



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS DE
ORIGEN NATURAL CON ACCIÓN
MULTIDIANA SOBRE
ENZIMAS PANCREÁTICAS DIGESTIVAS:
 α -GLUCOSIDASA, α -AMILASA Y LIPASA
PANCREÁTICA**

Yohum Steven Lozada Diaz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad, Departamento Química
Bogotá, Colombia

2023

BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS DE ORIGEN NATURAL CON ACCIÓN MULTIDIANA SOBRE ENZIMAS PANCREÁTICAS DIGESTIVAS: α - GLUCOSIDASA, α -AMILASA Y LIPASA PANCREÁTICA

Yohum Steven Lozada Diaz

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Química

Director (a):

Ph.D., Oscar Javier Patiño Ladino

Grupo de Investigación:

Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB) - Universidad
Nacional de Colombia

Codirector (a):

Ph.D., Juliet Angélica Prieto Rodríguez

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación: Grupo de Investigación Fitoquímica Universidad Javeriana
(GIFUJ) - Pontificia Universidad Javeriana

Línea de Investigación Química de Productos Naturales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad, Departamento Química

Bogotá, Colombia

2023

El que tiene fe en sí mismo no necesita que los demás crean en él
Miguel de Unamuno, 1925

A mi familia y a todas aquellas personas que me
brindaron su apoyo incondicional.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Yohum Steven Lozada Díaz

Yohum Steven Lozada Díaz

Fecha 01/08/2023

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y a la Pontificia Universidad Javeriana, por la formación académica brindada. Por brindarme el conocimiento científico y el espíritu crítico para el desarrollo de mi proceso formativo

A mi director de tesis, el profesor Oscar Javier Patiño, por brindarme la valiosa oportunidad de trabajar en su laboratorio y proyecto de investigación, compartir conocimiento, confiar en mí y dedicación plenamente a mi proceso de formación.

A mi codirectora de tesis, la profesora Juliet Angélica Prieto Rodríguez, Es con profunda gratitud y emoción que deseo expresar mi más sincero agradecimiento por todo lo que ha hecho por mí. Su incondicional apoyo, orientación y paciencia desde el inicio de este proyecto han sido fundamentales en mi desarrollo como profesional y persona. Su compromiso con el éxito de mi proyecto va más allá de lo que podría haber imaginado. Cada paso del camino, desde los ensayos biológicos hasta mi formación integral, ha sido iluminado por su sabiduría y dedicación. Gracias, infinitas gracias, por creer en mí y por impulsarme a superar mis propios límites. Sin duda, su guía y apoyo han sido el cimiento sobre el cual él construyó este trabajo con pasión.

A mis compañeros del Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB) del Departamento de Química por darme la oportunidad de trabajar con ustedes y compartir su espacio, conocimiento y apoyo para llevar a cabo este proyecto: Juan Cardozo, Estefanía Rodríguez, Stephanie Mahecha, Andrés Sierra, Harold Rodríguez, Daniel Ripoll y Cristóbal Ladino.

A mis compañeros y colaboradores de la Pontificia Universidad Javeriana del Departamento de Química por darme la oportunidad de trabajar con ustedes y compartir su espacio, conocimiento y apoyo para llevar a cabo este proyecto: Kevin Prince Lévuok, Mari Santamaría, Luis Chitiva, paula Ardila, a los profesores Jorge Robles Camargo, Ricardo Vera Bravo y Julián contreras Colaboradores del departamento de Química Mily Aurora Ángel Jiménez, Jaime González, Lorena Ariza y Cristian García.

A la Universidad Nacional de Colombia y a la Pontificia Universidad Javeriana, por la financiación y la formación académica brindada. Adicionalmente, Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (MinCiencias) por el apoyo financiero a través del contrato 003-2017 con código 110174559038, financiado a través de la convocatoria nacional de proyectos para el fortalecimiento de la investigación, creación e innovación de la universidad nacional de Colombia 2016-2018.

Resumen

Búsqueda de moléculas de origen natural con acción multidiana sobre enzimas pancreáticas digestivas: α -glucosidasa, α -amilasa y lipasa pancreática

La obesidad (OB) y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) son enfermedades sistémicas y crónicas que han alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial y constituyen un grave problema de salud pública, pues se encuentran entre las mayores causas de mortalidad y morbilidad. Estas dos patologías tienen estrecha relación a tal punto que el término "diabesidad" se ha empezado a utilizar para poner de manifiesto su interdependencia. Un enfoque que ha tomado relevancia para el control de la OB y DM2 involucra la inhibición de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y lípidos, como lipasa pancreática (LP), α -glucosidasa (AG) y α -amilasa (AA). En este sentido, la especie *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cas, ampliamente empleada en diferentes partes del mundo para el tratamiento de OB y DM2, siendo una especie interesante para la búsqueda de inhibidores de AG, AA y LP. La presente investigación contribuye a la búsqueda de moléculas con potencial inhibitorio multidiana frente a LP, AA y AG a partir del estudio a partir de sustancias de origen natural. La metodología incluyó el estudio fitoquímico biodirigido del extracto hidroalcohólico de hojas de *N. lobata* para aislar e identificar los compuestos con potencial inhibidor sobre las enzimas diana de interés y determinar su efecto citotóxico sobre dos líneas celulares: BHK-21 y MRC-5. Adicionalmente, se realizó una caracterización química y biológica de las preparaciones tradicionales más empleadas de *N. lobata* en el pacífico colombiano para determinar si dichos extractos tienen la capacidad de inhibir las enzimas de interés y contienen los metabolitos bioactivos identificados. Finalmente, se determinaron los mecanismos de inhibición enzimática sobre LP, AA y AG de los compuestos bioactivos provenientes de *N. lobata* y algunos compuestos

relacionados para establecer algunas relaciones preliminares de estructura-actividad. El estudio químico biodirigido permitió determinar que en las fracciones de AcOMe e iPrOH se concentra la actividad inhibitoria sobre las enzimas digestivas. A partir de estas fracciones se logró el aislamiento e identificación de dos sesquiterpenlactonas (neurolenina B **C1** y lobatina A **C2**), dos derivados de ácido benzoico (ácido p-hidroxibenzoico **C3** y ácido 3,4-dihidroxibenzoico **C4**) y dos flavonoides (5,6,4'-tetrahidroxi-3,7-dimetoxiflavonol **C5** y 5,6,3',4'-tetrahidroxi-3,7-dimetoxiflavonol **C6**). Los compuestos **C1**, **C2**, **C5** y **C6** demostraron ser inhibidores de LP y AG, con valores de CI_{50} entre 615 y 134 μ M sobre LP y entre 639 y 170 μ M sobre AG. Los compuestos **C1** a **C6** mostraron una actividad inhibidora débil sobre la enzima AA, con porcentajes de inhibición inferiores al 15%. Los estudios de citotoxicidad del extracto, las fracciones y compuestos bioactivos mostraron que el extracto HA y las fracciones de AcOMe e iPrOH presentaron una toxicidad moderada (viabilidad celular > 50%) con todas las concentraciones evaluadas sobre la línea celular MRC-5, mientras que sobre la línea BHK-21 el extracto también fue moderadamente tóxico y las fracciones fueron altamente tóxicas a la máxima concentración causando una mortalidad celular superior al 70%. Los compuestos **C5** y **C6** fueron altamente tóxicos sobre la línea celular BHK-21 causando mortalidades superiores al 62% con todas las concentraciones evaluadas, mientras que sobre la línea celular MRC-5 la toxicidad fue entre baja y moderada, siendo el compuesto **C6** el menos tóxico sobre esta línea celular. Los resultados de la caracterización química y biológica de las preparaciones tradicionales (**PT**) de *N. lobata* mostraron que el extracto hidroalcohólico obtenido presentó un mejor perfil de actividad inhibitoria sobre las tres enzimas de interés comparado con las PT, sin embargo, se encontró que las **PT** obtenidas a partir hojas frescas fueron las únicas que inhibieron las tres enzimas de interés. Respecto a la presencia de los compuestos bioactivos en las **PT**, se encontró que el compuesto **C1** está presente en todas las **PT**, tanto de hojas frescas como de hojas secas, mientras que los compuestos **C5** y **C6** solo pudieron ser detectados en las **PT** provenientes de hojas secas. Los resultados de los estudios de actividad enzimática de los compuestos bioactivos y compuestos relacionados indican que para que los compuestos de tipo sesquiterpenlactona estudiados inhiban la actividad catalítica de las enzimas AG y LP se requiere la presencia de grupos éster en las posiciones 9 y 8 del anillo lactónico, además estas sustancias se comportaron como inhibidores competitivos sobre las dos enzimas. En

el caso de los flavonoides se encuentra que los compuestos de tipo flavanona no son capaces de inhibir ninguna de las enzimas, haciéndose evidente la importancia de la insaturación entre los carbonos 2 y 3 del núcleo flavonoide para ejercer efectos inhibitorios sobre las tres enzimas de interés. La mayoría de los flavonoides inhibidores de las enzimas se comportaron como inhibidores de tipo competitivo o mixto sobre AA, AG y/o LP. De los compuestos estudiados, solo **C18** y **C19** lograron inhibir la actividad catalítica de las tres enzimas digestivas, mientras que los compuestos **C1**, **C2**, **C5** y **C6** solo lograron inhibir AG y LP.

Palabras clave: Lipasa pancreática, α -amilasa, α -glucosidasa, *Neurolaena lobata*, flavonoides, diabetes, obesidad.

Abstract

Search for molecules of natural origin with multidrug action on pancreatic digestive enzymes: α -glucosidase, α -amylase and pancreatic lipase.

Obesity (OB) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) are systemic and chronic diseases that have reached epidemic proportions globally and constitute a serious public health problem, as they are among the leading causes of mortality and morbidity. These two pathologies are closely related to the extent that the term "diabesity" has started to be used to highlight their interdependence. An approach that has gained relevance for the control of OB and T2DM involves the inhibition of enzymes related to carbohydrate and lipid metabolism, such as pancreatic lipase (PL), α -glucosidase (AG), and α -amylase (AA). In this regard, the species *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cas, widely used in different parts of the world for the treatment of OB and T2DM, is an interesting species for the search for inhibitors of AG, AA, and PL. This research contributes to the search for molecules with potential multi-target inhibitory activity against PL, AA, and AG by studying substances of natural origin. The methodology included the bio-guided phytochemical study of the hydroalcoholic extract of *N. lobata* leaves to isolate and identify compounds with potential inhibitory effects on the target enzymes of interest and to determine their cytotoxic effect on two cell lines: BHK-21 and MRC-5. Additionally, a chemical and biological characterization of the most commonly used traditional preparations of *N. lobata* in the Colombian Pacific region was performed to

determine if these extracts have the ability to inhibit the enzymes of interest and contain the identified bioactive metabolites.

Finally, the mechanisms of enzymatic inhibition on PL, AA, and AG by bioactive compounds from *N. lobata* and some related compounds were determined to establish preliminary structure-activity relationships. The bio-guided chemical study revealed that the AcOMe and iPrOH fractions concentrate the inhibitory activity on the digestive enzymes. From these fractions, the isolation and identification of two sesquiterpene lactones (neurolenin B **C1** and lobatin A **C2**), two benzoic acid derivatives (p-hydroxybenzoic acid **C3** and 3,4-dihydroxybenzoic acid **C4**), and two flavonoids (5,6,4'-trihydroxy-3,7-dimethoxyflavonol **C5** and 5,6,3',4'-trihydroxy-3,7-dimethoxyflavonol **C6**) were achieved. Compounds **C1**, **C2**, **C5**, and **C6** demonstrated inhibitory effects on PL and AG, with IC₅₀ values between 615 and 134 μ M on PL and between 639 and 170 μ M on AG. Compounds **C1** to **C6** showed weak inhibitory activity on AA, with inhibition percentages below 15%. Cytotoxicity studies of the extract, fractions, and bioactive compounds showed that the HA extract and the AcOMe and iPrOH fractions exhibited moderate toxicity (cell viability > 50%) at all evaluated concentrations on the MRC-5 cell line, while on the BHK-21 cell line, the extract was also moderately toxic, and the fractions were highly toxic at the maximum concentration, causing cellular mortality of over 70%. Compounds **C5** and **C6** were highly toxic on the BHK-21 cell line, causing mortalities above 62% at all evaluated concentrations, while their toxicity on the MRC-5 cell line ranged from low to moderate, with compound **C6** being the least toxic on this cell line.

The results of the chemical and biological characterization of the traditional preparations (TP) of *N. lobata* showed that the hydroalcoholic extract exhibited a better profile of inhibitory activity on the three enzymes of interest compared to the TP. However, it was found that the TP obtained from fresh leaves were the only ones that inhibited the three enzymes of interest. Regarding the presence of bioactive compounds in the TP, it was found that compound **C1** is present in all TPs, both from fresh and dried leaves, while compounds **C5** and **C6** could only be detected in TPs from dried leaves.

The results of the enzymatic activity studies of the bioactive compounds and related compounds indicate that for the studied sesquiterpene lactone compounds to inhibit the catalytic activity of AG and PL, the presence of ester groups at positions 9 and 8 of the lactone ring is required. Furthermore, these substances behaved as competitive inhibitors on both enzymes. In the case of flavonoids, it was found that flavanone-type compounds are not capable of inhibiting any of the enzymes, highlighting the importance of unsaturation between carbons 2 and 3 of the flavonoid nucleus to exert inhibitory effects on all three enzymes of interest. Most of the enzyme-inhibiting flavonoids acted as competitive or mixed inhibitors on AA, AG, and/or PL. Among the studied compounds, only **C18** and **C19** managed to inhibit the catalytic activity of all three digestive enzymes, while compounds **C1**, **C2**, **C5**, and **C6** only managed to inhibit AG and PL.

Keywords: pancreatic lipase, α -amylase, α -glucosidase, *Neurolaena. Lobata*, diabetes, obesity.

Contenido

| | |
|---|--------------|
| Agradecimientos..... | VIII |
| Resumen..... | XI |
| Abstract..... | XIV |
| Lista de figuras..... | XX |
| Lista de tablas..... | XXII |
| Lista de Símbolos y abreviaturas..... | XXIII |
| Introducción | 27 |
| Objetivos | 31 |
| Objetivo general | 31 |
| Objetivos específicos..... | 31 |
| 1. Estado actual del tema | 32 |
| 1.1. Generalidades entre la obesidad y la diabetes tipo 2..... | 32 |
| 1.2. Enzimas digestivas como blancos para el tratamiento de diabetes y obesidad. ... | 35 |
| 1.2.1. α -Glucosidasa (AG)..... | 35 |
| 1.2.1.1. Bioensayos <i>in vitro</i> para detección y cuantificación de la α -glucosidasa (AG). | 38 |
| 1.2.2. α -amilasa (AA). | 40 |
| 1.2.2.1. Bioensayos <i>in vitro</i> para detección y cuantificación de la α -amilasa (AA).43 | |
| 1.2.3. Lipasa pancreática (LP) | 45 |
| 1.2.3.1. Bioensayos <i>in vitro</i> para detección y cuantificación de la lipasa pancreática (LP). | 49 |
| 1.3. Importancia de las plantas para el control inhibitorio sobre enzimas digestivas . | 51 |
| 1.4. Generalidades de la especie <i>Neurolaena lobata</i> (L.) R.Br. ex Cas..... | 54 |
| 1.5. Clasificación taxonómica y morfología de <i>Neurolaena lobata</i> (L.) R.Br. ex Cas. | 55 |
| 1.6. Estudios fitoquímicos de la especie <i>Neurolaena lobata</i> (L.) R.Br. ex Cas..... | 56 |
| 1.7. Usos etnobotánicos de <i>Neurolaena lobata</i> (L.) R.Br. ex Cas. | 60 |
| 1.8. Estudios de actividad biológica de <i>Neurolaena lobata</i> (L.) R.Br. ex Cas. | 61 |
| 2. Metodología..... | 65 |
| 2.1. Procedimientos generales | 65 |

**Búsqueda de moléculas de origen natural con acción multidiana sobre enzimas
pancreáticas digestivas: α -glucosidasa, α -amilasa y lipasa pancreática**

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.2. | Identificación de los compuestos bioactivos de <i>Neurolaena lobata</i> con capacidad inhibitoria sobre lipasa pancreática (LP), α -amilasa (AA) y/o α -glucosidasa (AG)..... | 67 |
| 2.2.1. | Material vegetal | 67 |
| 2.2.2. | Extracción y fraccionamiento realizado del extracto de hojas de <i>N. lobata</i> | 67 |
| 2.2.3. | Determinación de la actividad inhibitoria frente a LP, AA y AG del extracto y fracciones <i>N. lobata</i> | 68 |
| 2.2.4. | Purificación de las fracciones AcOMe y iPrOH provenientes de <i>N. lobata</i> | 68 |
| 2.2.5. | Determinación de la inhibición de la actividad catalítica de los compuestos aislados sobre LP, AG y AA | 69 |
| 2.2.6. | Determinación de la actividad citotóxica | 71 |
| 2.2.7. | Análisis estadístico..... | 71 |
| 2.3. | Caracterización biológica y química de las preparaciones tradicionales más utilizadas de <i>Neurolaena lobata</i> para el tratamiento de diabetes y obesidad..... | 72 |
| 2.3.1. | Material vegetal | 72 |
| 2.3.2. | Obtención de las preparaciones tradicionales..... | 72 |
| 2.3.3. | Determinación de la actividad inhibitoria frente a LP, AA y AG de las preparaciones tradicionales..... | 73 |
| 2.3.4. | Análisis de la presencia de los compuestos bioactivos en las preparaciones tradicionales por HPTLC..... | 73 |
| 2.4. | Determinación de los mecanismos de inhibición enzimática sobre LP, AA y AG de los compuestos bioactivos provenientes de <i>N. lobata</i> y compuestos relacionados..... | 75 |
| 2.4.1. | Selección de los compuestos | 75 |
| 2.4.2. | Determinación de la inhibición de la actividad catalítica de los compuestos seleccionados sobre LP, AG y AA..... | 77 |
| 2.4.2.1. | Ensayo de la actividad catalítica de LP..... | 77 |
| 2.4.2.2. | Ensayo de la actividad catalítica de AA..... | 78 |
| 2.4.2.3. | Ensayo de la actividad catalítica de AG..... | 79 |
| 2.4.3. | Determinación del tipo de inhibición enzimática sobre de los compuestos bioactivos LP, AA y AG | 80 |
| 2.4.4. | Análisis estadístico | 80 |
| 3. | Resultados y discusiones | 81 |
| 3.1. | Identificación de los compuestos bioactivos de <i>Neurolaena lobata</i> con capacidad inhibitoria sobre lipasa pancreática (LP), α -amilasa (AA) y/o α -glucosidasa (AG)..... | 81 |
| 3.1.2. | Determinación de la inhibición de la actividad catalítica de los compuestos aislados sobre LP, AG y AA | 87 |
| 3.1.3. | Determinación de la actividad citotóxica | 88 |
| 3.2. | Caracterización biológica y química de las preparaciones tradicionales más utilizadas de <i>Neurolaena lobata</i> para el tratamiento de diabetes y obesidad..... | 91 |
| 3.2.2. | Estudio de actividad de la actividad inhibitoria frente a LP, AA y AG de las preparaciones tradicionales..... | 91 |
| 3.2.3. | Análisis de la presencia de los compuestos bioactivos en las preparaciones tradicionales por HPTLC..... | 94 |
| 3.4. | Determinación del tipo de inhibición enzimática sobre de los compuestos bioactivos LP, AA y AG | 108 |
| 3.4.2. | Estudio de inhibición sobre lipasa pancreática (LP)..... | 108 |

| | |
|---|------------|
| 3.4.3. Estudio de inhibición sobre α -glucosidasa (AG)..... | 112 |
| 3.4.4. Estudio de inhibición sobre α -amilasa (AA). | 115 |
| 4. Conclusiones y recomendaciones | 117 |
| 5.1. Conclusiones | 117 |
| 5.2. Recomendaciones..... | 119 |
| 5. ANEXOS..... | 121 |
| 5.1. Anexo 1 | 121 |
| 5.1.1. Anexo A1. Datos espectroscopicos y espectros RMN para el compuesto C1 | 122 |
| 5.1.2. Anexo A1. Datos espectroscópicos y espectros RMN para el compuesto C2 | 124 |
| 5.1.3. Anexo A1. Datos espectroscopicos y espectros RMN para el compuesto C3 | 126 |
| 5.1.4. Anexo A1. Datos espectroscopicos y espectros RMN para el compuesto C4 | 127 |
| 5.1.5. Anexo A1. Datos espectroscopicos y espectros RMN para el compuesto C5 | 129 |
| 5.1.6. Anexo A1. Datos espectroscópicos y espectros RMN para el compuesto C6 | 130 |
| 5.2 Anexo 2 | 133 |
| 5.1.7. Curva de calibración de compuesto C1 (Neurolenina B) a 254 nm en hojas Secas. | 133 |
| 5.1.8. Curva de calibración de compuesto C1 (Neurolenina B) a 254 nm en hojas Frescas. | 133 |
| 5.1.3. Curva de calibración de compuesto C5 (6-hidroxikaempferol 3,7-dimetil éter) a 254 nm en hojas Secas..... | 134 |
| 5.1.4. Curva de calibración de compuesto C5 (6-hidroxikaempferol 3,7-dimetil éter) a 254 nm en hojas Frescas..... | 134 |
| 5.1.5. Curva de calibración de compuesto C6 (quercetagetina 3,7-dimetil éter) a 356 nm en hojas Secas..... | 135 |
| 5.1.6. Curva de calibración de compuesto C6 (quercetagetina 3,7-dimetil éter) a 356 nm en hojas Frescas..... | 135 |
| 6. Bibliografía..... | 136 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura-1 Atlas informativo de la prevalencia de la obesidad para el (2022) imagen tomada de OGO. | 33 |
| Figura-2 Mecanismo de acción de α -glucosidasa (AG) (Código del PDB: 2QMJ). | 36 |
| Figura- 3 Plegamiento α -glucosidasa (AG) Código de (PDB: 2QMJ) | 36 |
| Figura-4 Reacción enzimática de la enzima AG La figura fue creada utilizando el software ChemDraw Professional..... | 39 |
| Figura-5 Mecanismo de acción de la enzima α -amilasa (AA) (Código de PDB:4GQR).. | 41 |
| Figura- 6 Plegamiento de la α -amilasa (AA) (Código de PDB: 4GQR) | 42 |
| Figura-7 El método basado en DNS indicador de inhibidores de α -amilasa La figura fue generada utilizando el software ChemDraw Professional. | 44 |
| Figura-8 Reacción enzimática de la enzima la AA La figura fue creada utilizando el software ChemDraw Professional..... | 45 |
| Figura- 9 Mecanismo de acción la enzima lipasa pancreática (LP) (Código de PDB: 1LPB)..... | 46 |
| Figura-10 Esquema de digestión y absorción de lípidos | 47 |
| Figura-11 Plegamiento de la lipasa pancreática (LP), (Código de PDB: 1LPB)..... | 48 |
| Figura-12 Reacción enzimática de la enzima la LP La figura fue creada utilizando el software ChemDraw Professional..... | 50 |
| Figura-13 Distribución geográfica de <i>Neurolaena</i> en América latina (A) y Colombia (B) tomado de EOL-global..... | 55 |
| Figura- 14 Características de hojas y flores de la especie <i>Neurolaena lobata</i> (L.) R.Br. ex Cas..... | 56 |
| Figura-15 Metabolitos representativos de la especie <i>Neurolaena lobata</i> (L.) R.Br. ex Cas. | 59 |
| Figura-16 Esquema de extracción y fraccionamiento por CLV sobre las hojas de <i>N. lobata</i> | 68 |
| Figura- 17 Esquema de extracción y fraccionamiento por CLV sobre las hojas de <i>N. lobata</i> (Asteraceae). | 70 |

| | |
|---|-----|
| Figura- 18 Compuestos aislados de las fracciones de AcOMe y iPrOH provenientes de las hojas <i>N. lobata</i> | 83 |
| Figura- 19 Porcentajes de mortalidad celular sobre las líneas BHK-21 y MRC-5 causados por el extracto HA , las fracciones AcOMe e iPrOH y compuestos C5 y C6 | 89 |
| Figura- 20 Porcentajes de inhibición de preparaciones tradicionales de <i>N. lobata</i> . Por decocción e infusión con hojas secas y frescas (PTD-F, PTD-S e PTI-S y PTI-F)..... | 92 |
| Figura-21 Cromatoplacas HPTLC obtenidas para la cuantificación de C1 , C5 y C6 en el extracto HA y las PT. A. Corresponde a los extractos obtenidos a partir de hojas secas. B. Corresponde a los extractos obtenidos a partir de hojas frescas. | 95 |
| Figura- 22 Gráficos Lineweaver-Burk del estudio cinético de los compuestos activos sobre LP | 109 |
| Figura- 23 Gráficos Lineweaver-Burk del estudio cinético de los compuestos activos sobre AG | 113 |
| Figura- 24 Gráficos Lineweaver-Burk del estudio cinético de los compuestos activos sobre AA. | 116 |

Lista de tablas

| | |
|--|-----|
| Tabla 1 Usos medicinales predominantes de <i>N. lobata</i> en diversos países de América Latina. | 60 |
| Tabla 2 Estudios biológicos reportados sobre los extractos y fracciones de la especie <i>N. lobata</i> | 62 |
| Tabla 3 Estudios biológicos sobre de los compuestos químicos identificados en la especie <i>N. lobata</i> | 63 |
| Tabla 4 Compuestos naturales seleccionados y evaluados sobre las enzimas LP, AG y AA. | 75 |
| Tabla 5 Efecto inhibitor sobre las enzimas LP, AA y AG sobre las fracciones obtenidas de las hojas <i>N. lobata</i> , expresado en valores CI_{50} | 81 |
| Tabla 6 Efecto inhibitor de los compuestos aislados de la especie <i>N. lobata</i> sobre la actividad catalítica de la AG, AA y LP. | 87 |
| Tabla 7 Concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) obtenidas para los extractos HA y PT de la especie <i>N. lobata</i> con potencial inhibitorio sobre las enzimas LP, AG y AA. | 93 |
| Tabla 8 Contenido de C1, C5 y C6 en el extracto HA y las PT obtenidas a partir de hojas de <i>N. lobata</i> | 94 |
| Tabla 9 Actividad inhibitoria sobre las tres enzimas de interés, divididos de metabolito secundario (sesquiterpenlactona y flavonoide). | 97 |
| Tabla 10 Inhibidores de lipasa pancreática y tipo de inhibición. | 110 |
| Tabla 11 Inhibidores de α -glucosidasa y tipo de inhibición. | 114 |
| Tabla 12 Inhibidores de α -amilasa y tipo de inhibición. | 116 |

Lista de Símbolos y abreviaturas

| | |
|------------------------------|---|
| AcOEt | Acetato de etilo |
| AcOMe | Acetato de metilo |
| Acetona-d₆ | Acetona deuterada |
| AGL | Ácidos grasos libres |
| FFA | Ácidos grasos libres |
| α | Alfa |
| aa | Aminoácidos |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| ADA | Asociación americana de la diabetes |
| APT | Attached proton test |
| β | Beta |
| 2D | Bidimensionales |
| BSA | Bovine serum albumin |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5-metil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio |
| CHCl₃ | Cloroformo deuterado |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| CI₅₀ | Concentración inhibitoria 50 |
| J | Constante de Acoplamiento |
| K_i | Constantes de inhibición |
| HPTLC | Cromatografía de capa fina de alto rendimiento |
| CCD | Cromatografía en capa delgada |
| CCDP | Cromatografía en capa delgada preparativa |
| CC | Cromatografía en columna |
| CF | Cromatografía flash |
| CLV | Cromatografía líquida al vacío |
| CNPG3 | 2-cloro-4-nitrofenol- α -d-maltotriosido |
| CNP | 2-cloro-p-nitrofenol |
| dL | Decilitro |
| DGGMR | 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico-(6'-metilresorufina)-éster |
| DNS | 3-amino-5-nitrosalicílico |
| DSC | Desoxicolato de sodio |
| δ | Desplazamientos químico |
| SD | Desviación estándar |
| DM | Diabetes mellitus |
| DM1 | Diabetes mellitus tipo 1 |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| DAG | Diacilgliceroles |
| DCM | Diclorometano |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| CO₂ | Dióxido de carbono |
| d | Doblete |
| EMEM | Eagle's minimum essential medium |
| EtOH | Etanol |
| R_f | Factor de retardo |

**Búsqueda de moléculas de origen natural con acción multidiana sobre enzimas
pancreáticas digestivas: α -glucosidasa, α -amilasa y lipasa pancreática**

| | |
|------------------------------------|---|
| FID | Federación internacional de diabetes |
| FDA | Food and drug administration |
| HMQC | ^1H -Detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence |
| HMBC | ^1H -Detected Multiple Bond Heteronuclear Multiple Quantum |
| °C | Grados centígrados |
| g | Gramos |
| Hz | Hertz |
| HA | Hidroalcoholico |
| HA-S | Hidroalcoholico hojas secas |
| NaOH | Hidróxido de sodio |
| COSY | Homonuclear correlation spectroscopy |
| IMC | Índice de masa corporal |
| i-PrOH | Isopropanol |
| kg/m² | Kilogramo/masa al cuadrado |
| LB | Lineweaver-burk |
| LP | Lipasa pancreática |
| HPL | Lipasa pancreática humana |
| PPL | Lipasa pancreática porcina |
| > | Mayor |
| DMEM | Medio eagle modificado de dulbecco |
| < | Menor |
| MeOH | Metanol |
| MeOD | Metanol deuterado |
| $\mu\text{g/mL}$ | Microgramo / mililitro |
| μM | Micromolar |
| mg | Miligramo |
| mg/g | Miligramo /gramo |
| mg/kg | Miligramo /kilogramo |
| mg/mL | Miligramos/mililitro |
| mL | Mililitro |
| mm/s | Milímetro por segundo |
| mm | Milímetros |
| MAG | Monoacilgliceroles |
| m | Multiplete |
| nm | Nanómetro |
| OB | Obesidad |
| oz | Onzas |
| OMS | Organización mundial de la salud |
| OPS | Organización panamericana de la salud |
| ppm | Partes por millón |
| pNPG | p-nitrofenil- α -d-glucopiranosido |
| pNP | p-nitrofenol |
| pH | Potencial de hidrogeno |
| PTD | Preparación tradicional por decocción |
| PTI | Preparación tradicional por infusión |
| PT | Preparaciones tradicionales |

| | |
|---------------|--|
| PTD-F | Preparaciones tradicionales decisión hojas frescas |
| PTD-S | Preparaciones tradicionales decisión hojas secas |
| PTI-F | Preparaciones tradicionales infusión hojas frescas |
| PTI-S | Preparaciones tradicionales infusión hojas secas |
| p.f. | Punto de fusión |
| RMN 1H | Resonancia magnética nuclear de hidrogeno |
| SLs | Sesquiterpenlactonas |
| s | Singlete |
| FBS | Suero fetal bovino |
| TAG | Triglicéridos |
| t | Triplete |
| UV | Ultravioleta |
| U/mg | Unidades/miligramo |
| 1D | Unidimensional |
| AA | α -Amilasa |
| AG | α -Glucosidasa |

Introducción

La obesidad y la diabetes son enfermedades crónico-digestivas que han alcanzado proporciones epidémicas, se encuentran entre las principales causas de mortalidad y morbilidad impactado negativamente al sistema de salud a nivel mundial (OMS 2022; Pan American Health Organization 2022). La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno anormal metabólico caracterizado por niveles elevados de glucosa en sangre como resultado alteraciones en la secreción o deficiencia de insulina. Según la Federación Internacional de Diabetes (FID), en el 2019, la diabetes causó 4,2 millones de muertes en el mundo, y se estima que para el 2045 serán cerca de 578 millones de diabéticos (FID, 2021 2021; OPS/OMS 2021). Uno de los principales factores de riesgo para padecer DM2 es la obesidad (OB) (Awosika and Aluko, 2019), una enfermedad crónica-digestiva definida como un trastorno inflamatorio de origen multifactorial; caracterizado por la acumulación crónica, anormal o excesiva de grasa (Cai et al. 2019).

La correlación obesidad-diabetes ha sido bien documentada a nivel clínico y epidemiológico y se fundamenta en el aumento en la producción y liberación de enzimas con actividad glucolíticas y lipolíticas, las cuales favorecen a nivel gastrointestinal la rápida absorción de grasas y carbohidratos consumidos en la dieta, generando el desarrollo de un fenotipo de resistencia a la insulina (Birari and Bhutani 2007; Kumashiro et al. 2011; Senosiain et al. 2013; Kumar and Chauhan 2021; Mera-Richard Flores et al. 2021; Shamsher Singh n.d. 2023). A nivel mundial se reporta que el 80% de los casos de DM2 fueron asociados a obesidad, por tanto, el aumento en la prevalencia del sobrepeso y la obesidad fue considerado directamente proporcional al incremento en la prevalencia de diabetes (Oliveira, Fonseca, and Silva 2022).

Búsqueda de moléculas de origen natural con acción multidiana sobre enzimas pancreáticas digestivas: α -glucosidasa, α -amilasa y lipasa pancreática

Entre las terapias actualmente recomendadas clínicamente para el tratamiento de la DM2 y OB, existen opciones respaldadas por evidencia clínica para el tratamiento y la prevención, que incluyen el aumento de la actividad física, cambios en los hábitos alimentarios para regular y/o reducir calorías y grasas, y el uso de fármacos orales enfocados en la inhibición de enzimas digestivas asociadas a la absorción de carbohidratos y lípidos, como α -glucosidasa (AG), α -amilasa (AA) y lipasa pancreática (LP), entre los que se encuentran miglitol y acarbosa inhibidores de AG y AA y el orlistat inhibidor de la LP (Bailey et al., 2010; Kumar and Chauhan 2021; OMS, 2022). Sin embargo, la baja efectividad terapéutica y los efectos secundarios de los fármacos convencionales ha promovido la búsqueda de nuevos tratamientos, posicionando al enfoque multidiana como una de las estrategias más promisorias en el diseño y desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de OB y DM2.

En este sentido, la OMS ha promovido la preservación y aprovechamiento del conocimiento tradicional para evaluar el potencial aporte de la medicina tradicional y complementaria al bienestar y la atención clínica (Aschner 2010; Francini, and Schinella 2015; Cheng et al. 2017). Con este propósito, los sistemas etnofarmacológicos han permitido el descubrimiento de nuevas fuentes naturales de moléculas bioactivas con propiedades antidiabéticas y antiobesidad. Tal es el caso de la especie *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cas. (Asteraceae), la cual ha sido ampliamente utilizada en América Central y del Sur, y en Colombia por la población chocoana, para el tratamiento de estas patologías (Ríos et al., 2015; Lévuok 2016; Zeng et al. 2018; Lozada Diaz 2019; Andrade-Cetto et al. 2019; Aschner 2010; Kovács et al. 2023). *N. lobata*, es conocida comúnmente como contra gabilana, gabilana, tres puntas, indio viejo, mano de lagarto, mano de tigre o venadillo, y su distribución está restringida a zonas neotropicales de Latinoamérica y las Indias Occidentales (Anon, 2022). A nivel tradicional esta especie se emplea como antiinflamatoria (Kerr, Mabry, and Yoser 1981), antiproliferativa (McKinnon et al. 2014) y para tratar la hipersecreción gástrica (Passreiter, Wendisch, and Gondol 1995). Se ha reportado que el extracto EtOH obtenido de las hojas *N. lobata* tiene la capacidad de disminuir el nivel de glucosa en sangre en ratones hiperglicémicos (Andrade-Cetto et al. 2019a). Además, se ha reportado el potencial inhibitorio de este extracto sobre enzimas digestivas como AG y LP. (Lévuok 2016; Lozada Diaz 2019; Andrade-Cetto et al. 2019) Los estudios fitoquímicos en *N. lobata* han llevado

al aislamiento de lactonas sesquiterpénicas de tipo germacranólido (neuroleninas A-F) y furanoheliangólido (lobatinas A y B), y flavonoides de tipo flavanoles como quercetina, kaempferol y sus derivados (Kerr, Mabry, and Yoser 1981; Kovács et al. 2023; McKinnon et al. 2014; Passreiter, Wendisch, and Gondol 1995).

En este sentido, y teniendo en cuenta el interés de nuestro equipo de investigación en buscar alternativas de origen natural para el tratamiento de OB y DM2, el objetivo principal de este trabajo consistió en buscar moléculas con potencial inhibitorio multidiana frente a lipasa pancreática, α -amilasa y α -glucosidasa, a partir del estudio de a partir de sustancias de origen natural. Para este fin, la primera fase del trabajo involucró el desarrollo de un estudio fitoquímico biodirigido para identificar los componentes bioactivos presentes en el extracto hidroalcohólico de *N. lobata*. Posteriormente se realizó una caracterización química y biológica de las preparaciones tradicionales de *N. lobata* comúnmente usadas en el pacífico colombiano para el tratamiento de DM2 y OB, con el fin de establecer si estas inhiben las enzimas de interés y contienen los metabolitos bioactivos. Por último, se buscó determinar los mecanismos de inhibición enzimática de los compuestos bioactivos extraídos de *N. lobata* y algunos compuestos relacionados, en relación con las enzimas LP, AA y AA, para establecer posibles relaciones estructura-actividad.

Objetivos

Objetivo general

Contribuir a la búsqueda de moléculas con potencial inhibitorio multidiana frente a lipasa pancreática, α -amilasa y α -glucosidasa, a partir del estudio de algunas sustancias de origen natural.

Objetivos específicos

- Identificar los compuestos bioactivos presentes en *Neurolaena lobata* con capacidad inhibitoria sobre lipasa pancreática (LP), α -amilasa (AA) y/o α -glucosidasa (AG).
- Caracterizar química y biológicamente las preparaciones tradicionales más utilizadas de *Neurolaena lobata* para el tratamiento de DM2 y OB.
- Determinar los mecanismos de inhibición enzimática sobre LP, AA y AG de los compuestos bioactivos provenientes de *N. lobata* y algunos compuestos relacionados.

1. Estado actual del tema

1.1. Generalidades entre la obesidad y la diabetes tipo 2

La obesidad y la diabetes tipo 2 (DM2) hacen parte de las enfermedades crónico-degenerativas de mayor importancia en salud pública, debido a las altas tasas de prevalencia y de mortalidad que causan y al alto gasto público que representan para la economía (OMS 2022; OPS/OMS 2021).

La obesidad puede definirse como es una enfermedad crónico-degenerativa causada por el desbalance metabólico entre la ingesta y gasto de la energía ya que existe un consumo excesivo de lípidos y carbohidratos con relación al bajo gasto calórico, cuando este desbalance ocurre por periodos prolongados el cuerpo por diferentes mecanismos de señalización desencadena un aumento e inflamación de los tejidos adiposos a causa de la acumulación de grasa corporal (Cai et al. 2017). Dentro de las principales causas identificadas que favorecen el desarrollo de la obesidad que modifican la genética y el metabolismo del organismo, son el estilo de vida sedentaria, los desórdenes de sueño, el consumo de bebidas alcohólicas y los malos hábitos alimenticios como la ingesta excesiva de alimentos con alto contenido calórico y de grasas (Rohde et al. 2019). Particularmente en una persona obesa la expresión de la leptina que se encuentra relacionada con las reservas energéticas y la regulación del apetito se ve reducida a causa de la inflamación de los tejidos adiposos, lo cual provoca irónicamente una señalización incorrecta en el cerebro como inanición constante, por ende, el paciente no se sentirá saciado (Crujeiras et al. 2015) dentro de las otras causas que contribuyen a la ganancia de peso encontramos el consumo de fármacos antidepresivos, corticoesteroidales, sulfonilureas, anticonceptivos esteroidales y anticonvulsivos que presentan esta característica como efecto secundario (Bujjirao and Kumar 2013; Uguz et al. 2015).

Según un informe de la (OMS) **Figura 1**, se estima que 62 millones de personas padecen obesidad. Esta cifra se ha triplicado desde 1980 y se proyecta en un increnebto de 109 millones para el año 2040. Uno de los datos más alarmantes es que, cada año, 244,000 muertes en todo el mundo están directamente atribuidas a la diabetes (OMS 2021). (Laakso and Kuusisto 2014; Lapertosa S, et al., 2010; Nam Han Cho et al. 2013).



Fuente: Repositorio de datos del Observatorio de Salud Global <https://apps.who.int/gho/data/node.main.A900A?lang=en> (último acceso 14.06.21)

Figura-1 Atlas informativo de la prevalencia de la obesidad para el (2022) imagen tomada de OGO.

La Asociación Americana del corazón y el Colegio Americano de Cardiología reportan que se han establecido 3 tipos de tratamientos para la obesidad, estos son el cambio a un estilo de vida activo, las cirugías bariátricas, y la farmacoterapia (M. D. Jensen et al. 2014; Kumar and Chauhan 2021; T. T. Liu et al. 2020). El primero consta en la implementación de una rutina de ejercicio acompañada de dietas con alto contenido proteico, bajo contenido de grasas y carbohidratos. En el segundo caso el objetivo consta en reducir el volumen del estómago por medio de diferentes técnicas como la implementación de un balón gástrico de silicona o realizando corte de este (Spínola and Castilho 2021). En tercer lugar, está la terapia farmacológica para lo cual se han diseñado fármacos enfocados en la disminución de peso cercano a 10% en aproximadamente 2 años. Actualmente, la FDA ha aprobado cinco fármacos para tratar la obesidad, cuatro de estos medicamentos actúan sobre los receptores

cerebrales que regulan el apetito: locaserina, fentermina/topiramato, naltrexona/bupropión y liraglutida. El orlistat es el único que reduce la absorción de grasa al inhibir la lipasa pancreática (Daneschvar et al., 2016; Genovese et al. 2021).

Por otro lado, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se define como un trastorno complejo de todo el metabolismo que consiste en la disrupción de la función de la insulina, mediado por múltiples vías patogénicas que van desde errores en la producción, liberación y señalización de la insulina, hasta la no captación ni aprovechamiento de esta, principalmente por células del músculo liso esquelético (FID, 2021). Además de estas vías, existen otras cascadas metabólicas que se ven afectadas, las especializadas en la absorción y degradación de las fuentes calóricas y energéticas ingeridas en la dieta; algunas de estas enzimas, las de más interés en las últimas décadas son: α -amilasa y α -glucosidasa, encargadas de hidrolizar el enlace glicosídico que une las cadenas de azúcares de alta densidad como el almidón, ampliamente ingerido en la dieta, hasta glucosa y/o maltosa para el caso de la primera y finalmente hasta monoazúcares en el caso de la segunda (Nair, Kavrekar, and Mishra 2013). Debido a este desorden metabólico, el primer síntoma que presenta y caracteriza a una persona que padece la enfermedad es el elevado nivel de glucosa en sangre o hiperglicemia. Se considera que hay hiperglicemia si la concentración de glucosa en ayunas es superior a 126 mg/dL, o si alcanza los 200 mg/dL después de haber consumido 75 g de glucosa por vía oral durante el ensayo de tolerancia. (Codario 2011; Kooti et al. 2016; Sreedharan and Abdelmalak 2018)

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes existen 5 clases de diabetes, de las cuales la más conocida es la tipo 2, con una prevalencia de 90 al 95% de todos los casos de diabetes (Chinsebu 2019; Codario 2011). En el 2019, la diabetes causó 4,2 millones de muertes en el mundo, y otros 2,8 millones fueron atribuidos a la hiperglicemia crónica. En el 2019 se calculó que cerca de 463 millones de personas padecían diabetes tipo II (DM2), se estima que para el 2045 serán cerca de 578 millones de diabéticos (FID, 2021; OMS 2022). Asimismo, mundialmente se reportó que el 80 % de los casos de diabetes fueron asociados a la obesidad.

