



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA Y
QUÍMICA DE LAS HOJAS DE *Hintonia
latiflora* (SESSÉ ET MOCIÑO EX DC.)
BULLOCK (RUBIACEAE): UNA
CONTRIBUCIÓN PARA LA
ELABORACIÓN DE SU MONOGRAFÍA
TIPO OMS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A :
BIOL. SOL CRISTIANS NIIZAWA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG DE ESPÍNDOLA

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la U.N.A.M., que a través de su programa de Maestría me permitió ampliar mi formación académica y explorar nuevos horizontes científicos.

A todos los apoyos recibidos durante el desarrollo de mi proyecto de investigación, a la beca del CONACyT a través de la cual pude dedicarme de tiempo completo al programa de Maestría. A los proyectos CONACyT C01-018 y DGAPA-UNAM IN208907 cuyos apoyos permitieron financiar el trabajo de investigación.

A la Dra. Rachel Mata a quien agradezco todo el tiempo y fuerzas invertidas en el desarrollo de este trabajo de investigación, así como sus consejos y conocimientos que supo verter en mí, introduciéndome en el mundo de la fitoquímica y ampliando mis panoramas profesionales y personales.

Al Dr. Robert Bye por todas las sugerencias a lo largo de esta investigación y por compartir todo su conocimiento en el campo de la etnobotánica y por permitirme conocer el universo que encierra la sierra Tarahumara.

Al Dr. Rogelio Pereda por guiarme durante el desarrollo de este trabajo experimental, acrecentándolo con sus observaciones siempre puntuales y acertadas, así como por la paciencia que supo tener al enseñarme la espectrometría de masas.

A la Dra. Reyna Osuna por aceptar ser miembro del jurado y enriquecer con sus comentarios esta tesis, así como por toda la ayuda y conocimientos brindados para llevar a cabo la descripción anatómica e histológica de *H. latiflora*.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por formar parte del jurado de esta tesis, tomándose el tiempo de leerla y comentarla.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías, coordinadora del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, por el procesamiento del material y las facilidades prestadas para el estudio anatómico de las hojas de *H. latiflora*.

A la M. en F. Ana Isabel Bieler Antolín del Laboratorio de Microcine por el apoyo en la toma de fotomicrografías y fotomacrogafías de *H. latiflora*.

A Rosa del Villar, Georgina Duarte-Lisci y Marisela Gutiérrez de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, por la asistencia técnica en las pruebas de espectrométricas y espectroscópicas realizadas durante este trabajo de investigación.

Al Dr. Paul Hersch por haber proporcionado las hojas de *H. standleyana* que permitieron hacer las comparaciones entre las composiciones químicas de estos dos copalchis.

A la M. en C. Isabel Rivero por toda la ayuda que me brindó en el laboratorio, sin la cual buena parte de esta tesis no podría haber sido realizada, así como por brindarme su amistad desde el primer momento que entré al Laboratorio 124.

A la M. en C. Laura Acevedo por auxiliarme y enseñarme a utilizar el CLAR, a través del cual pude desarrollar los perfiles cromatográficos contenidos en este trabajo de investigación.

A todos los compañeros del Laboratorio 124 del Conjunto E, Facultad de Química: Araceli, Krutzkaya, Lupita, Magda, Martha, Viridiana, Abraham, Fernando, Francisco, Mario y Pepe que a través de sus conocimientos, ayuda y consejos hicieron posible comprender muchos aspectos alrededor de este trabajo, además sin su compañía y amistad nunca hubiera sido lo mismo el desarrollo de esta tesis.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias, el Vives o cualquier otro lugar, que siempre estuvieron presentes y apoyaron en todo momento mi paso por la Maestría.

A toda mi familia esparcida por el mundo que siempre estuvieron al pendiente de mis pasos por el Posgrado, de mis proyectos y que con una llamada telefónica o un correo electrónico acortaban las distancias y estaban junto a mí.

A todos los amigos que fungen como familia aquí en México, los cuales nunca dejan de enterarse de lo que va pasando en mi vida y están siempre presentes apoyándome y aconsejándome.

A Jorge y Cristina (papá y mamá), a Azul y a Xul porque son partícipes de todos mis proyectos y logros; gracias a ustedes mi andar por este sendero que se llama vida tiene certeza.

A todos los que de una u otra forma han estado cerca de mí y han hecho posible la realización de esta tesis.

Índice

	Página
1. Resumen	1
1.1. Abstract	2
2. Introducción	4
3. Antecedentes	6
3.1. Plantas medicinales	6
3.1.1. Breve reseña histórica	6
3.1.2. Panorama actual y regulación de las plantas como agentes terapéuticos	7
3.2. Diabetes mellitus	11
3.2.1. Generalidades sobre la enfermedad	12
3.2.2. Fármacos utilizados para el control de la diabetes mellitus tipo 2	15
3.3. <i>Hintonia latiflora</i> , uno de los copalchis más utilizados en las prácticas médicas populares de México	19
3.3.1. Taxonomía y etnobotánica de <i>Hintonia latiflora</i> (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock	19
3.3.2. Cinco siglos de historia del Copalchi	25
3.3.3. Antecedentes fitoquímicos y farmacológicos de <i>Hintonia latiflora</i>	34
4. Objetivos	40
5. Hipótesis	41
6. Parte experimental	42
6.1. Recolecta del material vegetal	42
6.2. Caracterización anatómica y estructural de <i>Hintonia latiflora</i> (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock	42
6.2.1. Deshidratación e inclusión del material vegetal	42
6.2.2. Obtención de cortes anatómicos	43
6.2.3. Técnicas histoquímicas y de tinción	43
6.2.4. Análisis de las preparaciones histológicas	43
6.2.5. Estudio anatómico a través de microscopía electrónica de barrido	44
6.3. Estudio fitoquímico	44
6.3.1. Instrumental y registro de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	44
6.3.2. Preparación y extracción del material vegetal	45
6.3.3. Análisis y fraccionamiento cromatográfico	45
6.3.4. Aislamiento del ácido ursólico (24)	46
6.3.5. Aislamiento del ácido desoxicordifolínico (19)	46
6.3.6. Aislamiento de la 5-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)	47
6.3.7. Aislamiento del ácido clorogénico (26) a partir de la infusión	49
6.3.8. Establecimiento de perfiles cromatográficos en la infusión de hojas y corteza de <i>Hintonia latiflora</i> y <i>H. standleyana</i>	49
6.3.9. Establecimiento de la composición química de la infusión de hojas de <i>H. latiflora</i> y <i>H. standleyana</i>	50
6.4. Estudio farmacológico	51
6.4.1. Prueba de toxicidad aguda	51
6.4.2. Ensayos antidiabéticos	52
6.4.2.1. Prueba de tolerancia a la glucosa oral	52
6.4.2.1.1. Modelo de diabetes mellitus tipo 2	52
6.4.2.2. Ensayo hipoglucemiante agudo	53
6.5. Análisis estadístico	53
6.5.1. Diseño experimental	53

6.5.2. Modelo estadístico	54
6.5.3. Análisis e interpretación de la información	54
7. Resultados y discusión	56
7.1. Estudio farmacológico	57
7.1.1. Establecimiento de la dosis letal media	57
7.1.2. Efectos antidiabéticos	58
7.1.2.1. Efecto antihiper glucémico	58
7.1.2.2. Efecto hipoglucemiante	62
7.2. Pruebas de identidad	66
7.2.1. Caracterización anatómica e histológica	66
7.2.2. Pruebas de identidad química	71
7.2.2.1. Aislamiento de compuestos marcadores	71
7.2.2.1.1. Identificación del ácido ursólico (24)	71
7.2.2.1.2. Identificación del ácido desoxicordifolínico (19)	72
7.2.2.1.3. Identificación de la 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)	72
7.2.2.1.4. Identificación del ácido clorogénico (26)	76
7.2.2.2. Perfiles cromatográficos por CCD de las infusiones de las hojas y corteza de <i>Hintonia latiflora</i> y <i>H. standleyana</i>	76
7.2.2.3. Establecimiento de la composición química de la infusión de hojas de <i>H. latiflora</i> y <i>H. standleyana</i> , mediante CLAR	79
8. Conclusiones	83
9. Perspectivas	84
10. Bibliografía	85
11. Anexos	92
11.1. Anexo 1. Espectros de RMN ¹ H y ¹³ C y EM	92

Índice de cuadros, figuras y tablas

	Página
Cuadro 1. Principales hipoglucemiantes orales	18
Figura 1. <i>Hintonia latiflora</i> (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock	22
Figura 2. Árbol de <i>H. latiflora</i>	23
Figura 3. Hojas de <i>H. latiflora</i>	23
Figura 4. Corteza de <i>H. latiflora</i>	23
Figura 5. Reproducción del códice Florentino donde se ilustra el <i>chichicplatli</i> (fig. 613)	26
Figura 6. Reproducción del <i>copalxihuitl</i> ilustrado en el libro “Historia Natural de Nueva España”	27
Figura 7. Reproducción de la ilustración realizada durante las expediciones de Sessé y Mociño por Nueva España, se ilustra el copalchi <i>Coutarea latiflora</i>	28
Figura 8. Reproducción de la gráfica original contenida en el tomo XII de los AIMN, reportando la actividad antidiabética de <i>H. latiflora</i>	31
Figura 9. Reproducción del listado de productos opoterápicos y específicos “Novellas” donde se menciona al Copalchi Novellas como antidiabético	32
Figura 10. Anuncio en el periódico “La Vanguardia”, miércoles 6 de agosto de 1913	32
Figura 11. Anuncio en el periódico “La Vanguardia”, miércoles 25 de enero de 1922	32
Figura 12. Fotografía del Copalchi Novellas, donde se leen sus propiedades, y posología	33
Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de <i>Hintonia latiflora</i>	36
Esquema 1. Fraccionamiento primario del extracto íntegro de las hojas de <i>H. latiflora</i>	45
Cuadro 3. Fraccionamiento primario del extracto íntegro de las hojas de <i>Hintonia latiflora</i>	46
Cuadro 4. Fraccionamiento secundario de la fracción F22	47

Cuadro 5. Fraccionamiento secundario de la fracción F20	48
Cuadro 6. Fraccionamiento terciario de la fracción F20-VII	48
Tabla 1. Relación dosis - muerte en ratones ICR, extracto íntegro de las hojas de <i>H. latiflora</i>	58
Tabla 2. Efecto de la tolerancia a la glucosa oral del extracto de hojas de <i>H. latiflora</i> (100 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	59
Tabla 3. Efecto de la tolerancia a la glucosa oral del extracto de hojas de <i>H. latiflora</i> (100 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	59
Figura 13. Curva de tolerancia a la glucosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; extracto íntegro de las hojas de <i>H. latiflora</i> (100 y 500 mg/kg)	60
Figura 14. Curva de tolerancia a la glucosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos (STZ 100 mg/kg, i.p.); extracto íntegro de las hojas de <i>H. latiflora</i> (100 y 500 mg/kg)	61
Tabla 4. Efecto agudo del extracto de hojas de <i>H. latiflora</i> (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en concentración de glucosa sanguínea	63
Tabla 5. Efecto agudo del extracto de hojas de <i>H. latiflora</i> (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en concentración de glucosa sanguínea	63
Figura 15. Efecto agudo del extracto de hojas de <i>H. latiflora</i> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos	64
Figura 16. Efecto agudo del extracto de hojas de <i>H. latiflora</i> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos	65
Figura 17. Fotomacrografía (6.25×) domacios en el envés de la hoja de <i>H. latiflora</i>	66
Figura 18. Fotomacrografía (12.5×) detalle del domacio en el envés de la hoja	66
Figura 19. Fotomacrografía (6.25×) de la línea de tricomas en el haz de la hoja de <i>H. latiflora</i>	67
Figura 20. Fotomacrografía (12.5×) del detalle de la línea de tricomas en el haz de la hoja	67

Figura 21. Fotomicrografía (100×) en contraste de fases del mesófilo en corte transversal, tinción cuádruple de Johansen	68
Figura 22. Fotomicrografía (100×) en campo claro del mesófilo en corte transversal, cutícula teñida de rojo, tinción rojo “O” de aceite	68
Figura 23. Fotomicrografía (100×) en campo claro corte transversal, haz vascular tipo colateral, tinción de safranina - verde rápido	68
Figura 24. Imagen digital de microscopía electrónica de barrido (500×) campo de estomas paracíticos en el envés	69
Figura 25. Imagen digital de microscopía electrónica de barrido (1500×) detalle de estoma paracítico	69
Figura 26. Imagen digital de microscopía electrónica de barrido (75×) domacio en el envés de la hoja	70
Figura 27. Fotomicrografía (100×) en campo claro, corte longitudinal, tricoma pluricelular, tinción azul negro de naftol	70
Figura 28. Imagen digital de microscopía electrónica de barrido (3500×) detalle de la cutícula que recubre los tricomas	70
Figura 29. Fotomicrografía (100×) en campo claro, corte longitudinal, elementos de vaso, tinción cuádruple de Johansen	71
Figura 30. Imagen digital de microscopía electrónica de barrido (2000×) detalle de miembros de vaso en arreglo helicoidal	71
Tabla 6: Datos de RMN- ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) y RMN- ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) de la 5-O-[β -D-xilopiranosil-(1→6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)	75
Figura 31. Cromatografía en placa delgada de la infusión de las hojas de <i>H. latiflora</i> (HHL)	77
Figura 32. Cromatografía en placa delgada de la infusión de las hojas de <i>H. standleyana</i> (HHS)	77
Figura 33. Cromatografía en placa delgada de la infusión de la corteza de <i>H. latiflora</i> (CHL)	78
Figura 34. Cromatografía en placa delgada de la infusión de la corteza de <i>H. standleyana</i> (CHS)	78
Figura 35. Cromatograma de las infusiones de las hojas de <i>H. latiflora</i> (A) y <i>H. standleyana</i> (B)	80

Espectro 1. Espectro de RMN ¹ H del ácido ursólico (24)	91
Espectro 2. Espectro de RMN ¹³ C del ácido ursólico (24)	92
Espectro 3. Espectro IR del ácido ursólico (24)	93
Espectro 4. Espectro de EM modalidad FAB+ del ácido ursólico (24)	94
Espectro 5. Espectro de RMN ¹ H del ácido desoxicordifolínico (19)	95
Espectro 6. Espectro de RMN ¹³ C del ácido desoxicordifolínico (19)	96
Espectro 7. Espectro de RMN ¹ H de la 5- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)	97
Espectro 8. Espectro de RMN ¹³ C de la 5- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)	98
Espectro 9. Espectro COSY de la 5- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)	99
Espectro 10. Espectro HSQC de la 5- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)	100
Espectro 11. Espectro IR de la 5- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)	101
Espectro 12. Espectro de EM modalidad FAB+ de la 5- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)	102
Espectro 13. Espectro de RMN ¹ H del ácido clorogénico (26)	103
Espectro 14. Espectro de RMN ¹³ C del ácido clorogénico (26)	104
Espectro 15. Espectro IR del ácido clorogénico (26)	105

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
α	Rotación óptica
AcEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
CHCl ₃	Cloroformo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
cm	Centímetro
COSY	Correlación homonuclear
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de doble
dL	Decilitro
EtOH	Etanol
eV	Electrón volts
°C	Grados Celsius
EM	Espectrometría de masas
FAA	Formol-ácido acético-alcohol etílico
FAB ⁺	Bombardeo rápido de átomos modalidad positiva
g	Gramo
h	Hora
Hz	Hertz
HSQC	Correlación heteronuclear
i.p.	Intraperitoneal
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo
L	Litro
m	Multiplete
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mg	Miligramo
[M] ⁺	Ión molecular
[M-1] ⁺	Ión quasimolecular
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
μm	Micrometro
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
NAD	Nicotina-adenina dinucleótido
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>p</i>	Probabilidad
pf	Punto de fusión
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
s	Singulete
STZ	Estreptozotocina
UV	Ultravioleta

1. Resumen

Hintonia latiflora (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Rubiaceae), conocida popularmente como copalchi, ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana desde hace más de 400 años. Actualmente, la corteza es ampliamente comercializada debido a su potencial antidiabético. Dicha comercialización aunada a la falta de programas para su explotación sustentable ha amenazado el recurso, ubicándolo en peligro de extinción.

El objetivo principal de este trabajo fue fomentar la conservación de la especie mediante el estudio de la actividad antidiabética de las hojas de *H. latiflora*, estableciendo los parámetros de identidad, composición, seguridad y eficacia de la droga cruda para elaborar la monografía tipo Organización Mundial de la Salud (OMS).

El estudio anatómico y estructural permitió identificar las características principales de las hojas de esta especie. A nivel macroscópico, la característica principal fue la presencia de domacios en el envés de la hoja. En cuanto a las microscópicas, el arreglo helicoidal en los elementos de vaso, la presencia de estomas paracíticos y la ornamentación de los tricomas son propios de *H. latiflora*.

En cuanto a la composición química de las hojas de *H. latiflora*, se identificó al ácido desoxicordifolínico (**19**) como el compuesto marcador de especies del género *Hintonia*. Por otro lado, el aislamiento y la identificación de una serie de 4-fenilcumarinas, destacando el compuesto novedoso 5-O- $[\beta$ -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (**25**), así como de otros productos naturales como los ácidos ursólico (**24**) y clorogénico (**26**), conforman la mezcla de compuestos con actividad antidiabética que favorecen la eficacia terapéutica de la droga cruda.

El extracto orgánico de las hojas de *H. latiflora* presentó una dosis letal media (DL₅₀) menor que el de la corteza, el valor calculado de 1668 mg/kg se encuentra dentro del rango que permite considerarle como no tóxica.

La eficacia antidiabética del extracto orgánico de las hojas de *H. latiflora* queda comprobada, ya que presentó un potencial antihiper glucémico significativo en los experimentos en animales diabéticos al inhibir el pico postprandial. Además, mostró una actividad hipoglucemiante significativa en ratones diabéticos. El efecto se presentó desde las 1.5 horas y se mantuvo a lo largo de todo el experimento, alcanzando el

porcentaje máximo de variación de glucemia a las 9 horas para las dosis de 300 (-42.9%) y 500 mg/kg (-38.6%).

Con las observaciones y los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de investigación, se puede proponer el uso de las hojas de *H. latiflora* como un sustituto potencial de las cortezas, generando así una estrategia que permitiría la conservación de este recurso tan importante.

1.1. Abstract

Hintonia latiflora (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Rubiaceae), commonly known as copalchi, has been used in Mexican traditional medicine among 400 years. Nowadays, the stem-bark is widely commercialized due to their antidiabetic potential. The commercialization combined with the lack of strategies for their sustainable exploitation has endangered the resource at the point of extinction.

The main objective of this research was to promote the conservation of this species by establishing the antidiabetic efficacy and potential toxicity of the leaves as well as the appropriated quality control parameters. This information serves as the basis for a World Health Organization (WHO) type monograph.

The anatomical and structural study allowed the identification of the main features of the species. A distinctive macroscopically characteristic of *H. latiflora* is the presence of domatia in the back of the leaves; microscopically, the helicoidally arrangement in the vessel elements, the paracytic stomata, and the ornamentation of the trichomes are the most important features.

Desoxycordifolinic acid (**19**) was identified as the marker compound for the species of *Hintonia*. On the other hand, the presence in the leaves of several 4-phenylcoumarins, including the novel compound 5-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-7,4'-dimethoxy-4-phenylcoumarin (**25**), as well as ursolic (**24**) and chlorogenic (**26**) acids with known antidiabetic properties could explain the efficacy of the leaves.

The crude extract of *H. latiflora* leaves was slightly more toxic than the stem-bark extract; nevertheless, the calculated LD₅₀ of 1668 mg/kg fall into the dose range considered as non-toxic.

The antidiabetic efficacy of the crude extract of *H. latiflora* leaves was confirmed. The leaves exhibited significant antihyperglycemic effect in diabetic animals. In addition, it

showed an important hypoglycemic activity; in diabetic mice the effect appeared from the 1.5 hours and continued along the experiment, reaching the maximum effect after 9 hours at the doses of 300 (-42.9%) and 500 mg/kg (-38.6%).

In summary, the results of this work clearly indicated that the use of the leaves of *H. latiflora* as a substitute of its stem-bark is feasible, generating a strategy for the conservation of this valuable resource.

2. Introducción

Hintonia latiflora (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Rubiaceae), conocida popularmente como copalchi, es una planta no sólo de amplio uso en la medicina tradicional sino también con una amplia historia que data de más de 400 años de antigüedad. La comercialización de su corteza, tanto en México como en el extranjero, ha propiciado que hoy en día se encuentre en peligro de extinción, pues su explotación irracional genera la muerte del árbol (Sahagún, 1540; Mociño, 1802; Palmer, 1885; AIMN, 1894, Loaeza, 1906, 1907, 1908; Landa, 1913; Terres, 1913; Gentry, 1942; Díaz, 1976, Bye, 1986; Martínez, 1989; Argueta *et al.*, 1994).

La demanda de *H. latiflora* se ha incrementado debido a su atribuida eficacia para el tratamiento de la diabetes. La alta incidencia de esta enfermedad crónico-degenerativa a nivel mundial y, en particular, en México donde es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad, ha llevado a la búsqueda y el estudio de agentes terapéuticos que permitan el control de dicha enfermedad.

Una de las finalidades de éste estudio es fomentar la conservación de esta rubiácea medicinal a través de la investigación de las hojas, recurso vegetal renovable, y de esta forma poder proponer la sustitución del uso de la corteza, cuya explotación excesiva provoca la muerte de la planta. Para lograr dicho objetivo, es fundamental conocer la identidad, composición, inocuidad y eficacia de las hojas de *H. latiflora*, esta información permitirá, al mismo tiempo, generar su monografía tipo Organización Mundial de la Salud (OMS)

Toda aproximación al estudio de las hojas de *H. latiflora* debe basarse en la comparación con la corteza, ya que en la medida que la composición química, la inocuidad y la eficacia terapéutica se relacionen, podrá proponerse a las hojas como un sustituto posible al uso de la corteza.

La identidad de la droga cruda debe ser tanto química como botánica, para lo primero, la propuesta de un compuesto marcador es indispensable. En cuanto a la identidad botánica, tanto estudios macroscópicos, como microscópicos deben llevarse a cabo, ubicando las características diagnósticas morfológicas que la diferencien de otras especies del género *Hintonia* y de posibles sustitutos.

El estudio fitoquímico de las hojas permite la identificación de compuestos con potencial antidiabético, relacionando la composición con la eficacia terapéutica de la droga cruda.

La inocuidad de las hojas de *H. latiflora* debe establecerse a través de los estudios de toxicidad. Una de las principales características que debe cumplir esta parte vegetal para poder administrarse es que sea segura para el paciente.

La eficacia terapéutica de la droga cruda, debe establecerse a través de su potencial antidiabético, y esto se realiza valorando tanto la actividad antihiper glucemiante como la actividad hipoglucemiante del extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora* en los modelos farmacológicos apropiados.

Finalmente, los estudios realizados permitirán proponer a las hojas de *H. latiflora* como un sustituto al uso de la corteza promoviendo así la conservación de este recurso natural tan valorado.

3. Antecedentes

3.1. Las plantas medicinales

3.1.1. Breve reseña histórica

México es el segundo país a nivel mundial en especies botánicas con uso medicinal, aproximadamente 3352 especies, antecedido por China que cuenta con unas 5000 especies de plantas medicinales (Bye y Linares, 1992).

Es importante destacar que el vasto conocimiento en el uso de plantas medicinales en nuestro país es el reflejo del desarrollo que tuvieron las distintas culturas que habitaron el territorio mesoamericano. La zona centro se caracteriza por ser, desde época prehispánica, un punto de fusión y encuentro intercultural. Debido a distintas razones políticas, económicas o meramente de expansión territorial, habitantes de diversas culturas mesoamericanas se concentraron en la región central; esto generó que se reuniera un gran número de especies medicinales de distintos lugares, alguna de las cuales compartían usos terapéuticos similares. Además, la presencia de dos grandes centros culturales como Tenochtitlan y Teotihuacan, ayudaron a dispersar los conocimientos científicos por todos los territorios mesoamericanos. La zona sur formaba el núcleo del horizonte cultural mesoamericano, siendo la cuna de grandes civilizaciones como la Olmeca y la Maya, las cuales poseían una cosmogonía que los relacionaba estrechamente con su medio ambiente, generando así un profundo conocimiento de su flora. Por si fuera poco la zona sureste del país es la que concentra la mayor biodiversidad, producto de los complejos ecosistemas allí existentes, arrojando así una gama de recursos botánicos con fines terapéuticos (Guía México Desconocido, 2001).

Un factor que facilitó contar con el conocimiento de las plantas medicinales es el trabajo de recopilación que se llevó a cabo en el periodo novohispano destacando el códice de Martín de la Cruz, traducido al latín por Juan Badiano “*Libellus de medicinalibus indorum herbis*” o “*Códice de la Cruz-Badiano*”, publicado en 1552, el cual describe métodos curativos a través del uso de plantas, animales y algunos minerales utilizados por los médicos indígenas como Martín de la Cruz, complementando dicho trabajo con ilustraciones de los componentes utilizados. También, encontramos la obra de Fray Bernardino de Sahagún que en 1557 da a conocer la “*Historia general de las cosas de la Nueva España*” o “*Códice Florentino*”, escrito en

las dos lenguas de la Nueva España, náhuatl y castellano, en el cual se describe los nombres y usos múltiples de plantas medicinales y productos de origen animal utilizados por los indígenas para el tratamiento de distintas enfermedades. Más tarde, en 1570, encontramos la obra de Francisco Hernández “Historia Natural de las plantas de Nueva España” donde se destaca el amplio conocimiento en el manejo de las plantas medicinales para el tratamiento y prevención de distintas enfermedades (Bejar *et al.*, 2000; Cortez-Gallardo, 2004).

Las expediciones del español Martín de Sessé y Lacasta y el mexicano José Mariano Mociño llevadas durante la última década del siglo XVIII en Nueva España permitieron la recopilación de información etnobotánica en la obra “Flora Mexicana” o “Plantae Novae Hispaliae”, que más tarde fue la base de diversas investigaciones en plantas medicinales (McVaugh, 2000).

A finales del siglo XIX y principios del siglo XX, se publican los “Anales del Instituto Médico Nacional “ (AIMN), en los cuales se reportan todos los estudios botánicos, químicos, pre-clínicos y clínicos llevados a cabo por el Instituto. Esta obra es, probablemente, una de las fuentes más importantes del siglo XX en materia de plantas medicinales.

Las obras de Maximinio Martínez: “Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas” (1927) y “Las plantas medicinales de México” (1934) constituyen los últimos pilares en el estudio de la herbolaria mexicana, ya que recopila toda la información generada hasta mediados del siglo XX (Lozoya, 1984).

3.1.2. Panorama actual y regulación de las plantas como agentes terapéuticos

La relación con las plantas medicinales ha estado presente desde los primeros días de la humanidad conformando la base terapéutica en el control de la salud. Actualmente, en países en vías de desarrollo un gran porcentaje de la población todavía depende de este recurso para la atención primaria de la salud a través de su prescripción por los médicos tradicionales (OMS, 2000).

En 1978, la OMS en la Declaración de Alma-Ata recomendó, entre otras cosas, la inclusión de medicinas tradicionales de utilidad comprobada en la práctica terapéutica oficial (Akerlele, 1988). En esta misma asamblea se definió a la planta medicinal como cualquier vegetal que en uno o más de sus órganos contenga sustancias que pueden ser

utilizadas con fines terapéuticos *per se* o como precursores para la síntesis de otros productos de importancia medicinal (Cañigüeral y Vila, 2003). Las resoluciones de esa asamblea fueron de gran importancia, pues un organismo internacional reconoció el uso de los recursos vegetales con potencial terapéutico real.

En 1986 los participantes de la cuarta Conferencia Internacional de las Autoridades Regulatoras de Fármacos (*International Conference of Drug Regulatory Authorities*, ICDRA) solicitaron que la OMS compilara una lista de las plantas medicinales más utilizadas alrededor del mundo y estableciera los lineamientos para el control de calidad de las plantas medicinales. Como consecuencia se elaboró el documento "*Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines*" que contiene las directrices generales para establecer los procedimientos destinados al control de calidad de los productos herbolarios (WHO, 1999).

En 1989 la Asamblea Mundial de la Salud (WHA, por sus siglas en inglés) en su resolución WHA42.43, instó a los estados miembros a realizar una evaluación completa de sus sistemas de medicina tradicional, incluyendo estudios preclínicos y clínicos, con el fin de reglamentar y controlar los productos elaborados a partir de plantas medicinales. Así mismo, recomendó establecer y mantener estándares adecuados, proporcionando información científica confiable sobre la inocuidad, la eficacia y el control de calidad de estas plantas. Esa información debería incluirse también en las farmacopeas nacionales de los países miembros (OMS, 2000).

Durante la sexta ICDRA en 1991, tomando como base los lineamientos en materia de medicinas herbolarias, se solicitó a la OMS la elaboración de un documento que contuviese las monografías de las plantas medicinales más utilizadas alrededor del mundo, con la finalidad de establecer los parámetros de inocuidad, eficacia y control de calidad y/o aseguramiento de calidad de dichas plantas (WHO, 1999). Posteriormente, en su octava ICDRA celebrada en Bahrein en noviembre de 1996, se presentaron las primeras 28 "monografías de la OMS sobre plantas medicinales selectas", proporcionando, en cada caso, información científica sobre la inocuidad, la eficacia y el control de calidad de las plantas medicinales de uso generalizado, facilitando el uso adecuado de los medicamentos herbolarios y proporcionando el modelo para que los estados miembros elaboren sus propias monografías sobre estas y otros medicamentos herbarios adicionales y facilitar el intercambio de información (WHO, 1999).

Cada monografía consta de dos partes. La primera incluye la definición de la droga, una descripción de las características botánicas, distribución geográfica, pruebas de identidad, pureza y composición, y un listado de los principales constituyentes químicos. La definición de la droga provee el nombre científico de cada planta. Además, se presenta una lista con los sinónimos (en nomenclatura binomial) y nombres populares.

Con la inclusión de una descripción botánica detallada se pretende asegurar la calidad durante la recolecta y la producción del material vegetal, mientras que la descripción detallada de la droga cruda servirá para facilitar la comercialización de los productos. El compendio de los ensayos de identidad y de composición pueden ser utilizadas para el control y el aseguramiento de la calidad. Los constituyentes químicos se encuentran descritos en la sección de la monografía que tiene por encabezado “Componentes químicos principales”.

La segunda parte de cada monografía contiene información necesaria para los practicantes profesionales del cuidado de la salud. Esta parte comienza con los usos medicinales que han sido corroborados sobre datos científicos. Los usos medicinales están definidos como: usos sustentados en datos a nivel clínico, usos descritos en farmacopeas y sistemas de medicina tradicional (no sustentados por datos clínicos, pero sí en información farmacológica experimental que confirma su eficacia) y usos descritos en la medicina popular (usos que no son confirmados por datos clínicos o experimentos farmacológicos). Esta sección está escrita específicamente para los profesionales del cuidado de la salud y permitirá que un médico determine con rapidez cuales indicaciones terapéuticas están apoyadas en datos clínicos, sin tener que leer a través de toda la información farmacológica experimental y clínica. Esta sección incluye también una lista de posibles contraindicaciones, riesgos y precauciones: interacción con otros fármacos o plantas, potencial carcinogénico, mutagénico, efectos sobre la fertilidad y el embarazo (efectos teratogénicos), así como efectos en la lactancia y uso pediátrico. Esta sección también incorpora si existen reacciones adversas o efectos colaterales y una sección de dosificación titulada “Posología” (WHO, 1999). Cada monografía está ampliamente referenciada, permitiendo a los lectores acceder a información adicional cuando sea necesario.

En el año de 2001 se publicó el segundo volumen de “monografías de la OMS sobre plantas medicinales selectas” que incluye la información científica de otras 30 especies vegetales (WHO, 2001). La revisión de este segundo documento de monografías se llevó a cabo en la consulta de expertos de la OMS, en Milán Italia en marzo del año 1999. Un tercer volumen de esta serie se publicó a comienzos del año 2007, “monografías de la OMS sobre plantas medicinales selectas” incluyendo 28 monografías adicionales (WHO, 2007). Este último documento es el producto de la revisión llevada a cabo en la consulta de expertos de la OMS, en Ottawa, Canadá en julio del año 2001.

Debido al amplio uso y comercialización de medicamentos herbolarios en México, en el mes de febrero de 1997, se publicó en el Diario Oficial de la Federación, el Reglamento de Insumos para la Salud. Dicho Reglamento considera de manera explícita en sus artículos 66-71, 88-98 y 129-130 las condiciones que para su registro, autorización y venta deben cumplir los remedios herbolarios. De manera adicional, en el año 2001, la Secretaría de Salud, a través de su Comisión Permanente de la Farmacopea, publicó la primera edición de la “Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos”, como una respuesta ante la creciente necesidad de referentes a estos recursos y como una repercusión de la propuesta de la OMS. Sin embargo, a pesar de la reconocida riqueza herbolaria del país, las monografías de especies autóctonas e introducidas, de uso médico tradicional en nuestro país, resultaron muy limitadas en cantidad y calidad, ya que no se disponía de información suficiente para integrarlas. De ahí, que sea necesario investigar de manera exhaustiva e interdisciplinaria las plantas de mayor uso en nuestro país, con la finalidad de integrar, en primera instancia, las monografías tipo OMS de utilidad para el sector salud, industrial y público en general. Estas monografías contribuirán a normar el creciente comercio de drogas vegetales en México tanto a nivel nacional como internacional.

En los países desarrollados, se realiza una constante investigación farmacológica y se producen medicamentos a partir de las plantas medicinales; ya sea para la extracción de compuestos activos, base de fármacos convencionales, así como para generar preparados fitofarmacéuticos (Cañigual y Vila, 2003). En esos países el progreso de los aspectos de regulación y control de calidad de las materias primas es notable. El gran mercado de fitofármacos es esos países posiblemente ha contribuido al estado de desarrollo de su industria de plantas medicinales. Sobre todo en el caso de la

Unión Europea; en 1991 el mercado de medicamentos herbarios alemán ascendió a 1.7 mil millones de dólares americanos, mientras que en 1995 la cantidad total generada alcanzó los 9 mil millones de dólares americanos, encontrando así a los fitofármacos entre los 2000 medicamentos de mayor prescripción médica y con más de un 90% de la población utilizándolos (OMS, 2000). En toda Europa el valor global del mercado de los preparados a base de plantas medicinales alcanzó los 24 mil millones de dólares americanos en el año 2002. Un 66% de los alemanes utilizó en 1997 preparados herbarios para combatir el resfriado; también los trastornos gastrointestinales, el dolor de cabeza y el insomnio fueron padecimientos tratados con fitofármacos. En Francia, en cambio, el mercado está liderado por los productos de utilidad en el tratamiento de trastornos circulatorios (44%), seguidos por los digestivos y los antitusivos-antigripales. En el caso de los Estados Unidos, las alergias, el insomnio y los problemas respiratorios y digestivos constituyen el uso más frecuente de la fitoterapia (Cañigueral y Vila, 2003).

El interés por el conocimiento tradicional impulsado por el valor agregado que se está dando hoy en día a las plantas medicinales promueve la generación de documentos monográficos que permitan contar con un registro y control de la biodiversidad medicinal nacional.

3.2. Diabetes mellitus

Las enfermedades crónico-degenerativas son aquellas que van avanzando progresivamente hasta que terminan con la vida del paciente, sin que exista alguna cura para detenerlas. Las enfermedades crónico-degenerativas más comunes son la diabetes, el cáncer, la hipertensión arterial, la artritis y la enfermedad de Alzheimer (López García, 2002). Las enfermedades crónico-degenerativas son, actualmente, la principal causa de mortalidad en los países industrializados. Entre las enfermedades crónico-degenerativas de mayor impacto en el mundo se encuentra la diabetes mellitus.

La frecuencia de diabetes mellitus en la población mexicana ha aumentado más de treinta veces durante los últimos 50 años. Por esta razón, es la enfermedad que mayor atención médica demanda y una de las causas más importantes de hospitalización en México. Solamente en el Seguro Social (IMSS) se registran cada año más de 180 000 nuevos casos y se conceden más de cinco millones de consultas; se estima que diariamente mueren de manera prematura 39 derechohabientes a causa de las

complicaciones de este padecimiento; además el 70% de las personas con diabetes tienen formas moderadas o severas de daño neurológico, el cual, en casos severos, puede llevar a amputaciones de las extremidades inferiores. A partir de los 45 años se presenta la mayor tasa de incidencia, siendo entre 60 a 64 años el grupo de edad más afectado. En cuanto a los estados más afectados, encontramos a los estados de Campeche, el Distrito Federal, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Baja California Sur, Durango y Chihuahua; de hecho la Organización Panamericana para la Salud, ubica a las enfermedades crónico-degenerativas como la primera causa de morbilidad y mortalidad en México (Hernández-Ávila y Olaíz, 2002; Vigilancia epidemiológica, Secretaría de Salud, 2004; Comunicado de prensa No. 628, 12 de Noviembre de 2005, Secretaría de Salud).

Datos recientes de la encuesta nacional de salud indican que en el año 2000 cerca de 3.6 millones de mexicanos mayores de 20 años padecían diabetes mellitus tipo 2 y se estima que para el año 2030 el número de pacientes diabéticos en México se incrementará a más de seis millones. Es decir, en tan sólo un par de décadas se alcanzaría en México uno de los índices de diabetes más altos del mundo (Hernández-Ávila y Olaíz, 2002).

En un estudio realizado por la OMS, a partir de los casos estimados de diabetes para el año 2000 en México, se calcularon los costos directos e indirectos de la enfermedad. Los costos directos incluían los gastos en medicamentos, las hospitalizaciones, las consultas y el tratamiento de las complicaciones. Para estimar los costos indirectos se utilizó un criterio basado en el capital humano, que incluía el cálculo de los ingresos no percibidos debido a los casos de mortalidad prematura y discapacidad, por DM. El costo anual total asociado a la diabetes, según las estimaciones sería entonces de 15 118 millones de dólares americanos (gastos directos: 1 974 millones de dólares americanos; gastos indirectos: 13 144 millones de dólares americanos) (Barceló *et al.*, 2003).

3.2.1. Generalidades sobre la enfermedad

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por niveles de glucosa altos en la sangre, hiperglucemia. Puede ser causada por defectos en la secreción de insulina, resistencia a la insulina o ambas. Las complicaciones a largo plazo de la diabetes incluyen retinopatía con pérdida potencial de la visión; nefropatía

generando deficiencia renal; neuropatía periférica con el riesgo de úlceras en los pies, amputaciones y pie de Charcot; y neuropatías autonómicas causando alteraciones gastrointestinales, genitourinarias y cardiovasculares, así como disfunción sexual. En pacientes con diabetes se ha incrementado la incidencia de arteriosclerosis cardiovascular, arterial periférica y enfermedad cerebrovascular; así como hipertensión y anormalidades en el metabolismo lipoprotéico. Entre los síntomas de una marcada hiperglucemia se encuentran la poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces con polifagia y la visión nublada (American Diabetes Association, ADA, 2007).

Muchos procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes. Éstos van desde la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas con la consecuente producción deficiente de insulina, hasta anormalidades que generan resistencia a la insulina. La base de dichas anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en la diabetes, es la acción insuficiente de la insulina en los tejidos blanco.

Durante el período pre-diabético se identifican problemas con la glucosa ingerida y/o problemas con la tolerancia a la glucosa, que son los que llevan a una situación de hiperglucemia. Existen tres grandes tipos de diabetes: diabetes mellitus tipo 1 (insulinodependiente), diabetes mellitus tipo 2 (no insulinodependiente) y diabetes gestacional; aunque también existen otros tipos específicos de diabetes. Asignar un tipo u otro de diabetes a un individuo depende mucho de las circunstancias al momento de la diagnosis, pues pueden padecer más de un tipo, o bien puede un tipo desencadenar en otro distinto (Permut *et al.*, 2005; ADA, 2007).

