



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

COMPUESTOS MARCADORES Y ACTIVIDAD
HIPOGLICEMIANTE POTENCIAL DE *Exostema caribaeum*
(Jacq.) Roem. et Schult. (Rubiaceae)

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
FERNANDO GABRIEL BRINDIS HERNANDEZ
HECTOR ALEJANDRO URZUA HERNANDEZ



MEXICO, D. F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

m350848



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dra. Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. Suplente	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
2do. Suplente	Prof. Sergio Ismael Martínez Luis

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 124. Edificio E.
Facultad de Química. UNAM.

Asesor:

Rivero Cruz José F.

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentantes:

Fernando Brindis

Fernando Gabriel Brindis Hernández


Héctor Alejandro Urzúa Hernández

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Brindis Hernández

Fernando Abrici

FECHA: 11 Diciembre 2005

FIRMA: Fernando Brindis

Más que mil palabras...

El enfermo:

“—Me duele el estómago...”

El médico:

(2000 a. C.) “—¡Tome esta planta!...”

(1000 d. C.) “—Esto es una creencia pagana, ¡rece a este santo!”

(1850 d. C.) “—Esto no es más que superstición, ¡tome esta pócima!”

(1900 d. C.) “—Esta pócima es anticuada, ¡póngase esta inyección!”

(1940 d. C.) “—Esta inyección no sirve, ¡mejor use este supositorio!”

(1985 d. C.) “—Este supositorio no es eficaz, ¡tome esta cápsula!”

(2000 d. C.) “—Esta cápsula es pura química, ¡Tome esta planta!...”

(Guasch e Hinostroza, 2005)

AGRADECIMIENTOS

Al jurado asignado para la revisión de éste trabajo cuyos valiosos comentarios nos ayudaron a mejorar la versión final del mismo.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por habernos abierto las puertas de su laboratorio para el desarrollo de ésta tesis.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz, por su apoyo incondicional en la realización de éste trabajo.

Al QFB (y casi doctor) José Antonio Guerrero Analco, por su asesoría en la realización de los ensayos biológicos.

A la M. en C. Isabel Rivero Cruz, por su asesoría en la parte analítica y química.

A todos nuestros compañeros del Laboratorio 124

A la Unidad de Servicios en Apoyo a la Investigación (USAI). A la Q. Georgina Duarte, por el registro de los espectros de masas; a la M en C Rosa Isela del Villar por el registro de los espectros de RMN.

Al personal del Bioterio del Conjunto E de la Facultad de Química.

DEDICATORIAS

A mi padre: Rafael Brindis.

Por su apoyo, paciencia y por la oportunidad que me diste de terminar mis estudios profesionales.

A mis tías: María, Guadalupe, Elsa y Roció.

Por quererme, consentirme y creer en mí todo el tiempo.

A mis hermanas y primos: Mónica, Verónica, Oscar y Rodrigo.

Por dejarme la química a mí y estar conmigo siempre.

A Alejandro Urzúa:

Por que sin el este trabajo no seria lo que es y por que fue divertido trabajar contigo ¡Lo logramos!

A Dr. Fausto Rivero:

Por haberme concedido su tiempo, conocimientos y su disposición profesional para realizar este trabajo.

A Nancy, Azalea, Magdalena, Marcelino y Alejandro.

Por su amistad, apoyo y por dejarme ser parte de su grupo.

A Ricardo por persuadirme y animarme a ser QFB. Muy en especial a Belén G. por ser una excelente amiga a quien quiero mucho.

A todo el equipo del laboratorio 124:

Isabel, Blanca, Toño, Sergio, Paco, Laura, Araceli, Lupita, Gaby, Mario, Chavetti y Víctor, quienes me dieron su amistad sincera. Espero que me sigan soportando en la maestría.

A mí querida UNAM:

Porque me ha visto crecer y me ha dado los mejores amigos, maestros, momentos y recuerdos que llevaré siempre en mente.

Finalmente agradezco a la Dra. Rachel Mata: Por su ayuda, confianza y motivación durante mi estancia en su laboratorio y en la realización de este trabajo. Gracias.

FERNANDO BRINDIS HERNÁNDEZ

DEDICATORIA

A mis padres Habakuk y Alfredo, por ser un excelente ejemplo a seguir, y por enseñarme que con un poco de sacrificio y mucho amor se puede guiar con éxito a una familia.

A mis hermanas, Ariadna, Carmen, Jovita y Jacqueline, todas de una forma u otra, han compartido conmigo momentos muy especiales.

Al mejor amigo que he tenido: Alfredo, por ser el hermano que cualquiera hubiera deseado tener.

A mis sobrinas Maribel, Cristina y Alejandra, mi fuente de inspiración para esquivar con éxito los obstáculos que suelen aparecer. El dibujo que se muestra al final de esta dedicatoria, realizado por una de ellas, me acompañó durante la mayor parte de mi carrera, como un aliciente de superación.

A mi tía Donalda Hernández y a mi primo (y hermano) Edgar, porque a pesar de la distancia, siempre han formado parte de primordial de mi familia.

A Faustino, Sra. Aurora, Israel, Gaby, Nahomi y Lenni, por ser parte de mi familia, por su apoyo y amistad.

Al Sr. Margarito Suastegui Cañavera, por tu amistad y por la confianza que me brindaste muy por encima de la relación empleado-patrón.

A Benjamín Alarcón Loyola y su familia, que sin esperar nada a cambio siempre me recibieron con las puertas abiertas. Gracias Benjamín, por 10 años (y los que faltan) de inigualable amistad. Gracias Benjamín, Damián y Julio, por soportarme y compartir conmigo el gusto de vivir la música, la mejor forma de expresión que el ser humano puede tener.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química: por haberme permitido ser parte de ésta gran institución. Gracias a todos mis profesores, pues todos me dejaron una enseñanza en particular, especialmente al Dr. Victor Ugalde, quien no solo fue un gran maestro, sino es un buen amigo; y a la M. en C. Socorro Alpizar, quien siempre me ha brindado su apoyo.

A Fernando Brindis, por soportarme durante el desarrollo de ésta tesis, no te podrás quejar que además fue divertido trabajar en este proyecto.

A toda la gente con quien conviví durante mi estancia en el laboratorio 124: Isabel, Blanca, Toño, Sergio, Paco, Laura, Araceli, Mario, Chavetti, Victor, y muchos otros que ya no continúan en este lugar. Gracias a la Dra. Rachel Mata y al Dr. Fausto Rivero, por haber confiado en Fernando y en mí para la realización de esta investigación.

Al Dr. Carlos Mauricio Castro Acuña, gracias por la confianza que tuvo en mí durante mi estancia en su laboratorio; a la Dra. Aurora Ramos y muy en especial a la Sra. María Luisa Díaz del Valle, quien siempre me brindó su apoyo y amistad.

A mis compañeros en la Facultad de Química, del grupo 3 SADAPI generación 2000, a los QFB's, principalmente de las generaciones 2000 y 2001, son tantos que nombrarlos a todos resulta muy difícil: a Lupita, Gaby, Martín, Luis, Belén, Omar, Adrián, Edwin, Mariana, Alma, etc. etc. Muy en especial a Nancy, Magdalena y Azalia, con quienes he tenido la fortuna de convivir. A Damaris, por ser una amiga incondicional, y a quien le tengo mucho afecto.

Al Equipo Representativo de Béisbol de la Facultad de Química, que el proyecto que comenzamos hace unos cuantos años, ponga en alto el nombre de nuestra Facultad.

Finalmente, y no por eso menos importante, un agradecimiento muy especial a todas aquellas personas que directa o indirectamente, a conciencia o inconscientemente me colocaron obstáculos difíciles de atravesar, por que gracias a ellas, aprendí a levantarme a las adversidades y afrontarlas sin dejarme vencer.

Héctor Alejandro Urzúa Hernández.



INDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE DIAGRAMAS	VII
LISTA DE GRÁFICAS	VII
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE ESPECTROS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Compuestos Marcadores	4
1.2 Diabetes.	6
1.2.1 Generalidades.	6
1.2.2 Definición.	8
1.2.3 Tipos de Diabetes.	9
1.2.4 Complicaciones de la Diabetes.	10
1.2.5 Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2.	14
1.2.6 Productos Naturales Utilizados como Hipoglicemiantes.	14
1.3 Generalidades del Complejo Copalchi.	16
1.4 <i>Exostema caribaeum</i> .	16
1.4.1 Características Fitoquímicas y Etnobotánicas.	16

1.4.2 Actividad de las 4-fenilcumarinas.	20
1.4.3 Síntesis de 4-fenilcumarinas.	20
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	21
3. PARTE EXPERIMENTAL	24
3.1 Procedimientos Generales.	24
3.1.1 Análisis Cromatográficos.	24
3.1.2 Determinación de las Constantes Físicas, Espectroscópicas y Espectrométricas.	25
3.2 Material Vegetal.	26
3.3 Ensayos Biológicos.	26
3.3.1 Animales de Experimentación.	26
3.3.2 Inducción de Diabetes.	27
3.3.3 Determinación de Glucosa.	27
3.3.4 Administración de los Tratamientos.	29
3.3.5 Evaluación Aguda de la Actividad Hipoglicemiante del Extracto.	30
3.3.6 Evaluación Aguda de la Actividad Antihiper glucémica.	31
3.3.7 Evaluación Subaguda del Efecto Antihiper glucémico.	31
3.4 Estudio Fitoquímico de <i>Exostema caribaeum</i> .	34
3.4.1 Preparación del Extracto Íntegro.	34
3.4.2 Obtención de la 5-O-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4).	34

3.4.3 Fraccionamiento Primario del Extracto.	34
3.4.4 Aislamiento del Estigmasterol (14) a partir de la fracción primaria F004.	36
3.4.5 Estudio de la Fracción Primaria F011.	37
➤ Aislamiento de 5- <i>O</i> -β-D-glucosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15)	37
➤ Aislamiento de 5- <i>O</i> -β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4).	38
➤ Aislamiento de 5- <i>O</i> -β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8).	38
3.5 Obtención del Perfil Cromatográfico de <i>E. caribaeum</i> .	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Estudio Fitoquímico de la Especie <i>Exostema caribaeum</i> (Jacq.) Roem. et Schult.	38
4.1.1 Caracterización de los compuestos estigmasterol (14), 5- <i>O</i> -β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4), 5- <i>O</i> -β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8) y 5- <i>O</i> -β-D-glucosil-7-3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).	39
4.2 Obtención del Perfil Cromatográfico de <i>E. caribaeum</i> .	41
4.3 Ensayos Biológicos.	46
4.3.1 Evaluación Aguda de la Actividad Hipoglicemiante.	46

4.3.2 Evaluación Aguda de la Actividad Antihiperглиcémica.	49
4.3.3 Evaluación Subaguda del Efecto Antihiperглиcémico.	52
5 RESUMEN Y CONCLUSIONES	58
6. PERSPECTIVAS	60
7. BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXO DE ESPECTROS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Prevalencia de Diabetes a nivel mundial.	8
2	Principales complicaciones de la Diabetes.	13
3	Corteza de <i>Exostema caribaeum</i> .	17
4	Distribución en México de <i>E. caribaeum</i> .	119
5	Compuestos aislados de <i>E. caribaeum</i> .	21
6	Procedimientos generales de los ensayos con animales.	30
7	Cromatograma CLAR del extracto de <i>E. caribaeum</i> .	42
8	Cromatograma CLAR del 5-O-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina.	42
9	Cromatograma CLAR del 5-O-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina.	43
10	Cromatograma en capa fina del estigmasterol (14) y del extracto CH ₂ Cl ₂ -MeOH de <i>E. caribaeum</i> .	44
11	Cromatograma en capa fina de los compuestos aislados de <i>E. caribaeum</i> .	45

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Prevalencia de diabetes en las regiones de la OMS.	7
2	Patologías primarias que pueden inducir Diabetes.	12
3	Fármacos utilizados como hipoglicemiantes.	15
4	Características etnobotánicas y taxonómicas de <i>E. caribaeum</i> .	18
5	Fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto de <i>E. caribaeum</i> .	36
6	Fraccionamiento secundario de la Fracción primaria F011.	37
7	Condiciones de elución del perfil cromatográfico.	38
8	Metabolitos aislados de la especie <i>Exostema caribaeum</i> .	40
9	Porcentajes de variación de la glicemia en animales normoglicémicos.	48
10	Porcentajes de variación de la glicemia en animales diabéticos.	51
11	Efecto del extracto sobre los niveles de glucosa sanguínea en animales diabéticos.	56
12	Efecto del extracto sobre el peso corporal de animales diabéticos.	57

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de 5- <i>O</i> -β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4).	71
2	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de 5- <i>O</i> -β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8).	74
3	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de 5- <i>O</i> -β-D-glucosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).	77

LISTA DE ESPECTROS

Espectro		Página
1	Espectro de RMN- ¹ H de estigmasterol (14).	70
2	Espectro de RMN- ¹ H de 5- <i>O</i> -β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4).	72
3	Espectro de RMN- ¹³ C de 5- <i>O</i> -β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4).	73
4	Espectro de RMN- ¹ H de 5- <i>O</i> -β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8).	75
5	Espectro de RMN- ¹³ C de 5- <i>O</i> -β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8).	76

6	Espectro de RMN- ¹ H de 5-O-β-D-glucosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).	78
7	Espectro de RMN- ¹³ C de 5-O-β-D-glucosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).	79

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<i>Ad libitum</i>	A voluntad
<i>Per os</i>	Vía oral
AcOEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Å	Amstrongs
ANADEVA	Análisis de Varianza
ADA	Asociación Americana de Diabetes
cm	Centímetro
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
ICDRA	Conferencia Internacional de las Autoridades Reguladoras de Drogas
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
CG	Cromatografía de gases
CCF	Cromatografía en Capa Fina

CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
dL	Decilitro
δ	Desplazamiento químico
MODY	Diabetes de comportamiento del adulto que se presenta en el joven
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
d	Doblete
dd	Doblete dobleteado
eV	Electrovolts
EE	Error Estándar
EM-FAB	Espectroscopia de masas de Bombardeo de Átomos Rápido
EM-IE	Espectroscopia de masas de Impacto Electrónico
STZ	Estreptozotocina
HNF	Factor Nuclear de Hepatocito
IPF	Factor Promotor de la Insulina
F. M.	Fórmula Molecular

°C	Grado centígrado
g	Gramos
Hrs	Horas
IR	Infrarrojo
IP	Intraperitoneal
M ⁺	Ión molecular
Kg	Kilogramo
MeOH	Metanol
CD ₃ OD	Metanol deuterado
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetros
min	Minutos
MHz	Mega hertz
m	Múltiplete
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
P. M.	Peso Molecular

p. f.	Punto de Fusión
q	Quintuplete
m/z	Relación masa-carga
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
s	Singulete
TMS	Tetrametilsilano
t_R	Tiempo de retención
UV	Ultra Violeta
G_i	Valor de glicemia inicial
G_t	Valor de glicemia total

1. ANTECEDENTES

Los productos naturales han sido utilizados por el ser humano desde su aparición en el planeta, con diversos usos que van desde su alimento y vestimenta hasta su incorporación en los novedosos fitofármacos. Las plantas, han constituido la base para el desarrollo de la medicina tradicional desde hace miles de años (Guasch e Hinostroza, 2005; Mitscher *et al.*, 2000); los chinos, por ejemplo, han aportado sus conocimientos desde hace más de 4 000 años en el uso del antimalárico Chaáng Shan (*Dichroa febrifuga*) (Romo, 1999).

En México, el uso de plantas medicinales está ligado al desarrollo de las culturas prehispánicas, donde su comercialización fue de gran importancia (Legorreta, 1989). En las crónicas de la Nueva España, se relata el uso y comercialización de “Raíces y Hierbas medicinales” (Rodríguez, 1975). El registro más antiguo de las plantas medicinales, es el “Libellus” o “Códice Badiano”, escrito en 1522 en Náhuatl por Martín de la Cruz (de Tlatelolco), y traducido al latín por el indígena xochimilca Juan Badiano; sin embargo, el registro más importante que se conoce proviene de Francisco Hernández, quien llegó a la entonces Nueva España con la finalidad de identificar todas las yerbas, árboles y plantas medicinales existentes, y conocer que tipo de enfermedades curaban y cual era la forma de hacerlo, y como resultado de su estudio, logró describir 3076 plantas y sus usos medicinales (Argueta *et al.*, 1994; Romo, 1999).

Durante las últimas décadas, los sistemas tradicionales de medicina se volvieron un tema de importancia mundial, a pesar de los rápidos avances y proliferación de la medicina moderna (Shein, 2005). En algunos países desarrollados una gran proporción de la

población confía en las prácticas tradicionales y su recurso más importante, las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades en el cuidado de la salud primaria. Aunque la medicina alópata está disponible en estos países, los medicamentos herbolarios o fitomedicamentos, y en general las terapias alternativas y/o complementarias han mantenido su popularidad por razones históricas y culturales (Barnes, 2003; WHO *Monographs on Selected Medicinal Plants*, 1999; 2002). Estos productos son populares en países desarrollados como Alemania, Francia, Italia y los Estados Unidos, donde existen guías apropiadas para el registro oficial de estos fitofármacos (WHO *Monographs on Selected Medicinal Plants*, 1999; 2002).

Además, los preparados que incluyen productos derivados de plantas medicinales son ampliamente utilizados en los países en vías de desarrollo con una gran tradición en el empleo de plantas para el tratamiento de enfermedades.

Es importante destacar que se han evaluado científicamente muy pocas especies de plantas para su aplicación médica. Los datos de seguridad y eficacia están disponibles para unas cuantas especies de plantas, sus extractos e ingredientes activos, y las preparaciones que los contienen. En la mayoría de los países, el mercado de los fitomedicamentos está pobremente regulado, y frecuentemente éstos no están registrados ni controlados (WHO *Monographs on Selected Medicinal Plants*, 1999; 2002). La seguridad, calidad y eficacia de las plantas medicinales y fitomedicamentos por tanto, representa un problema importante en países industrializados y en vías de desarrollo. Tanto consumidores como profesionales en el cuidado de la salud necesitan hoy en día información autorizada y regulada sobre la

seguridad y eficacia de las plantas medicinales (Mitscher *et al.*, 2000; Shein, 2005; WHO *Monographs on Selected Medicinal Plants*, 1999; 2002).

Durante la cuarta Conferencia Internacional de las Autoridades Reguladoras de Drogas (ICDRA, por sus siglas en inglés) realizada en Tokio en 1986, se recopiló una lista de plantas medicinales, estableciendo especificaciones internacionales para el uso más apropiado de las plantas y preparaciones que contienen productos vegetales. Las guías para el aseguramiento de la calidad de los fitomedicamentos fueron posteriormente preparadas por la OMS y adoptadas por la sexta ICDRA en Ottawa Canadá en 1991. Como resultado de las recomendaciones de la ICDRA y en respuesta a los requerimientos de los Estados Miembros de la OMS de proveer fitomedicamentos seguros y efectivos para su utilización en los sistemas nacionales para cuidado de la salud, la OMS ha publicado dos volúmenes de monografías sobre plantas medicinales que reúnen 58 monografías de plantas medicinales (WHO *Monographs on Selected Medicinal Plants*, 1999; 2002).