En el tratamiento de la DM2, destacan varios tipos de antidiabéticos orales. Las biguanidas como metformina, fenformina y bufomina, reducen niveles de glucosa en sangre al suprimir la producción de glucosa hepática y promover la captación de glucosa en tejidos periféricos. Las sulfonilureas como la tolbutamida, glibenclamida, clorpropamida y glipizida, actúan como secretagogos de insulina, aumentando la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas (Spínola and Castilho 2021). Por último, están los inhibidores de enzimas digestivas como acarbosa, voglibosa y miglitol, que retrasan la absorción gastrointestinal de carbohidratos (Ng et al. 2020; Barrett et al. 2022; Klein et al. 2022).

Sin embargo, y a pesar del amplio espectro de medicamentos y/o sus mecanismos de acción, el uso terapéutico tanto de estos antidiabéticos orales, así como de los fármacos antiobesidad se ha visto limitado debido a su elevado costo, baja efectividad terapéutica y efectos secundarios asociados a su uso clínico (Ng et al. 2020; Barrett et al. 2022; Klein et al. 2022).

1.2. Enzimas digestivas como blancos para el tratamiento de diabetes y obesidad.

1.2.1. α -Glucosidasa (AG)

La familia de las glucosidasas es una clase diversa de enzimas que catalizan reacciones de glucohidrólisis conocidas como glucósido hidrolasas. Estas enzimas tienen la capacidad de actuar sobre diversos compuestos, como éteres, péptidos, ésteres, ésteres de ácido fosfórico, anhídridos de ácido y carbohidratos. Su función principal es romper los enlaces glicósidos α -1,4, implicados en la insuficiencia de azúcares y almidones en el proceso de digestión ver **Figura-2** (Copyright de Worthington Biochemical Corp. 1993). Estas enzimas son sintetizadas en los enterocitos o células del borde del cepillo del epitelio intestinal, y poseen una actividad catalítica similar a la enzima α -amilasa.

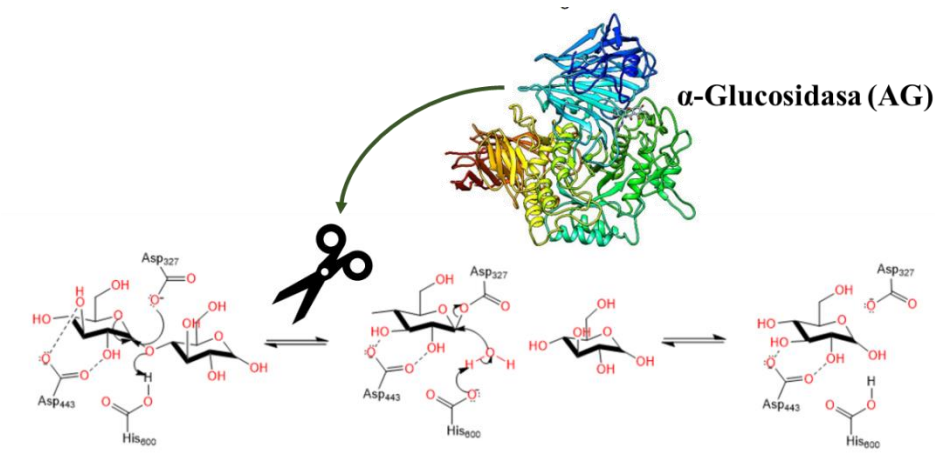


Figura-2 Mecanismo de acción de α -glucosidasa (AG) (Código del PDB: 2QMJ).

La enzima α -glucosidasa (AG) es una proteína que consta de aproximadamente 868 aminoácidos, con una masa molecular de 98,8 kDa. Su estructura se compone de 5 dominios principales: (1) un dominio tipo trébol P (residuos 1-51aa); (2) un dominio tipo sándwich β N-terminal (residuos 52-269aa); (3) un dominio tipo catalítico (β/α) (residuos 270-651aa); (4) un dominio proximal C-terminal (residuos 652-730 aa); y (5) un dominio distal C-terminal (residuos 731-868 aa), ambos con tipología sándwich β (Sim et al. 2008). La AG tiene como triada catalítica con residuos como Asp³²⁷, Asp⁴⁴³ y His⁶⁰⁰ ver **Figura-3**, que son fundamentales para su actividad catalítica en el dominio 5 C-terminal.

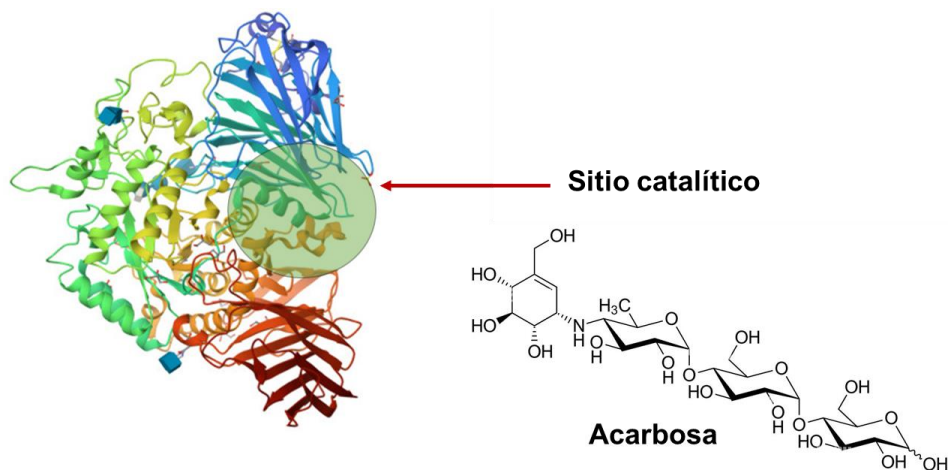


Figura- 3 Plegamiento α -glucosidasa (AG) Código de (PDB: 2QMJ)

Las glucosidasas AG son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en diversos organismos como microorganismos, hongos, plantas y animales. Su especificidad por el sustrato y sus propiedades varían según su origen, y se clasifican en tres tipos: α -glucosidasa I, α -glucosidasa II y α -glucosidasa III (Bischoff 1994). Estas enzimas juegan un papel crucial en el procesamiento y modificación de glicoproteínas dentro de las células. Las α -glucosidasas I y II se localizan en el retículo endoplásmico, mientras que las α -glucosidasas III se encuentran en los lisosomas (Bischoff 1994). Su función principal abarca el plegamiento adecuado de las glicoproteínas, el control de calidad y la eliminación de residuos de glucosa unidos a estas durante su biosíntesis (Shin et al. 2019).

En humanos, existen dos isoformas de la α -Glucosidasa (AG) codificadas por el gen GAA ubicado en el cromosoma 17q25. Estas isoformas son la EC 3.2.1.3 y la EC 3.2.1.20 (SIB n.d.). La AG se sintetiza como un precursor de 110 kDa con carácter ácido. Su función principal es hidrolizar enlaces α -1,4 y 1,6 de oligo y disacáridos, liberando unidades de α -D-glucosa. La isoforma EC 3.2.1.3 está presente en todas las células del cuerpo y realiza funciones de catabolismo en los lisosomas, mientras que la isoforma EC 3.2.1.20 (SIB and Yun 2010; Patricia and Padilla 2013), se encuentra en las vellosidades del intestino delgado y se descompone carbohidratos en la etapa final de la digestión, siendo una de las enzimas responsables de la degradación completa del almidón entre estas se resalta la AG Tipo I de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra en el endoplásmico retículo (Nakai et al. 2005; Yun 2010; López-Martínez, et al., 2014).

Saccharomyces cerevisiae, conocida como levadura de panadería o levadura, es un microorganismo unicelular del reino Fungi (Parapouli et al. 2020), ampliamente utilizado en la industria alimentaria y científica debido a su capacidad para fermentar diversas sustancias, incluidos carbohidratos, produciendo alcohol y gas carbónico. En la investigación científica, se emplea como objetivo de estudio para evaluar la actividad de la enzima α -glucosidasa, ya que esta levadura la produce como parte de su metabolismo natural (Walker and Stewart 2016). La α -glucosidasa es relevante en la

digestión de carbohidratos complejos, como almidones y disacáridos, descomponiéndolos en azúcares más simples, como la glucosa. Además, la levadura es de fácil acceso y bajo costo, lo que la convierte en una opción atractiva para experimentos en bioquímica y biología molecular (Krogerus et al. 2017).

Existen evidencias clínicas importantes, que correlacionan positivamente la inhibición de la enzima AG se ha considerado como una alternativa clave para el tratamiento de la DM2. (H. T. Nguyen et al. 2022). Los inhibidores de las α -glucosidasa son compuestos que bloquean directamente los centros activos de las enzimas, lo que disminuye la absorción de carbohidratos en el tracto gastrointestinal y limita su digestibilidad. Clínicamente, estos inhibidores se utilizan para prevenir enfermedades como la diabetes, la hiperglucemia, la hiperlipemia y la obesidad (Patricia and Padilla 2013; SIB n.d.; Yun 2010). La acarbosa es un pseudotetrasacárido de origen bacteriano que se aisló por primera vez de *Actinoplanes utahences* (CI₅₀ 0.5 mM) (Wolfender et al. 2015). Actúa como un análogo del sustrato de las α -glucosidasas, por lo que se considera un inhibidor competitivo de estas enzimas presentes en los bordes del cepillo de las células intestinales. La acarbosa, como antidiabético oral, retrasa la digestión de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos de manera dependiente de la dosis. Así, la glucosa derivada de estos sustratos más complejos, se libera y pasa a la sangre más lentamente, reduciéndose y retrasando su aumento postprandial plasmático (Patel et al. 2012).

1.2.1.1. Bioensayos *in vitro* para detección y cuantificación de la α -glucosidasa (AG).

Se han desarrollado diversos métodos, incluido el enfoque colorimétrico, para detectar la inhibición de la α -glucosidasa. El método cuantitativo basado en colorimetría es común y práctico para verificar el papel inhibidor de compuestos contra esta enzima. Este método implica la cuantificación del p-nitrofenol (pNP) liberado al hidrolizar el *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNPG) mediante la presencia alfa-glucosidasa. La absorbancia del

producto formado, que presenta un color amarillo, se mide a 400-415 nm mediante espectrofotometría Ver **Figura-4** (Hriscu et al. 2013).

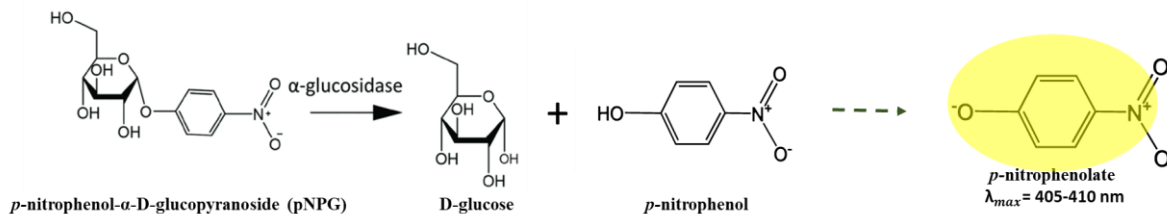


Figura-4 Reacción enzimática de la enzima AG La figura fue creada utilizando el software ChemDraw Professional.

Además, se utilizan otros ensayos para la detectar la actividad α -glucosidasa, que es el ensayo colorimétrico/fluorométrico de glucosa oxidasa. En este ensayo, la enzima glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa a glucolactona y peróxido de hidrógeno (Hriscu et al. 2013). Luego, el peróxido de hidrógeno reacciona con un sustrato cromogénico o fluorogénico, lo que produce un cambio de color o fluorescencia medible. La intensidad del cambio de color o fluorescencia es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra (Dirir et al. 2022)

La mayoría de los ensayos enzimáticos se pueden realizar en lectores de microplacas de 96 pozos o en espectrofotómetros/espectrofluorómetros o en cubetas tradicionales. (Lankatillake, et, al.,2019). La adaptación de estos ensayos al formato de microplacas presenta ventajas y desventajas notables, como la disminución de los volúmenes de reactivos y los costos asociados, así como la posibilidad de llevar a cabo pruebas con mayor rapidez. Esto resulta útil para evaluar, extractos, fracciones de productos natural y compuestos naturales como sintéticos (Lankatillake et al. 2021).

La interferencia del color en las muestras, particularmente en extractos de plantas, es una cuestión clave. Estos extractos, ricos en pigmentos naturales altamente conjugados, a menudo presentan una coloración intensa que puede distorsionar las mediciones de absorción en ensayos espectrofotométricos (Simeonov and Davis 2004). Entre estos

pigmentos, las clorofilas y los carotenoides se destacan en las plantas. Las clorofilas, por ejemplo, se absorben principalmente en los rangos de 430-480 nm y 640-660 nm (B. Kaur, et al., 2022).

Por otro lado, la insolubilidad de ciertos extractos y compuestos con los buffers usados en los ensayos pueden generar turbidez al dejar partículas sin disolver, lo que puede resultar en resultados inexactos (B. Kaur, et al., 2022; Restrepo 2017). La presencia de un medio turbio provoca la dispersión y absorción de la luz. Además, los sustratos también pueden constituir una fuente potencial de errores en los ensayos enzimáticos. Sustratos inestables, por ejemplo, pueden descomponerse gradualmente, para formar subproducto. La contaminación del sustrato con el producto cromogénico o fluorogénico puede introducir una falsa señal, resultando en un aumento engañoso de la absorbancia o fluorescencia que no está ligado a la actividad enzimática (Ewa 2009; Rigolon, et al., 2021).

Por lo tanto, es esencial minimizar los efectos de estas interferencias durante los experimentos es recomendable incluir un "blanco de muestra" en los ensayos (Meng et al. 2016; X. Yang and Kong 2016), Cuando se estás estudiando múltiples muestras a la vez es importante tener este blanco de muestra para cada una. Esto ayuda con el fin de garantizar la precisión de los resultados y su validez. Se recomienda usar un "blanco de control positivo" y un "blanco de control negativo" para mejorar la precisión de la medición. Las propiedades ópticas de las muestras varían, por lo que se deben corregir las medidas utilizando en sus respectivos blancos (Sosnowska et al. 2018; Lankatillake et al. 2021)

1.2.2. α -amilasa (AA).

La α -amilasa (AA), es una importante enzima pertenece a la familia de glucósido hidrolasas que son responsables en la conversión del almidón, polisacáridos y oligosacáridos en unidades menos complejas como trisacáridos y disacáridos (Wongsa et al. 2023). Estas enzimas su principal función es catalizar la hidrólisis del enlace (α -1,4-glicosídico) de los polisacáridos (Hamdani et al. 2020) ver **Figura-5**. Además, cumplen funciones biológicas importantes, tanto en humanos como en plantas, bacterias y otro tipo de organismos, en

humanos se identifican distintos tipos de amilasas, como las salivales presentes principalmente en la cavidad oral, y las pancreáticas, sintetizadas y secretadas por las células acinares en el duodeno (Cao et al. 2023). Entre estas amilasas, se encuentran diferentes polimorfismos alfa (α), beta (β) y gamma (γ). La α -amilasa tiene la capacidad de hidrolizar enlaces glicósidos α -(1-4) en cualquier parte de la cadena. Por otro lado, la β como la γ -amilasa solo cortan en los sitios no reducidos del extremo de la cadena, aunque la última también puede hidrolizar los enlaces α -(1-6) (Marengo et al. 2022).

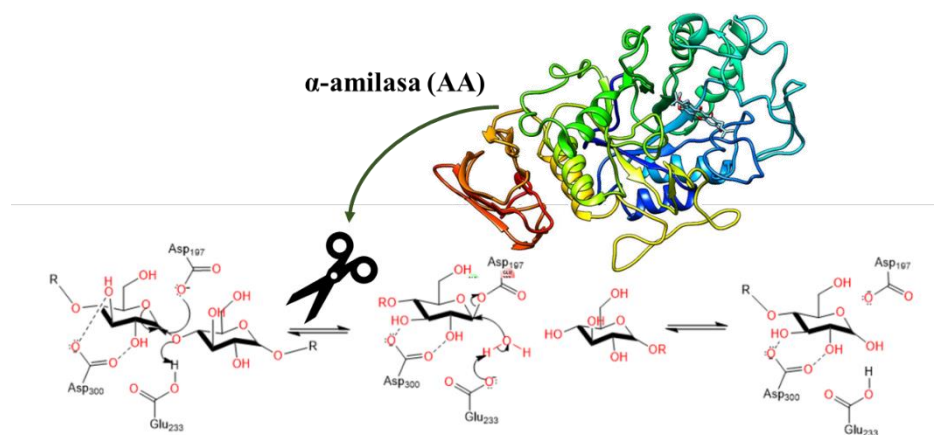


Figura-5 Mecanismo de acción de la enzima α -amilasa (AA) (Código de PDB:4GQR)

A nivel estructural, la α -amilasa consta de 512 aminoácidos con un peso molecular de 57,6 kDa. Esta enzima se compone de tres dominios: A, B y C. El dominio A adopta una conformación de barril y contiene el sitio activo de la enzima, donde se encuentran los residuos de la tríada catalítica: Asp¹⁹⁷, Glu²³³ y Asp³⁰⁰ (Zubair et al. 2023). Por otro lado, el dominio B contribuye a la estabilidad de la proteína y se encuentra en una hendidura entre los dominios A y B, donde también se une al sustrato. Ambos dominios A y B requieren la presencia de iones Ca²⁺ y Cl⁻, lo que estabiliza la hendidura del sitio activo y favorece la actividad catalítica. Por último, el dominio C forma una estructura β y parece ser un dominio independiente cuya función aún no se comprende ver completamente **Figura-6** (Ogunyemi et al. 2022).

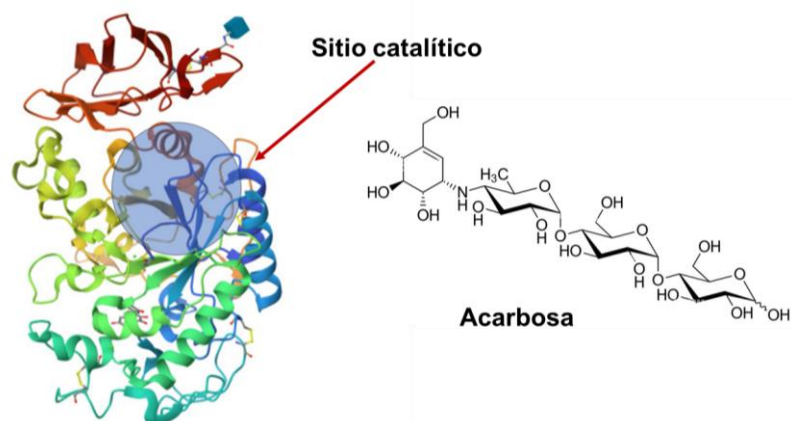


Figura- 6 Plegamiento de la α -amilasa (AA) (Código de PDB: 4GQR)

Las α -amilasas de procedencia animal y bacterias, como las presentes en el porcino o *Aspergillus oryzae*, cuentan con un elemento clave para su actividad; el ion cloruro que juega un papel importante como un activador alostérico (Paul et al. 2021). Esto permite que la cadena lateral del residuo de aminoácido Glu²³³ adopte una orientación específica que le permite protonar adecuadamente en un pH fisiológico necesario para alcanzar la máxima actividad catalítica de la enzima. Así, estas α -amilasas desempeñan eficientemente su papel en la digestión de carbohidratos (Anitha Gopal and Muralikrishna 2009).

Al estudiar la α -amilasa pancreática porcina (EC 3.2.1.1) mediante clonación molecular y análisis de estructura primaria, se ha revelado que esta enzima muestra una alta similitud con la secuencia de la α -amilasa pancreática humana, alcanzando un nivel de homología del 87,1% (Gopal and Muralikrishna 2008). Esta estrecha similitud sugiere que ambas amilasas realizan funciones similares y comparten una base genética, lo cual abre la posibilidad de utilizar enzimas homólogas como modelos para entender mejor las enzimas humanas (Paul et al. 2021). Para ello, la α -amilasa pancreática porcina se han utilizado enfoques bioquímicos, tanto *in vitro* como *in silico*, para una comprensión más completa de sus características y mecanismos de acción (Marengo et al. 2022).

En este sentido, los inhibidores de la α -amilasa desempeñan un papel crucial en la prevención y tratamiento de síndromes metabólicos como la diabetes tipo 2 y la obesidad. Estos inhibidores ayudan a controlar los niveles elevados de glucosa en la sangre al retrasar la absorción de carbohidratos (Sugimoto et al. 2015). Entre los fármacos utilizados para inhibir esta enzima se encuentran la acarbosa, el miglitol y la voglibosa. La voglibosa es un derivado sintético de la valiolumina, seleccionado como potencial antidiabético en 1994. Se ha informado que posee actividad inhibidora contra las enzimas maltasa y sucrasa (CI_{50} 2.2 μ M) (Ríos, et. al 2016). Por otro lado, el miglitol es un derivado de la 1-deoxinojirimicina, aislado de *Streptomyces hygroscopicus* aprobado como fármaco antidiabético en 1999 como un potencial terapéutico para el tratamiento de la DM2 debido a su capacidad de inhibir de manera reversible las enzimas glucosidohidrolasas intestinales (Asano 2005).

A diferencia de la acarbosa, el miglitol se absorbe casi por completo a través del intestino, lo que sugiere que puede tener un mayor efecto sistémico (Reid and Korner 2022). Sin embargo, no existen evidencias que respalden que el miglitol muestre efectos terapéuticos fuera del intestino, como sí ocurre con la acarbosa (Q. Zhu et al. 2013). A pesar de la abundante información disponible sobre los mecanismos de acción y la eficacia terapéutica de este tipo de inhibidores de enzimas glucosidohidrolasas, se ha observado que el uso prolongado de estos medicamentos puede generar efectos secundarios a nivel gastrointestinal. Además, diversas evidencias señalan que el control glicémico no se alcanza en su totalidad con este tipo de inhibidores. Por lo tanto, carecen de valor terapéutico para el tratamiento de la DM2 (N. Kaur et al. 2021).

1.2.2.1. Bioensayos *in vitro* para detección y cuantificación de la α -amilasa (AA).

El método principal utilizado para el ensayo de α -amilasa es el método DNS (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico). Los azúcares reductores liberados por la enzima que reaccionan con DNS, produciendo ácidos 3-amino-5-nitrosalicílico de color rojo anaranjado y se mide a 400-415 nm (Prakash 2022). Sin embargo, los polifenoles presentes en extractos de plantas pueden interferir con este método. Los estudios han demostrado que el (-)-galato de epigallocatequina (EGCG) muestra la mayor interferencia, seguido del ácido gálico y la

florizina. Por lo tanto, es esencial realizar experimentos de control adecuados para corregir estas interferencias ver **Figura-7** (Ezebuiri et al. 2022).

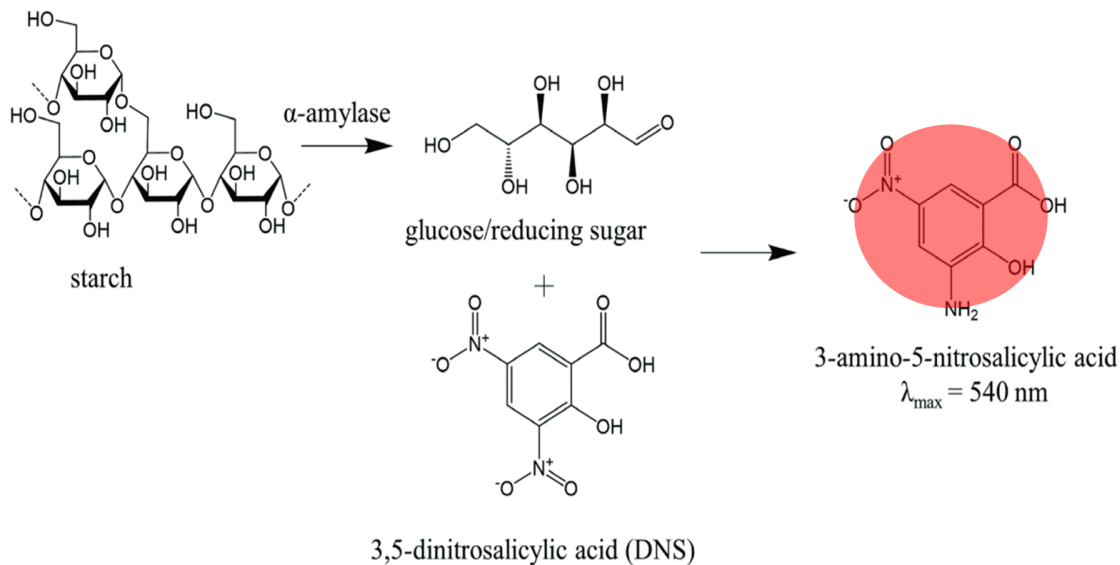


Figura-7 El método basado en DNS indicador de inhibidores de α -amilasa La figura fue generada utilizando el software ChemDraw Professional.

El reactivo de Lugol contiene yodo y yoduro de potasio, y forma un complejo de color azul intenso con el almidón en la solución, que se cuantifica espectrofotométricamente a 620 nm. Sin embargo, es importante mencionar que el uso de este indicador puede ser inconsistente en condiciones de temperatura y pH óptimo requerido para la actividad de cada enzima. Por ejemplo, la α -amilasa necesita un pH alrededor de 6,9, mientras que la lipasa pancreática requiere un pH de 8 (Buchholz and Melzig 2016).

En otro método, se utiliza almidón azul, también conocido como almidón azul insoluble, como sustrato para cuantificar la actividad de la α -amilasa. Este sustrato se une covalentemente al almidón de maíz insoluble. La reacción enzimática conduce a la formación de fragmentos coloreados solubles, cuya intensidad se medirá

espectrofotométricamente después de eliminar el sustrato restante mediante centrifugación o filtración (Lehoczki, Kandra, and Gyémánt 2018).

El uso de ésteres de *p*-nitrofenilo como sustrato desempeña un papel importante en la cuantificación enzimática. En un estudio del 2017, se obtuvo 2-cloro-4-nitrofenol- α -D-maltotriósido (CNP3) como sustrato para evaluar la actividad de la α -amilasa. Durante esta reacción, se liberan como productos maltotriosa y 2-cloro-*p*-nitrofenol (CNP), que se cuantifican mediante absorción a 405 nm para determinar la actividad enzimática ver **Figura-8** (Jerbi et al. 2017).

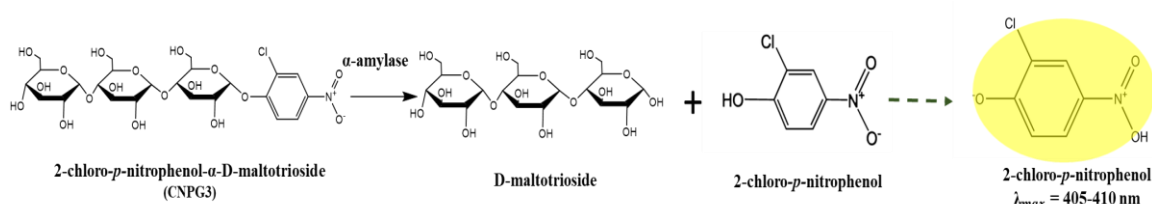


Figura-8 Reacción enzimática de la enzima la AA La figura fue creada utilizando el software ChemDraw Professional.

Cabe resaltar en estos ensayos enzimáticos, es importante considerar la posibilidad que se presenten problemas derivados de la interferencia del color en las muestras de estudio. Además, es necesario estar atento a la formación de precipitados debido a los buffers específicos utilizados en cada ensayo, así como a la presencia de sustratos que pueden resultar inestables.

1.2.3. Lipasa pancreática (LP)

En el cuerpo humano se distinguen dos tipos de lipasas: las preduodenales, como las lipasas linguales y gástricas, actúan antes del duodeno en el intestino delgado. Por otro lado, las lipasas extraduodenales o "superfamilia de lipasas" incluyen lipasas pancreáticas, hepáticas, lipoproteicas y endoteliales, actuando fuera del duodeno. Estas enzimas son secretadas por

las células acinares del páncreas y luego liberadas en el intestino delgado, donde contribuyen a la hidrólisis de los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos (Salazar et al. 2020).

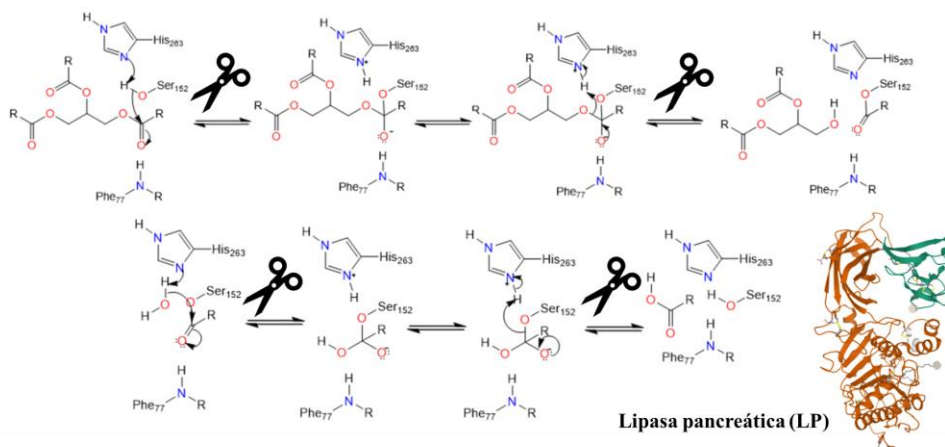


Figura- 9 Mecanismo de acción la enzima lipasa pancreática (LP) (Código de PDB: 1LPB)

La digestión de los lípidos comienza en la boca, pero la mayor parte ocurre en el intestino delgado, especialmente en el duodeno. Las lipasas presentes en el jugo lingual, gástrico y pancreático descomponen los triglicéridos (TAG) en diacilgliceroles (DAG), monoacilgliceroles (MAG) y ácidos grasos libres (FFA) (Tian et al. 2022) ver **Figura 9**. Junto con sales biliares, fosfolípidos y colesterol, estos productos forman micelas mixtas que se difunden hacia la mucosa intestinal, llevándolos a las microvellosidades de los enterocitos en el intestino delgado (Tian et al. 2022). En esta etapa, los TAG se vuelven a sintetizar y se unen a proteínas específicas llamadas apolipoproteínas, formando quilomicrones, que son estructuras llenas de lípidos. Estos quilomicrones son liberados de los enterocitos a los capilares sanguíneos mediante exocitosis. Así, la digestión de los lípidos se lleva a cabo mediante la interacción de estos nutrientes con enzimas específicas, siendo las principales responsables de su lipólisis las lipasas pancreáticas (LP), ver **Figura-10** (Birari and Bhutani 2007; Lunagariya et al. 2014).

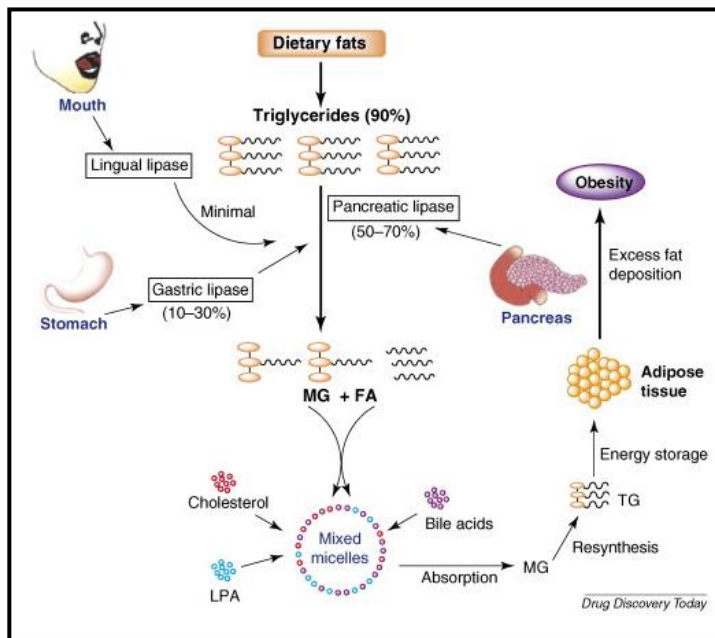


Figura-10 Esquema de digestión y absorción de lípidos

A nivel estructural, la lipasa pancreática consta de 449 residuos aminoácidos. La cadena polipeptídica se divide en dos unidades plegadas, el dominio N-terminal (1-336 aa) y el dominio C-terminal (337-449 aa). Mientras, el dominio N-terminal corresponde al sitio activo de la enzima, donde se encuentran los residuos de la tríada catalítica: Ser¹⁵² Asp¹⁷⁶ y His²⁶³ (Mukherjee 2003; González-Monte 2010), el dominio C-terminal es responsable de la unión de la colipasa, un cofactor requerido para la activación enzimática. Una vez que se ha producido esta unión, por un lado, el sitio activo queda expuesto para que el sustrato pueda entrar y, por otro lado, se forma una nueva cavidad en la enzima debido a la interacción entre el dominio C y la colipasa (Yang and Lowe 2000). Se sugiere que, en el caso específico de esta enzima, ambas condiciones favorecen la unión de un inhibidor competitivo ver **Figura-11**.

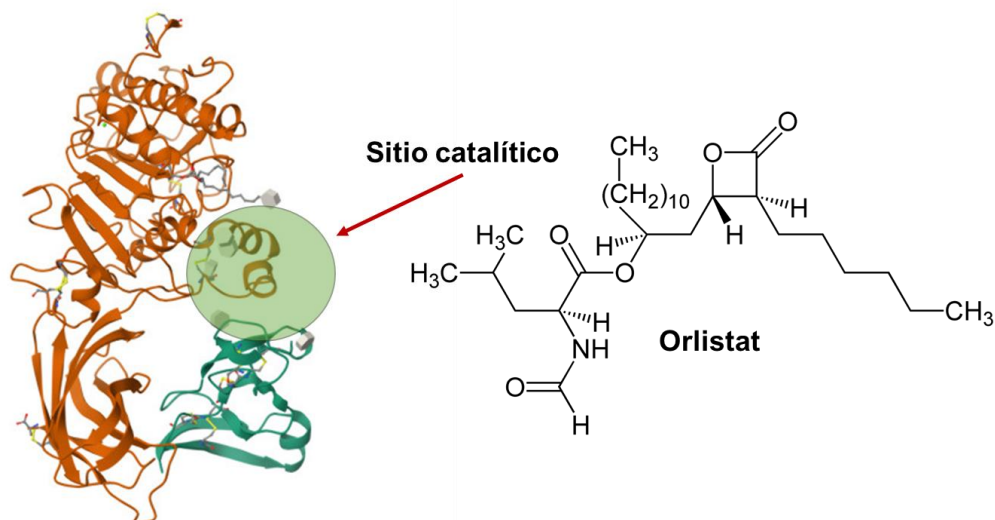


Figura-11 Plegamiento de la lipasa pancreática (LP), (Código de PDB: 1LPB)

Esta tríada catalítica, fue descubierta en las proteasas serínicas (Carter y Wells, 1988), es una característica fundamental presente en los lazos altamente conservados del dominio catalítico de las lipasas. En esta tríada, la Ser¹⁵² desempeña un papel crucial al conectar las hélices α que se encuentran empaquetadas a ambos lados de la hoja β (G. Zhu et al. 2021). Este residuo de serina funciona como nucleófilo y es el responsable directo de la actividad catalítica, definiendo así el plegamiento característico α/β -hidrolasa, compartido por muchas hidrolasas con diversas funciones catalíticas y orígenes filogenéticos. Los otros dos residuos de la tríada catalítica pueden ser reemplazados por diferentes aminoácidos (González, Rodríguez and Del Monte 2010).

Estudios previos han demostrado que la lipasa pancreática porcina (PPL) y la lipasa pancreática humana (HPL) exhiben actividades específicas similares en la hidrólisis de triglicéridos, con una homología del 86% (Albayati et al. 2020). Esta similitud en sus actividades se debe a que ambas lipasas comparten la misma tríada catalítica en su dominio C-terminal. Esta característica también explica su estereoselectividad hacia sustratos químicamente similares, lo que les permite actuar eficientemente frente a sustratos

hidrosolubles, como los ésteres del *p*-nitrofenol (Jensen, DeJong, and Clark 1983; R. Gupta et al. 2003).

A lo largo del tiempo, se han investigado diversas estrategias terapéuticas para combatir la obesidad, y una de las áreas de enfoque ha sido la enzima LP. Se cree que esta enzima juega un papel fundamental en la prevención y tratamiento de los trastornos asociados con la obesidad, ya que es responsable de descomponer una parte importante de las grasas de la dieta. Se han estudiado inhibidores específicos de la LP con el objetivo de reducir la absorción de lípidos y promover la pérdida de peso, logrando aproximadamente un 10% en un plazo de 2 años (Bonesi et al. 2018; Clavijo, Celis, and Gama 2019; Tundis, Loizzo, and Menichini 2010).

Para prescribir la farmacoterapia en pacientes con obesidad, es considerar esencial ciertos criterios de índice de masa corporal (IMC), siendo necesario un IMC mayor a 30 kg/m² (o en casos específicos, superior a 27 kg/m²), además de tener una condición de obesidad relacionada con morbilidad. Uno de los fármacos más utilizados y avanzados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) para el tratamiento de la obesidad es el orlistat, un potencial inhibidor de la LP producido naturalmente a partir de *Streptomyces toxytricini*. Sin embargo, su uso está asociado con efectos secundarios como dolor abdominal, distensión abdominal, complicaciones gastrointestinales, flatulencia y diarrea, así como dispepsia y daño hepático (Clavijo, Celis, and Gama 2019).

1.2.3.1. Bioensayos *in vitro* para detección y cuantificación de la lipasa pancreática (LP).

Se han empleado diversos métodos de ensayo para seleccionar inhibidores de la lipasa pancreática. El método más común se utiliza ésteres de *p*-nitrofenilo unidos a ácidos orgánicos como sustrato, permitiendo medir la actividad enzimática directa y continua la actividad de la enzima (Vo et al. 2022). Durante el ensayo, se utilizan ésteres de *p*-nitrofenilo (butirato, laurato, palmitato, fosfato, etc.) como sustrato, generando *p*-nitrofenol e ion *p*-nitrofenolato de color amarillo en medio alcalino, medible por espectrofotometría UV-Vis a 405-410 nm ver **Figura-12** (Bandara, Devereaux, and Weerasooriya 2023).

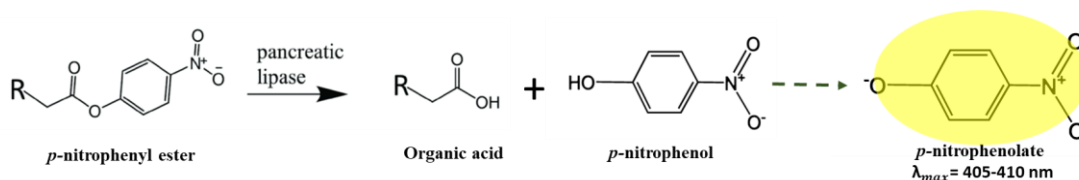


Figura-12 Reacción enzimática de la enzima la LP La figura fue creada utilizando el software ChemDraw Professional.

Otro método emplea el éster oleato de 4-metilumbeliferona como sustrato para evaluar la actividad de la lipasa mediante fluorimetría. En este método, se produce 4-metilumbeliferona, cuantificada por espectrofotometría UV-Vis a 455-465 nm. Además, se ha reportado el uso 1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-glutárico-(6'-metilresorufina)-éster (DGGMR) reportado como sustrato, generando un compuesto inestable en presencia de la lipasa que se descompone en ácido glutárico y metilresorufina, con color púrpura azulado medible a 580 nm (Jiao et al. 2014).

El kit de ensayo Lipase PST™ es otra opción para evaluar la inhibición de la Lipasa por extractos de plantas. Este método mide la formación de un colorante de quinona diamina que absorbe a 550 nm. En este método basado en la titulación, se hace reaccionar una emulsión de sustrato homogeneizado con goma arábiga y aceite de oliva con la enzima; luego, se detiene la reacción y se cuantifica los ácidos grasos liberados mediante titulación con NaOH 0,02M en condiciones básicas (Ekanem et al. 2007).

Cabe resaltar en estos ensayos enzimáticos, es importante considerar la posibilidad que se presenten problemas derivados de la interferencia del color en las muestras de estudio. Además, es necesario estar atento a la formación de precipitados debido a los buffers específicos utilizados en cada ensayo, así como a la presencia de sustratos que pueden resultar inestables.

1.3. Importancia de las plantas para el control inhibitorio sobre enzimas digestivas

La amplia diversidad de sustancias naturales aún sin explorar ofrece una posibilidad de cambio al tratamiento de enfermedades como la DM2 y la OB, que tradicionalmente han estado abastecidas por fármacos costosos, poco activos y con efectos secundarios no deseados (Elekofehinti, 2021). Como punto de partida, la medicina tradicional o conocimiento etnofarmacológico a permitido el descubrimiento de nuevas fuentes naturales de moléculas bioactivas con propiedades antidiabéticas y antiobesidad (Malviya, et al ,2018; Ghani, 2019). Así, el conocimiento desarrollado a través del tiempo por la medicina tradicional le ha dado a la humanidad la posibilidad de conocer y aprovechar las propiedades medicinales de muchas especies vegetales. La apropiación de la medicina tradicional a base de hierbas se ha extendido tanto en países en desarrollo como en naciones industrializadas, presentándose como una vía complementaria para abordar y prevenir diversas enfermedades (Qin et al. 2022).

La importancia de los productos naturales en el tratamiento de la diabetes y OB está sólidamente documentada, mostrando además una ventaja en términos de costos en comparación con los agentes hipoglucémicos sintéticos (Shaik Mohamed Sayed et al. 2023). Muchos de estos compuestos provienen de fuentes vegetales, como flavonoides, compuestos fenólicos, taninos condensados, taninos hidrolizables, terpenos y derivados del ácido cinámico, así como también de microorganismos, como es el caso de la acarbosa, miglitol y voglibosa. La metformina, aislada de la especie *Galega officinalis*, forma parte de los medicamentos disponibles en el mercado que mejoran la sensibilidad a la insulina para el manejo de la diabetes mellitus (Oliveira, et, al. 2022).

El papel de los productos naturales como inhibidores de las enzimas digestivas AG, AA y LP ha sido destacado a lo largo de la historia, con plantas medicinales y preparaciones tradicionales utilizadas para tratar diversas enfermedades, incluida la obesidad y DM2. A continuación se resaltan algunos antecedentes sobre las enzimas AG, AA y LP.

