackle: Woodhead Publishing and AACC International Press, United Kingdom, 2018; pp. 191-246.
- García, F.; Solís, J.; Calderon, J.; Luque, E.; Neyra, L.; Manrique, H.; Cancino, R.; Castillo, O.; Cornejo, S. del P.; Rodríguez, E.; Freundt, J.; Zacarías, E. Prevalencia de diabetes mellitus y factores de riesgo relacionados en una población urbana. *Rev. Soc. Peru Med. Interna* **2007**, *20*, 90-94.
- Ghorbanpour, M.; Hadian, J.; Nikabadi, S.; Varma, A. Importance of medicinal and aromatic plants in human life. In *Medicinal plants and environmental challenges*, 1^a eds.; Ghorbanpour, M., Varma, A., eds.; Springer, Cham, 2017; 6, pp. 1-24.
- Goleniowski, M.; Bonfill, M.; Cusido, R.; Palazón, J. Phenolic acids. In *Natural products*. Ramawat, K., Merillon, J., Eds.; Springer, Berlin, Heidelberg, 2013; 1951-1975.
- Guzmán-Juárez, N.; Madrigal-Bujaidar, E. Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica*. **2003**, *28*, 14-23.
- Habtemariam, S.; Introduction to plant secondary metabolites-From biosynthesis to chemistry and antidiabetic action. In *Medicinal food as potential therapies for type-2 diabetes and associated diseases: the chemical and pharmacological basis of their action*, 1^a ed.; Habtemariam, S., Eds.; Academic Press, UK, 2019; 109-132.
- Hanson, J. *Natural products: the secondary metabolites*; The Royal Society of Chemistry, UK, 2003; pp. 18-21.
- Henning, C.P. Compuestos secundarios nitrogenados: alcaloides. En *Productos naturales vegetales*, 1^a ed.; Ringuélet, J., Viña, S., Eds.; Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina, 2013; pp. 18- 61.
- Hernández-Ávila, M.; Gutiérrez, J.P.; Reynoso-Noverón, N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Públ.Méx.* **2013**, *55*, S129-S136.
- Hernandez-Galicia, E.; Aguilar-Contreras, A.; Aguilar-Santamaría, L.; Román-Ramos, R.; Chávez-Miranda, A.A.; García-Vega, L.M.; Flores-Sáenz, J.L.; Alarcón-

Aguilar, F.J. Studies on Hypoglucemic Activity of Mexican Medicinal Plants. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **2002**, *45*, 118-124.

-Huang, W.-Y.; Cai, Y.-Z.; Zhang, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer*.**2010**, *62*, 1-21.

-Hussein, R.; El-Anssary, A. Plants secondary metabolites: They key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. In *Herbal medicine*; Builders, P., Eds.; IntechOpen: United Kingdom, 2019; pp. 11- 30.

-Instituto Nacional de Salud Pública. (2012). Encuesta Nacional de salud y Nutrición 2012. Evidencia para la política pública en salud. Consultado el 29 de junio del 2021. [URL:https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/doctos/analiticos/DiabetesMellitus.pdf](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/doctos/analiticos/DiabetesMellitus.pdf).

-Jimoh, T.O. Enzymes inhibitory and radical scavenging potentials of two selected tropical vegetable (*Moringa oleifera* and *Telfairia occidentalis*) leaves relevant to type 2 diabetes mellitus. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2018**, *28*, 73-79.

-Kaku, K. Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. *JMAJ* **2010**, *53*, 41-46.

-Katsarou, A.; Gudbjörnsdottir, S.; Rawshani, A.; Dabelea, D.; Bonifacio, E.; Anderson, B.J.; Jacobsen, L.M.; Schatz, D.A.; Lernmark, A. Type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 1-17.

-Kaurinovic, B.; Vastag, D. Flavonoids and phenolic acids as potential natural antioxidant. In *Antioxidant*; Shalaby, E., Eds.; IntechOpen Book Series, London, UK, 2019; Volumen 5, pp 1-20.