La diabetes mellitus tipo 1 es el resultado de la destrucción autoinmune de las células β productoras de insulina; dejando al paciente dependiente de inyecciones de insulina para sobrevivir. Esta forma de diabetes corresponde al 5-10% de los casos. Entre los marcadores de la destrucción inmune de las células β pancreáticas encontramos, anticuerpos para células de las isletas, a la insulina, a la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD₆₅) y a las fosfatasa de tirosina IA-2 y IA-2 β . La tasa de destrucción es variable en cada individuo (ADA, 2007).

La diabetes mellitus tipo 2, también conocida como diabetes de la edad adulta, ocurre cuando la insulina pierde efectividad (insulinoreistencia), acompañada de una baja producción de la misma por parte de las células β . Al menos en un principio, y

frecuentemente a lo largo de su vida, los individuos que padecen diabetes mellitus tipo 2 no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir (Davis y Granner, 2001; Permut *et al.*, 2005; ADA, 2007). La diabetes mellitus tipo 2 supone el 90-95% de los casos de diabetes. La frecuencia de la diabetes mellitus está aumentando en todo el mundo de forma acelerada. Si en 1997 los datos de prevalencia se encontraban en torno a 124 millones de personas, se estima que en el año 2025 esta cifra llegará a 300 millones. En este tipo de diabetes se producen trastornos metabólicos caracterizados por una hiperglucemia dando lugar a complicaciones crónicas al afectar vasos y nervios. La alteración subyacente en esta enfermedad es la pérdida de sensibilidad de los tejidos a insulina, denominada insulinoresistencia, así como una secreción inadecuada de insulina por las células encargadas de su producción en el páncreas. Además de aumentar la concentración de glucosa la acción deficiente de la insulina se traduce frecuentemente en elevación de los niveles de colesterol y/o triglicéridos (ADA, 2007; Gómez Peralta, 2005). La mayor parte de los casos de diabetes mellitus tipo 2 se producen en el contexto de lo que llamamos síndrome metabólico. En éste se asocian diabetes, hipertensión arterial, aumento de los niveles de colesterol, triglicéridos y/o ácido úrico así como sobrepeso, muy probablemente relacionados a la insulinoresistencia. El síndrome metabólico eleva notablemente el riesgo cardiovascular y es una causa fundamental de muerte en los países desarrollados (ADA, 2007).

La diabetes mellitus tipo 2 se da en una mayor tasa en personas con antecedentes familiares de diabetes. En los últimos años se han descubierto muchos genes relacionados con la posterior aparición de diabetes aunque este componente genético es complejo y, posiblemente, debe acompañarse de factores ambientales relacionados, en este caso, fundamentalmente con los hábitos de vida: sedentarismo y alimentación inadecuada. Sin embargo, la genética de esta forma de diabetes es compleja y no está claramente definida (Permut *et al.*, 2005; ADA, 2007). El 80% de las personas con diabetes tipo 2 son obesas, y la obesidad por sí misma causa cierto grado de resistencia a insulina. Pacientes que no son obesos, muchas veces tienen mayor cantidad de grasa corporal distribuida predominantemente en la región abdominal (Gómez Peralta, 2005; ADA, 2007). El tratamiento de la diabetes tipo 2 se basa en tres pilares fundamentales: seguimiento de un plan de alimentación equilibrado, práctica de ejercicio físico regular y tratamiento farmacológico personalizado.

La diabetes gestacional se define como cualquier grado de intolerancia a glucosa que comienza o se detecta por primera vez durante el embarazo, la cual suele incrementar la tendencia a desarrollar diabetes mellitus tipo 2. El deterioro en la tolerancia a glucosa durante el embarazo se presenta normalmente durante el tercer trimestre (ADA, 2007).

También existen otros tipos específicos de diabetes: la relacionada con síndromes genéticos, la juvenil de inicio durante la madurez (MODY) ocasionada por defectos genéticos en la función de las células β , por enfermedades en el páncreas exocrino o endocrinopatías *per se*, la postoperatoria o por supresión inmunitaria y la diabetes relacionada con farmacoterapia (Davis y Granner, 2001; Permut *et al.*, 2005; ADA, 2007).

3.2.2. Fármacos utilizados para el control de la diabetes mellitus tipo 2

Los fármacos utilizados para el control de la diabetes mellitus tipo 2 se conocen bajo el nombre genérico de hipoglucemiantes orales. En contraste con los estudios sistemáticos que condujeron al aislamiento de la insulina, los hipoglucemiantes orales se descubrieron de manera accidental. Así en 1942, Janbon y colaboradores notaron que algunas sulfonamidas causaban hipoglucemia en animales de experimentación. A partir de dichas observaciones se fueron descubriendo más hipoglucemiantes que actúan a distinto nivel (Davis y Granner, 2001).

Entre los hipoglucemiantes orales encontramos a los inhibidores de α -glucosidasas, las biguanidas, los secretagogos de insulina, los sensibilizadores a la insulina y los inhibidores de las lipasas intestinales (Davis y Granner, 2001; Cheng y Fantus, 2005) (Cuadro 1).

Los inhibidores de las α -glucosidasas reducen la absorción intestinal de almidón, dextrina, oligosacáridos y disacáridos al inhibir la acción de las α -glucosidasas presentes en las microvellosidades intestinales. La inhibición de esta enzima aplaza la absorción de carbohidratos por lo que el aumento posprandial de la glucosa plasmática disminuye en sujetos tanto normales como diabéticos. Entre los inhibidores de las α -glucosidasas más comunes encontramos la acarbosa (Cuadro 1), un oligosacárido de origen microbiano, el miglitol, un derivado de la desoxinojirimicina y la voglibosa (Davis y Granner, 2001; Cheng y Fantus, 2005; Borges de Melo *et al.*, 2006). También inhiben de manera competitiva a la glucoamilasa y a la sacarasa, pero tienen efectos débiles sobre la α -

amilasa pancreática. Estos productos reducen las concentraciones plasmáticas posprandiales de glucosa en sujetos con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2. Los inhibidores de las α -glucosidasas pueden tener profundos efectos sobre las concentraciones de hemoglobina A_{1c} en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que presentan hiperglucemia grave (Cheng y Fantus, 2005; Davis y Granner, 2001).

Las biguanidas causan hipoglucemia al disminuir el aporte de glucosa hepática inhibiendo la gluconeogénesis. Por otro lado, éstas incrementan la toma de glucosa por parte del músculo esquelético y la sensibilidad a la insulina en el hígado. Existen varias biguanidas como la fenformina, la buformina y la metformina (Cuadro 1); sin embargo, esta última es la única que se sigue utilizando, ya que otras biguanidas están relacionadas con la producción de acidosis láctica (Davis y Granner, 2001; Cheng y Fantus, 2005). La metformina activa la proteína cinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK) hepática y muscular. La activación de AMPK produce la fosforilación e inhibición de la acetil-coenzima A carboxilasa, bloqueando así la síntesis de ácidos grasos, promoviendo su oxidación. La activación de AMPK hepático disminuye la expresión de la proteína 1 de unión al elemento regulador de colesterol (SREBP-1), un factor de transcripción implicado en la patogénesis de la resistencia a la insulina, dislipidemia y diabetes. La disminución en la expresión de SREBP-1 resulta en la baja de la expresión genética de enzimas lipogénicas, posteriormente contribuyendo a una disminución de la síntesis de triglicéridos y esteatosis hepática. De ésta forma, la metformina reduce la producción de glucosa hepática e incrementa la toma de glucosa por parte del músculo esquelético. AMPK es el principal regulador de metabolismo lipídico y de la glucosa, siendo la clave de los efectos benéficos de la metformina (Cheng y Fantus, 2005).

Dentro de los secretagogos encontramos a las sulfonilureas, las cuales causan hipoglucemia al estimular la liberación de insulina a partir de las células β pancreáticas. La administración aguda de sulfonilureas a pacientes con diabetes mellitus tipo 2 aumenta la liberación de insulina desde el páncreas. También pueden incrementar las cifras de insulina al reducir la depuración de la hormona en el hígado. Entre las sulfonilureas más comunes encontramos la glibenclamida (Cuadro 1), la gliclazida, la glimepirida y la gliburida (Davis y Granner, 2001; Cheng y Fantus, 2005). Las sulfonilureas se unen a su receptor en la superficie de las células β pancreáticas. El

receptor a sulfonilurea esta asociado a subunidades del canal de potasio sensible a trifosfatos (kir6.2). El complejo de unión receptor a sulfonilurea-kir6.2 produce el cierre de los canales de potasio y la inhibición del flujo de iones de potasio en las demás células β , lo cual resulta en la despolarización de la membrana celular y la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. El flujo de calcio causa la contracción de los microtúbulos y la exocitosis de insulina desde las vesículas. Las sulfonilureas no afectan directamente la sensibilidad a insulina (Cheng y Fantus, 2005).

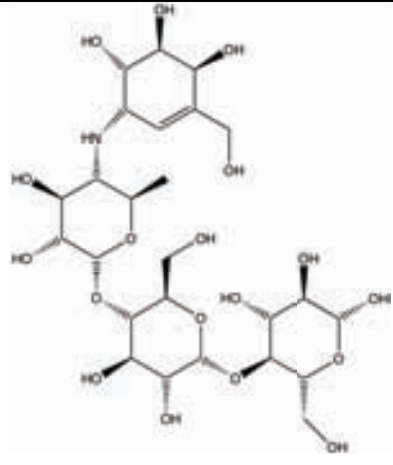
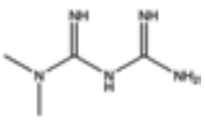
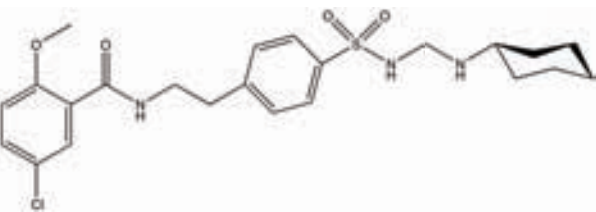
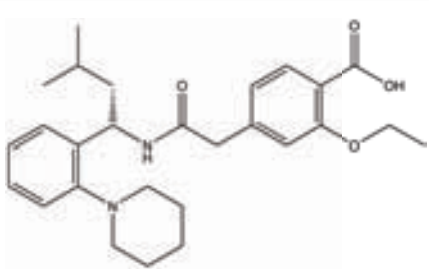
Existe otro grupo de secretagogos que no se encuentran relacionados con las sulfonilureas; esta nueva clase de medicamentos están representados por la nateglinida y la repaglinida (Cuadro 1). La repaglinida es un derivado del ácido benzóico, mientras que la nateglinida es un derivado de la fenilalanina. Su mecanismo de acción es similar al de las sulfonilureas, cierre del canal potasio-adenosin trifosfato y secreción de insulina dependiente de calcio; sin embargo, se unen al receptor de sulfonilureas en un sitio distinto; son de acción más rápida, pero la duración del efecto es menor, generando una baja liberación de insulina (Cheng y Fantus, 2005).

Las tiazolidinedionas activan genes que tienen capacidad de dar respuesta a la insulina y regulan el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Son sensibilizadores a la insulina, dando un aumento en la captación de glucosa en los músculos y decremento de la producción endógena de glucosa. Entre las tiazolidinedionas más comunes encontramos la troglitazona, retirada del mercado por estar vinculada a la toxicidad hepática, la rosiglitazona (Cuadro 1) y la pioglitazona (Davis y Granner, 2001; Cheng y Fantus, 2005). Las tiazolidinedionas funcionan como ligandos del receptor gama activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ), el cual es el más expresado en adipositos. Estos receptores nucleares son fundamentales en la regulación de la expresión de una variedad de genes involucrados en los metabolismos de lípidos y carbohidratos. Las tiazolidinedionas incrementan la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos, aparentemente debido al efecto sobre los adipocitos, ya que hay pocos receptores PPAR γ en el tejido muscular. En el adipocito, se incrementa la diferenciación, se reduce la lipólisis y los niveles de adipocitocinas circulantes se alteran, se reducen el factor α de necrosis tumoral y la leptina, se incrementa la adiponectina. El reclutamiento de un gran número de adipocitos pequeños, asociado a un incremento de la lipogénesis, produce una reducción en los ácidos grasos libre circulantes. Todos estos efectos

incrementan la sensibilidad a la insulina. En animales se ha observado que las tiazolidinedionas incrementan y preservan la función de las células β pancreáticas (Cheng y Fantus, 2005).

Los inhibidores de las lipasas intestinales no son hipoglucemiantes orales, sin embargo se recetan en el tratamiento de la diabetes. El fármaco orlistat inhibe selectivamente las lipasas gástricas y pancreáticas, y en consecuencia, la hidrólisis de las grasas a ácidos grasos libres absorbibles y la absorción de monosacáridos. La reducción en la absorción de grasas y monosacáridos produce un decremento en la ingesta energética y pérdida de peso, factores importantes en el control de la diabetes. El orlistat también se emplea para tratar la obesidad (Cheng y Fantus, 2005).

Cuadro 1. Principales hipoglucemiantes orales

Compuesto	
Inhibidores de α -glucosidasas:	
<ul style="list-style-type: none"> • Acarbosa 	
Biguanidas:	
<ul style="list-style-type: none"> • Metformina 	
Sulfonilureas:	
<ul style="list-style-type: none"> • Glibenclamida 	
Secretagogos no relacionados con las sulfonilureas:	
<ul style="list-style-type: none"> • Repaglinida 	

Tiazolidinedionas:

- Rosiglitazona



Referencias: Borges de Melo *et al.*, 2006; Cheng y Fantus, 2005; Davis y Granner, 2001

3.3. *Hintonia latiflora*, uno de los copalchis más utilizados en las prácticas médicas populares de México

3.3.1. Taxonomía y etnobotánica de *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock

Hintonia latiflora es un arbusto o árbol de hasta 5 m de alto, bisexual, perenne, que habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, entre los 80 y los 1200 msnm, se encuentra asociado a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña y bosque de pino-encino. Las ramas cinéreas, corto-pelosas o glabras, entrenudos cortos o alargados. Hojas caducifolias, simples, opuestas; con lámina aovada, oblonga, oval o aovadooval, de 3.5 a 12 por 1.5 a 6 cm, redondeada hasta aguda en la base, por lo común abruptamente corto-decurrente, obtusa, aguda o abruptamente corto-acuminada en el ápice, verde vivo, concolor, glabra o esparcidamente corto-pelosa en el haz, la venación plana, corto-pelosa o glabra en el envés, a menudo con grupos de tricomas blancos en las axilas de los nervios laterales, domacios, prominentes y arcuados, el margen plano; pecíolos delgados de 0.4 a 2 cm de largo; estípulas triangulares, de 2 a 4 mm de largo, agudas o acuminadas, con glándula apical. Flores perfectas; axilares, solitarias, pedicelos de 1 a 2.5 cm de largo, bractéolados en la mitad o más abajo, bractéolas menudas, sublubuladas; hipanto glabro o peloso, de 5 a 7 mm de largo; actinomorfas; lóbulos del cáliz 6, anchamente lineares o tubulados, de 1 a 2 cm de largo, corola blanca o verdosa en seco, de 6 a 8 cm de largo, tubo estrechamente obcónico, anguloso, ca. 3 cm de ancho en la garganta, lóbulos 6, plegado-imbricados, redondeado-ovados o semiorbiculares, ca. $\frac{1}{4}$ de largo que el tubo,

estambres 6, iguales de largo o más cortos que la corola, anteras de 2 a 2.5 cm de largo. Fruto en cápsula obovada, aguda en la base, de 2 a 3 por 1.5 a 2 cm, ligeramente comprimida, 6-costada, lenticelada y finamente tuberculada, parda. Semillas ovales u orbiculares, de 4 a 7 mm de largo, pardas. La planta florece en los meses de febrero y marzo, llegando a presentar una floración extemporánea en el mes de junio, las hojas están presentes entre los meses de febrero y octubre. Se distribuye a todo lo largo del territorio nacional (Borhidi, 2006; Cristians, observaciones personales) (Figura 1).

Nombre científico: *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Rubiaceae) (Icones Plantarum 33: t. 3295: 4. 1935).

Sinonimias: *Coutarea latiflora* Sessé et Mociño ex DC. (Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis 4: 350. 1830); *Coutarea pterosperma* (S. Watson) Standley (North American Flora 32: 127. 1921); *Portlandia pterosperma* S. Watson (Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences 24: 52. 1889) *Portlandia hexandra* Jacq. (Enumeratio Systematica Plantarum 16. 1760).

Nombres comunes: Campanilla (Jalisco), campanillo (Chiapas), cáscara sagrada, chib'ú'she (Sonora, Pima), chichicpatli (Náhuatl), copalchi, copalchi de Jojutla (Morelos), copalchile, copalquín, corteza de Jojutla, huetiyo (Sonora-Chihuahua, Warihío), iwíchuri (Chihuahua, Tarahumara), palo amargo, palo amargoso (Sinaloa), palo copalche (Durango), palo de bolsa (Michoacán), quina de Michoacán, quina, San Antonio, tacusisha (Nayarit, Cora), tapichogua (Sinaloa, Mayo) y tyaacujsixá'a (Nayarit, Cora) (Sahagún, 1540; Mociño, 1802; Palmer, 1885; AIMN, 1894, Loaeza, 1906, 1907, 1908; Landa, 1913; Terres, 1913; Gentry, 1942; Díaz, 1976, Bye, 1986; Martínez, 1989; Argueta *et al.*, 1994).

La familia Rubiaceae cuenta con una gran diversidad de especies, especialmente en los trópicos, con alrededor de 10 000 exponentes. Es biológica y morfológicamente diversa, con distintas formas de vida y rasgos reproductivos. Las formas de vida varían desde las hierbas pequeñas, epifitas, lianas, arbustos y árboles grandes; cuenta con una diversidad de flores con diferentes sistemas de polinización. Tiene una gran variedad de

frutos y semillas dispersados por distintos agentes; inclusive, los rasgos de los frutos se han usado como caracteres de clasificación. Las rubiáceas son una familia conocida por su difícil clasificación a nivel intrafamiliar. Un problema persistente en cuanto al esquema de clasificación, es el uso de uno o pocos caracteres como marcadores absolutos de un grupo taxonómico, orillando a clasificaciones poco naturales (Bremer *et al.*, 1995).

La familia Rubiaceae se divide en cuatro subfamilias: Cinchonoideae, Ixoroideae, Rubioideae y Antirheoideae. El género *Hintonia* ha sido difícil de ubicar dentro de una subfamilia, inclusive después de estudios filogenéticos utilizando la secuencia del gen del cloroplasto *rbcL*; de esta forma, se encuentra en una dicotomía entre las subfamilias Ixoroideae *sensu lato* y Cinchonoideae *sensu stricto* (Bremer *et al.*, 1995; Stranzinger *et al.*, 2006).

El género *Hintonia* fue descrito por primera vez por Bullock en 1935, quien lo separó del género *Portlandia*. Las especies del género *Hintonia* son endémicas de México y el norte de Centroamérica; se conocen cuatro especies: *H. latiflora*, *H. lumaeanana*, *H. octomera* y *H. standleyana* (Stranzinger *et al.*, 2006).

Según algunos autores *H. standleyana* es la misma especie que *H. latiflora* (Ochotorena-Booth, 2000). Esta creencia surge a partir de una confusión generada por Standley en su texto "North America Flora", donde usó el nombre de *H. latiflora* en un sentido distinto al de la descripción original. Sin embargo, el problema se resolvió en el estudio realizado por Motley y colaboradores (2005), enfocado al complejo Catesbaeae-Chiococceae perteneciente a la subfamilia Cinchonoideae. El estudio comprobó que *H. latiflora* y *H. standleyana* son dos especies distintas, enfocándose en la secuenciación de dos conjuntos de regiones: el gen nuclear ITS y el gen del cloroplasto *trnL-F*. Por otro lado, el estudio de Stranzinger y colaboradores (2006), permitió confirmar que se trata de dos especies a nivel molecular, utilizando secuencias de tres grupos de genes: el gen nuclear ITS, y los genes del cloroplasto *trnL-F* y *rps16*. Los resultados también sustentan la separación de las dos especies.

Además de la evidencia molecular, Borhidi (2006) señala una serie de caracteres anatómicos que diferencian a *H. latiflora* de *H. standleyana*. *H. latiflora* posee los lóbulos del cáliz y la corola glabros, la superficie de las hojas es glabra y posee domacios en el envés. En contraste *H. standleyana* posee los lóbulos del cáliz y corola pubescentes y

blanquecinos; la superficie de las hojas es pubescente-pilosa y el envés es piloso, al menos a lo largo de la venación (Figuras 1-4).

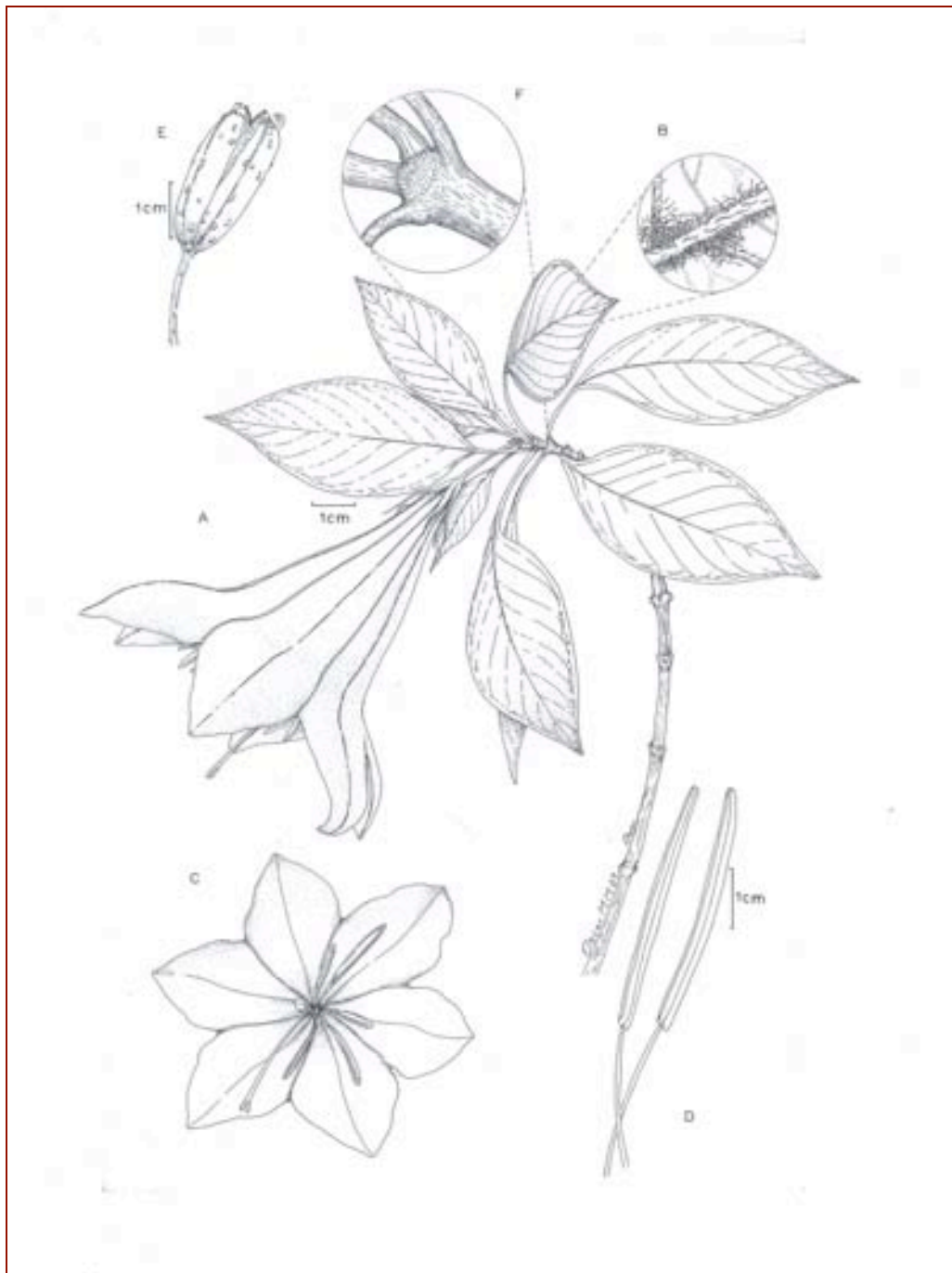


Figura 1. *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Oscar Montiel, 2009)



Figura 2. Árbol de *H. latiflora* (Urique, Chih., agosto 2007, S. Cristians)



Figura 3. Hojas de *H. latiflora* (Urique, Chih., agosto 2007, S. Cristians)



Figura 4. Corteza de *H. latiflora* (Urique, Chih., agosto 2007, R. Bye)

Hay una amplia información acerca de los usos de *H. latiflora* recabada a través de diversos estudios históricos, etnobotánicos y clínicos (Sahagún, 1540; Mociño, 1802; Palmer, 1885; AIMN, 1894, Loaeza, 1906, 1907, 1908; Landa, 1913; Terres, 1913; Gentry, 1942; Díaz, 1976, Bye, 1986; Martínez, 1989; Argueta *et al.*, 1994). Toda esta información ha sido condensada de la siguiente manera:

Padecimientos del sistema circulatorio. La corteza se utiliza para purificar la sangre. También se reporta el uso tópico de la corteza hervida para tratar dolores de pecho cercanos al corazón.

Padecimientos del sistema digestivo. El cocimiento y/o infusión de la corteza se usa contra problemas digestivos como purgante, contra el dolor de estómago, empacho, gastritis, úlcera gástrica, gastroenteritis, o bien como digestivo. Por otro lado, se utiliza en enfermedades de la vesícula biliar, “tratar la bilis” y cálculos biliares. También se reporta su uso en el tratamiento de cálculos vesicales.

Padecimientos del sistema endocrino. El uso de la infusión de la corteza de *H. latiflora* como antidiabético es quizás el uso más difundido hoy en día.

Padecimientos del sistema genito-urinario. La corteza en infusión se utiliza como diurético y contra diversas enfermedades del riñón. Además, los lavados y la unción de la corteza hervida en los genitales se reportan en el tratamiento de la comezón en dicha zona afectada.

Infecciones e infestaciones. La infusión de la corteza se utiliza como antiparasitario y en infecciones causadas por protozoarios, específicamente como antipalúdico.

Heridas. Se utiliza para tratar heridas y granos, a través de lavados con el cocimiento de la corteza y la aplicación de corteza seca pulverizada. Por otro lado, su infusión se usa para tratar heridas internas.

Padecimientos mentales. Se utiliza la infusión de la corteza como tranquilizante.

Padecimientos del sistema metabólico. La infusión de la corteza se utiliza como febrífugo en fiebres relacionadas con el paludismo.

Padecimientos del embarazo. El cocimiento de la corteza se utiliza para “quitar el aire de las mujeres que se alivian de niño”, tomando la infusión durante el periodo que la madre permanece acostada (cuarentena).

Padecimientos de la piel. Lavados con la infusión de la corteza se utilizan para manchas en la piel y mal de pinto. También se reporta su uso contra la caída del cabello.

3.3.2. Cinco siglos de historia del Copalchi

Hintonia latiflora es una planta con amplio uso en la historia de México. A lo largo del tiempo se le han atribuido usos variados a la corteza, como antipalúdica, antidiabética, febrífuga, antiséptica, tranquilizante, purificador sanguíneo, digestiva, purgante y diurética. Así mismo, para el tratamiento de la bilis, caída del cabello, heridas internas, úlcera gástrica, cálculos biliares y vesicales (Sahagún, 1540; Mociño, 1802; Palmer, 1885; AIMN, 1894, Loaeza, 1906, 1907, 1908; Landa, 1913; Terres, 1913; Gentry, 1942; Díaz, 1976, Bye, 1986; Martínez, 1989; Argueta *et al.*, 1994).

Los primeros reportes sobre el uso medicinal de *H. latiflora* se remontan al siglo XVI; Fray Bernardino de Sahagún en su “Historia general de las cosas de la Nueva España”, en el Libro undécimo, capítulo VI, párrafo tercero, menciona bajo el nombre de *chichicuáhuatl* (árbol amargo) o *chichicpatli* (medicina amarga), el uso de la corteza del árbol en infusión como eupéptico, purgante y diurético. Cabe mencionar que la característica amarga que lleva por nombre la planta, coincide con el sabor que tiene la corteza y hojas de esta rubiácea. En la misma obra, capítulo VII, párrafo quinto, número 140, Sahagún vuelve a hablar del *chichicpatli*, solo que esta vez la menciona como hierba y habla del uso de la raíz que en infusión es febrífuga y digestiva, también mencionando su uso molida para tratar llagas. La ilustración contenida en su obra corresponde a la descripción de la herbácea, figura 613 según los estudios de Francisco del Paso y Troncoso (Dibble y Anderson, 1963) (Figura 5).

A finales del siglo XVI, Francisco Hernández en su obra “Historia Natural de Nueva España”, en el tomo II, libro cuarto, capítulo L, cita un arbusto denominado *copalxíhuatl*, el cual no se ha determinado botánicamente pero sus características pueden corresponder a *H. latiflora*. Reporta que se utiliza para alejar las fiebres periódicas, uso que posteriormente alcanzaría gran auge (Figura 6).

En el año de 1802 Mariano Mociño, una vez concluidas las expediciones botánicas de la Nueva España, enlista una serie de plantas que son fundamentales para conformar la materia médica nacional y así dejar de depender de los suministros de la metrópoli, muchas veces adulterados o de elevados costos, alcanzando el autoabastecimiento de productos galénicos en el virreinato. Dentro de aquellas plantas consideradas febrífugas, tónicas y antisépticas, cita dos copalchis, “el de Guadalaxara” (*Portlandia hexandria*; sinonimia de *H. latiflora*, Rubiaceae) y “el de Tehuantepeque”

(*Croton febrifugum*; sinonimia de *C. niveus*, Euphorbiaceae); sin embargo, el proyecto de Mociño nunca llega a concretarse (Mociño, 1802; McVaugh, 2000) (Figura 7).

La buena reputación que gozaba el copalchi como febrífugo, hizo que se mandaran muestras de la corteza a España. Ya ahí recibió gran fama, por lo que inclusive se le llegó a comparar en actividad con la quina peruana, *Cinchona succirubra* (Lozoya, 1984). A partir de éste momento, comienza a utilizarse una mezcla de nombres, quinas y copalchis, así como de usos que van a generar numerosas sustituciones en los siglos venideros, hay que recordar que la comercialización de la *Cinchona* por parte de los jesuitas en Europa, había despertado gran interés por esta planta, por lo que la búsqueda de sustitutos era común. De ésta forma, bajo el nombre de “copalchi” se conocen una serie de especies pertenecientes tanto a la familia Rubiaceae, como a la Euphorbiaceae, por lo que su uso y comercialización ha estado marcado por sustituciones, confusiones e inclusive adulteraciones.

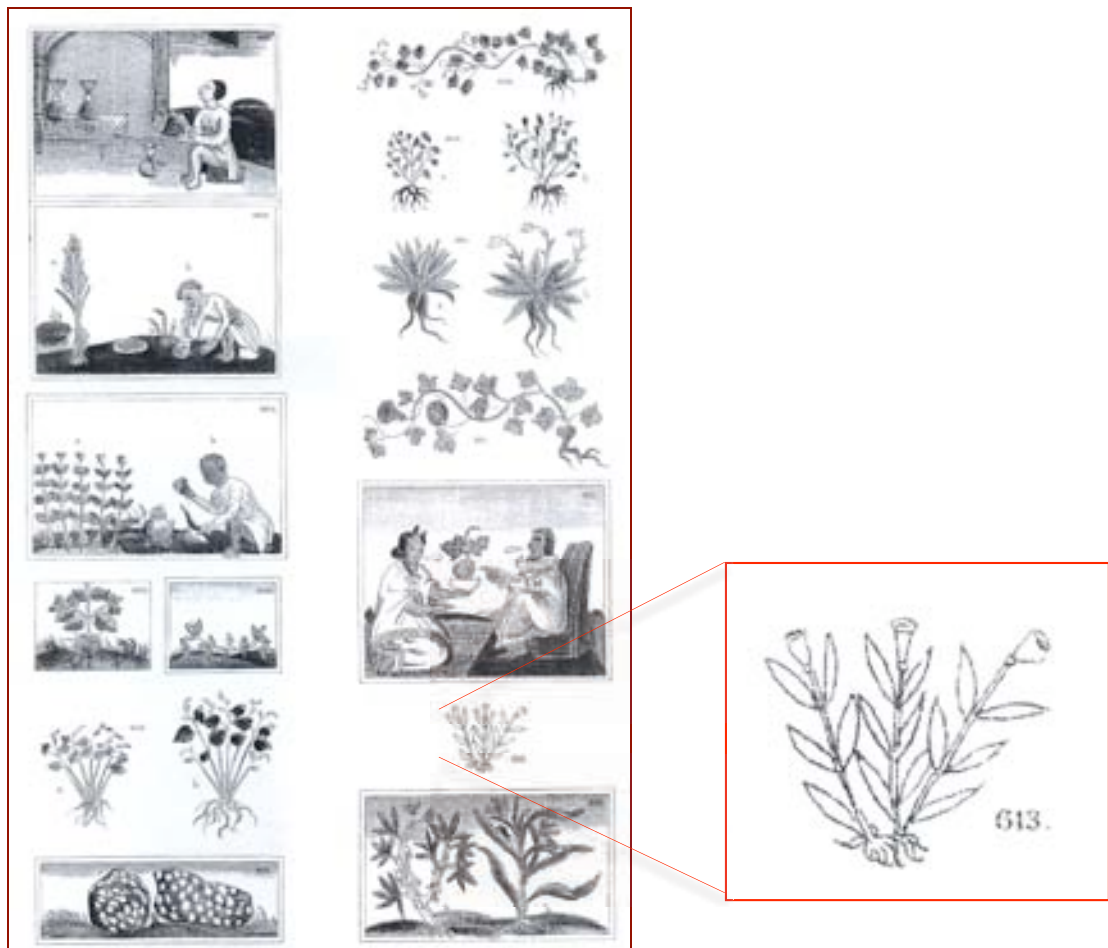


Figura 5. Reproducción del códice Florentino donde se ilustra el *chichicplatli*. Figura 613 según Francisco del Paso y Troncoso (Tomado de Dibble y Anderson, 1963).



Figura 6. Reproducción del *copalxihuitl* ilustrado en el libro "Historia Natural de las plantas de Nueva España" (Tomado de Hernández, reimpresión de 1943 a cargo del Instituto de Biología de la U.N.A.M.).



Figura 7. Reproducción de la ilustración realizada durante las expediciones de Sessé y Mociño por Nueva España, se puede leer la anotación hecha posteriormente que dice: *Coutarea latiflora* copalchi (Tomado de The Torner Collection of Sessé & Mociño biological illustrations).

La corteza de la euforbiácea *Croton niveus*, conocida también como copalchi, comenzó a comercializarse en Europa en el año de 1817, en Hamburgo, Alemania. Diez años después, se documentó el envío a Hamburgo, vía Liverpool, de otro crotón, *C. suberosum*. Esta especie se comercializaba bajo el nombre de quina blanca; ambas cortezas se utilizaban como antipiréticos (Arévalo, 1897).

En 1868, vuelven a aparecer cortezas de rubiáceas, de los géneros *Hintonia* y *Exostema*, sustituyendo a las euforbiáceas. En Europa, dichas cortezas ya tenían circulación dado que en ese tiempo eran usadas contra paludismo, bajo el nombre de quinas. De hecho se les utilizaba como sustituto de la corteza de quina. Las especies más importantes de acuerdo a la obra de Samuel Hahnemann "Apothederlexikon" (1793-1798) fueron *E. caribaeum*; árbol de quina caribeño y *E. floribundum*; árbol de quina de Lucien (Noster, 1992).

En México, el etnobotánico Edward Palmer realizó un estudio en la sierra Tarahumara durante 1885, entre las plantas que describió estaba el copalquín, *C. latiflora*. Reportó el uso de la corteza en el tratamiento del paludismo y las fiebres, asociando su actividad a la de la quina, lo que hizo que el copalquín fuera muy valorado en la zona de la Barranca de Batopilas. También registró el uso de la corteza pulverizada para el tratamiento de úlceras infectadas y heridas (Bye, 1986; 2007).

Con la fundación del Instituto Médico Nacional (IMN) en 1890, comienza el estudio multidisciplinario de las plantas medicinales mexicanas; una de las metas de la institución era la de generar la tan necesaria Materia Médica Nacional (AIMN, 1894). A lo largo de los diferentes tomos de los Anales del Instituto Médico Nacional (AIMN), continúan mencionándose bajo el término de "copalchi" distintas rubiáceas y euforbiáceas; sin embargo, conforme van pasando los años y se van desarrollando los proyectos de investigación del Instituto, las especies de euforbiáceas comienzan a mencionarse cada vez menos y predomina el estudio sobre *Coutarea latiflora* (sinonimia de *H. latiflora*). La primera mención a esta especie se encuentra en el tomo IV de los Anales del Instituto Médico Nacional (AIMN, 1900), en un listado de plantas que debían estudiarse por su gran demanda popular. En este listado la planta se designa con el nombre común de quina de Michoacán. Es hasta el tomo VIII de los AIMN que comienzan los reportes sobre los estudios clínicos de *C. latiflora*; así, se describe que la administración de un extracto fluido de copalchi (45 gramos por día) a un enfermo de

paludismo no provocó la mejoría del paciente (Loeaza, 1906). En el tomo IX continúan los ensayos de *C. latiflora*, también denominada copalchi de Jojutla, como antipalúdico en el Pabellón de Clínica Terapéutica del Hospital General; de nueva cuenta los resultados no fueron satisfactorios (Loeaza, 1907). Por último, los estudios clínicos empleando extracto seco de copalchi (2 gramos por día) tampoco mejoraron significativamente a los enfermos palúdicos tratados, como se reporta en el tomo X de los AIMN (Loeaza, 1908). En el tomo XII de los AIMN se describen los primeros análisis químicos de la planta así como los estudios pre-clínicos y clínico como agente antidiabético de *C. latiflora*.

En otros experimentos pre-clínicos se registró, además de la importante actividad diurética, un incremento en el peso de los animales; sin embargo, los estudios en perros diabetizados con floridzina no demostraron una disminución considerable de los niveles de glucosa. Por otro lado, en estudios clínicos se corroboró la actividad diurética, siendo de gran utilidad para el tratamiento de nefritis agudas y crónicas (Terres, 1913). En un estudio clínico, tras la administración de copalchi, se registró una disminución importante de la glucosa en la orina en periodos de 24 horas en pacientes diabéticos; además el tratamiento provocó una ganancia de peso en los enfermos, mejorando las condiciones de los mismos. Por todo ello se recomendó el uso terapéutico del copalchi (Landa, 1913) (Figura 8).

El análisis químico de la planta comprueba la presencia de una saponina y un glucósido, y confirma la ausencia de alcaloides, también reportan un tanino colorante rojo, dextrina y sus análogos, resina ácida, cera vegetal y caucho. La sustancia glucosídica que contiene la corteza de copalchi se obtuvo en buena cantidad. El glucósido aislado se administró a palomas, cuyos, conejos y perros y se comprobó que no era tóxico; sin embargo, la secreción salivar y gástrica aumentaron, al administrarse vía oral, debido al amargo sabor. También los animales registraron un aumento en la secreción urinaria (Terres, 1913).



Figura 8. Reproducción de la gráfica original contenida en el tomo XII de los AIMN, reportando la actividad antidiabética de *H. latiflora* (Tomado de Terres, 1913).