En estudios documentados acerca de especies con actividad inhibitoria sobre la enzima AG, se ha observado que las especies *Momordica charantia* L. (Nkambo, et, al, 2013), de la familia Cucurbitaceae, ha sido utilizado en la medicina tradicional para tratar la diabetes mellitus y otros síndromes metabólicos. El extracto MeOH de *M. charantia* muestra una potente actividad de inhibición de la AG de $72,30 \pm 0,30$ %, mejorando los niveles de glucosa en sangre en ayunas y la insulina en ratas diabéticas. Tal actividad podría deberse al alto contenido de flavonoides, alcaloides, polisacáridos, polipéptidos, glucósidos fenólicos y ácidos grasos que mejoran su eficacia farmacológica (Kashtoh and Baek 2022) Además, *Artemisia absinthium* de la familia Asteraceae (Bouyahya et al. 2021), ha sido utilizado en la medicina tradicional marroquí, empleado para la diabetes. El efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas. El extracto de AcOEt de *A. absinthium* muestran una mayor actividad de inhibición de la AG *in vitro* con un CI_{50} 0,155 mg/mL, en comparación con el extracto acuoso 0,170 mg/mL y el control con acarbosa con CI_{50} 0,148 mg/mL. Sin embargo, en condiciones *In vivo*, solo el extracto acuoso de *A. absinthium* las hojas muestran una actividad hipoglucemiante significativa, mientras que el extracto de AcOEt no muestra actividad. Tal actividad podría deberse al alto contenido de polifenoles en el extracto de *A. absinthium* (Kashtoh and Baek 2022).

Los Extractos de *Chrysophyllum cainito* y *Ensete superbum* (Doan et al. 2018; Habtemariam and Varghese 2017) mostraron una actividad inhibidora notable, con compuestos valiosos como proantocianidina, ácido gálico, rutina, quercetrina, β -amirina y lupeol. *Chrysophyllum cainito* redujo el azúcar en sangre en ratas diabéticas sin efectos adversos en el peso, mientras que *Ensete superbum* fue seguro en dosis de 2000 mg/kg. (Arrijal, Ma'arif, and Suryadinata 2018; Shailajan and Gurjar 2014) El extracto etanólico (EE) de *Adenosma bracteosum* mostró una actividad inhibidora superior a la acarbosa CI_{50} 0,027 mg/mL y 0,043 mg/mL. Se identificó isoscutellareína-8-o- β -D-glucopiranosido en el EE, con una actividad diez veces mayor que la acarbosa. Además, el extracto de éter de petróleo de *Hertia cheirifolia* mostró una actividad inhibitoria más potente que los extractos de AcOEt y butanol (Abuelizz et al. 2019). La sustancia aislada, nopol, también exhibió una actividad inhibidora superior al control (Modak et al. 2007).

Los compuestos de cianidina y sus derivados, extraídos del fruto de *Cinnamomum camphora* (Kashtoh and Baek 2022). Presentan una capacidad inhibitoria sobre la AG, con un valor CI_{50} de 5,29 mM, en contraste con el control de acarbosa que registra un CI_{50} de 1,64 mM. Además, el análisis cinético reveló que la cianidina compite con el sustrato de la α -glucosidasa por la unión a la región activa del receptor (Kim et al. 2020).

La α -amilasa ha sido ampliamente estudiada como diana farmacológica para prevenir la hiperglucemia posprandial en diabetes y otras enfermedades. Estudios etnobotánicos han identificado más de 1200 especies de plantas con actividad hipoglucemiante. Entre ellas, los extractos de *Artocarpus altilis*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Piper betel* y *Artocarpus heterophyllus* mostraron una inhibición del 50% en la AA a concentraciones de CI_{50} 130,55 $\mu\text{g/mL}$, 118,88 $\mu\text{g/mL}$, 84,63 $\mu\text{g/mL}$ y 70,58 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Mahomoodally et al. 2012; Lunagariya et al. 2014; Meng et al. 2016) Asimismo, el extracto de metanol de *B. orellana* mostró una inhibición con CI_{50} de 49 $\mu\text{g/mL}$, mientras que *C. verum* presentó un valor de CI_{50} de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (Batista et al. 2022; Maridass 2008).

El extracto EtOH de *Andrographis paniculata*, junto con su constituyente mayoritario, el andrografólido, han demostrado un potencial inhibitorio *in vitro* sobre las enzimas AG y AA, así como *in vivo* en ratas diabéticas. El extracto inhibió la actividad catalítica de la enzima AG con un CI_{50} de 17,2 mg/ml, y una actividad débil sobre la enzima AA con un valor CI_{50} de 50,9 mg/ml. Por su parte, el andrografólido mostró una inhibición similar en ambas enzimas, con valores de CI_{50} de 11,0 mg/ml y 11,3 mg/ml respectivamente. En estudios realizados en ratas diabéticas, tanto el extracto como el andrografólido redujeron significativamente los picos de glucosa en sangre y el área bajo la curva después de la administración oral de almidón y sacarosa (Kashtoh and Baek 2022).

Los estudios etnobotánicos han revelado que los extractos EtOH de las especies *Momordica charantia* L. y *Psoralea corylifolia* L. presentan un potencial inhibitorio sobre la LP, con valores de CI_{50} de 96,85 $\mu\text{g/ml}$ y 27,70 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Este efecto podría atribuirse a los niveles significativos de compuestos de tipo fenólicos y flavonoides presentes en ambas especies de 8.96-15.95 mg y 82,55-92.55 mg respectivamente. (Karale, et al., 2022).

Además, se han identificado otras especies, como *Amaranthus albus* L., *Helichrysum compactum* Boiss., *Chenopodium album* L. y *Agrimonia eupatoria* L. potenciales inhibidores de la LP. Todos los extractos presentaron actividad inhibidora de lipasa *in vitro*, siendo *Helichrysum compactum* el más potente CI_{50} : 45,70 μ g/mL. Los análisis HPLC revelaron la presencia de ácido *p*-cumárico 0,27 mg/g en *A. albus*, ácido benzoico 0,33 mg/g en *C. album*, y en *H. compactum*, ácido vanílico 7,32 mg/g, siringaldehído 14,97 mg/g, quercetina 4,66 mg/g, ácido *p*-cumárico 0,71 mg/g y ácido benzoico 3,43 mg/g. En *A. eupatoria* se destacan el ácido *p*-cumárico 0.71 mg/g y ácido benzoico 3.43 mg/g. (Şener et al. 2022).

1.4. Generalidades de la especie *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cas.

La especie *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cas, perteneciente a la familia Asteraceae (Tapia, 2004), muestra una amplia distribución en América Latina, desde México hasta Argentina, e incluyendo países como Bolivia, Colombia, Perú, Venezuela y las Guyanas (Anon, 2022). En Colombia, se ha registrado su presencia en varios departamentos que abarcan Amazonas, Antioquia, Bolívar, Boyacá, Caldas, Caquetá, Cauca, Chocó, Guaviare, La Guajira, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander, Putumayo, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima y Valle del Cauca (Chinchilla-Carmona et al. 2011; François et al. 2004; M. Gupta, Santana, and Espinosa 1905). En la **Figura-13** se ilustra la distribución geográfica de esta especie a nivel mundial y en Colombia. A la especie *N. lobata* se le han atribuido diversos nombres populares a lo largo de América Latina. En **Colombia**, se la conoce como capitana, contragavilana, gavilana, inaciabi, indio viejo, mano del lagarto, mano de tigre y venadillo (Anon, 2022). En **México** y **Panamá**, se le identifica como salvia gavilana, gavilana, varejón blanco, mano de tigre, capitana, mano de lagarto, tres puntas e inaciabi, En **Ecuador**, los nombres incluyen por sus comunidades indígenas Na kantsa, Wa kantsa (tsafi'ki), O'tsi seje'pa, De'a ico (Pai coca), Amargón, Capitana, Gavilana, Hierbita, Lagartijilla, Palo brujo, Samba y Tabaquillo. (Anon, 2022).

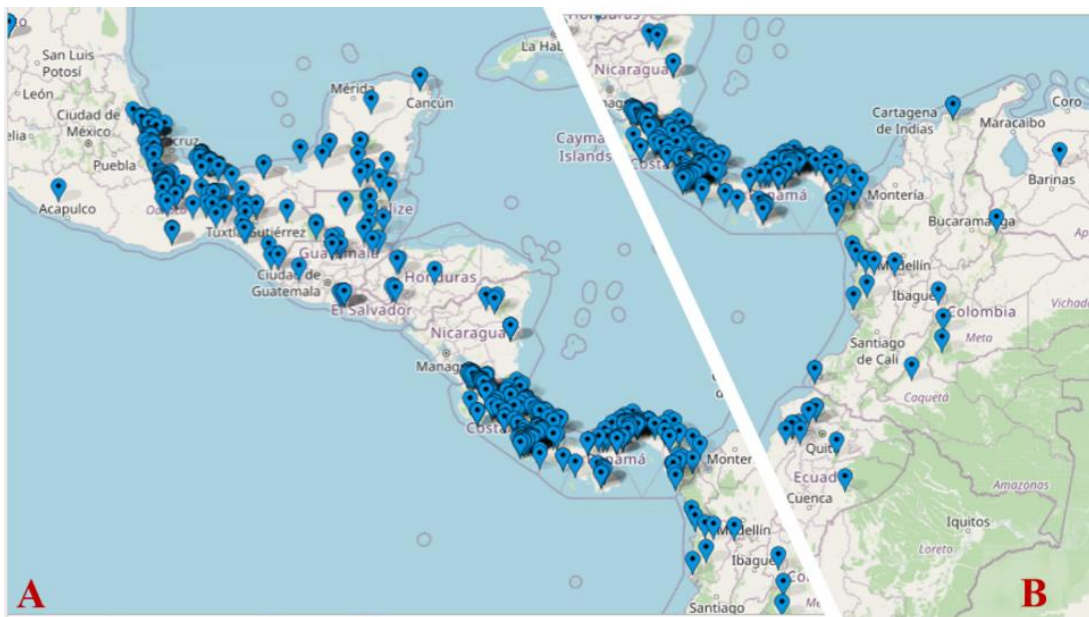


Figura-13 Distribución geográfica de *Neurolaena* en América latina (A) y Colombia (B) tomado de EOL-global.

1.5. Clasificación taxonómica y morfología de *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cas.

La clasificación taxonómica de esta especie indica que pertenece al reino Plantae, filo Tracheophyta, clase Magnoliopsida, orden Asterales, familia Asteraceae y al género *Neurolaena* (Anon, 2022). En la literatura científica *N. lobata* ha sido citada con varios sinónimos, tales como: *Calea lobata* (L.) Sw.; *Calea suriani* Cass.; *Conyza lobata* L.; *Conyza symphytifolia* Mill.; *Critonia chrysocephalum* (Klatt) RM King. & H.Rob.; *Eupatorium chrysocephalum* Klatt; *Eupatorium valverdeanum* Clatt; *Neurolaena fulva* BL Turner; *Neurolaena integrifolia* Cass.; *Neurolaena lobata* var. Indicar Donn. SM.; *Neurolaena suriani* (Cass.) Cass; *Pluchea symphytifolia* (Mill.) Gillis. Estos sinónimos reflejan las variaciones y evolución en la nomenclatura a lo largo del tiempo y en diferentes estudios taxonómicos. (Balslev et al. 2008; Farias et al., 2018.; Macbride and Weberbauer 1936; Anon 2022).

N. lobata se presenta como una hierba perenne robusta, anual o de vida corta, que puede alcanzar alturas de 0,5 a 4,0 metros. Sus tallos son muy ramificados y oscilan entre 0,5 y 4

metros de longitud. Sus hojas son alternas, casi sésiles, trilobuladas, con dos lóbulos laterales más cortos que el lóbulo central. La superficie superior de las hojas es áspera, mientras que el envés es piloso. Las florecitas amarillas se presentan en cabezuelas y tienen una corola de 4-5 mm de largo. El tubo de la corola puede alcanzar hasta 23 mm de longitud, y la garganta de la corola se ensancha y adquiere una forma subcilíndrica (cilíndrica con lados ligeramente curvados). Los frutos son aquenios de color negro con numerosas cerdas blanco-amarillentas. Los aquenios son glabros y presentan un vilano con aristas blancas densas (**Figura-14**) (Blair and Madrigal Calle 2005).

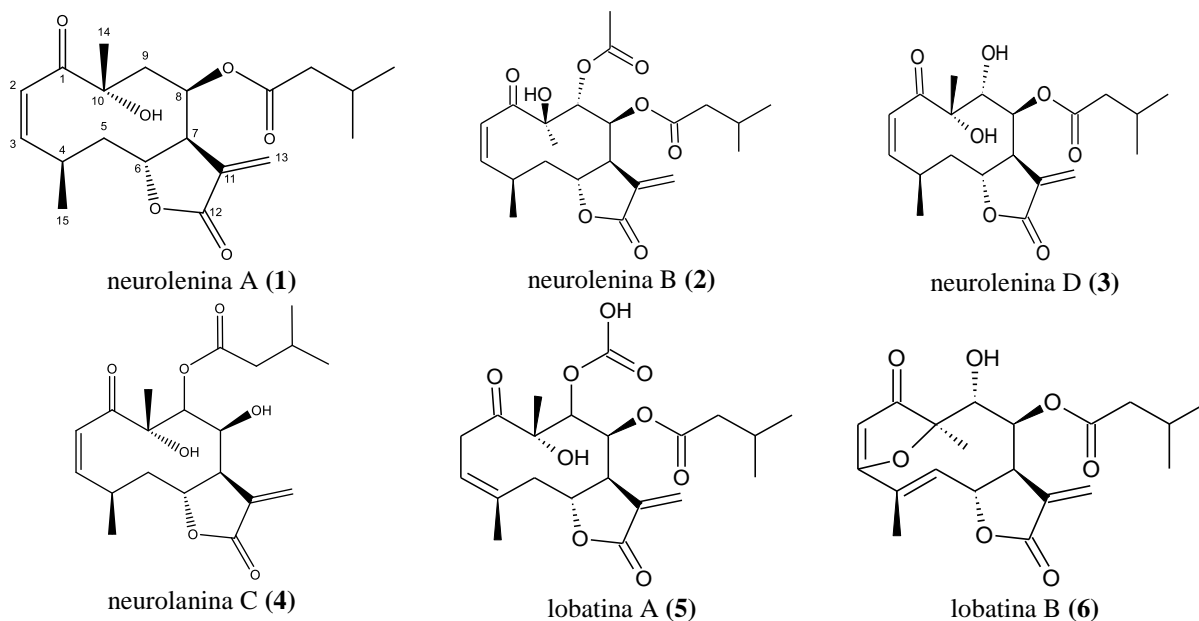


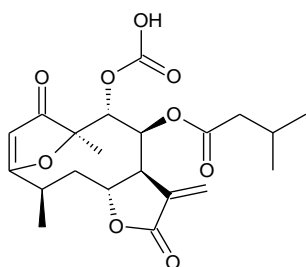
Figura- 14 Características de hojas y flores de la especie *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cas.

1.6. Estudios fitoquímicos de la especie *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cas.

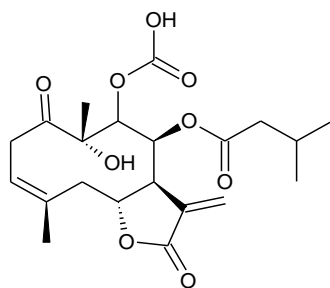
La composición química de la especie *N. lobata* ha sido ampliamente documentada, principalmente en órganos superiores. En estos órganos se han identificado diversos compuestos, entre los que destacan las sesquiterpenlactonas (SLs) como neurolenina A (**1**),

neurolenina B (**2**), neurolenina D (**3**), neurolanina C (**4**), lobatina A (**5**), lobatina B (**6**), 8 β -isovaleroyloxy-9 α -acetoxi-calyculatolide (**7**), lobatina D (**8**), lobatina E (**9**), neurolobatina B (**10**), neurolobatina A (**11**), 3 β -acetoxi-8 β -isovaleroiloxirrenosina (**12**), lobatin A (**13**), lobatina E (**14**), 5 β -hidroxi-8 β -isovaleroiloxi-9 α -hidroxicaliculatolida (**15**), lobatolide H (**16**), 8 β -hidroxi-9 α -isovaleroiloxicaliculatolida (**17**), lobatolide A (**18**), 3-epi-desacetilisovaleroilheliangina (**19**), lobatina C (**20**), lobatolide C (**21**) y lobatolide D (**22**). También se han identificado flavonoides como la quercetina (**23**), metil-quercetina (**24**), 6-hidroxi-3-metiléter-7-o- β -d-glucósidokaempferol (**25**), 6-metoxikaempferol (**26**), 5-metoxikaempferol (**27**), 3-metiléter-7-o- β -d-glucósido quercetagina (**28**), Asimismo, se han encontrado alcaloides del tipo pirrolizidina, incluyendo 2-hidroxi-2-metilhexahidro-1H-pirrolizina-1-carboxilato de metilo (**29**) y Ácido 2-hidroxi-2-metilhexahidro-1H-pirrolizina-1-carboxílico (**30**) La **Figura-15** relaciona algunos de estos compuestos previamente documentados. (Lajter et al. 2014; Kovács et al. 2023).

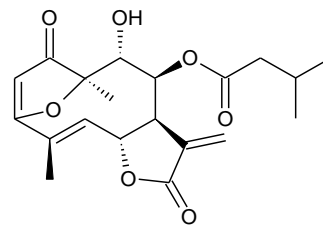




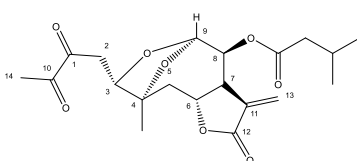
8 β -isovaleroyloxy-9 α -acetoxycalicutolide (**7**)



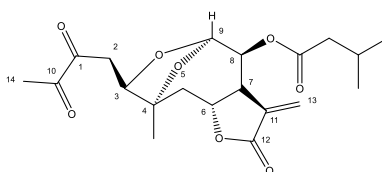
lobatina D (**8**)



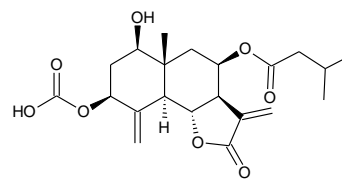
lobatina E (**9**)



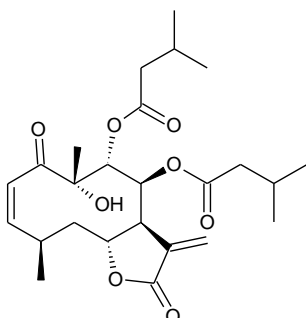
neurolobatina B (**10**)



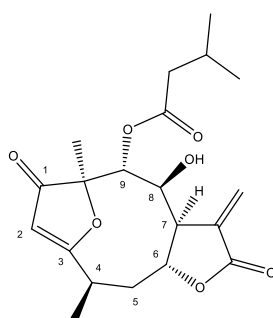
neurolobatina A (**11**)



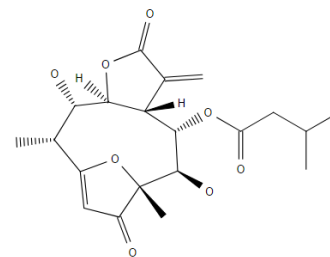
3 β -acetoxi-8 β -isovaleroiloxirrenosina (**12**)



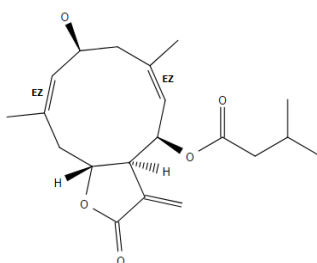
Lobatin A (**13**)



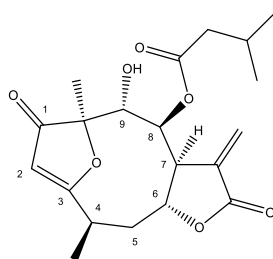
lobatin E (**14**)



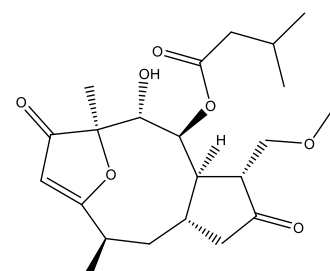
5 β -hidroxi-8 β -isovaleroiloxi-9 α -hidroxicaliculatolida (**15**)



lobatolide H (**16**)



8 β -hidroxi-9 α -isovaleroiloxicalicutolida (**17**)



lobatolide A (**18**)

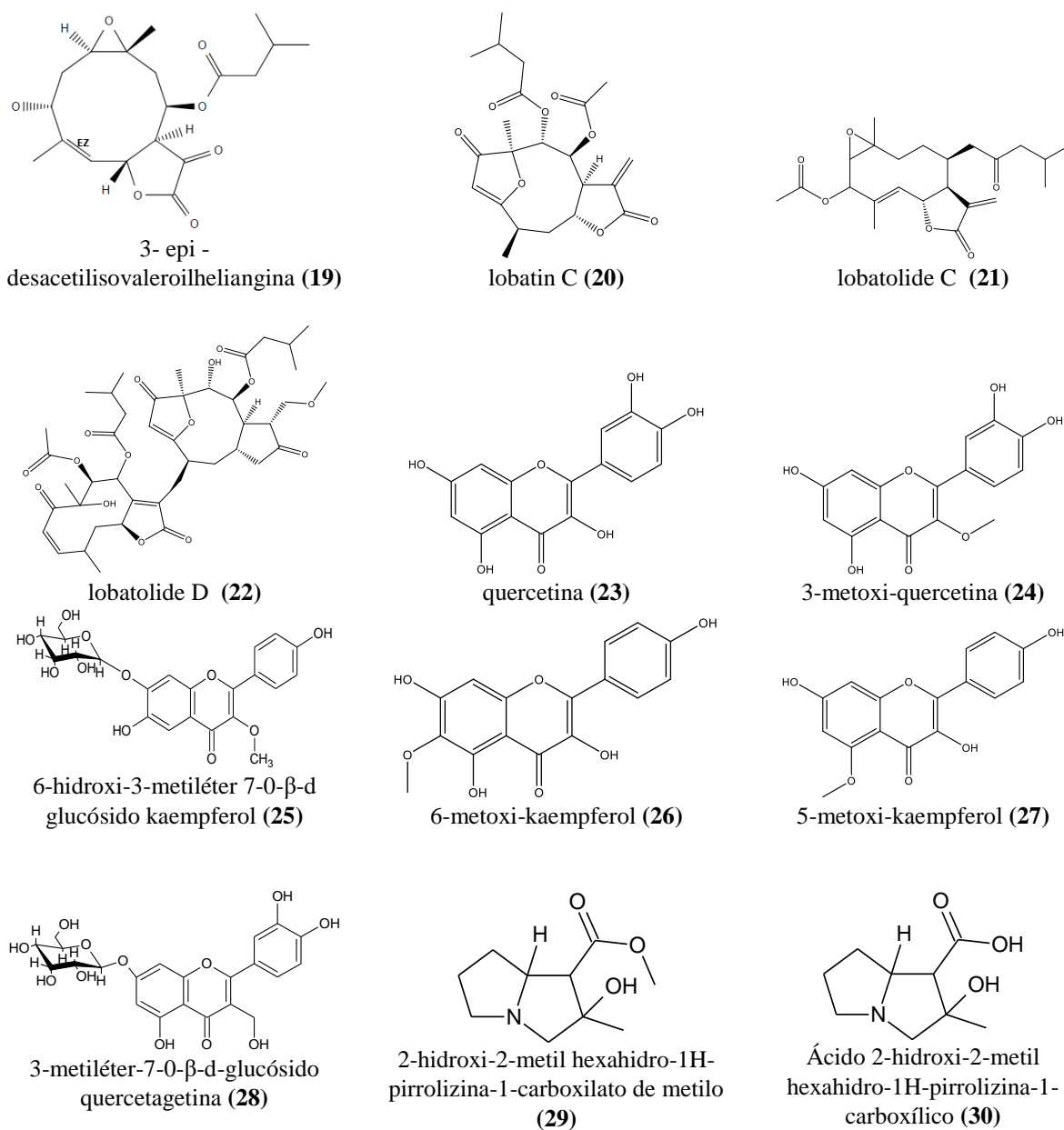


Figura-15 Metabolitos representativos de la especie *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cas.

1.7. Usos etnobotánicos de *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cas.

En diferentes países de Latinoamérica *N. lobata* ha sido utilizada por sus propiedades medicinales en diversas preparaciones para tratar una variedad de afecciones, desde dolores estomacales hasta enfermedades más específicas como la malaria, hipoglucemia y diabetes. Estos usos tradicionales han contribuido a su relevancia en la medicina popular en las culturas locales. En la **Tabla 1** proporciona una recopilación de usos tradicionales de *N. lobata* en diferentes regiones, junto con los órganos utilizados, los usos dados, las formas de preparación y las referencias bibliográficas que respaldan estos usos.

Tabla 1 Usos medicinales predominantes de *N. lobata* en diversos países de América Latina.

| Lugar de uso | órgano | Uso dado | Forma de preparación | Bibliografía |
|---|---------------|--|---|--|
| Colombia (Llanos orientales) | Hojas | Como cataplasma para tratar la mordedura de serpientes | maceración | (Anon, 2022) (Paniagua-Zambrana et al. 2020) |
| Colombia (Llanos orientales y pacífico) | Hojas y tallo | El dolor de cabeza, y para sanar úlceras y heridas. | La decocción o maceración se usa para bebidas | (Blair and Madrigal Calle 2005) |
| Colombia (pacífico) | Hojas | Se emplea para tratar afecciones hepáticas; sirve como diurético y coadyuvante en el tratamiento de cáncer, malaria y diabetes . | La decocción | (Blair and Madrigal Calle 2005) |
| Colombia (Amazonas) | Hojas | Recomienda como aperitiva, carminativa, hipotensora y tónica. | La infusión | (Blair and Madrigal Calle 2005) |
| Guatemala | Hojas | Se utiliza para la malaria, dolores estomacales, diabetes , amibiasis, para tratar enfermedades de la piel, contra enfermedades nerviosas, anemia, hipotensión e hipoglucemiante . | Decocción e infusión | (Navarrete et al. 2008) |
| Honduras | Hojas | Para dolores estomacales, úlceras e infecciones | Decocción infusión y maceración | (Cáceres et al. 1998) |
| México | Hojas | Como remedio para la malaria, resfriados y fiebre. | Decocción e infusión | (Andrade-Cetto et al. 2019a) |
| Panamá | Hojas | Para tratar diabetes , hipertensión, dolores hepáticos, malaria y como repelente de insectos | Decocción e infusión | (M. P. Gupta et al. 1984a; Turner 1982) |
| Venezuela | | Como remedio para tratar la malaria | Infusión | (Kerr, Mabry, and Yoser 1981) |

De acuerdo en los datos recopilados de los usos tradicionales de *N. lobata* presentes en la **Tabla 1**, se resalta su valioso aporte etnomedicinal en el tratamiento de la diabetes y la obesidad en diversas comunidades de Guatemala, Panamá y Colombia (Waldemar López, et al. 2022). Los recursos etnomedicinales varían en función de la dosis de decocción de hojas de *N. lobata* utilizada en el tratamiento de la diabetes. En Guatemala, donde la DM2 representa aproximadamente un tercio de las causas de mortalidad en el país, las poblaciones indígenas, específicamente los cakchiqueles de Guatemala (Allen et al. 2023), han empleado las hojas de *N. lobata* como terapia hipoglucemiante (Cruz and Andrade-Cetto 2015). Se ha observado que se consume alrededor de 2-3 gramos de material vegetal, principalmente hojas secas o frescas, preparadas en forma de infusión (Lee and Lee 2021). Esta infusión se consume en un promedio de 600 mL diarios (Waldemar López et al., 2022). En Colombia y Panamá, se ha informado de un rango de dosis que va desde 3 vasos diarios durante 4 días hasta 1 vaso diario antes del desayuno durante 7 días, Estos métodos de preparación incluyen tanto la decocción como la infusión de hojas, ya sean secas o frescas. (G. and Serrano 1995; Lévuok 2016). Cabe resaltar que en Colombia, especialmente en la región del Pacífico, se utiliza la especie *N. lobata* como planta medicinal y hasta la fecha no se ha documentado su uso en otras regiones del país.

1.8. Estudios de actividad biológica de *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cas.

La especie *Neurolaena lobata* ha sido objeto de investigaciones en relación con diversas actividades biológicas, explorando tanto extractos, fracciones como metabolitos aislados. Se han identificado posibles efectos que abarcan actividades antiinflamatorias, antibacterianas, antimicrobianas, antimaláricas y antiproliferativas (Gracioso, et al., 2000). La **Tabla 2** presenta información detallada sobre varios estudios en los que se ha evaluado el impacto de diferentes extractos y fracciones de *N. lobata* en una variedad de actividades biológicas, utilizando distintos modelos experimentales.

Tabla 2 Estudios biológicos reportados sobre los extractos y fracciones de la especie *N. lobata*.

| Tipo de muestra | Modelo utilizado | Dosis | Resultados | Bibliografía |
|--|--|-------------------------------------|---|------------------------------|
| Extracto de EtOH al 70% de hojas frescas y secas. | <i>In vitro</i> Antimalaria Líneas celulares Jurkat, Clon E6-1 | 5-100 μ g/mL | Hojas frescas CI_{50} 4.3 μ g/mL Hojas secas CI_{50} 4.1 μ g/mL | (François et al. 2004) |
| Extracto MeOH hojas y fracción CH_2Cl_2 | <i>In vitro</i> Antimalaria sobre la cepa <i>P. Falciparum</i> NF54 | 250 mg/mL | extracto MeOH CI_{50} 8,6 μ g/mL, fracción CH_2Cl_2 CI_{50} 10,6 μ g /mL | (Thesis and Lajter 2015) |
| Extracto de MeOH de hojas secas | <i>In vitro</i> Antiinflamatoria sobre los receptores TNF- α y THP-1 | 100 μ g/mL | TNF- α reducción del 80 % THP-1 reducción del 72 % | (Walshe-Roussel et al. 2013) |
| Extracto de MeOH de hojas secas | <i>in vivo</i> ratones hipoglucémicos | 250 mg/kg | 500 mg/kg | (M. P. Gupta et al. 1984b) |
| Extracto EtOH al 50 % de hojas secas | <i>in vitro</i> Inhibición de veneno de <i>B.asper</i> sobre la enzima PLA ₂ | Veneno extracto (p:p) de 1:25-1:400 | PLA ₂ CE_{50} 32.5 μ g/mL | (Saravia-Otten et al. 2021) |
| Extracto EtOH-H ₂ O 1:1 hojas secas | <i>In vivo</i> ratones Wistar hiperglucemia | 57 mg/kg | 153 mg/dl | (Andrade-Cetto et al. 2019) |
| Extracto acuoso hojas secas | <i>In vivo</i> En ratones Wistar hiperglucemia | 40 mg/kg | 139 mg/dl | (Andrade-Cetto et al. 2019) |
| Extracto EtOH-H ₂ O 1:1 hojas secas | <i>In vitro</i> Saccharomyces cerevisiae | 0,2 μ g/mL y 20 000 μ g/mL | CI_{50} 886 μ g/mL | (Andrade-Cetto et al. 2019) |
| Extracto EtOH al 80% de hojas | <i>In vitro</i> Antiinflamatoria Sobre los receptores TNF- α THP-1 | 100 μ g/mL | Extracto TNF- α 85% THP-1 72 % | (Vasas et al. 2021) |
| Fracciones de hojas secas Hexano, DCM, AcOEt y Acetona | <i>In vitro</i> Inhibición de veneno de serpiente Bothrops asper | 5-10% v/v | Hexano ---- DCM 16,4 % AcOEt 19,3 % Acetona 41,2 % | (Saravia-Otten et al. 2022) |

Basándonos en los datos biológicos recopilados de los estudios sobre *N. lobata*, detallados en la **Tabla 2**, se resalta las investigaciones llevadas a cabo por los investigadores Gupta y Andrade-Cetto por las contribuciones del efecto hipoglucemiante de la especie *N. lobata*. Gupta y colaboradores llevaron a cabo un estudio *in vivo* en ratones hiperglucémicos, emplearon el extracto MeOH de hojas secas de *N. lobata* a una dosis de 250 mg/kg. Los resultados indicaron un efecto hipoglucemiante a 500 mg/kg (Gupta *et al.*, 1984). Por su

parte, Andrade-Cetto en el 2019 reportó la actividad extractos acuosos y EtOH-H₂O 1:1 de hojas secas en ratones Wistar hiperglucémicos. Los resultados mostraron reducciones en los niveles de glucosa en sangre, indicando un posible efecto hipoglucemiante. También realizó estudios *in vitro* utilizando extracto EtOH-H₂O 1:1 en el modelo *S. cerevisiae*. Observaron una CI₅₀ de 886 µg/mL (Andrade-Cetto *et al.*, 2019).

Por otro lado, se ha documentado la actividad biológica de los compuestos químicos aislados de *N. lobata*, abarcando una amplia variedad de actividades que incluyen propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antimicrobianas, antimaláricas, antiproliferativas y anticancerígenas, entre otras (Dieseldorff 2007). Estas actividades han sido investigadas en diversos modelos de estudio tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha reportado de actividades específicas relacionadas con la diabetes, como la inhibición de enzimas digestivas (Velez et al. 2022). La **Tabla 3** proporciona información detallada sobre varios estudios en los que se ha evaluado los compuestos químicos de *N. lobata* en diversas actividades biológicas.

Tabla 3 Estudios biológicos sobre de los compuestos químicos identificados en la especie *N. lobata*.

| Tipo de muestra | Modelo utilizado | Dosis | Resultados | Bibliografía |
|--|--|----------------|---|------------------------------|
| NL-B Mezcla NL- C + D 2/3 lobatina B | <i>in vitro</i> Antiinflamatoria TNF- α THP-1 | 0.1-10 µM | TNF- α NLB, CI ₅₀ 2.32 µM NL- C + D CI ₅₀ 1.10 µM Lob-B CI ₅₀ 0,17µM THP-1 NLB, 11.2 µM NL- C + D 10.1 µM Lob-B 12.4 µM | (Walshe-Roussel et al. 2013) |
| Lobatolide H | <i>in vitro</i> Antiproliferativa, líneas celulares SiHa, C33A y HeLa | 10-40 µM | SiHa CI ₅₀ 2,82 µM C33A CI ₅₀ 4,43 µM HeLa CI ₅₀ 16,62 µM | (Kovács et al. 2023) |
| Neurolenina b NLB heterodímero (7) germacranolido (4) eudesmane (9) isodaucane (10) | <i>in vitro</i> Antiproliferativa Líneas celulares cancerígenas HeLa, C33A y SiHa. | 10,0 y 30,0 µM | NLB HeLa CI ₅₀ 1,24 µM, C33A CI ₅₀ 0,47 µM, SiHa. CI ₅₀ 1,33 µM (7) HeLa CI ₅₀ 91,87 µM C33A CI ₅₀ 94,66 µM SiHa CI ₅₀ 77,17 µM (4) HeLa CI ₅₀ 83,94 µM C33A CI ₅₀ 97,27 µM SiHa CI ₅₀ 79,77 µM | (Vasas et al. 2021) |

| | | (9) <20 μ M | (10) <20 μ M | |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------|---|---------------------------|
| Neurolenina A (Lob 1) | | | | |
| Neurolenina B (Lob 2) | In vitro Antiinflamatorio | | (Lob 1) 0.013 % | |
| Neurolenina C (Lob 3) | Línea células HUVEC/TERT 2 -CRL- | 100 ng/ml | (Lob 2) 0.124 % (Lob 3) 0.210 % (Lob 4) 0.169 % | (McKinnon et al. 2014) |
| Neurolenina D (Lob 4) | 4053 | | (Lob 5) 0.016 % | |
| Lobatina A (Lob 5) | | | | |

Basado en los datos recopilados de los estudios biológicos de los compuestos aislados de *N. lobata* presentes en la **Tabla 3**, se observa una presencia limitada de actividades biológicas vinculadas a la diabetes y la obesidad.

2. Metodología

2.1. Procedimientos generales

En el fraccionamiento del extracto etanólico se utilizó cromatografía líquida al vacío (CLV) empleando como fase estacionaria sílica gel 60 F₂₅₄ SiliaPlate™ de tamaño 5-20 µm (SiliCycle® Inc., Quebec, Canadá). Los aislamientos y purificaciones de los constituyentes químicos se realizaron mediante cromatografía flash (CF) utilizando como fase estacionaria sílica gel P₆₀ SiliaFlash® de tamaño 40-63 µm y/o 20-45 µm (SiliCycle® Inc., Quebec, Canadá). En algunos casos para las purificaciones se empleó cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP), en la que se usaron placas de sílica gel 60 F₂₅₄ de 1 mm de espesor SiliaPlate™ (SiliCycle® Inc., Quebec, Canadá). Los estudios cromatográficos y el monitoreo en el fraccionamiento y purificación, se realizaron por cromatografía en capa delgada (CCD) empleando cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ SiliaPlate™ (SiliCycle® Inc., Quebec, Canadá), utilizando como revelador luz UV (254 y 365 nm), vainillina al 0,1% en ácido sulfúrico al 5% y yodo. El análisis comparativo de las preparaciones tradicionales se realizó en un equipo de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés), conformado por un automuestreador (ATS 4), cámara de visualización y software VisionCATS (CAMAG®, Muttenz, Switzerland). Los disolventes utilizados para las separaciones cromatográficas fueron de grado técnico y destilados antes de su uso. Los disolventes utilizados para las separaciones cromatográficas fueron de grado técnico y destilados antes de su uso.

Los compuestos aislados fueron elucidados mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y por comparación con los datos reportados en la literatura. Los espectros de RMN (1D) uni y (2D) bidimensionales fueron adquiridos en un espectroscópicas avance AC-400 (Bruker®),

Leipzig, Germany), empleando solventes deuterados a una temperatura de 25 °C. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Los tipos de carbonos presentes en cada una de las moléculas elucidadas fueron obtenidos de los análisis de los experimentos APT.

Las enzimas empleadas para los estudios de inhibición enzimática fueron: lipasa pancreática tipo (LP) II derivada del páncreas porcino (100-500 U/mg proteína, Sigma-Aldrich, EC. 3.1.1.3); α -amilasa (AA) tipo VI-B derivada de páncreas porcino (≥ 10 unidades/mg sólido, L-SLBP4061V, Sigma-Aldrich, EC. 3.2.1.1) y α -glucosidasa (AG) tipo I derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (polvo liofilizado, ≥ 10 U/mg proteína, Sigma-Aldrich, EC. 3.2.1.20). Como sustratos se usaron los compuestos dodecanoato de 4-nitrofenilo (Sigma-Aldrich) para LP, 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltósido (Sigma-Aldrich) para AA, y p-nitrofenilo- α -D-glucopiranosido (Sigma-Aldrich) para AG. Los demás reactivos utilizados en los ensayos enzimáticos fueron de grado analítico, adquiridos comercialmente y usados sin tratamiento adicional. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) Utilizando el software Skanlt RE4.1.

Se emplearon líneas celulares humana (BHK-21) y animal (MRC-5) fueron adquiridas comercialmente por Lonza™, los medios de cultivo empleados fueron DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza™ BioWhittaker™) y EMEM (Medium EMEM Cell Culture Media, Lonza™ BioWhittaker™), estos medios de cultivos se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) con 2 mM de glutamina y un 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina, Lonza™ BioWhittaker™). Las células se mantuvieron en una atmosfera húmeda a 37°C con un 5% de CO₂, Además, los ensayos celulares se evaluaron mediante el método MTT ((bromuro de 3-(4,5-metil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) de Sigma-Aldrich). Los ensayos se llevaron a cabo en un lector de microplacas de la marca (BioRad).

2.2. Identificación de los compuestos bioactivos de *Neurolaena lobata* con capacidad inhibitoria sobre lipasa pancreática (LP), α -amilasa (AA) y/o α -glucosidasa (AG).

2.2.1. Material vegetal

Las hojas de *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cas (HUA 205424) fue colectada en los alrededores de la ciudad de Quibdó perteneciente al departamento de Chocó (Colombia). Un ejemplar del espécimen colectado reposa en el herbario de la Universidad de Antioquia. La colecta de esta especie está amparada bajo el marco de la amnistía establecido en el artículo 6° de la ley de 1955 de 2019.

2.2.2. Extracción y fraccionamiento realizado del extracto de hojas de *N. lobata*.

El material vegetal seco y molido de *N. lobata* (3150 g) se extrajo por maceración a temperatura ambiente con EtOH:H₂O 70:30, en el cual se realizaron cuatro extracciones con cambios de disolvente cada 2 días por dos semanas. El extracto fue concentrado a presión reducida y liofilizado para obtener el extracto hidroalcohólico seco (HA, 100 g). Una parte de este extracto (96 g) fue fraccionada por cromatografía líquida al vacío (CLV) utilizando solventes de diferente polaridad: diclorometano (DCM, 8.8 g), acetato de metilo (AcOMe, 42.2 g), isopropanol (*i*PrOH, 28.8 g) y mezcla etanol:agua 8.2 (EtOH:H₂O, 5.3 g). Las fracciones resultantes se sometieron a ensayos *in vitro* de inhibición de las enzimas LP, AA, y AG, En la **Figura-16** se ilustra el esquema general de extracción y fraccionamiento realizado sobre la especie *N. lobata*.

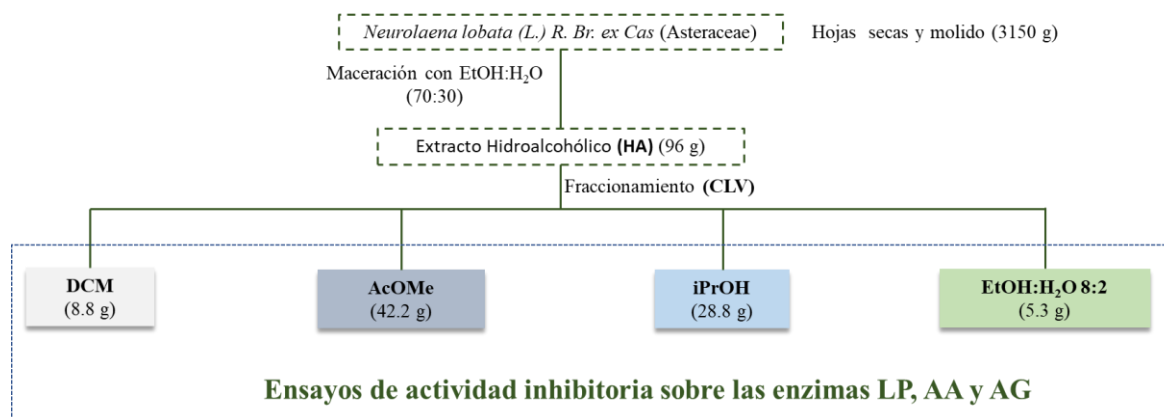


Figura-16 Esquema de extracción y fraccionamiento por CLV sobre las hojas de *N. lobata*.

2.2.3. Determinación de la actividad inhibitoria frente a LP, AA y AG del extracto y fracciones *N. lobata*.

Se determinó la actividad inhibitoria del extracto HA y las fracciones obtenidas mediante CLV frente las enzimas LP, AG y AA. Siguiendo las metodologías descritas en la literatura con algunas modificaciones (Ashok Kumar et al. 2012; Cardullo et al. 2021; Kaur et al. 2021; Vo et al. 2022). Las muestras fueron disueltas en DMSO y se evaluaron por triplicado en diferentes concentraciones para el extracto HA (1000 a 62.5 $\mu\text{g/mL}$) y las fracciones de CLV (500 a 6.25 $\mu\text{g/mL}$). En la **sección 2.4.2** se describen más detalles de la metodología empleada frente a cada una de las enzimas.