Las plantas medicinales contenidas en estos volúmenes, fueron seleccionadas por un grupo de asesores en Beijing en 1994 y son ampliamente utilizadas en todas las regiones de la OMS, y para cada una existe suficiente información para sustentar su seguridad y eficacia (WHO *Monographs on Selected Medicinal Plants*, 1999; 2002).

La importancia de las monografías radica en:

- Proveer información científica sobre la seguridad, eficacia y control de calidad/aseguramiento de la calidad de plantas medicinales de amplio uso, para facilitar su uso apropiado en los Estados Miembros de la OMS;

- Proveer modelos para asesorar a los Estados Miembros de la OMS en el desarrollo de sus monografías o formularios para éstos u otros fitomedicamentos ; y
- Facilitar el intercambio de información entre los Estados Miembros de la OMS.

Cada monografía consta de dos partes. La primera parte consiste en un resumen farmacopéico para el aseguramiento de la calidad, que incluye rasgos botánicos, distribución, pruebas de identidad, requerimientos de pureza, ensayos químicos, y constituyentes activos o mayoritarios. La segunda parte resume las aplicaciones clínicas, farmacología, contraindicaciones, advertencias, precauciones, reacciones adversas potenciales y posología.

En México, se ha despertado un creciente interés por parte de las autoridades sanitarias en elaborar un registro de la inocuidad, eficacia y control de calidad de los medicamentos herbolarios, lo cual se ve reflejado con la publicación de la Primera Edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos en el año 2001, la cual contiene monografías de 82 plantas medicinales y aceites esenciales, en donde se describen sus características botánicas y fitoquímicas, además de los métodos generales de análisis que son utilizados para el aseguramiento de la calidad de los mismos.

1.1 Compuestos Marcadores

Como es prácticamente imposible evaluar a todos los constituyentes de una droga vegetal, el aseguramiento de la calidad se realiza por medio de procesos de estandarización, los cuales se basan en la identificación de cantidades definidas de un constituyente o grupo

de constituyentes en particular, llamados “compuestos marcadores” (Gaedcke y Steinhoff, 2003).

Los compuestos marcadores son definidos como un constituyente presente en una especie, que es característico de la misma, y que puede ser usado para garantizar la calidad de los productos naturales (Eisner, 2001). Entre los usos que pueden mencionarse para los compuestos marcadores podemos destacar:

Identificación. Los compuestos marcadores se encuentran restringidos a pocas especies, o a una sola parte de la planta. Cuando éstos se detectan en un material vegetal, ayudan a confirmar la identidad del mismo (Eisner, 2001).

Detección de adulteración. La ausencia de ciertos marcadores puede ser utilizada para asegurar que adulterantes conocidos no están presentes en el material vegetal (Eisner, 2001).

Indicadores de calidad del producto durante la manufactura, manejo y almacenamiento. Los compuestos marcadores sirven para el control de los procesos de manufactura, manejo y almacenamiento, ya que proveen de un análisis objetivo en el historial del material vegetal, durante los pasos de secado, molienda, extracción, empaclado y almacenamiento, donde el material puede ser expuesto al calor, humedad, oxígeno o contaminación microbiana, disminuyendo la calidad del material vegetal (Eisner, 2001).

Control de calidad de mezclas. Es posible determinar la cantidad de una planta en una mezcla indirectamente, a través del uso de compuestos marcadores. El uso de este

procedimiento requiere que el marcador contenido en la materia prima, se analice antes de mezclar con otros materiales, para que su contenido en la molienda se pueda determinar (Eisner, 2001).

Vida de anaquel. Los compuestos marcadores son utilizados en ocasiones como un indicador de la vida de anaquel del producto. La formulación, empaque y condiciones de almacenamiento pueden afectar la estabilidad del material vegetal. Al monitorear la degradación de los compuestos marcadores, los fabricantes pueden conocer la estabilidad cuando la calidad del producto comienza a deteriorarse y así establecer la vida de anaquel del producto (Eisner, 2001).

Control de la actividad farmacológica. En plantas donde los compuestos marcadores tienen la actividad farmacológica conocida, el compuesto marcador puede ayudar a asegurar que cada lote del producto tendrá el mismo efecto fisiológico (Eisner, 2001).

1.2 Diabetes.

1.2.1 Generalidades.

En la actualidad, la diabetes es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial que se agrava rápidamente. Su mayor impacto lo encontramos sobre adultos económicamente activos y en México se presenta cada vez con mayor frecuencia en sujetos jóvenes (OMS, 2004). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se calcula que aproximadamente 171 millones de personas padecen diabetes a nivel mundial (Tabla 1 y Figura 1). Aproximadamente 3.2 millones de muertes al año son atribuidas a esta enfermedad (OMS; Guerrero, 2005). En México se estima que hay entre ocho y diez

millones de enfermos, de los cuales, cerca del 30% ignora que padece esta enfermedad (Medina, 2005). La calidad de vida que presentan estos pacientes, tiende a deteriorarse rápidamente como consecuencia de las diversas complicaciones producidas por los altos niveles de glucosa, situación que se debe en gran medida a un control deficiente de la enfermedad debido a los altos costos que implica (Medina, 2005). Tan solo el tratamiento de esta enfermedad, que incluye consultas médicas, exámenes de laboratorio y medicamentos alópatas, puede llegar a tener un costo entre 1 800 y 4 000 pesos mensuales (Medina, 2005), implicando un fuerte impacto en la economía familiar.

Tabla 1. Prevalencia de diabetes en las regiones de la OMS.

Región (de acuerdo a la OMS)	Número aproximado de casos
África	7 000 000
América	33 000 000
Europa	33 000 000
Este del Mediterráneo	15 000 000
Pacífico oeste	36 000 000
Sureste Asiático	47 000 000
Total	171 000 000

Fuentes: OMS; Wild *et al*, 2004.



Figura 1. Prevalencia de Diabetes a nivel mundial. Fuente: OMS.

1.2.2 Definición.

La diabetes mellitus es un desorden metabólico caracterizado por hiperglicemia crónica debida a una deficiencia de insulina o una insuficiente efectividad de su acción. La glucorregulación es un complejo proceso fisiológico en el que fallas a diferentes niveles (trastorno en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas) conducen finalmente a una hiperglicemia (Cabrera *et al*, 2000).

La insulina es una hormona de naturaleza proteica que regula la producción de la glucosa por el hígado y el uso de la misma para la adecuada función celular (Hopkins, 2005).

1.2.3 Tipos de diabetes.

La OMS y el Comité de Expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), han clasificado a la diabetes en cuatro grupos: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2, diabetes gestacional, y otros tipos específicos de diabetes (Cabrera *et al*, 2000).

La diabetes mellitus tipo I (DMT1), también llamada insulino dependiente o diabetes juvenil, usualmente se manifiesta antes de los 30 años (niños y adolescentes) de forma repentina. Esta patología, se debe a un proceso de destrucción de las células beta del páncreas provocadas por alteraciones inmunológicas o de causa desconocida, y por la cual se requiere una dosis diaria de insulina para prevenir el desarrollo de cetoacidosis, coma y muerte (Cabrera *et al*, 2000; Garduño, 2001; Hopkins, 2005). Los síntomas comunes de la DMT1 incluyen: sed excesiva, hambre continua, necesidad excesiva de orinar, pérdida de peso sin motivo, respiración rápida y profunda, cambios en la visión y somnolencia o agotamiento excesivo. Estos síntomas pueden aparecer de forma repentina (OMS, 2004).

La diabetes mellitus tipo 2 o diabetes no insulino dependiente (DMT2), se presenta en un 90 a 95% de los casos de diabetes y se caracteriza por el trastorno tanto en la secreción (producción insuficiente por células beta del páncreas), como en la acción de la insulina (aprovechamiento inadecuado por el organismo); su manifestación es más gradual y los niveles de glucosa en sangre son más estables, sin embargo, se requiere el uso de agentes hipoglicemiantes orales, que son efectivos en el control de la diabetes, aunque no eliminan sus complicaciones (Garduño, 2001; Hopkins, 2005). Los pacientes con este tipo de diabetes, pueden tener síntomas parecidos a los que presentan los pacientes con DMT1,

pero menos obvios, e incluso algunos no presentan síntomas y sólo se les diagnostica después de varios años del inicio de la enfermedad (OMS, 2004).

La diabetes gestacional es una intolerancia a los carbohidratos que conduce a una hiperglicemia de intensidad variable durante el embarazo (OMS, 1999), y puede desaparecer después de concluida esta etapa, o bien puede desarrollarse diabetes.

La diabetes gestacional, así como los otros tipos específicos de diabetes, como por ejemplo la pancreatopatía fibrocalculosa (formalmente clasificada como diabetes mellitus que esta relacionada con la mala nutrición, es el tipo de diabetes en que los jóvenes diabéticos de países tropicales en desarrollo poseen una historia nutricional deficiente, y los síntomas difieren de los dos tipos de diabetes anteriores) (Garduño, 2001), son padecimientos menos frecuentes generados como consecuencia de una patología primaria. En la Tabla 2 se muestran algunas de las patologías primarias que pueden inducir diabetes (Cabrera, 2000; Goodman, 2001).

1.2.4 Complicaciones de la diabetes.

La diabetes es una enfermedad crónica o de largo término, y sus complicaciones están relacionadas directamente con los altos niveles de glucosa en sangre. Las complicaciones pueden separarse en dos tipos:

Enfermedades microvasculares (daño a vasos sanguíneos pequeños). La neuropatía, que afecta aproximadamente al 50% de los pacientes diabéticos, puede disminuir la sensibilidad y dañar las extremidades (OMS, 2005); cerca del 20-30% de pacientes con DMT1 o DMT2 desarrollan nefropatía diabética, ésta causa representa la tercera parte de los

casos de daños renales (Molitch *et al*, 2000). La retinopatía diabética es una de las mayores causas de ceguera y discapacidad visual. Después de padecer por 15 años diabetes, aproximadamente el 2% de los enfermos tiende a ceguera total y un 10% desarrolla severos impedimentos visuales (OMS, 2005). Los daños en los vasos sanguíneos y nervios provocan ulceraciones y subsecuentemente amputación de los miembros inferiores. La diabetes representa la causa más común de amputación no traumática, y se puede prevenir por una regular inspección y buen cuidado de los pies.

Tabla 2 . Patologías primarias que pueden inducir Diabetes.

<p>Defectos genéticos en la función de las células β</p> <p>Cromosoma 20, HNF4α (MODY1)</p> <p>Cromosoma 7, glucocinasa (MODY 2)</p> <p>Cromosoma 12, HNF1α (MODY3)</p> <p>Cromosoma 13, IPF-1 (MODY4)</p> <p>Mutación en el DNA mitocondrial</p>	<p>Defectos genéticos en la acción de la insulina</p> <p>Resistencia a insulina tipo A</p> <p>Síndrome de Rabson-Mendenhall</p> <p>Diabetes lipoatrópica</p> <p>Mutaciones sobre el gen del receptor de insulina</p>
<p>Daño en la función exócrina del páncreas</p> <p>Pancreopatía fibrocalculosa</p> <p>Pancreatitis</p> <p>Pancreatectomía</p> <p>Neoplasia</p> <p>Fibrosis quística</p> <p>Hemocromatosis</p>	<p>Endocrinopatías</p> <p>Síndrome de cushing</p> <p>Acromegalia</p> <p>Hipertiroidismo</p> <p>Somatostatina</p>
<p>Inducción por fármacos</p> <p>Ácido nicotínico</p> <p>Glucocorticoides</p> <p>Hormonas tiroideas</p> <p>Agonistas alfa adrenérgicos</p> <p>Agonista beta adrenergicos</p> <p>Tiazidas</p> <p>Estreptozotocina</p> <p>Pentamidina</p> <p>Vacor</p>	<p>Inducción por infecciones</p> <p>Rubéola congénita</p> <p>Citomegalovirus</p> <p>Asociado a síndromes genéticos</p> <p>Síndrome de Down</p> <p>Síndrome de Klinefelter</p> <p>Síndrome de Prader-Willi</p> <p>Síndrome de Turner</p>
<p>Formas no comunes mediadas por inmunidad</p> <p>Síndrome autoinmune a la insulina</p> <p>Anticuerpos contra el receptor de insulina</p> <p>Síndrome de "Stiff Man"</p>	

Dentro de los padecimientos más importantes que encontramos en los pacientes con diabetes encontramos a las enfermedades macrovasculares (daño a vasos sanguíneos grandes). Las complicaciones más frecuentes que aparecen después de varios años o décadas con diabetes. Entre estas complicaciones podemos destacar el síndrome metabólico y la enfermedad vascular periférica. En la Figura 2 se ilustran algunos de éstos padecimientos y los sistemas u órganos que afectan.

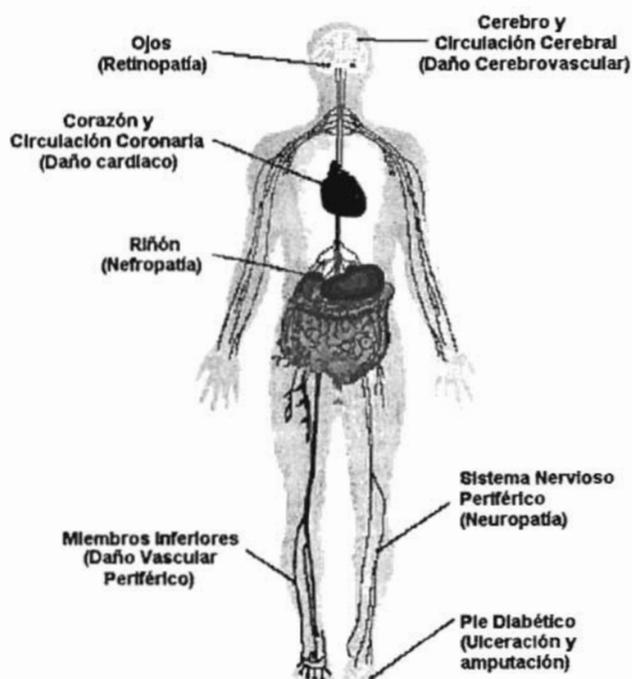


Figura 2. Principales complicaciones de la diabetes. Fuente: IDF, <http://www.atlas.idf.org>.

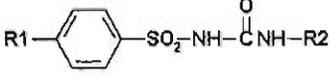
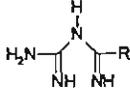
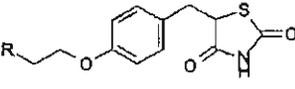
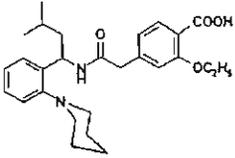
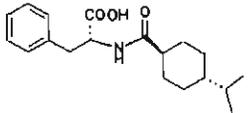
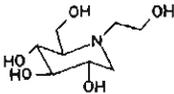
1.2.5 Tratamiento de la diabetes mellitus Tipo 2.

Aún cuando no se ha encontrado cura para la diabetes mellitus (exceptuando el trasplante de páncreas, realizado solo a pacientes de DMT1), se han buscado diversas alternativas para su control. Entre las alternativas que se tienen podemos destacar a la dieta y al ejercicio los cuales resultan ser suficientes para controlar los niveles de glucosa en DMT2. Sin embargo, cuando estas alternativas son insuficientes, se recurre el uso de hipoglucemiantes orales. En la Tabla 3 se resumen el tipo de fármacos, las estructuras químicas, los mecanismos de acción y la duración del efecto, de los 6 grupos de fármacos que se utilizan, de acuerdo a su naturaleza química.

1.2.6 Productos Naturales Utilizados como Hipoglicemiantes.

La disponibilidad y el empleo de medicamentos resultan de gran importancia para el éxito del tratamiento de una la diabetes. Por este motivo, en los últimos años se ha incrementado el uso de la medicina tradicional como una alternativa o complemento de las terapias alópatas (Legorreta, 1989), de hecho, el uso de una gran variedad de fitomedicamentos de la medicina tradicional en el mundo, ha jugado un papel muy importante en el tratamiento de DMT2 (Guerrero, 2005). Dentro de la medicina tradicional mexicana se cuenta con un gran número de especies destinadas al tratamiento de la diabetes, por ejemplo, especies que pertenecen a las familias Fabaceae, Asteraceae, Labiatae, Liliaceae, Poaceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, Rosaceae, Cactaceae, entre otras. Algunas especies de las familias Rubiaceae y Euphorbiaceae, pertenecen al complejo de la quina o complejo copalchi. (Garduño, 2001)

Tabla 3. Fármacos utilizados como hipoglicemiantes .

Tipo de Fármaco	Núcleo	Ejemplos	Mecanismo de acción	Duración aprox. del efecto
Sulfonilureas		Glibenclamida Tolbutamida Glimepirida	Estimulan la secreción de insulina en células β .	24 horas
Biguanidos		Metformina Fenformina	Disminuye la producción de glucosa de hígado e incrementa el consumo de la glucosa de la células	12 horas
Tiazolidinedionas		Pioglitazona Rosiglitazona	Disminuye la resistencia de las células a la acción de la insulina, y disminuye la producción de glucosa por el hígado.	16 a 34 horas
Meglitinidos		Repaglinida	Estimulan la liberación de insulina cerrando los canales de potasio dependientes de ATP en células β .	1 a 2 horas
Derivados de D-fenilalanina		nateglinida	Estimulan la secreción de insulina bloqueando los canales de potasio sensibles a ATP en células β .	
Inhibidores de la alfa-glucosidasa	Variable. Ejemplo: Miglitol. 	Acarbosa Miglitol	Inhiben la enzima alfa-glucosidasa en el intestino disminuyendo la absorción de carbohidratos.	1 hora

Fuentes: Goodman, 2001 y Hopkins, 2005.

1.3 Generalidades del complejo “copalchi”.

El complejo copalchi, también conocido como complejo quina, copalquim, cascarilla, etc., está formado por al menos 11 especies de árboles y arbustos dentro de las cuales destacan las siguientes rubiáceas: *Exostema caribaeum* (Pinto *et al*, 1997), *Exostema mexicanum* (Köhler *et al*, 2001) y *Hintonia latiflora* (Pinto *et al*, 1997; Anaya, 1991, Mata *et al*, 1992). La corteza de las plantas pertenecientes a este complejo (cualquiera de las plantas que lo integran o el conjunto de dos o más de ellas), han sido utilizadas en la medicina tradicional debido a que se le atribuyen usos contra el paludismo o malaria, padecimientos del hígado, bilis, vesícula, diabetes y para evitar la caída del cabello (Anaya, 1991). Estudios recientes han confirmado que algunas de las especies pertenecientes al complejo poseen actividad antimalárica (Noster y Kraus, 1990; Köhler *et al*, 2001) e hipoglicemiante o antidiabética (Pinto *et al*, 1997; Guerrero, 2005).