También para esta época se comienza a comercializar el copalchi por el laboratorio Novellas en Barcelona, España (Figura 9). El producto se anunciaba en un listado de “Específicos Novellas” bajo el nombre de “Copalchi Novellas” recetándose como antidiabético. En la etiqueta puede leerse: “extracto integral de una planta mejicana de poder antiglicosúrico y tónico” (Figura 12). A través de anuncios publicados en el periódico “La Vanguardia” podemos constatar que al menos durante 10 años se estuvo comercializando este producto en España (Figuras 10 y 11). Este es el primer reporte de un fitofármaco elaborado a partir de *H. latiflora*.

Los Productos Opoterápicos y los Específicos "NOVELLAS"

SON COMO SE DESPRENDE DEL EXAMEN DEL PRESENTE TEXTO. LOS MÁS ANTIGUOS Y ACREDITADOS EN SU GÉNERO

Serie "Opoterápicos Novellas"

Aparecidos en 1907, con método de obtención original y premiado

Profusamente imitados, pero jamás superados, siendo fácilmente distinguidos de estas imitaciones gracias a los datos del reverso

Nefrina Novellas	a gotas	Diurético aurarémico
Ovarina Novellas	"	Desarreglos de las señoras
Ovarina con belladona Novellas	"	Id. y antiespasmódico
Tirovarina Novellas	"	" y dismenorea
Tiroidina Novellas	"	Acción específica de la glándula
Hepatina Novellas	"	" " " " " "
Pancreatina Novellas	"	" " " " " "
Hipofisis total Novellas	"	" " " " " "
Suprarrenina Novellas	"	" " " " " "
Cerebrina Novellas	"	Tónico cerebral
Esplenina Novellas	"	Modificador hepatopoyético
Testiculina Novellas	"	Tónico genital
Colina Novellas	en pílofas	Colágeno

Serie "Solufijos cardíacos Novellas"

Siete medicamentos clásicos y simples para la Terapéutica cardíaca, elaborados por método propio y original

"Solufijo" de Digital	a gotas	Tónico regulador
"Solufijo" de Crataegus oxiacantha	"	" antiespasmódico
"Solufijo" de Convalaria	"	" diurético
"Solufijo" de Cactus grandiflora	"	" y estimulante
"Solufijo" de Estroflanto	"	" simple no angiotónico
"Solufijo" de Escila	"	Diurético
"Solufijo" de Adonis vernalis	"	Tónico y diurético sucedáneo de la digital

Serie "Específicos Novellas"

Seis medicamentos galénicos sencillos y de grande utilidad en la práctica

Esclafin Novellas	en pílofas	Antidiabético
Copalchi Novellas	a gotas	Antidiabético
Insulina Novellas	líquida	Vaso contractil
Salin de Carbonat. "Novellas"	pastillas efervescentes	Laxante salino
Pasta antidiabética Novellas	comprimidos	Antidiabético
Purgante Novellas (niños y adultos)	tabletas	Laxante sintético

DE VENTA EN TODAS LAS FARMACIAS — CENTROS DE ESPECÍFICOS EN ESPAÑA

Depósitos: En VALENCIA, Gamir y Centro farmacéutico; En ALICANTE, Centro farmacéutico y V. Coloma; En CÁDIZ, J. Díez; En PALMA, Centro farmacéutico, S.

Figura 9. Reproducción del listado de productos "opoterápicos y específicos Novellas" donde se menciona al Copalchi Novellas como antidiabético (Tomado de www.farmaciaserra.com/artes/Arte-Farmacia-Colecciones).

-Diabéticos Copalchi Novellas, único inventor de este poderoso medicamento. — Pedido: farmacia Novellas, Rambla de Cataluña, 77; Segalá, Alsina, etc.

Figura 10. Anuncio en el periódico "La Vanguardia", miércoles 6 de agosto de 1913.

Los diabéticos

sólo buscan un remedio que alivie su enfermedad con rapidez y seguridad. Esto lo consiguen los que toman el acreditadísimo

COPALCHI NOVELLAS

que es de probada eficacia y fácil de tomar

77, Rambla de Cataluña, FARMACIA NOVELLAS, y Centros de Específicos.

Figura 11. Anuncio en el periódico "La Vanguardia", miércoles 25 de enero de 1922.



Figura 12. Fotografía del Copalchi Novellas, donde se leen sus propiedades, y posología (Tomado de www.farmaciaserra.com/artes/Arte-Farmacia-Colecciones).

Volviendo a México, Howard Scott Gentry realiza estudios etnobotánicos en la zona norte del país en 1942 (Gentry, 1942). Durante su paso por las Barrancas en Chihuahua, describe el uso de la corteza de *Coutarea latiflora*, bajo el nombre de copalquín, como febrífugo y purgante, mismo que corrobora 20 años después en un estudio etnográfico de los indios warihío de Sonora y Chihuahua. Cabe destacar que para 1962, ya reconoce bajo el nombre de copalquín o hutetiyo a *H. latiflora* (Gentry, 1962). La reedición de 1998 de las "Plantas del Río Mayo de Gentry" anexa a los usos de febrífugo y purgante, el uso de antidiabético, haciendo hincapié en que la corteza es altamente demandada como tratamiento para la diabetes, y que actualmente es procesada comercialmente para usarla como medicina. (Martin *et al.*, 1998).

Es importante resaltar que a través de esta revisión histórica de cinco siglos, así como toda la información etnobotánica actual, la única parte que se utiliza de *H. latiflora* es la corteza, no existe reporte alguno de otra parte utilizada. Con esto se puede entender que dicho recurso no renovable lleva varios años de explotación no sustentable, volviendo importante la validación farmacológica de otra parte del árbol.

3.3.3. Antecedentes fitoquímicos y farmacológicos de *Hintonia latiflora*

En 1984 Reher y Kraus aislaron neoflavonoides (22) en *H. latiflora*. En 1987, Reguero y colaboradores reportan el aislamiento de dos cucurbitacinas: 23,24-dihidrocucurbitacina F (15) y 23,24-dihidrocucurbitacina-F-25-acetato (16); a estos principios se les atribuyó el sabor amargo de la corteza, característica que popularmente se asocia al efecto antipalúdico de la quina. Continuando con los estudios fitoquímicos en torno a *H. latiflora*, Mata y colaboradores (1990) aislaron dos glicósidos novedosos: 3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (17) y el 5-O-β-D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8); así como otras fenilcumarinas y cucurbitacinas ya conocidas. Los nuevos glicósidos no presentaron efecto contra *Plasmodium falciparum in vitro*, prueba relacionada a la actividad antimalárica de la planta (Mata, 1993). Mata y colaboradores (1992) reportan el aislamiento de un fenilestireno (23) y una nueva fenilcumarina: 5-O-(6''-acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (7). Guerrero-Analco y colaboradores (2007) reportan el aislamiento a partir de la corteza de otras cucurbitacinas y 4-fenilcumarinas más, destacando la 5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (9), así como la presencia de ácido desoxicordifolínico (19) (Cuadro 2).

En cuanto a los estudios farmacológicos, en 1960 Paris y Bastien comprobaron que un extracto de corteza de *H. latiflora* no afectaba los niveles de glucosa en conejos normoglicémicos en experimentos agudos. Sin embargo, cuando el extracto fue administrado por vía oral después de una carga de glucosa, el máximo de hiperglucemia producido era menor al nivel de glucemia observado en los animales del grupo control tarados con el vehículo (Bastien, 1961). El estudio como antimalárico fue retomado por Noster y Kraus (1990) sin encontrar actividad, y coincidente con los estudios realizados por los investigadores del IMN de principios del siglo XX. Rojas y colaboradores (1992) llevan a cabo un monitoreo antimicrobiano preliminar con los extractos de varias

especies vegetales medicinales de México, entre ellas extracto metanólico de la corteza de *H. latiflora*, la cual dio un resultado negativo, al ser inactiva sobre cepas selectas de bacterias Gram positivo y negativo y el hongo *Candida albicans*. Referente a la actividad antimalárica, el estudio más reciente, señala a las 4-fenilcumarinas aisladas de la corteza de *H. latiflora*, como las posibles responsables de la supresión de la parasitemia *in vivo* en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. Estos compuestos fueron efectivos también contra los esporozoitos del parásito *in vitro* (Argotte-Ramos *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Pinto y colaboradores (1997), se evaluó el efecto hipoglucemiante crónico de un preparado herbolario alemán, que se comercializa con el nombre de Sucontral, en ratas normoglicémicas. El preparado es a base de un extracto hidroalcohólico de una mezcla de las cortezas de *H. latiflora* y *Exostema caribaeum*. Los resultados permitieron establecer que el preparado tiene un efecto hipoglucemiante.

Una exploración etnobotánica en torno a las plantas medicinales con actividad antidiabética arroja referencias acerca de la familia Rubiaceae, entre ellas: *Bouvardia ternifolia*, *Morinda lucida* y *H. latiflora*. (Bnouham *et al.*, 2006).

La revisión de Bnouham y colaboradores hace referencia al trabajo de Korec y colaboradores (2000), en el cual se demuestra la actividad hipoglucemiante de *H. latiflora* en el modelo de ratas con diabetes inducida con estreptozotocina (STZ). Evaluaron un neoflavonoide sintético, la coutareagenina, previamente obtenida por hidrólisis de los glucósidos naturales de la planta.

Guerrero-Analco y colaboradores (2007) realizaron un estudio de la actividad antidiabética de copalchis pertenecientes a la familia Rubiaceae (*H. latiflora*, *H. standelyana* y *Exostema caribeum*). Quedó asentado que el extracto de la corteza de *H. latiflora* disminuye significativamente los niveles de glucosa sanguínea al administrarlo en ratas normoglicémicas y con diabetes inducida con STZ. Los resultados obtenidos con *H. latiflora* fueron coincidentes con los estudios anteriores de Bastien (1961) y Pinto (1997). Cabe mencionar que los estudios mostraron resultados positivos en estudios agudos y crónicos. Los autores relacionaron la actividad a compuestos ya conocidos para estas plantas, como son las 4-fenilcumarinas y las cucurbitacinas. La fenilcumarina 5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**9**) fue el compuesto que mejor reguló los niveles de glucosa en animales hiperglicémicos; por otro lado, el mecanismo

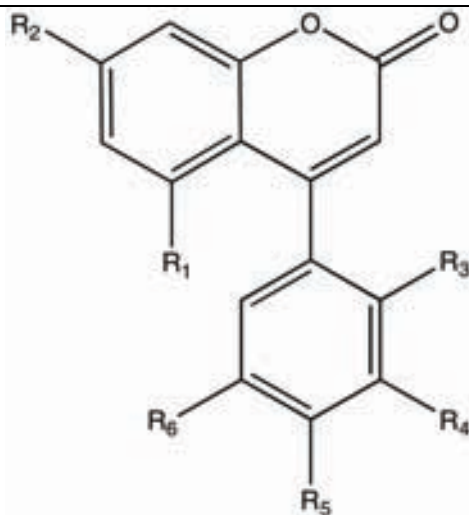
de acción involucra el efecto estimulante en la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas y una estimulación del metabolismo de glucógeno hepático.

Con relación a los estudios de la toxicidad de la planta, Déciga-Campos y colaboradores (2007) describieron que el extracto orgánico de la corteza no es tóxico en roedores de acuerdo a los criterios de Lorke (DL_{50} 2852 mg/kg), ni presentó mutagenicidad de acuerdo a la prueba de Ames. Tampoco el extracto fue tóxico para el ensayo de *Artemia salina* (DL_{50} >1000 μ g/ml).

En el año 2006, Korecova y colaboradores reportaron un estudio clínico monocéntrico abierto en 30 pacientes con diabetes mellitus tipo 2, a los cuales sometieron a un tratamiento durante 12 meses administrándoles el preparado Sucontral. Dicho estudio demostró una reducción del 20.6% en la glucosa en ayuno, un 19% en la glucosa postprandial y un promedio de 10.3% en la HBA_{1c} . Estos parámetros continuaron estables hasta 33 meses después del tratamiento; sin presentar episodios de hipoglucemia, ni efectos adversos. Demostrando así, la efectividad e inocuidad del tratamiento con *H. latiflora* en humanos.

A través de la revisión bibliográfica presentada, en ningún momento encontramos reportes de tipo fitoquímico, farmacológico o anatómico acerca de las hojas de *H. latiflora*, sólo se ha estudiado la corteza.

Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de *Hintonia latiflora*



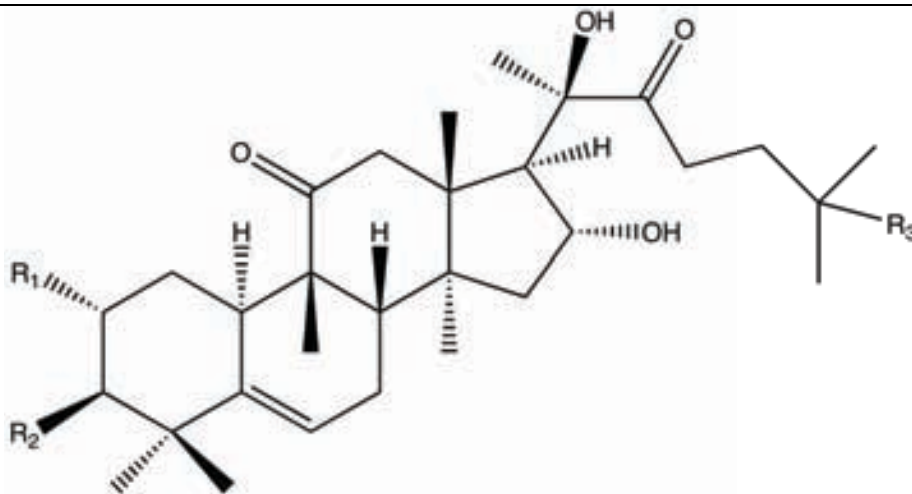
1: $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$, $R_3 = H$, $R_4 = H$, $R_5 = OCH_3$, $R_6 = H$

2: $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$, $R_5 = OCH_3$, $R_6 = H$

3: $R_1 = OH$, $R_2 = OCH_3$, $R_3 = OH$, $R_4 = H$, $R_5 = H$, $R_6 = OH$

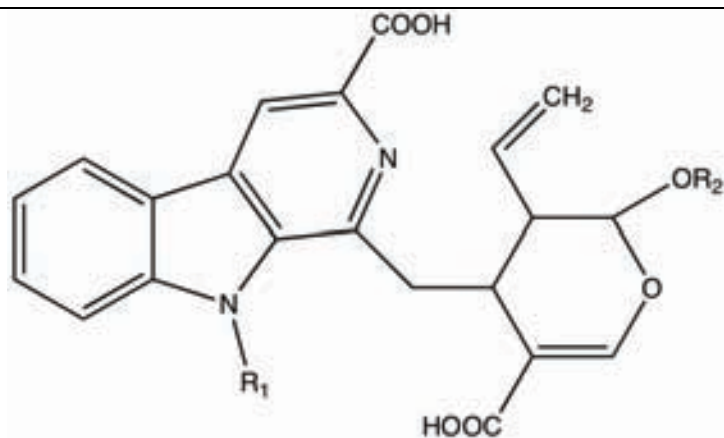
- 4: R₁= O-β-D-galactopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= OH, R₅= OH, R₆= H
 5: R₁= O-β-D-glucopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= OH, R₅= OH, R₆= H
 6: R₁= O-β-D-glucopiranosil, R₂= OH, R₃= H, R₄= OH, R₅= OH, R₆= H
 7: R₁= O-6''-acetil-β-D-glucopiranosil, R₂= OH, R₃= H, R₄= OH, R₅= OH, R₆= H
 8: R₁= O-β-D-galactopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= H
 9: R₁= O-β-D-glucopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= OH, R₄=H, R₅= OH, R₆= OH
 10: R₁= O-β-D-glucopiranosil, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= OH, R₅= OCH₃, R₆= H
 11: R₁= 6''-O-acetil-5-O-β-D-galactopiranosil, R₂= OH, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= H
 12: R₁= 6''-O-acetil-5-O-β-D-galactopiranosil, R₂= OH, R₃= H, R₄= OH, R₅= OH, R₆= H
 13: R₁= 5-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil], R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= OH, R₅= OH, R₆= H
 14: R₁= 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil], R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= OH, R₅= OH, R₆= H

Referencias: Reher y Kraus, 1984; Aquino *et al.*, 1987; Mata *et al.*, 1990; 1992; 2008; Reguero *et al.*, 1987; Argotte-Ramos *et al.*, 2006; Guerrero-Analco *et al.*, 2007



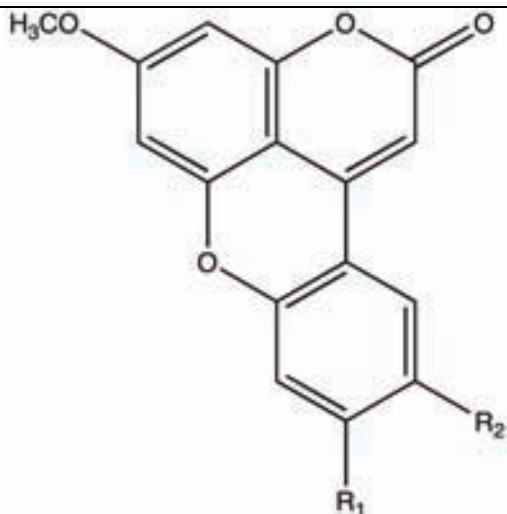
- 15: R₁= OH, R₂= OH, R₃= OH
 16: R₁= OH, R₂= OH, R₃= OAc
 17: R₁= OH, R₂= O-β-D-glucopiranosil, R₃= OH
 18: R₁= OH, R₂= O-β-D-glucopiranosil, R₃= OAc

Referencias: Reguero *et al.*, 1987; Mata *et al.*, 1990; Déciga-Campos *et al.*, 2007; Guerrero-Analco *et al.*, 2007



19: $R_1 = H$, $R_2 = -\beta\text{-D-glucopiranosil}$

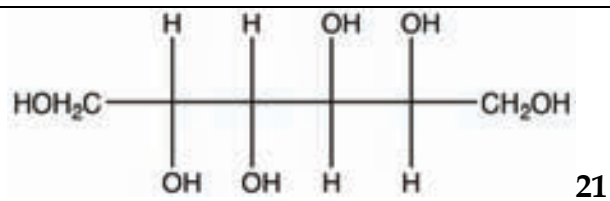
Referencias: Guerrero-Analco *et al.*, 2007



20: $R_1 = OH$, $R_2 = OH$

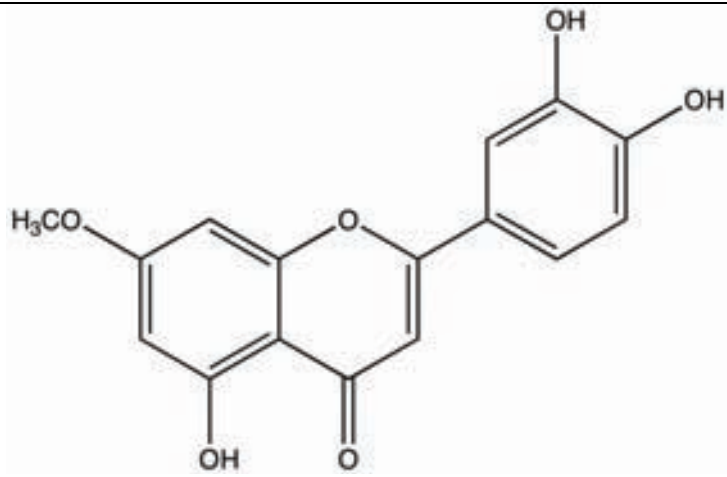
20a: $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$

Referencias: Reher y Kraus, 1984.



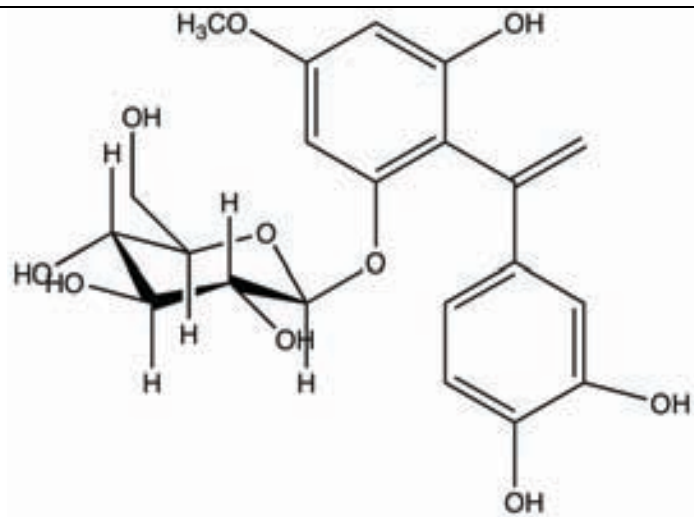
21

Referencias: Camacho, 1990



22

Referencias: Camacho, 1990



23

Referencias: Mata *et al*, 1992

4. Objetivos

Objetivos generales

- Estudiar la actividad antidiabética de las hojas de *H. latiflora* para promover conservación de la especie medicinal, evitando así el uso de la corteza, recurso no renovable.
- Generar información científica adicional para la integración de una monografía tipo Organización Mundial de la Salud de *H. latiflora*, una rubiácea de amplio uso en la medicina tradicional mexicana, mediante el establecimiento de parámetros de eficacia, inocuidad e identidad. Las hojas nunca han sido sometidas a ningún tipo de estudio farmacológico, químico o anatómico.

Objetivos particulares

- Evaluar el potencial antidiabético de las hojas de *H. latiflora*.
- Establecer de manera preliminar, la inocuidad del extracto de las hojas de *H. latiflora* mediante la determinación de su toxicidad aguda en roedores.
- Establecer los parámetros de identidad de las hojas de *H. latiflora* mediante el establecimiento de los compuestos marcadores, las características botánicas macroscópicas y microscópicas, así como los perfiles cromatográficos.
- Establecer los principios activos responsables de la actividad antidiabética comprobable mediante la experimentación farmacológica apropiada.

5. Hipótesis

Si la composición química de las hojas de *H. latiflora* es similar a la de la corteza, es altamente probable que el extracto íntegro de las hojas presente la misma eficacia farmacológica que los preparados tradicionales, garantizando la conservación del recurso vegetal.

6. Parte experimental

6.1. Recolecta del material vegetal

Para los estudios fitoquímicos y farmacológicos se utilizaron hojas y corteza de *Hintonia latiflora* recolectadas en Batopilas, Chihuahua durante el mes de noviembre de 2006; un ejemplar fue depositado en el Herbario Nacional (MEXU), bajo el registro R. Bye 34880. El material vegetal fue proporcionado por el Dr. Robert Bye, Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM.

Para la caracterización anatómica y estructural de *H. latiflora* se realizó una recolecta de material botánico en el municipio de Urique, estado de Chihuahua, en el mes de agosto de 2007. El material se fijó en una solución de FAA (formol, ácido acético y alcohol etílico) y en glutaraldehído. Asimismo, se recolectaron hojas de *H. latiflora* para tener muestras de distintas estaciones del año para futuros estudios comparativos. Se depositaron muestras de herbario de los árboles de los que se obtuvo el material botánico (R. Bye 35139, 35140, 35141).

En cuanto a las hojas y corteza de *H. standleyana* utilizadas para el establecimiento de perfiles cromatográficos de la infusión, se utilizó material recolectado en Atenango del Río, Guerrero; un ejemplar fue depositado en el herbario del jardín etnobotánico del INAH (ASFM-INAH), bajo el registro P. Hersch 824. El material vegetal fue proporcionado por el Dr. Paul Hersch Martínez, Jardín Etnobotánico, INAH.

6.2. Caracterización anatómica y estructural de *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock

6.2.1. Deshidratación e inclusión del material vegetal

Los tejidos fijados en FAA se enjuagaron tres veces con agua corriente (30 minutos cada enjuague). Posteriormente, se deshidrató el material vegetal a través de una serie de cambios de alcohol etílico durante dos horas en cada concentración: 30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%. El material se preincluyó en una mezcla de alcohol absoluto-xilol (1:1) de 20 a 30 minutos. Para finalizar en xilol puro por 20 minutos.

Posteriormente, se colocó la muestra en una serie de mezclas xilol-paraplast (2:1, 1:1 1:2) durante 20 - 30 minutos en cada una. Finalmente se incluyó en paraplast puro durante 24 horas en estufa a 65 °C, para obtener los bloques de parafina.

6.2.2. Obtención de cortes anatómicos

Los bloques de parafina que contienen el material vegetal se adhirieron a una base de madera. Con una navaja se formó una pirámide truncada que incluyó la muestra de material vegetal. El portamuestras con el bloque se refrigeró durante 10 minutos.

Se montó la muestra en el microtomo de rotación con el fin de obtener series de cortes de 8 μm de espesor. Para extender los cortes se utilizó un baño de flotación a 40 °C, el cual tiene un poco de gelatina que sirve como adhesivo. Los cortes se depositaron sobre la superficie del baño, cuando éstos extendieron, se colocaron en un portaobjetos.

6.2.3. Técnicas histoquímicas y de tinción

Para realizar las distintas técnicas histoquímicas, se eliminó la parafina de los cortes adheridos en los portaobjetos. Esto se logró metiendo los portaobjetos en a estufa (56-58 °C) durante 20 minutos, posteriormente se hicieron tres cambios de xilol y se hidrataron en una serie etanólica (100%, 96% ... hasta llegar a la concentración del solvente en que esté preparado el colorante) (López-Curto *et al.*, 2005).

Las técnicas histoquímicas que se realizaron fueron:

- Azul negro de naftol-APS, para identificar proteínas y polisacáridos insolubles.
- Lugol, par identificar gránulos de almidón.
- Rojo "O" de aceite, par identificar reservas lipídicas, cutina y suberina.
- Azul mercúrico de bromofenol, para identificar proteínas.
- Ácido peryodico-reactivo de Schiff, para identificar polisacáridos insolubles.

Así como las tinciones de:

- Safranina-verde rápido
- Cuádruple de Johansen

6.2.4. Análisis de las preparaciones histológicas

Las preparaciones obtenidas se analizaron mediante las técnicas de microscopía de campo claro y microscopía de contraste de fases con la finalidad de identificar y describir las características anatómicas y estructurales más distintivas de las hojas de *H. latiflora*.

Una vez identificados los campos de mayor interés se tomaron fotomicrografías en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias utilizando un microscopio

confocal Olympus Provis. Por otro lado se hizo un registro fotográfico utilizando un microscopio estereoscópico Carl Zeiss; las fotomicrografías de las hojas se orientaron en las características taxonómicas que le dan identidad a las hojas.

6.2.5. Estudio anatómico a través de microscopía electrónica de barrido

Muestras de hojas de *H. latiflora*, tanto secas como fijadas en FAA fueron procesadas para su estudio en microscopía electrónica de barrido JEOL JSM-5310LV, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido. Las muestras se deshidrataron a punto crítico y posteriormente se cubrieron con oro para permitir la conductividad de la muestra. Las observaciones realizadas se digitalizaron para su posterior inclusión en la tesis y la monografía de la especie.

6.3. Estudio fitoquímico

6.3.1. Instrumental y registro de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 μm ASTM). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, en placas de vidrio o de aluminio recubiertas con gel de sílice (silica gel 60 G₂₅₄ Merck), utilizando varios sistemas de elución y diferentes agentes cromógenos: sulfato cérico amoniacal, reactivo de Erlich, reactivo de Dragendorff, anisaldehído en H₂SO₄ (10% en EtOH).

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Jonhs y se reportan sin corregir. Los espectros en el IR se obtuvieron en pastillas de KBr o película y se midieron en un espectrómetro Perkin-Elmer 59913. Los espectros en el UV se registraron utilizando un espectrómetro Lambda II UV en MeOH. Los espectros de RMN ¹H (300 MHz), ¹³C (125 MHz), COSY, NOESY, HMBC y HSQC se determinaron en un espectrómetro Varian VXR-300S utilizando CDCl₃ o CD₃OD como disolventes y TMS como referencia interna. Los espectros de masas por impacto electrónico se obtuvieron utilizando un espectrómetro JEOL SX 102 mediante inyección directa con una energía de ionización de 70 eV.

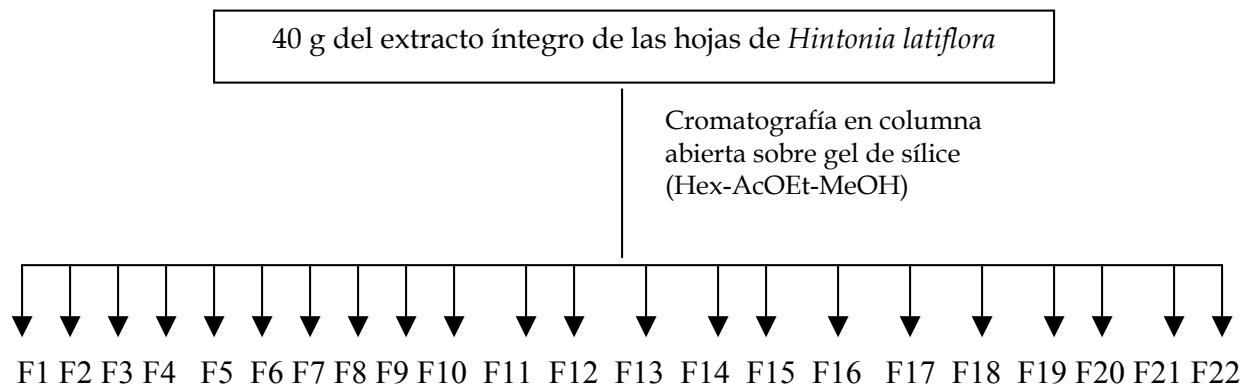
6.3.2. Preparación y extracción del material vegetal

El material vegetal se secó a temperatura ambiente durante 15 días, protegiéndolo de la exposición directa a la luz. Posteriormente, se fragmentó utilizando un molino de laboratorio Wiley, usando una rejilla de 2 mm.

Las hojas fragmentadas se maceraron en una mezcla de disolventes CH₂Cl₂-MeOH (1:1) durante una semana. Este proceso se realizó por triplicado para asegurar una mayor remoción de los componentes. Finalmente, se llevó a cabo la concentración de los macerados para obtener el extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora*.

6.3.3. Análisis y fraccionamiento cromatográfico

El extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora* se analizó por cromatografía en capa fina utilizando como sistemas de elución Hex-AcOEt, CH₂Cl₂-MeOH y AcOEt-MeOH en distintas proporciones, para encontrar las mejores condiciones para realizar el fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta. Posteriormente, una parte del extracto seco (40 g) se sometió a un fraccionamiento primario mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (1500 g), utilizando como eluyentes Hex, y mezclas de Hex-AcOEt, AcOEt, AcOEt-MeOH en distintas proporciones. El fraccionamiento primario generó un total de 225 fracciones de 500 ml cada una. A partir de un análisis de similitud en cromatografía de capa fina, las fracciones se combinaron para obtener 22 fracciones primarias (F1-F22). Dicho procedimiento se resume en el Cuadro 3 y Esquema 1.



Esquema 1. Fraccionamiento primario del extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora*

Cuadro 3. Fraccionamiento primario del extracto íntegro de las hojas de *Hintonia latiflora*

Eluyente y proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso
Hex	1-25	1-5	F1	
Hex-AcOEt (9:1)	26-47	6-13	F2	
Hex-AcOEt (8:2)	48-84	14-20	F3	6.3 mg
Hex-AcOEt (7:3)	85-101	21-25	F4	3.1 mg
Hex-AcOEt (6:4)	102-113	26-33	F5	1651.6 mg
Hex-AcOEt (1:1)	114-122	34-46	F6	394.1 mg
Hex-AcOEt (4:6)	123-131	47-55	F7	1644.4 mg
Hex-AcOEt (3:7)	132-142	56-61	F8	632 mg
Hex-AcOEt (2:8)	143-155	62-78	F9	2601.5 mg
Hex-AcOEt (1:9)	156-164	79-82	F10	520 mg
AcOEt	165-174	67-70 *	F11	208 mg
AcOEt-MeOH (9:1)	175-209	71-75 *	F12	371 mg
AcOEt-MeOH (8:2)	210-215	83-95	F13	1273 mg
AcOEt-MeOH (1:1)	216-225	96-112	F14	580.4 mg
		113-123	F15	279.1 mg
		124-141	F16	
		142-165	F17	296.2 mg
		166-175	F18	380.5 mg
		176-183	F19	
		184-197 *	F20	1621.6 mg
		198-215 *	F21	3747.9 mg
		216-225	F22	8017.1 mg

* Precipitó espontáneamente

6.3.4. Aislamiento del ácido ursólico (24)

A partir de las fracciones F11 y F12 (579 mg), eluidas con AcOEt-MeOH (9:1), cristalizaron espontáneamente 371 mg de un sólido blanco, el cual se sometió a los análisis espectroscópicos y espectrométricos pertinentes para conocer su identidad.

6.3.5. Aislamiento del ácido desoxicordifolínico (19)

Una parte de la fracción F22 (5 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (65 g), utilizando como eluyentes CHCl_3 y CHCl_3 -MeOH en distintas proporciones. El fraccionamiento secundario generó un total de 272 fracciones de 30 ml cada una. Por un análisis de similitud en cromatografía de capa fina, las fracciones se combinaron para obtener 13 fracciones secundarias (F22-I-F22-XIII). Dicho procedimiento se resume en el Cuadro 4.

La fracción F22-XI (24.1 mg) fue sometida a una separación en placa preparativa sobre gel de sílice. La fase móvil CHCl₃-MeOH-H₂O (5:1:1). Este proceso cromatográfico permitió el aislamiento del ácido desoxicrodifolínico (19).

Cuadro 4. Fraccionamiento secundario de la fracción F22

Eluyente y proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso
CHCl ₃	1-40	1-11	F22-I	69.7 mg
CHCl ₃ -MeOH (99:1)	41-45	12-53	F22-II	77.8 mg
CHCl ₃ -MeOH (97:3)	56-72	54-105	F22-III	147 mg
CHCl ₃ -MeOH (95:5)	73-91	106-123	F22-IV	33.3 mg
CHCl ₃ -MeOH (9:1)	92-132	124-132	F22-V	30.4 mg
CHCl ₃ -MeOH (85:15)	133-145	133-147	F22-VI	83.8 mg
CHCl ₃ -MeOH (8:2)	146-171	148-165	F22-VII	198.9 mg
CHCl ₃ -MeOH (7:3)	172-255	166-171	F22-VIII	97.2 mg
CHCl ₃ -MeOH (1:1)	256-272	172-184	F22-IX	424.2 mg
		185-214	F22-X	723 mg
		215-232	F22-XI	147.8 mg
		233-260	F22-XII	146.4 mg
		261-272	F22-XIII	88.5 mg

6.3.6. Aislamiento de la 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)

Análisis por CLAR de la fracción F20

Por similitud en cromatografía de capa fina, se reunieron las fracciones F20 y F21. La fracción combinada (5 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (65 g), utilizando como eluyentes CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂-MeOH en distintas proporciones. El fraccionamiento secundario generó un total de 216 fracciones de 80 ml cada una. Por un análisis de similitud en cromatografía de capa fina, las fracciones se combinaron para obtener 16 fracciones secundarias (F20-I-F20-XVI). Dicho procedimiento se resume en el Cuadro 5.

Las fracciones F20-VII-F20-IX presentaron características cromatográficas de interés por lo que una parte (200 mg) se sometió a un fraccionamiento terciario mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (100 g), utilizando una elución isocrática con una mezcla CH₂Cl₂-MeOH (9:1). El fraccionamiento terciario generó un total de 25 fracciones de 50 ml cada una. Por un análisis de similitud en cromatografía de

capa fina, las fracciones se combinaron para obtener cuatro fracciones terciarias (F20-VII-1-F20-VII-4). Dicho procedimiento se resume en el Cuadro 6.

Las fracciones terciarias F20-VII-1-F20-VII-3 (45 mg) se reunieron por sus características cromatográficas de fluorescencia a 365 nm en una cromatografía en capa fina, se sometieron a una separación mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), para lo cual se optimizaron las condiciones del sistema que condujera a una separación óptima de los compuestos de interés. Las mejores condiciones se obtuvieron al utilizar una columna analítica de Nucleosil C18 (5 µm; 125 mm × 4 mm), con un sistema de elución ACN-H₂O (3:7), a un flujo de 0.4 ml/min y longitudes de onda de 212 nm y 320 nm. El cromatograma resultante de la fracción combinada presentó un compuesto mayoritario (T_R= 5.2 min). Para el aislamiento del compuesto se utilizó una columna semipreparativa de Nucleosil C18 (5 µ; 250 mm × 10 mm) en el mismo sistema antes descrito. El rendimiento del compuesto fue de 5 mg.

Cuadro 5. Fraccionamiento secundario de la fracción F20

Eluyente y proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave
CH ₂ Cl ₂	1-25	1-15	F20-I
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (95:5)	26-64	16-42	F20-II
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (93:7)	65-90	43-45	F20-III
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)	91-116	46-67	F20-IV
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (85:15)	117-156	68-71	F20-V
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (8:2)	157-181	72-80	F20-VI
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (75:25)	182-192	81-90	F20-VII
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (7:3)	193-205	91-112	F20-VIII
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (6:4)	206-215	113-119	F20-IX
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:1)	216-	120-127	F20-X
		128-146	F20-XI
		147-159	F20-XII
		160-172	F20-XIII
		173-182	F20-XIV
		183-197	F20-XV
		198-216	F20-XVI

Cuadro 6. Fraccionamiento terciario de la fracción F20-VII

Eluyente y proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave	Peso
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)	1-4	1-4	F20-VII-1	34 mg
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)	5-9	5-9	F20-VII-2	10.1 mg
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)	10-18	10-18	F20-VII-3	2.3 mg
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:1)	19-25	19-25	F20-VII-4	

El compuesto aislado se sometió a los análisis espectroscópicos y espectrométricos pertinentes para determinar su identidad.

6.3.7. Aislamiento del ácido clorogénico (26) a partir de la infusión

La infusión de hojas de *H. latiflora* se preparó a partir 1.5 g de material vegetal molido (tamaño de partícula < 2000 μm) extraído en 100 mL de agua hirviendo durante 30 minutos, la infusión se filtró utilizando filtros Whatman No. 1, y se aforó a 250 mL en matraces volumétricos con agua destilada. El análisis de la infusión por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) se realizó con una columna Symmetry C8 (tamaño de partícula de 5 μm ; 3.9 \times 150 mm). El sistema de elución consistió de ACN-H₂O (0.1 % de ácido trifluoroacético) (19:81) a un flujo de 0.4 mL/min, el volumen de inyección en todos los casos fue de 20 μL . Este procedimiento permitió el aislamiento del compuesto mayoritario (t_{R} = 5.09 min; 5 mg) el cual se sometió a los análisis espectroscópicos y espectrométricos pertinentes para determinar su identidad.

6.3.8. Establecimiento de perfiles cromatográficos en la infusión de hojas y corteza de *Hintonia latiflora* y *H. standleyana*

Para el establecimiento de los perfiles cromatográficos en capa delgada (CCD) se hicieron particiones con acetato de etilo de infusiones de hojas y corteza de *H. latiflora* y *H. standleyana*. Las infusiones se prepararon a partir 9 g de material vegetal sobre el cual se vertieron 250 mL de agua hirviendo y se dejó reposar durante 30 minutos. El material vegetal utilizado fue el siguiente:

- Hojas de *H. latiflora*, recolectadas en Batopilas, Chih. (R. Bye 34880) (HHL)
- Corteza de *H. latiflora*, recolectada en Batopilas, Chih. (R. Bye 31735) (CHL)
- Hojas de *H. standleyana*, recolectadas en el estado de Guerrero (P. Hersch ASFM-INAH) (HHS)
- Corteza de *H. standleyana*, recolectada en Atenango del Río, Gro. (P. Hersch 824) (CHS)

Las particiones se obtuvieron a partir de 50 mL de infusión al cual se le adicionó un volumen idéntico de AcOEt y separando la fracción orgánica con un embudo de separación, se utilizó un volumen final de 150 mL de disolvente orgánico.