2.2.4. Purificación de las fracciones AcOMe y iPrOH provenientes de *N. lobata*.

La fracción de **AcOMe** (40.2 g) fue sometida a cromatografía flash (CF) utilizando como fase móvil en gradiente la mezcla de hexano:AcOEt (95:5 a 6:4), lo que condujo a la obtención de cuatro fracciones (Ac1-Ac4). La fracción Ac1 (11.0 g) fue purificada por sucesivas CF con hexano:AcOEt (6:4) y DCM:Acetona (99:1), seguido de cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) con sistema de elución tolueno:AcOEt (6:4), para así

aislar dos sólidos amorfos de color blanco correspondientes a **C1** (80 mg, p.f. 164-165 °C) y **C2** (50 mg, p.f. 123-124 °C). Las fracciones Ac2 y Ac3 se reunieron (10.5 g) y se sometieron a purificación por sucesivas CF con hexano:DCM:acetona (5:4.5:0.5), DCM:MeOH (9:1), CHCl₃:MeOH (9:1) y DCM:acetona (85:15), obteniéndose un sólido amarillo correspondiente a **C3** (21.5 mg, p.f. 206-208 °C). De la fracción Ac4 (13.32 g) fue purificado un sólido de color amarillo denominado **C4** (318.2 mg, p.f. 193-195 °C), mediante sucesivas CF con DCM:acetona (85:15 a 7:3) y CHCl₃:AcOEt:MeOH (95:5:5). La fracción iPrOH (28.8 g) se sometió a CF utilizando como sistema de elución en gradiente la mezcla DCM:MeOH (95:5 a 85:15), lo que condujo a la obtención de tres fracciones (iPr1-iPr3). De la fracción iPr1 (8.06 g) usando sucesivas CF con DCM:acetona (99:1) y CHCl₃:MeOH (9:1), permitió la obtención de un sólido amarillo correspondiente a **C5** (7.8 mg, p.f. 179-181°C). Las fracciones iPr2 y iPr3 se reunieron (14.5 g) y se sometieron a purificación mediante CF con CHCl₃:MeOH (9:1), para de esta manera obtener un sólido amarillo denominado **C6** (22.6 mg, p.f. 108-110 °C). En el **Figura-17** se ilustra el proceso de aislamiento y purificación. Los compuestos aislados fueron identificados mediante el uso de técnicas de RMN y por comparación con datos reportados en la literatura (**Anexo 1, Tablas A1 a A6 y Figuras- A1 a A6**).

2.2.5. Determinación de la inhibición de la actividad catalítica de los compuestos aislados sobre LP, AG y AA

Para determinar la inhibición de la actividad de los compuestos aislados de *N. lobata* sobre las enzimas LP, AG y AA, se implementaron las metodologías descritas en la sección **2.4.2**. Los compuestos aislados fueron evaluados a una concentración de 300 µM, y los compuestos que causaron una inhibición superior o igual al 50% en la máxima concentración evaluada, se les determinó la concentración inhibitoria media CI₅₀, en un rango de (300 a 9.37 µM). Todos los ensayos se analizaron por triplicado en tres ensayos independientes.

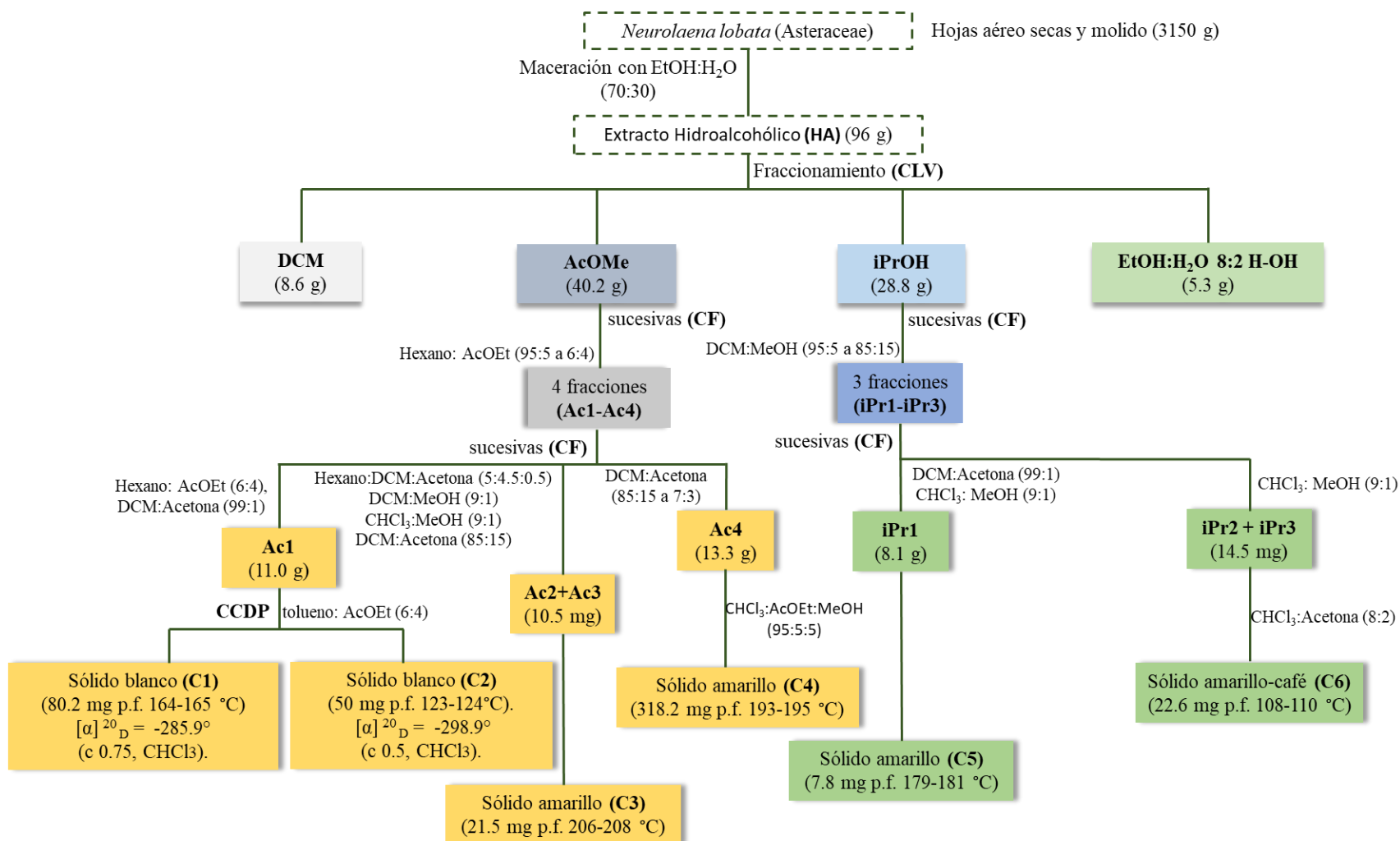


Figura- 17 Esquema de extracción y fraccionamiento por CLV sobre las hojas de *N. lobata* (Asteraceae).

2.2.6. Determinación de la actividad citotóxica

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita en la literatura descrita por (Mendez-Callejas et al. 2023) con algunas modificaciones. Se emplearon líneas celulares de origen animal (BHK-21) y humana (MRC-5), obtenidas de riñón de hámster y tejido pulmonar respectivamente. Para cada línea celular, se mantuvo en su medio de cultivo apropiado, EMEM para BHK-21 y DMEM para MRC-5. Inicialmente, las líneas celulares se sembraron a una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/pozo en placas de 96 pozos, con 100 μ L de medio suplementado al 10 % de FBS y al 1% con antibiótico penicilina/estreptomicina. Las células se incubaron a 37°C en un ambiente húmedo del 95% y CO₂ al 5 % durante 24 horas. Después de este periodo, se retiró el medio y se reemplazó con una mezcla fresca que contenía los tratamientos (extractos, fracciones o compuestos), en una proporción 1:10 en EtOH y medio de cultivo, respectivamente. Estos tratamientos se evaluaron a tres contracciones diferentes, basadas en sus valores de CI₅₀ previamente determinados en los ensayos enzimáticos (CI₅₀/10, CI₅₀ y 10xCI₅₀). Tras 24 horas, se retiró el medio y se agregaron 100 μ L de la solución de MTT, a una concentración de 0,5 mg/mL en buffer fosfato salino. Posteriormente, se incubaron por un periodo de 4 horas a 37°C con un ambiente húmedo al 95% con CO₂ al 5%. Finalmente se eliminó el sobrenadante, se agregaron 100 μ L de DMSO y los valores de absorbancia se midieron a 570 nm. Se empleó como control positivo taxol. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en dos ensayos independientes. Los porcentajes de % viabilidad fueron estimados a partir de las absorbancias medidas de acuerdo con la ecuación **Ec. 1** donde absorbancia vehículo es el promedio de la lectura del metabolismo de MTT en un grupo de tratamiento (n=4).

$$\text{Ec. 1 } \% \text{ viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia vehiculo}}{\text{Absorbancia control}} \times 100$$

2.2.7. Análisis estadístico.

Para el análisis detallado de los datos, se empleó el software estadístico GraphPad Prism 8. Todos los datos reportados representados es el promedio de tres repeticiones \pm SD, significancia estadística P <0.05.

2.3. Caracterización biológica y química de las preparaciones tradicionales más utilizadas de *Neurolaena lobata* para el tratamiento de diabetes y obesidad.

2.3.1. Material vegetal

Las hojas de *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cas (HUA 205424) fueron colectadas nuevamente en la ciudad de Quibdó-Chocó-Colombia. Un ejemplar del espécimen colectado reposa en el herbario de la Universidad de Antioquia. La colecta de esta especie está amparada bajo el marco de la amnistía establecido en el artículo 6° de la ley de 1955 de 2019.

2.3.2. Obtención de las preparaciones tradicionales

Se obtuvieron las preparaciones tradicionales (**PT**) en las que es consumida la *N. lobata* para el tratamiento de la OB y DM2 (Andrade-Cetto et al. 2019a; Blair and Madrigal Calle 2005) (Lévuok 2016). Se empleó material vegetal fresco y seco, se emplearon los métodos de decocción a 50°C (**PTD**) e infusión (**PTI**), y se empleó en todos los casos agua potable tratada envasada como solvente de extracción para obtener las preparaciones tradicionales. Para la preparación de los extractos por decocción se emplearon 10 g de material vegetal fresco o seco, se añadieron 250 mL de agua (equivalente a un vaso de 8oz) a 50°C y se mantuvo esta temperatura por 30 minutos, y posteriormente la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente. Para la preparación de los extractos por infusión, a 10g de hojas secas o frescas se añadieron 250 mL de agua hirviendo, permitiendo la extracción en diferentes intervalos de tiempo: 5, 10, 15 y 30 minutos. Cada una de las preparaciones tradicionales se preparó por triplicado. A los extractos obtenidos se les determinó su capacidad inhibitoria sobre las enzimas LP, AA y AG.

2.3.3. Determinación de la actividad inhibitoria frente a LP, AA y AG de las preparaciones tradicionales.

Para determinar la actividad inhibitoria de las preparaciones tradicionales (**PT**) sobre las enzimas LP, AG y AA, se implementaron nuevamente las metodologías descritas en la **sección 2.4.2**. Las **PT** fueron evaluadas a una concentración máxima de 1000 µg/mL. Posteriormente, los extractos que presentaron una inhibición superior al 50% en la máxima concentración evaluada, se les determinó la concentración inhibitoria media CI_{50} , en un rango de (1000 a 62.5 µg/mL). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado en tres ensayos independientes. Para el análisis detallado de los datos, se empleó el software estadístico GraphPad Prism 8. Los valores CI_{50} se estimaron mediante análisis de regresión no lineal. Se analizaron las diferencias estadísticamente significativas de las **PT**, empleando la prueba de análisis de varianza ANOVA para comparar las medias. Todos los datos reportados representan el promedio de tres repeticiones \pm SD, significancia estadística $P < 0.05$.

2.3.4. Análisis de la presencia de los compuestos bioactivos en las preparaciones tradicionales por HPTLC.

2.3.4.1. Preparación de las soluciones estándar

Se disolvió 1.0 mg de los compuestos activos **C1**, **C5** y **C6** aislados de *N lobata* en 1 mL de MeOH grado HPLC para obtener la solución estándar # 1 (1 mg/mL) y a partir de esta solución se preparó la solución estándar #2 a una concentración de 0.1 mg/mL. Cada solución se filtró a través de una membrana de polipropileno de 0,22 µm para su posterior análisis de HPTLC. Las soluciones se prepararon por triplicado.

2.3.4.2. Preparación de las muestras de las preparaciones tradicionales.

Las **PT** y el extracto hidroalcoholico (**HA**) se disolvieron en una proporción de 10 mg en 1 mL de MeOH grado HPLC, logrando una concentración de 10 mg/mL. Posteriormente, cada

solución de muestra fue sometida a filtración mediante un filtro de membrana de polipropileno de 0,22 μm para su posterior análisis de HPTLC. Las soluciones se prepararon por triplicado.

2.3.4.1. Elaboración de las curvas de calibración

La curva de calibración de los compuestos **C1**, **C5** y **C6** se preparó aplicando diferentes volúmenes de las soluciones estándar (1, 3, 5 y 8 μL de la solución #2 y 1, 2, 3, 4 y 5 μL de la solución #1) para obtener el rango de 100-5000 ng/banda. El gráfico de calibración se creó con el área del pico frente a la concentración a una longitud de onda de 254 nm. Con la ayuda de la ecuación de regresión polinomial grado 2 y el área de pico correspondiente a **C1**, **C5** y **C6** se estimó la cantidad de cada compuesto en las **PT** y el extractó **HA**.

2.3.4.2. Instrumentación y condiciones de HPTLC

Las muestras fueron analizadas en un sistema HPTLC (Camag, Muttanz, Suiza) equipado con un aplicador automático TLC Sampler 4 (ATS4) con una jeringa de 25 μL , una unidad de visualización TLC-3 y un escáner TCL-4, todo operado por medio del software visionCATS. La cromatografía se realizó en placas de TLC de 10 cm x 20 cm recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ SiliaPlate™ (SiliCycle® Inc, Canada). En cada placa fueron sembradas 15 muestras, aplicadas de acuerdo con las siguientes configuraciones que se mantuvieron constantes fueron en todos los análisis: ancho de banda de 7 mm; distancia entre bandas de 3 mm, distancia de 1.5 cm desde el borde lateral de la placa, distancia de 2 cm desde el borde inferior de la placa, distancia de revelado entre 7 y 8 cm. Los volúmenes de aplicación fueron de 10 μL para extractos y para los compuestos fueron los indicados en la sección 2.3.4.1 para la construcción de la curva de calibración en un rango entre 100-5000 ng/banda. Las fases de elución fueron hexano:AcOEt (6:4) para el compuesto **C1** y DCM:AcOEt:MeOH (85:10:5) para los compuestos **C5** y **C6**. Los resultados de la separación se adquirieron a 365 y 254 nm (lámpara de Hg) mediante un visualizador TLC-3. La evaluación cuantitativa de la placa se realizó en la región Ultravioleta (UV) usando un densitómetro en modo absorbancia-reflectiva a 254 nm mediante el escáner TLC-4, con una dimensión de ranura de 4.00 x 0.30 mm, con una velocidad de exploración (20 mm/s) y una

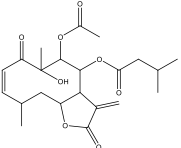
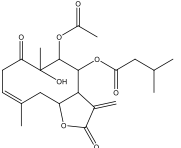
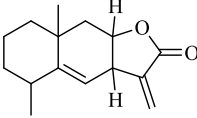
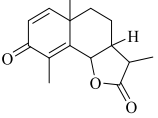
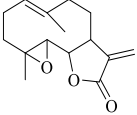
resolución de datos de 100 mm/paso. El pico de **C1**, **C5** y **C6** se detectó por comparación de su factor de retardo (Rf) con los del estándar, y la concentración se evaluó a partir de las curvas de calibración. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los valores se reportan como media \pm DS.

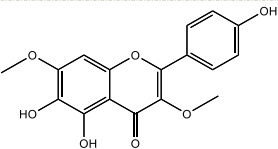
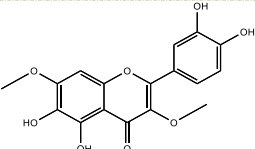
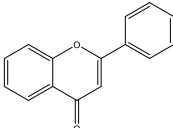
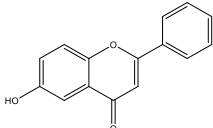
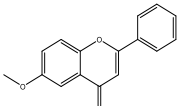
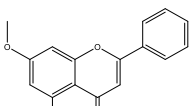
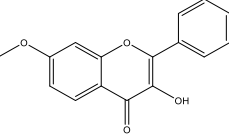
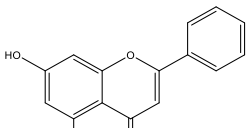
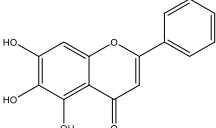
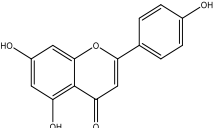
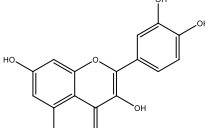
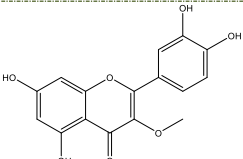
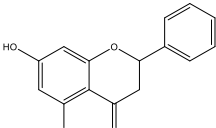
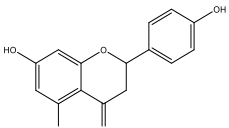
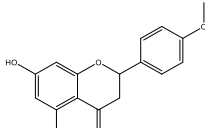
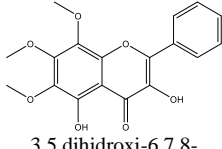
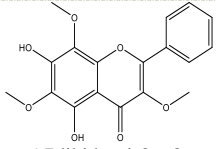
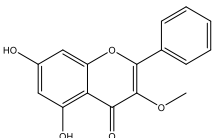
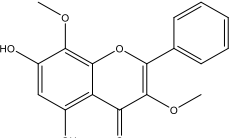
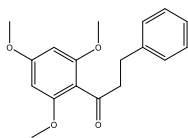
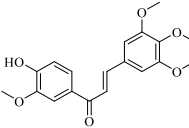
2.4. Determinación de los mecanismos de inhibición enzimática sobre LP, AA y AG de los compuestos bioactivos provenientes de *N. lobata* y compuestos relacionados.

2.4.1. Selección de los compuestos

Con el propósito de enriquecer la discusión sobre los compuestos aislados de la especie *N. lobata* con potencial inhibitorio sobre las enzimas LP y AG (**C1** y **C2** de tipo SLs y **C5** y **C6** del tipo flavonoide), así como establecer algunas relaciones estructura-actividad, se decidió incluir en esta investigación compuestos naturales de tipo SLs y flavonoide estructuralmente relacionados con los aislados, ya sea adquiridos comercialmente o previamente aislados e identificados por el equipo de investigación QuiProNaB. Los detalles de los flavonoides y SLs seleccionados se reportan en la **Tabla 4**.

Tabla 4 Compuestos naturales seleccionados y evaluados sobre las enzimas LP, AG y AA.

| Sesquiterpenlactonas (SLs) | | | |
|--|---|---|---|
|  <p>Neurolenina B (C1) Aislada de <i>N. lobata</i></p> |  <p>Lobatina A (C2) Aislada de <i>N. lobata</i></p> |  <p>Alantolactona (C7) Comercial Molport</p> |  <p>Santonin (C8) Comercial Molport</p> |
|  <p>Partenolida (C9) Comercial Molport</p> | | | |

| Flavonoides | | | |
|--|---|---|---|
|  <p>5,6,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol (C5) Aislada de <i>N. lobata</i></p> |  <p>5,6,3',4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol (C6) Aislada de <i>N. lobata</i></p> |  <p>Flavona (C10) Comercial sigma aldrich</p> |  <p>6-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona (C11) Comercial sigma aldrich</p> |
|  <p>6-metoxiflavona (C12) Comercial sigma aldrich</p> |  <p>5-hidroxi-7-metoxiflavona (C13) Comercial sigma aldrich</p> |  <p>3-hidroxi-7-metoxiflavona (C14) Comercial sigma aldrich</p> |  <p>Crisina (C15) Comercial sigma aldrich</p> |
|  <p>Baicaleín (C16) Comercial sigma aldrich</p> |  <p>Apirigina (C17) Comercial sigma aldrich</p> |  <p>Quercetina (C18) Comercial sigma aldrich</p> |  <p>3-O-metoxi-quercetina (C19) Aislada de <i>Gnaphalium gracile</i> H.B.K</p> |
|  <p>Pinocembrina (C20) Comercial sigma aldrich</p> |  <p>Naringenina (C21) Comercial sigma aldrich</p> |  <p>Ponciretina (C22) Comercial sigma aldrich</p> |  <p>3,5 dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona (C23) Aislada de <i>Gnaphalium gracile</i> H.B.K</p> |
|  <p>5,7dihidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona (C24) Aislado de <i>Gnaphalium gracile</i> H.B.K</p> |  <p>Gnaphalin (C25) Aislado de <i>Gnaphalium gracile</i> H.B.K</p> |  <p>Conyzatina (C26) Aislado de <i>Gnaphalium gracile</i> H.B.K</p> |  <p>5,7,9-trimetoxidihidrochalcona (C27) Aislado de <i>Piper pesaresanum</i></p> |
|  <p>7-hidroxi-6,3',4',5'-tetrametoxidihidrochalcona (C28) Aislada de <i>Piper pesaresanum</i></p> | | | |

2.4.2. Determinación de la inhibición de la actividad catalítica de los compuestos seleccionados sobre LP, AG y AA.

2.4.2.1. Ensayo de la actividad catalítica de LP.

Se evaluó la actividad inhibitoria sobre la enzima LP según el método propuesto por (Cardullo et al. 2021; Kaur et al. 2021) con algunas modificaciones. Se utilizó lipasa pancreática porcina tipo II (100-500 U/mg de proteína), dodecanoato de *p*-nitrofenilo como sustrato y orlistat como control positivo. Los extractos, fracciones y compuestos fueron disueltos en DMSO. La máxima concentración evaluada para extractos fue de 1000 µg/mL, para las fracciones de 500 µg/mL y para los compuestos 300 µM. Los ensayos se desarrollaron en placas de 96 pozos. Para iniciar, se preparó una solución de enzimática de LP a una concentración de 1 mg/ml en tampón de Tris-HCl a una concentración de 0.5 M con un pH 8.5, suplementado con 5 mM de desoxicolato de sodio (DSC) y 5mM de NaCl. Esta mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos para eliminar partículas en suspensión. Luego se tomaron 30 µL de la solución enzimática y se mezclaron con 30 µL de solución madre de la sustancia a evaluar (extracto, fracción o compuesto), junto con 160 µL de tampón de Tris-HCl (0.5 M con un pH 8.5 y NaCl a 5mM). La mezcla resultante se pre-incubó a 37 °C durante 5 minutos. Luego, se añadieron 30 µL de sustrato a una concentración de 0.075 mM, obteniendo un volumen final de 250 µL. La incubación se llevó a cabo durante 25 minutos a 37 °C. La actividad enzimática se cuantificó midiendo la absorbancia a 405 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes. Los porcentajes de inhibición fueron estimados a partir de las absorbancias medidas de acuerdo con la ecuación **Ec. 2**

$$\text{Ec. 2 } \% \text{ inhibición} = \frac{A \text{ control} - A \text{ inhibidor}}{A \text{ control}} \times 100$$

Para los extractos, fracciones y compuestos que mostraron una inhibición superior al 50% en la máxima concentración evaluada, se calculó la concentración inhibitoria media CI_{50} , en un rango de concentraciones de (1000 a 62.5 µg/mL) para extractos, de (500 a 6.25 µg/mL) para las fracciones y de (300 a 9.37 µM) para compuestos.

2.4.2.2. Ensayo de la actividad catalítica de AA.

La actividad sobre la enzima AA se evaluó según el método propuesto por (Ashok Kumar et al. 2019; Hanh, Dang, and Dat 2021), con algunas modificaciones, utilizando como enzima AA páncreas porcino tipo VI-B (≥ 5 U/mg sólido), 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltósido como sustrato y acarbosa como control positivo. Los extractos, fracciones y compuestos fueron disueltos en DMSO. La máxima concentración evaluada para extractos fue de 1000 $\mu\text{g/mL}$, para las fracciones de 500 $\mu\text{g/mL}$ y para los compuestos 300 μM . Los ensayos se desarrollaron en placas de 96 pozos. Inicialmente, se tomaron 30 μL de una solución enzimática de AA a una concentración de 1U/mg en tampón de fosfato de sodio 0.5 M con un pH 6.4, suplementado con NaCl a 5 mM, que se mezclaron con 30 μL de solución madre de la sustancia a evaluar (extracto, fracción o compuesto), junto con 160 μL de buffer fosfato de sodio (0.5 M, pH 6.4 y NaCl 5 mM). La mezcla resultante se preincubó a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 30 μL de sustrato a una concentración de 533.2 μM , obteniendo un volumen final de 250 μL . La incubación se llevó a cabo durante 30 minutos a 37 °C. La actividad enzimática se cuantificó midiendo la absorbancia a 405 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes. Los porcentajes de inhibición fueron estimados a partir de las absorbancias medidas de acuerdo con la ecuación **Ec. 3**

$$\text{Ec. 2 } \% \text{ inhibición} = \frac{A \text{ control} - A \text{ inhibidor}}{A \text{ control}} \times 100$$

Para los extractos, fracciones y compuestos que mostraron una inhibición superior al 50% en la máxima concentración evaluada, se calculó la concentración inhibitoria media CI_{50} , en un rango de concentraciones de (1000 a 62.5 $\mu\text{g/mL}$) para extractos, de (500 a 6.25 $\mu\text{g/mL}$) para las fracciones y de (300 a 9.37 μM) para compuestos.

2.4.2.3. Ensayo de la actividad catalítica de AG.

La actividad sobre la AG se evaluó según el método propuesto por (Gomes et al. 2021; Zhang et al. 2022). Con algunas modificaciones, utilizando como enzima AG Tipo I de *Saccharomyces cerevisiae* (≥ 10 U/mg de proteína), α -D-glucopiranosido de p-nitrofenilo como sustrato y acarbosa como control positivo. Los extractos, fracciones y compuestos fueron disueltos en DMSO. La máxima concentración evaluada para extractos fue de 1000 $\mu\text{g/mL}$, para las fracciones de 500 $\mu\text{g/mL}$ y para los compuestos 300 μM . Los ensayos se desarrollaron en placas de 96 pozos. Se tomaron 20 μL de una solución enzimática de AG con una concentración de 0,5 U/mL, en tampón de fosfato de sodio 0.5 M con un pH 6.4, suplementado con 5mM de NaCl, que se mezclaron con 10 μL de solución madre de la sustancia a evaluar (extracto, fracción o compuesto), junto con 200 μL de buffer fosfato de sodio (0.5 M con un pH 6.4 y NaCl a 5 Mm). La mezcla resultante se preincubó a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 20 μL de sustrato a una concentración de 110 μM , obteniendo un volumen final de 250 μL . La incubación se llevó a cabo durante 30 minutos a 37 °C. La actividad enzimática se cuantificó midiendo la absorbancia a 405 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado e independientes, los porcentajes de inhibición fueron estimados a partir de las absorbancias medidas de acuerdo con la ecuación **Ec. 4**

$$\text{Ec. 4 } \% \text{ inhibición} = \frac{A \text{ control} - A \text{ inhibidor}}{A \text{ control}} \times 100$$

Para los extractos, fracciones y compuestos que mostraron una inhibición superior al 50% en la máxima concentración evaluada, se calculó la concentración inhibitoria media CI_{50} , en un rango de concentraciones de (1000 a 62.5 $\mu\text{g/mL}$) para extractos, de (500 a 6.25 $\mu\text{g/mL}$) para las fracciones y de (300 a 9.37 μM) para compuestos.

2.4.3. Determinación del tipo de inhibición enzimática sobre de los compuestos bioactivos LP, AA y AG

Los mecanismos de inhibición enzimática sobre LP, AA y AG fueron establecidos mediante las metodologías previamente mencionadas en la **sección 2.4.2**. Los compuestos bioactivos se evaluaron con base a los valores CI_{50} previamente determinados, se evaluaron a tres concentraciones diferentes 0,5, 1,0 y $2,0 \times CI_{50}$. Para cada enzima, se utilizaron concentraciones crecientes de sustrato, para LP entre 3.90 a 1000 μ M de dodecanoato de *p*-nitrofenilo, para AG de 1 a 50 mM de O- α -D-glucopiranosido de *p*-nitrofenol y para AA de 0.625 a 2.5 mM de 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltósido. Los experimentos cinéticos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism 8. Las constantes de inhibición (K_i) se calcularon a partir de las curvas [Sustrato] en función de la velocidad de reacción, mediante una regresión no lineal de la función cinética de inhibición enzimática. Además, el mecanismo de inhibición se determinó gráficamente aplicando la función de regresión doble recíproca de Lineweaver-Burk (Rodhi, et al., 2020).

2.4.4. Análisis estadístico

Para el análisis detallado de los datos, se empleó el software estadístico GraphPad Prism 8. Los valores CI_{50} se estimaron mediante análisis de regresión no lineal. Se analizaron las diferencias estadísticamente significativas empleando la prueba de análisis de varianza ANOVA para comparar las medias. Todos los datos reportados representan el promedio de tres repeticiones \pm SD, significancia estadística $P < 0.05$.

3. Resultados y discusiones

3.1. Identificación de los compuestos bioactivos de *Neurolaena lobata* con capacidad inhibitoria sobre lipasa pancreática (LP), α -amilasa (AA) y/o α -glucosidasa (AG).

En el presente estudio se realizó un estudio químico sobre las hojas de *N. lobata* con el fin de aislar e identificar algunos constituyentes químicos con potencial inhibitorio sobre las enzimas LP, AG y AA. De esta manera, al extracto hidroalcohólico (HA) y cada una de las fracciones provenientes de la CLV fueron sometidas a ensayos de inhibición enzimática sobre LP, AA y AG. Los resultados de estas evaluaciones se resumen en la **Tabla 5**, de donde se deduce que la actividad inhibitoria sobre las tres enzimas de interés se encuentra en el extracto HA y luego del fraccionamiento predomina en las fracciones más polares de AcOMe e iPrOH. Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionaron para continuar con el proceso de aislamiento e identificación las dos fracciones con promisorio actividad multidiana (AcOMe e iPrOH).

Tabla 5 Efecto inhibitor sobre las enzimas LP, AA y AG sobre las fracciones obtenidas de las hojas *N. lobata*, expresado en valores CI_{50} .

| Muestras / controles (+) | LP CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ | AA CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ | AG CI_{50} $\mu\text{g/mL}$ |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| HA | 166.3 \pm 1.8 | 202.0 \pm 1.1 | 74.79 \pm 2.3 |
| DCM | NA (13.2%) | NA (5.6%) | NA (50.5%) |
| AcOMe | 317.9 \pm 3.0 | 141.2 \pm 2.0 | 94.4 \pm 3.9 |
| iPrOH | 251.0 \pm 0.6 | 691.1 \pm 3.6 | 78.5 \pm 3.0 |
| EtOH-H ₂ O | NA (21.5%) | NA (6.3%) | NA (38.1%) |
| Orlistat | 2.40 \pm 1.1 | ND | ND |
| Acarbosa | ND | 3,16 \pm 2.5 | 345.9 \pm 3.2 |

(LP) lipasa pancreática, (AA) α -amilasa, (AG) α -glucosidasa, (HA) extracto hidroalcohólico, (DCM) diclorometano, (AcOEt) Acetato de etilo, (iPrOH) isopropanol, (EtOH:H₂O) etanol:agua, (Desviación Estándar) \pm DS. NA: No activo; ND: No determinado. El valor entre paréntesis indica el porcentaje de inhibición a la concentración máxima evaluada para las fracciones (500-62.5 $\mu\text{g/mL}$)

El estudio fitoquímico realizado sobre las fracciones de AcOMe e iPrOH condujo al aislamiento e identificación de seis compuestos (**Figura-18**) entre los que se encuentran dos

sesquiterpenlactonas (neurolenina B **C1** y lobatina A **C2**), dos derivados de ácido benzoico (ácido *p*-hidroxibenzoico **C3** y ácido 3,4-dihidroxibenzoico **C4**) y dos flavonoides (5,6,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol **C5** y 5,6,3',4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol **C6**). Los derivados de ácido benzoico (**C3** y **C4**) y los flavonoides (**C5** y **C6**) se reportan por primera vez en *N. lobata*, mientras que **C1** y **C2** ya habían sido reportadas en la especie (Passreiter, Wendisch, and Gondol 1995). Las sesquiterpenlactonas encontradas en este estudio son de tipo germacranólido consideradas marcadores químicos para la familia Asteraceae y se caracterizan por sus propiedades anticancerígenas, antimaláricas, antipalúdicas y antiinflamatorias (François et al. 1996; Gomes et al. 2021; Hanh, Dang, and Dat 2016). Los derivados de ácido benzoico **C3** y **C4** ya han sido reportados previamente en la naturaleza, incluyendo algunas especies de las familias Nepenthaceae y Combretaceae. A estos compuestos se les han demostrado propiedades anticoagulante (Choi and Kim 2022), antiinflamatoria (Han et al. 2022; Abdullah et al. 2016a; Berger et al. 2001), Finalmente, los flavonoides **C5** y **C6** ya habían sido previamente identificados en la especie *N. oaxacana* (Ulubelen et, al 1980) Estudios previos han demostrado que estos dos compuestos presentan propiedades como antiinflamatorias (Williams et al. 1995) y antioxidantes (Wu et al. 2006).

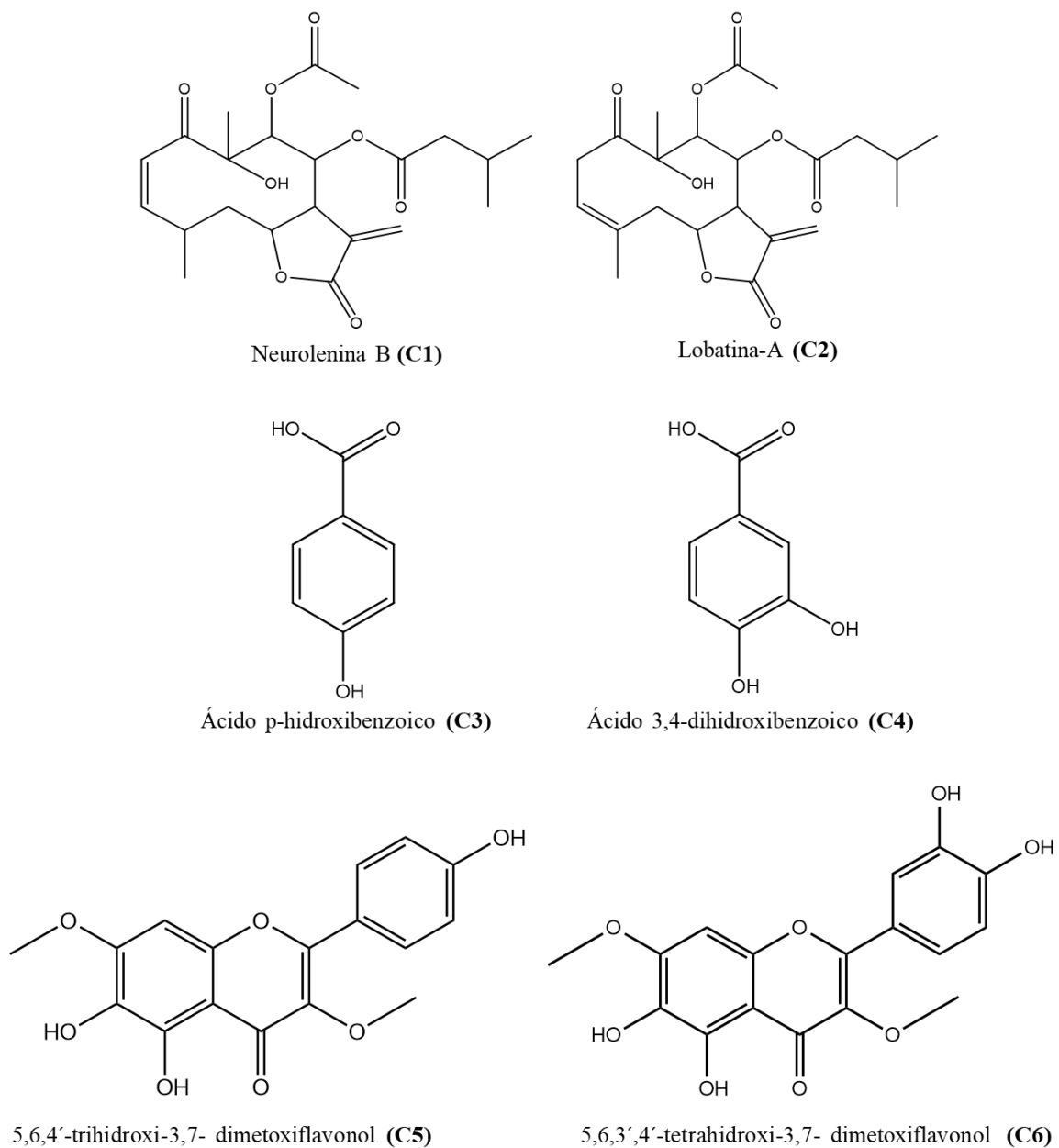


Figura- 18 Compuestos aislados de las fracciones de AcOMe y iPrOH provenientes de las hojas *N. lobata*.

El compuesto **C1** fue aislado como sólido amorfo de color blanco con p.f. de 165-164°C, el cual en CCD se caracterizó por presentar una coloración café al ser revelado con el reactivo vainillina-ácido sulfúrico al 5%. Por análisis de RMN (**Anexo 1; tabla A1.1; Figuras A1.1, A1.2**) se determinó la presencia de una sesquiterpenlactona (SLs) de tipo germacránolido por las señales típicas de un sistema γ -lactona- α,β -insaturada (señales de ^1H con δ_{H} 2.58 (s, 1H), 4.54 (dd, $J = 11.8, 4.9$ Hz, 1H), 5.80 (s, 1H), 6.30 (s, 1H) y en APT con δ_{C} , 41.3 (CH), 76.5 (CH), 126.7 (CH₂), 134.9 (C), 168.9 (C=O)) y que dentro del núcleo base presenta un grupo carbonilo α - β -insaturado (δ_{H} 6.00 (t, $J = 11.5$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H) y con δ_{C} 125.4 (CH), 148.3 (CH), 204.8 (C=O)). Adicionalmente, se determinó la presencia de un grupo acetilo (δ_{H} 2.08 (s, 3H) y con δ_{C} 20.7 (CH₃), 170.2 (C=O)) y de un grupo isovalerilo (δ_{H} 0.87 (d, 6H), 1.88-1.94 (m, 1H), 1.95 -2.04 (m, 1H), 2.09 (m, 1H) y con δ_{C} 22.3 (CH₃), 22.5 (CH₃), 25.0 (CH), 42.7 (CH₂), 171.0 (C=O)). El núcleo base, la asignación de las señales de RMN y la ubicación de los sustituyentes fueron corroboradas por análisis de experimentos bidimensionales tipo COSY, HMQC y HMBC. Por comparación con los datos reportados en la literatura este compuesto fue identificado como neurolenina B, una SLs de tipo germacránolido que ya había sido reportada en *N. lobata* (Passreiter, Wendisch, and Gondol 1995) y en otras especies como *Eupatorium inulaefolium* (Blair et al. 2002). A neurolenina B, se le ha determinado su actividad antimalárica (Chinchilla-Carmona et al. 2011), (François et al. 2004), antiinflamatoria (Chinchilla-Carmona et al. 2011) y anticancerígena (Kiss et al. 2015; Lajter et al. 2014).

El compuesto **C2** fue aislado como sólido amorfo de color blanco con p.f. 123-124 °C, que en CCD se caracterizó por presentar una coloración café al ser revelado con el reactivo vainillina-ácido sulfúrico al 5%. Por análisis de RMN (**Anexo 1; tabla A2.1; Figuras A2.1, A2.2**) se determinó que presenta un perfil similar a **C1**. La diferencia entre sus espectros se evidencia por la desaparición de las señales del grupo carbonilo α,β insaturado presente en **C1** y la aparición de señales para un carbonilo β,γ insaturado en **C2** (δ_{H} 3.07 (dd, $J = 15.9, 7.9$ Hz, 1H), 3.57 (dd, $J = 15.9, 9.6$ Hz, 1H), 5.91 (t, $J = 9.58, 8.13$ Hz, 1H) y con δ_{C} 36.0 (CH₂), 121.4 (CH), 136.8 (C), 210.1 (C=O)). Por comparación con los datos reportados en la literatura se determinó que el compuesto **C2** corresponde a Lobatina A, una

sesquiterpenlactona que ya ha sido reportada en *N. lobata* (Passreiter, Wendisch, and Gondol 1995) y en especies del género *Austro eupatorium* como es el caso de *A. inulifolium* (Blair et al. 2002). A este compuesto se le ha reportado que tiene actividad antiparasitaria (François et al. 1996), antialimentaria (Passreiter and Isman 1997) y antiinflamatoria (McKinnon et al. 2014).

El compuesto **C3** fue aislado como sólido amarillo en forma de agujas, con p.f. 206-208 °C, mientras que **C4** fue aislado como sólido amarillo amorfo, con p.f. 193-195 °C. Del análisis espectroscópico de RMN (**Anexo 1; tabla A3.1; Figuras A3.1, A3.2**), (**Anexo 1; tabla A4.1; Figuras A4.1, A4.2**) se determinó la presencia de derivados de ácido benzoico en **C3** y **C4**. Por comparación con los datos reportados en la literatura se identificó a **C3** como ácido *p*-hidroxibenzoico (Xin, Aisa, and Wang 2008) y **C4** como ácido 3,4-dihidroxibenzoico (D. M. C. Nguyen et al. 2013). El compuesto **C3** ha sido previamente identificado en la especie *N. glandulifera* (Xin, Aisa, and Wang 2008), mientras que **C4** en *T. nigrovenulosa* (D. M. C. Nguyen et al. 2013). Para el compuesto **C3** se le ha reportado actividad anticoagulante (Choi and Kim 2022) y antiinflamatoria (Han et al. 2022), mientras que para **C4**, se le ha reportado actividad antioxidante (X. Li et al. 2011) y propiedades neuroprotectoras sobre la proteína β amiloide (25-35) (Ban et al. 2007).

