



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Estudio agudo del efecto hipoglucemiante del extracto  
acuoso de la corteza de *Cecropia peltata L.* en el modelo  
de rata STZ-NA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**ILIANA BAYARTE RUANO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ADOLFO ANDRADE CETTO  
2015**



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.

1. Datos del alumno  
Bayarte  
Ruano  
Iliana  
5554630557  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
306077557
2. Datos del Tutor  
Dr.  
Adolfo  
Andrade  
Cetto
3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
René de Jesús  
Cárdenas  
Vázquez
4. Datos del sinodal 2  
Dra.  
Patricia  
Guevara  
Fefér
5. Datos del sinodal 3  
Dra.  
Sonia Marlen  
Escandón  
Rivera
6. Datos del sinodal 4  
Biól.  
Isabel  
Mejía  
Luna
7. Datos del trabajo escrito  
Estudio agudo del efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de la corteza de *Cecropia peltata* L. en el modelo de rata STZ-NA.  
66 p  
2015

Dedicado a mis padres, Iliana Ruano y Jaime Bayarte.  
A mi hermana Mariana Bayarte.  
A mis abuelos Lucina López Martínez y  
Salvador Ruano Reyna.

*La confianza que los campesinos tienen en las plantas viene de lejos.  
Acostumbrados a sacarlo todo de la tierra, lo lógico es que sea ella, la  
tierra, la que les proporcione los medios para curarse.*

- Maurice Messegué-

## **Agradecimientos Académicos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ella desde el nivel bachillerato y ahora a nivel licenciatura.

A CONACyT CB - 0151264 y PAPIIT IN214413 por contribuir con recursos para financiar la realización del proyecto.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto, por aceptarme en su grupo de trabajo, su apoyo en el desarrollo de mi proyecto y por contagiarme el gusto por la Etnofarmacología.

Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, a la Dra. Sonia Marlen Escandón Rivera y a la Dra. Patricia Guevara Fefér, por formar parte de mi jurado y ayudarme a mejorar mi trabajo con sugerencias y consejos de gran valor así como aprobarlo al final.

A la Biól. Isabel Mejía por haber sido mi profesora de taller y enseñarme a trabajar en el laboratorio, a manejar a los animales, por sus consejos y su disposición por ayudarme, por brindarme su amistad y sus enseñanzas, muchas gracias por eso, por ser una excelente persona y por creer en mí.

A todos mis profesores de la carrera, en especial la Dra. Jimena Saucedo Zugazagoitia no sólo por sus enseñanzas en química general las cuales fueron increíbles, sino por enseñarme a tener integridad como profesionista y al Dr. Alejandro Marche Cova por lograr que comprendiera la biología molecular de una manera impresionante.

.

## **Agradecimientos Personales.**

A mis padres, por acompañarme siempre en todo momento y alentarme para terminar la realización de la tesis. Gracias a ellos he logrado salir adelante y pude lograr una de mis metas culminando mi trabajo de tesis.

A mi madre, por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada momento de mi vida.

A toda mi familia, mis tíos, primos y sobrinos a quienes quiero mucho y me enseñan cada día a ser una mejor persona.

A mis amigos biólogos, Carlos Cervantes Montes por tu carisma que siempre alegraba mis días en la facultad, a Marco D. Ornelas Cruces y Dalia Margarita Ortiz Lozano los quiero mucho saben que sin ustedes en la carrera no hubiera sido lo mismo, David Arias mi primer mejor amigo de la Universidad con quien he pasado momentos que no cambiaría por nada, a Dafne Figueroa y Fernanda Ayhllon con quienes pasé momentos de diversión en las clases y por hacer la tarea de bioestadística juntas; aprendí mucho de ustedes. A todos ustedes gracias por las alegrías, tristezas y locuras.

A Iván Flores, por revisar mi trabajo y darme consejos para mejorarlo, en verdad fue de gran ayuda. Gracias por tu amistad, por tu apoyo y cariño incondicional.

A mis compañeros de laboratorio Gerardo, Artemisa, Gaby, Christian, Jazz Rocío, Viridiana y Sagrario, por enseñarme el trabajo en equipo y a mejorar mi manejo con los animales. Gracias por ser un gran equipo de laboratorio.