-King, H.; Aubert, R.E.; Herman, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025. *Diabetes care* **1998**, *21*, 1414-1431.

-Klaas, C.A.; Wagner, G.; Laufer, S.; Sosa, S.; Loggia, R.D.; Bomme, U.; Pahl, H.L.; Merfort, I. Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from *Arnica* flowers. *Planta Med.* **2002**, *68*, 385-391.

-Kriplani, P.; Guarve, K.; Baghael, U.S. *Arnica montana* L.-a plant of healing: review. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *69*, 925-945.

-Kumar, N.; Goel, N. Phenolic acids: natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol. Rep.* **2019**, *24*, 1-10.

-Kumar, S.; Paul, S.; Walia, Y.K.; Kumar, A.; Singhal, P. Therapeutic potential of medicinal plants: a review. *J. Biol. Chem. Chron.* **2015**, *1*, 46-54.

-Lai, J.; Xiao, M; Zhao, J.; Li, Z.; Xing, B.; Li, X.; Kong, M.; Li, L.; Zhang, Q.; Liu, Y.; Chen, H.; Qin, W.; Wu, H.; Chen, S. An overview of plant phenolic compounds and

their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*.**2016**, *21*, 1-19.

-Lara, E.A.; Fernández, E.; Lara, D.J.; Chaloupkova, P.; Zepeda, J.M.; Milella, L.; Russo, D. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Papantla, Veracruz, Mexico. *Plants* **2019**, *8*, 1-20.

-Lara, E.A.; Fernández, E.; Lara, E.A.; Zepeda, J.M.; Polesny, Z.; Pawera, L. An ethnobotanical study of medicinal plants used in Zacatecas state, Mexico. *Acta Soc.Bot. Pol.* **2018**, *87*, 3581- 3596.

-Lin, D.; Xiao, M.; Zhao, J.; Li, Z.; Xing, B.; Li, X.; Kong, M.; Li, L.; Zhang, Q.; Liu, Y.; Chen, H.; Qin, W.; Wu, H.; Chen, S.an overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, **2016**, *21*, 1374-1353.

-Lin, X.; Xu, Y.; Pan, X.; Xu, J.; Ding, Y.; Sun, X.; Song, X.; Ren, Y.; Shan, P.-F.Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Scientific reports*, **2020**, *10*, 14790-14801.

- López-Martínez, L.X.; Aguilar, L.M.; Dublán-García, O. Actividad antioxidante e inhibidora de α -glucosidasa y α -amilasa de tres variedades de cebolla (*Allium cepa* L.). *Nova scientia*. **2014**, *6*, 234-247.

-Mata, R.; Figueroa, M.; Navarrete, A.; Rivero-Cruz, I. Chemistry and biology of selected mexican medicinal plants. In *Progress in the chemistry of organic natural products*; Kinghorn, A., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J., Asakawa, Y., Liu, J.K., Eds.; Springer, Cham, 2019; Volumen 108, pp 1-118.

-Medina-Pérez, G.; Zaldívar-Ortega, A.K.; Cenobio-Galindo, A. de J.; Afanador-Barajas, L.N.; Vieyra-Alberto, R.; Estefes –Duarte, J.A.; Campos-Montiel, R.G. Antidiabetic activity of cactus acid fruit extracts: simulated intestinal conditions of the inhibitory effect on α -amylase and α -glucosidase. *Appl.Sci.* **2019**, *9*, 1-9.

-Mendoza, D.L.; Loza, S.A. Actividad inhibitoria alfa-amilasa y fenoles totales en extractos etanólicos de hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón). *Rev. Cuba. De Plantas Medicinales* **2014**, *19*, 310-318.

-Mendoza, D.L.; Medina, R. Inhibición *in vitro* de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreáticas por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl). *Avances en química* **2015**, *10*, 33-40.

-Merrit, A.D.; Karn, R.C. The human α -amylases. In *Advances in human genetics*. Harris, H., Hirschhorn, K., Eds.; Springer, Boston, MA, 1977; 8, pp. 137-234.