El compuesto **C5** fue aislado como sólido amorfo de color amarillo-café con p.f. 179-181 °C, que en CCD produjo un color amarillo fluorescente al ser observado en luz UV de 365 nm, luego de ser revelado con el reactivo de productos naturales (NP/PEG), lo que es indicativo de que puede corresponder a un flavonoide (Ulubelen, et, al .1980) Por análisis de RMN (**Anexo 1; tabla A5.1; Figuras A5.1, A5.2**), se corroboró la presencia de un flavonoide tipo flavona o flavonol por las señales en ^1H con δ_{H} 6.80 (s, 1H-8), 6.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), junto con las señales de APT con δ_{C} 91.2 (CH), 106.8 (C), 116.2 (CH), 116.3 (CH), 122.0 (CH), 123.1 (C), 130.7 (C), 139.0 (C), 145.9 (C), 146.7 (C), 146.8 (C), 149.0 (C-2), 150.8 (C), 154.9 (C), 179.6 (C=O). Adicionalmente, se determinó la presencia de dos grupos metoxilos (δ_{H} 3.97 (s, 3H), 3.86 (s, 3H) y con δ_{C} 60.1 (CH₃), 56.7 (CH₃)) y de posiblemente tres grupos hidroxilos fenólicos (Señales para carbonos aromáticos oxigenados con δ_{C} 131.1, 146.8 y 160.8),

estando uno de ellos posiblemente quelatado (señales en ^1H con δ_{H} 12.48 (s, 1H)). El núcleo base, la asignación de las señales de RMN y la ubicación de los sustituyentes fueron corroboradas por análisis de experimentos bidimensionales tipo COSY, HMQC y HMBC. Por comparación con los datos reportados en la literatura este compuesto **C5** fue identificado como 5,6,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol **C5**, el cual ya había sido previamente identificado en la especie *N. oaxacana* (Ulubelen et al. 1980). A **C5** se le ha determinado que posee actividad antioxidante (Durmaz 2021), antiinflamatoria (Williams et al. 1995) y actividad citotóxica (Garayev et al. 2017).

El compuesto **C6**, fue aislado como un sólido amorfo de color amarillo-café, con p.f. 108-110 °C, que en CCD produjo un color amarillo fluorescente al ser observado en luz UV, luego de ser revelado con NP/PEG, lo que sugirió la presencia de un flavonoide (Ulubelen, et al. 1980). Por análisis de RMN (**Anexo 1; tabla A6.1; Figuras A6.1, A6.2**), se determinó que presenta un perfil similar a **C5**. La diferencia entre sus espectros se evidencia por el cambio de sustitución en el anillo C, pasando de estar 1,4 disustituido para **C5** a estar 1,3,4 trisustituido para **C6** (δ_{H} 6.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H) y con δ_{C} 116.2 (CH), 116.3 (CH), 122.0 (CH), 145.9 (C), 146.7 (C)). Adicionalmente, se logró establecer la presencia de dos sustituyentes oxigenados sobre los carbonos aromáticos en posiciones 3' y 4' del anillo B para **C6** (145.9 (C) y 146.7 (C)), en comparación a **C5** que solo presenta un carbono aromático oxigenado en el anillo B. La ubicación de los sustituyentes fue corroborada por análisis de experimentos bidimensionales de tipo HMBC. Por comparación con los datos reportados en la literatura se determinó que el compuesto **C6** corresponde a 5,6,3',4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol **C6**, un flavonoide que ya había sido reportado previamente en el género *Neurolaena*, particularmente en *N. oaxacana* (Ulubelen et al. 1980), A este compuesto se le ha reportado que presenta propiedades antiinflamatorias (Williams et al. 1995) y antioxidantes (Wu et al. 2006).

3.1.2. Determinación de la inhibición de la actividad catalítica de los compuestos aislados sobre LP, AG y AA

Los compuestos **C1** a **C6** fueron evaluados como inhibidores de la actividad catalítica de las enzimas LP, AA y AG, y los resultados de estos ensayos se resumen en la **Tabla 6**, donde se encuentra que los compuestos **C3** y **C4** no lograron inhibir ninguna de las tres enzimas a la máxima concentración evaluada (300 μ M).

Tabla 6 Efecto inhibitor de los compuestos aislados de la especie *N. lobata* sobre la actividad catalítica de la AG, AA y LP.

| compuestos / control (+) | Lipasa pancreática (LP) CI ₅₀ (μ M) | α -glucosidasa (AG) CI ₅₀ (μ M) | α -amilasa (AA) CI ₅₀ (μ M) |
|--------------------------|--|---|---|
| C1 | 591.8 \pm 1.2 | 639.0 \pm 3.8 | NA (7.8%) |
| C2 | 615.6 \pm 2.9 | 525.1 \pm 4.7 | NA (9.5%) |
| C3 | NA (37.8%) | NA (39.1%) | NA (4.5%) |
| C4 | NA (31.2%) | NA (47.3%) | NA (2.4%) |
| C5 | 166.4 \pm 3.2 | 170.3 \pm 2.2 | NA (13.8%) |
| C6 | 134.1 \pm 0.7 | 215.2 \pm 2.1 | NA (12.5%) |
| Orlistat | 0.6 \pm 0.2 | ND | ND |
| Acarbosa | ND | 345.9 \pm 3.2 | 3.2 \pm 2.6 |

(LP) lipasa pancreática, (AA) α -amilasa, (AG) α -glucosidasa, Valores de CI₅₀ \pm DS. ND: No determinado. NA: No activo, el valor entre paréntesis indica el porcentaje de inhibición a la concentración máxima evaluada (300 μ M).

Los compuestos **C1**, **C2**, **C5** y **C6** muestran una actividad inhibitoria sobre la enzima LP con valores CI₅₀ entre 615 y 166 μ M, destacándose el compuesto **C6** como el más activo. No obstante, ninguno de los compuestos ejerció un efecto inhibitor comparable o superior al causado por el orlistat. Con relación a la enzima AG, los compuestos **C1**, **C2**, **C5** y **C6** también mostraron actividad inhibitoria con valores CI₅₀ entre 639 y 170 μ M. Los compuestos **C5** y **C6** son aproximadamente 1.5 veces más activos que el control positivo acarbosa. También se encuentra los compuestos **C1** al **C6** mostraron una actividad inhibitoria débil sobre la enzima AA, con porcentajes de inhibición inferiores al 15 %. En un estudio desarrollado por Guan y colaboradores en 2022 se reportó que los compuestos **C3** y **C4** inhibieron la enzima AA con una CI₅₀ de 25.72 mM y 25.36 mM. resultados que concuerdan con los encontrado en el presente estudio, pues a una concentración de 300 μ M

no se esperaba una inhibición considerable. Es importante resaltar que este estudio constituye el primer reporte de la actividad inhibitoria de los compuestos **C1** a **C6** sobre las enzimas LP y AG, y de los compuestos **C1**, **C2**, **C5** y **C6** sobre la enzima AA.

Con base en los resultados de inhibición enzimática es posible establecer algunas relaciones preliminares de estructura actividad. Analizando los resultados obtenidos sobre LP, en el caso de los flavonoles **C5** y **C6** es posible indicar que la inhibición de la enzima se ve más favorecida por la presencia de dos grupos hidroxilo vecinal en el anillo B. En el caso de las sesquiterpenlactonas **C1** y **C2**, es posible evidenciar que el sistema carbonilo α - β insaturado en las posiciones 1, 2 y 3 en **C1** favorece ligeramente la inhibición de LP.

Para el caso de la enzima AG, analizando los resultados obtenidos para **C5** y **C6**, se puede inferir que la presencia del grupo hidroxilo en la posición 3' tiene un efecto negativo sobre la capacidad del flavonoide de inhibir AG, pues el compuesto **C5** que tiene en la posición 3' libre es aproximadamente 1.5 veces más activo que el compuesto **C6** que tiene el hidroxilo en la posición 3'. Para las sesquiterpenlactonas **C1** y **C2** se observa que la presencia del sistema carbonilo α - β insaturado en las posiciones 1, 2 y 3 en **C1** impacta negativamente la inhibición sobre AG.

3.1.3. Determinación de la actividad citotóxica

Los ensayos preliminares de citotoxicidad celular se llevaron a cabo mediante el ensayo de reducción del MTT en dos líneas celulares BHK-21 (hámster) y MRC-5 (humanas). Las concentraciones del extracto **HA**, las fracciones **AcOMe** e **iPrOH**, así como los compuestos activos **C5** y **C6** (que presentaron el mejor perfil de actividad sobre las enzimas) fueron seleccionadas con base a los valores CI_{50} estimados en los ensayos enzimáticos sobre las enzimas LP y AG, escogiendo en cada caso el mayor valor CI_{50} ($CI_{50}/10$, CI_{50} y $CI_{50} \times 10$). Los porcentajes de mortalidad celular observados sobre las dos líneas por la acción de los extractos, fracciones y compuestos evaluados se muestran en la **Figura-19**. En general se observa que la línea celular BHK-21 es más susceptible a la presencia de las sustancias evaluadas que la línea MCR-5. Se encontró que el extracto **HA** mostró porcentajes de

mortalidad celular entre 51 y 35% en ambas líneas celulares en las concentraciones evaluadas, catalogándose como moderadamente tóxico estas células. En cuanto a las fracciones de **AcOMe** e **iPrOH** se determinó que sobre la línea MRC-5 los porcentajes de viabilidad celular estuvieron entre 55 y 82% para **AcOMe**, catalogándose como tóxico leve a moderado, mientras que para la fracción **iPrOH** la viabilidad celular fue superior o igual al 95%, lo que indica que es una sustancia de baja toxicidad. En el caso de la línea BHK-21, se encuentra que las fracciones **AcOMe** e **iPrOH** son moderadamente tóxicas (% mortalidad celular > 45%) en las concentraciones evaluadas, a excepción de la concentración más baja evaluada para la fracción **iPrOH** que causó un porcentaje de mortalidad celular del 10%, siendo una sustancia levemente tóxica. Finalmente, los compuestos **C5** y **C6** mostraron un alto efecto citotóxico en la línea celular BHK-21, pues causaron mortalidades celulares superiores al 68% en las tres concentraciones. No obstante, en las células MRC-5, la citotoxicidad estuvo entre leve y baja, con porcentajes de mortalidad inferiores al 18%, a excepción de la concentración más alta del compuesto **C5**, que causó una mortalidad celular del 62.8%.

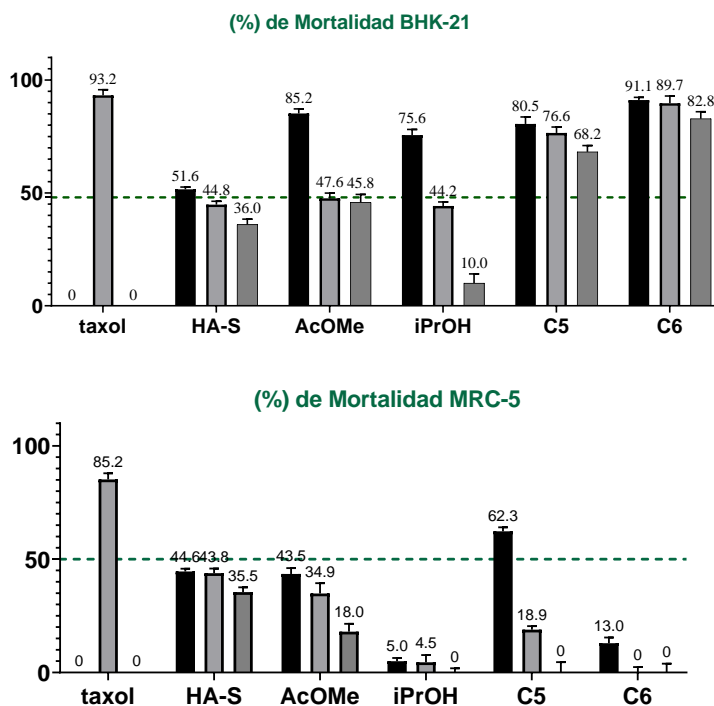


Figura- 19 Porcentajes de mortalidad celular sobre las líneas BHK-21 y MRC-5 causados por el extracto **HA**, las fracciones **AcOMe** e **iPrOH** y compuestos **C5** y **C6**.

Debido a limitaciones en la disponibilidad de recursos, no fue posible determinar la actividad citotóxica de las moléculas bioactivas neurolenina B y lobatina A. Sin embargo, se ha reportado acerca de la actividad citotóxica de neurolenina B. sobre las líneas celulares MRC-5. Kovács y su equipo de trabajo ha llevado a cabo estudios *in vitro* sobre la actividad citotóxica de las SLs neurolenina B y lobatina A. Los estudios se llevaron a cabo diversas líneas celulares, incluyendo células no cancerosas como MRC-5 (fibroblastos humanos) y NIH/3T3 (células embrionarias de ratón), así como líneas celulares cancerosas humanas (SiHa, HeLa y C33A). Los resultados obtenidos indican que la neurolenina B posee un efecto citotóxico significativo en todas las líneas celulares cancerosas. Sin embargo, en las líneas celulares no cancerosas, se observa una tendencia hacia una selectividad mínima en las líneas celulares no cancerosas, se obtuvo un valor de CI_{50} de 1,31 μM para las células NIH/3T3 y valores CI_{50} de 5.36 μM en MRC-5 (Kovács et al., 2023).

En otros estudios realizados por François en 1996, se exploró la relación estructura-actividad del efecto citotóxico de las SLs presentes en *N. lobata* en líneas cancerosas humanas como GLC-4 y COLO 320HSR. En este contexto, se observaron resultados significativos. Neurolenina B y lobatina A mostraron valores de CI_{50} de 4.4 μM y 5.4 μM , respectivamente. En contraste, Lobatina A presentó valores de CI_{50} de 43.9 μM y 36.9 μM . Esta diferencia se atribuye a un cambio en la posición 3,4 del doble enlace, lo cual resultó en una disminución de la actividad citotóxica en 10 veces (François et al., 1996).

Por otro lado, no se ha reportado, hasta la fecha, indicios de actividad citotóxica para los compuestos **C5** y **C6** sobre las líneas celulares MRC-5 y BHK-21, respectivamente. Aunque se han documentado casos de actividad citotóxica en líneas cancerígenas y no cancerígenas. Por ejemplo, estudios realizados por Marlarz y colaboradores reportan valores de CI_{50} para el compuesto C5 sobre líneas celulares humanas, tanto normales como cancerosas, en rangos de concentración de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Sobre las líneas celulares de cáncer de próstata (DU145 y PC3), así como en células epiteliales de próstata (PNT-2). Los valores de CI_{50} obtenidos fueron 74,62 μM para PNT-2, 83,62 μM para DU145 y 19,64 μM para PC3. Sin embargo, sobre las líneas celulares como no tumorales como HaCaT, A375 y HTB140, los valores de

CI₅₀ fueron superiores a 100 µg/mL, indicando una menor citotoxicidad en estas células. Estos resultados destacan el potencial del compuesto C5 como agente citotóxico específico contra líneas celulares de cáncer de próstata, mientras que su efecto en otras líneas celulares es menos pronunciado (Malarz et al. 2023).

3.2. Caracterización biológica y química de las preparaciones tradicionales más utilizadas de *Neurolaena lobata* para el tratamiento de diabetes y obesidad.

3.2.2. Estudio de actividad de la actividad inhibitoria frente a LP, AA y AG de las preparaciones tradicionales.

Con el objetivo de respaldar científicamente el uso terapéutico atribuido a la medicina tradicional de la especie *N. lobata* en el tratamiento de la OB y DM2, se evaluó la actividad inhibitoria de las preparaciones tradicionales (PT) obtenidas a partir de hojas secas y frescas sobre las enzimas LP, AA y AG. En la **Figura-20** se presentan los porcentajes de inhibición observados en los extractos evaluados a una concentración de 1000 µg/mL. Se destaca que tanto las preparaciones tradicionales mediante decocción (PTD) e infusión (PTI) a partir de hojas frescas (PTD-F e PTI-F), lograron inhibir las tres enzimas en más del 50%. En el caso de la decocción a partir de hojas secas (PTD-S) se observó una inhibición superior al 50% en las enzimas LP y AG, mientras que en enzima AA la inhibición fue inferior al 50%. En el caso de la infusión de hojas secas (PTI-S), se apreció una inhibición superior al 50% en las enzimas LP y AA, pero en la enzima AG no superó el 45%.

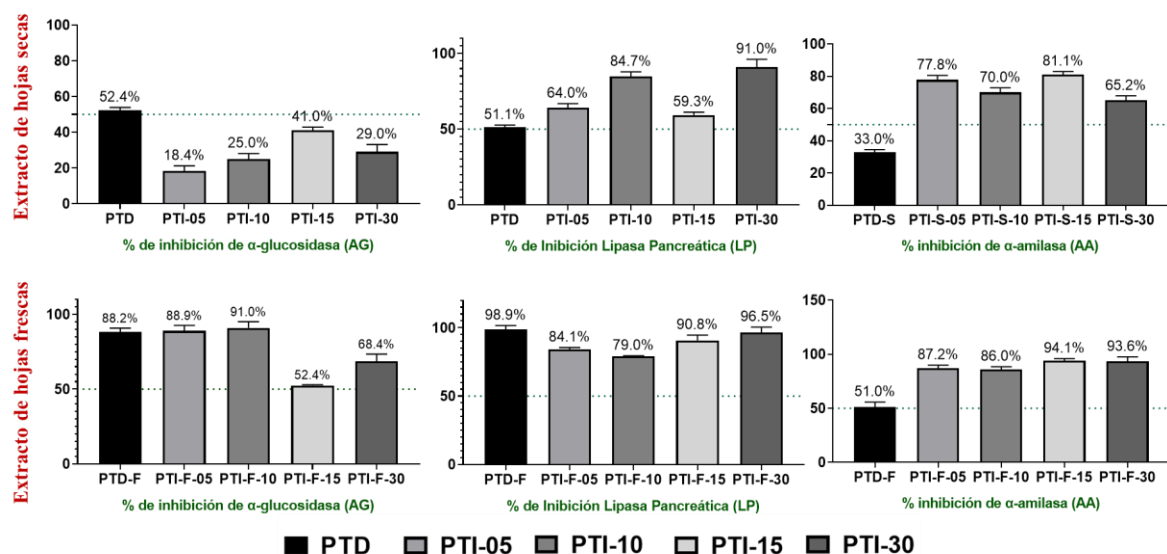


Figura- 20 Porcentajes de inhibición de preparaciones tradicionales de *N. lobata*. Por decocción e infusión con hojas secas y frescas (PTD-F, PTD-S e PTI-S y PTI-F)

Con base en los resultados anteriores, a los extractos que mostraron actividad inhibitoria superior al 50% se les determinó la CI_{50} , que se presentan en la **Tabla 7**. Se puede evidenciar que los valores de CI_{50} estimados en las **PT** por decocción e infusión (PTD e PTI) de hojas secas y frescas fueron muy superiores a los que causó el extracto HA sobre las tres enzimas, lo que indica que el extracto hidroalcohólico, del que se aislaron los compuestos bioactivos, tiene un mejor perfil de actividad inhibitoria sobre las enzimas de interés. Los valores CI_{50} sobre la enzima LP estuvieron entre 951 y 290 $\mu\text{g/mL}$, sobre AA entre 870 y 170 $\mu\text{g/mL}$ y sobre AG entre 1352 y 149 $\mu\text{g/mL}$, siendo todas las **PT** menos activas que los controles positivos empleados para las tres enzimas. También es posible evidenciar que en general las **PT** obtenidas a partir de hojas frescas presentaron menores valores de CI_{50} y que sobre las enzimas AA y LP la extracción por infusión fue la que condujo a obtener extractos más activos sobre las dos enzimas, siendo las infusiones de 30 minutos las que presentaron los valores CI_{50} más bajos. Para el caso de la AG la **PT** obtenida por decocción a partir de hojas frescas fue la más activa y se observó que el tiempo de extracción con el método de infusión es inversamente proporcional a la actividad sobre esta enzima, siendo más activo el extracto obtenido en la infusión por 5 minutos.

Tabla 7 Concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) obtenidas para los extractos HA y PT de la especie *N. lobata* con potencial inhibitorio sobre las enzimas LP, AG y AA.

| Muestras /control (+) | | LP CI ₅₀ µg/mL | AA CI ₅₀ µg/mL | AG CI ₅₀ µg/mL |
|-----------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Hojas secas | PTD-S | 951.8 ± 2.6 | ND | 1352 ± 4.6 |
| | PTI-S-05 | 669.1 ± 2.5 | 393.0 ± 4.5 | ND |
| | PTI-S-10 | 668.6 ± 3.8 | 207.5 ± 3.4 | ND |
| | PTI-S-15 | 618.6 ± 2.8 | 433 ± 3.2 | ND |
| | PTI-S-30 | 403.4 ± 1.7 | 512.1 ± 3.4 | ND |
| Hojas frescas | PTD-F | 846.9 ± 2.6 | 870.8 ± 4.6 | 149.6 ± 4.3 |
| | PTI-F-05 | 438.6 ± 2.0 | 196.18 ± 3.6 | 160.3 ± 2.2 |
| | PTI-F-10 | 724.9 ± 2.7 | 246.4 ± 3.4 | 471.1 ± 4.7 |
| | PTI-F-15 | 542.1 ± 3.1 | 203.4 ± 2.8 | 660.3 ± 3.2 |
| | PTI-F-30 | 290.0 ± 2.0 | 170.2 ± 2.7 | 807.7 ± 1.0 |
| HA | | 166.3 ± 1.8 | 114.4 ± 2.5 | 74.7 ± 2.9 |
| C(+) | Acarbosa (+) | ND | 2.0 ± 2.6 | 223.3 ± 2.2 |
| | Orlistat (+) | 0.27 ± 0.2 | ND | ND |

(LP) lipasa pancreática, (AA) α-amilasa, (AG) α-glucosidasa, preparaciones tradicionales decocción e infusión con hojas secas y frescas (PTD-F, PTD-S e PTI-S y PTI-F) (Desviación Estándar ±DS). ND: No determinado.

Es importante mencionar que los resultados obtenidos en nuestro estudio para las diferentes **PT** de *N. lobata* constituye el primer reporte de actividad inhibitoria sobre las tres enzimas digestivas de interés, excepto para la **PT** obtenida por decocción a partir de hojas secas sobre la enzima AG, para la cual se reportó un valor CI₅₀ > 1000 µg/mL en el estudio desarrollado por Andrade-Cetto y colaboradores en 2019, resultados que concuerdan con los encontrados en nuestro estudio (Andrade-Cetto et al. 2019) En el estudio de Andrade-Cetto y colaboradores también se reportan los resultados de un estudio de actividad hipoglucemiante en ratas Wistar con el extracto tradicional por decocción y el extracto por maceración con EtOH-H₂O 1:1, encontrando que la mejor actividad se obtiene con el extracto hidroalcohólico antihiperlipidémica con una concentración de 250mg/kg. Nuestros hallazgos hacen un aporte importante a la validación del uso tradicional dado a *N. lobata* por las comunidades en diferentes países de Latinoamérica para el tratamiento de OB y DM2, demostrando que las formas de uso de esta especie logran reducir la actividad catalítica de enzimas digestivas relacionadas con el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

3.2.3. Análisis de la presencia de los compuestos bioactivos en las preparaciones tradicionales por HPTLC

En este estudio se determinó el contenido de los compuestos **C1**, **C5** y **C6** en el extracto **HA** y las diferentes **PT** obtenidas a partir de hojas secas y frescas de *N. lobata*. En la **Tabla 8** los resultados del contenido de los compuestos **C1**, **C5** y **C6** (ver en **Anexo 2** las curvas de calibración) obtenidas y en la **Figura 21** se presentan las cromatoplacas obtenidas para la cuantificación tres compuestos. En general se observa que el perfil cromatográfico del extracto **HA** es más complejo que el de las preparaciones tradicionales, observándose sustancias en diferentes rangos de polaridad, mientras que en las **PT** se observa que la mayoría de las sustancias extraídas son polares.

Tabla 8 Contenido de **C1**, **C5** y **C6** en el extracto HA y las PT obtenidas a partir de hojas de *N. lobata*.

| Muestras | | Compuesto C1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ | Compuesto C5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ | Compuesto C6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ |
|---------------|-----------------|---|---|---|
| Hojas secas | PTD-S | 22.97 ± 0.26 | 3.46 ± 0.45 | 5.76 ± 0.25 |
| | PTI-S-05 | 19.35 ± 0.75 | 2.50 ± 0.22 | 5.30 ± 0.32 |
| | PTI-S-10 | 22.32 ± 0.38 | 2.58 ± 0.31 | 5.34 ± 0.61 |
| | PTI-S-15 | 22.47 ± 0.28 | 2.67 ± 0.63 | 5.29 ± 0.31 |
| | PTI-S-30 | 22.86 ± 0.17 | 2.34 ± 0.51 | 5.34 ± 0.21 |
| Hojas frescas | PTD-F | 17.63 ± 0.96 | ND | ND |
| | PTI-F-05 | 16.35 ± 0.23 | ND | ND |
| | PTI-F-10 | 16.17 ± 0.27 | ND | ND |
| | PTI-F-15 | 16.98 ± 0.31 | ND | ND |
| | PTI-F-30 | 16.90 ± 0.20 | ND | ND |
| HA | | 27.65 ± 0.18 | 4.70 ± 0.71 | 14.23 ± 0.29 |

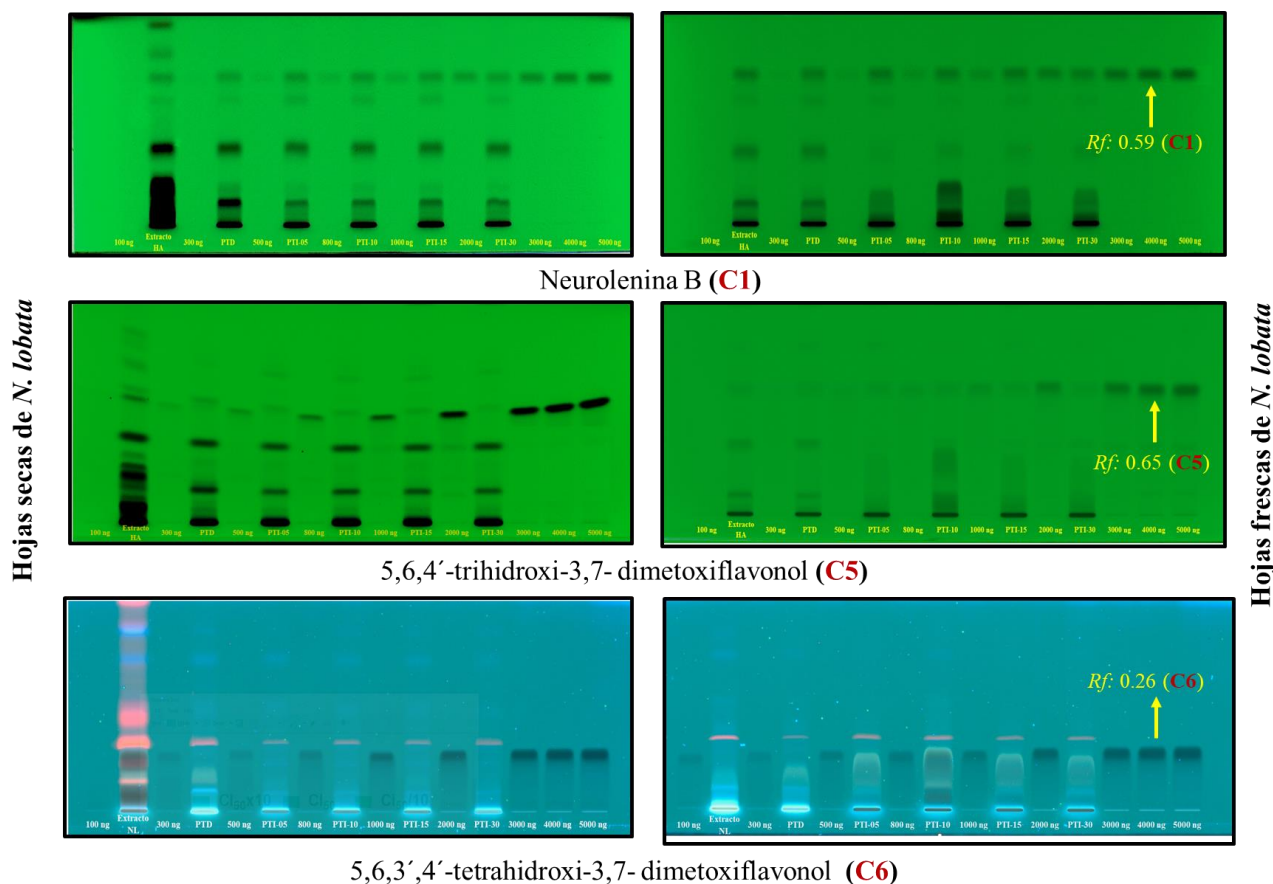


Figura-21 Cromatoplaques HPTLC obtenidas para la cuantificación de **C1**, **C5** y **C6** en el extracto **HA** y las **PT**. A. Corresponde a los extractos obtenidos a partir de hojas secas. B. Corresponde a los extractos obtenidos a partir de hojas frescas.

Se encontró que en todas las preparaciones tradicionales obtenidas de hojas secas y en el extracto **HA** están presentes los tres compuestos, siendo el extracto **HA** el que tiene el mayor contenido de los compuestos bioactivos, seguido por la **PTD-S**. No fue posible detectar los flavonoides **C5** y **C6** en las **PT** obtenidas a partir de hojas frescas, tanto por decocción como por infusión, mientras que el compuesto **C1** se encontró en todas las preparaciones tradicionales, estando en menor proporción en los extractos obtenidos a partir de hojas frescas, lo que indica que el contenido de humedad en el material vegetal fresco reduce la concentración de los metabolitos secundarios. También fue posible evidenciar que el contenido de los compuestos **C1**, **C5** y **C6** en las diferentes **PT** obtenidas por infusión (**PTI**) no presenta diferencias significativas, lo que sugiere que el tiempo de extracción no modifica drásticamente la composición química de dichos extractos.

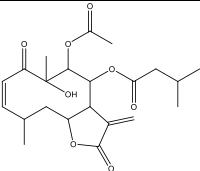
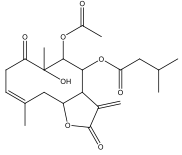
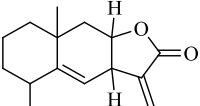
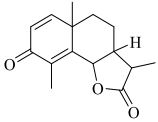
Relacionando la composición química de las **PT** con la actividad inhibitoria que causaron sobre las enzimas LP, AG y AA es posible inferir que dicha actividad no está altamente relacionada con el contenido de los compuestos **C5** y **C6**, pues a pesar de que estos compuestos no fueron detectados en las **PT** a partir de hojas frescas, estas fueron las que presentaron las menores CI_{50} sobre las tres enzimas. Por lo tanto, la inhibición de la actividad catalítica de las enzimas por parte de la **PT** debe puede estar relacionada con compuestos de alta polaridad o puede deberse a un efecto sinérgico.

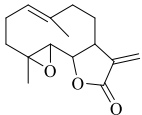
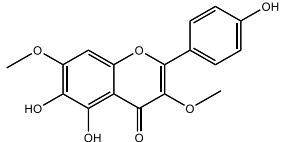
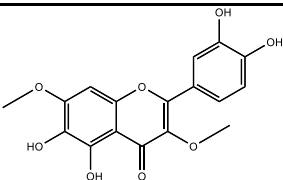
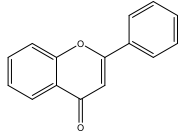
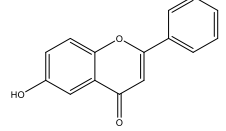
3.3. Determinación de los mecanismos de inhibición enzimática sobre LP, AA y AG de los compuestos bioactivos provenientes de *N. lobata* y compuestos relacionados.

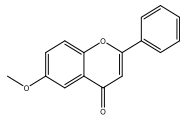
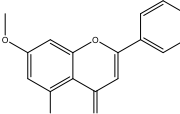
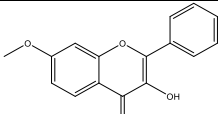
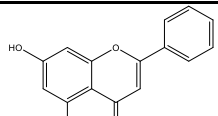
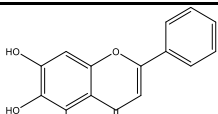
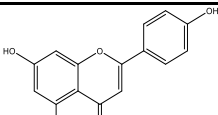
3.3.1. Determinación de la inhibición de la actividad catalítica de los compuestos seleccionados sobre LP, AG y AA.

Con los compuestos aislados **C1**, **C2**, **C5** y **C6** y algunos compuestos obtenidos comercialmente o aislados en el grupo de investigación que contienen estructuras similares a la de los aislados, se realizó un estudio preliminar de estructura-actividad inhibitoria sobre LP, AG y AA, empleando una concentración máxima de 300 μ M para el tamizaje y determinando la CI_{50} de aquellos compuestos que causaron una inhibición superior al 50% a la máxima concentración evaluada. En la **Tabla 9** se presentan los resultados del estudio de actividad inhibitoria sobre las tres enzimas de interés, divididos por tipo de metabolito secundario (sesquiterpenlactona y flavonoide).

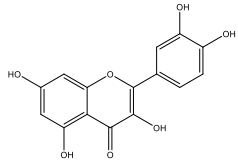
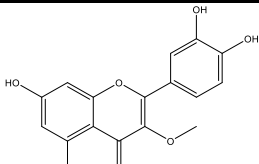
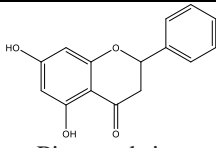
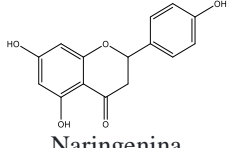
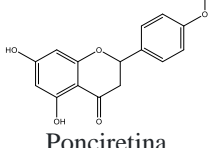
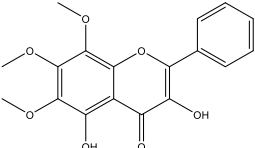
Tabla 9 Actividad inhibitoria sobre las tres enzimas de interés, divididos de metabolito secundario (sesquiterpenlactona y flavonoide).

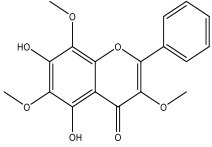
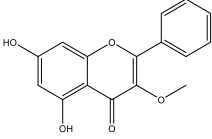
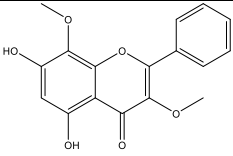
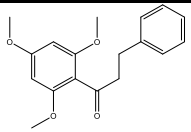
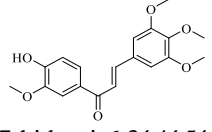
| compuestos / control (+) | Estructura | lipasa pancreática (LP) | | α -glucosidasa (AG) | | α -amilasa (AA) | |
|-----------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | | % de inhibición a 300 μ M | CI ₅₀ (μ M) | % de inhibición a 300 μ M | CI ₅₀ (μ M) | % de inhibición a 300 μ M | CI ₅₀ (μ M) |
| Sesquiterpenlactonas | | | | | | | |
| C1 |  <p>Neurolenina B</p> | 48.5 \pm 1.2 | 591.8 \pm 1.2 | 44.5 \pm 1.2 | 639.0 \pm 3.8 | 7.8 \pm 2.3 | ND |
| C2 |  <p>Lobatina A</p> | 38.7 \pm 3.1 | 615.6 \pm 2.9 | 53.7 \pm 1.1 | 525.1 \pm 4.7 | 9.5 \pm 0.3 | ND |
| C7 |  <p>Alantolactona</p> | 15.6 \pm 4.2 | ND | 12.7 \pm 2.1 | ND | 44.3 \pm 1.5 | ND |
| C8 |  <p>Santonina</p> | 21.7 \pm 2.8 | ND | 7.6 \pm 3.1 | ND | 48.5 \pm 2.5 | ND |

| | | | | | | | |
|--------------------|--|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|----|
| C9 |  Partenólido | 7.9 ± 3.2 | ND | 7.8 ± 0.1 | ND | 33.1 ± 1.8 | ND |
| Flavonoides | | | | | | | |
| C5 |  5,6,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol | 58.9 ± 3.2 | 166.4 ± 3.2 | 79.2 ± 2.9 | 170.3 ± 2.2 | 13.8 ± 1.0 | ND |
| C6 |  5,6,3',4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol | 82.3 ± 1.7 | 134.1 ± 0.7 | 61.2 ± 3.6 | 215.2 ± 2.1 | 12.5 ± 1.0 | ND |
| C10 |  Flavona | 1.2 ± 2.2 | ND | 48.8 ± 0.2 | ND | 22.4 ± 0.1 | ND |
| C11 |  6-hidroxi flavona | 4.3 ± 1.2 | ND | 26.3 ± 2.2 | ND | 5 ± 0.2 | ND |

| | | | | | | | |
|------------|--|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|----|
| C12 |  6-metoxiflavona | 19.4 ± 3.2 | ND | 5.9 ± 4.6 | ND | 8.1 ± 3.6 | ND |
| C13 |  5-hidroxi-7metoxiflavona | 37.4 ± 1.2 | ND | 39.9 ± 3.3 | ND | 45.5 ± 2.1 | ND |
| C14 |  3-hidroxi-7-metoxiflavona | 65.4 ± 0.4 | 264.4 ± 0.5 | 47.6 ± 3.2 | ND | 32.8 ± 1.3 | ND |
| C15 |  Crisina | 78.9 ± 0.1 | 62.0 ± 0.8 | 75.0 ± 3.8 | 174.4 ± 2.3 | 37.8 ± 3.6 | ND |
| C16 |  Baicaleín | 65.1 ± 0.8 | 190.8 ± 1.4 | 82.8 ± 3.5 | 167.7 ± 1.3 | 17.4 ± 2.0 | ND |
| C17 |  Apirigina | 94.6 ± 3.4 | 34.2 ± 2.8 | 76.6 ± 1.3 | 260.1 ± 3.5 | 42.2 ± 2.1 | ND |

Búsqueda de moléculas de origen natural con acción multidiana sobre enzimas pancreáticas digestivas: α -glucosidasa, α -amilasa y lipasa pancreática

| | | | | | | | |
|------------|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| C18 |  Quercetina | 98.2 ± 2.5 | 72.0 ± 0.7 | 94.5 ± 1.0 | 59.1 ± 0.8 | 81.7 ± 1.2 | 64.5 ± 0.8 |
| C19 |  3-O-metil-quercetina | 97.2 ± 0.1 | 98.5 ± 0.8 | 72.5 ± 1.3 | 133.4 ± 1.4 | 74.5 ± 0.3 | 57.8 ± 1.5 |
| C20 |  Pinocembrina | 25.7 ± 1.6 | ND | 24.8 ± 1.1 | ND | 38.8 ± 1.5 | ND |
| C21 |  Naringenina | 20.3 ± 1.2 | ND | 24.0 ± 3.5 | ND | 10.2 ± 3 | ND |
| C22 |  Ponciretina | 37.9 ± 3.8 | ND | 18.1 ± 4.1 | ND | 43.1 ± 1.8 | ND |
| C23 |  | 90.1 ± 2.1 | 73.6 ± 0.9 | 23.9 ± 2.5 | ND | 5.4 ± 2.5 | ND |

| | | | | | | | |
|-----|--|------------|-------------|-------------|-------------|------------|----|
| | 3,5 dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona | | | | | | |
| C24 |  5,7dihidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona | 92.9 ± 2.6 | 151.4 ± 1.4 | 40.6 ± 1.0 | ND | 21.9 ± 2.9 | ND |
| C25 |  Gnaphalin | 35.2 ± 3.4 | ND | 20.6 ± 2.5 | ND | 14.9 ± 3.2 | ND |
| C26 |  Conyzatina | 64.2 ± 3.9 | 229.6 ± 0.5 | 79.0 ± 1.1 | 122.5 ± 0.2 | 24.5 ± 3.1 | ND |
| C27 |  5,7,9-trimetoxidihidrochalcona | 38.3 ± 2.8 | ND | 3.0 ± 1.2 | ND | 40.3 ± 3.5 | ND |
| C28 |  7-hidroxi-6,3',4',5'-tetrametoxidihidrochalcona | 95.0 ± 2.6 | 37.9 ± 3.1 | 76.0 ± 3.6 | 170.9 ± 3.8 | 40.5 ± 1.5 | ND |
| | Orlistat | 0.6 ± 0.2 | ND | ND | ND | ND | ND |
| | Acarbosa | ND | ND | 345.9 ± 3.2 | ND | 3.2 ± 2.6 | ND |

(LP) lipasa pancreática, (AA) α-amilasa, (AG) α-glucosidasa, Valores de CI₅₀ ± DS. ND: No determinado

Se observa que de las cinco sesquiterpelaconas incluidas en el estudio, solo los compuestos **C1** y **C2** lograron inhibir las enzimas LP y AG con CI_{50} inferiores a $650 \mu M$, mientras que los compuestos **C7**, **C8** y **C9** lograron causar porcentajes de inhibición de la AA entre 30 y 49%, porcentajes muy superiores a los causados por las lactonas **C1** y **C2** sobre esta enzima. Los anteriores resultados sugieren que la presencia de los ésteres con una unidad de acetato en la posición 9 y una unidad de isovalerato en la posición 8 (presentes en los compuestos **C1** y **C2**) favorecen el efecto inhibitorio sobre LP y AG, mientras que la ausencia de los dos grupos éster influye positivamente en la inhibición de la AA. También es posible inferir que la posición lineal o angular del anillo lactónico, así como la presencia de un núcleo germacránolido o eudesmanolido, no tienen un efecto significativo en la inhibición causada por las lactonas **C7**, **C8** y **C9** sobre AA. Los resultados de actividad inhibitoria de las cinco lactonas constituyen el primer reporte de actividad sobre las enzimas LP, AA, y AG. Sin embargo, se tienen reportes de otras lactonas sesquiterpénicas con potencial antidiabético. Por ejemplo, para la tirotundina aislada de *Tithonia diversifolia* (Lin, 2012) se determinó que tiene actividad agonista sobre el receptor $PPAR\gamma$, que controla la expresión de genes de la síntesis y de la oxidación de ácidos grasos, y están involucrados en el almacenamiento de ácidos grasos poliinsaturados en distintos tejidos como hígado, el musculo esquelético y adiposo, efecto que le confiere gran potencial a la tirotundina para desempeñar un papel importante en el tratamiento de la diabetes. Para la lactona denominada costunólido, principio activo del extracto de hojas de *Costus speciosus*, también ha sido reportado su potencial antidiabético, encontrándose que produce una reducción significativa en el nivel de glucosa en plasma sanguíneo en modelo murino, con una dosis de 20 mg/kg (peso corporal) administrada de manera oral, así como genera un aumento en la sensibilidad a la insulina y a la captación de glucosa Según (Chen et al. 1995; Eliza et al. 2009; Liu et al. 2013).

El estudio de inhibición enzimática de los compuestos de tipo flavonoide permitió evidenciar que, de los 21 compuestos evaluados a una concentración de $300 \mu M$, 12 lograron inhibir la LP, 10 inhibir la AG y solo dos la AA. A continuación, se analizan los resultados obtenidos para cada una de las enzimas.