El mejor sistema de elución se logró con una fase móvil constituida por CHCl₃ -

MeOH (7:3) con 10 gotas de CH₃COOH por cada 20 mL de fase móvil preparada. Los extractos se aplicaron en una concentración de 1 mg/mL. Las placas cromatográficas obtenidas se analizaron a dos longitudes de onda, 365 nm y 254 nm, y se revelaron con una solución de sulfato cérico amoniacal. En todos los casos, se compararon los cromatogramas contra estándares conocidos de distintos productos obtenidos las distintas especies de *Hintonia* y *Exostema* (Mata *et al.*, 1990; 1992; 2008; Guerrero-Analco, *et al.*, 2005; 2007).

6.3.9. Establecimiento de la composición química de la infusión de hojas de *H. latiflora* y *H. standleyana*

Para el establecimiento de perfiles cromatográficos a través de CLAR se hicieron infusiones de hojas de *H. latiflora* y *H. standleyana*. Las infusiones se prepararon a partir 1.5 g de material vegetal molido (tamaño de partícula < 2000 µm) extraído en 100 mL de agua hirviendo durante 30 minutos, las infusiones se filtraron utilizando filtros Whatman No. 1, y se aforaron a 250 mL en matraces volumétricos con agua destilada. El material vegetal utilizado fue el siguiente:

- Hojas de *H. latiflora*, recolectadas en Batopilas, Chih. (R. Bye 34880) (HHL).
- Hojas de *H. standleyana*, recolectadas en el estado de Guerrero (P. Hersch ASFM-INAH) (HHS).

Para realizar los perfiles en CLAR de los extractos acuosos, se utilizó una columna Symmetry C8 (tamaño de partícula de 5 µm; 3.9 × 150 mm). El sistema de elución utilizado fue acetonitrilo : agua (0.1 % de ácido trifluoroacético) (19:81) a un flujo de 0.4 mL/min, el volumen de inyección en todos los casos fue de 20 µL. La identificación de los compuestos en los cromatogramas se llevó a cabo con base en el tiempo de retención y el enriquecimiento de las infusiones con estándares (10 µL de solución estándar a una concentración de 1.25 mg/mL) bajo las mismas condiciones cromatográficas. Los estándares utilizados fueron 5-*O*-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**4**), 5-*O*-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**5**), 5-*O*-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**6**), 6''-*O*-acetil-5-*O*-β-D-galactopiranosil-4',7-dihidroxi-4-fenilcumarina (**11**), 6''-*O*-acetil-5-*O*-β-D-galactopiranosil-3',4',7-trihidroxi-4-fenilcumarina (**12**), 5-*O*-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**13**), 5-*O*-[β-D-xilopiranosil-

(1→6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**14**), y 5-O-[β -D-xilopiranosil-(1→6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (**25**) las cuales fueron aisladas previamente de la corteza y hojas de *H. standleyana* y *H. latiflora* (Mata *et al.*, 1990; 1992; 2008; Guerrero-Analco, *et al.*, 2005; 2007). También, se utilizó un estándar de ácido clorogénico (**26**) (Sigma-Aldrich).

6.4. Estudio farmacológico

6.4.1. Prueba de toxicidad aguda

Para evaluar la toxicidad aguda del extracto íntegro de *H. latiflora*, se utilizó el protocolo experimental descrito por Lorke (1983). Se utilizaron grupos de tres ratones macho cepa ICR, con un peso promedio entre 30–35 gramos. Se ensayaron tres dosis del extracto (10, 100 y 1000 mg/kg) En todos los casos el material se suspendió en una solución salina (0.1% de Tween 80, Sigma). Posterior a la administración de los extractos, los animales se observaron durante las primeras dos horas, y se continuaron monitoreando durante quince días, registrando su peso, comportamiento y cambios fisiológicos visibles. Al finalizar el periodo de observación, se realizó un examen morfológico general de los órganos de los animales, comparándolos contra un individuo del grupo control.

En la segunda etapa de la evaluación de toxicidad aguda, se utilizaron grupos de tres ratones macho cepa ICR, con un peso promedio entre 30 y 35 gramos. Las muestras se administraron por vía oral, y se ensayaron a las dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg. En todos los casos se suspendieron en una solución salina (0.1% de Tween 80). Posterior a la administración de los extractos, los animales se observaron durante las primeras dos horas, y se continuaron monitoreando durante quince días, registrando su peso, comportamiento y cambios fisiológicos visibles. Al finalizar el periodo de observación, se realizó un examen morfológico general de los órganos de los animales, comparándolos contra un individuo del grupo control.

Con las dos fases del método de Lorke concluidas, se puede estimar el valor de la dosis mínima necesaria para producir la muerte del animal por toxicidad (DL₅₀). Dicho valor se calcula mediante una media geométrica entre la dosis donde se presenta el deceso del primer animal y la última dosis donde no hay muertos.

6.4.2. Ensayos antidiabéticos

6.4.2.1. Prueba de tolerancia a la glucosa oral

Para la evaluación de la actividad antidiabética del extracto íntegro de la hojas de *H. latiflora*, se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT), lo cual permitió caracterizar la actividad antihiper glucémica, utilizando animales normoglicémicos y diabéticos (Williamson *et al.*, 1996).

Se utilizaron ratones ICR macho, de 25 gramos de peso promedio, con un ayuno de 12 horas, formando lotes de ocho animales, los cuales se agruparon en los distintos tratamientos: vehículo (control negativo), glibenclamida 10 mg/kg (control positivo) (Sigma), extracto de *H. latiflora* 100 mg/kg y extracto de *H. latiflora* 500 mg/kg. A cada lote se le administró una carga de 1 g/kg de glucosa anhidra (Sigma).

Para su administración, cada dosis de extracto íntegro se suspendió en solución salina con 0.05% de Tween 80; los dos controles siguieron el mismo procedimiento de disolución; todos los tratamientos fueron administrados vía oral utilizando una sonda orogástrica. Se tomó muestras de sangre a las 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas después de la administración. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas de la vena caudal de los animales a través de una pequeña incisión en el final de la misma. Los niveles de glucosa sanguínea se midieron por el método enzimático de la glucosa oxidasa utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra 2, Jonhson & Jonhson). Los valores obtenidos en las lecturas de glucosa sanguínea se reportan en mg/dL de glucosa sanguínea. Se verificó si los animales presentaron, o no, una disminución del pico posprandial relacionada con la administración de los extractos.

6.4.2.1.1. Modelo de diabetes mellitus tipo 2

Los ratones macho (15-20 g) de la cepa ICR, se diabetizaron con una dosis intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ 100 mg/kg, Fluka) posterior a la administración del dinucleótido de la nicotinamida (NAD 50 mg/kg i.p., Sigma). Dicho protocolo tiene la finalidad de proteger a las células β pancreáticas del daño oxidativo excesivo que produce la STZ, asegurando así la generación de un cuadro fisiológico similar al de la diabetes tipo 2 en los animales (Masiello *et al.*, 1998).

6.4.2.2. Ensayo hipoglucemiante agudo

Para la evaluación de la actividad antidiabética del extracto íntegro de la hojas de *H. latiflora*, se llevó a cabo un experimento de tipo agudo, utilizando animales normoglucémicos (Guerrero-Analco *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 1996). Se utilizaron ratones cepa ICR macho, de 25 gramos de peso promedio, con un ayuno de 24 horas, formando lotes de ocho animales, los cuales se agruparon en los distintos tratamientos: vehículo (control negativo), glibenclamida 10 mg/kg (control positivo) (Sigma), extracto de *H. latiflora* 100 mg/kg, extracto de *H. latiflora* 300 mg/kg y extracto de *H. latiflora* 500 mg/kg.

Para su administración, cada dosis de extracto íntegro se suspendió en una solución salina con 0.05% de Tween 80; para los dos controles se siguió el mismo procedimiento de disolución; todos los tratamientos fueron administrados vía oral utilizando una sonda orogástrica.

De todos los tratamientos se tomó muestras de sangre a las 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas después de la administración. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas de la vena caudal de los animales a través de una pequeña incisión en el final de la misma. Los niveles de glucosa sanguínea se midieron por el método enzimático de la glucosa oxidasa utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra, Jonhson-Jonhson, Milpitas, CA, EE.UU.). Una vez obtenidos los valores de las lecturas de glucosa sanguínea (mg/dL), se calcularon los porcentajes de variación de glucemia de acuerdo a la ecuación:

$$\% \text{ de variación de glucemia} = [(G_i - G_t) / G_i] \times 100$$

donde G_i corresponde al valor de glucemia inicial y G_t el valor de glucemia a las 0, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 horas posteriores a la administración de las muestras.

6.5. Análisis estadístico

6.5.1. Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental, elemento que dio origen al valor de las variables obtenidas, fue un ratón cepa ICR, en los diferentes tratamientos ensayados. La comparabilidad de las muestras se consiguió por medio de la asignación aleatoria de las unidades a los grupos de

estudio. La validez interna estuvo dada por las mismas características de los ratones en los diferentes tratamientos (sexo y peso), igual número de lotes y animales ($n= 6$) en las diferentes condiciones experimentales, así como la ubicación de los lotes en las mismas condiciones para los diferentes tratamientos (condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo del Bioterio Centro UNAM-Harlan, siguiendo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999). La variable en cada caso (concentración de glucosa sanguínea y/o porcentaje de variación de glucemia) se clasifica como numérica continua. En cada medición se realizó una lectura por animal para obtener el valor promedio para cada tratamiento en un tiempo dado (Méndez, 1990).

6.5.2. Modelo estadístico

Para la evaluación de los diferentes tratamientos se planteó un modelo completamente aleatorizado con un criterio de clasificación. El factor ensayado fue el tratamiento administrado a cada lote de ratones, a distintas dosis, siempre con un control negativo (vehículo) y un control positivo (glibenclamida) en cada experimento.

El modelo empleado es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} , representa el porcentaje de concentración de glucosa sanguínea y/o porcentaje de variación de glucemia en la unidad experimental j -ésima (un raton cepa ICR), sometida al tratamiento (población i -ésima).

μ , representa la media general de la población que contiene los tratamientos.

τ_i , representa el efecto del tratamiento ($\tau_i = \mu_i - \mu$, donde μ_i es la media de la población o tratamiento i -ésimo).

ε_{ij} , es el error aleatorio ocasionado por todos los factores no constantes, cada uno de los tratamientos estudiados se considera de distribución normal, con media cero y varianza σ .

6.5.3. Análisis e interpretación de la información

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANADEVA) con un nivel de probabilidad (α) 0.05, utilizando el programa estadístico Prisma Graph-Pad, version 4.0.

Después de realizar los análisis se obtuvieron dos alternativas:

-
-
- a) El caso de los análisis de varianza donde no se rechazó H_0 , es decir, que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al nivel de significancia usado. Esto implica que la variabilidad entre las poblaciones estudiadas es del mismo orden de magnitud que las de los errores y por esto se considera que las medias de los tratamientos (como poblaciones) son iguales.
- b) El caso de los análisis de varianza donde se rechazó H_0 , es decir, se considera que hay diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. En este caso, se aplicaron pruebas de rango múltiple de intervalos de confianza a un nivel de probabilidad $\alpha = 0.05$ (*t* de Dunnett), para distinguir los niveles que causan la diferencia (Méndez, 1976).

7. Resultados y discusión

A través de la revisión bibliográfica llevada a cabo se pudo constatar que *H. latiflora* es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana con más de 400 años de historia (Sahagún, 1540; Mociño, 1802; Palmer, 1885; AIMN, 1894, Loaeza, 1906, 1907, 1908; Landa, 1913; Terres, 1913; Gentry, 1942; Díaz, 1976, Bye, 1986; Martínez, 1989; Argueta *et al.*, 1994). Durante este periodo, han sido constantes los envíos tanto de material botánico a Europa, como de su información etnobotánica, preclínica y clínica.

La importancia de esta planta dentro de la medicina tradicional había sido señalada por Mociño desde principios del siglo XIX (Mociño, 1802), y una idea similar fue retomada por los investigadores del IMN sin embargo, las circunstancias socio-políticas del momento, impidieron que se concretara un proyecto a nivel nacional que permitiera su uso racional como planta medicinal.

El uso de *H. latiflora* como antidiabético se reporta, por vez primera, en los estudios del IMN (Landa, 1913; Terres, 1913); y posterior a ésta descripción, en Barcelona se empieza a comercializar el copalchi. Esta información da pie a conjeturar si existió alguna relación entre Antonio Novellas y los investigadores del Instituto Médico Nacional. Si tenemos en cuenta el escenario de la Revolución Mexicana, la situación política y social que se vivía en México, existe la posibilidad de que científicos mexicanos hayan migrado a Europa y tal vez organizado negocios con compañías farmacéuticas extranjeras. El hecho concreto es que a partir de ese momento, se inicia la descripción en la literatura científica europea de *H. latiflora* como un agente antidiabético.

No obstante la revisión histórica de esta planta, el momento y la razón en la que empieza a utilizarse como antidiabético se desconocen. La euforbiácea *Croton niveus* se conoce también como copalchi y tiene reputación de antipalúdico y antidiabético; las constantes sustituciones entre estas especies pudieron favorecer el establecimiento del uso de *H. latiflora* como agente antidiabético. Durante todo este tiempo, la corteza de *H. latiflora* ha sido comercializada por propios y extraños, los grandes volúmenes de extracción, aunados a la falta de políticas y estrategias para su explotación sustentable, ha generado que esta rubiácea tenga mermadas sus poblaciones nativas y se encuentre en peligro de extinción. Este escenario, motivó el interés por el estudio de las hojas de *H.*

latiflora, generando una fuente renovable de compuestos. Así como el encontrar productos naturales que ayuden a controlar la diabetes.

Otra manera de proteger este valioso recurso natural es la generación de un instrumento que reúna toda la información científica generada hasta ahora y, de esta forma, facilitar la diagramación y la instrumentación de estrategias que permitan la explotación sostenible de la planta. El tipo de documento idóneo para este fin es la monografía tipo OMS, esto se debe a que dicho escrito asienta la información taxonómica, etnobotánica, química y terapéutica de una manera concisa y accesible a un público amplio, desde usuarios de la medicina tradicional hasta tomadores de decisiones a nivel gubernamental.

Toda la información recopilada en los antecedentes sumados a los resultados que se describen a continuación, permitirán escribir la monografía de esta planta medicinal que México ha proporcionado al mundo. Estos resultados se discuten en dos partes. La primera, abarca la discusión referente a la investigación farmacológica, la prueba de toxicidad aguda y los efectos antidiabéticos (actividad hipoglucemiante y antihiper glucémica) del extracto de hojas de *H. latiflora*. La segunda parte, se refiere a la caracterización anatómica e histológica y a los resultados obtenidos de la investigación química, que generó información importante para el establecimiento de las pruebas de identidad química de las hojas incluyendo compuestos marcadores y perfiles cromatográficos de las hojas de *H. latiflora*.

7.1. Estudio farmacológico

7.1.1. Establecimiento de la dosis letal media

El extracto íntegro de *H. latiflora* tuvo una dosis letal media de 1668 mg/kg (DL_{50} = 1668 mg/kg). Un ratón del grupo tratado con la dosis 1600 mg/kg murió. Los ratones que ingirieron la dosis de 2900 mg/kg, murieron todos; mientras que de los del grupo que recibieron la dosis de 5000 mg/kg sólo murieron dos (Tabla 1). Todos los ratones presentaron cierta complicación gastrointestinal (diarrea con mucosidad), la cual fue evidente poco después de la hora de administración; al día siguiente del tratamiento los ratones volvieron a la normalidad.

En cuanto a los pesos registrados, en todos los grupos el peso inicial promedio se

mantuvo, presentando un ligero aumento al final de los 15 días; estos datos indican que no existió complicación metabólica.

En cuanto a la inspección anatómica general de los órganos vitales, no se encontraron diferencias entre los tratamientos y el control; todos tenían el mismo color y tamaño; tampoco se apreciaron muestras de daño tisular.

Dosis (mg/kg)	10	100	1000	1600	2900	5000	DL₅₀= 1668 mg/kg
No. de muertes	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	2/3	

Tabla 1. Relación dosis - muerte en ratones ICR, extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora*

La DL₅₀ calculada para el extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora* debe contrastarse con la DE₅₀ reportada para el extracto íntegro de la corteza de *H. latiflora* (DL₅₀= 2852 mg/kg) (Déciga-Campos *et al.*, 2007). El extracto íntegro de las hojas presentó una DL₅₀ menor que la de la corteza. Este menor valor puede estar asociado a una diferencia en la concentración de algunos compuestos en la hoja, o a una composición química distinta. Sin embargo, el rango de toxicidad en el cual se encuentra el extracto de hojas sigue siendo considerado como no tóxico de acuerdo a los criterios de Lorke, por lo que el ligero aumento en la toxicidad no es un motivo que descarte el uso terapéutico de las hojas.

7.1.2. Efectos antidiabéticos

7.1.2.1. Efecto antihiperoglucémico

El extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora* no mostró efecto en los ratones normoglucémicos (Tabla 2, Figura 13). En el caso de los animales diabéticos, se observó un efecto antihiperoglucémico considerable al inhibir el pico postprandial, presentando un aumento de la concentración de la glucosa sanguínea menor al 10% después del tratamiento (Tabla 3, Figura 14). El efecto se presentó en ambas dosis ensayadas, lo que favorece la seguridad del extracto de hojas de *H. latiflora*, ya sólo se aprecia su actividad en animales diabéticos. La inhibición del pico postprandial es de suma importancia en el paciente diabético, ya que este fenómeno está asociado con diversas complicaciones cardiovasculares que dañan significativamente al enfermo (ADA, 2007).

Tabla 2. Efecto de la tolerancia a la glucosa oral del extracto de hojas de *H. latiflora* (100 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en concentración de glucosa sanguínea. Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo.* $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Concentración de glucosa sanguínea (mg/dL)					
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	97 \pm 8.5	170.3 \pm 13.7	121 \pm 12.2	99.7 \pm 9.6	86.3 \pm 5.4	77 \pm 4.7
Glibenclamida	10	97 \pm 8.5	175.1 \pm 19.4	93.2 \pm 14	68.3 \pm 8.2	47.6 \pm 5.1	48.5 \pm 5.8
Extracto de <i>H. latiflora</i>	100	97 \pm 8.5	191.8 \pm 17	120.6 \pm 12.2	99.6 \pm 8.3	87.3 \pm 7	60 \pm 8.7
Extracto de <i>H. latiflora</i>	500	97 \pm 8.5	170.3 \pm 13.7	121 \pm 12.2	99.7 \pm 9.6	86.3 \pm 5.4 *	77 \pm 4.7

Tabla 3. Efecto de la tolerancia a la glucosa oral del extracto de hojas de *H. latiflora* (100 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en concentración de glucosa sanguínea. Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo.* $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Concentración de glucosa sanguínea (mg/dL)					
		0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehículo)	–	189.4 \pm 15.8	374.7 \pm 50.4	332 \pm 59.7	284.8 \pm 57.5	260.2 \pm 51.1	206.2 \pm 37.6
Glibenclamida	10	189.4 \pm 15.8	269.7 \pm 29.4	202.3 \pm 21.4 *	151.5 \pm 13.3 *	123.2 \pm 7.7 *	97.8 \pm 6.3 *
Extracto de <i>H. latiflora</i>	100	189.4 \pm 15.8	197.1 \pm 17 *	167.7 \pm 9 *	174.7 \pm 10.5 *	171.8 \pm 7.5 *	138.4 \pm 5.1
Extracto de <i>H. latiflora</i>	500	189.4 \pm 15.8	202.1 \pm 13.7 *	166.8 \pm 9.4 *	158.1 \pm 7.8 *	157.1 \pm 13.2 *	139 \pm 13.9

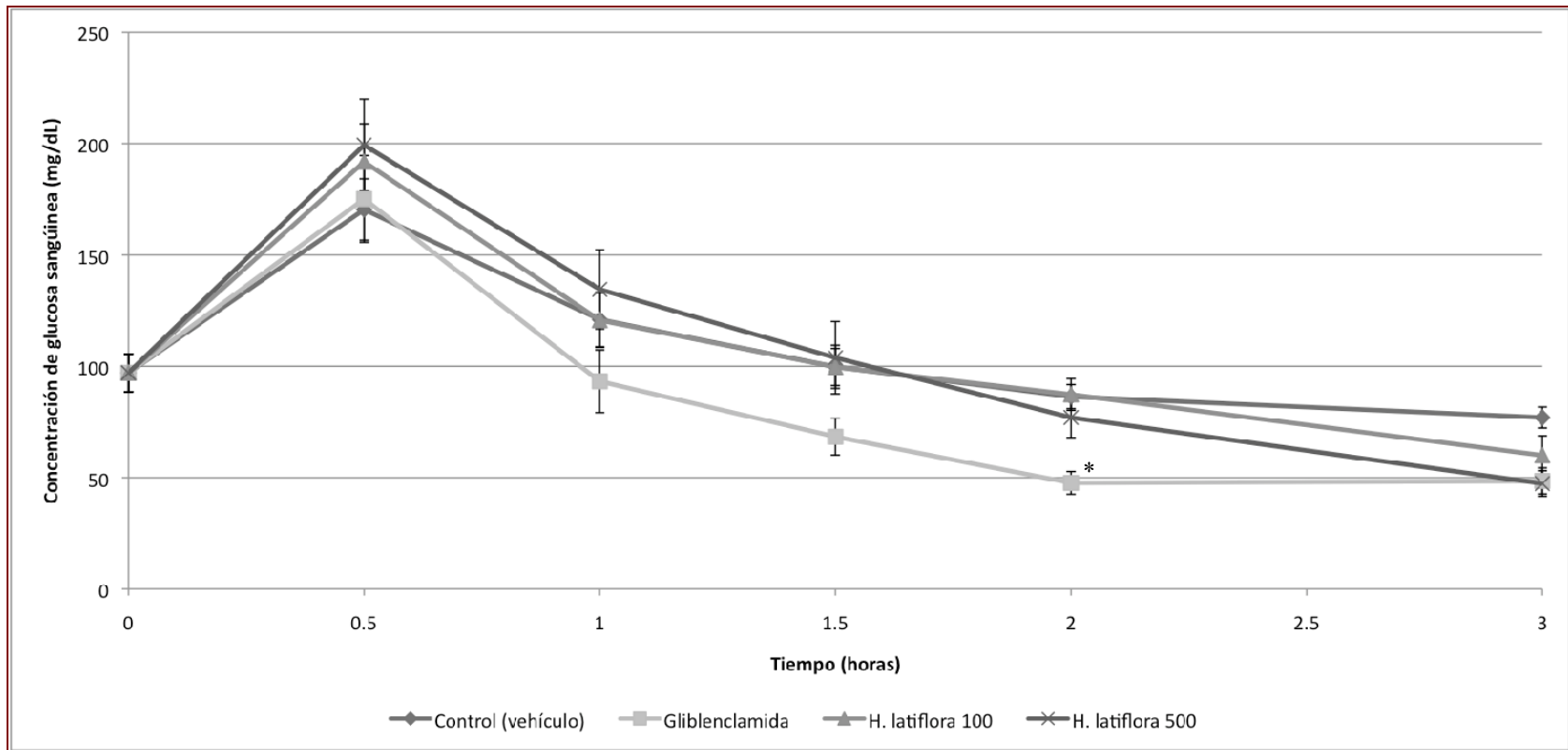


Figura 13. Curva de tolerancia a la glucosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones normoglucémicos; extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora* (100 y 500 mg/kg). Datos expresados en concentración de glucosa sanguínea (mg/dL). * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguida de de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

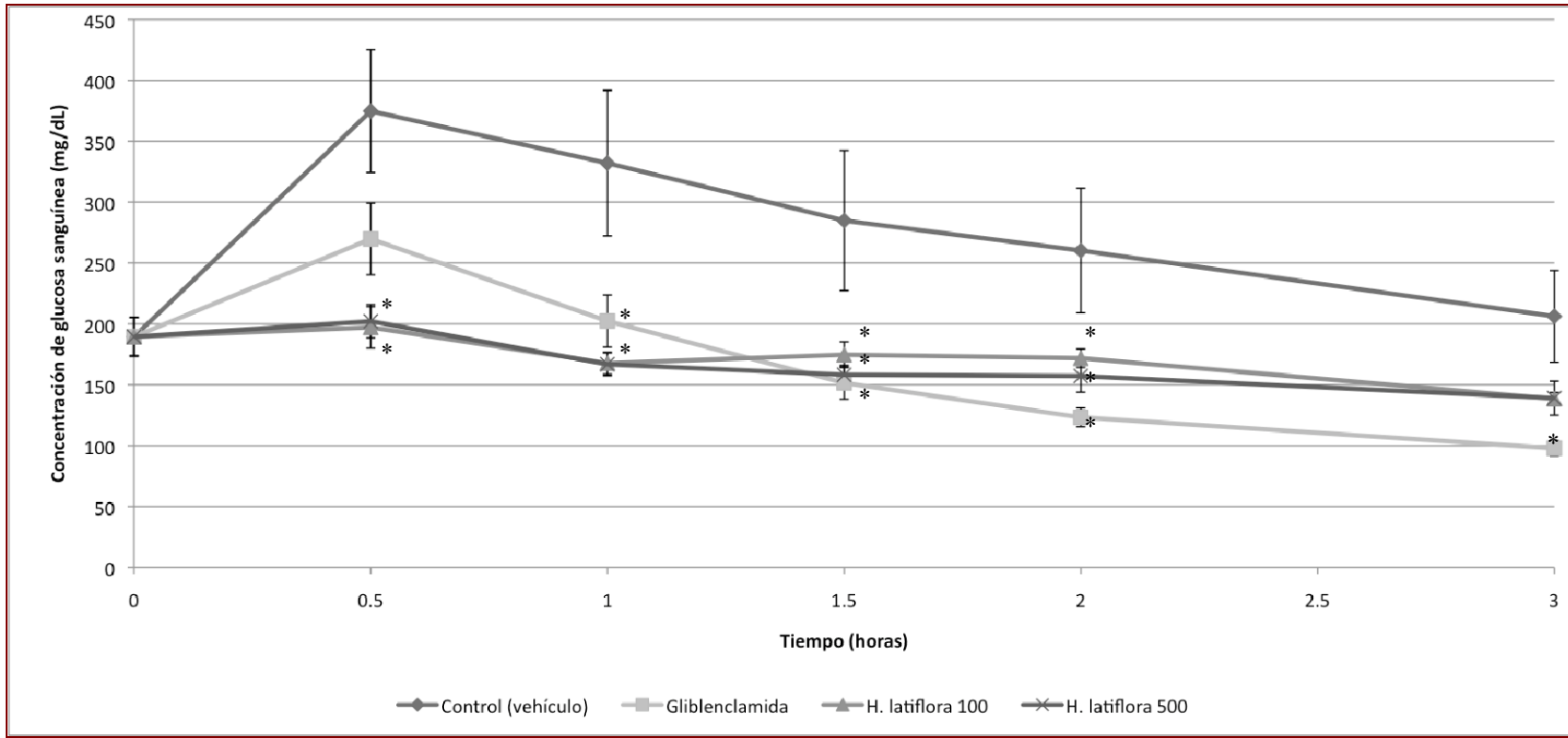


Figura 14. Curva de tolerancia a la glucosa oral durante un lapso de 3 horas en ratones diabéticos (STZ 100 mg/kg, i.p.); extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora* (100 y 500 mg/kg). Datos expresados en concentración de glucosa sanguínea (mg/dL). * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVIA seguida de de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

7.1.2.2. Efecto hipoglucemiante

El extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora* presentó un efecto hipoglucemiante significativo, tanto en los ratones normoglucémicos como en los diabéticos tratados. En el caso de los normoglucémicos, el extracto presentó actividad sólo a la dosis de 500 mg/kg a partir de las cinco horas posteriores a la administración; a las 9 horas se observó un decremento de glucosa del 50% (Tabla 4, Figura 15). En los ratones diabéticos la actividad biológica observada fue mucho mejor, ya que a las tres dosis ensayadas (100, 300 y 500 mg/kg) se observó una disminución de los niveles de glucosa sanguínea, el efecto se presentó desde la primera toma de sangre (1.5 horas) y fue constante durante todo el experimento. El porcentaje máximo de variación de glucosa se alcanzó en el último tiempo de medición a las dosis de 300 (-42.9%) y 500 mg/kg (-38.6%) (Tabla 5, Figura 16).

7. Resultados y discusión

Tabla 4. Efecto agudo del extracto de hojas de *H. latiflora* (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Datos expresados en concentración de glucosa sanguínea. Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. El % de variación de glucemia se expresa entre parentesis. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de *t* de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glucemia inicial (mgdL ⁻¹)	Concentración de glucosa sanguínea (mg/dL)				
		0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	–	149.2 \pm 3.3	139 \pm 8.2 (-7)	125.5 \pm 5.2 (-15.6)	110 \pm 8 (-26.2)	111.5 \pm 4.1 (-25)	107.5 \pm 3.4 (-27.7)
Glibenclamida	10	148.8 \pm 2.9	112.5 \pm 3.1 (-24.3)	92.2 \pm 5.7 (-37.9)	82.8 \pm 5.1 (-44.5) *	80.1 \pm 5.2 (-46.2) *	76.6 \pm 4.7 (-48.6) *
Extracto de <i>H. latiflora</i>	100	152.7 \pm 8.7	127.2 \pm 7 (-14.4)	109.8 \pm 6.5 (-28)	103.5 \pm 3.7 (-31.3)	103.6 \pm 4.7 (-32)	96 \pm 5.5 (-36.7)
Extracto de <i>H. latiflora</i>	300	159.3 \pm 7	141.3 \pm 8.7 (-10.7)	125.2 \pm 4 (-18.4)	106.6 \pm 5.4 (-31.4)	102.6 \pm 8.3 (-33.4)	98 \pm 8.5 (-37)
Extracto de <i>H. latiflora</i>	500	150.6 \pm 6.2	138.5 \pm 8.17 (-7.9)	96.8 \pm 5.6 (-35.1)	85 \pm 7.1 (-43.8) *	89.3 \pm 4.1 (-41.5) *	74.6 \pm 5.1 (-50.9) *

Tabla 5. Efecto agudo del extracto de hojas de *H. latiflora* (100, 300 y 500 mg/kg) en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos. Datos expresados en concentración de glucosa sanguínea. Cada valor es la media \pm EE para 6 ratones en cada grupo. El % de variación de glucemia se expresa entre parentesis. * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguido por una prueba de *t* de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glucemia inicial (mgdL ⁻¹)	Concentración de glucosa sanguínea (mg/dL)				
		0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	–	202.2 \pm 3.4	207.7 \pm 8.1 (4.4)	181.6 \pm 5.3(-14.4)	190 \pm 8.2 (-8.5)	199.1 \pm 5.8 (-2.1)	200.6 \pm 3.4 (-0.8)
Glibenclamida	10	282.5 \pm 35.7	193.1 \pm 24.8 (-39.8) *	173.7 \pm -25.3 (-48.8) *	167.6 \pm 17.7 (-50) *	171.3 \pm 21.3 (-49.2) *	169.8 \pm 20.3 (-50) *
Extracto de <i>H. latiflora</i>	100	284.2 \pm 24.7	230.8 \pm 16.9 (-24.8) *	231 \pm 17.4 (-27.9)	224.7 \pm 15 (-28.5) *	226.3 \pm 13.7 (-27.9) *	231.8 \pm 14.4 (-27.7) *
Extracto de <i>H. latiflora</i>	300	275.8 \pm 19.4	212.2 \pm 6.8 (-23.1) *	215.7 \pm 6 (-27.7)	188 \pm 2.3 (-37.8) *	173.5 \pm 4 (-39) *	164.3 \pm 4.8 (-42.9) *
Extracto de <i>H. latiflora</i>	500	282.8 \pm 44.5	208.2 \pm 29.3 (-36.6) *	204.2 \pm 30.4 (-37.7) *	201.3 \pm 23.9 (-36.7) *	208 \pm 24.8 (-35.6) *	202.2 \pm 20.4 (-38.6) *

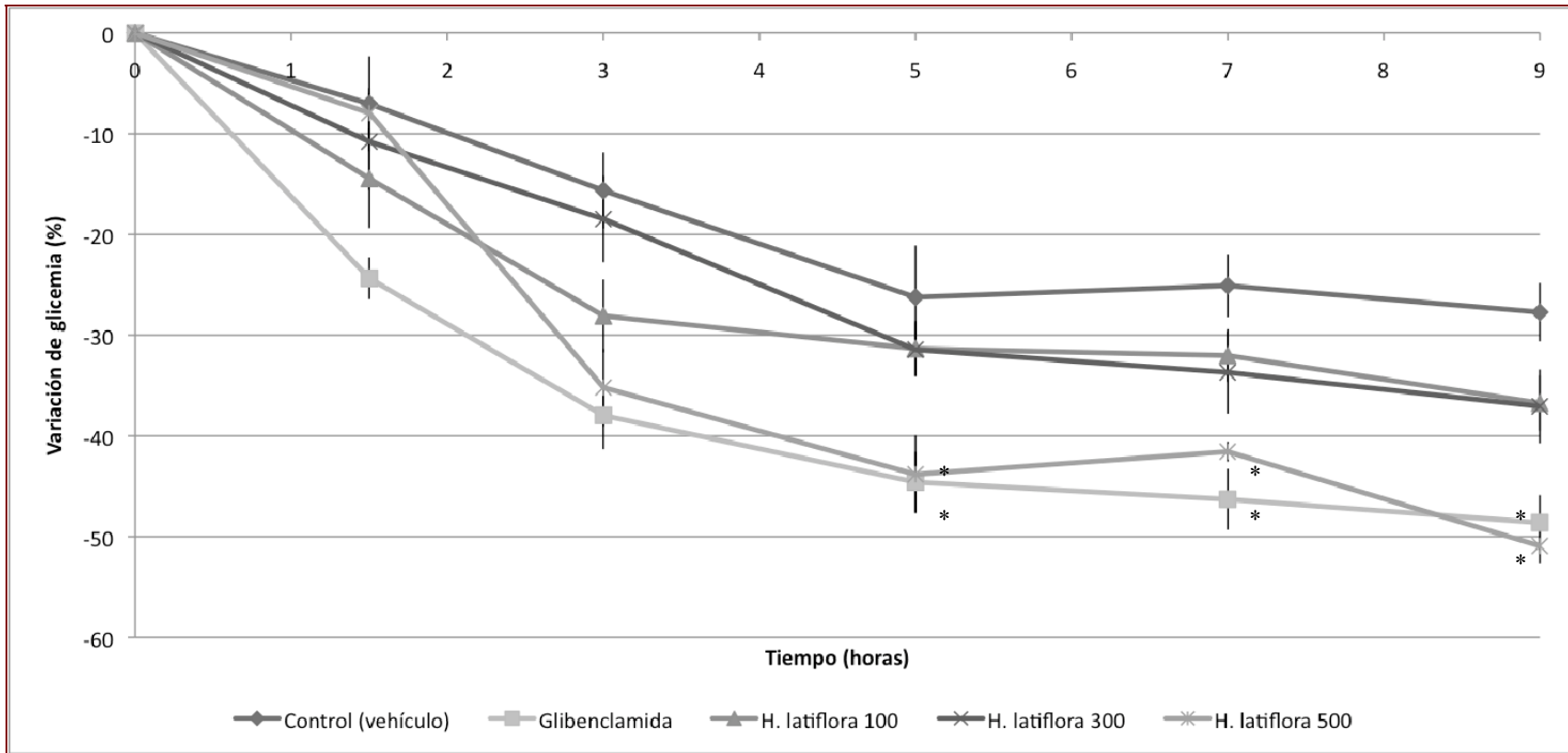


Figura 15. Efecto agudo del extracto de hojas de *H. latiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguida de de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

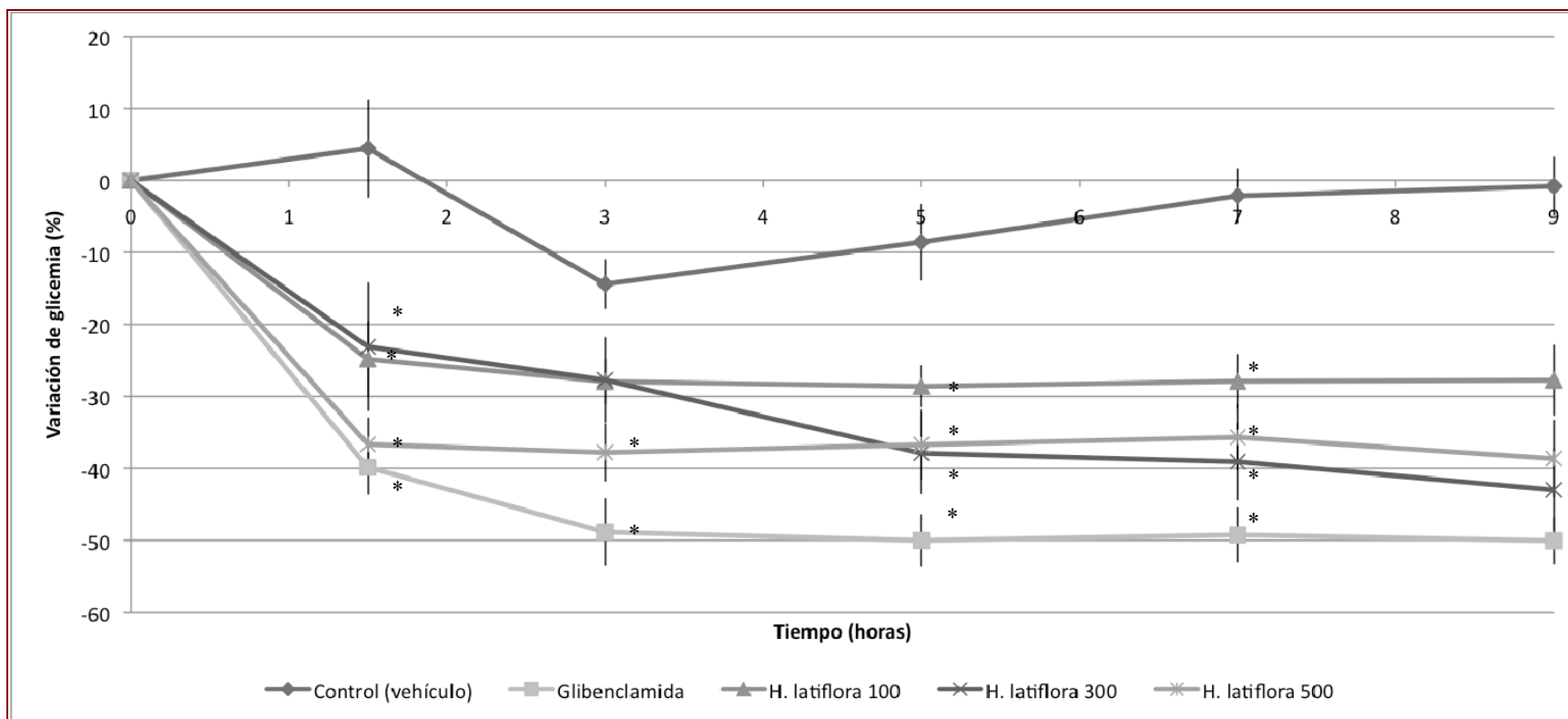


Figura 16. Efecto agudo del extracto de hojas de *H. latiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones diabéticos * $p < 0.05$ diferencia significativa ANADEVa seguida de de t de Dunnet comparando cada valor con el control negativo a ese mismo tiempo.