# CONTENIDO

## ABREVIATURAS

## FIGURAS

## TABLAS

## IMÁGENES

## GRÁFICAS

RESUMEN .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
2.1 Antecedentes históricos de la diabetes.....	4
2.2 Diabetes Mellitus en México y el Mundo.....	6
2.3 Definición de Diabetes Mellitus y clasificación .....	8
2.4 Diabetes Mellitus tipo 2.....	9
2.5 Etiología y fisiopatología de la diabetes.....	10
2.5.1 Homeostasis de la Glucosa .....	12
2.6 Diagnóstico de la Diabetes.....	13
2.6.1 Control de la Diabetes Mellitus.....	14
2.7 Hipoglucemiantes Orales.....	15
2.7.1 Mecanismo de acción de la Glibenclamida como hipoglucemiante oral .	17
2.8 Modelos animales utilizados para el estudio de la Diabetes Mellitus tipo 2.	18
2.9 Modelo Inducido con Estreptozotocina y Nicotinamida (STZ-NA) .....	20
2.10 Características experimentales del modelo animal.....	21
2.11 Componentes en plantas reportados con actividad farmacológica .....	22
2.11.1 Ácido clorogénico .....	25
2.12 Plantas Medicinales en México.....	25
2.12.1 Plantas reportadas con actividad hipoglucemiante.....	27

2.12.2 <i>Cecropia peltata</i> L. ....	29
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	34
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	35
4.1 General .....	35
4.2 Particulares .....	35
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	36
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	37
<b>7. RESULTADOS</b> .....	46
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	53
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	57
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	58



## ABREVIATURAS

<b>AC</b>	Ácido clorogénico
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ADA</b>	American Diabetes Association
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion calcio
<b>CC</b>	Cromatografía en columna
<b>CD</b>	Control Diabético
<b>CD+G</b>	Control Diabético con Glibenclamida
<b>CND</b>	Control no Diabético
<b><i>C. obtusifolia</i></b>	<i>Cecropia obtusifolia</i>
<b>Co A</b>	Coenzima A
<b><i>C. peltata</i></b>	<i>Cecropia peltata</i>
<b>dl</b>	Decilitro
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DM2</b>	Dibetes Mellitus tipo 2
<b>ECV</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>Et-H<sub>2</sub>O</b>	Etanol Agua
<b>GE + P</b>	Grupo experimental más extracto acuoso de <i>C.peltata</i>
<b>GE+PX10</b>	Grupo experimental más extracto acuosos a dosis x10
<b>GIP</b>	Péptido insulíntrópico dependiente de Glucosa
<b>GLP-1</b>	Péptido 1
<b>GLUT</b>	Transportador de Glucosa
<b>GPA</b>	Glucemia Plasmática en Ayunas
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina Glucosilada
<b>HPLC</b>	Hig-performance liquid chromatography
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Ácido fosfórico
<b>IDF</b>	International Diabetes Federation

<b>IMSS</b>	Instituto Mexicano del Seguro Social
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>IS</b>	Isorientina
<b>K</b>	Potasio
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>NA</b>	Nicotinamida
<b>NAD+</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Oxidada
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	Hidróxido de Amonio
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ONU</b>	Organización de las Naciones Unidas
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>PARP-1</b>	Poli (ADP ribosa) Polimerasa 1
<b>PTOG</b>	Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa
<b>SM</b>	Síndrome Metabólico
<b>spp.</b>	Especie
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>SU</b>	Sulfonilureas
<b>TLC</b>	Thin Layer Chromatography
<b>TZD</b>	Tiazolidinedionas
<b>T0</b>	Tiempo cero
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México
<b>USA</b>	United States of America
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v.i</b>	Vía intravenosa
<b>v.p</b>	Vía peritoneal

## FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos fisiopatológicos de la hiperglucemia y sus tratamientos farmacológicos adecuados.
- Figura 2.** Secretagogos de insulina estimulan la secreción de glucosa.
- Figura 3.** Rutas metabólicas de plantas vasculares.
- Figura 4.** Moléculas que presentan unidades de isopreno.
- Figura 5.** Esqueleto básico de los flavonoides.
- Figura 6.** Ejemplos de alcaloides.
- Figura 7.** Ácido clorogénico.

## TABLAS

- Tabla 1.** Principales países con mayor número de personas con diabetes entre los 20 a 79 años. Estimaciones al 2035.
- Tabla 2.** Grupos experimentales y dosis de administración.
- Tabla 3.** Pasos a seguir para realizar las placas de cromatografía.
- Tabla 4.** Condiciones a las que se sometió el HPLC.
- Tabla 5.** Valores medios de glucosa plasmática circulante.
- Tabla 6.** El número indica cuantos metabolitos fueron detectados, (-) indica metabolito no detectado

## IMÁGENES

- Imagen 1.** *C. peltata L.*
- Imagen 2.** Árbol de *Cecropia*.
- Imagen 3.** Placa de TLC para detectar A y B) Flavonoides glucosilados, C) flavonoides agliconas. 1. Extracto acuoso, 2. Extracto Et-H<sub>2</sub>O. IS (isorientina), AC (ácido clorogénico).