Lipasa pancreática (LP)

En la **Tabla 9** se puede observar los valores de CI_{50} estimados para los flavonoides activos sobre LP están entre 34.2 y 264.4 μM , encontrándose que ninguno de estos compuestos muestra una actividad superior a la del control positivo orlistat. Es importante mencionar que este estudio reporta el primer antecedente sobre la actividad inhibitoria frente a la enzima LP para la mayoría de los compuestos evaluados, incluidos los compuestos aislados **C5** y **C6** provenientes de *N. lobata*, así como los compuestos seleccionados **C10-C14**, **C19**, **C20** y **C22-C28**. En estudios previos desarrollados por Li-Mag y colaboradores se han reportado valores de CI_{50} para los compuestos **C16**, **C17** y **C18**, que corresponden a $156 \pm 22 \mu g/mL$, $256 \pm 54 \mu g/mL$ y $128 \pm 22 \mu g/mL$, respectivamente (M. M. Li et al. 2023). Es importante resaltar que, tanto en los reportes previos como en este estudio, se ha utilizado el mismo método para la cuantificación de la actividad enzimática de la lipasa pancreática (LP). Sin embargo, existen algunas diferencias en los procedimientos de pre-incubación e incubación, la concentración de enzima (2 mg/mL) y el uso del sustrato (palmitato de p-nitrofenilo). Dichas variaciones metodológicas podrían ser las responsables de las marcadas diferencias observadas en los resultados informados en la literatura. Por lo tanto, es fundamental tener en cuenta estas discrepancias al interpretar y comparar los datos obtenidos en diferentes estudios. Esto se puede evidenciar en el caso de los compuestos que no inhibieron más del 50% en la primera etapa sobre la enzima LP, pero cuyos valores de CI_{50} están reportados en literatura. Para los compuestos **C15**, **C16**, **C17**, **C18** y **C21**: $CI_{50} > 593 \mu M$, $156 \pm 22 \mu g/mL$, $256.6 \pm 54 \mu g/mL$, $128 \pm 22 \mu M$ y $603.2 \pm 41 \mu g/mL$, respectivamente (Li-Mag et al., 2023).

Según en nuestros resultados, se resalta la importancia de la presencia del doble enlace en el anillo C para inhibir la actividad catalítica de la LP, lo cual se evidencia con el hecho de que los compuestos **C20**, **C21** y **C22**, que fueron las únicas flavanonas incluidas en el estudio, causaron inhibiciones inferiores al 40% a la máxima concentración evaluada. También se observa que la sustitución de los anillos A y B del flavonoide es importante para la inhibición de la LP, pues las flavonas que no tienen sustitución en el anillo B y que tienen uno sustituyente en el anillo A o carecen de sustitución en el anillo A, no lograron superar el 40% de inhibición a la máxima concentración evaluada (**C10-C13**). La presencia del

grupo OH en el carbono 6 del anillo A de la flavona tiene un efecto negativo en la actividad inhibitoria sobre LP, lo cual se evidencia al comparar el valor CI_{50} de los compuestos **C15** y **C16**, siendo este último aproximadamente 3 veces menos activo que **C15**.

Otra observación importante es que en general los compuestos de tipo flavona mostraron una actividad entre 1.5 y 2 veces superior a la de los flavonoles, por ejemplo, los compuestos **C15** y **C17** exhibieron valores CI_{50} de 62.0 y 34.2 μM , respectivamente, valores de CI_{50} menores comparados con los de compuestos **C18** y **C19** con valores de CI_{50} de 72.0 y 98.5 μM , respectivamente. Por otro lado, se puede inferir que la presencia de grupos metoxilo en la posición 3 del flavonoide disminuye la actividad sobre la enzima LP, pues los compuestos **C18** y **C23** que tienen el hidroxilo en el carbono 3 tienen menores valores CI_{50} de los compuestos 3-O-metilados (**C5**, **C6**, **C2** y **C26**). Estas diferencias pueden estar relacionados con la disminución en el número de aceptores/donadores de enlaces de hidrógeno, que son interacciones que favorece la actividad sobre la LP. (Vasas et al. 2021) Comparando la actividad inhibitoria exhibida por los flavonoles 3-O-metilados, es posible evidenciar que la polisustitución en el anillo A, ya sea con grupos OH o OCH_3 , favorece la actividad sobre la LP, pues se observa que el compuesto **C25** que solo tiene dos sustituyentes en el anillo A no logró inhibir en más del 35% la enzima a la máxima concentración, mientras que los compuestos **C5**, **C6**, **C24** y **C26** que tienen tres o más sustituyentes en el anillo A exhibieron valores CI_{50} entre 134 y 229 μM .

Finalmente, se destaca el potencial inhibitorio del compuesto **C28**, un flavonoide tipo chalcona, con un potencial valor de CI_{50} de 37.9 μM sobre la enzima LP. Su actividad se le atribuye a la presencia del grupo carbonilo α,β -insaturado, que le confiere la capacidad de actuar como aceptor de Michael, permitiéndole interactuar con diversas dianas enzimáticas. Además, se ha reportado en varios estudios que la presencia de grupos donantes de electrones, como metilo, etilo y metoxi en la posición para del anillo B del fenilo, contribuye a una interacción mejorada con diversas enzimas (Kovács et al. 2023; Vasas et al. 2021).

α -glucosidasa

En la **Tabla 9** se observa que sobre AG Los valores CI_{50} obtenidos para los flavonoides activos oscilan entre 59.11 y 260 μ M. Es importante destacar que todos los compuestos activos mostraron un efecto inhibitorio mayor sobre la enzima AG en comparación con el control positivo acarbossa. Específicamente, el compuesto **C20** mostró la mayor actividad, siendo aproximadamente 17 veces más potente que el control positivo. Además, se observó que los compuestos aislados de *N. lobata* corresponden **C5** y **C6** inhibieron la actividad catalítica de esta enzima con valores de CI_{50} de 170.3 y 215.2 μ M, respectivamente siendo estos aproximadamente 1,5 veces más activos que el control positivo acarbossa. Para los flavonoides **C15- C18** y **C21**, se ha reportado su actividad frente a la enzima AG, encontrándose que los resultados obtenidos en este estudio difieren de los reportes previos por realizados por Fan You y colaboradores reportando valores de CI_{50} de 422.67 ± 9.37 μ g/mL, 277.94 ± 6.21 μ g/mL, para **C15** y **C16** (K. Li et al. 2018). En estudios desarrollados por Kashtoh como Baek y colaboradores reportan valores de CI_{50} para el compuesto **C17** de 231.13 ± 5.35 μ g/mL (Kashtoh and Baek 2022), para **C18** una CI_{50} de 1.84 mM reportado por Abdullah y colaboradores (Abdullah et al. 2016), y el compuesto **C21** con un valor de CI_{50} 73 μ M, reportado por Tadera y colaboradores (Tadera et al. 2006) Tanto en los reportes previos como en el presente estudio, se empleó el mismo método para la cuantificación de la actividad enzimática de AG, sin embargo, existen diferencias en los tiempos de reacción, pre-incubación e incubación, así como en las concentraciones de sustrato y enzima utilizadas en cada caso. Estas variaciones metodológicas pueden ser las responsables de las marcadas diferencias en los resultados encontrados en las diferentes investigaciones. Es importante resaltar que en este estudio se reporta por primera vez para los demás flavonoides estudiados la inhibición de la actividad catalítica de AG.

Analizando los resultados obtenidos y la estructura de los compuestos bioactivos, es posible evidenciar la importancia del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 en el anillo C para la actividad inhibitoria de los compuestos sobre la enzima AG, pues en el caso de las flavanonas **C20**, **C21** y **C22** se encontró que no logran inhibir más del 38% la actividad catalítica de la AG a la máxima concentración evaluada. Por otro lado, se observó que los compuestos de tipo flavonol mostraron una mayor actividad que las flavonas, por ejemplo,

el compuesto **C18** exhibió con un valor CI_{50} de 59.1 μM , lo cual indica una mayor potencia inhibitoria en comparación con los compuestos **C15**, **C16** y **C17** que presentaron valores de CI_{50} de 174.2, 167.7 y 160.1 μM respectivamente. Según nuestros resultados, la hidroxilación en los anillos A y B de los compuestos de tipo flavona tiene un efecto significativo sobre la actividad inhibitoria sobre AG. Esto se evidencia en los compuestos **C17** y **C16**, con valores de CI_{50} de 160.1 y 167.7 μM , respectivamente, los cuales son más activos que el compuesto **C15** con un valor CI_{50} de 174.4 μM . Estas diferencias se deben al aumento en el número de aceptores/donadores de enlaces de hidrógeno y a la posición de los sustituyentes en los anillos A, B y/o C, lo cual favorece la actividad sobre AG. (K. Li et al. 2018) Por otro lado, al comparar los compuestos **C18** y **C19**, se observa que la actividad se ve disminuida en el compuesto **C19** debido a la presencia del grupo metilo en la posición C-3 del anillo C. También se encuentra que existe un efecto negativo en la inhibición de la enzima AG debido a la presencia de dos o más grupos metoxilo en el anillo A, lo cual se evidencia en los compuestos **C23** y **C24**, que exhibieron porcentajes de actividad sobre la enzima AG del 23.9% y 40.6%, respectivamente.

α -amilasa

Como se mencionó anteriormente, de los 21 flavonoides evaluados en este estudio, únicamente dos compuestos, **C18** y **C19** demostraron la capacidad de inhibir la enzima AA. Los valores de CI_{50} para estos compuestos, respectivamente, fueron de 64.5 y 57.8 μM , sin embargo, es importante destacar que ninguno de los compuestos activos superó la actividad del control positivo acarbosa (**Tabla 9**). Se ha reportado para el compuesto **C18** actividad inhibitoria de la enzima AA, con valores CI_{50} de 770 $\mu\text{g/mL}$ (Meng et al. 2016). Es importante destacar que los resultados obtenidos en este estudio y los reportados por Yonghong no son comparables debido a las diferencias en la metodología utilizada. En el estudio previo, se empleó almidón soluble al 1% como sustrato, se realizaron tiempos de incubación de 3 minutos y se empleó una longitud de onda de medición de 540 nm. Cabe destacar que este estudio representa el primer informe sobre la actividad inhibitoria de los demás flavonoides estudiados. Analizando las estructuras de todos los flavonoides que no superaron una inhibición del 50% a la máxima concentración evaluada con la de los dos

flavonoides activos, es posible inferir que el patrón de hidroxilación en las posiciones 5, 7, 3' y 4' de núcleo del flavonoide es determinante para ejercer un efecto inhibitorio sobre AA, siendo los compuestos **C18** y **C19** los únicos flavonoides del estudio que tienen dicho patrón de sustitución. También es posible observar que la actividad inhibitoria sobre AA se ve disminuida en el compuesto **C19** debido a la presencia del grupo metilo en el carbono C-3 del anillo C.

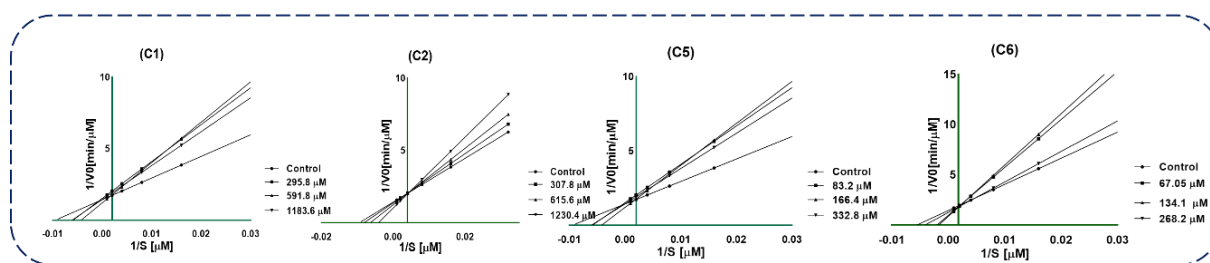
3.4. Determinación del tipo de inhibición enzimática sobre de los compuestos bioactivos LP, AA y AG

3.4.2. Estudio de inhibición sobre lipasa pancreática (LP).

Con cada uno de los compuestos bioactivos evaluados, se realizó un estudio de cinética enzimática, variando las concentraciones de inhibidor y sustrato, con el objetivo de determinar el tipo de inhibición que ejercen sobre la enzima LP. Para esto, se utilizaron gráficos de doble recíproca de Lineweaver-Burk ver **Figura-22**. El análisis cinético permitió determinar que los compuestos aislados de *N. lobata* **C1**, **C2**, **C5** y **C6** junto los compuestos seleccionados **C14**, **C16**, **C19**, **C23**, **C24** y **C26** actúan como inhibidores de tipo competitivo, mientras que los compuestos **C17** y **C18** se comportan como inhibidores de tipo mixto y el compuesto **C28** como inhibidor no competitivo. Estos resultados sugieren que las sesquiterpenlactonas y la mayoría de los flavonoides compiten con el sustrato en el sitio activo de la enzima. Además, se estimaron las constantes de inhibición (K_i) para establecer la afinidad de los inhibidores por la enzima (**Tabla 10**), encontrándose que las constantes de inhibición oscilan entre 34.2 y 305.5 μM , encontrándose que las constantes de inhibición estimadas para **C17**, **C23** y **C28** son menores a la K_m (47.4 μM) de la enzima, por lo tanto, es posible afirmar que estos inhibidores tienen mayor afinidad con la enzima que el sustrato empleado en el ensayo, mientras que los demás inhibidores tienen menor afinidad con la enzima. Es importante mencionar que estudios previos realizados por los investigadores, como Feng et al.(2020) y Martínez et al, (2021), reportan a los compuestos **C17** y **C18** como inhibidores mixtos de la LP, (Martinez-Gonzalez et al. 2020; Zhou et al.

2021), lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo. Además, estudios desarrollados por Sarayu y colaboradores (Pai et al. 2020) reportan al compuesto **C15** como inhibidor competitivo de la LP, lo cual también concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación. Es relevante destacar el primer reporte del mecanismo de acción para los compuestos **C5**, **C6**, **C14**, **C19**, **C23**, **C24**, **C26** y **C28** sobre la enzima LP.

Compuestos aislados de *N. lobata*



Compuestos seleccionados

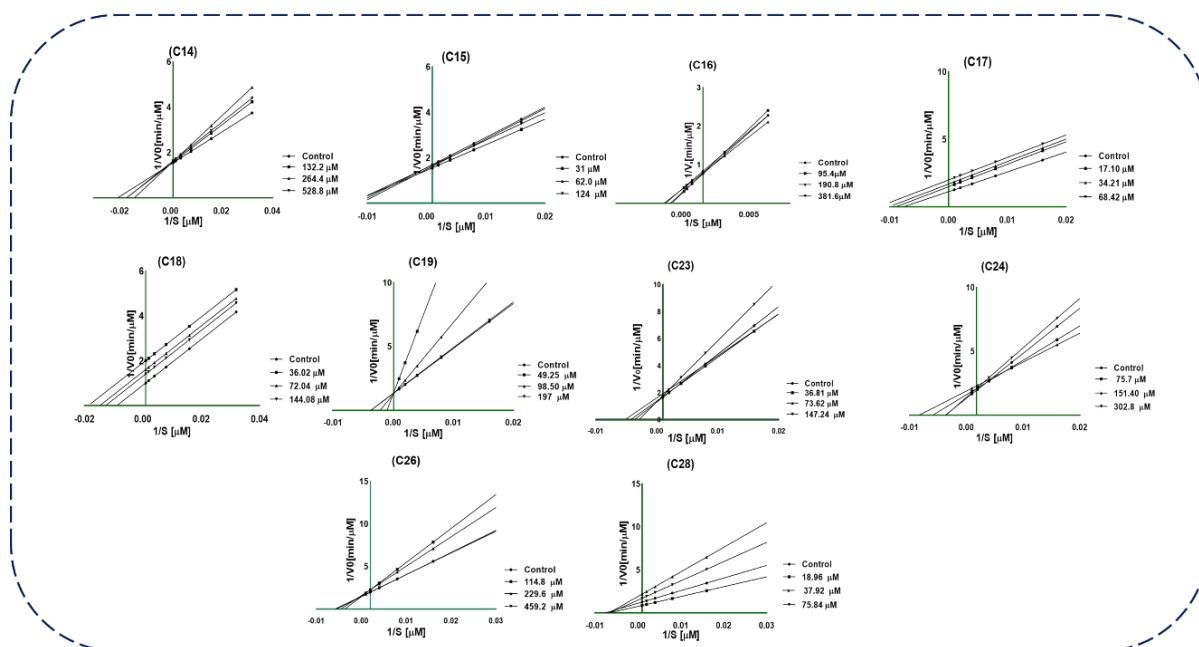
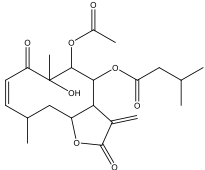
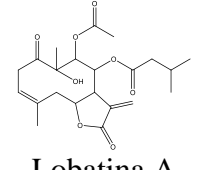
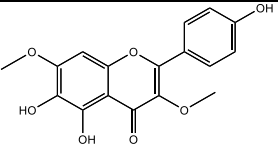
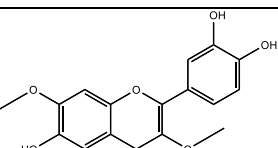
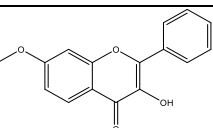
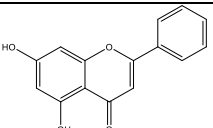
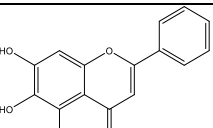
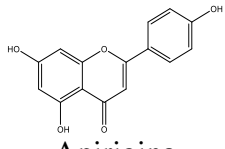
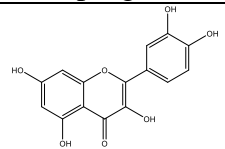
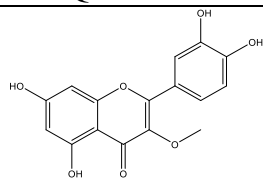
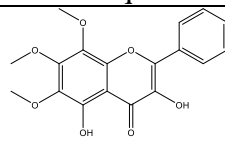
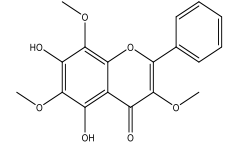
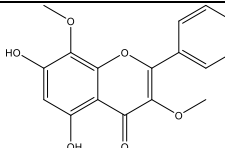
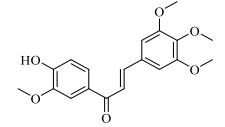


Figura- 22 Gráficos Lineweaver-Burk del estudio cinético de los compuestos activos sobre LP

Tabla 10 Inhibidores de lipasa pancreática y tipo de inhibición

| compuestos / control (+) | Estructura | lipasa pancreática (LP) | | |
|-----------------------------|--|-----------------------------|------------|-------------------|
| | | CI ₅₀ (μ M) | Ki μ M | Tipo de inhibidor |
| Sesquiterpenlactonas | | | | |
| C1 |  Neurolenina B | 591.8 \pm 1.2 | 285.5 | Competitivo |
| C2 |  Lobatina A | 615.6 \pm 2.9 | 305.5 | Competitivo |
| Flavonoides | | | | |
| C5 |  5,6,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol | 166.4 \pm 3.2 | 83.2 | Competitivo |
| C6 |  5,6,3',4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol | 134.1 \pm 0.7 | 67 | Competitivo |
| C14 |  3-hidroxi-7-metoxiflavona | 264.4 \pm 0.5 | 132 | Competitivo |
| C15 |  Crisina | 62.0 \pm 0.8 | 55.2 | Competitivo |
| C16 |  Baicaleín | 190.8 \pm 1.4 | 95.2 | Competitivo |

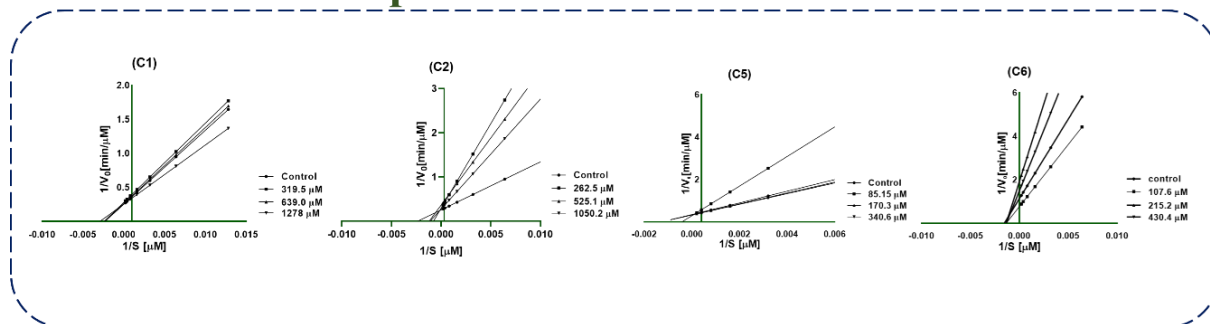
| | | | | |
|-----------------|---|-----------------|-------|----------------|
| C17 |  Apirigina | 34.2 ± 2.8 | 34.2 | Mixto |
| C18 |  Quercetina | 72.0 ± 0.7 | 71.5 | Mixto |
| C19 |  3-O-metil-quercetina | 98.5 ± 0.8 | 49 | Competitivo |
| C23 |  3,5 dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona | 73.6 ± 0.9 | 36.5 | Competitivo |
| C24 |  5,7 dihidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona | 151.4 ± 1.4 | 75.5 | Competitivo |
| C26 |  Conyzatina | 229.6 ± 0.5 | 114.5 | Competitivo |
| C28 |  7-hidroxi-6,3',4',5'-tetrametoxidihidrochalcona | 37.9 ± 3.1 | 37.4 | No Competitivo |
| Orlistat | | 0.6 ± 0.2 | 1.7 | Irreversible |

3.4.3. Estudio de inhibición sobre α -glucosidasa (AG).

Con cada uno de los compuestos bioactivos evaluados, se realizó un estudio de cinética enzimática, variando las concentraciones de inhibidor y sustrato, con el objetivo de determinar el tipo de inhibición ejercen sobre la enzima AG. Para ello, se utilizaron gráficos de Lineweaver-Burk, como se observan en la **Figura-23**. El análisis cinético permitió determinar que los aislados por *N. lobata* **C1**, **C2**, **C5** y **C6**, junto con los compuestos **C15** al **C18**, actúan como inhibidores de tipo competitivo, mientras que los compuestos **C1**, **C2**, **C19**, **C26** y **C28** se comportan como inhibidores de tipo no competitivo. Además, se estimaron las constantes de inhibición (K_i) para establecer la afinidad de los inhibidores por la enzima (**Tabla 11**), y se observa que las constantes de inhibición oscilan entre 58.1 y 318 μM , sin embargo, encontrándose que todas las constantes de inhibición estimadas son mayores a la K_m (12 μM), por lo tanto, es posible afirmar que los inhibidores tienen menor afinidad con la enzima que el sustrato empleado en el ensayo.

Es importante mencionar que estudios previos realizados por Freitas y colaboradores, reportan a los compuestos **C18** y **C19** como inhibidores competitivos de la AG (Proença et al. 2017), lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo. Además, se resalta el primer reporte del mecanismo de acción para los compuestos **C5** y **C6** provenientes de *N. lobata*, junto con los compuestos **C14**, **C15**, **C19**, **C26** y **C26** sobre la enzima AG.

Compuestos aislados de *N. lobata*



Compuestos seleccionados

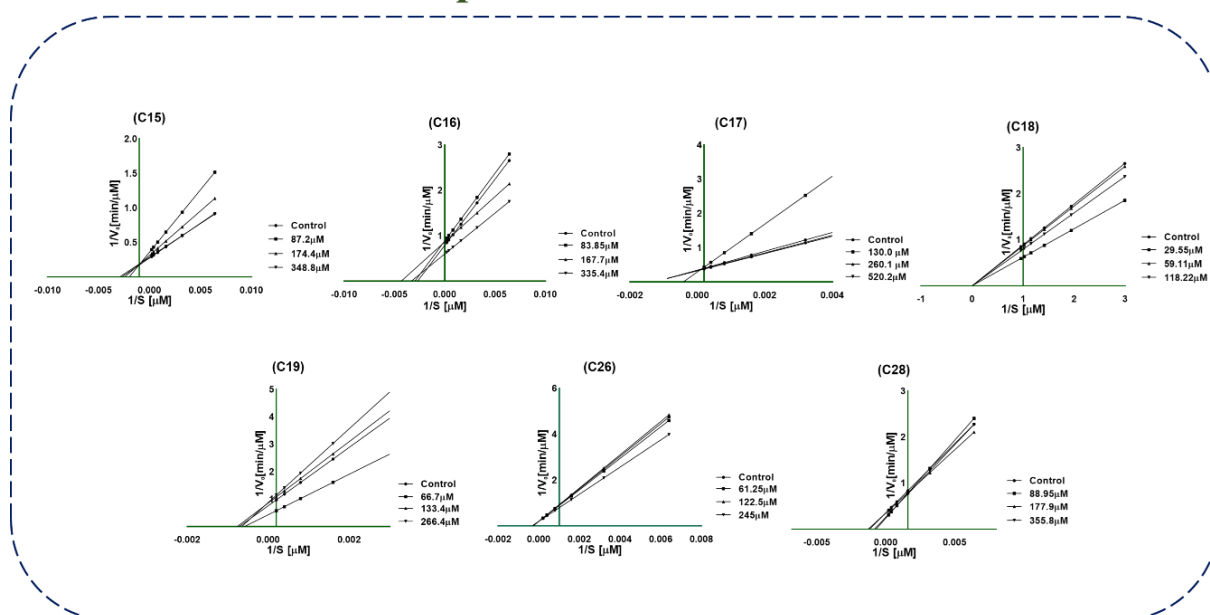
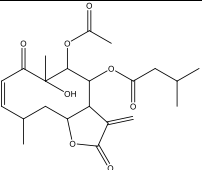
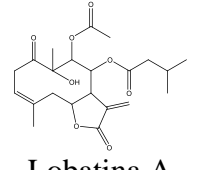
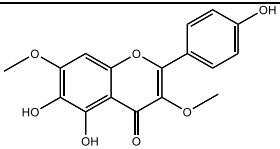
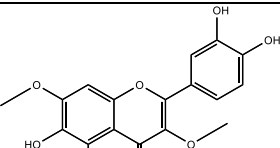
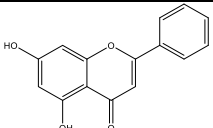
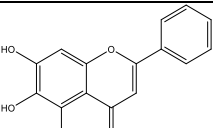
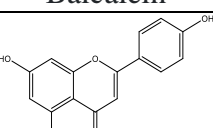
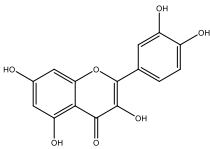
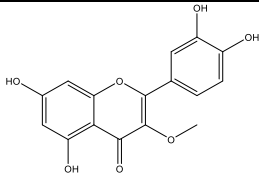
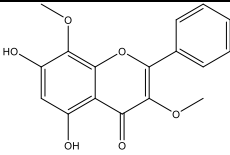
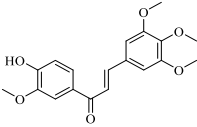


Figura- 23 Gráficos Lineweaver-Burk del estudio cinético de los compuestos activos sobre AG

Tabla 11 Inhibidores de α -glucosidasa y tipo de inhibición

| compuestos / control (+) | Estructura | α -glucosidasa (AG) | | |
|-----------------------------|--|-----------------------------|------------|-------------------|
| | | CI ₅₀ (μ M) | Ki μ M | Tipo de inhibidor |
| Sesquiterpenlactonas | | | | |
| C1 |  Neurolenina B | 639.0 \pm 3.8 | 318.2 | Competitivo |
| C2 |  Lobatina A | 525.1 \pm 4.7 | 238.7 | Competitivo |
| Flavonoides | | | | |
| C5 |  5,6,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol | 170.3 \pm 2.2 | 85 | Competitivo |
| C6 |  5,6,3',4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol | 215.2 \pm 2.1 | 107.2 | Competitivo |
| C15 |  Crisina | 174.4 \pm 2.3 | 87.1 | Competitivo |
| C16 |  Baicaleín | 167.7 \pm 1.3 | 83.7 | Competitivo |
| C17 |  Apirigina | 260.1 \pm 3.5 | 130 | Competitivo |

| | | | | |
|-----------------|--|-----------------|-------|----------------|
| C18 |  Quercetina | 59.1 ± 0.8 | 58.1 | Competitivo |
| C19 |  3-O-metil-quercetina | 133.4 ± 1.4 | 66.5 | No Competitivo |
| C26 |  Conyzatina | 122.5 ± 0.2 | 122.2 | No Competitivo |
| C28 |  7-hidroxi-6,3',4',5'- tetrametoxidihidrochalcona | 170.9 ± 3.8 | 85.3 | No competitivo |
| Acarbosa | | 345.9 ± 3.2 | 56.3 | Competitivo |

3.4.4. Estudio de inhibición sobre α -amilasa (AA).

El estudio de cinética enzimática sobre AA permitió determinar que los compuestos **C18** y **C19** actúan como inhibidores de tipo competitivo (**Figura-24** y **Tabla 12**), encontrándose que las constantes de inhibición de los compuestos **C18** y **C19** son 32.9 y 28.7 μM , respectivamente, evidenciando que los valores de K_i determinados para los dos inhibidores son menores que la K_m (340 μM), lo que indica que estos tienen mayor afinidad por la enzima que el sustrato empleado en el ensayo. Es importante mencionar que estudios previos realizados por Dandekary y colaboradores, reportan al compuesto **C18** como inhibidor mixto y/o competitivo de la AA (Dandekar et al. 2021) lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo. Es relevante destacar el reporte del mecanismo de acción para el compuesto **C19** sobre AA.

Compuestos seleccionados

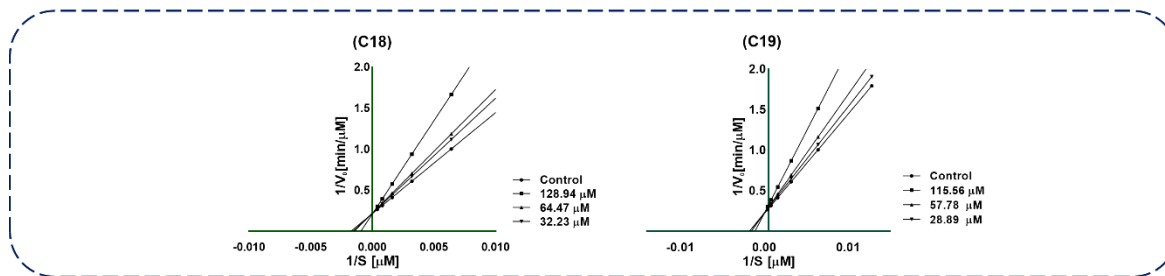
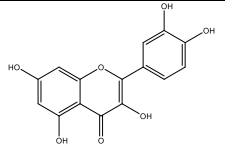
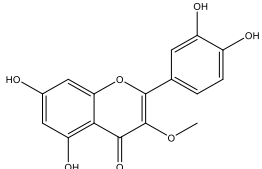


Figura- 24 Gráficos Lineweaver-Burk del estudio cinético de los compuestos activos sobre AA.

Tabla 12 Inhibidores de α -amilasa y tipo de inhibición

| compuestos / control (+) | Estructura | α -amilasa (AA) | | |
|--------------------------|---|-----------------------------|------------|-------------------|
| | | CI ₅₀ (μ M) | Ki μ M | Tipo de inhibidor |
| Flavonoides | | | | |
| C18 |  Quercetina (C18) | 64.5 \pm 0.8 | 32.9 | Competitivo |
| C19 |  3-O-metil-quercetina | 57.8 \pm 1.5 | 28.7 | Competitivo |
| Acarbosa | | 3.16 \pm 2.6 | 35.5 | Competitivo |

4. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

El presente trabajo contribuye en la búsqueda de moléculas con potencial inhibitorio, frente a la lipasa pancreática (LP), α -glucosidasa (AG) y α -amilasa (AA). Además, la evidencia científica del uso tradicional de *Neurolaena lobata* como un remedio natural con propiedades terapéuticas frente a la diabetes y la obesidad. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir:

- El estudio fitoquímico realizado sobre las hojas de *N. lobata* permitió el aislamiento e identificación de dos sesquiterpenlactonas (**C1** y **C2**), dos derivados de ácidos aromáticos (**C3** y **C4**) y dos flavonoides (**C5** y **C6**), de los cuales **C3** a **C6** se reportan por primera vez en la especie.
- En el estudio se reporta por primera la acción inhibitoria multidiana frente a las enzimas LP, AG y/o AA para el extracto HA, algunas fracciones (AcOEt e iPrOH) y los compuestos **C1**, **C2**, **C5**, y **C6**, encontrándose que el extracto y las fracciones tienden a ser moderadamente tóxicos sobre las línea celulares MRC-5 y BHK-21, mientras que los compuestos **C5** y **C6** con altamente tóxicos sobre la línea celular BHK-1 y levemente tóxicos sobre la línea celular MRC-5

- La caracterización química y biológica de las **PT** de *N. lobata* obtenidas a partir de hojas frescas y secas, permite concluir que los remedios tradicionales consumidos por las poblaciones en el pacífico colombiano son menos efectivas para inhibir las enzimas LP, AA y AG en comparación con el extracto hidroalcohólico **HA**, destacándose las PT obtenidas de hojas fresca como las más activas sobre las tres enzimas. También fue posible evidenciar que la neurolenina B (C1) está presente tanto en las **PT** como en el extracto **HA** en cantidades similares, mientras que los compuestos **C5** y **C6** están contenidos en mayor proporción en el extracto **HA** y no pudieron ser detectados en las **PT** obtenidas de hojas frescas.
- Para que los compuestos de tipo sesquiterpenlactona estudiados inhiban la actividad catalítica de las enzimas AG y LP ser requiere la presencia de grupos éster en las posiciones 9 y 8 del anillo lactónico, como es el caso de los compuestos **C1** y **C2**. Estas lactonas se comportan como inhibidores competitivos de AG y LP, con constantes de inhibición (K_i) mayores a la de K_m de las dos enzimas, lo que indica que son inhibidores menos afines por las enzimas en comparación con los sustratos.
- En el caso de los flavonoides se encuentra que los compuestos de tipo flavanona no son capaces de inhibir ninguna de las enzimas, haciéndose evidente la importancia de la insaturación entre los carbonos 2 y 3 del núcleo flavonoide para ejercer efectos inhibitorios sobre las tres enzimas de interés. La mayoría de los flavonoides inhibidores de las enzimas se comportaron como inhibidores de tipo competitivo o mixto sobre AA, AG y/o LP, y en general son menos afines por las enzimas que los sustratos empleados en cada caso, a excepción de los compuestos **C17**, **C23** y **C28** sobre LP y **C18** y **C19** sobre AA, pues fueron los únicos compuestos que presentaron valores de K_i menores que las K_m de las respectivas enzimas.
- De los compuestos estudiados, solo **C18** y **C19** lograron inhibir la actividad catalítica de las tres enzimas digestivas, catalogándose como inhibidores multidiana o polifarmacológicos.

5.2. Recomendaciones

- Es de importancia continuar con las investigaciones fitoquímicas en la especie *N. lobata* y en otras especies pertenecientes al género *Neurolaena* presentes en Colombia, con el fin de contribuir a la caracterización química de estas especies y para obtener otros constituyentes químicos con potencial de inhibición enzimática frente a LP, AA y AG, que contribuyan a dar mayor robustez a los resultados obtenidos.
- Se recomienda evaluar las preparaciones tradicionales provenientes de *N. lobata* frente a otros modelos biológicos, para seguir contribuyendo a la validación de los usos tradicionales que se le dan a la especie.
- Es importante seguir realizando estudios que permitan determinar el mecanismo de acción de los compuestos que tuvieron actividad sobre las enzimas LP, AA y AG, y realizar otros ensayos sobre los modelos de diabetes y obesidad con el fin de ampliar el espectro de actividad.
- Se recomienda realizar estudios computacionales QSAR sobre las moléculas con mayor potencial con el fin de validar y establecer relaciones de estructura actividad cuantitativas y predecir algunos compuestos más activos. Para esta fase es necesario tener un mayor número de moléculas por lo que se recomienda contemplar estudios de síntesis de derivados y análogos de los núcleos de interés.
- Realizar estudios de optimización farmacodinámica e incluir un mayor número de ligandos para hacer más robusto el modelo computacional, para predecir moléculas con mayor afinidad e interacción con las dianas biológicas de interés.

5. ANEXOS

5.1. Anexos 1

Datos espectroscópicos y constantes físicas de los compuestos:

Neurolenina B (C1)

Lobatina-A (C2)

Acido *p*-hidroxibenzoico (C3)

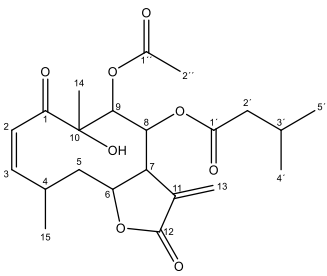
Acido 3,4-dihidroxibenzoico (C4)

5, 6, 4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol (C5)

5, 6, 3',4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol (C6)

5.1.1. Anexo A1. Datos espectroscópicos y espectros RMN para el compuesto C1

Tabla A 1.1 Datos espectroscópicos para el compuesto C1

| | | |
|--|---|--|
|  | Nombre | Neurolenina B |
| | Estado Físico | Sólido blanco |
| | Formula Molecular | C ₂₂ H ₃₀ O ₈ |
| | Peso Molecular | 422.47 g/mol |
| | Punto De Fusión | 165-164°C |
| | [α]²⁰_D | -285.9° |
| <p>RMN ¹H: (300 MHz, CDCl₃) δ 6.58 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 6.00 (t, J = 11.5 Hz, 1H), 5.80 (s, 1H), 5.54 (s, 2H), 4.54 (dd, J = 11.8, 4.9 Hz, 1H), 4.12 (s, OH), 3.09 (m, 1H), 2.58 (s, 1H), 2.09 (s, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.04 – 1.95 (m, 1H), 1.94 – 1.88 (m, 1H), 1.81 (td, J = 13.8, 12.4, 4.9 Hz, 1H), 1.41 (td, J = 13.8, 11.8, 5.3 Hz, 1H), 1.32 (s, 3H), 1.11 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 6.1 Hz, 6H).</p> | | |
| <p>APT: (75 MHz, CDCl₃) δ 204.8 (C-1, C=O), 170.2 (C-1', C=O), 170.4 (C-1'', C=O), 168.9 (C-12, C=O), 148.3 (CH, C-3), 134.9 (C, C11), 126.7 (CH₂ C-13), 125.4 (CH, C-2), 79.4 (C, C-10), 76.5 (CH, C-6), 74.0 (CH, C-9), 73.9 (CH, C-8), 42.7 (CH₂, C-2'), 41.3 (CH, C-7), 40.4 (CH₂, C-5), 28.3 (CH, C-4), 25.0 (CH, C-3'), 23.8 (CH₃, C-14), 22.5 (CH₃, C-4'), 22.3 (CH₃, C-5'), 20.7 (CH₃, C-2'), 19.8 (CH₃, C-15).</p> | | |
| (Passreiter, Wendisch, and Gondol 1995) | | |

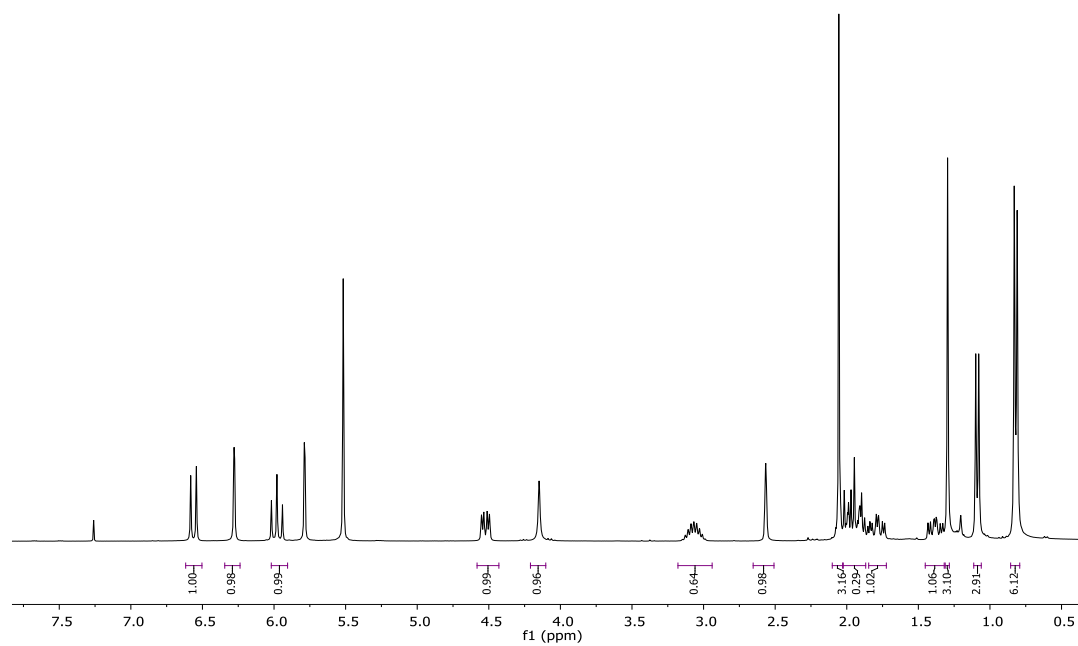


Figura A 1.1 Espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) compuesto C1

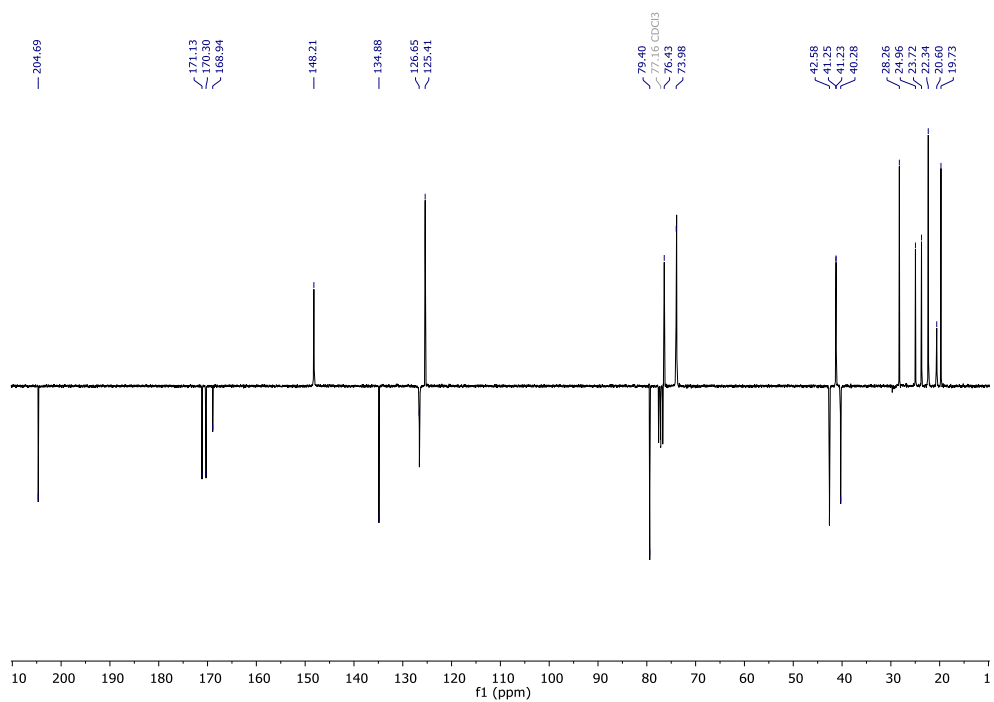
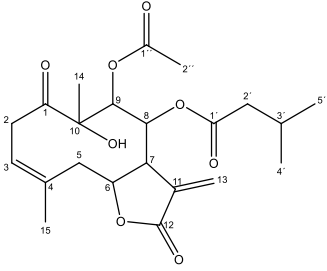