7.2. Pruebas de identidad

7.2.1. Caracterización anatómica e histológica

La hoja presenta una lámina coriácea de forma aovadooval de 3–4.5 cm de largo por 2–4 cm de ancho. El ápice de la hoja es agudo. Presenta un peciolo largo de 1.5–2.5 cm de largo. La vena central es conspicua al igual que las secundarias, las terciarias son inconspicuas.

Una característica importante de la hoja de *H. latiflora* es la presencia de domacios en las axilas de las venas en el envés de la hoja; siendo más abundantes hacia la base foliar (Figuras 17 y 18). Mientras que en el haz, se puede observar un grupo de tricomas en una cavidad que forma la vena central cerca del peciolo (Figuras 19 y 20).

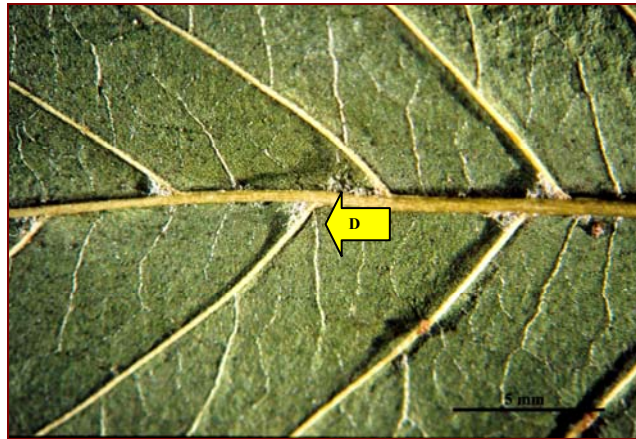


Figura 17. Fotomacrografía (6.25×) domacios (D) en el envés de la hoja de *H. latiflora*.

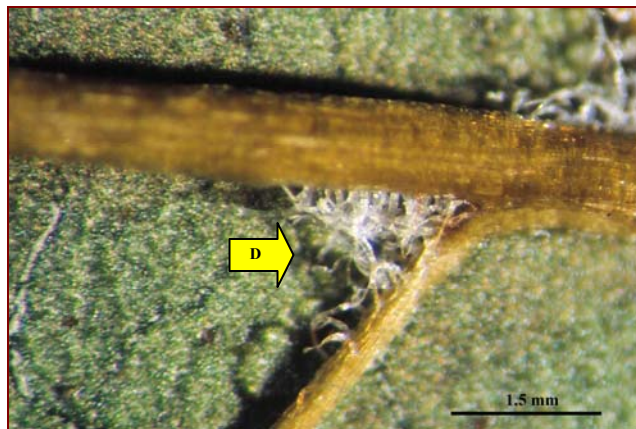


Figura 18. Fotomacrografía (12.5×) detalle del domacio (D) en el envés de la hoja.

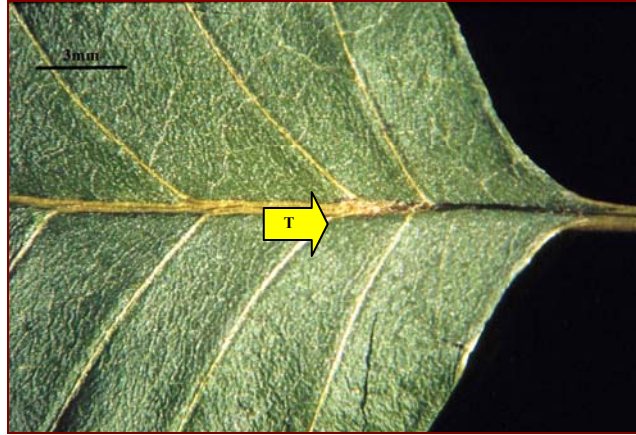


Figura 19. Fotomacrografía(6.25×) de la línea de tricomas (T) en el haz de la hoja de *H. latiflora*.

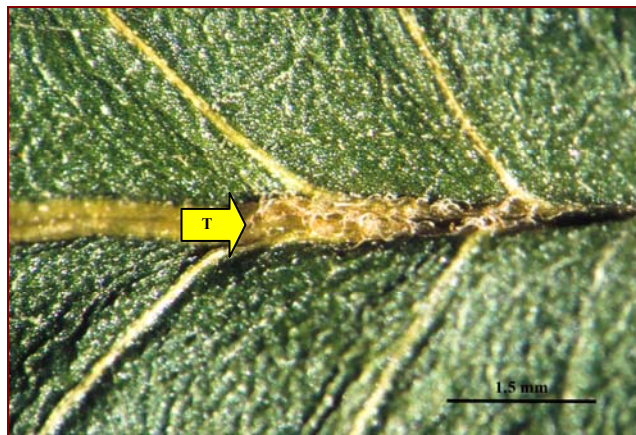


Figura 20. Fotomacrografía (12.5×) del detalle de la línea de tricomas (T) en el haz de la hoja.

Basándose en el corte transversal de la hoja de *H. latiflora* (Figura 21), se puede describir una epidermis del haz uniestratificada presentando cutícula sobre ella, con un parénquima en empalizada uniestratificado, tejido esponjoso pluriestratificado y la epidermis del envés uniestratificada con cutícula al igual que la epidermis del haz (Figura 22). Los haces vasculares incluidos en el parénquima son de tipo colateral, ya que claramente el floema está orientado hacia la cara abaxial de la hoja (Figura 23).

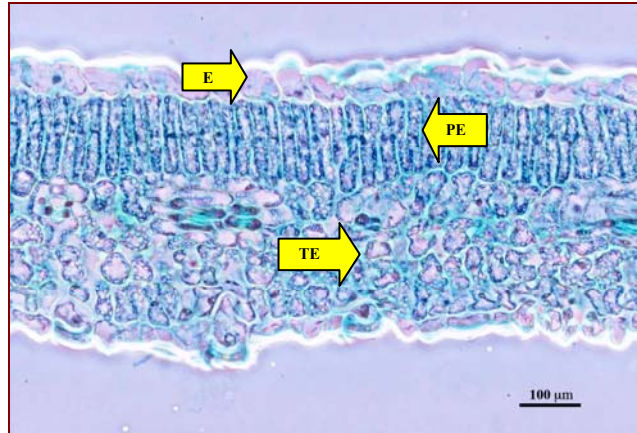


Figura 21. Fotomicrografía (100×) en contraste de fases del mesófilo en corte transversal se aprecia la epidermis (E), el parénquima en empalizada (PE) y el tejido esponjoso (TE) tinción cuádruple de Johansen.

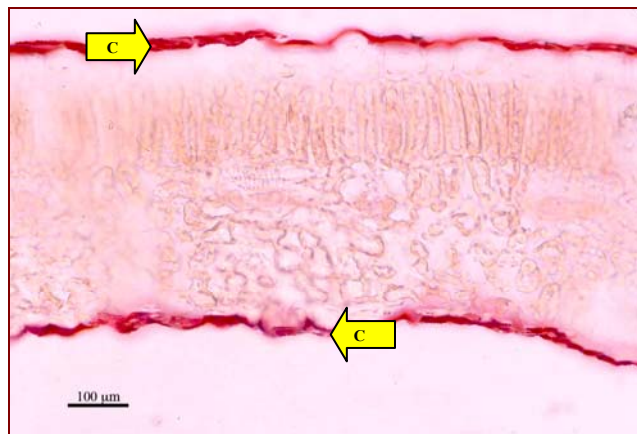


Figura 22. Fotomicrografía (100×) en campo claro del mesófilo en corte transversal, cutícula (C) teñida de rojo, tinción rojo "O" de aceite.

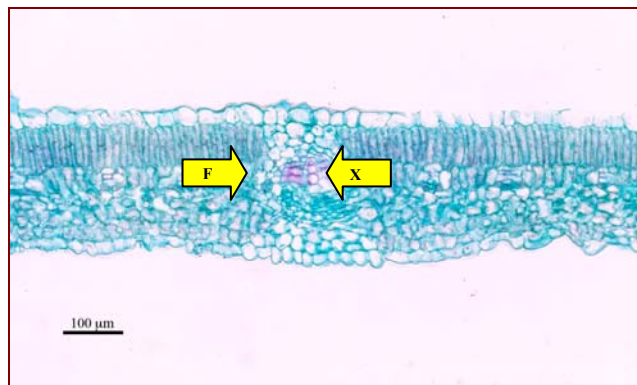


Figura 23. Fotomicrografía (100×) en campo claro corte transversal, haz vascular tipo colateral con el floema (F) rodeando al xilema (X), tinción de safranina - verde rápido.

La hoja es de tipo hipostomática con estomas paracíticos (rubiáceos) abundantemente distribuidos a lo largo de la epidermis del envés, con células epidérmicas grandes e irregulares (Figuras 24 y 26).

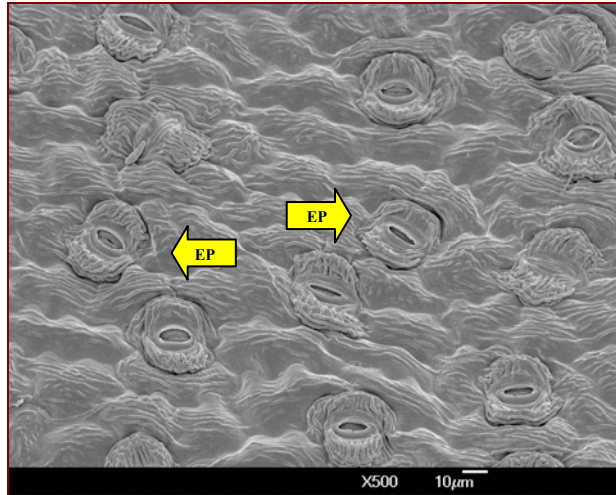


Figura 24. Imagen digital de microscopía electrónica de barrido (500×) campo de estomas paracíticos (EP) en el envés.

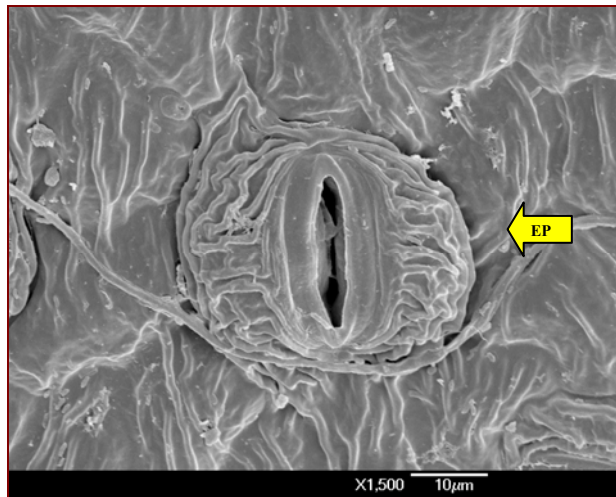


Figura 25. Imagen digital de microscopía electrónica de barrido (1500×) detalle de estoma paracítico (EP).

Los cortes longitudinales de *H. latiflora* muestran tricomas pluricelulares con varias filas celulares, cubiertos con una cutícula, agrupados en domacios en las axilas de las venas en el envés, y en la cavidad cerca del peciolo en el haz (Figuras 26, 27 y 28).

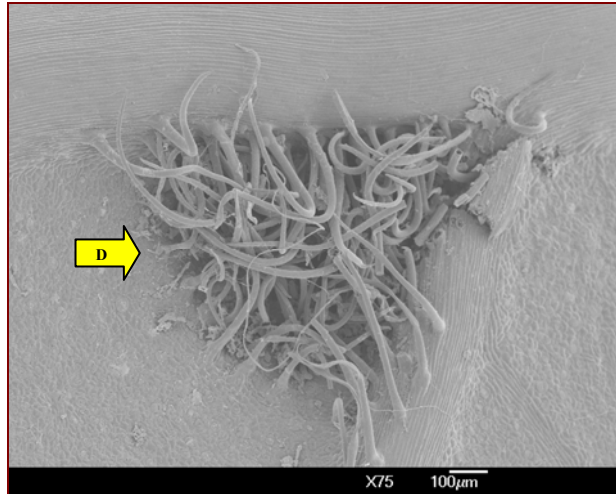


Figura 26. Imagen digital de microscopía electrónica de barrido (75×) domacio (D) en el envés de la hoja.



Figura 27. Fotomicrografía (100×) en campo claro, corte longitudinal, tricoma pluricelular (T), tinción azul negro de naftol.

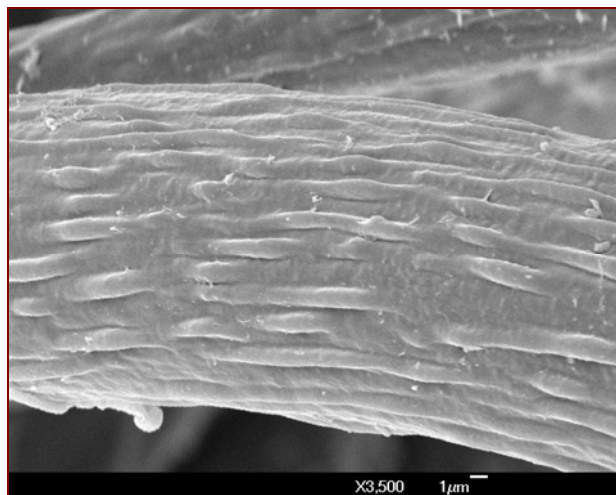


Figura 28. Imagen digital de microscopía electrónica de barrido (3500×) detalle de la cutícula que recubre los tricomas.

Los miembros de vaso presentan una ornamentación helicoidal particular, cerca de la cual se ubican cavidades de contenido de naturaleza mineral, probablemente drusas (Figuras 29 y 30).



Figura 29. Fotomicrografía (100×) en campo claro, corte longitudinal, elementos de vaso (V), tinción cuádruple de Johansen.

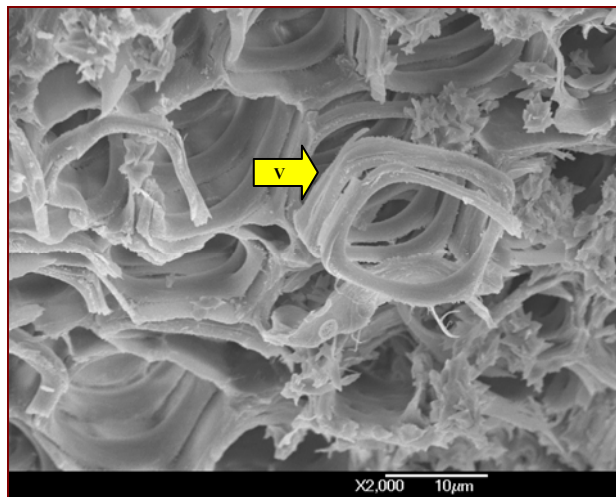


Figura 30. Imagen digital de microscopía electrónica de barrido (2000×) detalle de miembros de vaso en arreglo helicoidal (V).

7.2.2. Pruebas de identidad química

7.2.2.1. Aislamiento de compuestos marcadores

7.2.2.1.1. Identificación del ácido ursólico (24)

El estudio fitoquímico de las hojas de la planta se inició con la F12 ya que el análisis cromatográfico de capa fina indico la presencia en está fracción del compuesto mayoritario del extracto (Cuadro 3). Este producto cristalizó espontáneamente de la

fracción y se identificó como ácido ursólico (**24**) mediante el análisis detallado de sus espectros en el IR, de RMN y de masas (Anexo I, Espectro 1-4).

La presencia del compuesto **24** en las hojas de *H. latiflora* es de suma importancia, pues numerosos reportes han comprobado la efectividad de este terpenoide en el tratamiento de la diabetes mellitus y padecimientos asociados a la enfermedad (Gao *et al.*, 2008). De tal forma que el ácido ursólico (**24**) regula la apoptosis en ambientes ricos en glucosa (Oh *et al.*, 2007); estimula la captación de glucosa por incremento en la fosforilación del receptor de insulina (Zhang *et al.*, 2006) y suprime la angiogénesis en pacientes diabéticos con retinopatía no proliferativa (Skopinski *et al.*, 2004).

7.2.2.1.2. Identificación del ácido desoxicordifolínico (19)

El análisis cromatográfico de la fracción F22 (Cuadro 4), utilizando el reactivo de Dragendorff como agente visualizador, indicó la presencia de una sustancia de naturaleza alcaloidea. Tras sucesivos procedimientos cromatográficos, se obtuvieron 7.8 mg del alcaloide (pf > 250 °C), que resultó idéntico en todos sus aspectos a una muestra de referencia del ácido desoxicordifolínico (**19**) (Déciga-Campos *et al.*, 2006). En el anexo I se ilustran los distintos espectros (Anexo I, Espectro 5 y 6) del producto **19**.

El aislamiento del compuesto **19** permite relacionar quimiotaxonómicamente a las distintas especies *H. latiflora* y *H. standleyana*, por otro lado, permite la relación entre distintas partes de la planta (corteza y hoja), ya que se trata de un compuesto previamente reportado para la especie (Guerrero-Analco *et al.*, 2007). Al ser el ácido desoxicordifolínico un compuesto de naturaleza restringida, pero presente en el género, podemos proponerlo como compuesto marcador, estableciendo así una característica quimiotaxonómica útil para las pruebas de identidad tanto de la droga cruda derivada de la corteza como de las hojas.

7.2.2.1.3. Identificación de la 5-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)

De la fracción F20-VII-1-F20-VII-3, se aisló un sólido amarillo (4 mg) distinto cromatográficamente a las fenilcumarinas previamente aisladas del género (Cuadro 6). La fórmula molecular del producto **25** se estableció por espectrometría de masas en su

modalidad FAB positivo como $C_{28}H_{32}O_{14}$. Esta fórmula, en conjunto con las frecuencias de absorción observada en el IR (Tabla 1, Espectro 11) sugieren que la molécula es un glicósido de una 4-fenilcumarina y que la porción sacárida está constituida por dos unidades de azúcar.

Los espectros de resonancia magnética nuclear, RMN- 1H y RMN- ^{13}C , (Tabla 6, Anexo I, Espectro 7 y 8) resultaron similares a los compuestos de tipo 4-fenilcumarina obtenidos por Guerrero-Analco y colaboradores (2007). El espectro de RMN- ^{13}C presentó 15 señales asignables al núcleo 4-fenilcumarina, detectándose de esta manera la presencia de un carbonilo de tipo α -pirona, doce carbonos aromáticos y dos carbonos adicionales correspondientes a la doble ligadura α,β insaturada. En la región de los carbonos base de oxígeno se aprecian dos señales correspondientes a grupos metoxilo y las once señales restantes, corresponden a la porción disacárida, formada por xilosa y glucosa; la naturaleza de esta unidad se comprobó por la analogía de los desplazamientos químicos del producto **25** con los del compuesto **14**, previamente aislado por Guerrero y colaboradores (2007).

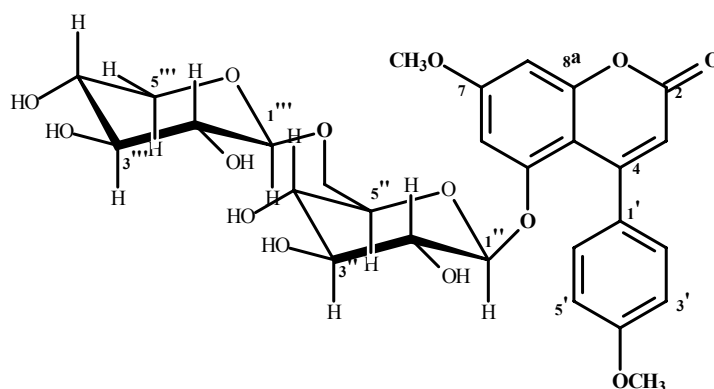
El espectro de RMN- 1H (Tabla 6, Anexo I, Espectro 7) presentó en la región de los hidrógenos aromáticos cinco señales, dos atribuibles a un sistema AA'BB' que corresponde al anillo B de la 4-fenilcumarina, dos correspondientes a un sistema de tipo AB en el anillo A y uno perteneciente a la doble ligadura α,β insaturada del anillo C. En la región donde resuenan los hidrógenos unidos a los carbonos bases de oxígeno, el espectro de RMN 1H del producto **25** registró señales atribuibles a dos unidades de azúcar, una hexosa y una pentosa. En δ_H 4.80 (d, $J= 8.0$, H-1'') y δ_H 4.24 (d, $J= 7.5$, H-1''') se observaron dos dobletes correspondientes a los hidrógenos anoméricos. Los valores de las constantes de acoplamiento permitieron inferir las orientaciones a-axial y a-ecuatorial de estos hidrógenos (H-1'' y H-1''', respectivamente), por consiguiente las uniones glicosídicas en **25** se establecen a través de los hidroxilos β orientados.

Los cuadros de conectividad observados en los espectros de correlación homonuclear (COSY) del compuesto **25** (Anexo I, Espectro 9) permitieron asignar inequívocamente las señales atribuibles a los hidrógenos de las dos unidades de azúcar en el producto. Las señales de los azúcares observadas en el espectro de RMN 1H correspondieron con las de una unidad de glucosa [δ_H 4.80 (d, $J= 8.0$, H-1''), 2.55 (dd, $J=$

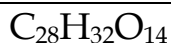
9.2, 8.0, H-2''), 3.26 (dd, $J= 9.0, 9.0$, H-3''), 3.16 (dd, $J= 9.5, 9.5$, H-4''), 3.25 (dd, $J= 9.5, 9.5$, H-5''), 4.0 (dd, $J= 11.7, 2.5$, H-6a''), 3.73 (dd, $J= 12.0, 6.5$, H-6b''); estas señales correlacionaron en el espectro HSQC con las observadas en δ_C 101.3 (C-1''), 74.3 (C-2''), 77.7 (C-3''), 71.2 (C-4''), 77.7 (C-5''), 70.2 (C-6''), respectivamente] y una de xilosa [δ_H 4.24 (d, $J= 7.5$, H-1'''), 3.18 (dd, $J= 9.0, 7.5$, H-2'''), 3.55 (dd, $J= 9.5, 9.5$, H-3'''), 3.47 (m, $J= 3.47$, H-4'''), 3.08 (dd, $J= 11.5, 10.0$, H-5a'''), 3.82 (dd, $J= 11.5, 5.0$, H-5b'''), señales que correlacionaron en el espectro HSQC con las señales en δ_C 105.4 (C-1'''), 77.9 (C-2'''), 77.2 (C-3'''), 71.1 (C-4'''), 66.8 (C-5'''), respectivamente] (Tabla 6, Anexo I, Espectro 9 y 10).

Las correlaciones observadas en el espectro NOESY del producto **25** entre H-1'' (δ_H 4.80)/H-6' (δ_H 7.30), H-1''' (δ_H 4.24)/ H-6a'' (δ_H 4.0) y H-6b'' (δ_H 3.73) permitieron establecer que la glucosa se encuentra unida directamente a la aglicona a través del hidroxilo del carbono anomérico y del hidroxilo de la posición C-5, y que la apiosa se une a la glucosa mediante un enlace glicosídico de tipo 1→6 (Tabla 6, Anexo I, Espectro 12). La secuencia de las dos unidades de azúcar se comprobó por espectrometría de masas, demostrándose en el patrón de fragmentación la pérdida de una unidad de xilosa terminal, ya que se observó un pico en 460 una correspondiente al ión quasimolecular menos 133, correspondiente a la xilosa.

Con base en estas evidencias el producto **25** se identificó como 5-O-[β -D-xilopiranosil-(1→6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina, un análogo novedoso de una 4-fenilcumarina.



5-O-[β -D-xilopiranosil-(1→6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (**25**)



P.M. 592

sólido amarillo; pf > 320 °C; $[\alpha]_D$ -26 (c 0.01, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} 327 (4.00), 330 (4.10) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3403, 1702, 1653, 1612, 1512, 1367, 1074 cm^{-1} ; ^{13}C y ^1H RMN, ver Tabla 1; FABEM m/z 593 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 460 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_4]^+$, 299 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_9]^+$; FABEMAR m/z 593.1799 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{14}$, 593.1792).

Tabla 6. Datos de RMN- ^1H (CD_3OD , 500 MHz) y RMN- ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) de la 5-O- $[\beta$ -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (**25**)

Posición	δ_{C}	δ_{H} mult, (J en Hz)
2	162.9	
3	113.4	5.93, s
4	157.9	
4a	105.7	
5	158.0	
6	96.4	6.69, d (2.5)
7	165.0	
8	100.5	6.70, d (2.0)
8a	157.1	
1'	133.3	
2'	130.3	7.30, d (9.0)
3'	114.1	6.97, d (9.0)
4'	161.4	
5'	114.1	6.97, d (9.0)
6'	130.3	7.30, d (9.0)
1''	101.3	4.80, d (8.0)
2''	74.3	2.55, dd (9.2, 8.0)
3''	77.7	3.26, dd (9.0)
4''	71.2	3.16, dd (9.5)
5''	77.7	3.25, dd (9.5)
6''	70.2	4.00, dd (11.7, 2.5) 3.73, dd (12.0, 6.5)
1'''	105.4	4.24, d (7.5)
2'''	74.9	3.18, dd (9.0, 7.5)
3'''	77.2	3.55, dd (9.5)
4'''	71.1	3.47, m
5'''		3.08 dd (11.5, 10.0)
CH₃O-	66.8	3.82 dd (11.5, 5.0)
CH₃O-	56.5	3.90, s
CH₃O-	55.9	3.85, s

7.2.2.1.4. Identificación del ácido clorogénico (26)

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos al compuesto mayoritario (5 mg) aislado de la infusión de hojas de *H. latiflora*, demostró que se trataba de ácido clorogénico (26) (pf 210 °C; Anexo I, Espectros 13 y 14). Además, dicha presencia se corroboró con el enriquecimiento del pico mayoritario de la infusión, utilizando un estándar comercial (Sigma) (Figura 33).

Las propiedades antidiabéticas y antioxidantes del ácido clorogénico han sido ampliamente descritas en la literatura (Matsui *et al.*, 2006; Bassoli *et al.*, 2008; Scherer y Godoy, 2008). Por otro lado, el compuesto 26 reduce la absorción de carbohidratos mimetizando el efecto de fármacos como la acarbosa, inhibiendo la presencia de picos posprandiales, fenómenos tan dañinos para el diabético. En pacientes normoglucémicos, este principio actúa como un agente preventivo contra el desarrollo de la diabetes (McCarty, 2005).

7.2.2.2. Perfiles cromatográficos por CCD de las infusiones de las hojas y corteza de *Hintonia latiflora* y *H. standleyana*

Con la finalidad de completar las pruebas de identidad química se establecieron los perfiles cromatográficos de las infusiones de la corteza y hojas de *H. latiflora*. También se establecieron los correspondientes a *H. standleyana* para complementar su monografía. Los rendimientos de cada muestra analizada fueron los siguientes:

- Hojas de *H. latiflora* (HHL); 54.1 mg
- Corteza de *H. latiflora* (CHL); 34.9 mg
- Hojas de *H. standleyana* (HHS); 114.9 mg
- Corteza de *H. standleyana* (CHS); 37.8 mg

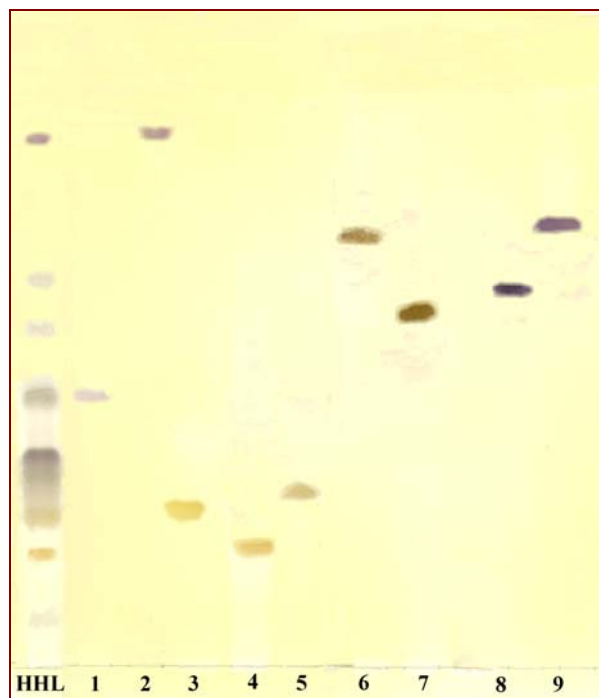


Figura 31. Cromatografía en placa delgada de la infusión de las hojas de *H. latiflora* (HHL). Carriles 1: compuesto 25; 2: compuesto 24; 3: compuesto 4; 4: compuesto 13; 5: compuesto 5; 6: compuesto 11; 7: compuesto 12; 8: compuesto 17; 9: compuesto 18.



Figura 32. Cromatografía en placa delgada de la infusión de las hojas de *H. standleyana* (HHS). Carriles 1: compuesto 25; 2: compuesto 24; 3: compuesto 4; 4: compuesto 13; 5: compuesto 5; 6: compuesto 11; 7: compuesto 12; 8: compuesto 17; 9: compuesto 18.

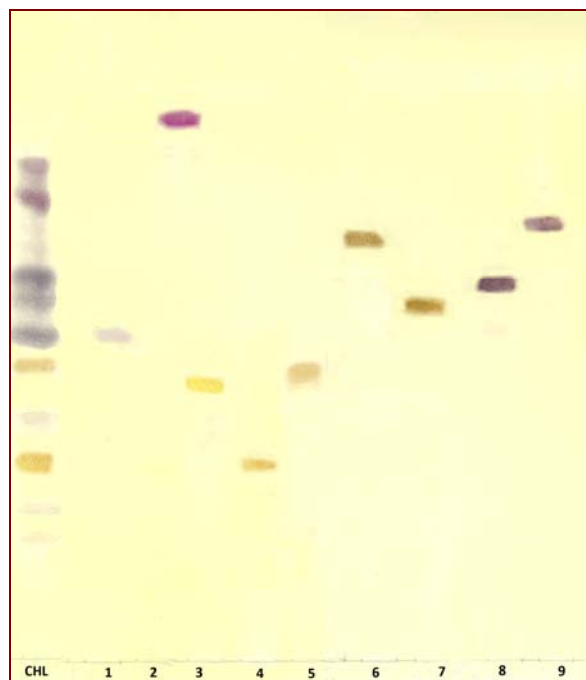


Figura 33. Cromatografía en placa delgada de la infusión de la corteza de *H. latiflora* (CHL). Carriles 1: compuesto 25; 2: compuesto 24; 3: compuesto 4; 4: compuesto 13; 5: compuesto 5; 6: compuesto 11; 7: compuesto 12; 8: compuesto 17; 9: compuesto 18.

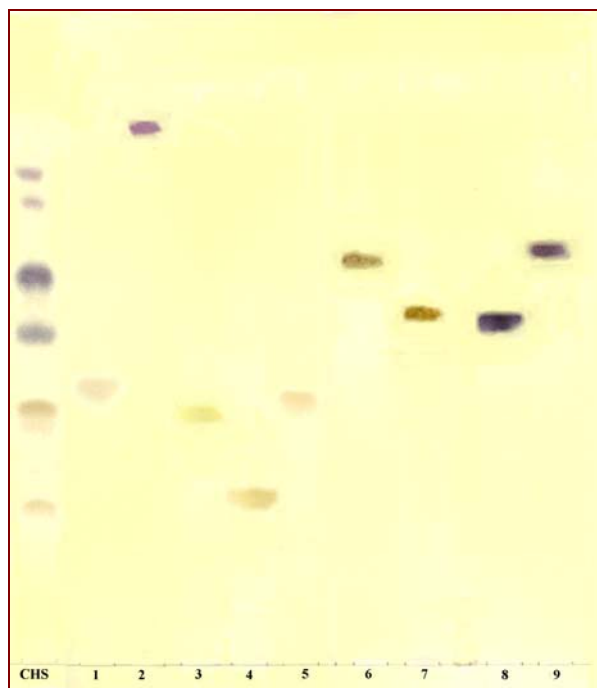


Figura 34. Cromatografía en placa delgada de la infusión de la corteza de *H. standleyana* (CHS). Carriles 1: compuesto 25; 2: compuesto 24; 3: compuesto 4; 4: compuesto 13; 5: compuesto 5; 6: compuesto 11; 7: compuesto 12; 8: compuesto 17; 9: compuesto 18.

A partir de estos resultados se pudo analizar la complejidad fitoquímica de cada extracto (Figuras 31-34). La comparación entre las infusiones de las distintas partes vegetales de las especies del género *Hintonia* permitió evidenciar la existencia de una composición química similar entre todas ellas (HHL, HHS, CHL, CHS).

La diferencia que podemos encontrar entre los extractos de hoja y corteza de ambas especies es la ausencia de cucurbitacinas (compuestos **17** y **18**) en las primeras; sin embargo, éstas presentan ácido ursólico (**24**), compuesto de mayor interés en el control de la diabetes. Por otro lado, la presencia del compuesto **24** le da a las hojas una mayor riqueza en el contenido de productos naturales con actividad antidiabética. (Skopinski *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008).

7.2.2.3. Establecimiento de la composición química de la infusión de hojas de *H. latiflora* y *H. standleyana*, mediante CLAR

La mayoría de los componentes de las infusiones fueron identificados a partir del enriquecimiento con los diversos estándares ensayados, así como la comparación de sus tiempos de retención con aquellos de los estándares (Figura 35).

En el caso de la infusión de *H. standleyana* (HHS), el componente principal fue la 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**5**), compuesto que presenta un efecto hipoglucemiante significativo (Guerrero-Analco *et al.*, 2007). Sin embargo, en el caso de la infusión de las hojas de *H. latiflora*, aunque se identificó una mezcla de 4-fenilcumarinas, el componente principal fue el ácido clorogénico (**26**). Como se ha mencionado con anterioridad, el compuesto **26** tiene diversas propiedades antioxidantes y antidiabéticas (McCarty, 2005; Matsui *et al.*, 2006; Bassoli *et al.*, 2008; Scherer y Godoy, 2008). La compleja mezcla de productos naturales con potencial antidiabético identificados en HHL, permite explicar la eficacia terapéutica observada en los ensayos farmacológicos. La composición química de las hojas de *H. latiflora* en su conjunto, permite proponer a esta parte de la planta, como un sustituto al uso de la corteza, ya que presenta una mayor complejidad y un aporte mayor de compuestos con actividad antidiabética.

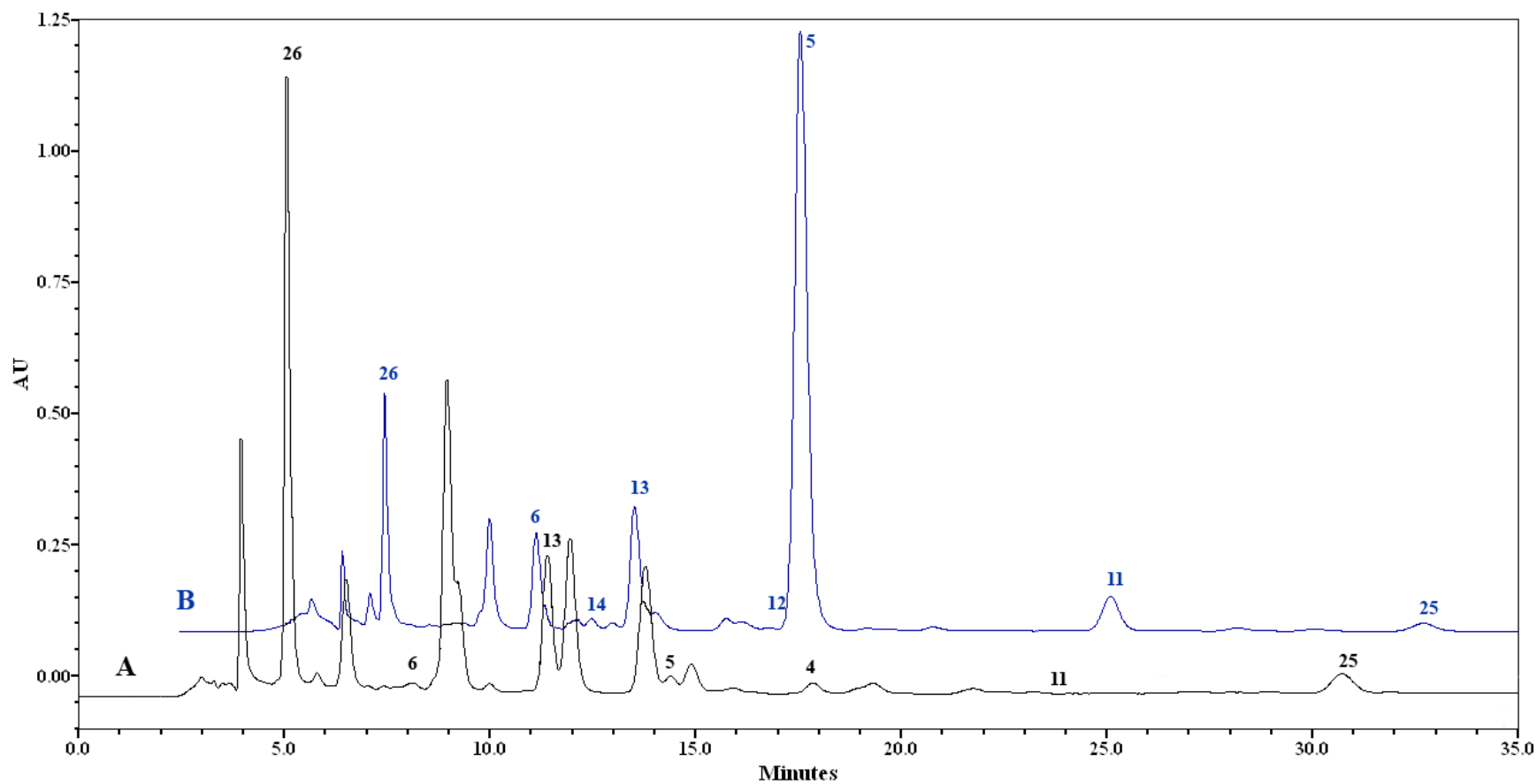


Figura 35. Cromatograma de las infusiones de las hojas de *H. latiflora* (A) y *H. standleyana* (B). (A) Identificación del pico (tiempo de retención en minutos, Rt): 4 (17.94); 5 (14.36); 6 (8.30); 11 (23.41); 13 (11.33); 25 (30.82) y 26 (5.04). (B) Identificación del pico (tiempo de retención en minutos, Rt): 5 (14.2); 6 (8.77); 11 (23.54); 12 (14.44); 13 (11.17); 14 (10.11); 25 (30.35) y 26 (5.09).

El estudio de las hojas de *H. latiflora* permitió establecer los parámetros referentes a la identidad, composición, inocuidad y eficacia de esta planta medicinal de tan amplio uso en la medicina tradicional mexicana.

No obstante el menor valor de la DL₅₀ del extracto íntegro de la hojas con respecto al del extracto de la corteza de *H. latiflora* (DL₅₀= 1668 mg/kg vs. 2852 mg/kg) (Déciga-Campos *et al.*, 2007), el extracto se puede catalogar como no tóxico de acuerdo con los estándares de Lorke (Lorke, 1983).

La actividad farmacológica que presenta el extracto de hojas de *H. latiflora*, principalmente en animales diabéticos, está directamente relacionada a la composición química detectada. Se observó una actividad antidiabética significativa: el efecto antihiper glucémico, actividad biológica no descrita para la corteza de la especie, ni para otras rubiáceas del complejo copalchi, y el efecto hipoglucemiante que presentaron las hojas de *H. latiflora*, consolidó la eficacia pre-clínica de la rubiácea para el control de la diabetes.

Los efectos hipoglucemiante e antihiper glucémico están relacionados con la mezcla de productos naturales con propiedades antidiabéticas presentes en el extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora*. En primer lugar, las bien estudiadas 4-fenilcumarinas (Guerrero-Analco *et al.*, 2005; 2007), entre ellas la 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (**25**), un compuesto novedoso. Además se identificaron el ácido ursólico (**24**) y el ácido clorogénico (**26**). Se han analizado las propiedades antidiabéticas para el ácido ursólico (**24**) (Skopinski *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008); así como las antidiabéticas y antioxidantes del ácido clorogénico (**26**) (McCarty, 2005; Matsui *et al.*, 2006; Bassoli *et al.*, 2008; Scherer y Godoy, 2008). Lo anterior, genera un mayor valor sobre la composición química de la corteza, ya que se tiene una combinación de compuestos con diversas actividades antidiabéticas que incrementan la importancia de las hojas.