1.4 *Exostema caribaeum*

1.4.1 Características Fitoquímicas y Etnobotánicas.

Exostema caribaeum (Figura 3) es una de las 100 especies más comercializadas en México con fines curativos. En la Tabla 4, se resumen sus principales características taxonómicas y etnobotánicas. Noster y Kraus demostraron *in vitro* que el extracto de la corteza posee una potente actividad contra *Plasmodium falciparum* (Noster y Kraus, 1990). Además, su actividad como hipoglicemiante, solo se ha estudiado en el extracto etanólico del complejo copalchi (*Hintonia latiflora* y *Exostema caribaeum*). Éste extracto disminuyó significativamente los niveles sanguíneos de glucosa en ratas sanas (Pinto *et al*, 1997). En la Tabla 4 se resumen las características etnobotánicas y taxonómicas de *E. caribaeum*.

En la Figura 4 se ilustra el mapa de la distribución de *E. caribaeum* en la república Mexicana (Anaya, 1991).

Estudios fitoquímicos previos sobre *E. caribaeum* han permitido el aislamiento del polialcohol manitol (1) (Krebs y Griesinger, 1960) y de la exostemina (2) (Sánchez, 1969).

Estudios más recientes han reportado el aislamiento y caracterización del anisaldehído (3) y el β -sitosterol (García, 1987), y las 4-fenilcumarinas 5-*O*- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4), 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcumarina (5), 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (6), 5-*O*- β -D-galactosil-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (7), 5-*O*- β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8), 5-*O*-(6''-acetil)- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (9), 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina (10), 7,4'-dimetoxi-5'-hidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina (11) y 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina (12) (Mata *et al*, 1987; García, 1987; Mata *et al*, 1988). En la Figura 5 se ilustran las estructuras de los compuestos aislados a la fecha de *E. caribaeum*.

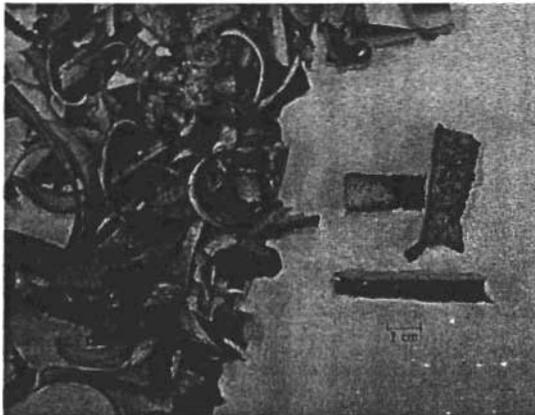


Figura 3. Corteza de *Exostema caribaeum*.

Tabla 4. Características etnobotánicas y taxonómicas de *E. caribaeum*.

Familia	Rubiaceae (Subfamilia Cinchonoideae)
Nombre Científico	<i>Exostema caribaeum</i> (Jacq.) Roem. et Schult.
Nombres vulgares	Copalche, copalchi (República Mexicana); chaktsi us ^a , sabac-ché ^a , (Yucatán); copalche de Jojutla (Morelia, Mich.); jocotillo de cerro (Tuxtla Gutiérrez, Chis); palo santo, copalti, falsa quina, copalchi de Jojutla, quina de Michoacán, copalchi de Michoacán, planta de la quina, zalacche, chactselis (Anaya, 1991; Argueta, 1994; Díaz, 1976; García, 1987; Sánchez, 1969; Pinto <i>et al</i> , 1997)
Descripción	Árbol con ramas horizontales y fuste recto, hasta de 10m de alto y 15cm de diámetro. Corteza escamosa café con manchas blanquecinas, fisuras longitudinales profundas y anchas de color casi negro, tronco todo cubierto de escamas, con fisuras transversales bien marcadas por lo que las escamas son rectangulares o cuadradas pero irregularmente distribuidas, lo que da apariencia de troncos viejos. Hojas pecioladas, ovaladas o elípticooblondas de 5 a 11cm de largo, acumniadas o agudas en la base. Flores solitarias de corola blanca en forma de campana. Fruto capsular ovalado elíptico de 1 a 1.5 cm de largo, de color café oscuro lustroso (Anaya, 1991; Argueta, 1994).
Distribución	Esta especie tropical se encuentra en las Indias Occidentales, Centro y Sudamérica (Mata <i>et al</i> , 1987; Nassar <i>et al</i> , 1980; Pinto <i>et al</i> , 1997). En México (Figura 1), se encuentra en Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tamaulipas y Yucatán (Anaya, 1991).
Usos	La infusión de la corteza se utiliza contra la malaria y también se usa para curar el dolor de estómago y fiebre (Anaya, 1991). En fomentos se utiliza contra granos, llagas y manchas (Argueta, 1994). También es usada para clarificar la sangre, contra úlceras, gastritis, disentería, mata amibas, solitarias, como agente antidiabético y como diurético (Anaya, 1991; Argueta, 1994; Díaz, 1977; Garduño, 2001).

^a Lengua Maya.



Figura 4. Distribución en México de *E. caribacum*.

1.4.2 Actividad de las 4-fenilcumarinas de *E. caribaeum*.

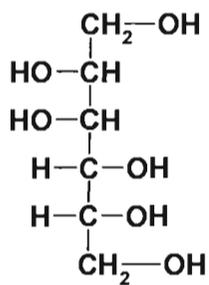
Se ha demostrado que la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina (10) posee actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa* y actividad antifúngica contra *C. albicans*, mientras que la 5-O-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4) (aislada de *H. latiflora*) presentó actividad antifúngica contra *C. albicans* (Rojas *et al*, 1992).

Además, se ha demostrado que la exostemina (2) y su derivado metilado (exostemina III) tienen actividad inhibitoria sobre la enzima fosfodiesterasa del AMPc (Kusano *et al*, 1991).

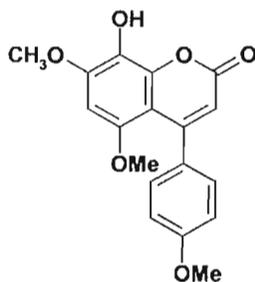
De manera adicional, Calera y colaboradores encontraron que la 5-O-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4) actúa como un inhibidor de la transferencia de energía en cloroplastos de espinacas, mientras que la 5-O-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8) actúa como desacoplador en cloroplastos de espinacas, inhibiendo la síntesis de ATP y la captación de protones (Calera *et al*, 1995; 1996).

1.4.3 Síntesis de 4-fenilcumarinas.

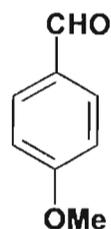
Debido a la gran relevancia que han alcanzado las 4-fenilcumarinas naturales, se ha reportado la síntesis de diversas moléculas con dicho núcleo. En el caso de las 4-fenilcumarinas de *E. caribaeum* se ha reportado la síntesis de la exostemina (2) (Mukerjee *et al*, 1968), además de la 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcumarina (5) y la 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (6), (Bose y Banerji, 1990; Bose y Banerji, 1991).



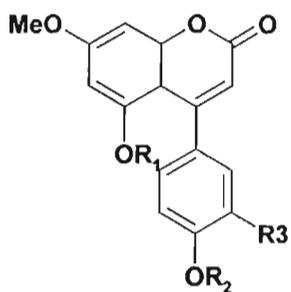
(1)



(2)

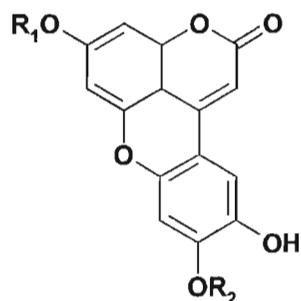


(3)



R_1 R_2 R_3

4	β -D-gal	H	OH
5	Me	Me	H
6	H	Me	OH
7	β -D-gal	Me	H
8	β -D-glu	H	OH
9	6''-acetyl- β -D-gal	H	OH



R_1 R_2

10	H	H
11	Me	Me
12	Me	H

Figura 5. Compuestos aislados de *E. caribaeum*.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En los últimos años se ha observado un creciente interés por la investigación de las plantas medicinales en el mundo y hoy presenciamos un resurgimiento de “medicamentos herbolarios” novedosos en Europa, Asia y Estados Unidos de América del Norte. La mayoría de estos productos que se comercializan a nivel industrial, provienen de plantas de reconocido uso en la medicina popular (Lozoya, 1993).

El crecimiento anual en el consumo de medicamentos herbolarios ha sido constante en las últimas décadas. En 1992 fue del 15% en la Comunidad Europea; 8% en el resto de Europa; 12% en América del Norte y el suroeste de Asia, y de un 15% en Japón, India y Pakistán. El incremento anual para este consumo se estima en 8% para la comunidad Europea; 12% para el resto de Europa; 10% para Norteamérica y el suroeste asiático y 15% para Japón, Pakistán e India (Hersh, 1996). Es importante destacar que, la mitad del gasto europeo en fitomedicamentos corresponde a Alemania; este país corresponde a uno de los principales centros de comercio de plantas medicinales en el mundo (Hersh, 1996). Para el registro oficial de medicamentos herbolarios en Europa se requiere la elaboración de una monografía que incluya los siguientes aspectos: una descripción detallada de las propiedades curativas del medicamento, estudios farmacológicos, químicos, toxicológicos y clínicos de las plantas medicinales que integran el producto o, en su caso, de la preparación propuesta. Deberá documentarse también, si existen riesgos por sobre dosificación, las posibles contraindicaciones y los efectos indeseables. Cabe hacer notar que los aspectos de

tipo fitoquímico son indispensables para el procedimiento de manufactura y estandarización de la preparación (WHO, *Monographs on selected medicinal plants*, 1999; 2002).

México no se encuentra exento de esta influencia, y en el año 2001 la Secretaría de Salud publicó la primera Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, con el objeto de dar a conocer los métodos de análisis y las especificaciones técnicas que deberían cumplir las plantas y los fitomedicamentos derivados de ellas, que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios.

Con base en las consideraciones anteriores, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo primordial establecer los compuestos marcadores y la evaluación del potencial hipoglicemiante del extracto de *Exostema caribaeum*. Esta especie es ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana por sus propiedades antidiabéticas. Se espera que los resultados derivados del presente trabajo constituyan la base para establecer estrategias que permitan evaluar la calidad de la droga cruda derivada de la especie *E. caribaeum*, y que permitan elaborar una monografía que eventualmente se incorpore a una nueva edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Ésta monografía debe contener, además de los procedimientos de control de calidad, la información científica relacionada con la seguridad y eficacia de la especie medicinal *E. caribaeum*. La monografía así integrada servirá para establecer de manera eficiente las regulaciones sanitarias correspondientes por parte de las autoridades de salud.

Para el cumplimiento del objetivo de este proyecto, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Determinar la composición del extracto total de *E. caribaeum*.
- Desarrollar el método analítico por CLAR para separar los diferentes componentes del extracto.
- Aislar los componentes mayoritarios del extracto de *E. caribaeum*.
- Establecer los compuestos marcadores extracto de *E. caribaeum*.
- Evaluar la actividad antidiabética potencial de la especie *E. caribaeum*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Procedimientos Generales.

3.1.1 Análisis Cromatográficos.

La cromatografía por adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM). La cromatografía en columna de exclusión se realizó usando 100 g de Sephadex LH-20, de 50 cm de altura y 2.5 cm de diámetro, y se eluyó de forma isocrática con MeOH.

Los análisis de cromatografía en capa fina analítica (CCF), se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución. La CCF se realizó sobre placas de aluminio con diferentes dimensiones, recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. La visualización de las placas se realizó con luz UV (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm), y posteriormente se revelaron con sulfato cérico amoniacal, seguido de calentamiento (110 °C aprox.) hasta visualización de los compuestos.

Los análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) se realizaron en un Cromatógrafo Waters 600 (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, EUA) acoplado a un detector de absorbancia UV Waters 2487 Dual o un detector PDA Waters 996, y se utilizó una Columna Waters Symmetry® C₁₈ (tamaño de partícula 5 µm, 100 Å), de 4.6 x 250 mm. Los analitos se prepararon disolviendo 1 mg de muestra en 500 µL de metanol se inyectaron en un volumen de 10 µL. Los espectros se

registraron utilizando las longitudes de onda 254 y 280 nm, y se procesaron mediante un programa de software Millennium 32 (Waters). Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente.

3.1.2 Determinación de las Constantes Físicas, Espectroscópicas y Espectrométricas.

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fisher-Johns, y no se encuentran corregidos. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro FTIR de rejilla Modelo 1605 marca Perkin-Elmer, o en un aparato Nicolet FT-5X en pastilla o en película. Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico (EM-IE) se determinaron en un aparato JEOL JMS-SX102A Hewlett-Packard 5890 serie II mediante introducción directa a 70 eV y bombardeo de átomos rápidos (EM-FAB). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) y de Carbono 13 (RMN-¹³C) se generaron en un aparato Unity-Inova, marca Varian, el cual se operó a una radiofrecuencia de 300 y 75 MHz respectivamente. Los espectros se realizaron en CDCl₃, CD₃OD y los desplazamientos químicos se designaron en unidades δ (ppm), referidas al tetrametilsilano (TMS).

Los análisis de arriba indicados se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

3.2 Material vegetal.

La recolección del material vegetal (corteza) de *Exostema caribaeum*, se realizó en Temalac, Municipio de Atenango del Río, Guerrero, en enero de 2003.

La recolección e identificación de la especie fue realizada por el Dr. Paul Hersch Martínez del Jardín Botánico del Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH). Un ejemplar de referencia (voucher 153) se depositó en la colección botánica del herbario del Jardín Botánico del INAH, Cuernavaca, Morelos.

3.3 Ensayos Biológicos.

3.3.1 Animales de Experimentación.

Para los ensayos de diabetes se utilizaron poblaciones homogéneas de *Rattus norvegicus* machos cepa Wistar, de 55-60 días de edad y peso de 180-220 g, procedentes del Centro UNAM-Harlan (Harlan México).

Todos los procedimientos que involucraron a estos animales y sus cuidados se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" y con las reglas internacionales sobre cuidado y uso de animales de laboratorio. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio con alimento y agua *ad libitum*.

3.3.2 Inducción de Diabetes.

Todos los animales fueron pesados en balanza granataria antes de la administración del diabetógeno. La diabetes mellitus fue inducida de acuerdo a un modelo conocido , con una inyección IP de estreptozotocina (STZ) (50 mg/Kg; Sigma. St. Louis, MO) preparada inmediatamente antes de su administración, disuelta en una solución amortiguadora de citratos a pH = 4.5, en un volumen de 1 mL/Kg. Siete días después de la administración, se registraron los niveles de glucosa sanguínea en los animales. Se consideraron diabéticas todas las ratas con niveles de glucosa mayores a 250 mg/dL (Sharma, 1997).

3.3.3 Determinación de Glucosa.

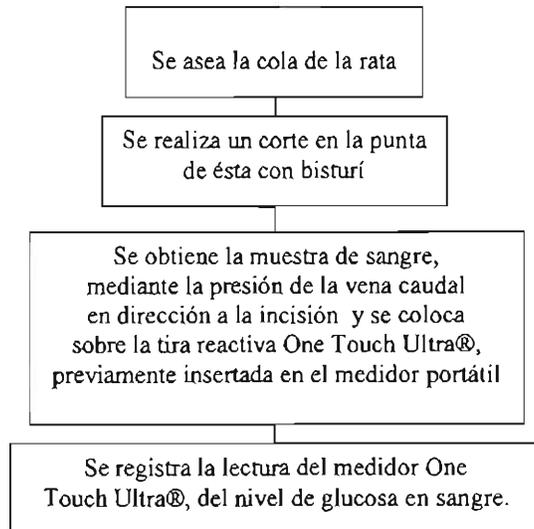
Las muestras de sangre requeridas para los ensayos biológicos durante la evaluación del efecto hipoglicemiante, se tomaron de la vena caudal, mediante una incisión en el extremo de la cola de los animales de experimentación, como se describe el diagrama 1. El corte se realizó con bisturí, previamente desinfectado con algodón impregnado en alcohol etílico, aproximadamente a 2 mm del extremo de la cola. La determinación de glucosa sanguínea se realizó utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra®, Jonhson-Jonhson) (Figura 3-B).

Los datos experimentales de los niveles de glucosa sanguínea se procesaron para obtener los porcentajes de variación de glicemia con respecto al nivel inicial, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de variación de glicemia} = \frac{G_t - G_i}{G_i} \times 100$$

Donde G_i es el valor de la glicemia inicial y G_t es el valor de la glicemia al tiempo de determinación (horas o días) posterior a la administración del extracto (Sharma, 1997). El porcentaje de variación de la glicemia fue graficada con respecto al tiempo de medición conjuntamente. Todas las gráficas se realizaron con el programa computacional Sigma Plot para Windows Versión 4.01 (SPSS Inc.), mientras que el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett se realizó con el programa computacional Sigma Stat para Windows Versión 2.03 (SPSS Inc.).

Diagrama 1. Obtención de la muestra de sangre para el análisis del nivel de glucosa.



3.3.4 Administración de los Tratamientos.

Para todos los ensayos, el extracto fue preparado para administrarse en un volumen de 0.5 mL/100g de peso, utilizando 2 gotas de Tween 20 y utilizando como diluyente agua destilada.

Como testigo se utilizó el hipoglicemiante comercial Glibenclamida (10 mg/Kg; Sigma, St. Louis, MO) (Sharma, 1997), preparado de la misma forma que el extracto. Los controles se prepararon utilizando únicamente 2 gotas de Tween 20 y agua destilada.

El extracto, testigo y controles, fueron preparados inmediatamente antes de los experimentos. La administración de los tratamientos, se realizó *per os*, por medio de una sonda nasogástrica infantil de látex FR8, como se muestra en la figura 3-C.