Figura-A1.2 Espectro APT (75 MHz, CDCl_3) compuesto C1

5.1.2. Anexo A1. Datos espectroscópicos y espectros RMN para el compuesto C2

Tabla A2.1 Datos espectroscópicos para el compuesto C2

| | | |
|--|---|--|
|  | Nombre | Lobatina-A |
| | Estado Físico | Sólido blanco |
| | Formula Molecular | C ₂₂ H ₃₀ O ₈ |
| | Peso Molecular | 422.47 g/mol |
| | Punto De Fusión | 123-124 °C |
| | [α]²⁰_D | -298.9° |
| <p>RMN ¹H: (300 MHz, CDCl₃) δ 6.31 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 5.91 (t, J = 9.58, 8.13 Hz, 1H), 5.85 (dd, J = 10.4, 1.6 Hz, 1H), 5.69 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 5.65 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.92 (dt, J = 7.7, 3.8 Hz, 1H), 4.25 (s, 1H), 3.57 (dd, J = 15.9, 9.6 Hz, 1H), 3.06 (dd, J = 15.9, 7.9 Hz, 1H), 2.82 (dd, J = 15.1, 3.6 Hz, 1H), 2.73 (dd, J = 15.0, 4.2 Hz, 1H), 2.61 (m, J = 7.8, 3.1, 1.6 Hz, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.12 (m, 1H), 2.08 (m, 1H), 1.89 (m, 1H), 1.84 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 0.88 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 0.85 (d, J = 4.5 Hz, 3H).</p> | | |
| <p>APT: (75 MHz, CDCl₃) δ 210.1 (C, C=O), 171.0 (C, C=O), 170.5 (C, C=O-1'), 168.2 (C, C=O), 136.8 (C, C-4), 134.4 (C, C-11), 124.4 (CH₂, C-13), 121.5 (CH, C-3), 80.6 (C, C-10), 76.7 (CH, C-9), 72.6 (CH, C-6), 66.6 (CH, C-8), 42.9 (CH₂, C-5), 42.2 (CH, C-7), 36.2 (CH₂, C-2'), 36.0 (CH₂, C-2), 25.6 (CH₃, C-14), 25.6 (CH₃, C-14), 25.5 (CH, C-3'), 22.6 (CH₃, C-15), 22.5 (CH₃, C-4'), 22.3 (CH₃, C-4'), 22.3 (CH₃, C-5'), 20.7 (CH₂, C-2').</p> | | |
| (Passreiter, Wendisch, and Gondol 1995) | | |

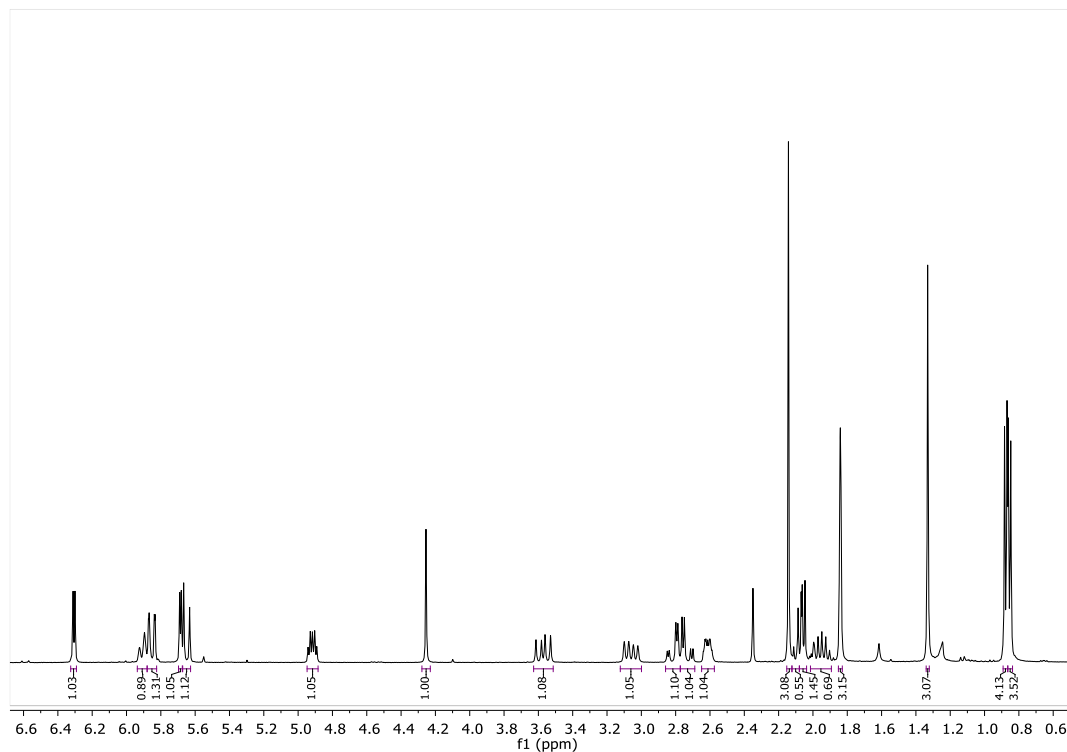


Figura-A2.1 Espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) compuesto C2

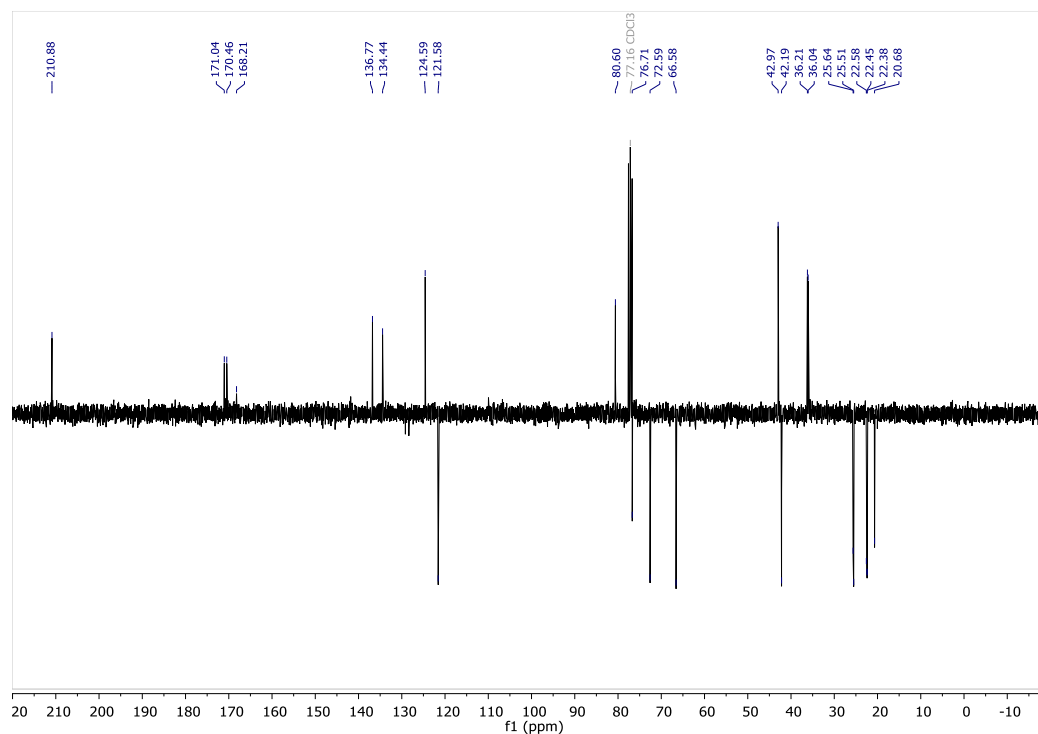
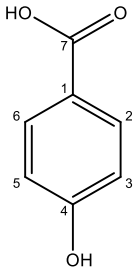
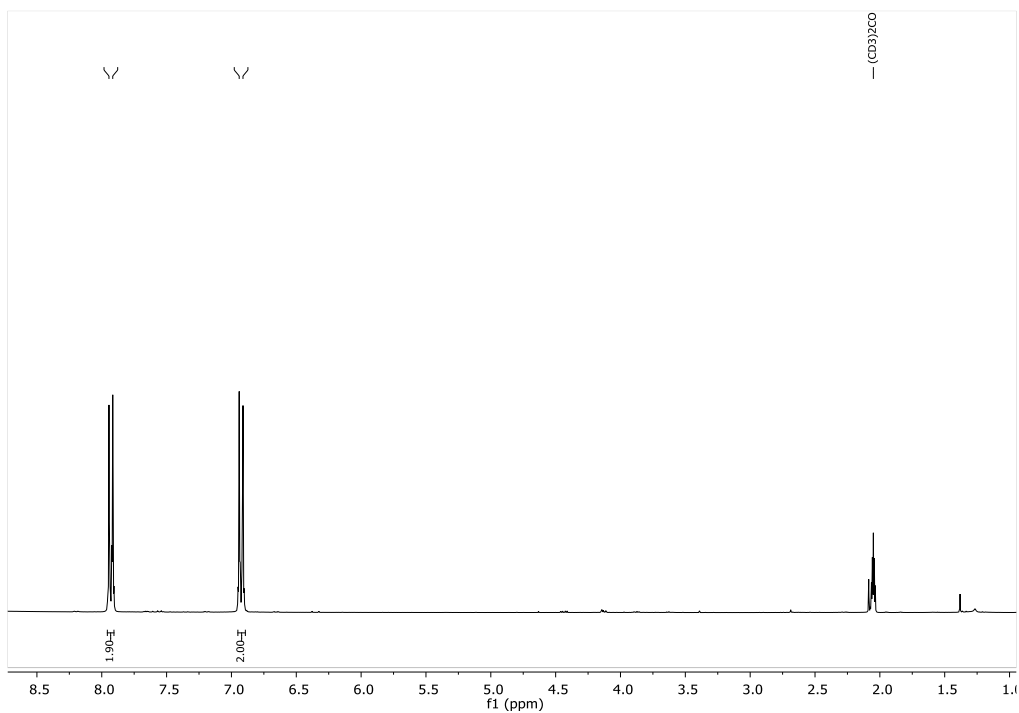


Figura-A2.1 Espectro APT (75 MHz, CDCl_3) compuesto C2

5.1.3. Anexo A1. Datos espectroscópicos y espectros RMN para el compuesto C3

Tabla A 3.1 Datos espectroscópicos para el compuesto C3

| | | |
|---|--------------------------|--|
|  | Nombre | Ácido p-hidroxibenzoico |
| | Estado Físico | Sólido amarillo |
| | Formula Molecular | C ₇ H ₆ O ₃ |
| | Peso Molecular | 138.03 g/mol |
| | Punto De Fusión | 206-208 °C |
| RMN ¹H: (400 MHz, Acetona-d₆) δ 7.92 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H-2,6), 6.92 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H-3,5). | | |
| APT: NMR (100 MHz, Acetona-d₆) δ 115.9 (CH, C-3, 5), 122.6 (C, C-1), 132.7 (CH, C-2, 6), 162.6 (C, C-4), 167.7 (C, C=O). | | |
| (Xin, Aisa, and Wang 2008) | | |

Figura-A3.1 Espectro RMN ¹H (300 MHz, Acetona-d₆) compuesto C3

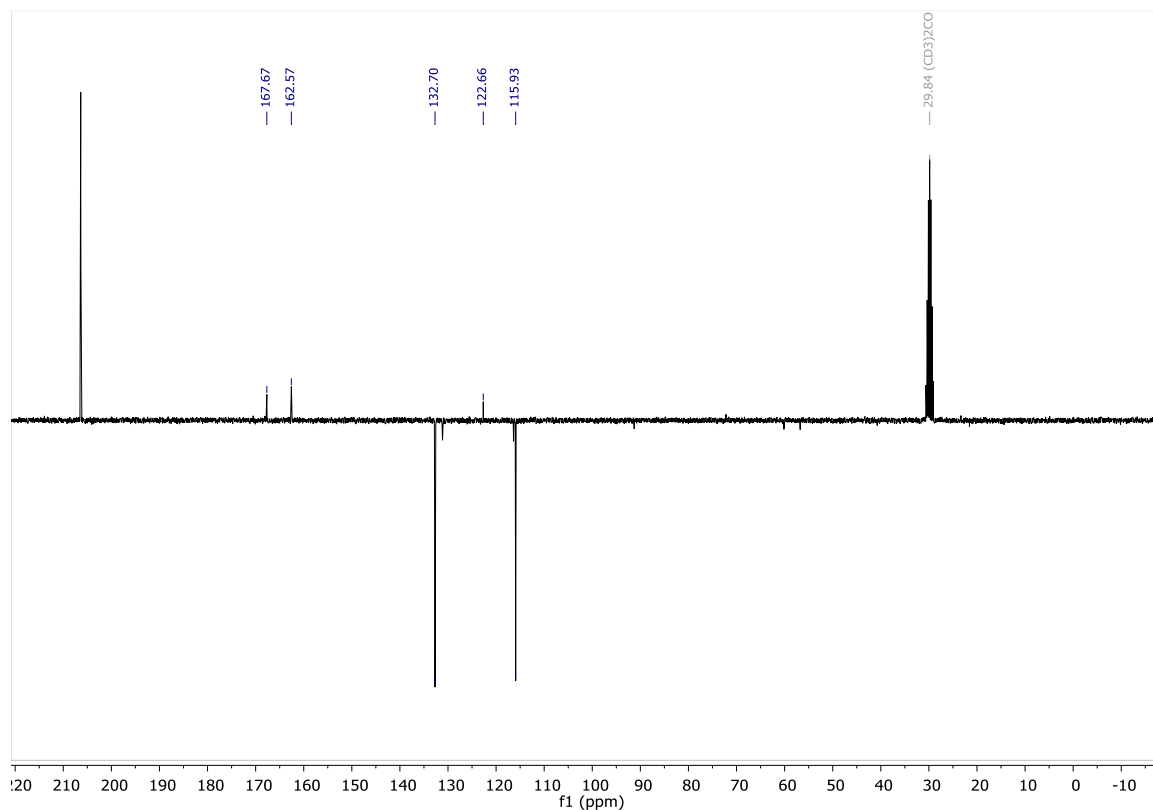


Figura-A3.2 Espectro APT (75 MHz, Acetona-d₆) compuesto **C3**

5.1.4. Anexo A1. Datos espectroscópicos y espectros RMN para el compuesto **C4**

Tabla A 4.1 Datos espectroscópicos para el compuesto **C4**

| | | |
|---|--------------------------|--|
| | Nombre | Ácido 3,4-dihydroxibenzoico |
| | Estado Físico | Sólido amarillo |
| | Formula Molecular | C ₇ H ₆ O ₂ |
| | Peso Molecular | 154.12 g/mol |
| | Punto De Fusión | 193-195 °C |
| RMN ¹H: (400 MHz, CD₄O) δ 7.53 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.47 (dd, <i>J</i> = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.90 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H) | | |
| APT: NMR (100 MHz, CD₄O) δ 115.7 (CH, C-5), 117.7 (CH, C-2), 123.5 (C, C-1), 123.9 (CH, C-6), 146.0 (C, C-3), 151.5 (C, C-4), 170.2 (C, C=O). | | |
| (D. M. C. Nguyen et al. 2013) | | |

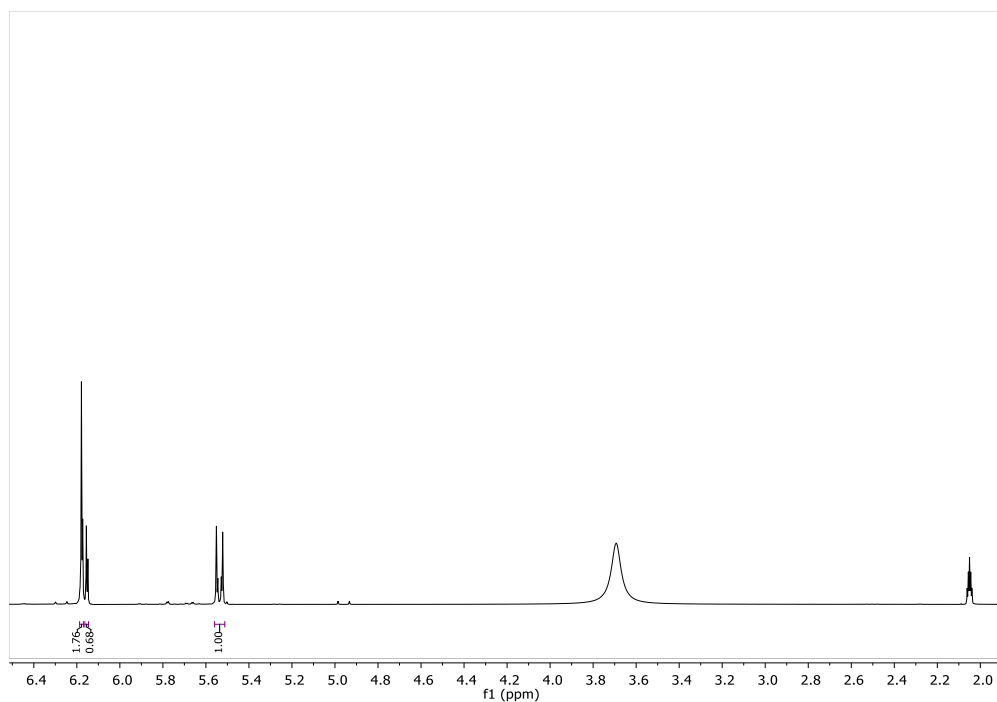


Figura-A4.1 Espectro RMN ^1H (300 MHz, CD_4O) compuesto **C4**

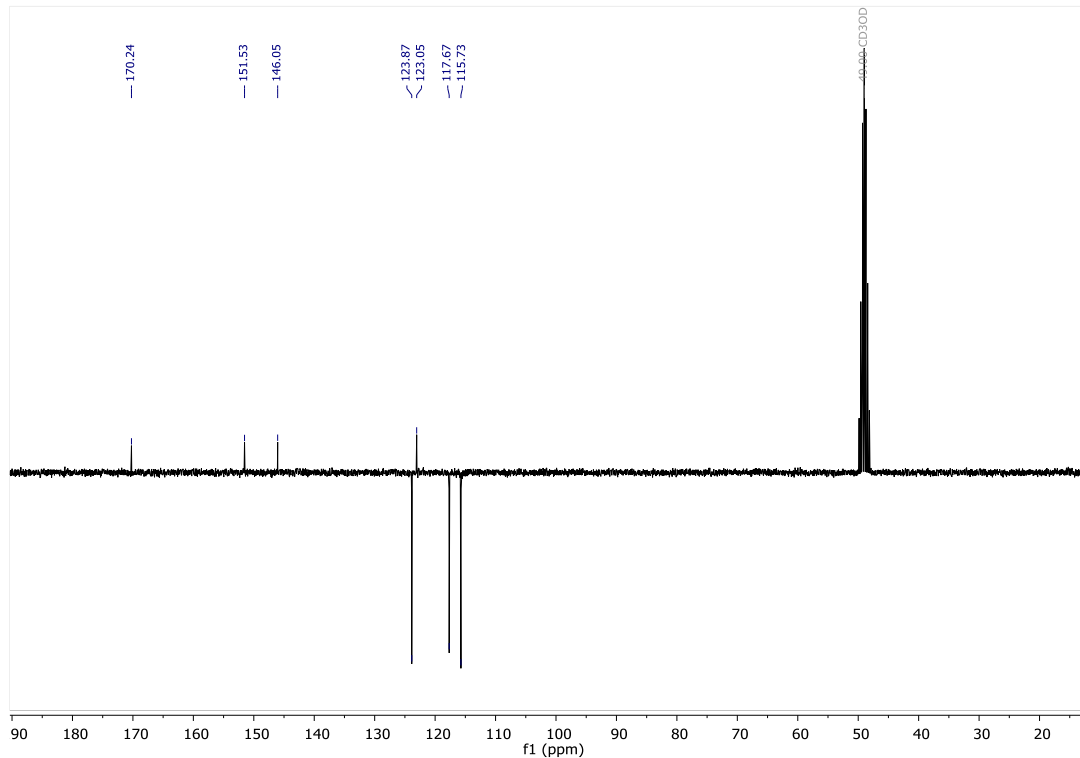
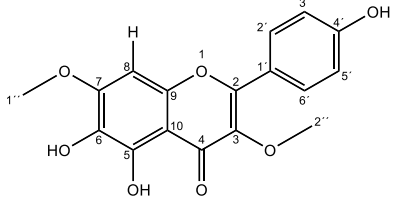


Figura-A4.2 Espectro APT (75 MHz, CD_4O) compuesto **C4**

5.1.5. Anexo A1. Datos espectroscópicos y espectros RMN para el compuesto C5

Tabla A 5.1 Datos espectroscópicos para el compuesto **C5**

| | | |
|--|--------------------------|--|
|  | Nombre | 5,6,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol |
| | Estado Físico | Sólido amarillo |
| | Formula Molecular | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ |
| | Peso Molecular | 330.07 g/mol |
| | Punto De Fusión | 179-181 °C |
| RMN ¹H: (400 MHz, Acetona-d₆) δ 12.48 (s, 1H), 7.01 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 2H-2', 6'), 8.03 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 2H-3', 5'), 6.81 (s, 1H-8), 3.97 (s, 3H-1'), 3.86 (s, 3H-2'). | | |
| APT: (100 MHz, Acetona-d₆) δ 179.6 (C, C=O), 160.8 (C, C-4'), 156.9 (C, C-7), 150.29 (C, C-9), 146.8 (C, C-5), 157.1 (C, C-2), 138.1 (C, C-3), 130.1 (C, C-6), 130.8 (CH, C-2',6'), 122.7(C, C-1'), 116.3(CH, C -3',5'), 106.9 (C, C-10), 91.2 (CH, C-8), 60.1(CH ₃ , C-2'), 56.7 (CH ₃ , C-1'). | | |
| (Ulubelen, Kerr, and Mabry 1980) | | |

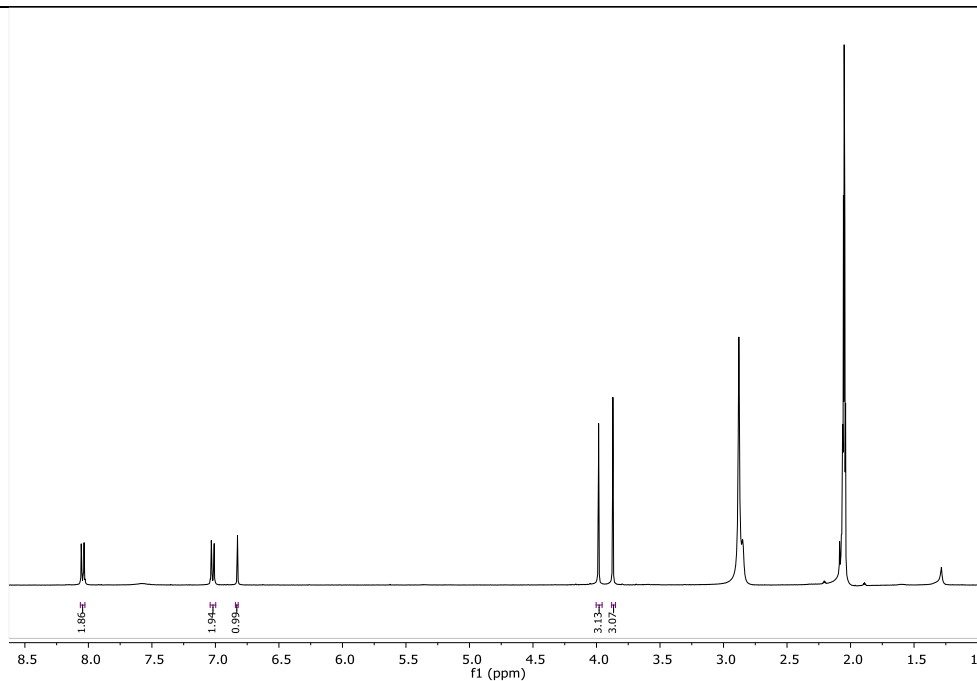


Figura-A5.1 Espectro RMN ¹H (300 MHz, Acetona-d₆) compuesto **C5**

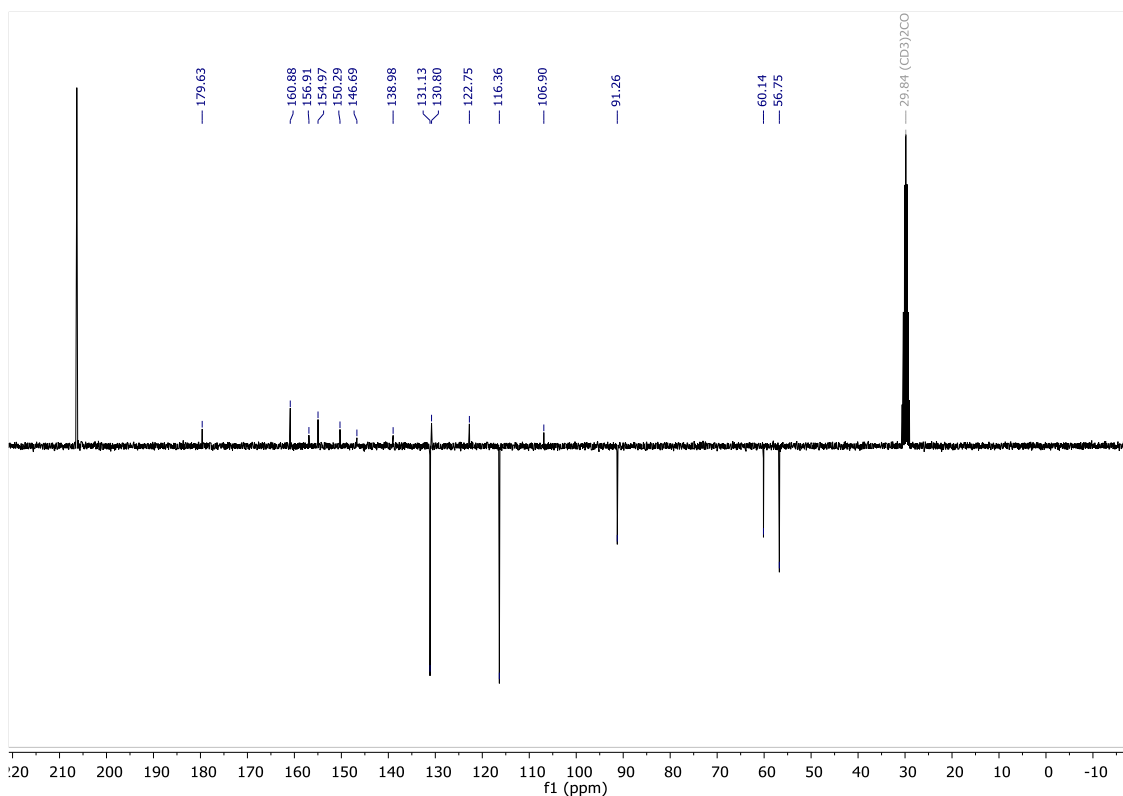


Figura-A5.2 Espectro APT (75 MHz, Acetona- d_6) compuesto C5

5.1.6. Anexo A1. Datos espectroscópicos y espectros RMN para el compuesto C6

Tabla A 6.1 Datos espectroscópicos para el compuesto C6

| | | |
|--|--------------------------|---|
| | Nombre | 5,6,3',4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavonol |
| | Estado Físico | solidos amarillos-café |
| | Formula Molecular | $C_{17}H_{14}O_7$ |
| | Peso Molecular | 346.29 g/mol |
| | Punto De fusión | 108-110 °C |
| RMN 1H: (400 MHz, Acetona-d_6) δ 12.47 (s, 1H-5-OH), 7.71 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H-5'), 7.58 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H-6'), 6.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H-2'), 6.80 (s, 1H-8), 3.97 (s, 3H-2'), 3.86 (s, 3H-1'). | | |

APT: (100 MHz, Acetona-d₆) δ 179.6 (C, C=O), 150.8 (C, C-9), 154.9 (C, C-7), 146.8 (C, C-5), 149.0 (C, C-2), 146.7 (C, C-3'), 145.9 (C, C-4'), 139.0 (C, C-3), 130.7 (C, C-6), 123.1(C, C-1'), 122.0(CH, C-6'), 116.3 (CH, C-2'), 116.2 (CH, C-5'), 106.8 (C, C-10), 91.2(CH, C-8), 60.1 (CH₃, C-1''), 56.7 (CH₃, C-2'').

(Ulubelen, Kerr, and Mabry 1980)

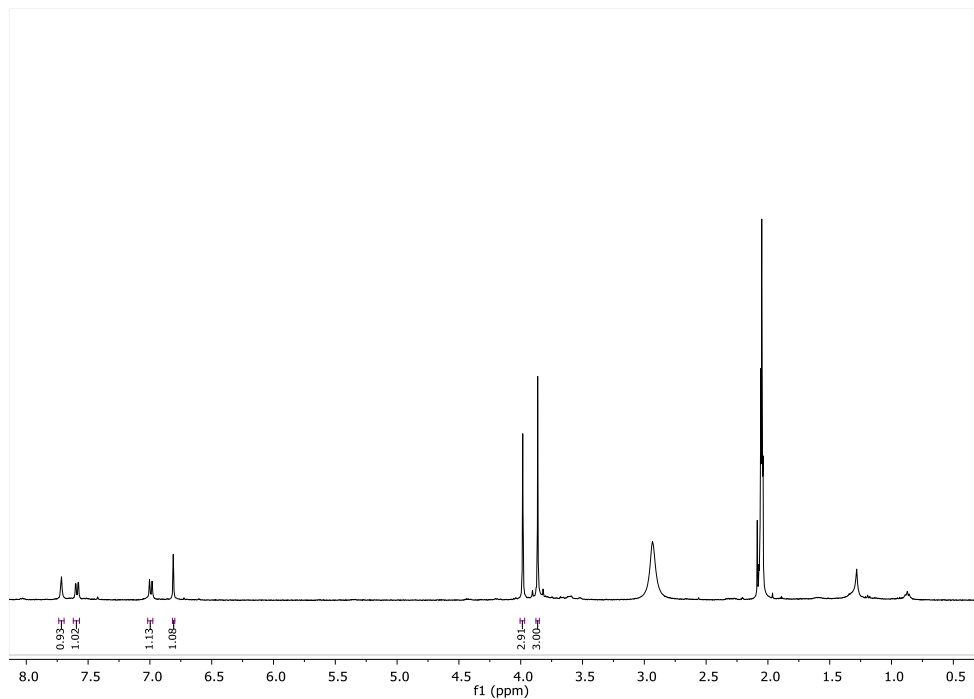


Figura-A6.1 Espectro RMN ¹H (300 MHz, Acetona-d₆) compuesto **C6**

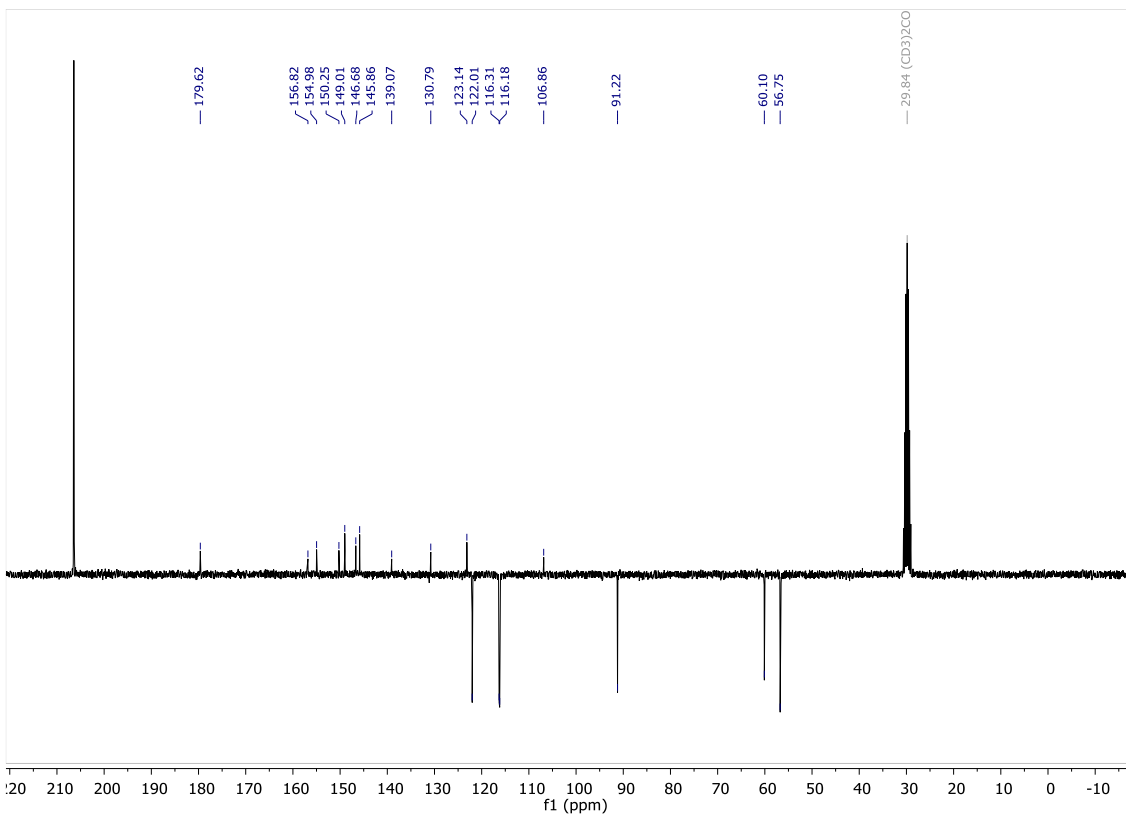
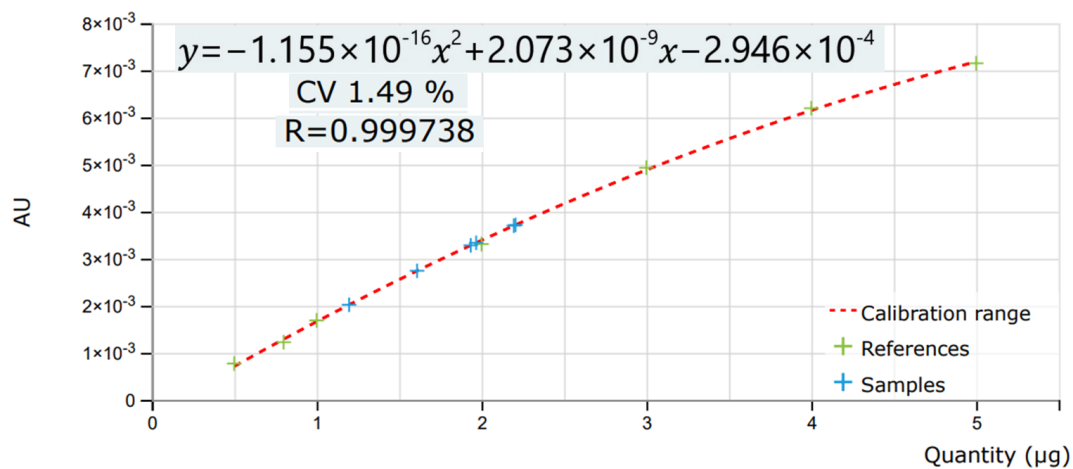


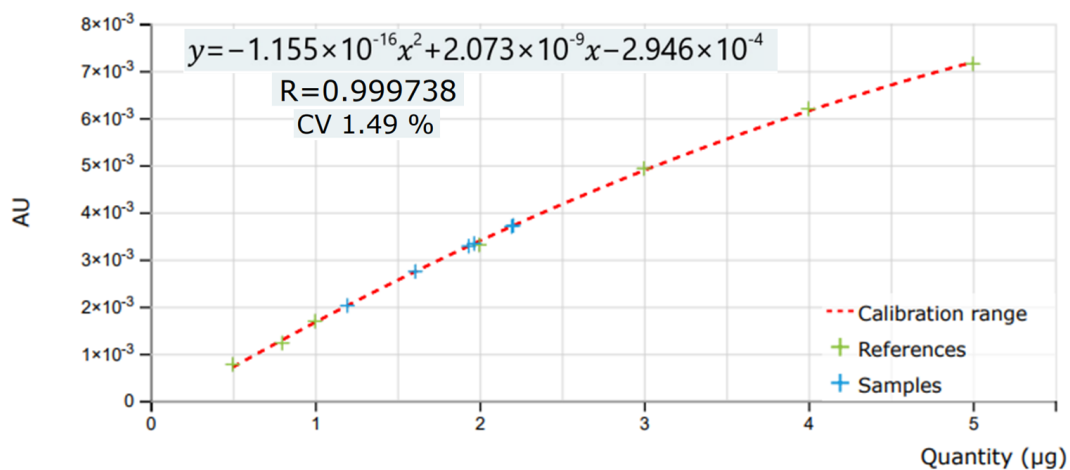
Figura-A6.2 Espectro APT (75 MHz, Acetona- d_6) compuesto **C6**

5.2 Anexo 2

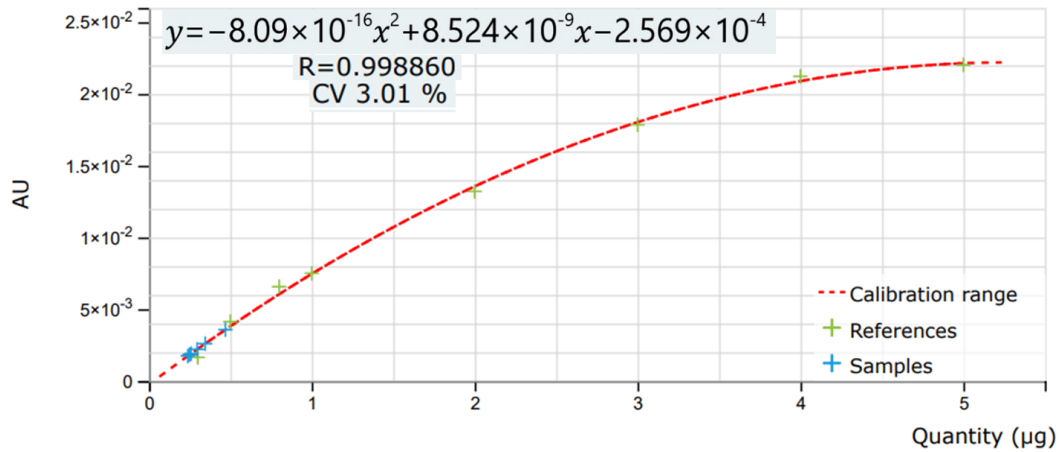
5.1.7. Curva de calibración de compuesto C1 (Neurolenina B) a 254 nm en hojas Secas.



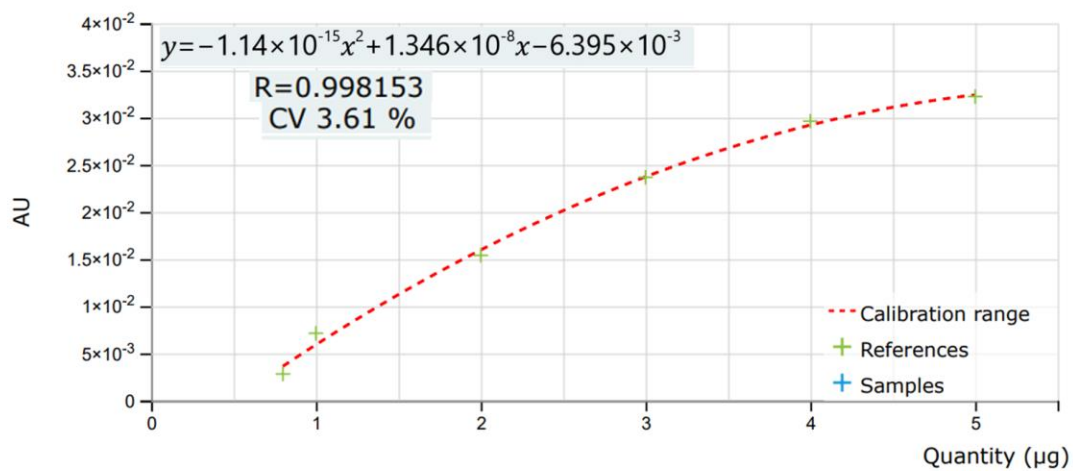
5.1.8. Curva de calibración de compuesto C1 (Neurolenina B) a 254 nm en hojas Frescas.



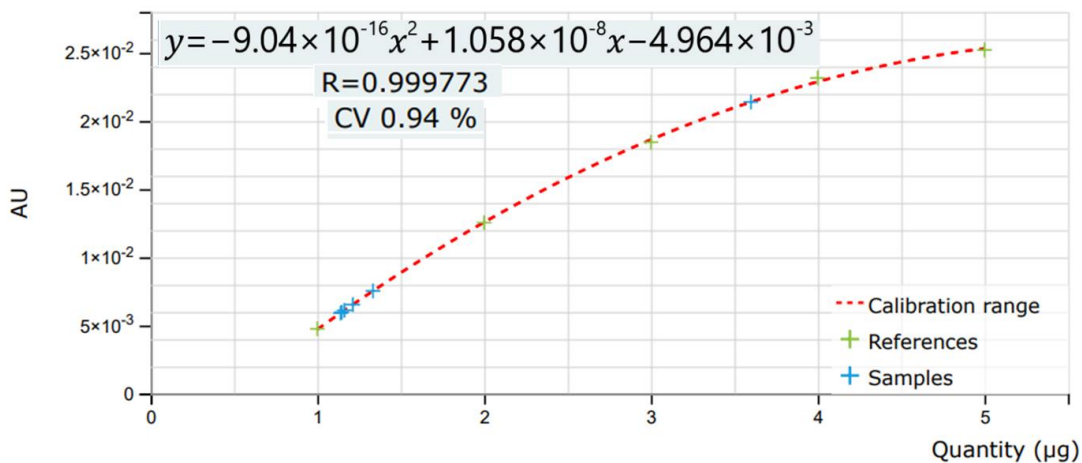
5.1.3. Curva de calibración de compuesto C5 (6-hidroxikaempferol 3,7-dimetil éter) a 254 nm en hojas Secas.



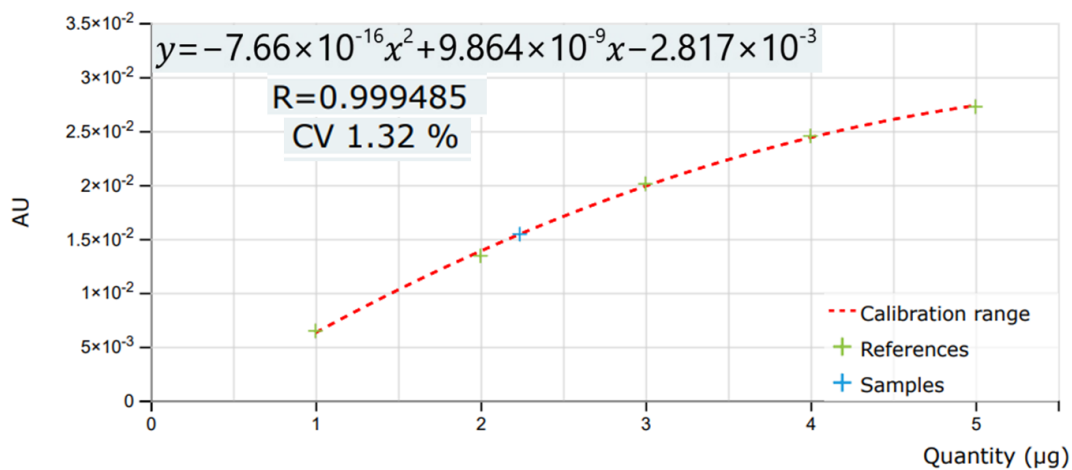
5.1.4. Curva de calibración de compuesto C5 (6-hidroxikaempferol 3,7-dimetil éter) a 254 nm en hojas Frescas.