En cuanto a la eficacia pre-clínica, la prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) permitió describir la actividad antihiper glucémica del extracto íntegro de las hojas de *H. latiflora*. En ratones normoglucémicos no se observó ningún efecto antihiper glucémico, pues el pico postprandial nunca se redujo (Tabla 2, Figura 13). En contraste con los

ratones diabéticos, se observó una importante actividad antihiper glucémica, característica no descrita con anterioridad para la planta (Tabla 3, Figura 14).

En relación al ensayo hipoglucemiante agudo realizado en ratones, estos resultados fortalecieron la hipótesis planteada al inicio del presente proyecto de investigación, ya que se corroboraron las propiedades antidiabéticas de las hojas de *H. latiflora*. El efecto hipoglucemiante del extracto en la dosis de 500 mg/kg se presentó a partir de las 1.5 horas y se mantuvo durante todo el ensayo; además esta disminución alcanzó más de un 40% en relación al control (Tabla 5, Figura 16).

El estudio anatómico y estructural de la hoja de *H. latiflora*, tanto a nivel microscópico como macroscópico, permitió reconocer características que la separan de *H. standleyana*. Aunado a los estudios botánicos, el establecimiento de compuestos marcadores, como el ácido desoxicordifolínico (**19**) y el conocimiento de la composición química permiten dar una identidad global a la droga cruda, pieza fundamental en el establecimiento de una monografía.

Con los resultados de los estudios químico y farmacológico de las hojas de *H. latiflora* se puede, sin duda alguna, relacionar el complejo y variado perfil químico, con la actividad antidiabética, tanto en su efecto antihiper glucémico como en su acción hipoglucemiante. Es importante hacer hincapié en que los efectos antidiabéticos, principalmente la actividad hipoglucemiante, se presenta sólo en animales diabéticos. Todos estos resultados permiten proponer el uso de las hojas como un potencial sustituto de las cortezas y, por otro lado, se genera una estrategia que permite la conservación de tan importante recurso natural nacional.

8. Conclusiones

- Se describieron parámetros de identidad para las hojas de *H. latiflora*. A nivel químico, el ácido desoxicordifolínico (**19**) puede proponerse como el compuesto marcador. A nivel anatómico e histológico se identificaron las características diagnósticas de la especie que permitirían diferenciar la especie de posibles adulterantes, tal es el caso de los estomas paracíticos, la presencia de domacios, la cutícula en la hoja, entre otros.
- La composición química de las hojas de *H. latiflora* está formada por una serie de 4-fenilcumarinas, destacando el compuesto novedoso 5-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (**25**). Por otro lado, la presencia de los ácidos ursólico (**24**) y clorogénico (**26**) incrementan el potencial antidiabético.
- La toxicidad del extracto orgánico de las hojas de *H. latiflora* (DL_{50} = 1668 mg/kg) se encuentra dentro de los parámetros que permiten considerar a la droga cruda como no tóxica.
- El extracto orgánico de las hojas de *H. latiflora* presentó una actividad antidiabética significativa, tanto antihiper glucémica como hipoglucemiante. La eficacia terapéutica está directamente relacionada a su diversidad en la composición química.
- Se generó la información necesaria para escribir la monografía tipo OMS de *H. latiflora*, la cual será publicada en un futuro próximo.
- Se puede proponer el uso de las hojas como un potencial sustituto de las cortezas de *H. latiflora*, generando así una estrategia que permita la conservación de este recurso tan importante.

9. Perspectivas

- El establecimiento de las condiciones para generar los cromatogramas en CLAR permitió la identificación de la mayoría de los compuestos, pero restan varios compuestos de interés que deben ser aislados e identificados.
- La comparación de la composición química en distintas estaciones del año y diversos sitios de colecta del material vegetal permitirá entender mejor la dinámica química y fisiológica de *H. latiflora*.
- Realizar un estudio fenético de los caracteres morfológicos de las especies del género *Hintonia*, así como en individuos de *H. latiflora* de distintas poblaciones, cuya información permitiría una caracterización diagnóstica y así la comparación intra e interespecífica.
- Realizar estudios a nivel molecular que generen un código de identificación genético de la especie, "barcode", teniendo así otro parámetro de identidad para *H. latiflora*, dando luz a la problemática taxonómica que sufre el género.
- Una mayor cantidad de pruebas preclínicas y clínicas son necesarias para poder implementar con seguridad la sustitución de las hojas por la corteza en las formulaciones herbarias terapéuticas.

10. Bibliografía

A

- Akerele, O. 1988. Medicinal plants and primary health care: An agenda for action. *Fitoterapia*. **59**, 355-363.
- American Diabetes Association (ADA). 2007. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Position statement. *Diabetes Care*. **30**, S42-S47.
- *Anales del Instituto Médico Nacional (AIMN)*. 1984. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. 218.
- Aquino, R., D'Agostino, M., De Simone, F., y Pizza, C. 1988. 4-aryl coumarin glycosides from *Coutarea Hexandra*. *Phytochemistry*. **27**, 1827-1830.
- Arévalo, R. 1897. Estudio sobre la Corteza de Copalchi. *Nueva recopilación de Monografías Mexicanas y Tesis Inaugurales de Materia Médica*. Folletín del tomo II de los Anales del Instituto Médico Nacional. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. 66-70.
- Argotte-Ramos R., Ramírez-Ávila, G., Rodríguez-Gutiérrez, M.C., Ovilla-Muñoz, M., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M., González-Cortázar, M., Álvarez, L. 2006. Antimalarial 4-phenylcoumarins from the stem bark of *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*. **69**, 1442-1444.
- Argueta, A. V., Cano, L. M., y Rodarte, M. E. (editores) 1994. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista. México.

B

- Barceló, A., Aedo, C., Rajpathak, S., Robles, S. 2003. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bulletin WHO*. **81**, 19-27.
- Bassoli, B.K., Cassolla, P., Borba-Murad, G.R., Constantin, J., Salgueiro-Pagadigorria, C.L., Bazotte, R.B., Ferreira da Silva, R.S., Medri de Souza, H. 2008. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochemistry and Function*. **26**, 320-328.
- Bastien, M. 1961. Recherches sur les Copalchis, drogues hypoglycémiantes et en particulier sur le *Coutarea latiflora* DC (Rubiaceae). Dissertation. Faculté de Pharmacie de l'Université. Francia.
- Bejar, E., Reyes-Chilpa, R., Jiménez-Estrada, M. 2000. Bioactive compounds from selected plants used in XVI century Mexican traditional medicine. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier Science. **24**, 799-844.
- Bnouham, M., Ziyyat, A., Mekhfi, H., Tahri, A., Legssyer, A. 2006. Medicinal plants with potential antidiabetic activity: a review of ten years of herbal medicine (1990 - 2000). *International Journal of Diabetes and Metabolism*. **14**, 1-25.
- Borges de Melo, E., da Silveira Gomes, A., Carvalho, I. 2006. α - and β -glucosidases inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*. **62**, 10277-10302.
- Borhidi, A. 2006. *Rubiaceas de México*. Akadémiai Kiadó. Hungría. 340 p.

- Bremer, B., Andreasen, K., Olsson, D. 1995. Subfamilial and tribal relationship in the Rubiaceae based on rbcL sequence data. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **82**, 383-397.
- Bye, R.A. 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany*. **40**, 103-124.
- Bye, R., Linares, E., Flores, P. 1992. *Selección de plantas medicinales de México*. Noriega Editores. México. 125 p.
- Bye, R.A. 2007. Investigación acerca del texto: Un estudio de la flora y sus usos en la Sierra Tarahumara. Chihuahua, México. 1885 por Dr. Edward Palmer.

C

- Camacho, M.R. 1990. Nuevos metabolitos secundarios de la *Hintonia latiflora* (Sesse et Mociño ex D.C.) y aislamiento de compuestos bioactivos del *Teloxys graveolens* (Wild) W. A. Weber. Tesis de Maestría (Farmacia-Química Farmacéutica), Facultad de Química, U. N. A. M. México.
- Cañigüeral, S., Vila, R. 2003. La fitoterapia racional. *Fitoterapia: vademécum*. 4° ed. Ed. Masson. España. 15-27.
- Cheng, A.Y., Fantus, G. 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*. **172**, 213-226.
- Cortéz-Gallardo, V. 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*. **15**, 123-136.

D

- Davis, S.N., Granner, D.K. 2001. Insulina, hipoglicemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endocrino. *Goodman & Gilman: las bases farmacológicas de la terapéutica*. 10° ed. Mc Graw Hill. Vol. II. **61**, 1697-1733.
- Déciga-Campos, M., Guerrero-Analco, J.A., Quijano, L., Mata, R. 2006. Antinociceptive activity of 3-O-β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae). *Pharmacology, biochemistry and behavior*. **83**, 342-348.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Ángeles-López, G.E., Navarrete, A., Mata, R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **110**, 334-342.
- Díaz, J.L. (editor). 1976. *Usos de las plantas medicinales de México: monografías científicas I y II*. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. México. 358 y 329 p.
- Dibble, C.E., Anderson, A.J.O. 1963. History of the things of New Spain: Book 11, Earthly things. The University of Utah. E.U.A.

G

- Gao, D.; Li, N.; Li, Q.; Li, J.; Han, Z.; Fan, Y.; Liu, Z. 2008. Study of the extraction, purification and antidiabetic potential of ursolic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *Therapy*. **5**, 697–705.
- Gentry, H.S. 1942. *Río Mayo Plants: a study of the flora and vegetation of the Valley of the Río Mayo, Sonora*. Carnegie Institution of Washington. E.U.A. 328 p.
- Gentry, H.S. 1962. The Warihío Indians of Sonora-Chihuahua: an ethnographic survey. *Bureau of American Ethnology Bulletin*. **186**, 61-144.
- Gómez Peralta, F. 2005. Diabetes mellitus tipo 2. Departamento de endocrinología y nutrición. Clínica universitaria de Navarra.
- Guerrero-Analco, J., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R. 2007. Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry*. **68**, 2087–2096.
- Guerrero-Analco, J.A., Hersch-Martínez, P., Pedraza-Chaverri, A., Navarrete, A., Mata, R. 2005. Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Medica*. **71**, 1099-1105.
- *Guía México Desconocido: plantas medicinales*. 2001. Editorial México Desconocido. México. 9, 37–38, 59–60.

H

- Hernández-Avila, M., Olaíz-Fernández, G. 2002. La diabetes y el mexicano: un reto para la salud pública. *Ciencias*. **58**, 8-16.
- Hernández, F. 1615. *Historia de las plantas de Nueva España*. Tomo II, Libros 3 y 4. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 1943. Imprenta Universitaria. México.

K

- Korec, R., Heinz-Sensch, K., Zoukas, T. 2000. Effects of the neoflavonoid coutareagenin, one of the antidiabetic active substances of *Hintonia latiflora*, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Arzneimittelforschung: Drug Research* **50**, 122-128.
- Korecova, M., Hladicova, M., Korec, R. 2006. *Hintonia latiflora* in patients with type 2 diabetes: a long-term study. *Zeitschrift für Phytotherapie*. **27**, 272-278.

L

- Landa, E. 1913. Estudio del Copalchi de Jojutla (*Coutarea latiflora*). *Anales del Instituto Médico Nacional: tomo XII, número 4*. Secretaría de Instrucción Pública y Bellas Artes. 146-158.

- Loaeza, A. 1906. Informes de trabajos realizados en el mes de enero al mes de noviembre de 1906. *Anales del Instituto Médico Nacional: tomo VIII*. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento .408, 510.
- Loaeza, A. 1907. Informes de trabajos realizados del mes de enero al mes de noviembre de 1907. *Anales del Instituto Médico Nacional: tomo IX*. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. 178, 246.
- Loaeza, A. 1908. Informes de los trabajos realizados del mes de enero al mes de unio de 1908. *Anales del Instituto Médico Nacional: tomo X*. Secretaría de Instrucción Pública y Bellas Artes. 154-155.
- López Curto, L., Márquez Guzmán, J., Murguía Sánchez, G. 2005. *Técnicas para el estudio en angiospermas: libro de laboratorio*. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México. 178 p.
- López-García, V. 2002. El alcance y la fuerza integradora de la medicina naturista en la interpretación y curación de las enfermedades crónico-degenerativas. Discurso Premio AEMN 2002. Asociación Española de Médicos Naturistas. España.
- Lorke, D. 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*. **54**, 275-287.
- Lozoya, X. 1984. *Plantas y luces en México: la Real Expedición Científica a Nueva España (1787-1803)*. Ediciones del Serbal. España. 224 p.
- Lozoya, X. 1984. *Bibliografía básica sobre herbolaria medicinal de México*. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. México. 86 p.

M

- Martin, P.S., Yetman, D., Fishbein, M., Jenkins, P., Van Devender, T.R., Wilson, R.K. 1998. *Gentry's Río Mayo Plants : the tropical deciduous forest & environs of northwest Mexico*. The Southwest Center Series. The University of Arizona Press. E.U.A.
- Martínez, M. 1989. *Las plantas medicinales de México*. Ed. Botas. México.656 p.
- Masiello, P. Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., Ribes, G. 1998. Experimental NIDDM: Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. **47**, 224-229.
- Mata R., Del Rayo Camacho, M., Cervera, E., Bye, R., Linares E. 1990. Secondary metabolites form *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **29**, 2037-2040.
- Mata, R., Camacho, M.R., Cervera, E., Bye, R., Linares, E. 1990. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **29**, 2037-2040.
- Mata, R., Del Rayo Camacho, M., Mendoza, S., Del Carmen Cruz, M. 1992. A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **31**, 3199-3201.
- Mata, R. 1993. Estudios químicos y aspectos biológicos de algunas plantas usadas en la medicina tradicional de México. *La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana*. Secretaría de Salud. México. 143-156.
- Mata, R., Acevedo, L., Méndez-Bautista, D.I., Guerrero-Analco, J.A., Rivero, Rodríguez, J.M. 2008. Development and validation of Liquid Chromatography Method for quantification of the active markers of *Hintonia standleyana* and *Hintonia latiflora* crude drugs. *Pharmaceutical Biology*. **46**, 105-110.

- Matsui, T., Ogunwande, I. A., Abesundara, K. J. M., Matsumoto, K. 2006. Anti-hyperglycemic Potential of Natural Products. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. **6**, 349–356.
- McCarty, M.F. 2005. Nutraceutical resources for diabetes prevention – an update. *Medical Hypotheses*. **64**, 151-158.
- McVaugh, R. 2000. *Botanical Results of the Sessé & Mociño expedition (1787-1803): a guide to relevant scientific names of plants*. Hunt Institute for Botanical Documentation. 226, 463, 471.
- Méndez, I. 1976. *Comparación de las medias de población*. Comunicaciones técnicas. Vol. 3. No. 17. Serie azul: monografías. IIMAS, UNAM. México.
- Méndez, I. 1990. *El protocolo de investigación: lineamientos para su elaboración y análisis*. 2° ed. Ed. Trillas. México. 210 pp.
- Mociño, J.M. 1802. Extracto del discurso que dixo D. Joseph Mariano Mociño en la apertura de las lecciones de botánica en México. *Anales de Historia Nacional 1799 – 1804: tomo III, número 15*. Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. 288-296.
- Motley, T. J., Wurdack, K. J., y Delprete, P. G. 2005. Molecular systematics of the Catesbaceae-Chiococceae complex (Rubiaceae): flower and fruit evolution and biogeographic implications. *American Journal of Botany*. **92**, 316–329.

N

- Noster, S. 1992. Untersuchung der Copalchi-Rinden unter besonderer Berücksichtigung von *Coutarea hexandra* (Jacq.) Schum., *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. & Schult., *Exostema mexicanum* Gray und *Hintonia latiflora* (Sessé & Mociño ex DC.) Bullock. Doktorgrades Dissertation. Universität Hamburg, Alemania.
- Noster, S., y Kraus, L. 1990. In vitro antimalarial activity of *Coutarea latiflora* and *Exostema caribaeum* extracts on *Plasmodium falciparum*. *Planta Medica*. **56**, 63-65.

O

- Ochoterena-Booth, H. 2000. Systematics of *Hintonia* Bullock and the *Portlandia* complex (Rubiaceae). PhD Dissertation. Cornell University, Ithaca, New York, E.U.A.
- Oh, C.J., Park, C.I., Yang, C.H., Park, J.W. 2007. Ursolic acid regulates high glucose-induced apoptosis. *Free Radical Research*. **41**, 638 –644.
- Organización Mundial de la Salud. 2000. *Situación reglamentaria de los medicamentos: una reseña mundial*. OMS 52 p.

P

- Permut, A.M. 2005. Genetic epidemiology of diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. **115**, 1431-1439.
- Pinto, A., Capasso, A., Sorrentino, L. 1997. Experimental animal studies on the hypoglycemic effects of a copalchi extract. *Drug Research*. **47**, 829-833.

R

- Reguero, M.T., Mata, R., Bye, R., Linares, E., Delgado, G. 1987. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine: cucurbitacines from *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*. **50**, 315-316.
- Reher, G., y Kraus, L. 1984. New neoflavonoids from *Coutarea latiflora*. *Journal of Natural Products*. **47**, 172-174.
- Rojas, A., Hernández, L., Pereda-Miranda R., Mata, R. 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **35**, 275-283.

S

- Sahagún, B. (1540 - 1585) 1988. *Historia general de las cosas de Nueva España: primera versión íntegra del texto castellano del manuscrito conocido como Códice Florentino*. Introducción, glosario y notas de Alfredo López Austin y Josefina García Quintana. Alianza Editorial. España.
- Scherer, R.; Godoy, H. T. 2008. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*. **112**, 654-658.
- Skopinski, P., Szafilik, J., Duda-Krol, B., Nartowska, J., Sommer, E., Chorostowska-Wynimko, J., Demkow, U., Skopinska-Rozewdka, E. 2004. Suppression of angiogenic activity of sera from diabetic patients with non-proliferative retinopathy by compounds of herbal origin and sulindac sulfone. *International Journal of Molecular Medicine*. **14**, 707-711.
- Stranczinger, S., Szentpéteri, J.L., Borhidi, A. 2006. Sequence differentiation between some DNA regions of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana*. *Acta Botanica Hungarica*. **48**, 435-440.

T

- Terres, J. 1913. Informe rendido por el Director del Instituto a la Secretaría de Instrucción Pública y Bellas Artes de los trabajos realizados por el establecimiento del 1 de julio de 1911 al 31 de diciembre de 1912. *Anales del Instituto Médico Nacional: tomo XII, número 3*. Secretaría de Instrucción Pública y Bellas Artes. 104, 109, 118, 129.

V

- Vigilancia epidemiológica. 2004. Semana 21. Secretaría de Salud. México.

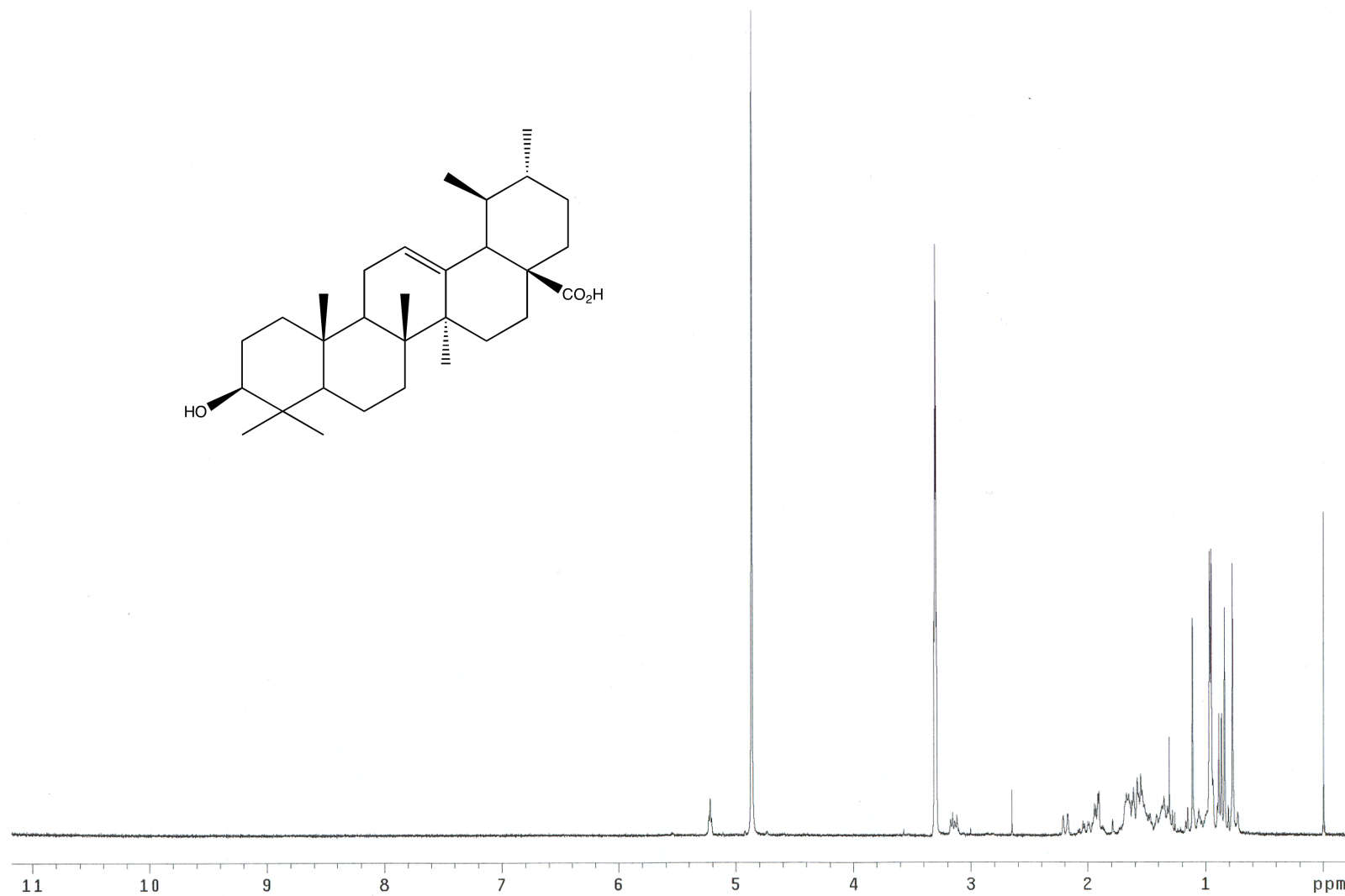
W

- Williamson, E. M., Opako, D. T., y Evans, F. J. 1996. *Pharmacological methods in phytotherapy research*. Volumen 1. Ed. John Wiley & Sons. E.U.A. 1-228.

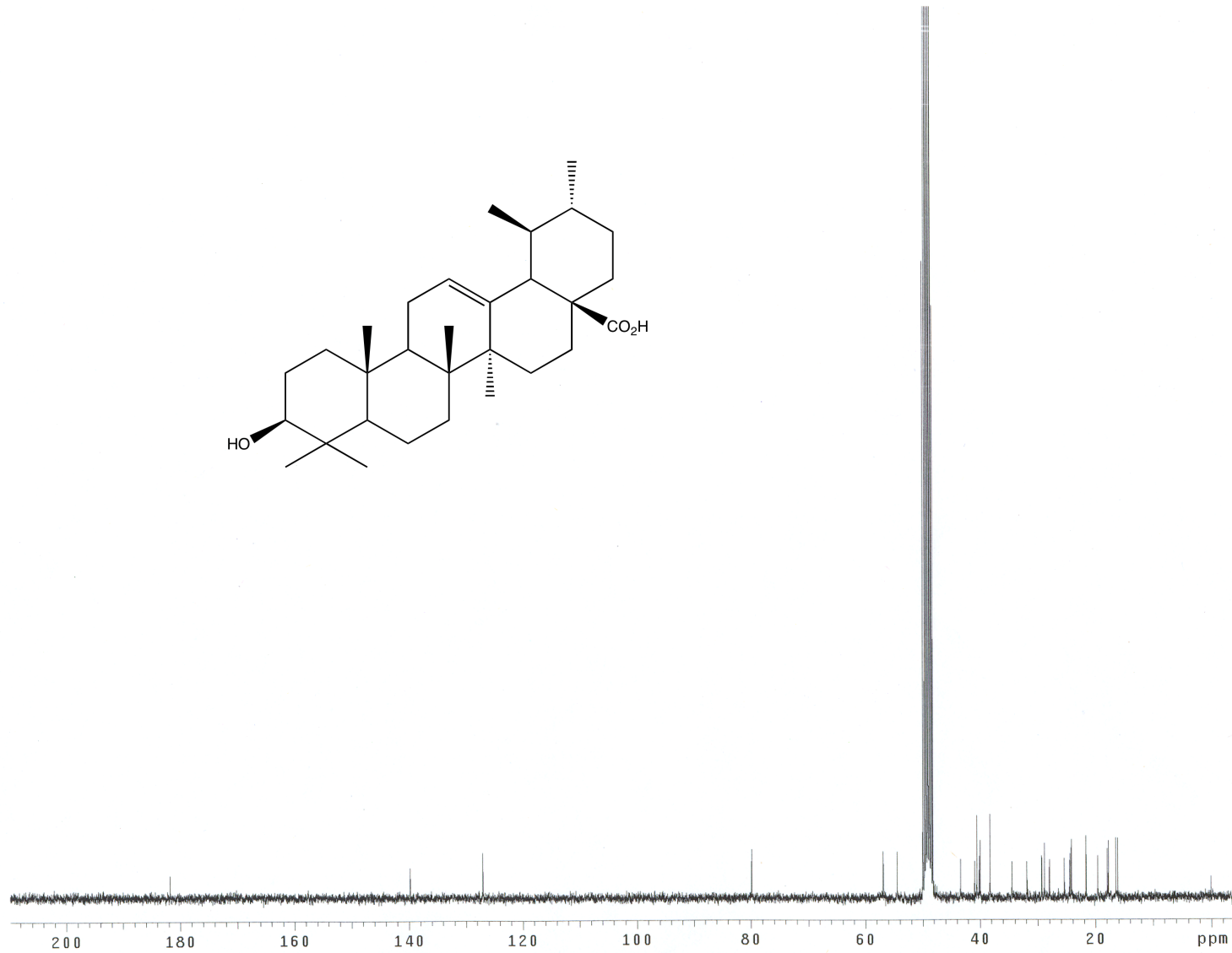
-
-
- World Health Organization. 1999. *WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume 1.* World Health Organization. Ginebra, Suiza.
 - World Health Organization. 2001. *WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume 2.* World Health Organization. Ginebra, Suiza.
 - World Health Organization. 2007. *WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume 3.* World Health Organization. Ginebra, Suiza.

Z

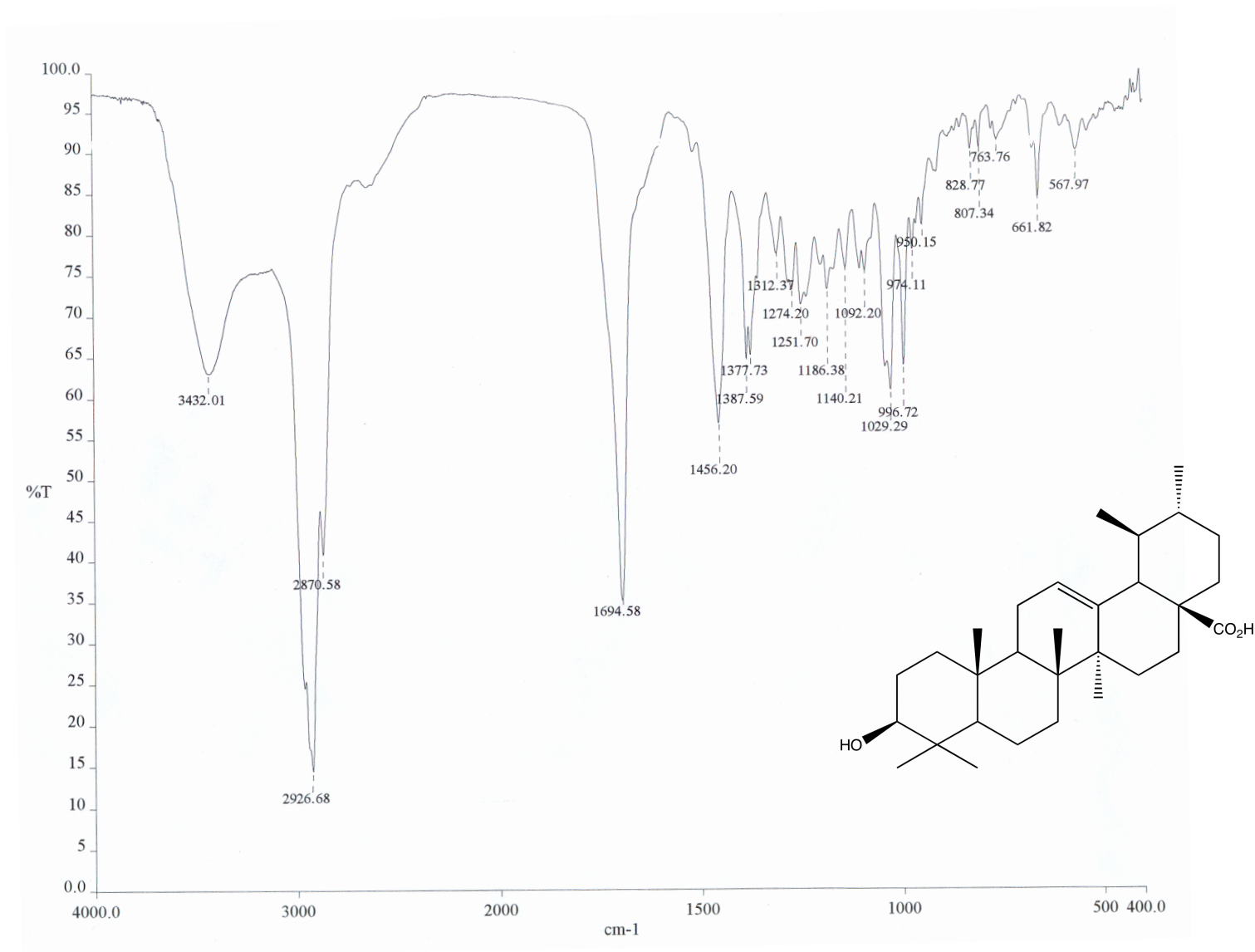
- Zhang, W., Hong, D., Zhou, Y., Zhang, Y., Shen, Q., Li, J., hu, L., Li, J. 2006. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1760; **10**: 1505 - 1512.



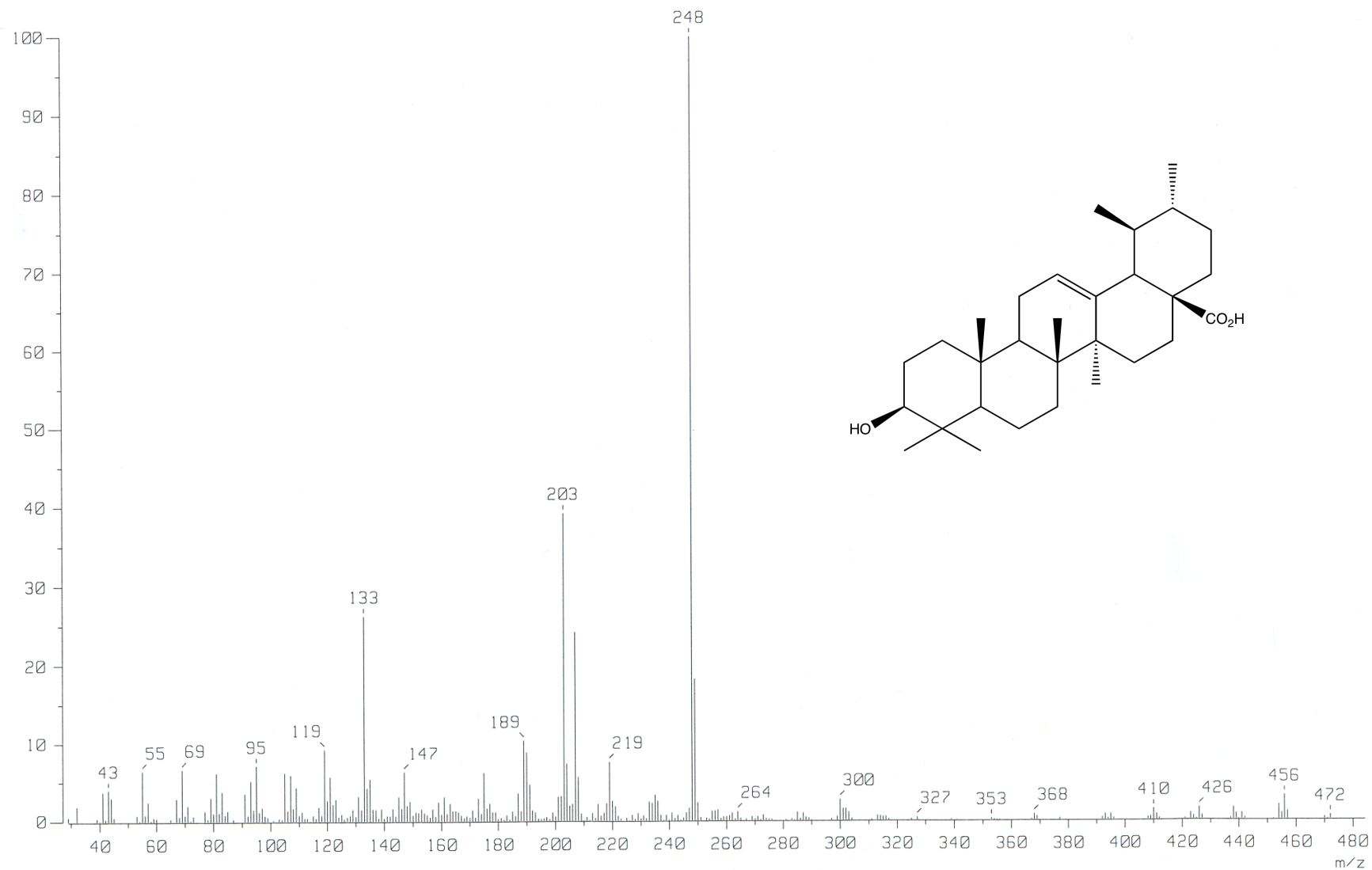
Espectro 1. Espectro de RMN ¹H del ácido ursólico (24)



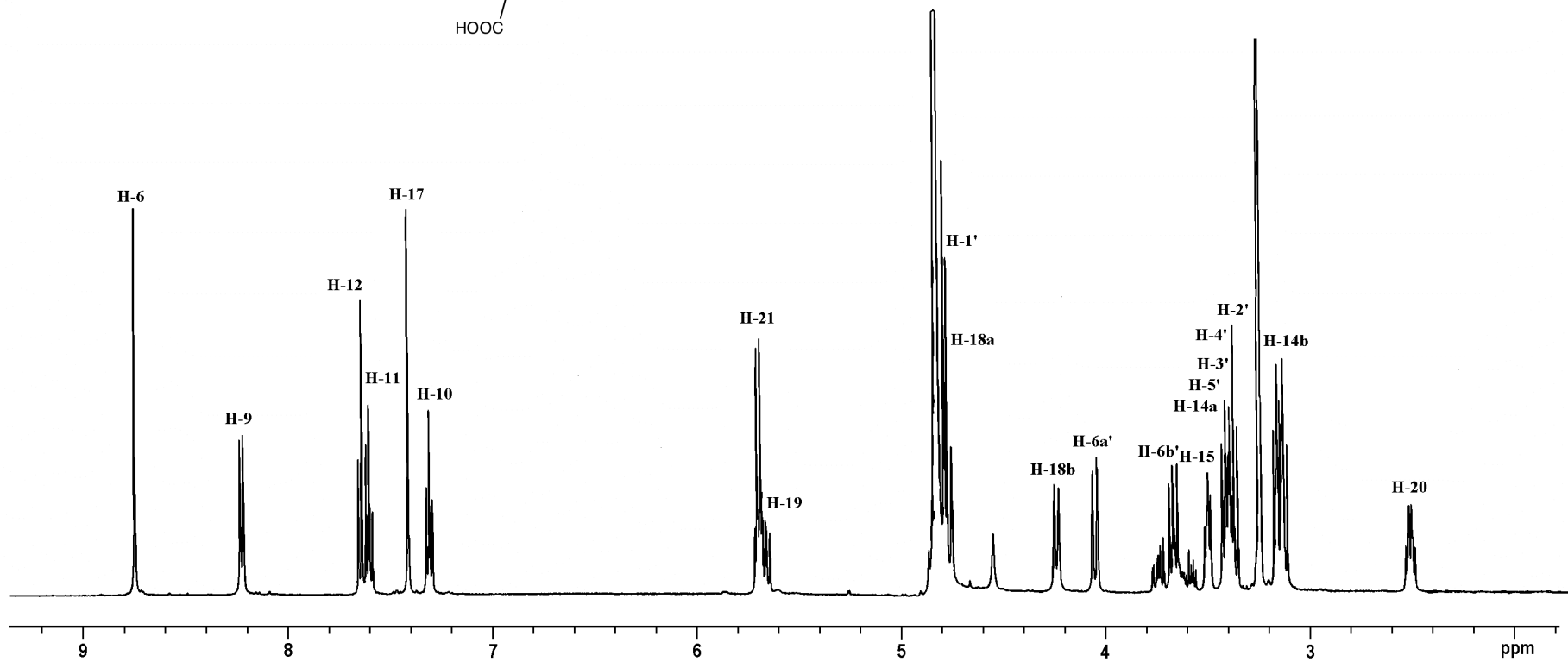
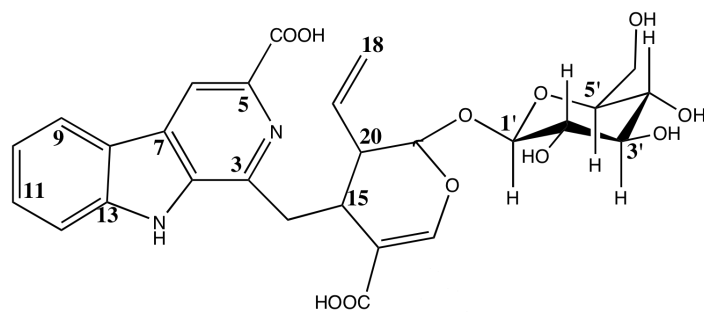
Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C del ácido ursólico (24)