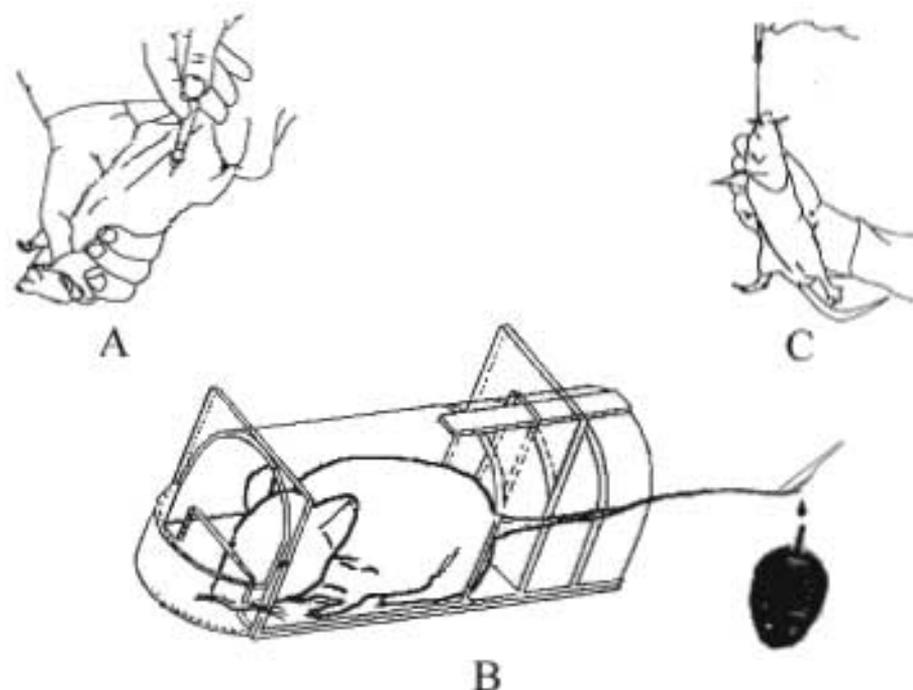


Figura 6. Procedimientos generales de los ensayos con animales. A: administración intraperitoneal. B: Determinación de glucosa. C: Administración intragástrica.

3.3.5 Evaluación Aguda de la Actividad Hipoglicémica del Extracto.

Se utilizaron 40 ratas, distribuidas aleatoriamente en grupos de 6 animales. Se prepararon con 18 horas de ayuno y agua *ad libitum* en jaulas individuales. El procedimiento de administración de los agentes y la medición de glucosa en sangre para este ensayo se realizó como se muestra en el diagrama 2.

3.3.6 Evaluación Aguda de la Actividad Antihiperglucémica.

Se utilizaron 36 ratas, diabetizadas como se indica en los procedimientos generales. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 6 y se prepararon con 18 horas de ayuno y agua *ad libitum* en jaulas individuales. El procedimiento de administración de los agentes y la medición de glucosa en sangre para este ensayo se realizó como se muestra en el diagrama 3.

3.3.7 Evaluación Subaguda del Efecto Antihiperglucémico.

Se utilizaron 24 ratas, de las cuales 18 fueron diabetizadas con STZ. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos de 6 ratas cada uno. Los grupos se nombraron como control positivo, testigo y extracto íntegro. Un cuarto grupo se añadió al experimento, el cual se formó con ratas sin diabetizar (control negativo).

Las ratas de cada grupo fueron administradas diariamente en la mañana y en la tarde durante 30 días. El extracto íntegro se administró a una dosis de 50 mg/kg. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura, con ciclos luz-oscuridad de 12 horas, y acceso libre a alimento y agua.

La determinación de glucosa en sangre y peso corporal se realizó al inicio del experimento, y a los 3, 7, 10, 12, 15, 21 y 30 días posteriores a la administración de los tratamientos. Los resultados de glucosa sanguínea se procesaron sin calcular % de variación de glicemia.

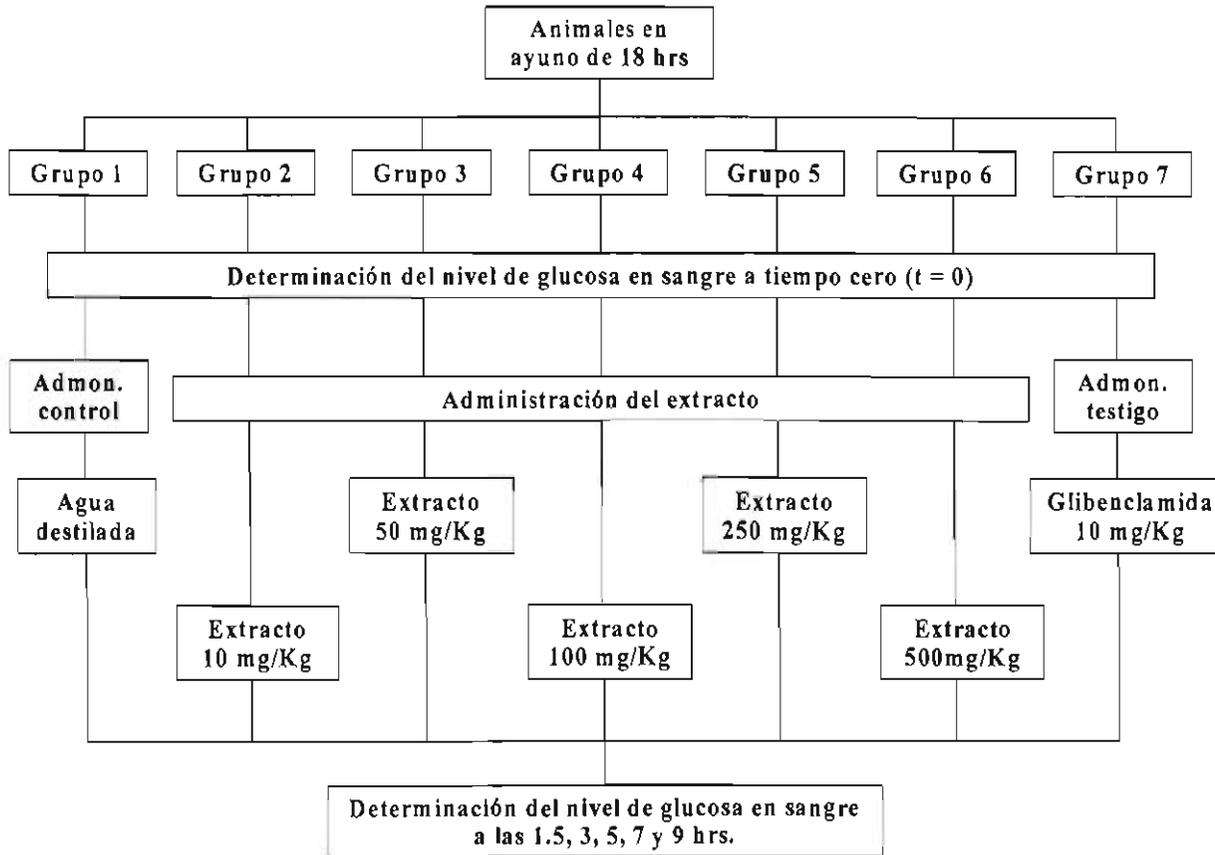


Diagrama 2. Evaluación de la actividad hipoglicemiante.

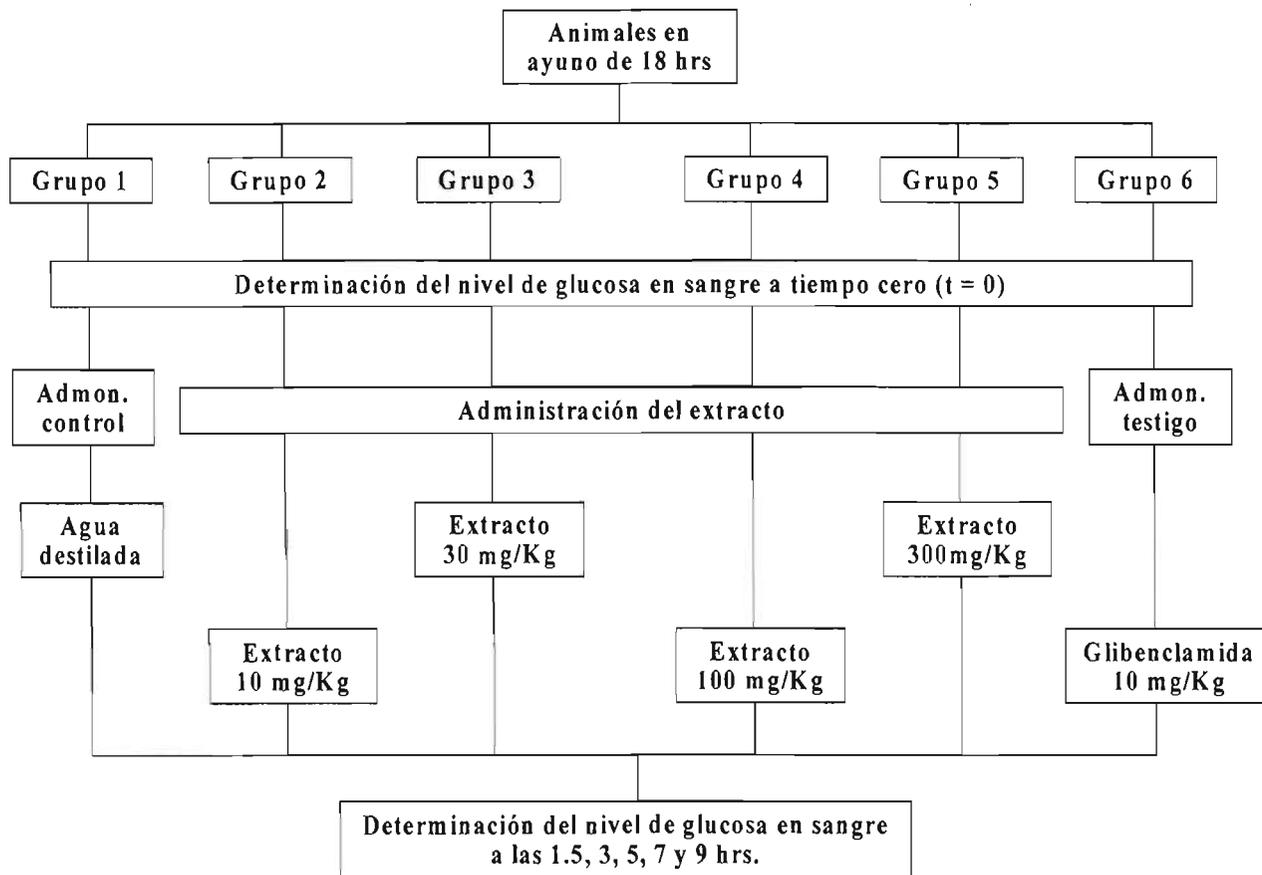


Diagrama 3. Evaluación de la actividad antihiper glucémica.

3.4 Estudio Fitoquímico de *Exostema caribaeum*.

3.4.1 Preparación del Extracto Íntegro.

El proceso de desecación se realizó a temperatura ambiente. Una vez seco, se molió en un molino de cuchillas Modelo Willey 4.

El extracto se preparó a partir del material vegetal seco y molido (1.2 Kg), mediante un proceso de maceración utilizando una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH en proporción 1:1. El extracto resultante se filtró y se concentró al vacío obteniéndose 272.6 g de un residuo color café claro.

3.4.2 Obtención de la 5-O- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4).

El residuo obtenido del proceso de maceración y concentración, se intentó disolver en CH_2Cl_2 -MeOH (1:1), para su fraccionamiento primario. De este proceso precipitó espontáneamente un residuo color crema, el cual fue separado por filtración al vacío y se limpió por medio de múltiples lavados con MeOH. Este precipitado se identificó como 5-O- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4) mediante comparación con muestra auténtica, en métodos espectroscópicos y espectrométricos.

3.4.3 Fraccionamiento Primario del Extracto.

Las aguas madres resultantes de la precipitación, se sometieron a un fraccionamiento primario utilizando gel de sílice como fase estacionaria (2.6 Kg). El proceso de elución se realizó utilizando hexano, mezclas de hexano- CH_2Cl_2 (diversas proporciones), CH_2Cl_2 , mezclas de CH_2Cl_2 -MeOH (diversas proporciones) y MeOH. Este

proceso generó 196 eluatos, los cuales se analizaron por CCF, reuniéndose las que resultaron similares cromatográficamente, y se obtuvo un conjunto de 12 fracciones primarias (F001-F012). En los eluatos 143-153, precipitó espontáneamente un residuo café, con características similares en CCF, para todos los eluatos, los cuales se juntaron y se les asignó la clave F013. En el Diagrama 4 se resume el proceso de extracción y fraccionamiento primario, y en la Tabla 5 se resume el proceso cromatográfico del fraccionamiento primario del extracto.

Diagrama 4. Extracción y fraccionamiento primario de *Exostema caribaeum*.

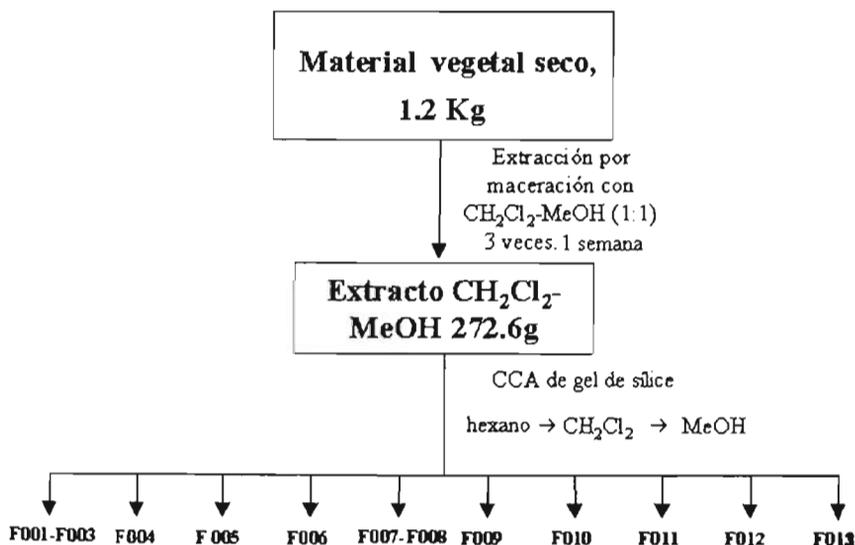


Tabla 5. Fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto de *E. caribaeum*.

Fase móvil	Proporción	Eluatos	Fracciones reunidas	Clave
hexano-CH ₂ Cl ₂	1:1	1-16	1-7	F001
hexano-CH ₂ Cl ₂	4:6	17-32	8-14	F002
hexano-CH ₂ Cl ₂	3:7	33-56	15-39	F003
hexano-CH ₂ Cl ₂	2:8	57-72	40-96	F004
hexano-CH ₂ Cl ₂	1:9	73-94	97-123	F005
CH ₂ Cl ₂		95-110	124-127	F006
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:5	111-126	128-141	F007
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	9:1	127-142	142	F008
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	8:2	143-158	143-147	F009
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	6:4	159-174	148	F010
CH ₂ Cl ₂ -MeOH	1:1	175-190	149-174	F011
MeOH		191-196	175-196	F012
			143-153 (pp)	F013

3.4.4 Aislamiento del Estigmasterol (14) a partir de la fracción primaria F004.

Se realizó el fraccionamiento secundario de la fracción primaria F004 (2.5176 g), por medio de cromatografía en columna abierta, utilizando gel de sílice (81 g) como fase estacionaria, y un gradiente hexano, mezclas de hexano-AcOEt, mezclas de AcOEt-MeOH, y MeOH como fase móvil. Este proceso generó un conjunto de 10 fracciones secundarias. La fracción F004-II se sometió a una recromatografía en columna abierta utilizando sephadex (50 x 2.5 cm) y como eluyente MeOH. De la fracción 5, cristalizó de manera espontánea un compuesto con punto de fusión de 133-135°C, que se identificó como estigmasterol (14), por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas de una muestra auténtica.

3.4.5 Estudio de la Fracción Primaria F011.

El fraccionamiento secundario de la fracción primaria F011 (89 g), se realizó mediante cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice (780 g) como fase estacionaria, y AcOEt-MeOH (1:0) → AcOEt-MeOH (1:0) como fase móvil (Tabla 5). Durante éste proceso se obtuvieron precipitados en algunos de los eluatos, los cuales, al compararse por CCF, generaron un conjunto de 5 fracciones de precipitados (Tabla 6).

Una cantidad idéntica de fracción primaria F011, fue fraccionada utilizando las mismas condiciones de fraccionamiento, generando los precipitados que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Fraccionamiento secundario de la Fracción primaria F011.

Fase móvil	Proporción	Eluatos	Precipitados reunidos 1ra columna	Precipitados reunidos 2da columna
AcOEt-MeOH	9:1	1-11	7-10	2'
AcOEt-MeOH	85:15	12-18	12	6'-10'
AcOEt-MeOH	8:2	19-24	14-16	11'-12'
AcOEt-MeOH	7:3	25-31	17-18	12'-13'
AcOEt-MeOH	1:1	32-33	23	14'-17'
MeOH		34-35		23'-24'

➤ Aislamiento de 5-O-β-D-glucosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).

Al precipitado obtenido en la 1ra columna (7-10), se sometió a una cromatografía de exclusión con Sephadex, de la cual se generó un conjunto de 4 fracciones terciarias. La fracción terciaria 3 se hizo pasar nuevamente por una columna de Sephadex, generando 10 nuevas fracciones, de las cuales, la fracción 7 se colocó nuevamente en columna de Sephadex, obteniéndose 4 fracciones, de las cuales, en la fracción 3 se obtuvieron cristales color ámbar con punto de fusión de 198°C.

➤ **Aislamiento de 5-O-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4).**

El precipitado de la fracción 12, se purificó mediante una cromatografía de exclusión con Sephadex, obteniéndose cantidades adicionales de 5-O-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4), como un polvo fino color crema, con punto de fusión de 246-248°C.

➤ **Aislamiento de 5-O-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8).**

Se sometió a la fracción 6'-10'a un fraccionamiento terciario mediante cromatografía en columna abierta con gel de sílice (230 g), con un gradiente de elución AcOEt-MeOH, y se generaron un conjunto de 4 fracciones terciarias. De la fracción 3 se obtuvo un precipitado de color crema, con punto de fusión de 252-254°C..

3.5 Obtención del Perfil Cromatográfico de *E. caribaeum*.

El perfil cromatográfico fue realizado utilizando el extracto íntegro, además de los compuestos 4 y 8, y se identificaron los picos correspondientes a dichos compuestos dentro del espectro cromatográfico en CLAR del extracto. Todas las muestras se inyectaron en el cromatógrafo como se indica en los procedimientos generales y con las condiciones que se muestran en la tabla 6. Los disolventes empleados en los sistemas de elución, fueron acidificados al 0.1% con ácido acético glacial.

Tabla 7. Condiciones de elución del perfil cromatográfico.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% ACN	% H ₂ O	Curva
0	0.35	20	80	
15	0.35	20	80	6
30	0.35	100	0	8
35	0.35	20	80	6

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio Fitoquímico de la Especie *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem. et Schult.