-Momina, S.S.; Rani, V.S. *In vitro* studies on α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of some bioactive extracts. *J. Young Pharm.* **2020**, *12*, s72-s75.

- Monzón, J.G. Estudio metabólico de hojas de *Passiflora ligularis* Juss y su relación con la actividad inhibitoria sobre α -amilasa y α -glucosidasa. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2019.
- Nair, S.S.; Kavrekar, V.; Mishra, A. *In vitro* studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extract. *Eur. J. Exp. Biol.* **2013**, *3*, 128-132.
- Narita, Y.; Inouye, K. Inhibition of porcine pancreas α -amylase by chlorogenic acid from green coffee beans and cinnamic acid derivatives: A focus on kinetic. In *Coffee in health and disease*, 1a ed.; Preedy, V., Eds.; Academic Press, 2014; pp 757- 763.
- Nieto-Trujillo, A. Evaluación de la actividad citotóxica de cultivos *in vitro* de especies productoras de lactonas sesquiterpénicas y compuestos fenólicos en una línea celular de linfoma. Tesis doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, 2020.
- Obón, C.; Rivera, D.; Verde, A.; Fajardo, J.; Valdés, A.; Alcaraz, F.; Carvalho, A.M. *Arnica*: A multivariate analysis of the botany and ethnopharmacology of a medicinal plant complex in the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *144*, 44-56.
- Oboh, G.; Agunloye, O.M.; Adefegha, S.A.; Akinyemi, A.J.; Ademiluyi, A.O. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (*in vitro*): a comparative study. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **2015**, *26*, 165-170.
- Ortega, M.E. Uso alternativo del *Arnica montana* y la árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*) como antiinflamatorio y analgésicos en pacientes sometidos a cirugías de terceros molares. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2013.
- Ozougwu, J.C.; Obimba, K.C.; Belonwu, D.C.; Unakalamba, C.B. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Physiol. Pathophysiol.* **2013**, *4*, 46-57.
- Payan, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1696*, 171-180.
- Palacios, A.; Duran M.; Obregón, O. Factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 y síndrome metabólico. *Rev. Soc. Venez. Endocrinología Metabolismo* **2012**, *10*, 34-40.
- Peñarrieta, J.M.; Tejeda, L.; Mollinedo, P.; Vila, J.L.; Bravo, J.A. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Rev. Boliv. Quim.* **2014**, *31*, 68-81.
- Pérez-Alonso, N.; Jiménez, E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biot. Veg.* **2011**, *11*, 195-211.

- Petrova, M.; Zayova, E.; Vassilevska-Ivanova, R.; Vlahova, M. Biotechnological approaches for cultivation and enhancement of secondary metabolites in *Arnica montana* L. *Acta.Physiol. Plant.* **2012**, *34*, 1597-1606.
- Ponce, J.O.; Rodríguez, N.; Juárez, R.P. Inhibición de la α -amilasa por medio de extractos de plantas medicinales como tratamiento complementario/alternativo de la diabetes y la caries. *Rev. Soc. Odontol.* **2018**, *28*, 41-45.
- Qian, M.; Haser, R.; Buisson, G.; Duée, E.; Payan, F. The active center of a mammalian α -amylase. Structure of the complex of a pancreatic α -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-Å resolution. *Biochemistry* **1994**, *33*, 6284-6294.
- Reddy, N.S.; Nimmagadda, A.; Sambasiva, K.R.S. An overview of the microbial α -amylase family. *Afr. J. Biotechnol.* **2003**, *2*, 645-648.
- Ringuelet, J.; Viña, S. *Productos naturales vegetales*, 1ª ed.; Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina, 2013; pp. 18- 61.
- Rojas, E.; Molina, R.; Rodríguez, C. Definición, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. *RVEM* **2012**, *10*, 7-12.
- Romero-Cerecero, O.; Reyes-Morales, H.; Aguilar-Santamaría, L.; Huerta-Reyes, M.; Tortoriello-García, J. Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos, México. *B. Latinoam. Caribe PL.* **2009**, *8*, 380-388.
- Roy, A.; Mahalingam, G. The *in-vitro* antidiabetic activity of *Phoenix roebelenii* leaf extract. *Int. J. Green Pharm.* **2017**, *11*, S128- S134.
- Ruiz-Reyes, E.; Suarez, M. Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *CENIC* **2015**, *46*, 9-24.
- Saad, B.; Zaid, H.; Shanak, S.; Kadan, S. Antidiabetic medicinal plants. In *Anti-diabetes and anti-obesity medicinal plants and phytochemicals*, 1ª ed.; Saad, B., Zaid, H., Shanak, S., Kadan, S., Eds.; Springer, Cham, 2017; 16, pp. 147-174.
- Sales, P.M.; Souza, P.M.; Simeoni, L.A.; Magalhães, P.O.; Silveira, D. α -amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2012**, *15*, 141-183.
- Salgado, D.Y. Incremento en la actividad alcoholítica de AmyA de *Thermotoga marítima* mediante mutagénesis sitio dirigida. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México, México, 2017.
- Santa, N.M.; Zacarías, R. Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Rev. Hosp.Gral.Dr.M.Gea.González* **2002**,*5*, 33-41.
- Sarabia, B.; Can, A.R.; Guerrero, J.G. Identificación de factores de riesgo de la diabetes mellitus tipo 2 en adultos de 30 a 60 años de edad en la comunidad de Isla Aguada, municipio de Ciudad del Carmen, Campeche. *RIDE* **2015**, *5*, 1-15.