## GRÁFICAS

- Gráfica 1.** Efecto hipoglucemiante del extracto acuoso *C. peltata* en ratas Wistar adultas en estudio agudo durante 3 horas. \* Diferencias significativas contra el CD ( $p \leq 0.05$ ).
- Gráfica 2.** Efecto hipoglucemiante del extracto acuoso *C. peltata* en ratas Wistar adultas en estudio agudo durante 3 horas. \* Diferencias significativas contra el CD ( $p \leq 0.05$ ).
- Gráfica 3.** Cromatogramas del extracto acuoso de *C. peltata*. A) Muestra el cromatograma del estándar de ácido clorogénico resuelto en HPLC de fase reversa y B) Muestra el perfil cromatográfico del extracto acuoso *C. peltata* resuelto en HPLC a una longitud de onda de 320nm. Tiempo de retención del AC 8.72 min.
- Gráfica 4.** Espectro de HPLC de *C. peltata* (línea azul) comparado con el espectro de Ácido clorogénico (línea roja). Se puede observar un alto porcentaje de similitud entre ambos espectros.



## RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio de tipo agudo para determinar el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de la corteza de *Cecropia peltata*, la cual fue recolectada en el municipio de Cancún Quintana Roo en México.

Para llevar a cabo el proceso experimental, se utilizaron ratas Wistar adultas hiperglucémicas inducidas con Estreptozotocina y protegidas con Nicotinamida, a las cuales se les realizaron mediciones de glucosa sanguínea, con espacios de tiempo en minutos de 0, 60, 120 y 180.

Se observó una disminución de glucosa sanguínea en los grupos experimentales a partir de los 60 minutos, para analizar los resultados se empleó una T de student, como prueba estadística y se construyó una curva dosis respuesta, graficando las medias de glucosa de los grupos control y los grupos experimentales.

Posteriormente se realizaron placas de cromatografía en capa fina (TLC), en el extracto acuoso y Etanol-Agua (Et-H<sub>2</sub>O), para determinar los metabolitos secundarios presentes en la corteza de la planta. Finalmente se realizó una prueba de Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), con el fin de corroborar la presencia de Ácido clorogénico en el extracto acuoso de la corteza de la planta ya que este compuesto ha sido citado en estudios previos, como un inhibidor de la gluconeogénesis y el cual se encuentra presente en plantas del género *Cecropia*.

En las pruebas fitoquímicas de TLC realizadas a los extractos, acuoso y Et-H<sub>2</sub>O, se determinó la presencia de metabolitos del grupo flavonoides de tipo agliconas y glicosilados, lo que resulta importante al corroborar con resultados previos del extracto acuoso de la hoja en un modelo inducido en ratas a los 5 días de nacidas (Andrade Cetto et al 2007).



En el análisis por HPLC del extracto acuoso, se determinó la presencia del ácido clorogénico (AC) en mayor concentración con respecto a otros compuestos, es probable que este compuesto sea uno de los causantes de que se observara una disminución en las concentraciones de glucosa en sangre. En 2015 Nicasio demuestra que el efecto hipoglucemiante se encuentra correlacionado con las concentraciones de AC en las hojas de *C. peltata*.

Finalmente el presente estudio confirmó la actividad hipoglucemiante del género *Cecropia*, en particular, de acuerdo a los usos etnobotánicos que se le da en la medicina tradicional mexicana.

El uso del modelo STZ-NA, ayudó a la mejor comprensión de algunos de los aspectos de la fisiopatología de la diabetes a nivel experimental.



## 1. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica de múltiples causas. En su etapa inicial no produce síntomas, pero al ser detectada tardíamente puede provocar complicaciones graves de salud, estas pueden ser: infarto al miocardio, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura (ensanut.insp.mx, 2012).

Debido a un mal estilo de vida de la población, tanto en niños como adultos, los niveles de sobrepeso y obesidad han ido en aumento, este es el primer factor de riesgo para desencadenar la enfermedad; lo cual ha dado como resultado una mayor prevalencia de diabetes en esta población, incrementando sustancialmente en las últimas décadas (ensanut.isp.mx, 2012).

Por otro lado, las plantas medicinales han adquirido importancia en cuanto a su uso tradicional debido a la necesidad de encontrar alternativas para tratar enfermedades como la diabetes, dentro de estas se encuentra el género *Cecropia* el cual tiene importancia biológica por sus múltiples usos.

Entre las especies más utilizadas en la herbolaria mexicana se ubican a *C. obtusifolia* y *C. peltata*, estas se han reportado para tratamientos con efecto hipoglucemiante, diurético y tranquilizante debido a la amplia diversidad de metabolitos que contiene, entre los que se encuentran: flavonoides, terpenoides y esteroides que se encuentran presentes en la planta (Chavez, J, 2010).