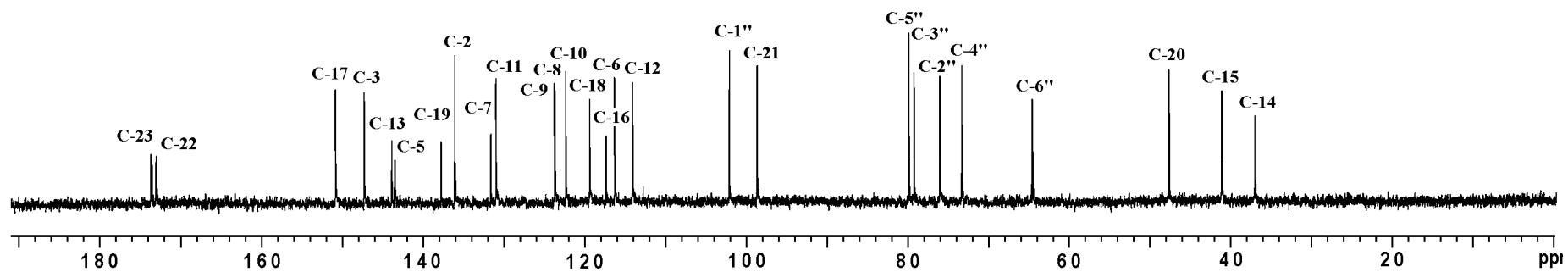
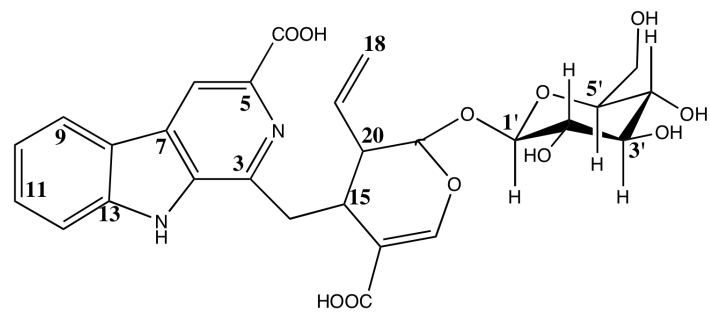
Espectro 3. Espectro IR del ácido ursólico (24)



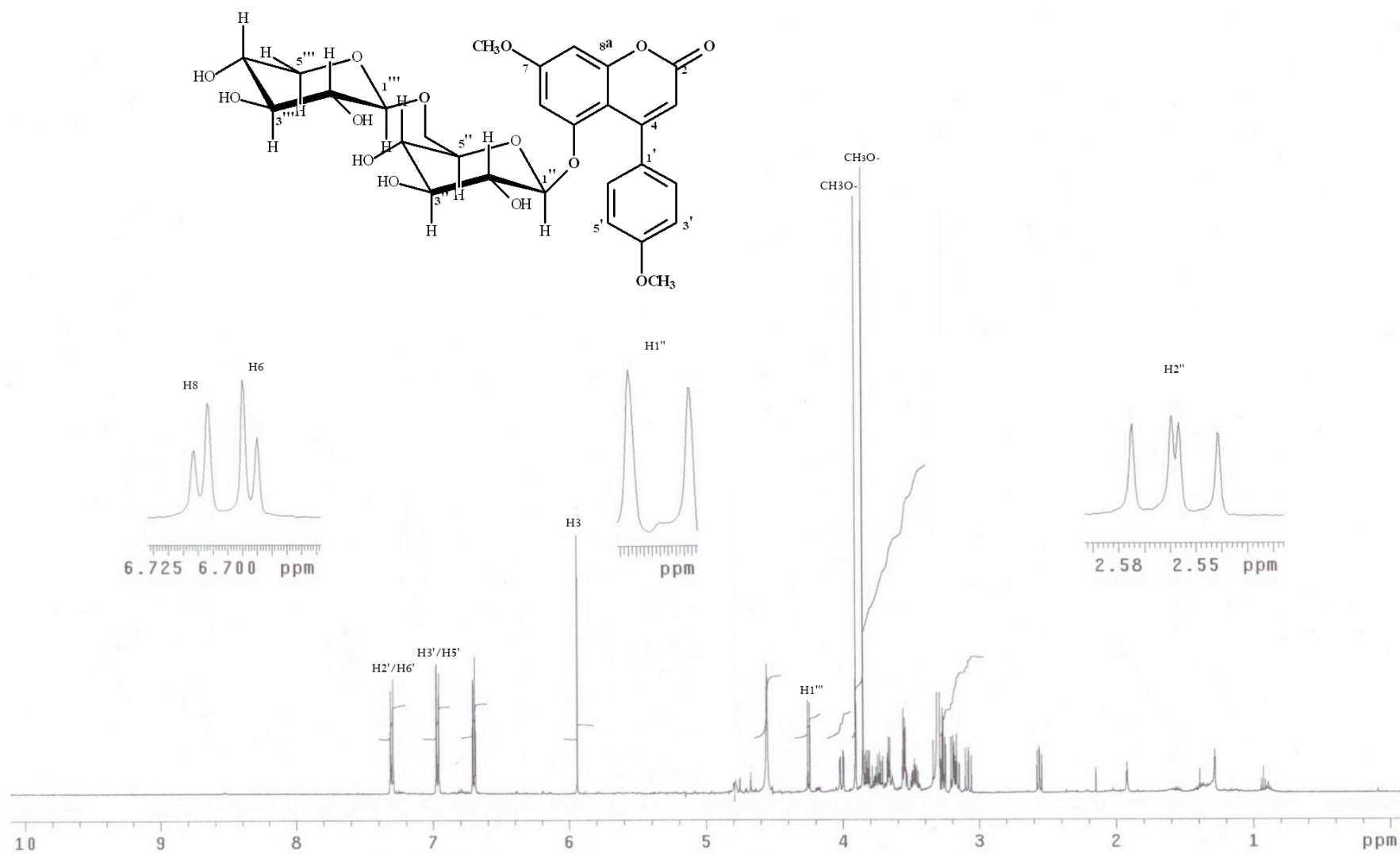
Espectro 4. Espectro de EM modalidad FAB+ del ácido ursólico (24)



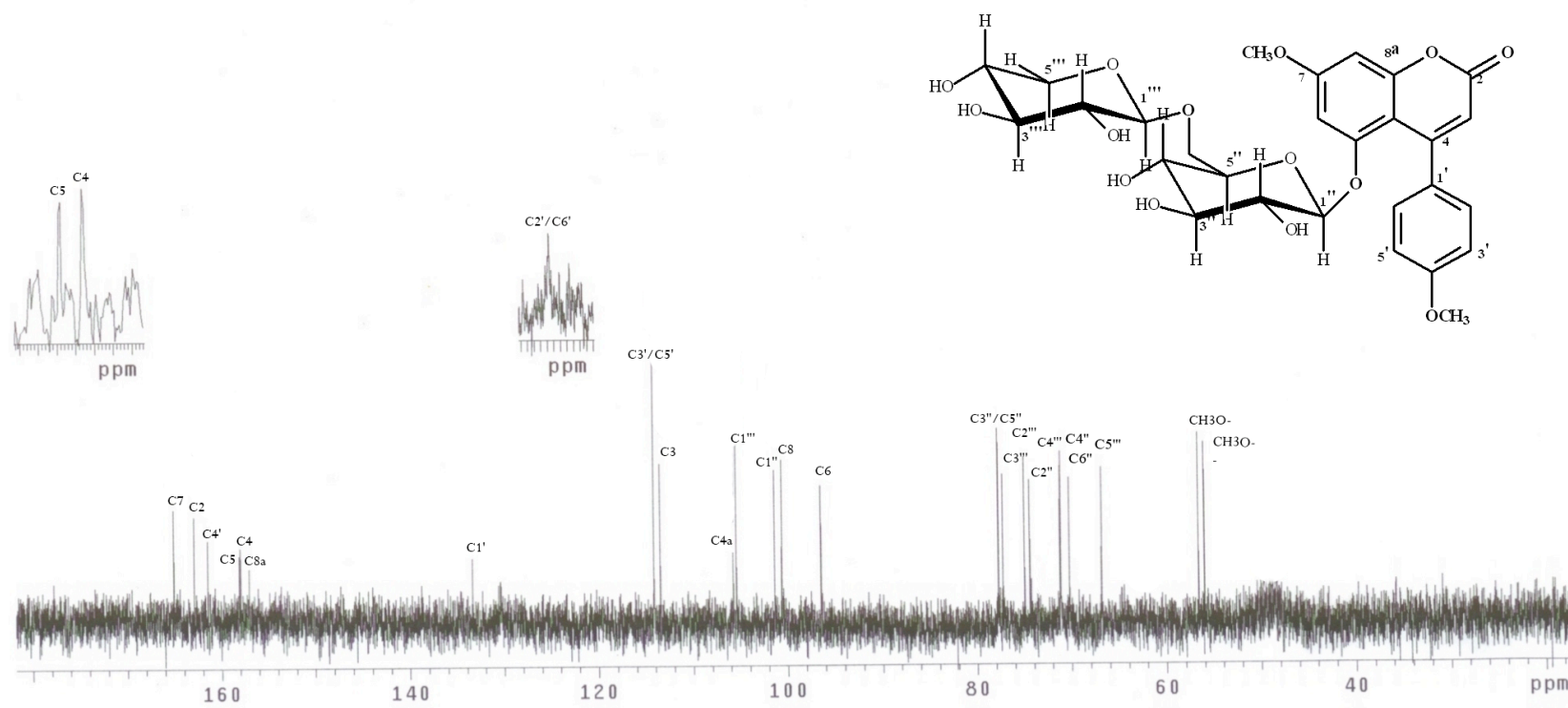
Espectro 5. Espectro de RMN ^1H del ácido desoxicordifolínico (19)



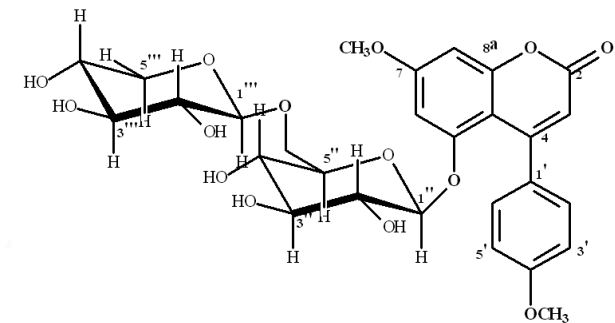
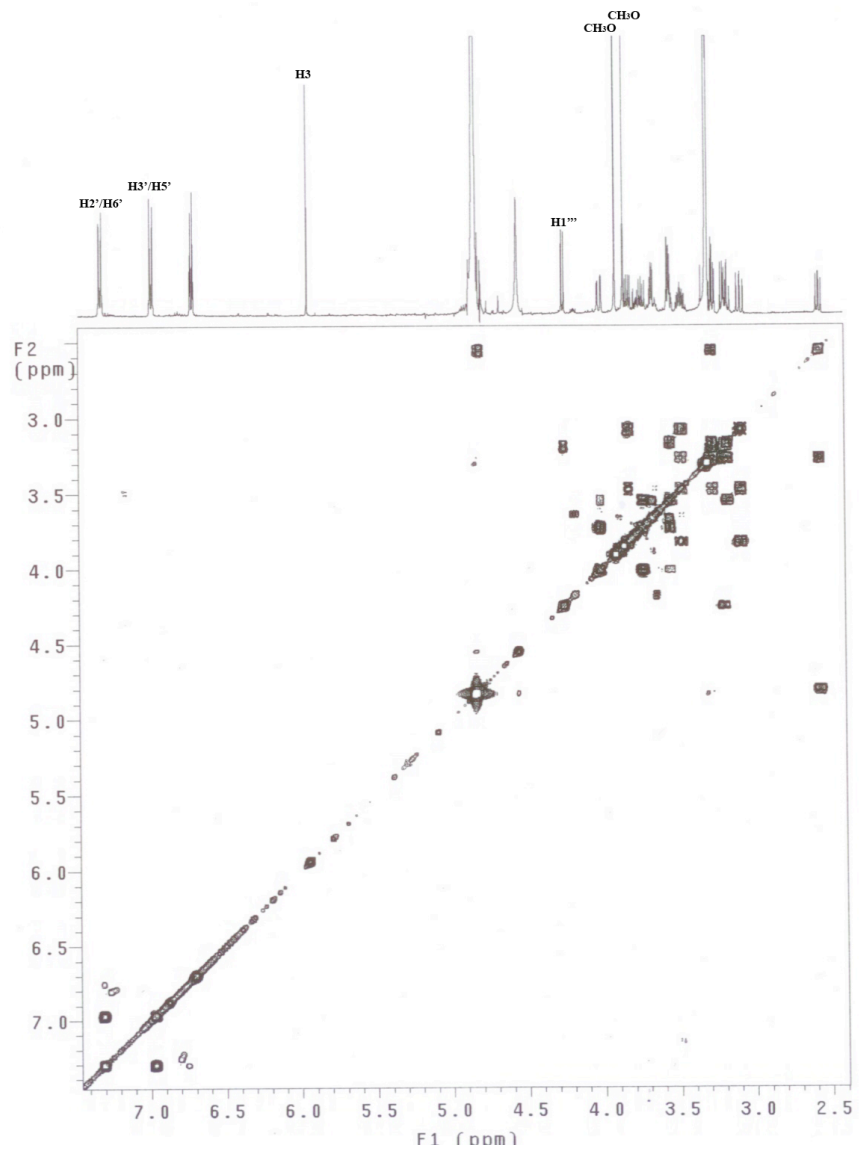
Espectro 6. Espectro de RMN ^{13}C del ácido desoxicordifolínico (19)



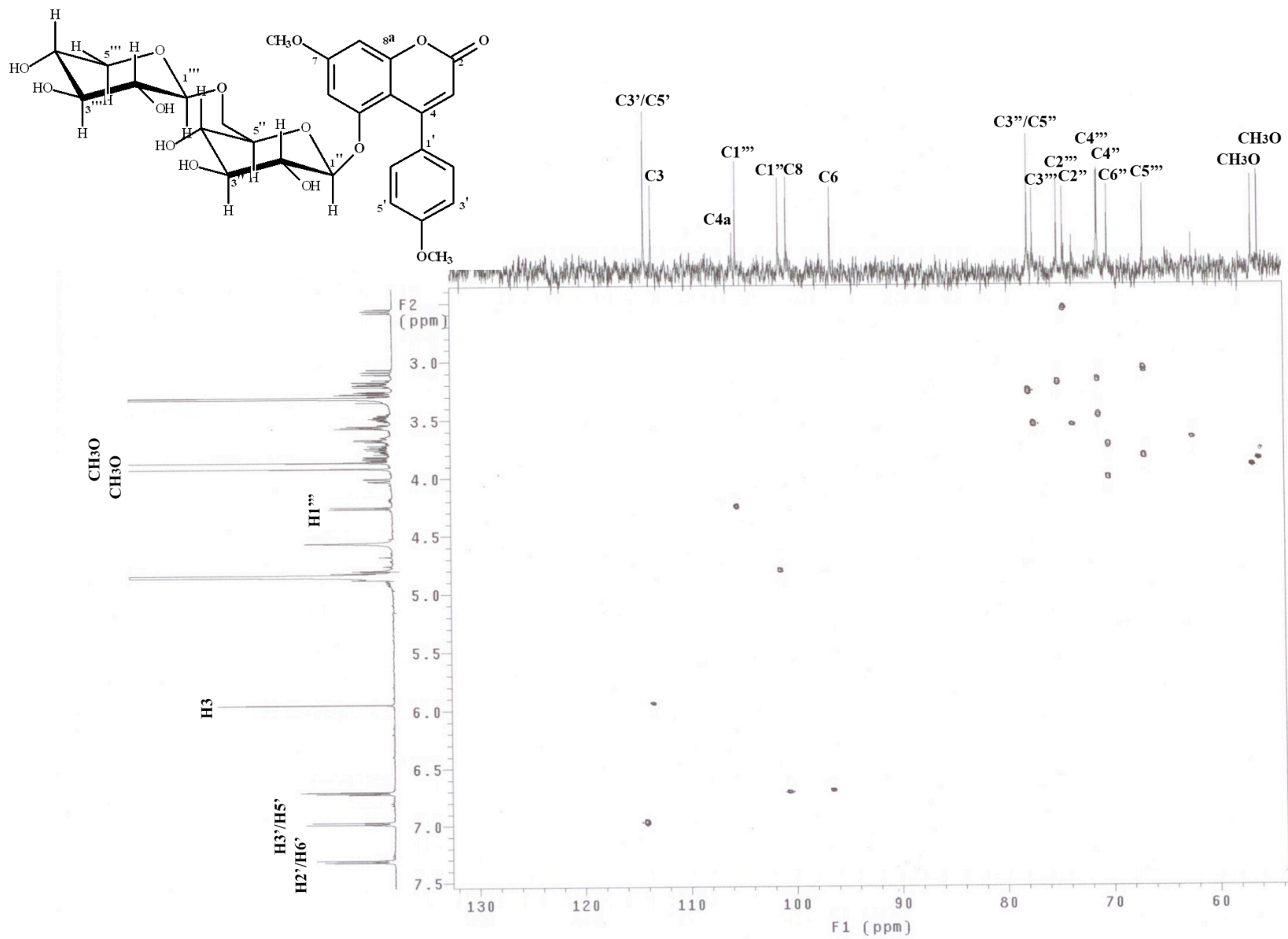
Espectro 7. Espectro de RMN ¹H de la 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)



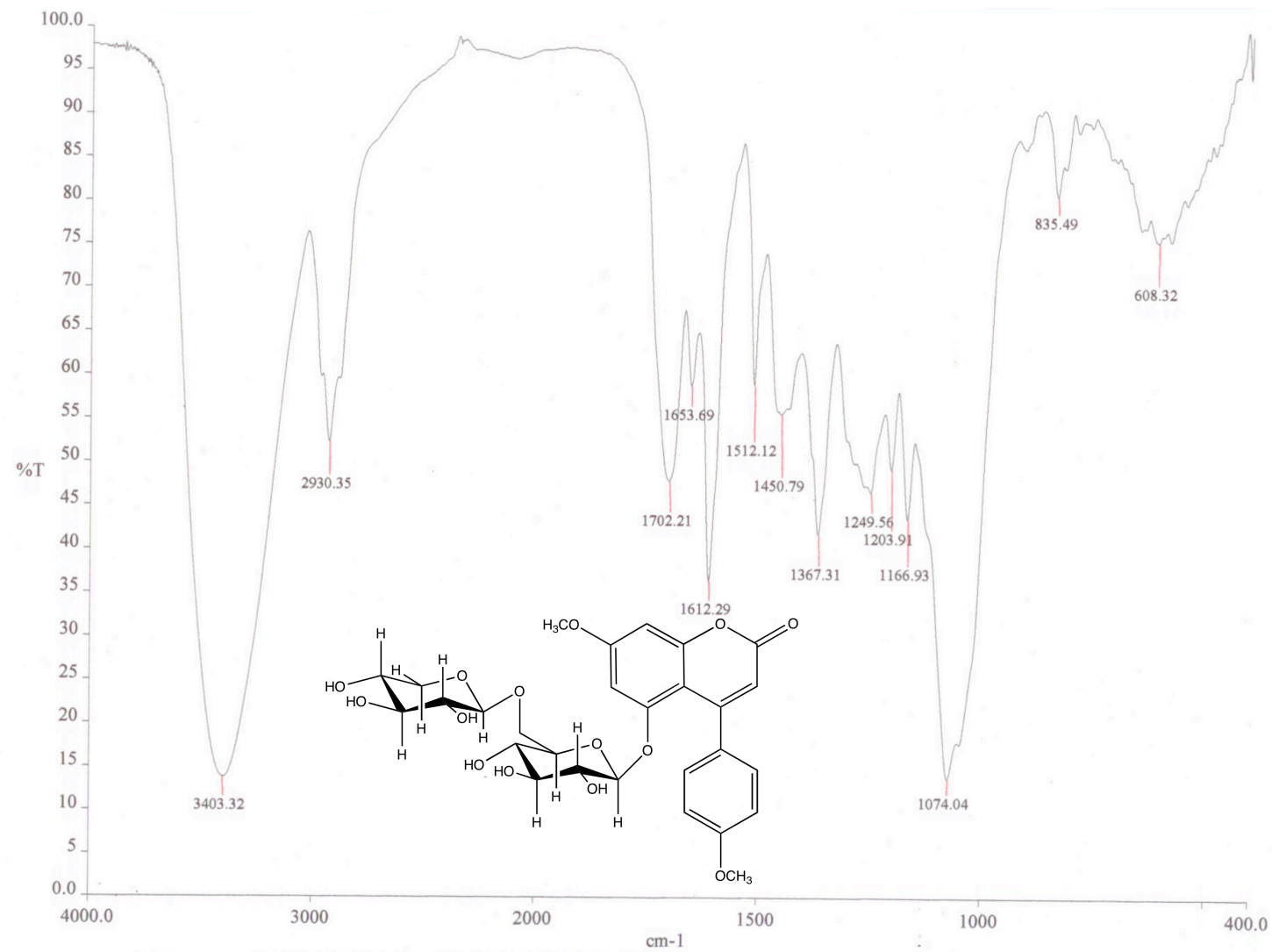
Espectro 8. Espectro de RMN ¹³C de la 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)



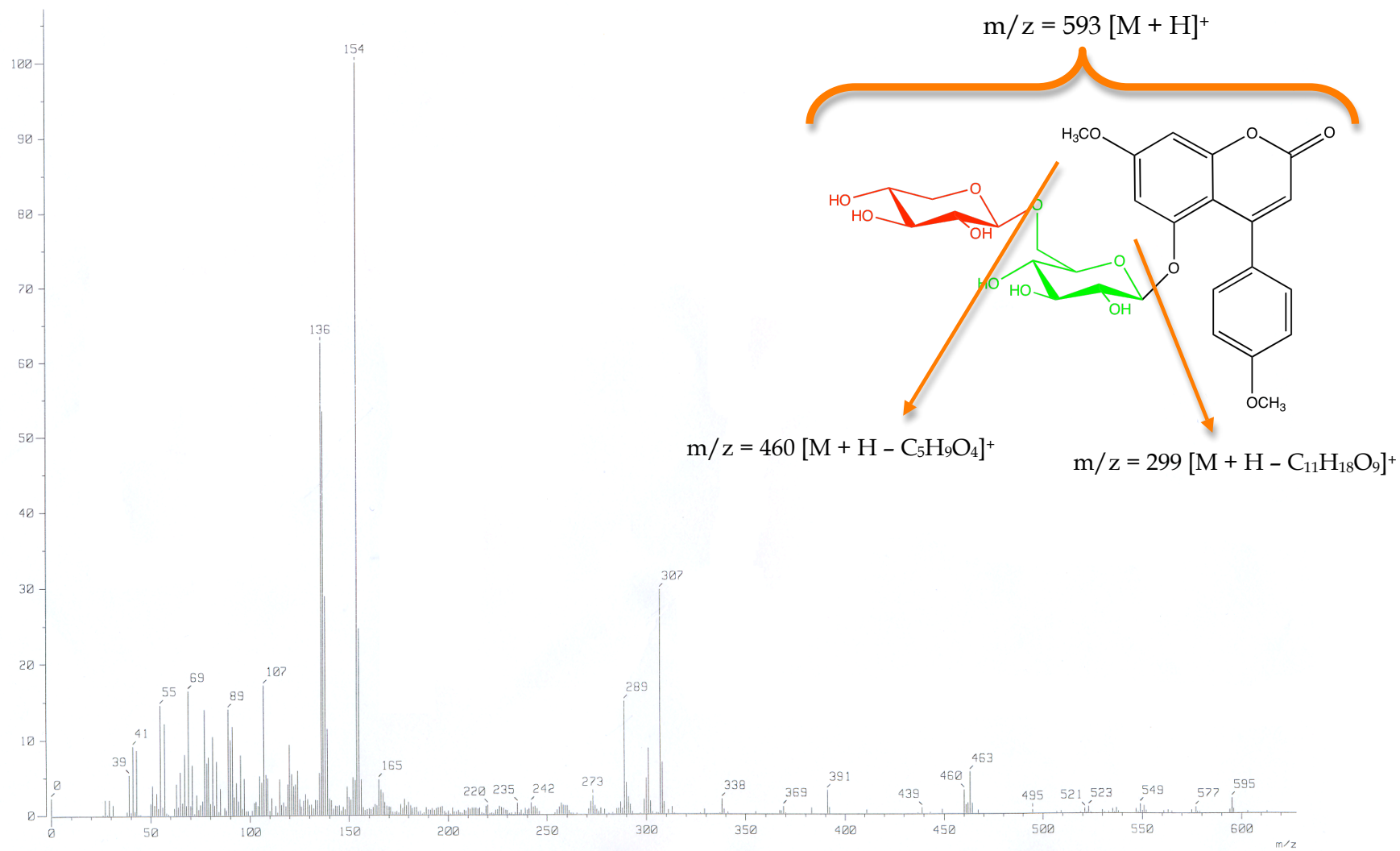
Espectro 9. Espectro COSY de la 5-O-[\beta-D-xilopiranosil-(1→6)-\beta-D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)



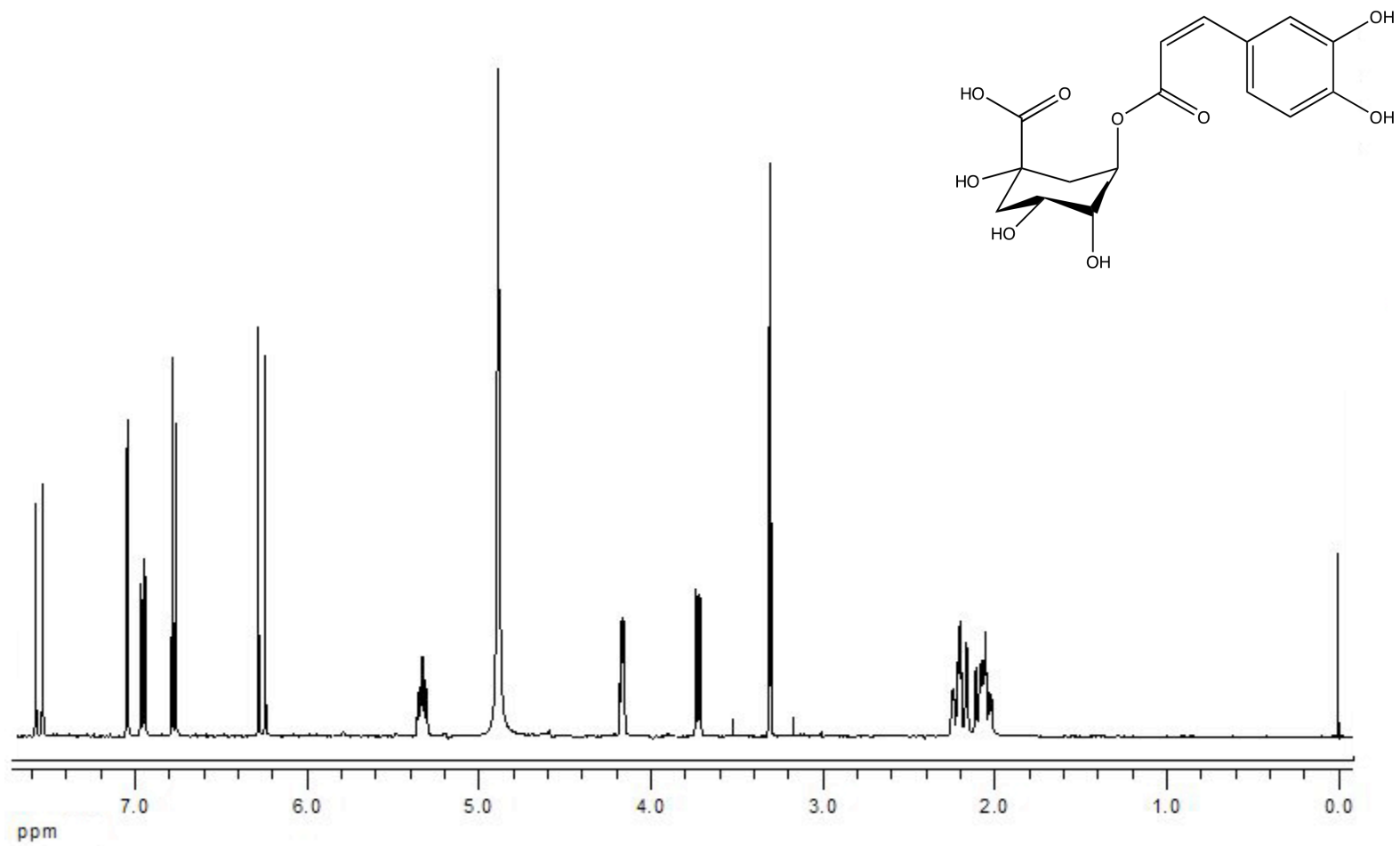
Espectro 10. Espectro HSQC de la 5-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)



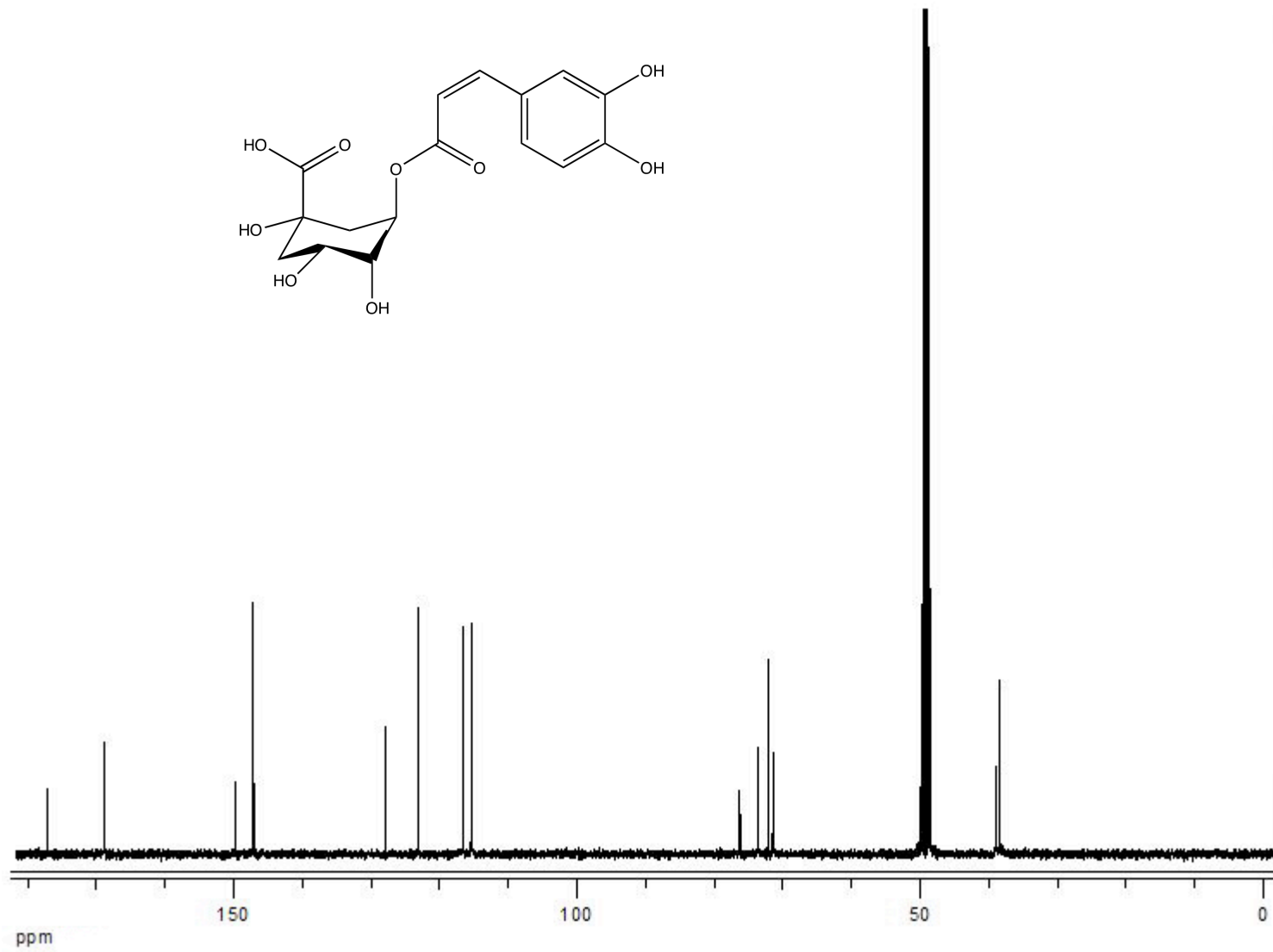
Espectro 11. Espectro IR de la 5-O-[\beta-D-xilopiranosil-(1\to6)]-\beta-D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)



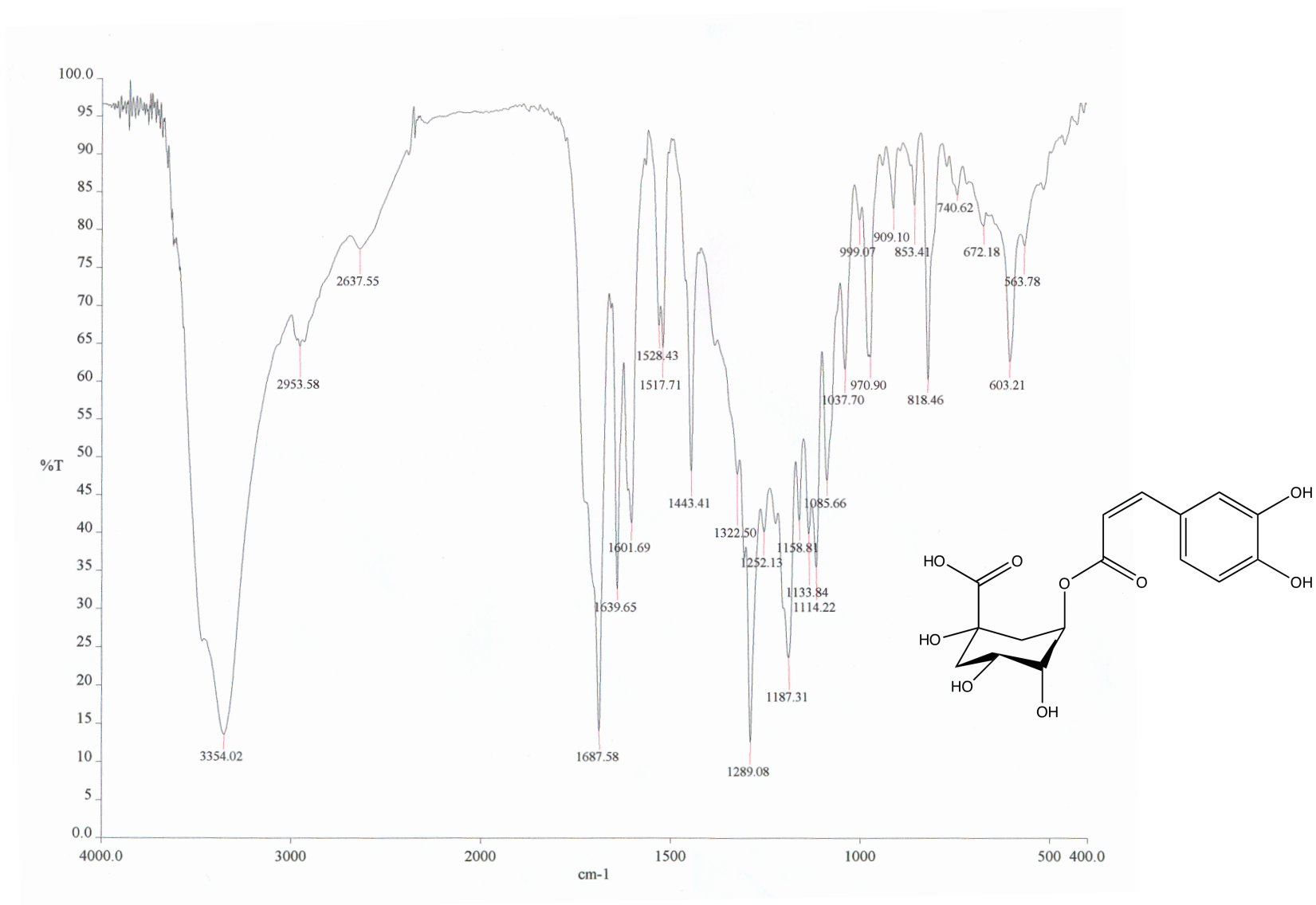
Espectro 12. Espectro de EM modalidad FAB+ de la 5-O-[\beta-D-xilopiranosil-(1\to6)-\beta-D-glucopiranosil]-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (25)



Espectro 13. Espectro de RMN ^1H del ácido clorogénico (26)



Espectro 14. Espectro de RMN ¹³C del ácido clorogénico (26)



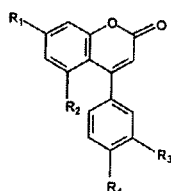
Espectro 15. Espectro IR del ácido clorogénico (26)

Hypoglycemic Activity of Extracts and Compounds from the Leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: Potential Alternatives to the Use of the Stem Bark of These Species(1)

Sol Cristians, Jose# A. Guerrero-Analco, Araceli Pe#rez-Va#squez, Francisco Palacios-Espinosa, Carlos Ciangherotti, Robert Bye, and Rachel Mata

J. Nat. Prod., Article ASAP • DOI: 10.1021/np800642d

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on January 28, 2009



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	OH	6"-O-acetyl-5-O-β-D-galactopyranosyl	H	OH
2	OH	6"-O-acetyl-5-O-β-D-galactopyranosyl	OH	OH
3	OCH ₃	5-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]	H	OCH ₃



More About This Article

Additional resources and features associated with this article are available within the HTML version:

- Supporting Information
- Access to high resolution figures
- Links to articles and content related to this article
- Copyright permission to reproduce figures and/or text from this article

[View the Full Text HTML](#)



ACS Publications
 High quality. High impact.

Hypoglycemic Activity of Extracts and Compounds from the Leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: Potential Alternatives to the Use of the Stem Bark of These Species^{§,1}

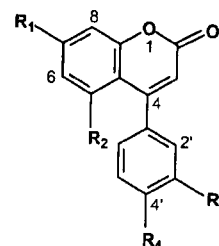
Sol Cristians,[†] José A. Guerrero-Analco,[‡] Araceli Pérez-Vásquez,[‡] Francisco Palacios-Espinosa,[†] Carlos Ciangherotti,^{†,‡} Robert Bye,[‡] and Rachel Mata^{*,†}

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, D.F. 04510, Mexico, and Jardín Botánico, Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, D.F. 04510, Mexico

Received October 13, 2008

The CH₂Cl₂–MeOH (1:1) extract of the leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora* caused significant decrease in blood glucose levels in both normal and streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats when compared with vehicle-treated groups ($p < 0.05$). These extracts were not toxic to mice according to the Lorke criteria. From the hypoglycemic extract of *H. standleyana*, two new 4-phenylcoumarins, namely, 6''-*O*-acetyl-5-*O*- β -D-galactopyranosyl-7,4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**1**) and 6''-*O*-acetyl-5-*O*- β -D-galactopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (**2**), were obtained. The analogous extract of *H. latiflora* yielded the new 5-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-7,4'-dimethoxy-4-phenylcoumarin (**3**) along with several known compounds, including ursolic acid and desoxycordifolinic acid. Phenylcoumarins **1** and **2** showed hypoglycemic activity. HPLC profiles of the leaf extracts of both plants revealed the presence of known hypoglycemic phenylcoumarins as well as chlorogenic acid. The overall results have indicated that the leaves of *H. standleyana* and *H. latiflora* possess similar antidiabetic potential to their stem bark. Therefore, the leaves from these species could represent an alternative to the use of their stem bark, which, in turn, would contribute to the conservation of these Mexican medicinal plants.