- Shehadeh, M.B.; Suaifan, G.A.R.Y.; Abu-Odeh, A. Plants secondary metabolites as blood glucose-lowering molecules. *Molecules*, **2021**, *26*, 4333-4379.
- Shiffman, M. *Arnica montana*. In *Aesthetic medicine: Art and Techniques*, 1^a ed.; Prendergast, P., Shiffman, M., Eds.; Springer, Berlin, Heidelberg, 2012; 13, pp 289-294.
- Somolinos, J. El código de la Cruz-Badiano. *Salud Públ.Méx.* **1990**, *32*, 603-617.
- Spitaler, R.; Schlorhauser, P.D.; Ellmerer, E.P.; Merfort, I.; Bortenschlager, S.; Stuppner, H.; Zidorn, C. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 409-417.
- Surmacz-Magdziak, A.; Sugier, D. *in vitro* propagation of *Arnica montana* L.: An endangered herbal species of great importance to medicine. *Acta Sci. Pol.* **2012**, *11*, 127-140.
- Teoh, E. S. Secondary metabolites of plants. In *Medicinal Orchids of Asia*, 1^a ed; Teoh, E., Eds.; Springer, Cham, 2016; 18, pp. 59-73.
- Tholl, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2015**, *148*, 63-106.
- Tundis, R.; Loizzo, M.R.; Menichini, F. Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: An update. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2010**, *10*, 315-331.
- Velázquez-Vázquez, G.; Pérez-Armendáriz, B.; Ortega-Martinez. L.D.; Nelly-Juarez, Z. Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México. *BLACPMA* **2019**, *18*, 265-276.
- Verma, P.; Chaturvedi, R. In vitro plant cell cultures: A route to production of natural molecules and systematic in vitro assay for their biological properties. In *Medicinal Plants*; Joshee, N., Dhekney, S., Parajuli, P. Eds. ; Springer, Cham, 2019; 215-241.
- Villaseñor, J.L. Diversidad y distribución de la familia Asteracea en México. *Bot. Sci.* **2018**, *96*, 332-358.
- Waizel-Bucay, J.; Cruz-Juárez, M. de L. *Arnica montana* L., planta medicinal europea con relevancia. *Rev.Mex. Cien.For.***2014**, *5*, 98-109.
- World Health Organization. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66040>
- Zulak, K.G.; Liscombe, D.K., Ashihara, H.; Facchini, P.J. Alkaloids. In *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Crozier, A., Clifford, M., Ashihara, H. Eds.; Blackwell Publishing Ltd, UK, 2006; pp 102- 136.