La selección primaria de la especie *E. caribaeum* se realizó con base en criterio de tipo etnomédico, el cual constituye uno de los criterios más importantes para seleccionar las materias primas destinadas al descubrimiento de compuestos biológicamente activos (Cox y Balick, 1994; Houghton, 1999; Fabricant y Farnsworth, 2001, *inter alia*). La especie *E. caribaeum* es utilizada de la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diabetes (Calzada, 1987; Garduño, 2001). Además, esta especie es utilizada en el tratamiento de la malaria, dolores de estómago y la fiebre (Anaya, 1991). También se le recomienda para el tratamiento de úlceras, gastritis, disentería, amibiasis, llagas y granitos y para matar solitarias (Anaya, 1991; Martínez, 1989). Posteriormente, durante la realización de los ensayos biológicos utilizando el extracto CH₂Cl₂-MeOH (1:1) de *E. caribaeum*, se estableció que esta especie constituye una fuente potencial de compuestos con una actividad antidiabética.

Con base en los resultados obtenidos en las evaluaciones biológicas, se realizó el estudio fitoquímico de *E. caribaeum* con la finalidad de aislar y establecer los compuestos marcadores que permitieran ayudar durante el proceso de identificación de la especie *E. caribaeum*.

La preparación del extracto activo en gran escala se realizó mediante un proceso de maceración, tal como se indicó en la Parte Experimental (3.4.1). Posteriormente, el extracto resultante se sometió a un fraccionamiento primario mediante cromatografía en

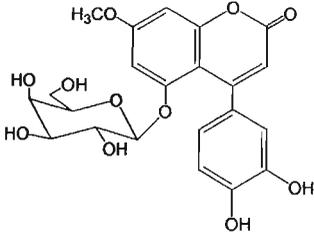
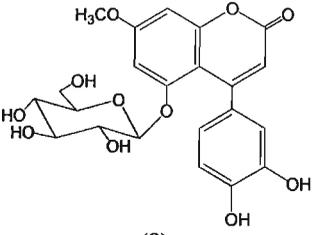
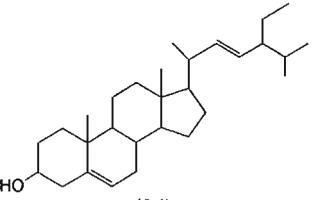
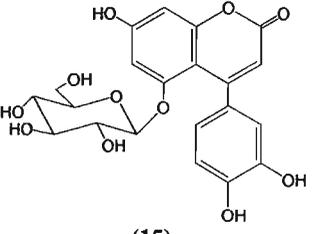
columna abierta utilizando gel de sílice como adsorbente, y como sistema de elución hexano, mezclas de hexano-AcOEt, mezclas de AcOEt-MeOH, y MeOH. Este proceso permitió obtener un conjunto de 12 fracciones primarias. De manera adicional, se obtuvo un polvo que precipitó espontáneamente en las fracciones intermedias.

Las fracciones primarias F004 y F011 se sometieron a fraccionamientos secundarios por métodos cromatográficos para aislar los compuestos mayoritarios de cada una de estas fracciones (Parte Experimental, 3.4.4, 3.4.5 y 3.4.6). Como resultado de este proceso fue posible aislar los compuestos estigmasterol (**14**), 5-*O*-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**4**) y 5-*O*-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**8**). En la tabla 8 se presentan las estructuras de los compuestos identificados y sus rendimientos con base en el peso de la droga cruda.

4.1.1 Caracterización de los compuestos estigmasterol (14**), 5-*O*-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**4**), 5-*O*-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**8**) y 5-*O*-β-D-glucosil-7-3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**15**).**

Los productos estigmasterol (**14**), 5-*O*-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**4**), 5-*O*-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**8**) y 5-*O*-β-D-glucosil-7-3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**15**), se caracterizaron por comparación de las constantes físicas y espectroscópicas con las descritas previamente en la literatura. En el Anexo se proporcionan las constantes físicas y espectroscópicas de éstos productos.

Tabla 8. Metabolitos aislados de la especie *Exostema caribaeum*.

Estructura	Rendimiento (%)
 <p>(4)</p>	2.6
 <p>(8)</p>	2.8×10^{-2}
 <p>(14)</p>	2×10^{-3}
 <p>(15)</p>	7.8×10^{-3}

Con la finalidad de contribuir a la elaboración de una monografía farmacopéica de la especie *Exostema caribaeum* se determinó la composición de su extracto de CH₂Cl₂-MeOH (1:1), mismo que presenta actividad antidiabética moderada. El análisis se realizó por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAR). Posteriormente se seleccionaron los constituyentes más relevantes, los cuales fueron establecidos como los compuestos marcadores y se procedió a desarrollar un método que permitiera separar los componentes mayoritarios del extracto.

4.2 Obtención del Perfil Cromatográfico de *E. caribaeum*.

Para desarrollar el método analítico por CLAR se aplicó una estrategia similar a las descritas en la literatura (García, 2005). Considerando que el extracto obtenido a partir de la especie *E. caribaeum* es poco soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos y que sus constituyentes son compuestos de bajo peso molecular, se decidió utilizar columnas de fase reversa utilizando diferentes sistemas de elución.

La concentración del extracto se ajustó para tener un rango de respuesta menor a 2.0 unidades de absorbancia. De esta forma se empleó una concentración de extracto de 1.0 mg/mL de extracto en metanol.

El método analítico que se seleccionó fue aquel que permitió la mejor separación de los compuestos 4 y 8 y con un tiempo de corrida corto (>30 minutos)

El registro del cromatograma por CLAR del Extracto de *E. caribaeum* (Figura 8), permite observar dos picos cromatográficos, los cuales corresponden a los compuestos mayoritarios contenidos en el material vegetal utilizado, con t_R de 15.5 y 25.0 min, respectivamente.

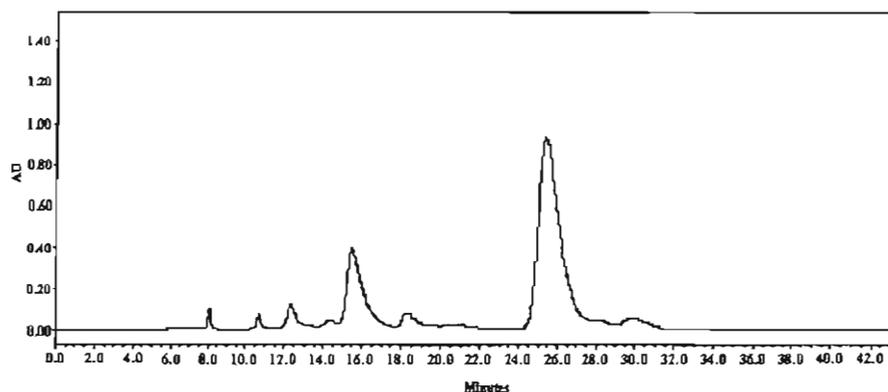


Figura 7. Cromatograma CLAR del extracto de *E. caribaeum*.

En el cromatograma CLAR del compuesto (4) (Figura 9), se registró un pico cromatográfico con t_R de 25 min, comparable a la señal mayoritaria con mayor t_R del cromatograma del extracto de *E. caribaeum* y que corresponde a 5-*O*- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina.

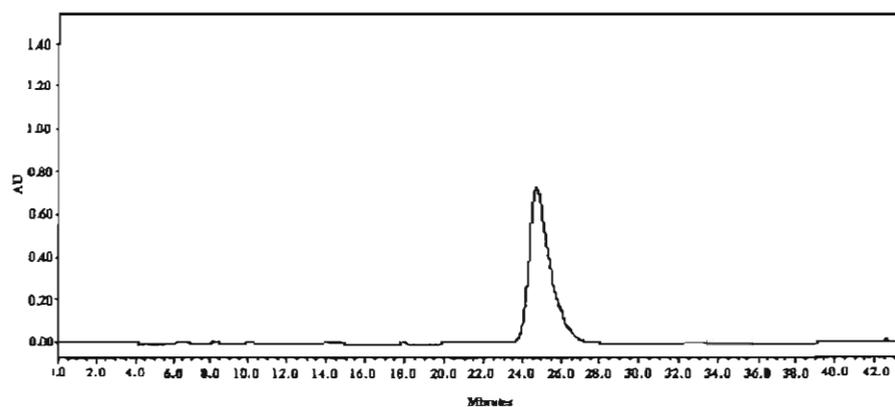


Figura 8. Cromatograma CLAR del 5-*O*- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina.

En el registro del cromatograma de CLAR del compuesto (8) (Figura 10), se observa una señal con un tiempo de retención de 15.5 minutos, similar a la primera señal mayoritaria obtenida en el cromatograma del extracto de *E. caribaeum*, la cual corresponde al 5-O-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina.

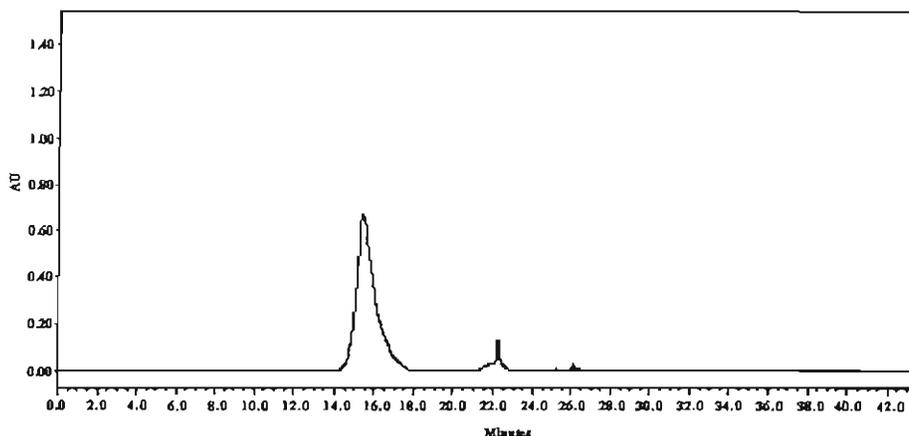


Figura 9. Cromatograma CLAR del 5-O-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina.

Estos resultados permitieron corroborar que las 4-fenilcumarinas 5-O-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4) y 5-O-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8) representan los compuestos más abundantes dentro del extracto. Con base en los resultados anteriores, las fenilcumarinas 4 y 8 se seleccionaron como los compuestos marcadores de la especie.

De manera adicional, dentro del aseguramiento de la calidad de las plantas medicinales, la prueba de identificación es importante. En la prueba de identificación se consideran el ensayo de identidad química (huellas digitales), el cual se establece por

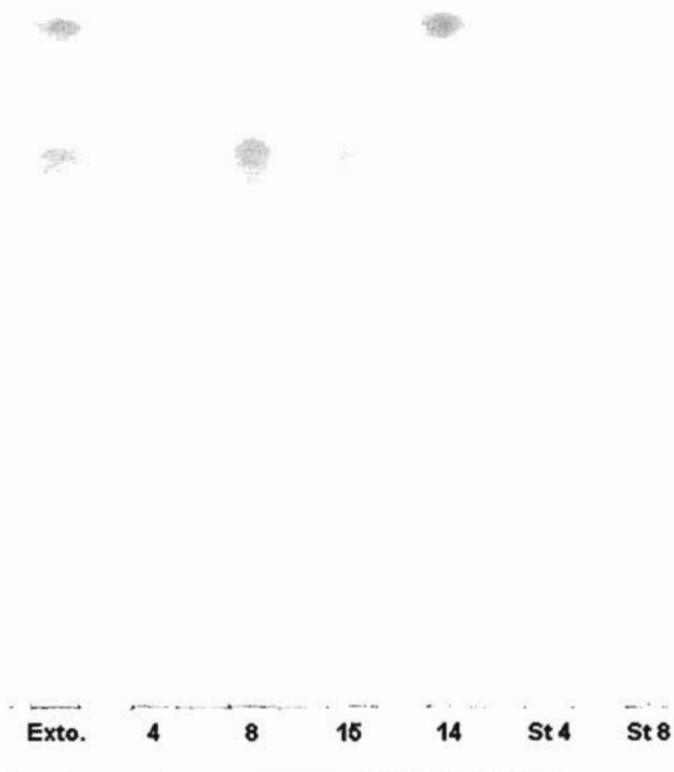
Cromatografía en Capa Fina (CCF), Cromatografía de Gases (CG) y/o Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) (Gaedcke y Steinhoff, 2003). En las Figuras 10 y 11, se muestra la CCF de los compuestos aislados en comparación con el Extracto.



Cantidad aplicada: 20 μ L de muestra. Placas Silica gel 60 F₂₅₄, Merck. Sistema de elución: Hexano-AcOEt 8:2. Evaluación directa: UV 254 nm y 365 nm. Agente cromógeno: Sulfato Cérico Amoniacal.

Muestras: {Exto.} Extracto *E. caribaeum*. {14} Estigmasterol.

Figura 10. Cromatograma en capa fina del estigmasterol (14) y del extracto CH₂Cl₂-MeOH de *E. caribaeum*.



Cantidad aplicada: 20 μ L de muestra. Placas Silica gel 60 F₂₅₄, Merck. Sistema de elución: AcOEt-MeOH 7:3. Evaluación directa: UV 254 nm y 365 nm. Agente cromógeno: Sulfato Cérico Amoniacal.

Muestras: {Exto.} Extracto de *E. caribaeum*; {4} 5-O- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina; {8} 5-O- β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina; {15} 5-O- β -D-glucosil-7-3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina; {14} Estigmasterol; {St 4} Estándar compuesto 4; {St 8} Estándar compuesto 8.

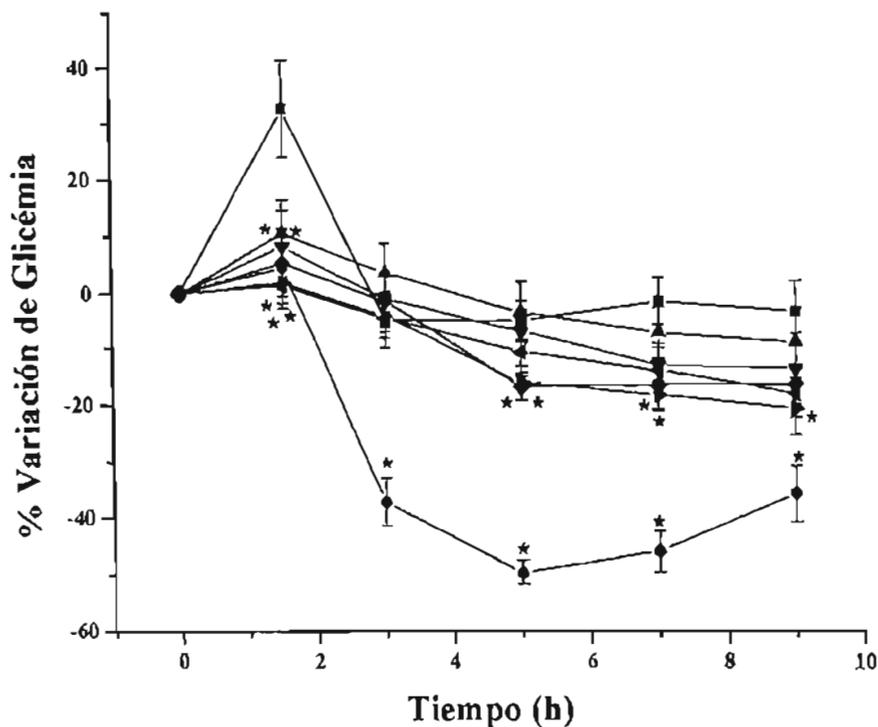
Figura 11. Cromatograma en capa fina de los compuestos aislados de *E. caribaeum*.

4.3 Ensayos Biológicos.

4.3.1 Evaluación Aguda de la Actividad Hipoglicemiante.

El resultado del análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en este estudio, mostró que el extracto íntegro de *Exostema caribaeum* produjo una disminución significativa de la glicemia en los animales de experimentación comparados con el grupo control negativo (vehículo), a las 5 y 7 hrs (-16.85 ± 2.49 y -16.46 ± 4.70 %, respectivamente) de la dosis de 100 mg/Kg; para la dosis de 500 mg/Kg, se observa una disminución significativa en los niveles de glucosa sanguínea a partir de las 5 hrs (-16.05 ± 3.00 %), este efecto se mantuvo hasta el término del experimento (-18.25 ± 2.53 % y -20.53 ± 4.58 % a las 7 y 9 hrs, respectivamente). La glibenclamida (10mg/Kg) mostró su máximo efecto 5 horas después de su administración, después de este periodo se observa una disminución de su efecto. Estos resultados se muestran en la Gráfica 1 y en la Tabla 8.

En todos los tratamientos, excepto con la dosis de 10 mg/Kg, existe diferencia significativa a las 1.5 hrs con respecto al control negativo; además, se observa un incremento en los valores de glicemia (incluso en 10 mg/Kg), que se presenta normalmente en este tipo de estudios farmacológicos, posiblemente debido a la estimulación de diferentes procesos metabólicos y de homeostasis (Garduño, 2001). Las dosis de 100, y 500 mg/Kg, son las que presentan el mejor efecto hipoglicemiante, y presentan diferencias significativamente diferentes con respecto al control negativo. Al realizar una ANADEV (p<0.05) entre estas dosis, no se tienen diferencias estadísticamente significativas, a ninguno de los tiempos de análisis.



■ Control; ● testigo (Glibenclamida); ▲ extracto (10 mg/Kg); ▼ extracto 50 mg/Kg;
 ◆ extracto (100 mg/Kg); ◄ extracto (250 mg/Kg); ► extracto (500 mg/Kg). * $p < 0.5$ ANADEV -
 Análisis de varianza seguido de la prueba t de Dunnett para la comparación de medias con respecto a los valores iniciales-.

Gráfica 1. Efecto del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ de *E. caribaeum* sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas normoglicémicas.

Tabla 9. Porcentajes de variación de la glicemia en animales normoglicémicos.