The extremely bitter stem bark of some Mexican Rubiaceae species, commonly known as "copalchis", is highly valued in folk medicine for treating type 2 diabetes.^{3–5} *Hintonia standleyana* Bullock, *H. latiflora* (Sesse et Mociño ex DC.) Bullock (syn. *Coutarea latiflora* Sesse et Mociño ex DC.), *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. et Schult., and *E. mexicanum* Gray are the most widely used species. The chemical composition^{6–11} as well as the antidiabetic,^{3,4,11–15} antimalarial,^{10,16} and antimicrobial¹⁷ properties of the stem bark of *H. latiflora* have been the subject of several investigations. More recently, we have described the antidiabetic and antinociceptive properties as well as some chemical constituents of *H. standleyana* stem bark.^{18,19} In the last 50 years, the stem bark of both these *Hintonia* species has been exploited extensively and commercialized, locally and outside of Mexico, without any official regulation. Furthermore, the crude drugs are harvested from wild plants, thereby causing irreversible damage to these resources. Accordingly, the "copalchis" are now scarce and in danger of extinction.²⁰ For this reason, it is important to protect these valuable resources by regulating their commercialization and finding similar therapeutic alternatives. With this scenario, the present investigation was undertaken as a preliminary step to determine if the aerial parts of *H. standleyana* and *H. latiflora* possess the same antidiabetic properties as their stem bark in animal models. The final goal would be to recommend the use of the leaves rather than the stem bark, thus contributing to the conservation of both species. Consequently, herein, we report the potential toxicity and short-term hypoglycemic and antihyperglycemic effects of crude organic extracts obtained from the leaves of *H. standleyana* and *H. latiflora*. In addition, the isolation and identification of three new analogues of known 4-phenylcoumarins (**1–3**) from these two species is described.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	OH	6''- <i>O</i> -acetyl-5- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl	H	OH
2	OH	6''- <i>O</i> -acetyl-5- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl	OH	OH
3	OCH ₃	5- <i>O</i> -[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]	H	OCH ₃
4	OCH ₃	5- <i>O</i> -[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]	OH	OH
5	OCH ₃	5- <i>O</i> -[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]	OH	OH
6	OCH ₃	5- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl	OH	OH
7	OCH ₃	5- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl	OH	OH
8	OH	5- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl	OH	OH

Results and Discussion

The potential toxic effects of the leaves of *H. latiflora* (HLE) and *H. standleyana* (HSE) were assessed preliminarily in mice according to the Lorke procedure.²¹ For this, mice were treated orally with increasing doses (10–5000 mg/kg) of their crude extracts prepared with CH₂Cl₂–MeOH (1:1). In the case of *H. latiflora*, the calculated LD₅₀ of the extract was 1.67 g/kg; this figure was slightly higher than the LD₅₀ previously reported for the stem bark extract (2.85 g/kg).²² On the other hand, the LD₅₀ of HSE was higher than 5 g/kg. In either case, the treatments did not provoke behavioral alterations, lesions, or bleeding of the internal tissues and organs of the animals throughout the experiments. Therefore, according to the Lorke criteria, neither of the extracts was regarded as toxic.

Next, the hypoglycemic activity of the crude extracts (HSE and HLE) in normoglycemic and streptozotocin (STZ)-induced diabetic

[§] Dedicated to Dr. David G. I. Kingston of Virginia Polytechnic Institute and State University for his pioneering work on bioactive natural products.

* Corresponding author. Tel: + 52-55-5622 5289. Fax: +52-55-5622 5329. E-mail: rachel@servidor.unam.mx.

[†] Facultad de Química, UNAM.

[‡] Instituto de Biología, UNAM.

¹ On leave from Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Table 1. Effects of the Crude Extracts of the Leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora* on Blood Glucose Levels in Normal Rats^a

test samples	dose (mg/kg)	initial glycemia (mg dL ⁻¹)		% variation of glycemia			
		0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
control (vehicle)		96.7 ± 1.9	2.3 ± 5.1	0.2 ± 5.7	-15.7 ± 3.4	-16.6 ± 4.0	-22.3 ± 3.9
<i>H. standleyana</i> glibenclamide	10	101.2 ± 3.1	-12.1 ± 3.9*	-22.5 ± 6.1*	-38.2 ± 5.3*	-49.1 ± 5.1*	-43.4 ± 4.4*
<i>H. standleyana</i> HSE	100	97.3 ± 2.2	-2.2 ± 5.8	-17.2 ± 4.5*	-36.3 ± 1.2*	-39.2 ± 4.7*	-36.1 ± 6.7*
HSE	300	99.5 ± 5.6	-2.2 ± 7.4	-18.5 ± 3.9*	-26.0 ± 6.9*	-48.2 ± 4.4*	-44.6 ± 3.2*
control (vehicle)		93.5 ± 3.3	-0.2 ± 4.1	-10.4 ± 3.6	-23.5 ± 3.3	-16.9 ± 1.9	-13.0 ± 2.3
<i>H. latiflora</i> glibenclamide	10	104 ± 3.4	-14.4 ± 5.1*	-31.6 ± 6.2*	-43.2 ± 4.5*	-45.1 ± 4.4*	-48.5 ± 4.4*
<i>H. latiflora</i> HLE	100	94.6 ± 2.3	-1.7 ± 2.3	-17.6 ± 2.2	-24.5 ± 1.8	-17.1 ± 3.1	-22.5 ± 0.8*
HLE	300	96.3 ± 3.0	-10.0 ± 4.1	-29.6 ± 3.6*	-33.6 ± 2.6*	-33.3 ± 3.0*	-37.6 ± 2.1*

^a Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group. **p* < 0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for comparison with respect to negative control values at the same time.

Table 2. Effect of the Crude Extract of the Leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora* on Blood Glucose Levels in STZ-Induced Diabetic Rats^a

test samples	dose (mg/kg)	initial glycemia (mgdL ⁻¹)		% variation of glycemia			
		0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
control (vehicle)		279.3 ± 6.3	8.7 ± 3.8	-3.9 ± 3.7	-7.9 ± 6.7	-9.8 ± 4.9	-17.6 ± 3.3
<i>H. standleyana</i> glibenclamide	10	286.2 ± 3.1	-17.8 ± 7.7*	-23.5 ± 7.1*	-34.6 ± 6.8*	-35.4 ± 5.9*	-33.9 ± 5.7*
<i>H. standleyana</i> HSE	100	287.8 ± 2.2	-6.6 ± 5.5	-22.0 ± 5.2*	-31.6 ± 7.6*	-32.2 ± 6.5*	-30.9 ± 9.1*
HSE	300	289.0 ± 5.6*	-15.7 ± 2.1	-25.4 ± 4.1*	-34.2 ± 3.8*	-34.1 ± 4.7*	-39.6 ± 4.8*
control (vehicle)		253 ± 32.3	13.8 ± 4.0	19.9 ± 15.0	6.7 ± 8.7	-6.3 ± 7.9	-12.8 ± 10.8
<i>H. latiflora</i> glibenclamide	10	245.5 ± 51.8	-9.3 ± 8.6	-24.8 ± 11.1	-40.2 ± 12.7*	-52.5 ± 13.3*	-59.7 ± 11.4*
<i>H. latiflora</i> HLE	100	273.8 ± 46.5	3.56 ± 6.9	-12.7 ± 11.3	-44.2 ± 14.4*	-57.0 ± 17.3*	-62.6 ± 13.5*
HLE	300	272.3 ± 19.5	-3.9 ± 10.5	-25.5 ± 10.4*	-50.8 ± 14.5*	-64.4 ± 14.0*	-68.8 ± 11.7*

^a Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group. **p* < 0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for comparison with respect to negative control values at the same time.

Table 3. Effect of Compounds **1** and **2** from the Leaves of *Hintonia standleyana* on Blood Glucose Levels in Normal Rats^a

test samples	dose (mg/kg)	initial glycemia (> (mg dL ⁻¹))		% variation of glycemia			
		0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
control (vehicle)		86.6 ± 2.2	3.1 ± 5.7	-2.5 ± 3.8	-18.7 ± 1.6	-20.2 ± 4.0	-18.2 ± 3.5
glibenclamide	10	96.4 ± 3.4	-8.4 ± 4.4*	-30.1 ± 5.1*	-47.6 ± 1.9*	-41.8 ± 2.8*	-37.1 ± 2.9*
compound 1	10	91.0 ± 3.0	-10.3 ± 3.8*	-17.8 ± 3.9*	-20.9 ± 3.6*	-27.2 ± 1.4*	-24.0 ± 6.7*
compound 2	10	96.8 ± 2.2	-9.2 ± 4.1	-29.9 ± 3.2*	-28.6 ± 3.2*	-25.0 ± 2.2*	-30.6 ± 3.2*

^a Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group. **p* < 0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for comparison with respect to negative control values at the same time.

rats was determined using standard protocols.^{11,18} As shown in Tables 1 and 2, HSE and HLE treatments (100 and 300 mg/kg) caused a significant decrease in blood glucose levels in both normal and STZ-diabetic rats when compared with vehicle-treated groups (*p* < 0.05). In normoglycemic animals, the highest hypoglycemic effect of both extracts was observed at a dose of 300 mg/kg. In the case of HSE the activity (-48.2%) was observed with the dose of 300 mg/kg after 7 h and persisted throughout the experiment; for HLE, an effect (-37.6%) was observed at 300 mg/kg after 9 h (Table 1). In diabetic animals, the maximum hypoglycemic effect of both extracts was observed at the 300 mg/kg dose, but the effect of HLE was significantly higher than the HSE effect (HSE: -39.6% at 9 h; HLE: -68.8% at 9 h) (Table 2).

The active extracts were subjected to chromatographic fractionation. This process led to the isolation of the new 4-phenylcoumarin

analogues 6''-*O*-acetyl-5-*O*-β-D-galactopyranosyl-4',7-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**1**) and 6''-*O*-acetyl-5-*O*-β-D-galactopyranosyl-3',4',7-trihydroxy-4-phenylcoumarin (**2**) from *H. standleyana*. In the case of *H. latiflora*, the new 4-phenylcoumarin 5-*O*-[β-D-xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7,4'-dimethoxy-4-phenylcoumarin (**3**) was isolated. The structures of **1**–**3** were elucidated using spectroscopic methods including one- and two-dimensional NMR techniques.

The HRFABMS (positive mode) of **1**–**3** were very similar, showing quasimolecular ions [M + H]⁺ at *m/z* 475.1159 (C₂₃H₂₂O₁₁), 491.1109 (C₂₃H₂₂O₁₂), and 593.1799 (C₂₈H₃₂O₁₄), respectively. The NMR spectra (CD₃OD, Table 5) were very similar to other 4-phenylcoumarin glycosides isolated from the bark of *H. standleyana*, *H. latiflora*, and *E. caribaeum*.^{11,18,23,24} The aromatic region of the ¹H NMR spectrum of **1**–**3** (Table 5) displayed signals

Table 4. Effect of Compounds **1** and **2** from the Leaves of *Hintonia standleyana* on Blood Glucose Levels in STZ-Induced Diabetic Rats^a

test simples	dose (mg/kg)	initial glycemia (mg dL ⁻¹)		% variation of glycemia			
		0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
control (vehicle)		282.8 ± 3.6	0.3 ± 3.5	-15.6 ± 1.7	-20.7 ± 2.1	-23.0 ± 1.5	-19.3 ± 1.4
glibenclamide	10	280.2 ± 5.1	-13.7 ± 3.6*	-35.5 ± 1.4*	-35.9 ± 2.6*	-35.2 ± 1.6*	-36.7 ± 2.5*
compound 1	10	277.4 ± 4.4	-11.0 ± 1.8*	-24.9 ± 2.1*	-22.7 ± 3.6	-25.2 ± 2.5	-27.1 ± 4.5
compound 2	10	276.4 ± 4.2	-5.0 ± 2.8	-20.7 ± 4.6*	-29.5 ± 4.8*	-34.7 ± 5.2*	-37.2 ± 5.5*

^a Each value is the mean ± SEM for 6 rats in each group. **p* < 0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for comparison with respect to negative control values at the same time.

Table 5. NMR Spectroscopic Data (100 MHz ¹³C, 400 MHz ¹H, CD₃OD) for the 4-Phenylcoumarins **1–3**

position	1		2		3	
	δ _C	δ _H (J in Hz)	δ _C	δ _H (J in Hz)	δ _C	δ _H (J in Hz)
2	163.2		163.2		162.9	
3	112.5	5.87, s	112.5	5.87, s	113.4	5.93, s
4	158.3		158.0		157.9	
4a	104.3		104.2		105.7	
5	159.0		158.2		158.0	
6	98.2	6.52, d (2.2)	98.2	6.52, d (2.4)	96.4	6.69, d (2.5)
7	163.3		163.3		165.0	
8	100.8	6.48, d (2.2)	100.8	6.47, d (2.4)	100.5	6.70, d (2.0)
8a	158.0		157.4		157.1	
1'	132.4		132.9		133.3	
2'	130.4	6.85, d (8.4)	117.0	6.85, d (2.1)	130.3	7.30, d (9.0)
3'	115.5	7.24, d (8.8)	145.3		114.1	6.97, d (9.0)
4'	157.4		147.1		161.4	
5'	115.5	6.85, d (8.4)	115.8	6.83, d (7.8)	114.1	6.97, d (9.0)
6'	130.4	7.24, d (8.8)	120.8	6.73, dd (8.1, 2.1)	130.3	7.30, d (9.0)
1''	101.9	4.67, d (7.8)	101.8	4.69, d (7.8)	101.3	4.80, d (8.0)
2''	71.8	3.08, dd (7.8)	71.8	3.13, dd (7.8)	74.3	2.55, dd (9.2, 8.0)
3''	74.4	3.42, dd (9.8, 3.4)	74.4	3.44, dd (9.6, 3.3)	77.7	3.26, dd (9.0)
4''	69.8	3.78, brd (2.4)	69.9	3.78, da (3.3)	71.2	3.16, dd (9.5)
5''	74.4	3.83, m	74.3	3.84, m	77.7	3.25, dd (9.5)
6''	64.5	4.36, dd (11.6, 8.4) 4.16, dd (11.6, 4.0)	64.5	4.36, dd (11.4, 8.2) 4.15, dd (11.4, 4.2)	70.2	4.00, dd (11.7, 2.5) 3.73, dd (12.0, 6.5)
1'''					105.4	4.24, d (7.5)
2'''					74.9	3.18, dd (9.0, 7.5)
3'''					77.2	3.55, dd (9.5)
4'''					71.1	3.47, m
5'''					66.8	3.08 dd (11.5, 10.0) 3.82 dd (11.5, 5.0)
OCH ₃ -7					56.5	3.90, s
OCH ₃ -4'					55.9	3.85, s
-OCOCH ₃	169		169			
-OCOCH ₃	20	2.10, s	20	2.10, s		

due to (i) two *meta*-coupled hydrogens (H-6 and H-8) and (ii) an ABX system formed by H-2', H-5', and H-6' in the case of **2**, or an AA'BB' system produced by H-2', H-6', H-3', and H-5' for **1** and **3**. (iii) Finally, the typical singlet (~δ_H 5.87) signal for the hydrogen of the α-pyrone ring system (H-3) was observed. The NMR spectra of **1** and **2** displayed also the resonances for a sugar moiety, and those of **3** for a disaccharide unit. The carbon resonances (Table 5) of the 4-phenylcoumarin portion were assigned through the analysis of the HSQC and HMBC experiments and by comparison with suitable models.^{11,18,23,24} The ¹³C NMR chemical shifts (Table 5) observed in the sugar region of **1** and **2** confirmed the presence of one β-D-acetylgalactopyranosyl moiety in these molecules. The presence of fragment ions at *m/z* 415 [M + H - CH₃CO₂H]⁺ and 313 [M + H - C₆O₅H₁₁]⁺ or *m/z* 431 [M + H - CH₃CO₂H]⁺ and 329 [M + H - C₆O₅H₁₁]⁺ in the FABMS of **1** and **2**, respectively, indicated consecutive losses of one hexose unit and an acetoxy moiety from the molecular ions. Furthermore, the HMBC correlations between C-5 and the anomeric hydrogen of galactose (H-1'') clearly indicated that the acetylgalactosyl unit is attached to the C-5 hydroxyl of the aglycon in both cases. The upfield shift of H-2'', due to the protection exerted by the phenyl

group at C-4 of the phenylcoumarin core, was consistent with this proposal. In the case of compound **3**, the nature of the disaccharide unit was initially determined by detailed analysis of the carbon chemical shifts of the sugar region, which were identical to those of 5-*O*-[β-D-xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin previously isolated from *H. latiflora*¹² and *Coutarea hexandra*.²⁶ This observation was consistent with the existence of ion fragments at *m/z* 460 [M + H - C₅H₉O₄]⁺ and 299 [M + H - C₁₁O₁₈H₉]⁺, indicating consecutive losses of one xylose unit and one glucose moiety from the molecular ion. The HMBC correlations of the anomeric hydrogen of glucose (H-1''; δ_H 4.8) to C-5 (δ_C 158.0) of the aglycon unit and the anomeric hydrogen of xylose (H-1'''; δ_H 4.24) to C-6'' (δ_C 70.2) were in agreement with the 1→6 linkage and with the attachment of the glucose moiety at the C-5 hydroxyl. The NOESY interaction H-6 (δ_H 6.69)/H-1'' (δ_H 4.8) was in accord with the disaccharide linkage site. The nature of the sugars was confirmed by methanolysis with MeOH and 1 M HCl.²⁵ Thus, compounds **1** and **2** led to the isolation of the β-D-methylgalactopyranoside with a positive optical rotation. Compound **3**, under the same conditions, afforded β-D-

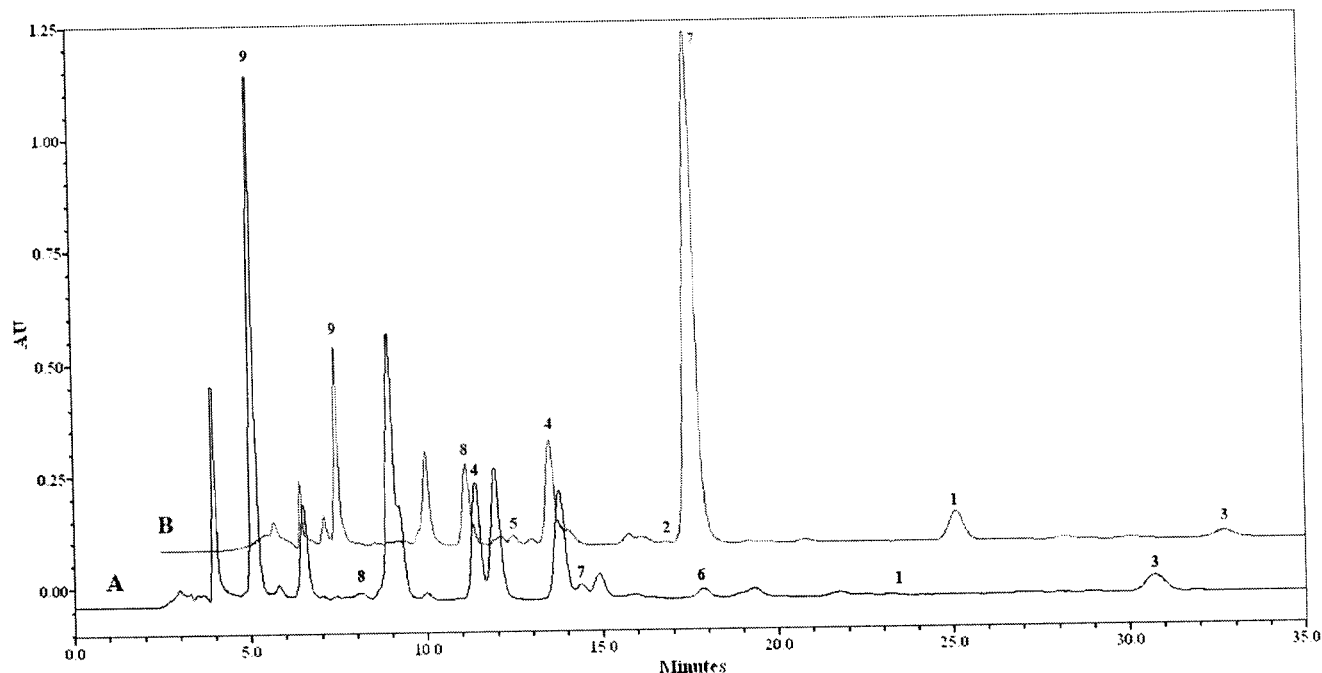


Figure 1. Analytical HPLC chromatogram recorded at 327 nm of the components of the leaf infusion from *H. latiflora* (A) and *H. standleyana* (B). (A) Peak identification (t_R , min): 1 (23.41); 3 (30.82); 4 (11.33); 6 (17.94); 7 (14.36); 8 (8.30); and 9 (5.04). (B) Peak identification (t_R , min): 1 (23.54); 2 (14.44); 3 (30.35); 4 (11.17); 5 (10.11); 7 (14.2); 8 (8.77); and 9 (5.09). For chromatographic conditions, see the Experimental Section.

methylglucopyranoside and β -D-methylxylopyranoside with positive and negative optical rotations, respectively.

The active principles of the vernacular preparations (infusions and decoctions) obtained from the stem barks of "copalchis" are mainly 4-phenylcoumarins glycosides.²⁷ Therefore the infusions of the leaves of both *Hintonia* species were analyzed by HPLC in order to establish their 4-phenylcoumarin profiles. The results are summarized in Figure 1. In each case, most of the components were identified by spiking the infusion with the appropriate standards. In the case of *H. standleyana*, the main component was 5-*O*- β -D-glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (7), which possesses the noted hypoglycemic effect. However, in the case of *H. latiflora*, the main component was not a phenylcoumarin but chlorogenic acid (9). The antidiabetic²⁸ and antioxidant²⁹ properties of chlorogenic acid have been demonstrated. Compound 9 promotes a significant reduction in the plasma glucose peak during the oral glucose tolerance test, which suggests its potential as a glycemic index lowering agent and for reducing the risk of developing type 2 diabetes.^{30,31} The remaining constituents in the infusions were mostly 4-phenylcoumarins with known hypoglycemic activity.^{11,18}

Coumarins 1 and 2, newly isolated in this study, were evaluated in the same assays as the extracts. As shown in Tables 3 and 4, compound 2 (10 mg/kg) did cause a significant decrease in blood glucose levels in both normal and STZ-diabetic rats when compared with vehicle-treated groups ($p < 0.05$). In normoglycemic animals, the hypoglycemic effect of 2 was around -30.6% at 9 h. In diabetic animals, the highest antihyperglycemic effect of 2 was observed at 7 and 9 h (-34.7% and -37.2%, respectively). Compound 3 was not evaluated due to the scarcity of the sample. As previously observed, the results found in the present investigation showed that the nature of the sugar moiety at C-5 is not relevant for the biological action since 2 was more active than 1. On the other hand, the presence of a catechol unit in 2 revealed its relevance for the hypoglycemic effect.

The presence of ursolic acid, with known hypoglycemic and antioxidant^{32,33} properties as well as its stimulating glucose uptake

and enhancing insulin receptor phosphorylation activities,³⁴ could partially account for the observed hypoglycemic effect of HLE.

In conclusion, the leaves of *H. standleyana* and *H. latiflora* are effective as hypoglycemic agents in diabetic conditions using experimental animal models. The antidiabetic properties demonstrated in this study for both *Hintonia* species are due mainly to the presence of 4-phenylcoumarins. Since the leaves of both species are devoid of toxic effects and displayed discernible hypoglycemic effects, they could be an excellent alternative to the use of their stem bark. The use of the leaves as renewable resources might also contribute to the conservation of these Mexican plants, which have been recently overexploited.

Experimental Section

General Experimental Procedures. Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were recorded on a Perkin-Elmer 241 digital polarimeter. IR spectra were recorded as KBr pellets or film on a Perkin-Elmer 59913 spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a Varian VXR-300S spectrometer, at either 400 MHz (¹H) or 100 (¹³C) MHz, in CD₃OD using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. EIMS were obtained on a JMS-AX505HA mass spectrometer. Positive FABMS data were obtained with a JEOL SX 102 mass spectrometer using an NBA matrix. Open column chromatography was carried out on silica gel 60 (70–230 mesh, Merck). HPLC analysis was performed on a Waters HPLC instrument equipped with a UV/visible detector model 2487 set at 327 nm, a pump (Waters 600), a low-pressure solvent mixing valve, a manual sampler injector, and a degasser unit. Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic information were performed by the Millennium 32 software program (Waters). TLC analysis was performed on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck), and visualization of the plates was carried out using ceric sulfate (10%) solution in H₂SO₄ or anisaldehyde-H₂SO₄ reagent (for sugars).

Plant Material. The leaves (500 g) of *H. standleyana* were collected in Atenango del Rio, Guerrero, in May 2005 and identified by Raymundo Rufino and Francisco Ramos from the Mexican National Herbarium (MEXU); a voucher specimen (P. Hersch No 423) was deposited at the ASFM-INAH Herbarium, Cuernavaca. The leaves (370 g) of *H. latiflora* were collected in Batopilas, Chihuahua, in November

2006 and identified by Robert Bye from the UNAM Botanical Garden; a voucher specimen (R. Bye 34880) was deposited at MEXU, Mexico.

Extraction and Isolation. Dried and shredded leaves of *H. standleyana* (500 g) and *H. latiflora* (370 g) were macerated with CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) (2 L \times 3) for 6 days at room temperature. The extracts were evaporated in vacuo to yield 80 g of a green residue from *H. standleyana* and 60 g of a green residue from *H. latiflora*. The dried extract of *H. standleyana* (50 g) was chromatographed in a glass column packed with silica gel (1 kg) eluting with hexane-EtOAc (3:7 \rightarrow 0:1) and EtOAc-MeOH (1:0 \rightarrow 0:1) to yield eight primary fractions (FH1-FH8). Fraction FH3 (1.2 g), eluted with hexane-EtOAc (5:95), was further chromatographed over a silica gel column using hexane-EtOAc (1.5:8.5 \rightarrow 0:1) and EtOAc-MeOH (1:0 \rightarrow 8:2) as eluents to give seven fractions (FH3I-FH3VII). From fraction FH3V (700 mg), eluted with EtOAc-MeOH (99:1), spontaneously crystallized 400 mg of **2**. Fraction FH5 (4 g), eluted with EtOAc-MeOH (9:1), was further chromatographed over a silica gel column, using EtOAc-MeOH (1:0 \rightarrow 5:5) as eluents, to render 10 fractions (FH5I-FH5X). From fraction FH5VII eluted with EtOAc-MeOH (8:2) spontaneously crystallized 650 mg of **1**.

The dried extract of *H. latiflora* (40 g) was chromatographed in a glass column packed with silica gel (1.5 kg) eluting with hexane-EtOAc (1:0 \rightarrow 0:1) and EtOAc-MeOH (1:0 \rightarrow 1:1) to yield six primary fractions (F1-F6). From fraction F2 (500 mg), eluted with EtOAc-MeOH (9:1), spontaneously crystallized 371 mg of ursolic acid. Fraction F6 (5 g), eluted with EtOAc-MeOH (1:1), was further chromatographed over a silica gel column with CHCl_3 -MeOH (1:0 \rightarrow 1:1) to obtain 13 fractions (F6I-F6XIII). Fraction F6XI (24.1 mg), eluted with CHCl_3 -MeOH (1:1), was purified by using preparative TLC [silica gel; CHCl_3 -MeOH-H₂O (5:1:1)] in order to isolate 5 mg of desoxy-cordifolinic acid. Fraction F4 (5 g), eluted with EtOAc-MeOH (1:1), was additionally chromatographed over a silica gel column with CH_2Cl_2 -MeOH (1:0 \rightarrow 1:1) to afford 13 fractions (F4I-F4XIII). HPLC chromatographic separation of fraction F4VII (200 mg) on a Merck-Purospher Star RP-18e (5 μm ; 250 mm \times 4.6 mm) column, eluting with CH_3CN -H₂O (3:7), 0.4 mL/min flow rate, yielded 12 mg of compound **3**.

6''-O-Acetyl-5-O- β -D-galactopyranosyl-4',7-dihydroxy-4-phenylcoumarin (1): yellow solid; mp 153-156 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -27 (c 0.01, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 325 (3.95), 329 (4.05) nm; IR (KBr) λ_{max} 3450, 1705, 1620, 1510, 1430, 1360, 1265, 1090 cm^{-1} ; ^{13}C and ^1H NMR, see Table 5; FABMS m/z 475 [M + H]⁺, 415 [M + H - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$]⁺, 313 [M + H - $\text{C}_6\text{O}_5\text{H}_{11}$]⁺; HRFABMS m/z 475.1159 [M + H]⁺ (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{O}_{11}$, 475.1162).

6''-O-Acetyl-5-O- β -D-galactopyranosyl-3',4',7-trihydroxy-4-phenylcoumarin (2): beige solid; mp 155-158 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -29 (c 0.01, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 328 (4.05), 332 (4.11) nm; IR (KBr) λ_{max} 3430, 1705, 1615, 1515, 1435, 1365, 1265, 1080 cm^{-1} ; ^{13}C and ^1H NMR, see Table 5; FABMS m/z 491 [M + H]⁺, 431 [M + H - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$]⁺, 329 [M + H - $\text{C}_6\text{O}_5\text{H}_{11}$]⁺; HRFABMS m/z 491.1109 [M + H]⁺ (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{O}_{12}$, 491.1111).

5-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-7,4'-dimethoxy-4-phenylcoumarin (3): yellow solid; mp > 320 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -26 (c 0.01, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} 327 (4.00), 330 (4.10) nm; IR (KBr) ν_{max} 3403, 1702, 1653, 1612, 1512, 1367, 1074 cm^{-1} ; ^{13}C and ^1H NMR, see Table 5; FABMS m/z 593 [M + H]⁺, 460 [M + H - $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_4$]⁺, 299 [M + H - $\text{C}_{11}\text{O}_{18}\text{H}_9$]⁺; HRFABMS m/z 593.1799 [M + H]⁺ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{14}$, 593.1792).

Analysis of Sugar Moieties of Compounds 1-3. A 10 mg quantity of each compound (1-3), dissolved in 5 mL of MeOH, was refluxed separately with 10 mL of HCl (1 M) for 2 h at 90 °C. The reaction mixture was diluted with H₂O and extracted twice with EtOAc. The H₂O layer was passed through an Amberlite MB-3 column. The eluates were then concentrated in vacuo to dryness to yield 2 mg of methyl- β -D-galactopyranoside as a glassy solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +44.5 (c 0.01, H₂O), in the case of **1** and **2**. For compound **3** the solid residue was subjected to HPLC separation using the same Merck-Purospher Star RP-18e column (eluting with H₂O and 0.4 mL/min flow rate) to afford 1 mg of methyl- β -D-glucopyranoside, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +120 (c 0.01, H₂O), and methyl- β -D-xylopyranoside, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -55 (c 0.01, H₂O).

HPLC Profiles. The standards 5-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**4**), 5-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**5**), 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-

3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**6**), 5-O- β -D-glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**7**), and 5-O- β -D-glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (**8**) were isolated from the stem bark of *H. standleyana* and *H. latiflora*, respectively, as previously described.^{8,9,11,18} Their purity was verified by HPLC and NMR. Chlorogenic acid (**9**) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). HPLC grade CH_3CN and MeOH were obtained from Honeywell Burdick & Jackson (Morristown, NJ); trifluoroacetic acid was purchased from Sigma-Aldrich. The stock standard solutions were prepared separately by accurately weighing 10 mg, pouring into 10 mL volumetric flasks, and dissolving in CH_3CN -H₂O (1:3). The solutions for analysis were prepared using 1.5 g of milled (particle size < 2000 μm , mesh size 2 mm) *H. standleyana* or *H. latiflora* extracted in 100 mL of hot water for 30 min and then filtered through Whatman No. 1 filter paper and poured into a volumetric flask and made up to 250 mL with distilled water. For the HPLC profile of each aqueous extract, a Symmetry C₈ (series WO3251R012) column (5 μm particle size, 3.9 \times 150 mm i.d.) was used. The elution system consisted of CH_3CN -H₂O 0.1% trifluoroacetic acid (19:81) at a flow rate of 0.4 mL/min, and the injection volume was 20 μL in all cases. Identification of compounds in the chromatograms was performed from their retention times and by spiking with standards (10 μL of standard stock solution) separated under the same conditions.

Test Animals. The toxicity studies were performed on male mice ICR (body weight range, 25-30 g); the antidiabetic tests were accomplished with Wistar rats (body weight range 180-220 g). Both types of animal were purchased from Centro UNAM-Harlan (Harlan México, SA de CV). Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with international rules on care and use of laboratory animals. The animals were housed under standard laboratory conditions and maintained on standard pellet diet and water ad libitum.

Acute Toxicity Study in Mice. The experiments were carried out in two phases as previously described.²² In the first, intragastric doses of 10, 100, and 1000 mg/kg of crude extract were administered. On the second phase, doses of 1600, 2900, and 5000 mg/kg were administered to mice following the Lorke method criteria. In both phases, mice were observed daily during a period of 14 days for mortality, toxic effects, and/or changes in behavioral pattern. At the end of the experiments, the animals were sacrificed in a CO₂ chamber.

Preparation of the Test Samples and Collection of Blood Samples. The samples were suspended in 0.05% Tween 80 in saline solution. Glibenclamide (10 mg/kg bw, Sigma-Aldrich Co.) was used as a hypoglycemic model drug.¹⁸ Control rats received only the vehicle (0.05% Tween 80 in saline solution) in the same volume (0.5 mL of vehicle/100 g bw) by the same route. Blood samples were collected from caudal vein by means of a small incision in the end of the tail. Blood glucose levels (mg/dL) were estimated by enzymatic glucose oxidase method using a commercial glucometer (One Touch Ultra, Milpitas, CA). Percentage variation of glycemia for each group was calculated with respect to initial (0 h) level according to the following: % variation of glycemia = $[(G_i - G_t)/G_i] \times 100\%$ where G_i is initial glycemia values and G_t is the glycemia value after sample administration.

Acute Hypoglycemic Assay. The assays were carried out as previously reported.^{11,18} HSE and HLE treatments (100 and 300 mg/kg bw), compounds **1** and **2** (10 mg/kg bw), or glibenclamide was administered by intragastrical route. Blood samples were collected at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h after drug administration.

Induction of Experimental Diabetes and Antihyperglycemic Assay. Diabetes mellitus was induced in rats by a single intraperitoneal injection of freshly prepared STZ (50 mg/kg; Sigma-Aldrich Co.) dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5, in a volume of 1 mL/kg bw. After 7 days of STZ administration, blood glucose levels of each rat were determined. Rats with blood glucose levels higher than 250 mg/dL were considered diabetic and included in the study.¹¹ Diabetic rats were treated as previously described.^{11,18} HSE and HLE (100 and 300 mg/kg bw), pure **1** and **2** (10 mg/kg bw), or glibenclamide (10 mg/kg bw) was administered by intragastric route. Blood samples were collected at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h after drug administration.

Statistical Analysis. Data are expressed as the means \pm SEM for the number ($n = 6$) of animals in each group. Repeated measurement analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the changes in blood glucose and other parameters. Dunnett range post hoc compari-

sons were used to determine the source of significant differences where appropriate; $p < 0.05$ was considered statistically significant. Prisma Graph-Pad (version 4.0) software was used for statistics.

Acknowledgment. This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Proyecto C01-018) and DGAPA-UNAM IN208907. The generous donation of a Purospher Star RP-18e column by VWR International is acknowledged. The authors are grateful to P. Hersch from INAH, Morelos for the plant material of *H. standleyana*. The technical assistance of I. Rivero-Cruz, L. Acevedo, R. del Villar, M. Gutiérrez, and G. Duarte-Lisci is also recognized. J.A.G.-A. and S.C. acknowledge a fellowship from CONACyT to carry out graduate studies. C.C. acknowledges fellowships from Proyecto Iberoamericano de Macrouiversidades under the auspices of Banco Santander.

References and Notes

- (1) Taken in part from the Ph.D. and M.S. Theses of J. A. Guerrero-Analco and S. Cristians, respectively.
- (2) Deleted in proof.
- (3) Landa, E. *Anal. Inst. Med. Nac.* **1913**, *12*, 146.
- (4) Terres, J. *Anal. Inst. Med. Mex.* **1913**, *12*, 109.
- (5) Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *99*, 325–348.
- (6) Reher, G.; Kraus, L. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 172–174.
- (7) Reguero, M.; Mata, R.; Bye, R.; Linares, E.; Delgado, G. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 315–316.
- (8) Mata, R.; Camacho, M.; Cervera, E.; Bye, R. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2037–2040.
- (9) Mata, R.; Camacho, M.; Mendoza, S.; Cruz, M. C. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3199–3201.
- (10) Argotte-Ramos, R.; Ramírez-Avila, G.; Rodríguez-Gutiérrez, M. C.; Ovilla-Muñoz, M.; Lanz-Mendoza, H.; Rodríguez, M.; González-Cortazar, M.; Alvarez, L. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1442–1444.
- (11) Guerrero-Analco, J.; Medina-Campos, O.; Brindis, F.; Bye, R.; Pedraza-Chaverri, J.; Navarrete, A.; Mata, R. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2087–2095.
- (12) Paris, R. R.; Bastien, M. *Ann. Pharm. Fr.* **1960**, *18*, 205–219.
- (13) Pinto, A.; Capasso, A.; Sorrentino, L. *Drug Res.* **1997**, *47*, 829–833.
- (14) Korec, R.; Heinz-Sensch, K.; Zoukas, T. *Drug Res.* **2000**, *50*, 122–128.
- (15) Korecova, M.; Hladíková, M.; Korec, R. *Z. Phytother.* **2006**, *27*, 272–278.
- (16) Noster, S.; Kraus, L. *Planta Med.* **1990**, *56*, 63–65.
- (17) Rojas, A.; Hernandez, L.; Pereda-Miranda, R.; Mata, R. *J. Ethnopharmacol.* **1992**, *35*, 275–283.
- (18) Guerrero-Analco, J. A.; Hersch-Martínez, P.; Pedraza-Chaverri, J.; Navarrete, A.; Mata, R. *Planta Med.* **2005**, *71*, 1099–1105.
- (19) Déciga-Campos, M.; Guerrero-Analco, J. A.; Quijano, L.; Mata, R. *Pharmacol., Biochem. Behav.* **2006**, *83*, 342–348.
- (20) Hersch-Martínez, P. *Destino Común: los Recolectores y su Flora Medicinal*; Instituto Nacional de Antropología e Historia: México, D.F., 1996; p 262.
- (21) Lorke, D. *Arch. Toxicol.* **1983**, *54*, 275–287.
- (22) Déciga-Campos, M.; Arriaga-Alba, M.; Rivero-Cruz, I.; Castañeda-Corral, G.; Angeles-López, G.; Navarrete, A.; Mata, R. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 334–342.
- (23) Mata, R.; Calzada, F.; Garcia, M.; Reguero, M. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 866–870.
- (24) Mata, R.; Calzada, F.; Garcia, M. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 851–856.
- (25) Maradufu, A.; Perlin, A. S. *Carbohydr. Res.* **1974**, *32*, 261–277.
- (26) Aquino, R.; D'Agostino, M.; De Simone, F.; Pizza, C. *Phytochemistry* **1987**, *27*, 1827–1830.
- (27) Mata, R.; Acevedo, L.; Méndez-Bautista, D.; Guerrero-Analco, J. A.; Rivero, B.; Rodríguez, J. *Pharm. Biol.* **2008**, *46*, 105–110.
- (28) Bassoli, B. K.; Cassolla, P.; Borba-Murad, G. R.; Constantin, J.; Salgueiro-Pagadigorria, C. L.; Bazotte, R. B.; Ferreira da Silva, R. S.; Medri de Souza, H. *Cell Biochem. Funct.* **2008**, *26*, 320–328.
- (29) Scherer, R.; Godoy, H. T. *Food Chem.* **2008**, *112*, 654–658.
- (30) Matsui, T.; Ogunwande, I. A.; Abesundara, K. J. M.; Matsumoto, K. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 349–356.
- (31) McCarty, M. F. *Med. Hypotheses* **2004**, *64*, 151–158.
- (32) Gao, D.; Li, N.; Li, Q.; Li, J.; Han, Z.; Fan, Y.; Liu, Z. *Therapy* **2008**, *5*, 697–705.
- (33) Oh, C. J.; Kil, I. S.; Park, C. I.; Yang, C. H.; Park, J. W. *Free Radical Res.* **2007**, *41*, 638–644.
- (34) Zhang, W.; Hong, D.; Zhou, Y.; Zhang, Y.; Shen, Q.; Li, J. Y.; Hu, L. H.; Li, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 1505–1512.

NP800642D