5.1.5. Curva de calibración de compuesto C6 (quercetagina 3,7-dimetil éter) a 356 nm en hojas Secas.



5.1.6. Curva de calibración de compuesto C6 (quercetagina 3,7-dimetil éter) a 356 nm en hojas Frescas.



6. Bibliografía

- Abdullah, Nur Hakimah et al. 2016. "Chemical Constituents of Malaysian U. Cordata Var. Ferruginea and Their in Vitro α -Glucosidase Inhibitory Activities." *Molecules* 2016, Vol. 21, Page 525 21(5): 525. <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/525/htm> (March 8, 2023).
- Abuelizz, Hatem A. et al. 2019. "Triazoloquinazolines as a New Class of Potent α -Glucosidase Inhibitors: In Vitro Evaluation and Docking Study." *PLoS ONE* 14(8).
- Albayati, Samah Hashim et al. 2020. "Main Structural Targets for Engineering Lipase Substrate Specificity." *Catalysts* 10(7).
- Allen, Lindsay P. et al. 2023. "Plant Medicine Usage of People Living with Type 2 Diabetes Mellitus in Belize: A Qualitative Exploratory Study." *PloS one* 18(8): e0289212. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37535596/> (August 15, 2023).
- Andrade-Cetto, Adolfo, Elda Carola Cruz, Christian Alan Cabello-Hernández, and René Cárdenas-Vázquez. 2019a. "Hypoglycemic Activity of Medicinal Plants Used among the Cakchiquels in Guatemala for the Treatment of Type 2 Diabetes." *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM* 2019. /pmc/articles/PMC6332994/ (March 13, 2023).
- Anitha Gopal, B., and G. Muralikrishna. 2009. "Porcine Pancreatic α -Amylase and Its Isoforms: Purification and Kinetic Studies." *International Journal of Food Properties* 12(3).
- Arrijal, Imam Malikul Hadi, Burhan Ma'arif, and Arief Suryadinata. 2018. "ACTIVITY OF ETHYL ACETATE EXTRACT FROM *Chrysophyllum Cainito* L. LEAVES IN DECREASING BLOOD SUGAR LEVEL IN MALE WISTAR RATS." *Journal of Islamic Pharmacy* 3(1).
- Asano, Naoki. 2005. "Naturally Occurring Iminosugars and Related Compounds: Structure, Distribution, and Biological Activity." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3(5).
- Aschner, P. 2010. "Epidemiología de La Diabetes En Colombia." *Avances en Diabetología* 26(2): 95–100.
- Atlas de diabetes de la FID 2021. 2021. "No Title Atlas de Diabetes de La FID." *10th edition*. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/> (February 2, 2023).

- Awosika, Temitola O., and Rotimi E. Aluko. 2019. "Inhibition of the in Vitro Activities of α -Amylase, α -Glucosidase and Pancreatic Lipase by Yellow Field Pea (*Pisum Sativum* L.) Protein Hydrolysates." *International Journal of Food Science & Technology* 54(6): 2021–34. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijfs.14087> (February 17, 2023).
- Bailey, Clifford J., and Caroline Day. 2004. "Metformin: Its Botanical Background." *Practical Diabetes International* 21(3): 115–17. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pdi.606> (March 12, 2023).
- Balslev, Henrik et al. 2008. "Enciclopedia de Las Plantas Útiles Del Ecuador (Con Extracto de Datos)." : 1–3. <https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/bitstreams/b80ee8d6-b073-4788-b63e-176042ec952d/download> (August 22, 2023).
- Ban, Ju Yeon et al. 2007. "3,4-Dihydroxybenzoic Acid from *Smilacis Chinae* Rhizome Protects Amyloid β Protein (25-35)-Induced Neurotoxicity in Cultured Rat Cortical Neurons." *Neuroscience Letters* 420(2).
- Bandara, Subhani, Shelby Devereaux, and Aruna Weerasooriya. 2023. "Methods to Evaluate the Antiobesity Effects of Medicinal Plants Using Enzyme Assays." *Obesities* 3(1).
- Barrett, J. S. et al. 2022. "High Intramuscular Triglyceride Turnover Rates and the Link to Insulin Sensitivity: Influence of Obesity, Type 2 Diabetes and Physical Activity." *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 47(4): 343–56. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35061523/> (August 13, 2023).
- Batista, Mateus Alves et al. 2022. "Potential of the Compounds from *Bixa Orellana* Purified Annatto Oil and Its Granules (Chronic®) against Dyslipidemia and Inflammatory Diseases: In Silico Studies with Geranylgeraniol and Tocotrienols." *Molecules* 27(5).
- Birari, Rahul B., and Kamlesh K. Bhutani. 2007. "Pancreatic Lipase Inhibitors from Natural Sources: Unexplored Potential." *Drug Discovery Today* 12(19–20): 879–89.
- Bischoff, H. 1994. "Pharmacology of Alpha-Glucosidase Inhibition." *European journal of clinical investigation* 24 Suppl 3.
- Blair, Silvia., and Beatriz. Madrigal Calle. 2005. "Plantas Antimaláricas de Tumaco : Costa

- Pacífica Colombiana.” : 347.
- Blair, Silvia et al. 2002. “Antimalarial Activity of Neurolelin B and Derivates of *Eupatorium Inulaefolium* (Asteraceae).” *Pharmazie* 57(6).
- Bonesi, Marco et al. 2018. “Exploring the Anti-Proliferative, pro-Apoptotic, and Antioxidant Properties of *Santolina Corsica* Jord. & Fourr. (Asteraceae).” *Biomedicine and Pharmacotherapy* 107(August): 967–78.
- Bouyahya, Abdelhakim et al. 2021. “Moroccan Antidiabetic Medicinal Plants: Ethnobotanical Studies, Phytochemical Bioactive Compounds, Preclinical Investigations, Toxicological Validations and Clinical Evidences; Challenges, Guidance and Perspectives for Future Management of Diabetes Worldw.” *Trends in Food Science & Technology* 115: 147–254.
- Buchholz, Tina, and Matthias F. Melzig. 2016. “Medicinal Plants Traditionally Used for Treatment of Obesity and Diabetes Mellitus - Screening for Pancreatic Lipase and α -Amylase Inhibition.” *Phytotherapy Research* 30(2).
- Bujjirao, Gude, and P K Ratna Kumar. 2013. “Anti-Obese Therapeutics From Medicinal Plants-a Review.” *International Journal of Bioassays* 02(10).
- Cáceres, Armando et al. 1998. “Plants Used in Guatemala for the Treatment of Protozoal Infections. I. Screening of Activity to Bacteria, Fungi and American Trypanosomes of 13 Native Plants.” *Journal of Ethnopharmacology* 62(3).
- Cai, Chao Yun et al. 2017. “Analogues of Xanthones—Chalcones and Bis-Chalcones as α -Glucosidase Inhibitors and Anti-Diabetes Candidates.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 130: 51–59.
- Calderón, Ángela I. et al. 2006. “Screening of Latin American Plants for Cytotoxic Activity.” *Pharmaceutical Biology* 44(2).
- Chen, H C et al. 1995. “Active Compounds from *Saussurea Lappa* Clarks That Suppress Hepatitis B Virus Surface Antigen Gene Expression in Human Hepatoma Cells.” *Antiviral research* 27(1–2): 99–109.
- Cheng, Chung Wah et al. 2017. “CONSORT Extension for Chinese Herbal Medicine Formulas 2017: Recommendations, Explanation, and Elaboration (Traditional Chinese Version).” *Annals of internal medicine* 167(2): W7–20.
- Chinchilla-Carmona, Misael et al. 2011. “Evaluación in Vivo de La Actividad Antimalárica

- de 25 Plantas Provenientes de Una Reserva de Conservación Biológica de Costa Rica.” *Revista Chilena de Historia Natural* 84(1): 115–23.
- Chinsembu, Kazhila C. 2019. “Diabetes Mellitus and Nature’s Pharmacy of Putative Antidiabetic Plants.” *Journal of Herbal Medicine* 15.
- Choi, Jun Hui, and Seung Kim. 2022. “In Vitro Antithrombotic, Hematological Toxicity, and Inhibitor Studies of Protocatechuic, Isovanillic, and p-Hydroxybenzoic Acids from *Maclura Tricuspidata* (Carr.) Bur.” *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 3496 27(11): 3496. <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/11/3496/htm> (August 20, 2023).
- Clavijo, Briggyth Katherine Rojas, María Angélica Castillo Celis, and Johanna Marcela Moscoso Gama. 2019. “Inhibidores de La Lipasa Pancreática Como Alternativa de Tratamiento Frente a La Obesidad.” *Medicina e Investigación Universidad Autónoma del Estado de México* 7(2): 17–24. <https://medicinainvestigacion.uaemex.mx/article/view/18914> (March 5, 2023).
- Codario, Ronald A. 2011. *Type 2 Diabetes, Pre-Diabetes, and the Metabolic Syndrome*.
- Copyright de Worthington Biochemical Corp. 1993. “Worthington Enzyme Manual.”
- Crujeiras, Ana B. et al. 2015. “Leptin Resistance in Obesity: An Epigenetic Landscape.” *Life Sciences* 140.
- Cruz, Elda Carola, and Adolfo Andrade-Cetto. 2015. “Ethnopharmacological Field Study of the Plants Used to Treat Type 2 Diabetes among the Cakchiquels in Guatemala.” *Journal of Ethnopharmacology* 159: 238–44.
- Daneschvar, Homayoun L., Mark D. Aronson, and Gerald W. Smetana. 2016. “FDA-Approved Anti-Obesity Drugs in the United States.” *American Journal of Medicine* 129(8).
- Dieseldorff, Nathalia Granados. 2007. “Clínicas Odontológicas de Norteamérica: Sobredentaduras Parciales Removibles / Dir. Ivan McDermonnt ; Tr. José A. Ramos Tercero.--” : 72. [https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/library/index.php?title=331&query=@title=Special:GSMSearchPage@process=@field1=autores@value1=GRANADOS DIESELDORFF, NATHALIA @mode=advanced&recnum=1](https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/library/index.php?title=331&query=@title=Special:GSMSearchPage@process=@field1=autores@value1=GRANADOS_DIESELDORFF,NATHALIA @mode=advanced&recnum=1) (August 12, 2023).

- Dirir, Amina M., Marianne Daou, Ahmed F. Yousef, and Lina F. Yousef. 2022. "A Review of Alpha-Glucosidase Inhibitors from Plants as Potential Candidates for the Treatment of Type-2 Diabetes." *Phytochemistry Reviews* 21(4).
- Doan, Hau Van, Siriporn Riyajan, Roongtip Iyara, and Nuannoi Chudapongse. 2018. "Antidiabetic Activity, Glucose Uptake Stimulation and α -Glucosidase Inhibitory Effect of *Chrysophyllum Cainito* L. Stem Bark Extract." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 18(1).
- Durmaz, Lokman. 2021. "Antioxidant, Antiepileptic, and Anticholinergic Properties of 4',5,7-Trihydroxy-3,6-Dimethoxyflavone as Natural Phenolic Compound: A Toxicology Approach." *Toxin Reviews* 40(3).
- Ekanem, A. P., M. Wang, J. E. Simon, and D. A. Moreno. 2007. "Antiobesity Properties of Two African Plants (*Aframomum Meleguetta* and *Spilanthes Acmella*) by Pancreatic Lipase Inhibition." *Phytotherapy Research* 21(12).
- Elekofehinti, Olusola Olalekan. 2015. "Saponinas: Principios Antidiabéticos de Plantas Medicinales - Una Revisión." *Pathophysiology* 22(2): 95–103.
- Eliza, J., P. Daisy, S. Ignacimuthu, and V. Duraipandiyan. 2009. "Antidiabetic and Antilipidemic Effect of Eremanthin from *Costus Speciosus* (Koen.)Sm., in STZ-Induced Diabetic Rats." *Chemico-Biological Interactions* 182(1): 67–72.
- Ewa, MŁodzinska. 2009. "Survey of Plant Pigments: Molecular and Environmental Determinants of Plant Colors." *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51(1).
- Ezebuio, V. et al. 2022. "Optimization of α -Amylase Production by *Enterobacter Cloacae* Strain D1 Isolated from Cassava Effluent-Impacted Soil Using Response Surface Methodology." *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*.
- Farias Paiva de Lucena, Reinaldo, and Denise Dias da Cruz. "Ethnobotany of the Mountain Regions of Brazil."
- François, Guido et al. 2004. "Evaluación in Vivo de La Actividad Antimalárica de 25 Plantas Provenientes de Una Reserva de Conservación Biológica de Costa Rica." *Revista Chilena de Historia Natural* 18(1): 184–86.
- François, Guido, Claus M. Passreiter, Herman J. Woerdenbag, and Marleen Van Looveren. 1996. "Antiplasmodial Activities and Cytotoxic Effects of Aqueous Extracts and Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena Iobata*." *Planta Medica* 62(2): 126–29.

- <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2006-957833> (February 18, 2023).
- G., Luis Fernando Ospina, and Roberto Pinzón Serrano. 1995. "PLANTAS USADAS COMO ANTIDIABETICAS EN LA MEDICINA POPULAR COLOMBIANA." *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 23(1).
- Garayev, Elnur et al. 2017. "New Sesquiterpene Acid and Inositol Derivatives from *Inula Montana* L." *Fitoterapia* 120.
- Genovese, Massimo, Ilaria Nesi, Anna Caselli, and Paolo Paoli. 2021. "Natural α -Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors: A Source of Scaffold Molecules for Synthesis of New Multitarget Antidiabetic Drugs." *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 4818 26(16): 4818. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/16/4818/html> (August 13, 2023).
- Ghani, Usman. 2015. "Re-Exploring Promising α -Glucosidase Inhibitors for Potential Development into Oral Anti-Diabetic Drugs: Finding Needle in the Haystack." *European Journal of Medicinal Chemistry* 103: 133–62.
- Gomes, José Hugo de Sousa et al. 2021. "Polyphenol-Rich Extract and Fractions of *Terminalia Phaeocarpa* Eichler Possess Hypoglycemic Effect, Reduce the Release of Cytokines, and Inhibit Lipase, α -Glucosidase, and α -Amilase Enzymes." *Journal of Ethnopharmacology* 271: 113847.
- González, Jorge, Jairo Rodríguez, and Alberto Del Monte. 2010. "Lipases: Enzymes Having the Potential for Developing Immobilised Biocatalysts by Interfacial Adsorption." *Rev. Colomb. Biotecnol* 1.
- Gopal, B. Anitha, Sridevi A. Singh, and G. Muralikrishna. 2008. "Porcine Pancreatic Alpha Amylase and Its Isoforms-Effect of Deglycosylation by Peptide-N-Glycosidase F." *International Journal of Biological Macromolecules* 43(2).
- Gracioso, J. S., C. A. Hiruma-Lima, and A. R.M. Souza Brito. 2000. "Antiulcerogenic Effect of a Hydroalcoholic Extract and Its Organic Fractions of *Neurolaena Lobata* (L.) R.BR." *Phytomedicine* 7(4): 283–89.
- Gupta, Mahabir P., Nilka G. Solis, Mario Esposito Avella, and Ceferino Sanchez. 1984a. "Hypoglycemic Activity of *Neurolaena Lobata* (L.) R. Br." *Journal of*

- Ethnopharmacology* 10(3): 323–27.
- . 1984b. “Hypoglycemic Activity of *Neurolaena Lobata* (L.) R. Br.” *Journal of Ethnopharmacology* 10(3): 323–27.
- Gupta, Mahabir, Isabel Santana, and Alex Espinosa. 1905. “Libro de Plantas Medicinales de Panamá.” *Rev Farmacol* 45: 115–45.
- Gupta, Rani, Pooja Rathi, Namita Gupta, and Sapna Bradoo. 2003. “Lipase Assays for Conventional and Molecular Screening: An Overview.” *Biotechnology and Applied Biochemistry* 37(1).
- Habtemariam, Solomon, and George Kabakasseril Varghese. 2017. “Antioxidant, Anti-Alpha-Glucosidase and Pancreatic Beta-Cell Protective Effects of Methanolic Extract of *Ensete Superbum* Cheesm Seeds.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7(2).
- Hamdani, Syeda Shamila et al. 2020. “Synthesis, Crystal Structures, Computational Studies and α -Amylase Inhibition of Three Novel 1,3,4-Oxadiazole Derivatives.” *Journal of Molecular Structure* 1200.
- Han, Xue et al. 2022. “P-Hydroxybenzoic Acid Ameliorates Colitis by Improving the Mucosal Barrier in a Gut Microbiota-Dependent Manner.” *Nutrients* 14(24): 5383. <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/24/5383/htm> (August 20, 2023).
- Hanh, Tran Thi Hong, Nguyen Hai Dang, and Nguyen Tien Dat. 2016. “ α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Saponins from *Polyscias Fruticosa* Leaves.” *Journal of Chemistry* 2016.
- Hriscu, Monica, Laura Chiş, Monica Toşa, and Florin Dan Irimie. 2013. “PH-Profiling of Thermoactive Lipases and Esterases: Caveats and Further Notes.” *European Journal of Lipid Science and Technology* 115(5).
- Huo, Peng Chao et al. 2021. “Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Chalcone-like Compounds as Potent and Reversible Pancreatic Lipase Inhibitors.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 29: 115853.
- Jensen, Michael D. et al. 2014. “2013 AHA/ACC/TOS Guideline for the Management of Overweight and Obesity in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Obesity Society.” *Circulation* 129(25 SUPPL. 1).

- Jensen, Robert G., Felice A. DeJong, and Richard M. Clark. 1983. "Determination of Lipase Specificity." *Lipids* 18(3).
- Jerbi, Amel, Amal Derbali, Abdelfatteh Elfeki, and Majed Kammoun. 2017. "Essential Oil Composition and Biological Activities of Eucalyptus Globulus Leaves Extracts from Tunisia." *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 20(2).
- Jiao, Ping et al. 2014. "Lipase Inhibition and Antiobesity Effect of *Atractylodes Lancea*." *Planta Medica* 80(7).
- Karale, Pushpa, S. C. Dhawale, and M. A. Karale. 2022. "Quantitative Phytochemical Profile, Antioxidant and Lipase Inhibitory Potential of Leaves of *Momordica Charantia* L. and *Psoralea Corylifolia* L." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 84(1).
- Kashtoh, Hamdy, and Kwang Hyun Baek. 2022. "Recent Updates on Phytoconstituent Alpha-Glucosidase Inhibitors: An Approach towards the Treatment of Type Two Diabetes." *Plants* 2022, Vol. 11, Page 2722 11(20): 2722. <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/20/2722/htm> (May 24, 2023).
- Kaur, Baljinder, Santosh Kumar, and Brajesh Kumar Kaushik. 2022. "Recent Advancements in Optical Biosensors for Cancer Detection." *Biosensors and Bioelectronics* 197.
- Kaur, Navjot et al. 2021. "Alpha-Amylase as Molecular Target for Treatment of Diabetes Mellitus: A Comprehensive Review." *Chemical Biology & Drug Design* 98(4): 539–60. <https://europepmc.org/article/MED/34173346> (March 5, 2023).
- Kerr, K. M., T. J. Mabry, and S. Yoser. 1981. "6-Hydroxy- and 6-Methoxyflavonoids from *Neurolaena Lobata* and *N. Macrocephala*." *Phytochemistry* 20(4): 791–94.
- Kim, Jang Hoon et al. 2020. "An Investigation of the Inhibitory Mechanism of α -Glucosidase by Chysalodin from *Aloe Vera*." *International Journal of Biological Macromolecules* 147: 314–18.
- Kiss, Izabella et al. 2015. "Lobatin B Inhibits NPM/ALK and NF-KB Attenuating Anaplastic-Large-Cell-Lymphomagenesis and Lymphendothelial Tumour Intravasation." *Cancer Letters* 356(2).
- Klein, Samuel, Amalia Gastaldelli, Hannele Yki-Järvinen, and Philipp E. Scherer. 2022. "Why Does Obesity Cause Diabetes?" *Cell Metabolism* 34(1): 11–20.

- <http://www.cell.com/article/S1550413121006318/fulltext> (August 13, 2023).
- Kooti, Wesam et al. 2016. "The Role of Medicinal Plants in the Treatment of Diabetes: A Systematic Review." *Electronic physician* 8(1).
- Kovács, Tibor et al. 2023. "Isolation and NMR Scaling Factors for the Structure Determination of Lobatolide H, a Flexible Sesquiterpene from *Neurolaena Lobata* †." *International Journal of Molecular Sciences* 24(6).
- Krogerus, Kristoffer, Tuulikki Seppänen-Laakso, Sandra Castillo, and Brian Gibson. 2017. "Inheritance of Brewing-Relevant Phenotypes in Constructed *Saccharomyces Cerevisiae* × *Saccharomyces Eubayanus* Hybrids." *Microbial Cell Factories* 16(1).
- Kumar, Ashwani, and Shilpi Chauhan. 2021. "Pancreatic Lipase Inhibitors: The Road Voyaged and Successes." *Life Sciences* 271.
- Kumashiro, Naoki et al. 2011. "Cellular Mechanism of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(39): 16381–85. <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1113359108> (March 12, 2023).
- Laakso, Markku, and Johanna Kuusisto. 2014. "Insulin Resistance and Hyperglycaemia in Cardiovascular Disease Development." *Nature reviews. Endocrinology* 10(5): 293–302.
- Lajter, Ildikó et al. 2014. "Sesquiterpenes from *Neurolaena Lobata* and Their Antiproliferative and Anti-Inflammatory Activities." *Journal of Natural Products* 77(3): 576–82. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/np400834c> (February 17, 2023).
- Lankatillake, Chintha et al. 2021. "Screening Natural Product Extracts for Potential Enzyme Inhibitors: Protocols, and the Standardisation of the Usage of Blanks in α -Amylase, α -Glucosidase and Lipase Assays." *Plant Methods* 17(1): 1–19. <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-020-00702-5> (March 5, 2023).
- Lankatillake, Chintha, Tien Huynh, and Daniel A. Dias. 2019. "Understanding Glycaemic Control and Current Approaches for Screening Antidiabetic Natural Products from Evidence-Based Medicinal Plants." *Plant Methods* 15(1).
- Lapertosa S, Fernanda, Aquino, Natalia Aráoz, Silvana Fernández. 2010. "Prevalencia de Enfermedad Coronaria En Pacientes Con Diabetes Mellitus Tipo II." *Revista de*

- Posgrado de la Via Cátedra de Medicina* 200(August 2003): 4–9.
- Lee, Hana, and Junsoo Lee. 2021. “Anti-Diabetic Effect of Hydroxybenzoic Acid Derivatives in Free Fatty Acid-Induced HepG2 Cells via MiR-1271/IRS1/PI3K/AKT/FOXO1 Pathway.” *Journal of Food Biochemistry* 45(12).
- Lehoczki, Gábor, Lili Kandra, and Gyöngyi Gyémánt. 2018. “The Use of Starch Azure for Measurement of Alpha-Amylase Activity.” *Carbohydrate Polymers* 183.
- Lévuok, Kevin Prince. 2016. “Búsqueda de Inhibidores de Las Enzimas Digestivas α -Glucosidasa, α -Amilasa y Lipasa Pancreática a Partir Del Extracto Hidroalcohólico y El Aceite Esencial Obtenido de La Corteza de *Vismia Macrophylla* Kunth (Hypericaceae).” : 191.
- Li, Ke et al. 2018. “Inhibitory Effects against α -Glucosidase and α -Amylase of the Flavonoids-Rich Extract from *Scutellaria Baicalensis* Shoots and Interpretation of Structure–Activity Relationship of Its Eight Flavonoids by a Refined Assign-Score Method.” *Chemistry Central Journal* 12(1): 1–11. <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13065-018-0445-y> (May 24, 2023).
- Li, Mang Mang et al. 2023. “Structure-Activity Relationship of Dietary Flavonoids on Pancreatic Lipase.” *Current Research in Food Science* 6: 100424.
- Li, Xican, Xiaozhen Wang, Dongfeng Chen, and Shuzhi Chen. 2011. “Antioxidant Activity and Mechanism of Protocatechuic Acid in Vitro.” *Functional Foods in Health and Disease* 1(7).
- Lin, Hsiang-Ru. 2012. “Sesquiterpene Lactones from *Tithonia Diversifolia* Act as Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists.” *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 22(8): 2954–58.
- Liu, Song et al. 2013. “Inhibition of Pancreatic Lipase, α -Glucosidase, α -Amylase, and Hypolipidemic Effects of the Total Flavonoids from *Nelumbo Nucifera* Leaves.” *Journal of Ethnopharmacology* 149(1): 263–69.
- López-Martínez, Leticia X., Luisa M. Aguilar Cisneros, and Octavio Dublán-García. 2014. “Actividad Antioxidante e Inhibidora de α -Glucosidasa y α -Amilasa de Tres Variedades de Cebolla (*Allium Cepa* L.)” *Nova Scientia* 6(12): 234.

- Lozada Diaz, Yohum Steven. 2019. “Búsqueda de Inhibidores de Enzimas Digestivas a Partir Del Extracto Hidroalcohólico de Hojas de Neurolaena Lobata (Asteraceae) - Hdl:11349/23381.” Universidad Distrital Francisco José de Caldas. <https://repository.udistrital.edu.co/handle/11349/23381> (March 17, 2023).
- Lunagariya, Nitin A., Neeraj K. Patel, Sneha C. Jagtap, and Kamlesh K. Bhutani. 2014. “Inhibitors of Pancreatic Lipase: State of the Art and Clinical Perspectives.” *EXCLI Journal* 13.
- Macbride, J. Francis, and A. Weberbauer. 1936. “Flora of Peru.” 13. <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/7205> (August 22, 2023).
- Mahomoodally, M. Fawzi et al. 2012. “Traditional Medicinal Herbs and Food Plants Have the Potential to Inhibit Key Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes in Vitro and Reduce Postprandial Blood Glucose Peaks in Vivo.” *The Scientific World Journal* 2012.
- Malarz, Janusz et al. 2023. “Constituents of Pulicaria Inuloides and Cytotoxic Activities of Two Methoxylated Flavonols.” *Molecules* 28(2).
- Malviya, N, S Jain, and S Malviya. 2010. “Antidiabetic Potential of Medicinal Plants.” *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 67(2): 113–18.
- Marengo, Mauro et al. 2022. “Evaluation of Porcine and Aspergillus Oryzae α -Amylases as Possible Model for the Human Enzyme.” *Processes* 10(4).
- Maridass, Muthiah. 2008. “Evaluation of Brine Shrimp Lethality of Cinnamomum Species.” *Ethnobotanical Leaflets* 12.
- McKinnon, R. et al. 2014. “Pharmacological Insight into the Anti-Inflammatory Activity of Sesquiterpene Lactones from Neurolaena Lobata (L.) R.Br. Ex Cass.” *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 21(12): 1695–1701. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25442279/> (February 17, 2023).
- Mendez-Callejas, Gina et al. 2023. “A New Flavanone from Chromolaena Tacotana (Klatt) R. M. King and H. Rob, Promotes Apoptosis in Human Breast Cancer Cells by Downregulating Antiapoptotic Proteins.” *Molecules* 28(1): 58. <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/1/58/htm> (May 29, 2023).
- Meng, Yonghong et al. 2016. “Evaluation of Total Flavonoids, Myricetin, and Quercetin from Hovenia Dulcis Thunb. As Inhibitors of α -Amylase and α -Glucosidase.” *Plant Foods for Human Nutrition* 71(4): 444–49.

- <https://link.springer.com/article/10.1007/s11130-016-0581-2> (May 24, 2023).
- Modak, Manisha et al. 2007. "Indian Herbs and Herbal Drugs Used for the Treatment of Diabetes." *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 40(3).
- Mukherjee, Manjari. 2003. "Human Digestive and Metabolic Lipases - A Brief Review." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22(5–6).
- Nair, Sindhu S, Vaibhavi Kavrekar, and Anshu Mishra. 2013. "In Vitro Studies on Alpha Amylase and Alpha Glucosidase Inhibitory Activities of Selected Plant Extracts." *European Journal of Experimental Biology* 3(1).
- Nakai, Hiroyuki et al. 2005. "Molecular Analysis of α -Glucosidase Belonging to GH-Family 31." *Biologia, Bratislava* 60: 131–35.
- Nam Han Cho et al. 2013. "Executive Summary- IDF Diabetes Atlas." *Diabetes Atlas*: 16.
- Navarrete, Hugo et al. 2008. Herbario QCA & Herbario AAU *Enciclopedia de Las Plantas Útiles Del Ecuador (Con Extracto de Datos)*.
- "Neurolaena Lobata." 2022. *CABI Compendium* CABI Compe.
- Ng, Arnold C.T., Victoria Delgado, Barry A. Borlaug, and Jeroen J. Bax. 2020. "Diabesity: The Combined Burden of Obesity and Diabetes on Heart Disease and the Role of Imaging." *Nature Reviews Cardiology* 2020 18:4 18(4): 291–304. <https://www.nature.com/articles/s41569-020-00465-5> (August 13, 2023).
- Nguyen, Dang Minh Chanh et al. 2013. "Nematicidal Activity of 3,4-Dihydroxybenzoic Acid Purified from Terminalia Nigrovenulosa Bark against Meloidogyne Incognita." *Microbial pathogenesis* 59–60: 52–59. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23603737/> (May 30, 2023).
- Nguyen, Huy Truong et al. 2022. " α -Glucosidase Inhibitory and Antimicrobial Benzoylphloroglucinols from Garcinia Schomburgkiana Fruits: In Vitro and In Silico Studies." *Molecules* 27(8): 2574. <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/8/2574/htm> (March 5, 2023).
- Nkambo, W., Norbert G. Anyama, and B. Onegi. 2013. "Ein Vivo Hypoglycemic Effect of Methanolic Fruit Extract of Momordica Charantia L." *African Health Sciences* 13(4): 933–39.
- Ogunyemi, Oludare M. et al. 2022. "Inhibition Mechanism of Alpha-Amylase, a Diabetes

- Target, by a Steroidal Pregnane and Pregnane Glycosides Derived from *Gongronema Latifolium* Benth.” *Frontiers in Molecular Biosciences* 9: 808.
- Oliveira, Cláudia Lourenço, Catarina Morais Fonseca, and Cristina Ramos Silva. 2022. “Uso Da Metformina Na Prevenção Da Diabetes Gestacional Na Grávida Obesa Não Diabética: Uma Revisão Baseada Na Evidência.” *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar* 38(1): 74–80. <https://rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf/article/view/13128> (August 13, 2023).
- OMS. 2021. “Obesidad y Sobrepeso.” <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (February 17, 2023).
- . 2022. “Diabetes.” *16 de septiembre*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (February 17, 2023).
- OPS/OMS. 2021. “Diabetes - OPS/OMS | Organización Panamericana de La Salud.” <https://www.paho.org/es/temas/diabetes> (February 17, 2023).
- Pan American Health Organization. 2022. “Panorama of Diabetes in the Americas.” *Panorama of Diabetes in the Americas*.
- Paniagua-Zambrana, Narel Y et al. 2020. “*Neurolaena Lobata* (L.) Cass. Asteraceae.” : 1–3. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-319-77093-2_204-1 (August 11, 2023).
- Parapouli, Maria, Anastasios Vasileiadis, Amalia Sofia Afendra, and Efstathios Hatziloukas. 2020. “*Saccharomyces Cerevisiae* and Its Industrial Applications.” *AIMS Microbiology* 6(1).
- Passreiter, Claus M., and Murray B. Isman. 1997. “Antifeedant Bioactivity of Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena Lobata* and Their Antagonism by γ -Aminobutyric Acid.” *Biochemical Systematics and Ecology* 25(5): 371–77.
- Passreiter, Claus M., Detlef Wendisch, and Daniel Gondol. 1995. “Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena Lobata*.” *Phytochemistry* 39(1): 133–37.
- Patel, D. K., S. K. Prasad, R. Kumar, and S. Hemalatha. 2012. “An Overview on Antidiabetic Medicinal Plants Having Insulin Mimetic Property.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(4).
- Patricia, Diana, and Rey Padilla. 2013. “Evaluación in Vitro Del Efecto de Un Extracto de Frutos de *Physalis Peruviana* Sobre Algunas Carbohidrasas Intestina.”

- Paul, Jai Shankar et al. 2021. "Aspects and Recent Trends in Microbial α -Amylase: A Review." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 193(8).
- Prakash, Ved. 2022. "Determination of α -Amylase Inhibitory Potential of Leaf Extracts of *Rhododendron Arboreum* Sm. and *Rhododendron Campanulatum* D. Don." *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 12(1-S).
- Qin, Xiao Ya et al. 2022. "Discovery and Characterization of the Naturally Occurring Inhibitors Against Human Pancreatic Lipase in *Ampelopsis Grossedentata*." *Frontiers in Nutrition* 9: 181.
- Reid, Tirissa J., and Judith Korner. 2022. "Medical and Surgical Treatment of Obesity." *Medical Clinics of North America* 106(5).
- Restrepo, Sánchez. 2017. "Cuantificación de Clorofila ' a ' Clorofilas." *Departamento de química organica, UNAM*.
- Rigolon, Thais Coroline Buttow, Isadora Rebouças Nolasco de Oliveira, and Paulo Cesar Stringheta. 2021. "Antocianinas." In *Corantes Naturais: Da Diversidade Da Natureza as Aplicações e Benefícios*,.
- Ríos, José Luis, Flavio Francini, and Guillermo R. Schinella. 2015. "Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus." *Planta Medica* 81(12–13): 975–94. <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0035-1546131> (March 12, 2023).
- Ríos, José Luis, Flavio Francini, and Guillermo R Schinella. 2016. "Productos Naturales Para El Tratamiento de La Diabetes (I): Mecanismos de Acción." *Revista de Fitoterapia* 16(1).
- Rodhi, Miradatul Najwa Muid, Fazlena Hamzah, and Ku Halim Ku Hamid. 2020. "Kinetic Behaviour of Pancreatic Lipase Inhibition by Ultrasonicated *A. Malaccensis* and *A. Subintegra* Leaves of Different Particle Sizes." *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis* 15(3).
- Rohde, Kerstin et al. 2019. "Genetics and Epigenetics in Obesity." *Metabolism: Clinical and Experimental* 92.
- Salazar, Luz et al. 2020. "Caracterización, Clasificación y Usos de Las Enzimas Lipasas En La Producción Industrial." *Characterization, classification and uses of lipase enzymes*

- in industrial production*. 39(4).
- Saravia-Otten, Patricia et al. 2021. "Inhibición de Las Actividades Proteolítica y Fosfolipasa A2 Del Veneno de Bothrops Asper Por El Extracto Etanólico de Neurolaena Lobata (L.) Cass." *Ciencia, Tecnología y Salud* 8(1).
- . 2022. "Inhibition of Enzymatic Activities of Bothrops Asper Snake Venom and Docking Analysis of Compounds from Plants Used in Central America to Treat Snakebite Envenoming." *Journal of Ethnopharmacology* 283.
- Şener, Sila Özlem et al. 2022. "Investigation of Selected Medicinal Plants for Their Anti-Obesity Properties." *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 19(5).
- Shaik Mohamed Sayed, Ummul Fathima et al. 2023. "Natural Products as Novel Anti-Obesity Agents: Insights into Mechanisms of Action and Potential for Therapeutic Management." *Frontiers in Pharmacology* 14.
- Shailajan, Sunita, and Deepti Gurjar. 2014. "Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of Chrysophyllum Cainito Linn. Leaves." *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 26(1).
- Shin, Hansol et al. 2019. "Optimization of in Vitro Carbohydrate Digestion by Mammalian Mucosal α -Glucosidases and Its Applications to Hydrolyze the Various Sources of Starches." *Food Hydrocolloids* 87.
- SIB. "SIB Swiss Institute of Bioinformatics - Home Page."
- Sim, Lyann et al. 2008. "Human Intestinal Maltase–Glucoamylase: Crystal Structure of the N-Terminal Catalytic Subunit and Basis of Inhibition and Substrate Specificity." *Journal of Molecular Biology* 375(3): 782–92.
- Simeonov, Anton, and Mindy I. Davis. 2004. Assay Guidance Manual *Interference with Fluorescence and Absorbance*.
- Sosnowska, Dorota, Anna Podśędek, Małgorzata Redzyna, and Alicja Z. Kucharska. 2018. "Inhibitory Effect of Black Chokeberry Fruit Polyphenols on Pancreatic Lipase – Searching for Most Active Inhibitors." *Journal of Functional Foods* 49.
- Spínola, Vítor, and Paula C. Castilho. 2021. "Assessing the In Vitro Inhibitory Effects on Key Enzymes Linked to Type-2 Diabetes and Obesity and Protein Glycation by Phenolic Compounds of Lauraceae Plant Species Endemic to the Laurisilva Forest." *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 2023 26(7): 2023. <https://www.mdpi.com/1420->

- 3049/26/7/2023/htm (March 5, 2023).
- Sreedharan, Roshni, and Basem Abdelmalak. 2018. "Diabetes Mellitus: Preoperative Concerns and Evaluation." *Anesthesiology Clinics* 36(4).
- Sugimoto, Satoru, Hisakazu Nakajima, Kitaro Kosaka, and Hajime Hosoi. 2015. "Review: Miglitol Has Potential as a Therapeutic Drug against Obesity." *Nutrition and Metabolism* 12(1).
- Tadera, Kenjiro, Yuji Minami, Kouta Takamatsu, and Tomoko Matsuoka. 2006. "Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids." *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52(2): 149–53.
- Tian, Yongqi et al. 2022. "Efficient Screening of Pancreatic Lipase Inhibitors from Cod Meat Hydrolysate through Ligand Fishing Strategy." *Frontiers in Nutrition* 9.
- Tundis, R, M R Loizzo, and F Menichini. 2010. "Natural Products as Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Inhibitors and Their Hypoglycaemic Potential in the Treatment of Diabetes: An Update." *Mini reviews in medicinal chemistry* 10(4): 315–31.
- Turner, B. 1982. "Taxonomía de Neurolaena (Asteraceae-Heliantheae) En JSTOR." : 142. <https://www.jstor.org/stable/23642726> (August 11, 2023).
- Uguz, Faruk et al. 2015. "Weight Gain and Associated Factors in Patients Using Newer Antidepressant Drugs." *General Hospital Psychiatry* 37(1).
- Ulubelen, Ayhan, Kathleen M. Kerr, and Tom J. Mabry. 1980. "New 6-Hydroxyflavonoids and Their Methyl Ethers and Glycosides from Neurolaena Oaxacana." *Phytochemistry* 19(8).
- Vasas, Andrea et al. 2021. "Isolation, Structure Determination of Sesquiterpenes from Neurolaena Lobata and Their Antiproliferative, Cell Cycle Arrest-Inducing and Anti-Invasive Properties against Human Cervical Tumor Cells." *Pharmaceutics* 13(12): 2088. <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/12/2088/htm> (February 17, 2023).
- Velez, Giler et al. 2022. "Análisis Fitoquímico de Neurolaena Lobata Con La Finalidad de Determinar Su Potencial Antioxidante." <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/28891> (August 12, 2023).
- Vo, Cam Van T. et al. 2022. "Screening for Pancreatic Lipase Inhibitors: Evaluating Assay Conditions Using p-Nitrophenyl Palmitate as Substrate."

- <https://doi.org/10.1080/26895293.2021.2019131> 15(1): 13–22.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/26895293.2021.2019131> (February 17, 2023).
- Waldemar López-Valenzuela, Fredy, Jorge Mario Vargas Ponce, and María Nereida Marroquín Tinti. 2022. “Modelo de Publicación Sin Fines de Lucro Para Conservar La Naturaleza Académica y Abierta de La Comunicación Científica PDF Generado a Partir de XML-JATS4R.” <http://portal.amelica.org/ameli/journal/50/503446007/> (August 14, 2023).
- Walker, Graeme M., and Graham G. Stewart. 2016. “Saccharomyces Cerevisiae in the Production of Fermented Beverages.” *Beverages* 2(4).
- Walshe-Roussel, Brendan et al. 2013. “Potent Anti-Inflammatory Activity of Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena Lobata* (L.) R. Br. Ex Cass., a Q’eqchi’ Maya Traditional Medicine.” *Phytochemistry* 92.
- Williams, Christine A. et al. 1995. “A Biologically Active Lipophilic Flavonol from *Tanacetum Parthenium*.” *Phytochemistry* 38(1).
- Wolfender, Jean Luc, Guillaume Marti, Aurélien Thomas, and Samuel Bertrand. 2015. “Current Approaches and Challenges for the Metabolite Profiling of Complex Natural Extracts.” *Journal of Chromatography A* 1382.
- Wongsa, Prinya et al. 2023. “Influence of Hot-Air Drying Methods on the Phenolic Compounds/Allicin Content, Antioxidant Activity and α -Amylase/ α -Glucosidase Inhibition of Garlic (*Allium Sativum* L.).” *European Food Research and Technology* 249(2).
- Wu, Yihang et al. 2006. “Hepatoprotective Effect of Total Flavonoids from *Laggera Alata* against Carbon Tetrachloride-Induced Injury in Primary Cultured Neonatal Rat Hepatocytes and in Rats with Hepatic Damage.” *Journal of Biomedical Science* 13(4).
- Xin, X. L., H. A. Aisa, and H. Q. Wang. 2008. “Flavonoids and Phenolic Compounds from Seeds of the Chinese Plant *Nigella Glandulifera*.” *Chemistry of Natural Compounds* 44(3): 368–69. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10600-008-9066-3> (May 30, 2023).
- Yang, Xiaoping, and Fanbin Kong. 2016. “Evaluation of the in Vitro α -Glucosidase Inhibitory Activity of Green Tea Polyphenols and Different Tea Types.” *Journal of the*

-
- Science of Food and Agriculture* 96(3).
- Yang, Yanqing, and Mark E. Lowe. 2000. "The Open Lid Mediates Pancreatic Lipase Function." *Journal of Lipid Research* 41(1).
- Yun, Jong Won. 2010. "Possible Anti-Obesity Therapeutics from Nature – A Review." *Phytochemistry* 71(14–15): 1625–41.
- Zeng, Su Ling et al. 2018. "Evaluation of Anti-Lipase Activity and Bioactive Flavonoids in the Citri Reticulatae Pericarpium from Different Harvest Time." *Phytomedicine* 43: 103–9.
- Zhu, Guoying et al. 2021. "Structure and Function of Pancreatic Lipase-Related Protein 2 and Its Relationship With Pathological States." *Frontiers in Genetics* 12.
- Zhu, Qibo et al. 2013. "Comparison of the Hypoglycemic Effect of Acarbose Monotherapy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Consuming an Eastern or Western Diet: A Systematic Meta-Analysis." *Clinical Therapeutics* 35(6).
- Zubair, Shumaila et al. 2023. "New Ferrocene Integrated Amphiphilic Guanidines: Synthesis, Spectroscopic Elucidation, DFT Calculation and in Vitro α -Amylase and α -Glucosidase Inhibition Combined with Molecular Docking Approach." *Heliyon* 9(4).