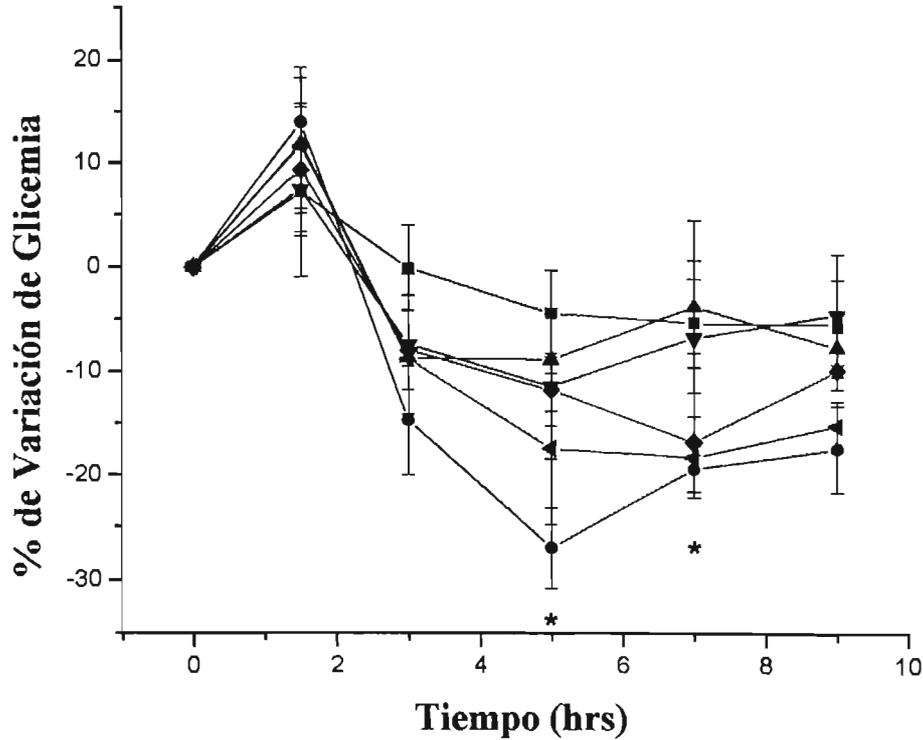
Tratamiento	% de variación de la glicemia				
	1.5 hrs	3 hrs	5 hrs	7 hrs	9 hrs
Control (Vehículo)	32.63 ± 8.71	-4.84 ± 5.11	-5.01 ± 3.53	-1.40 ± 4.21	-3.24 ± 5.56
Testigo (Glibenclamida)	4.66* ± 4.05	-37.15* ± 4.32	-49.52* ± 2.13	-45.91* ± 3.50	-35.56* ± 4.99
Extracto (10 mg/Kg)	10.59 ± 5.83	3.66 ± 5.07	-3.44 ± 5.46	-7.13 ± 4.64	-8.82 ± 6.25
Extracto (50 mg/Kg)	8.36* ± 6.31	-0.95 ± 4.94	-6.90 ± 3.86	-12.79 ± 3.67	-13.46 ± 6.27
Extracto (100 mg/Kg)	5.47* ± 5.97	-1.34 ± 4.78	-16.85* ± 2.49	-16.46* ± 4.70	-16.24 ± 2.80
Extracto (250 mg/Kg)	1.39* ± 4.15	-4.49 ± 3.62	-10.64 ± 4.35	-13.83 ± 4.05	-17.92 ± 4.19
Extracto (500 mg/Kg)	1.99* ± 3.74	-4.12 ± 2.96	-16.05* ± 3.00	-18.25* ± 2.53	-20.53* ± 4.58

Media (± EE) (% de variación de glicemia); * diferencia significativa (p < 0.05) en ANADEVa seguida de la prueba t de Dunnett, en comparación con valores iniciales.

4.3.2 Evaluación Aguda de la Actividad Antihiperглиcémica.

Siete días después de la administración de la estreptozotocina (STZ), se midieron los niveles de glucosa de los animales de experimentación. Los niveles de glucosa de todos los animales se registraron ≥ 250 mg/dL, y fueron consideradas e incluidas en el estudio como diabéticos (Sharma, 1997).

Al comparar los grupos tratados con el extracto de *E. caribaeum* con el grupo control no se observa una disminución estadísticamente significativa de los niveles de glucosa sanguínea para ninguna de las dosis utilizadas. La glibenclamida tubo un comportamiento similar al mostrado en el ensayo de actividad hipoglicemiante, con un efecto máximo a las 5h y disminución de su efecto después de este tiempo, y a las 5 y 7 hrs (-27.00 ± 3.81 % y -19.38 ± 2.24 %, respectivamente) presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. Los resultados se muestran en la Gráfica 2 y en la Tabla 9.



■ Control; ● testigo (Glibenclamida); ▲ extracto (10 mg/Kg); ▼ extracto 30 mg/Kg;
 ◆ extracto (100 mg/Kg); ◀ extracto (300 mg/Kg). * $p < 0.5$ ANADEVA -Análisis de varianza seguido de la prueba t de Dunnett para la comparación de medias con respecto a los valores iniciales-.

Gráfica 2. Efecto del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ de *E. caribaeum* sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas diabéticas.

Tabla 10. Porcentajes de variación de la glicemia en animales diabéticos.

Tratamiento	% de variación de la glicemia				
	1.5 hrs	3 hrs	5 hrs	7 hrs	9 hrs
Control (Vehículo)	7.15 ± 4.20	-0.06 ± 4.08	-4.40 ± 4.16	-5.30 ± 4.26	-5.38 ± 4.30
Testigo (Glibenclamida)	14.04 ± 5.30	-14.73 ± 5.24	-27.00* ± 3.81	-19.38* ± 2.24	-17.42 ± 4.20
Extracto (10 mg/Kg)	11.93 ± 6.37	-8.69 ± 6.04	-8.87 ± 4.93	-3.75 ± 4.46	-7.65 ± 1.54
Extracto (30 mg/Kg)	7.47 ± 8.34	-7.42 ± 6.72	-11.41 ± 6.97	-6.74 ± 11.26	-4.48 ± 5.85
Extracto (100 mg/Kg)	9.38 ± 6.04	-7.95 ± 3.77	-11.76 ± 3.51	-16.82 ± 4.84	-9.81 ± 1.76
Extracto (300 mg/Kg)	11.73 ± 6.61	-8.81 ± 6.02	-17.44 ± 7.30	-18.28 ± 3.97	-15.23 ± 2.46

Media (± EE) (% de variación de glicemia); * diferencia significativa ($p < 0.05$) en ANADEVa seguida de la prueba *t* de Dunnett, en comparación con valores iniciales.

4.3.3 Evaluación Subaguda del Efecto Antihiperlicémico.

Siete días después de la administración del diabetógeno (STZ), se midieron los niveles de glucosa de los animales de experimentación. Los niveles de glucosa de todos los animales se registraron ≥ 250 mg/dL, y fueron consideradas e incluidas en el estudio como diabéticos (Sharma, 1997).

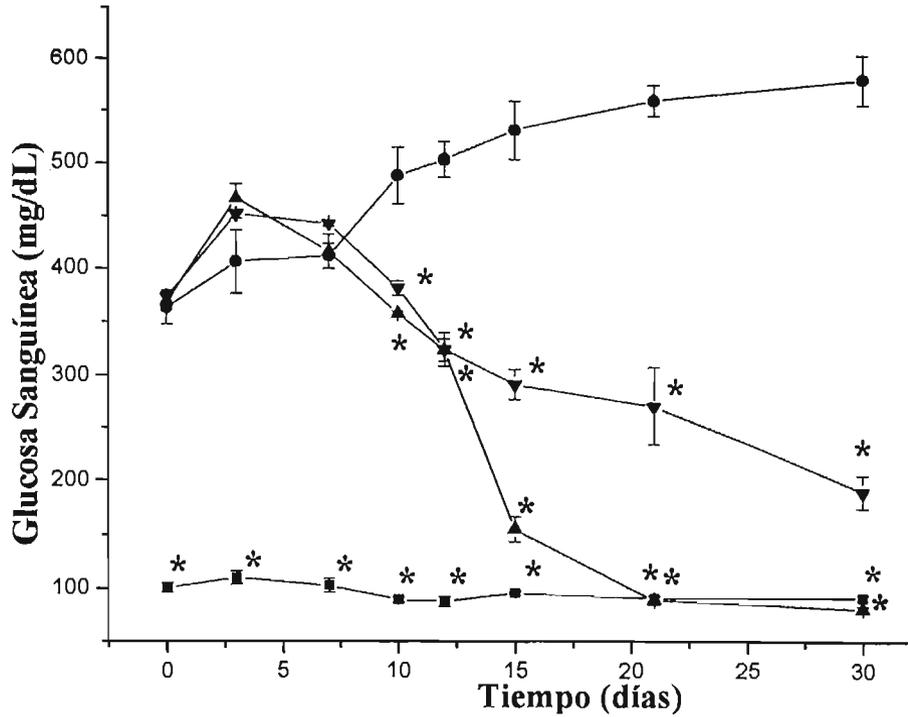
La selección de la dosis para este ensayo, se realizó con base a los resultados obtenidos en las evaluaciones agudas, en donde la dosis de 100 mg/Kg, presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo en la evaluación hipoglicemiante. Aunque también la dosis de 500 mg/Kg presentó diferencias en los mismos tiempos, no se consideró debido a que aumenta 5 veces la probabilidad de presentar un efecto tóxico, con respecto a la dosis de 100 mg/Kg, además de que presenta un comportamiento similar.

El extracto de la corteza de *E. caribaeum* produjo una disminución significativa de la glicemia en los animales de experimentación, a partir del décimo día de administración. En los animales tratados con el testigo, la disminución de los valores de glucosa sanguínea se manifiesta de forma progresiva a partir del día 13, incluso a partir del día 21, se presenta un comportamiento similar al control. El efecto observado en los animales tratados con el extracto, fue moderado en comparación con el efecto de la glibenclamida, y no alcanza un comportamiento similar al control. Estos resultados indican que la administración oral del extracto disminuye los niveles de glucosa sanguínea, pero no restablece los niveles de glucosa a valores normales, en un periodo de 30 días. Éstos resultados se muestran en la Gráfica 3 y en la Tabla 10.

Los animales de experimentación, antes de la administración del diabetógeno, registraron el mismo rango de peso que los animales que se incluyeron en el control positivo. 7 días después de la administración del mismo, estos animales tuvieron una disminución del peso corporal.

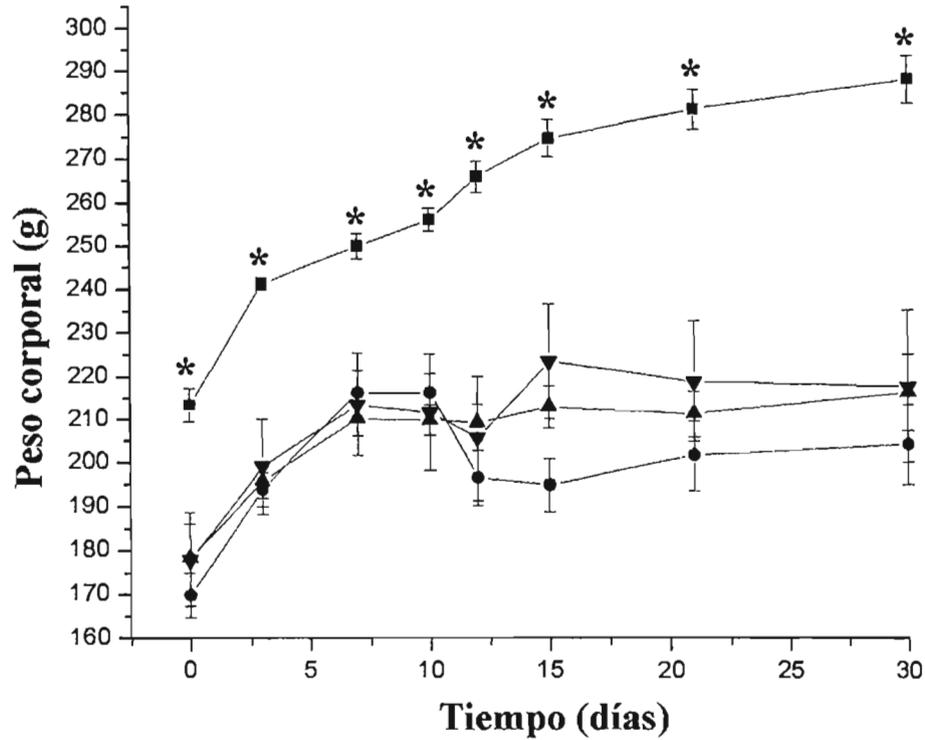
Al realizar el análisis estadístico del peso corporal de los animales, se encontró una diferencia estadísticamente significativa del extracto, testigo y control positivo (diabético), con respecto al control negativo (animales normales), pero no hubo diferencias significativas entre ellos. Éstos resultados se muestran en la Gráfica 4 y en la Tabla 10.

Los resultados obtenidos de éste estudio indican que, a pesar de que el extracto CH₂Cl₂-MeOH de *E. caribaeum* resulta efectivo en disminuir los niveles de glucosa sanguínea en animales diabéticos, no restablece las condiciones de peso corporal.



■ Control negativo; ● control positivo; ▲ testigo (Glibenclámda)
 ▼ extracto (100 mg/Kg); . * $p < 0.5$ ANADEVA -Análisis de varianza seguido de la prueba t de Dunnett para la comparación de medias con respecto a los valores iniciales-.

Gráfica 3. Variación de los niveles observados de glicemia para el extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ de *E. caribaeum*.



▼ extracto (100 mg/Kg.). * $p < 0.5$ ANADEV -Análisis de varianza seguido de la prueba t de Dunnett para la comparación de medias con respecto a los valores iniciales-.

Gráfica 4. Efecto del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ de *E. caribaeum* sobre el peso corporal de los animales de experimentación.

Tabla 11. Efecto del extracto sobre los niveles de glucosa sanguínea en animales diabéticos.

Tratamiento	% de variación de la glicemia							
	0	3	7	10	12	15	21	30
Control positivo (Vehículo)	100.50 ± 4.59	109.67 ± 6.10	102.67 ± 6.19	89.67 ± 2.42	87.67 ± 4.20	95.83 ± 1.38	91.00 ± 1.98	92.00 ± 2.48
Control negativo (vehículo)	363.33* ± 16.15	406.33* ± 29.93	412.00* ± 11.45	488.00* ± 26.52	503.33* ± 16.53	531.33* ± 27.57	559.67* ± 14.78	580.34* ± 24.17
Testigo	369.33 ± 5.73	466.33 ± 13.50	416.00 ± 16.57	357.67* ± 2.46	323.33* ± 10.22	154.67* ± 11.66	89.00* ± 4.30	81.00* ± 3.08
Extracto (100 mg/Kg)	373.33 ± 5.74	451.67 ± 3.80	442.67 ± 2.83	381.67* ± 6.93	324.00* ± 15.82	291.67 ± 13.97	270.67* ± 36.91	189.67* ± 15.26

Media (± EE) (% de variación de glicemia); * Diferencia significativa ($p < 0.05$) en ANADEVa seguida de la prueba / de Dunnett, en comparación con valores normales

Tabla 12. Efecto del extracto sobre el peso corporal de animales diabéticos.

Tratamiento	Peso corporal (g)							
	0	3	7	10	12	15	21	30
Control positivo (Vehículo)	169.80 ± 5.20	193.90 ± 3.90	216.20 ± 5.20	216.10 ± 4.50	196.40 ± 6.20	194.80 ± 6.00	201.60 ± 8.00	204.2 ± 9.20
Control negativo (vehículo)	213.40* ± 3.90	241.30* ± 1.50	249.90* ± 3.00	256.00* ± 2.70	265.90* ± 3.50	274.60* ± 4.20	281.30* ± 4.50	288.20* ± 5.5
Testigo	178.30 ± 7.80	195.80 ± 4.00	210.20 ± 4.1	209.70 ± 3.50	209.10 ± 4.3	212.80 ± 4.90	211.2 ± 5.40	216.3 ± 8.90
Extracto (100 mg/Kg)	177.90 ± 10.60	199.10 ± 10.90	213.40 ± 11.90	211.50 ± 13.50	205.60 ± 14.30	223.30 ± 13.20	218.80 ± 13.90	217.70 ± 17.70

Media (± EE) (% de variación de glicemia); * Diferencia significativa ($p < 0.05$) en ANADEVa seguida de la prueba *t* de Dunnett, en comparación con valores normales

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación constituye una aportación al conocimiento de los remedios herbolarios. El análisis del extracto de CH_2Cl_2 de *Exostema caribaeum* permitió identificar sus principales componentes, entre ellos las 4-fenilcumarinas 5-O- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**4**) y 5-O- β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**8**). Estos productos fueron establecidos como los compuestos marcadores de utilidad para el control de calidad de los extractos de la especie de *E. caribaeum*.

El método analítico desarrollado por CLAR para separar los componentes del extracto permitió determinar que los componentes mayoritarios del extracto de *E. caribaeum* son las 4-fenilcumarinas 5-O- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**4**) y 5-O- β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**8**). En un futuro, éste método será de utilidad para valorar el contenido de 4-fenilcumarinas en los extractos de *E. caribaeum*. De manera adicional, este método será de utilidad para determinar el contenido de 4-fenilcumarinas 5-O- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**4**) y 5-O- β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**8**) en extractos de la droga o en los productos fabricados con la misma, que son ampliamente utilizados por la población mexicana para el cuidado de la salud.

El estudio fitoquímico del extracto íntegro de la especie *Exostema caribaeum*, permitió el aislamiento de los metabolitos secundarios identificados como estigmasterol

(14) y 5-*O*- β -D-glucosil-7-3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15) descritos por primera vez en ésta especie.

Los estudios biológicos realizados al extracto íntegro de *Exostema caribaeum*, demostraron que su efecto antihiperlicemiantes se presenta de forma moderada en comparación con un fármaco comercial.

6. PERSPECTIVAS

La investigación fitoquímica y biológica realizada a la especie *Exostema caribaeum* en el presente trabajo, representa una continuación al estudio que se ha realizado en los últimos años a dicha especie. Sin embargo, aún falta mucho camino por recorrer para la consolidación de una monografía farmacopeica, y es por eso que a partir de este trabajo hemos formulado las siguientes perspectivas:

- Validar el método analítico en CLAR, correspondiente al perfil cromatográfico de la especie.
- Realizar la evaluación antidiabética de los compuestos aislados de esta especie, incluyendo compuestos marcadores.
- Realizar ensayos de toxicidad para el extracto y compuestos aislados.
- Determinar el mecanismo de acción mediante el cual el extracto de *E. caribaeum* produce el efecto antidiabético.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Anaya-Dávila Garibi, M. I. (1991). Estudio Etnobotánico del Complejo Quina en México. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
2. Aquino, R.; D'Angostino, M.; De Simone, F.; Pizza, C. (1988). 4-Arylcoumarin glicosides from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, **27** 1827-1830.
3. Argueta, A.; Cano, A.; Rodarte, M. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol. I. Instituto Nacional Indigenista. México, pp 17.
4. Argueta, A.; Cano, A.; Rodarte, M. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol. II. Instituto Nacional Indigenista. México, pp 1108-1109.
5. Barnes, J. (2003). Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part I. Regulation and quality. *J. Clin. Pharmacol.* **55**, 226-233.
6. Bose, P.; Banerji, J. (1990). Synthesis of 4-phenylcoumarins. *Indian J. Chem.* **29B**, May. 422-424.
7. Bose, P.; Banerji, J. (1991). Synthesis of 4-phenylcoumarins from *Dalbergia volubilis* and *Exostema caribaeum*. *Phytochemistry*, **30** 2438-2439.
8. Cabrera-Rode, E.; Suárez-Fonseca, L.; Díaz-Horta, O.; Díaz-Díaz, O. (2000). Nuevos criterios para clasificar la Diabetes Mellitus. *Revista Cubana de Endocrinología*. **11**. 51-55.

9. Calera, M.; Mata, R.; Anaya, A. L.; Lotina-Hennsen, B. (1995). 5-O- β -D-galactopyranosil-7-metoxo-3',4'-dihidroxy-4-phenylcoumarin, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosynth. Res.* **45**. 105-110.
10. Calera, M.; Mata, R.; Lotina-Hennsen, B.; Anaya, A. L. (1996). Uncoupling behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts: structure-activity relationships. *J. Agric Food. Chem.* **44**. 2966-2969.
11. Calzada-Bermejo, F. (1987). Estudio Fitoquímico de la Planta de la Quina. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, UNAM. México.
12. Cox, P. A.; Balick, M. J. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Sci. Amer.* 82-87.
13. Díaz, J. L. (1976). Índice y sinonimia de las plantas medicinales de México. Monografías científicas I. Instituto Mexicano para Estudio de Plantas Medicinales A. C., México.
14. Díaz, J. L. (1977). Usos de las Plantas Medicinales de México. Monografías científicas II. Instituto Mexicano para el Estudio de Plantas Medicinales A. C., México.
15. Eisner, S. (2001). Guidance Documents for the Manufacture and Sale of Botanical Extracts. Use of Marker Compounds in Manufacturing and Labeling Botanically Derived Dietary Supplements. American Herbal Products Association. USA.

16. Fabricant, D. S.; Fransworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*. **109**, 69-74.
17. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud, Comisión Permanente de los Estados Unidos Mexicanos. México, 2001.
18. Gaedcke, F.; Steinhoff, B (2003). Herbal Medicinal Products. Scientific and Regulatory Basis for Development, Quality Assurance and Marketing Authorisation. Medpharm Scientific Publisher, CRC Press. Chapter 3. New Cork.. USA.
19. García Mateos, M. del R. (1987). 4-Arilmumarinas de la *Exostema caribaeum* Jacq. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM, México.
20. Garduño-Ramírez, M. L. C. (2001). Búsqueda de sustancias con actividad hipoglucemiante a partir de ciertos vegetales empleados en la medicina tradicional mexicana. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM, México.
21. Goodman, G.; Hardman, J.; Limbird, L.: Molinoff, P.; Ruddon, R. (2001). The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. Chapter 61. Macmillan Publishing Company. USA.
22. Guasch, G.; Hinostroza, L. (2005). Diagnóstico y medicina tradicional. El arte del diagnóstico en las medicinas tradicionales de Asia y América. Ed. Ocelote. México. p. 9-23.

23. Guerrero-Analco, J. A.; Hersh-Martínez, P.; Pedraza-Chaverri, J.; Navarrete, A.; Mata, R. (2005). Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-Induced Diabetic rats. *Planta medica*, In press.
24. Hersh-Martinez, P. (1996). Destino común: los recolectores y su flora medicinal. Colección Biblioteca del INAH. Cap.1 (23-30).
25. Hopkins Johns Universiti. USA. Press.
26. Houghton, P. J. (1999). Roots of remedies: Plants, people and pharmaceuticals. *Chem Ind.* **1**, 15-19.
27. International Diabetes Federation. <http://www.eatlas.idf.org>.
28. Köhler, I.; Jenett-Siems, K.; Mockenhaupt, F. P.; Siems, K.; Jakupovic, J.; González, J. C.; Hernández, M. A.; Ibarra, R. A.; Berendsohn, W. G.; Bienzle, U.; Elich, E. (2001). *In vitro* Antiplasmodial Activity of 4-Phenylcoumarins from *Exostema mexicanum*. *Planta medica*, **67**, 89-91.
29. Krebs, K. G.; Griesinger, E. (1960). Ingredients of the bark of *Exostema caribaeum*. *Arzneimittel-Forschung*, **10**, 32-33.
30. Kusano, A.; Nikaido, T.; Kuge, T.; Ohmoto, T.; Monache, G. D.; Botta, B.; Botta, M.; Saitoh, T. (1991). Inhibition of Adenosine 3',5'-Cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids from Licorice roots and 4-Arylcoumarins. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 930-933.

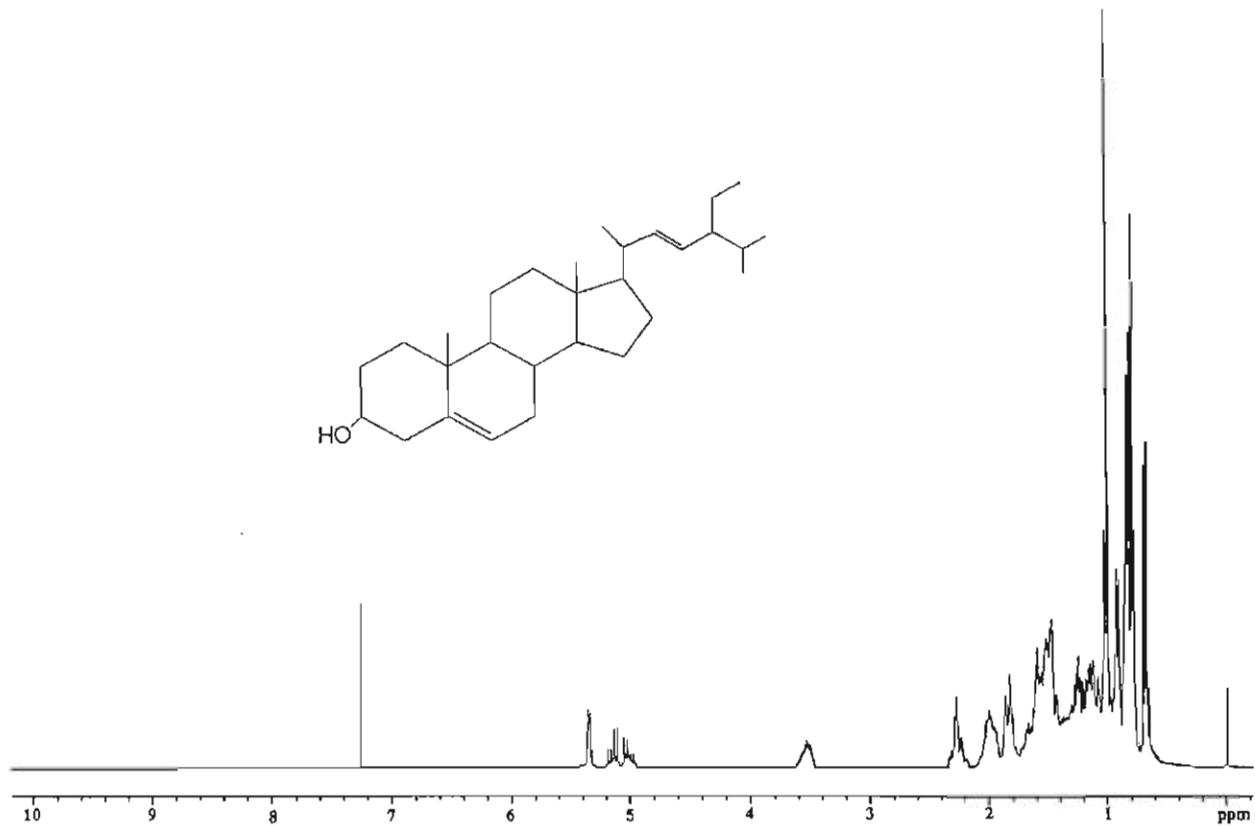
31. Legorreta-Arellano, I. O. (1989). Estudio Comparativo de las Plantas Usadas para el Tratamiento de la Diabetes en Algunos Mercados de México. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
32. Lozoya, X. (1993). Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. En la investigación científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Edición Conmemorativa, Secretaria de Salud, México. 255-270.
33. Martínez, M. (1989). Las Plantas Medicinales de México. 6^a edición, México, D. F. Ediciones Botas, 56-57.
34. Mata, R.; Calzada, F.; García, M. R.; Reguero, M. T. (1987). Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, III: new 4-Phenylcoumarins from *Exostema Caribaeum*. *J. Nat. Prod*, **50**, 866-871.
35. Mata, R.; Calzada, F.; García, M. R. (1988). Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, VI. Additional new 4-Phenylcoumarins from *Exostema Caribaeum*. *J. Nat. Prod*, **51**, 851-856.
36. Mata, R.; Camacho, M. R.; Cervera, E.; Bye, R.; Linares, E. (1990). Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*, **29** 2037-2040.
37. Mata, R.; Camacho, M. R.; Mendoza, S.; Cruz, M. C. (1992). A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*, **31**, 3199-3201.

38. Medina-Salgado, C. (2005). Abatir la Enfermedad, Diabetes Mellitus. *Revista de Ciencia y Desarrollo*, **30**, 6-14.
39. Mitscher, L. A.; Pillai, S.; Shankel, D. M. (2000). Some Transpacific Thoughts on the Regulatory Need for Standardization of Herbal Medical Products. *J. Food Drug Anal*, **8**, 229-234.
40. Molitch, M. E.; DeFronzo, R. A.; Franz, M. J.; Keane, W. F. (2000). Diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, **23**, S69-S72.
41. Mukerjee, S. K.; Saroja, T.; Seshadri, T. R. (1968). The structure of exostemin and synthesis of some related 4-phenyl coumarins. *Tetrahedron*, **24**, 6527-6534.
42. Nassar, M; Saenz, J. A.; Galvez, N. (1980). Phytochemical screening of Costa Rican plants: alkaloid analysis. V. *Revista de Biología Tropical*, **28**, 1-11.
43. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
44. Noster, S.; Kraus, L. (1990). *In vitro* antimalarial activity of *Coutarea latiflora* and *Exostema caribaeum* extracts of *Plasmodium falciparum*. *Planta medica*, **56**, 63-65.
45. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/en>
46. Organización Mundial de la Salud (1999). WHO monographs on selected medicinal plants. Volume I. World Health Organization. Geneva, Switzerland.

47. Organización Mundial de la Salud (2002). WHO monographs on selected medicinal plants. Volume 2. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
48. Organización Mundial de la Salud. (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva, Switzerland.
49. Organización Mundial de la Salud (2004). Diabetes action now: An initiative of the World Health Organization and the International Diabetes Federation. Marketing and Dissemination, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
50. Pinto, A.; Capasso, A.; Sorrentino, L. (1997). Experimental animal studies on the hypoglycemic effects of a Copalchi extract. *Arzneimittel Forschung*, **47**, 829-833.
51. Rodríguez-Domínguez, J. (1975). Antología de Ciencias de la Salud. Lecturas Universitarias, tomo 24. UNAM. México.
52. 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. *J. Ethnopharm*, **35**, 275-283.
53. Romo de Vivar, A. (1999). Química, Universo, Tierra y Vida. 2da. Edición. La ciencia para todos, No. 51. Fondo de Cultura Económica. México.

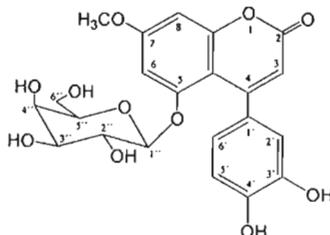
54. Sánchez-Viesca, F. (1969). The structure of exostemin, a new 4-Phenylcoumarin isolated from *Exostema caribaeum*. Short communication. *Phytochem.* **8**, 1821-1823.
55. Sharma, S. R.; Dwivedi, S. K.; Swarup, D. (1997). Hypoclicaemic, antihyperglucaemic and hipolipidemic activities of *Caesalpinia bonducella* seeds in rats. *J. Etnopham.* **58**, 39-44.
56. Shein, K. (2005). Proposal for preparation of monographs on the use of traditional medicine in primary health care. World Health Organization, Regional Office for South-East Asia.
57. Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H. (2004). Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care*, **27**, 1047-1053.

ANEXO



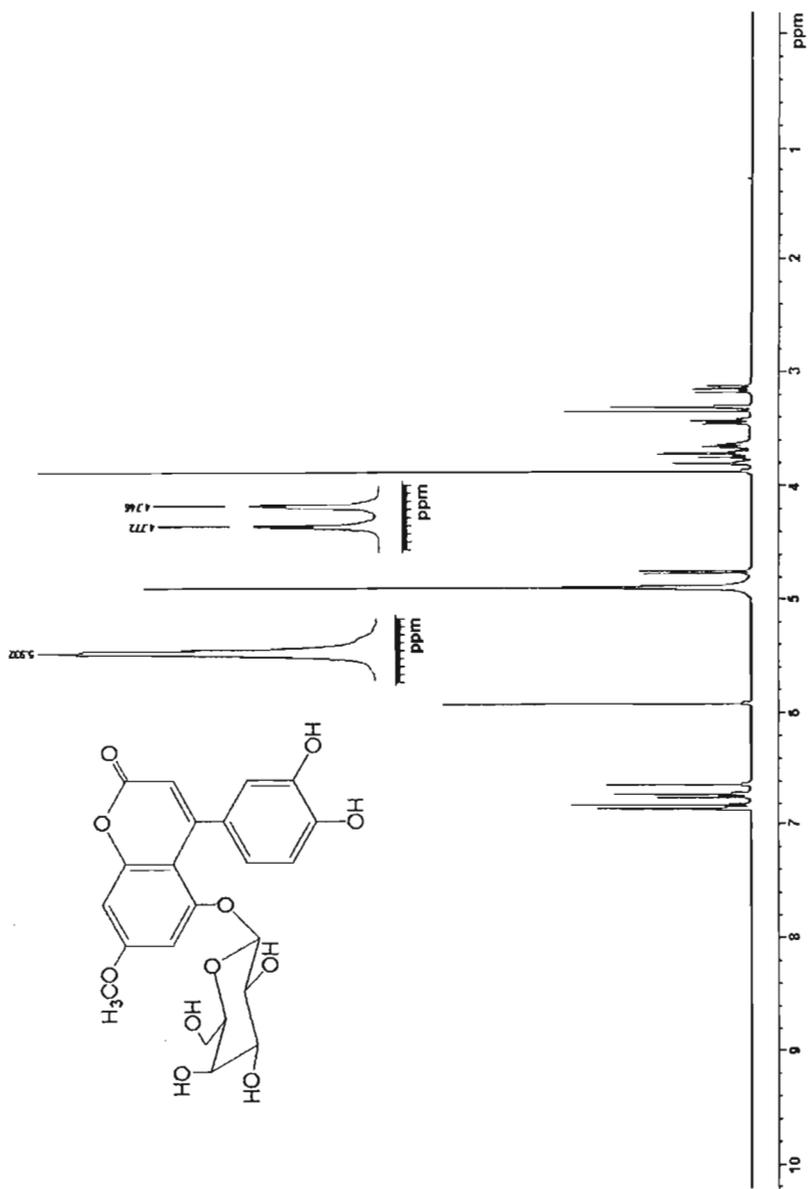
Espectro 1. Espectro de RMN- ^1H de estigmasterol (14) (300MHz, CDCl_3)

Cuadro 1. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 5-O-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4).

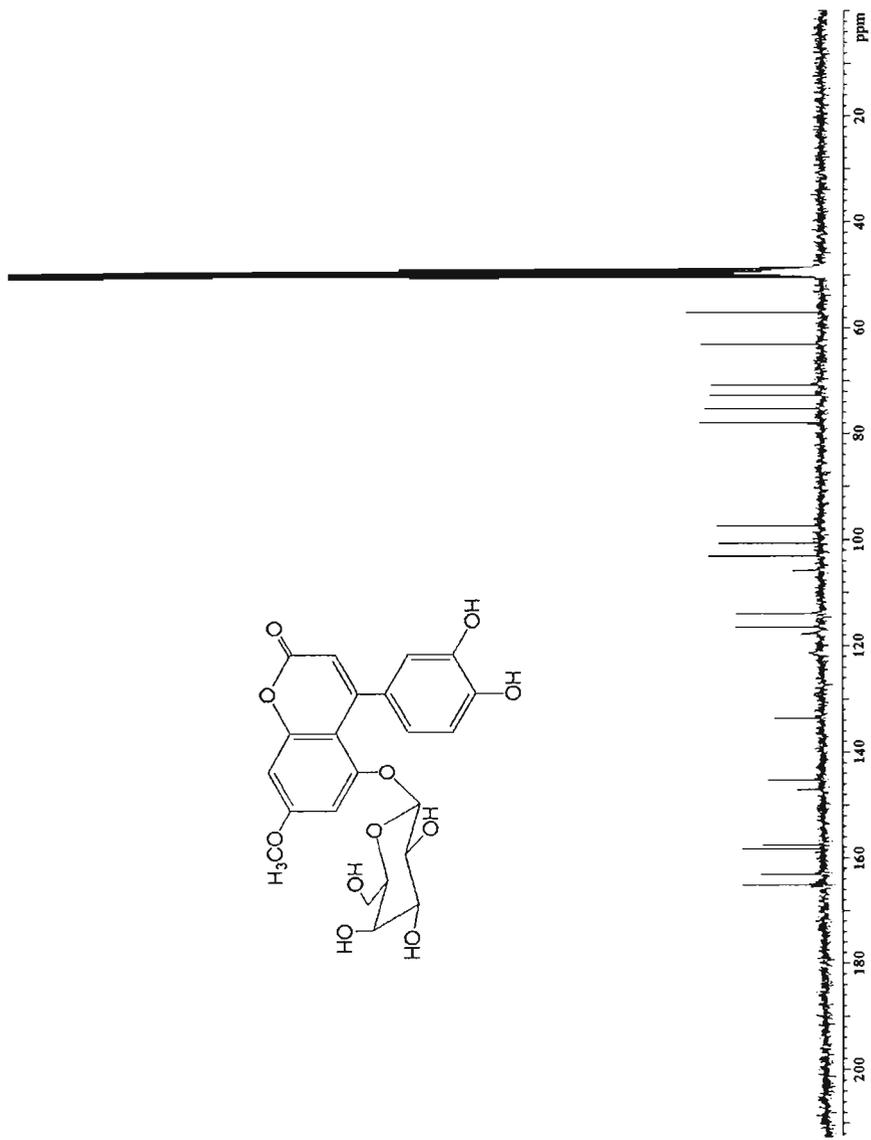


5-O-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4)

p. f. =	228-231 ° C
P. M. =	462 uma
F. M. =	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁
RMN- ¹ H CH ₃ OD, 300 MHz (J en Hz)	5.92 (s, H-3), 6.76 (d, J = 2.1, H-6), 6.64 (d, J = 2.1, H-8), 6.85 (d, J = 2.9, H-2'), 6.82 (d, J = 8.1, H-5'), 6.71 (dd, J = 8.1, 2.1, H-6'), 3.87 (s, 7-OCH ₃), 4.75 (d, J = 7.8, H-1''), 3.14 (dd, J = 9.6, H-2''), 3.43 (dd, J = 9.7, 3.6, H-3''), 3.79 (m, H-4''), 3.64 (m, H-5''), 3.71 (m, H-6'').
RMN- ¹³ C (75 MHz), δ en ppm	162.9 (C-2), 113.3 (C-3), 157.3 (C-4), 105.1 (C-4a), 158.0 (C-5), 99.9 (C-6), 164.9 (C-7), 96.6 (C-8), 158.0 (C-8a), 132.7 (C-1'), 115.8 (C-2'), 145.4 (C-3'), 147.2 (C-4'), 117.1 (C-5'), 120.7 (C-6), 102.3 (C-1''), 72.0 (C-2''), 74.6 (C-3''), 70.1 (C-4''), 77.3 (C-5''), 62.4 (C-6''), 56.5 (q, 7-OCH ₃).
EM-FAB ⁺ m/z	463 [M + H]

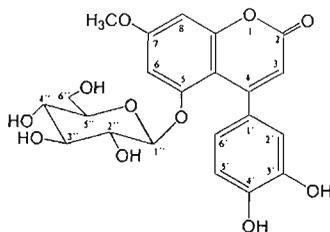


Espectro 2. Espectro de RMN-¹H de 5-O-β-D-galactosil-3,4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (4) 300MHz, CD₃OD



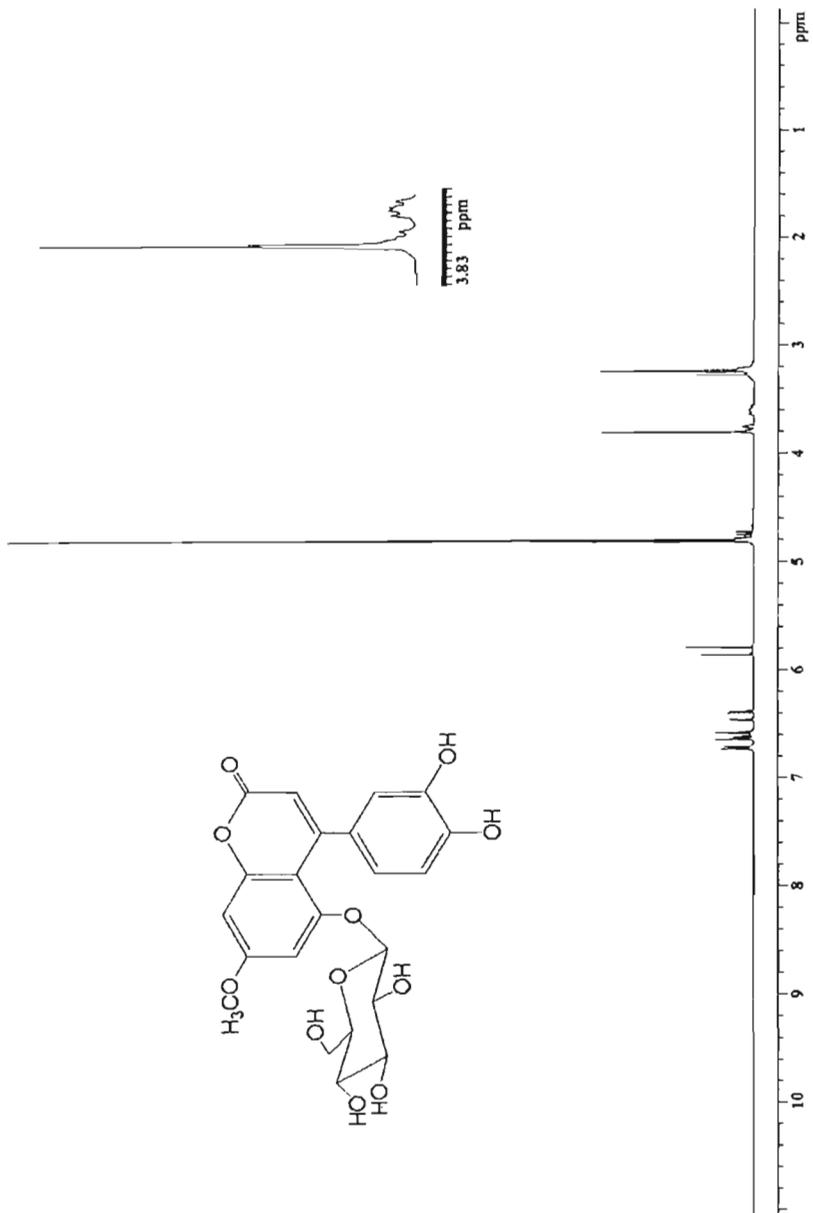
Espectro 3. Espectro de RMN-¹³C de 5-O-β-D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4'-fenilcumarina (4) 300MHz, CD₃OD

Cuadro 2. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 5-O-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8).

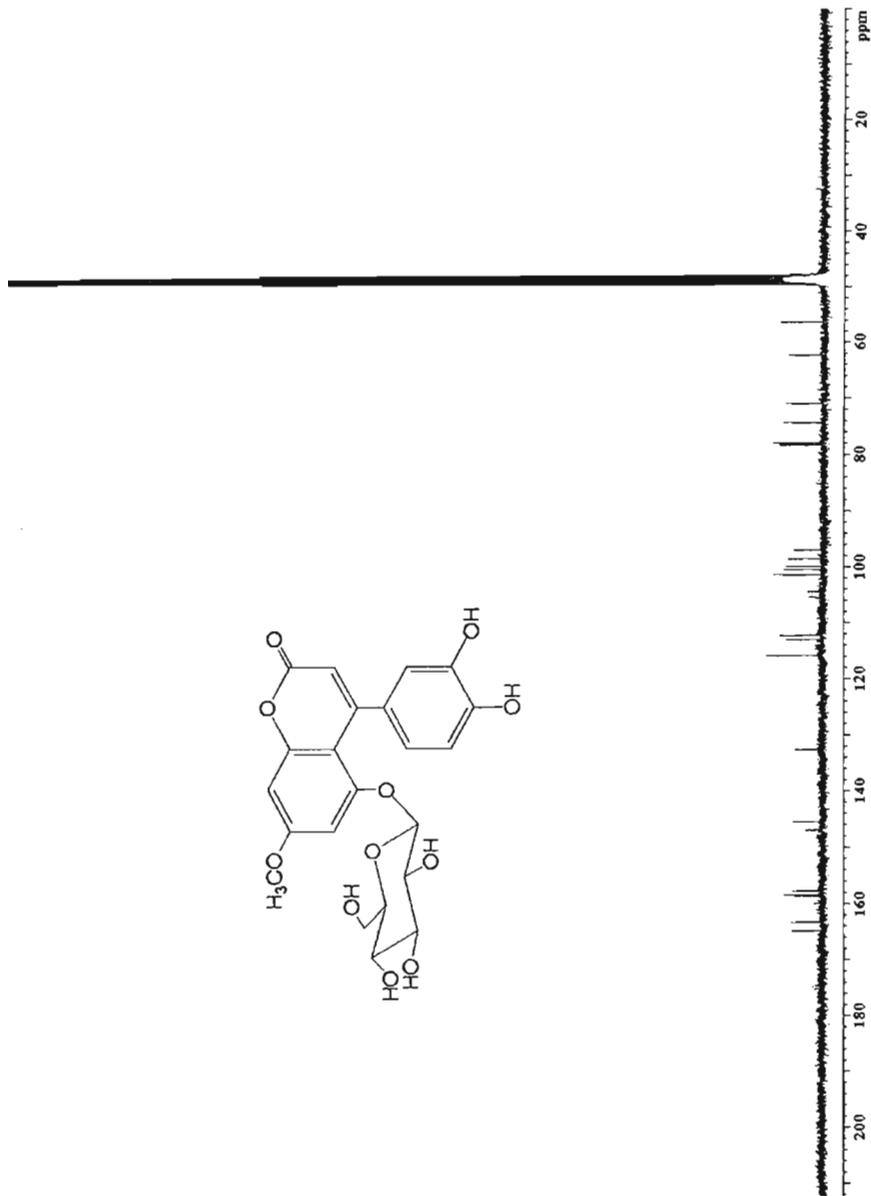
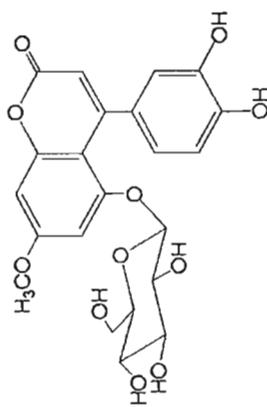


5-O-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8)

p. f. =	237-238 ° C
P. M. =	462 uma
F. M. =	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁
RMN- ¹ H CH ₃ OD, 300 MHz (<i>J</i> en Hz)	5.85 (s, H-3), 6.72 (d, <i>J</i> = 2.5, H-6), 6.65 (d, <i>J</i> = 2.5, H-8), 6.75 (d, <i>J</i> = 3.0, H-2'), 6.81 (d, <i>J</i> = 2.5, H-5'), 6.55 (d, <i>J</i> = 8.0, 2.5, H-6'), 4.72 (d, <i>J</i> = 7.5, H-1'), 3.83 (7-OCH ₃), 2.66 (m, H-2''), 3.20 (m, H-3''), 3.29 (m, H-4''), 3.60 (m, H-5''), 3.76 (dd, <i>J</i> = 11.5, 2.0, H-6'').
RMN- ¹³ C (75 MHz), δ en ppm	163.2 (C-2), 112.2 (C-3), 158.4 (C-4), 104.4 (C-4a), 157.4 (C-5), 98.3 (C-6), 163.4 (C-7), 100.4 (C-8), 158.1 (C-8a), 132.9 (C-1'), 115.7 (C-2'), 145.4 (C-3'), 147.1 (C-4'), 112.3 (C-5'), 115.7 (C-6), 100.3 (C-1''), 74.0 (C-2''), 77.7 (C-3''), 70.8 (C-4''), 78.1 (C-5''), 62.3 (C-6''), 56.5 (7-OCH ₃),
EM-FAB ⁺ m/z	463 [M + H]

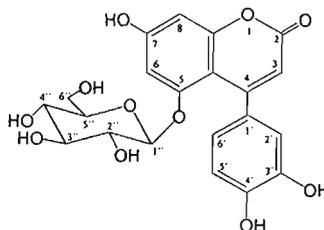


Espectro 4 Espectro de RMN- ^1H de 5-O- β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4'-fenilcumarina (8) 300MHz, CD_3OD



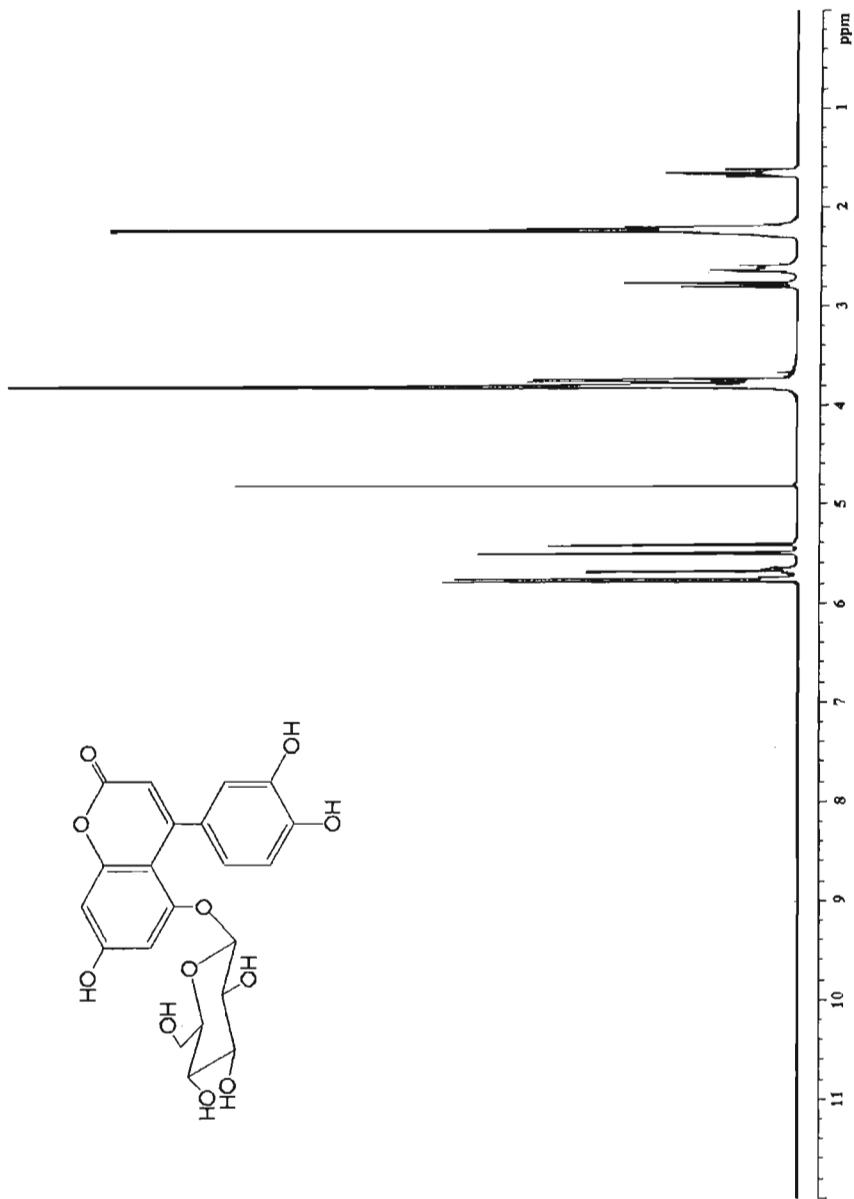
Espectro 5. Espectro de RMN- ^{13}C de 5-O-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (8) 300MHz, CD_3OD

Cuadro 3. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del 5-O-β-D-glucosil-7-3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15)

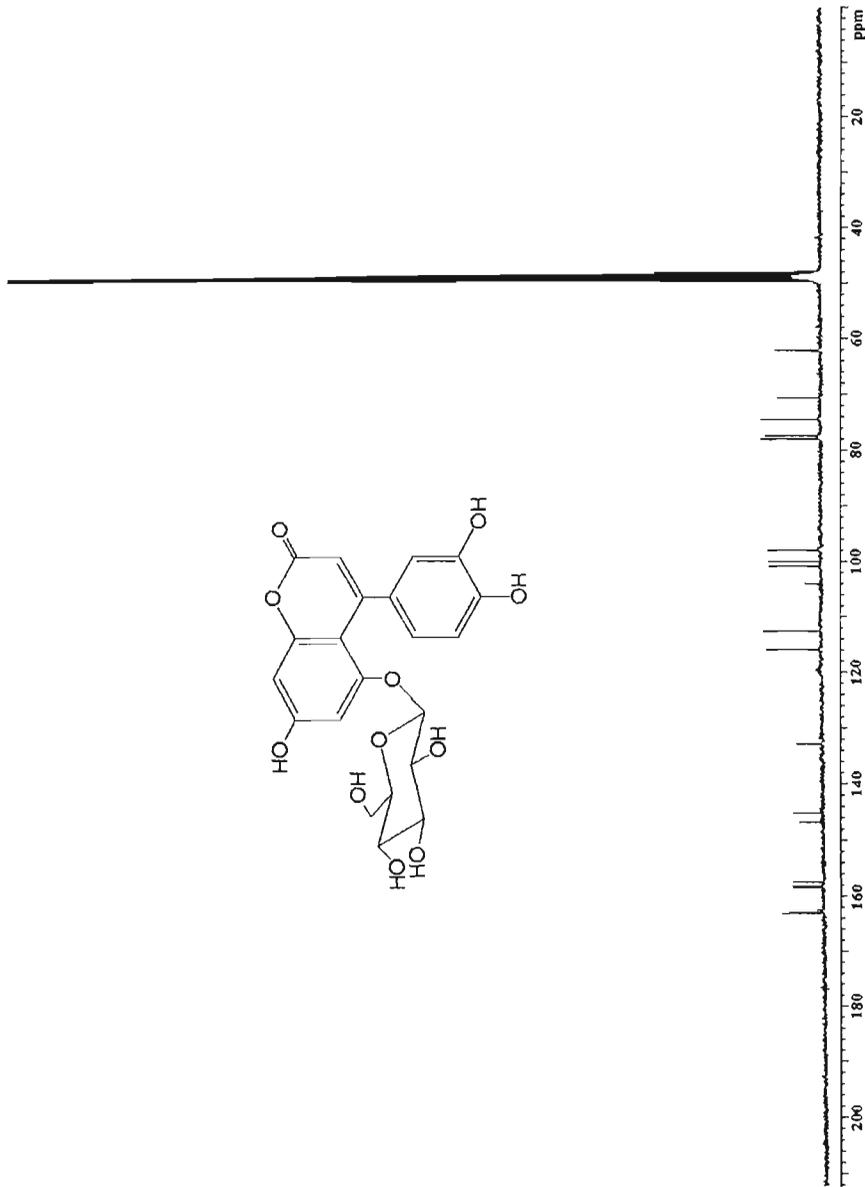
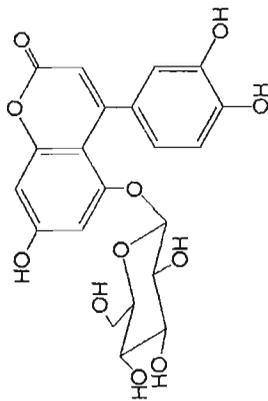


5-O-β-D-glucosil-7-3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15)

p. f. =	250-252 °C
P. M. =	448 uma
F. M. =	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
RMN- ¹ H CH ₃ OD, 300 MHz (<i>J</i> en Hz)	5.90 (s, H-3), 6.76 (d, <i>J</i> = 2.1, H-6), 6.64 (d, <i>J</i> = 2.1, H-8), 6.82 (d, <i>J</i> = 2.9, H-2'), 6.81 (d, <i>J</i> = 7.8, H-5'), 6.81 (dd, <i>J</i> = 8.1, 2.1, H-6'), 4.90 (d, <i>J</i> = 7.8, H-1'), 2.72 (dd, <i>J</i> = 9.0, 7.8, H-2''), 3.29 (m, H-3''), 3.33 (m, H-4''), 3.69 (dd, <i>J</i> = 11.7, 2.2, H-5''), 3.85 (dd, <i>J</i> = 11.7, 2.1, H-6'').
RMN- ¹³ C (75 MHz), δ en ppm	163.2 (C-2), 112.1 (C-3), 158.3 (C-4), 104.4 (C-4a), 157.4 (C-5), 98.3 (C-6), 163.4 (C-7), 100.3 (C-8), 158.1 (C-8a), 132.9 (C-1'), 115.7 (C-2'), 145.4 (C-3'), 147.0 (C-4'), 112.1 (C-5'), 115.7 (C-6), 100.2 (C-1''), 74.5 (C-2''), 77.6 (C-3''), 70.8 (C-4''), 78.2 (C-5''), 62.3 (C-6'').
EM-FAB ⁺	449 [M + H]



Espectro 6. Espectro de RMN-¹H de 5-O-β-D-glucosil-7-3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15) 300MHz, CD₃OD



Espectro 7. Espectro de RMN-¹³C de 5-O-β-D-glucosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15) 300MHz, CD₃OD