Actualmente, la medicina tradicional puede ser descrita como un conjunto de conocimientos y prácticas de origen indígena, sobre salud, la cual constituye un legado de la cultura mexicana que debe ser cuidado y preservado. Este tipo de medicina representa una opción importante ante la necesidad de atención a la



salud y ha sido reconocida por organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización de la Naciones Unidas (ONU) (Nigenda G, 2001, CINU, 2013).

Por lo antes mencionado, el presente trabajo contribuye a enriquecer el conocimiento en cuanto a la química y farmacología del género *Cecropia* en específico de la especie *C. peltata*, brindando información más detallada sobre su efecto terapéutico.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Antecedentes históricos de la diabetes**

El entendimiento de la DM como una enfermedad y su desarrollo en el cuerpo humano, ha llevado a realizar diversas investigaciones en los campos de medicina, epidemiología y farmacología.

Dicha enfermedad ya era mencionada desde antes de la era cristiana, Areteo de Capadocia, un médico griego residente de Roma describió este padecimiento como una enfermedad fría y húmeda, en la que la carne y los músculos se funden para convertirse en orina y fue él quien le otorgó el término de Diabetes que en griego significa Sifón. Durante la edad moderna, en 1679 Thomas Willis le dio el nombre de diabetes mellitus (DM) que significa sabor a miel por el sabor dulce de la orina. El clínico francés Bouchardat dio a conocer la importancia de la obesidad y la vida sedentaria como factores importantes en el origen de la diabetes, sugiriendo las normas para un tratamiento dietético basándolo en la





restricción de glúcidos y en el bajo valor calórico de la dieta (Sánchez Rivero, 2007).

Para el año 1869, Paul Langerhans observó racimos de células del páncreas bien diferenciadas, describió estas células llamándolas islotes de Langerhans cuando trabajaba en su tesis doctoral, años después en 1893 Edouard Laguesse sugirió que estos racimos constituían la parte exocrina del páncreas.

Los jóvenes Canadienses Banting y Best consiguieron aislar la insulina y descubrieron su efecto hipoglucemiante en 1921. Por otro lado el primer extracto hipoglucémico patentado fue el “Acotamol”, desarrollado por el alemán Georg Zuelguer en 1907, sin embargo, presentó graves efectos tóxicos. El médico rumano Nicolas Paulesco también preparó un extracto a partir de páncreas congelados de perro y buey, al cual llamó “pacreatina” y era capaz de revertir la hiperglucemia, sin embargo, el extracto era demasiado potente por lo cual los efectos tóxicos eran tales que excluían cualquier posibilidad de administración terapéutica (Sánchez Rivero 2007). En 1942 Janbon y Col; de la Clínica de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina de Montpellier, observaron fortuitamente que el p-amino benceno-isopropil-tiodiazol presentaba propiedades hipoglucemiantes y fue así como se descubrieron las sulfonilureas. Este fue el punto de partida de una serie de trabajos experimentales y clínicos que han permitido el tratamiento de algunas formas de diabetes, mediante compuestos que, a diferencia de la insulina, resultan activos cuando se administran por vía oral (Cañadell, J.M, 1960; [www.iqb.es](http://www.iqb.es)).

Así se fueron haciendo descubrimientos entorno a la diabetes a lo largo de la historia. Este breve resumen es sólo una parte representativa en la historia de esta enfermedad, sin embargo, han existido muchos más estudios y personajes



que se han interesado por la Diabetes con el fin de entender el papel que juega la hormona que libera el páncreas. Estos descubrimientos, han ayudado a entender cómo es que se desarrolla la enfermedad, lo cual, ha permitido que se intenten emplear diversos tipos de tratamientos con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes con DM, entre los cuales la mayoría no han sido del todo exitosos por lo cual se siguen haciendo investigaciones.

## **2.2 Diabetes Mellitus en México y el Mundo**

En el 2012 se reportaron cerca de 371 millones de personas con DM a nivel mundial y esta cifra ha ido en aumento en todos los países. En la población mexicana, el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI, 2012) señala que la diabetes ocupaba el segundo lugar de enfermedades crónicas que más afectan a los mexicanos en edad productiva después de enfermedades cardiovasculares y cáncer.

La Federación Internacional de Diabetes (IDF) en el 2013, reconoce la existencia de 382 millones de personas que viven con el padecimiento y alguna afectación como resultado de los estados de hiperglucemia. Esto indica con respecto a los datos del 2012, que la cifra de pacientes se incrementó en 11 millones de personas y se prevé que para el 2035 la población mundial podría contar con 471 millones de personas con esta enfermedad; lo cual, representa una crisis de salud en todo el mundo pues a finales del 2013 la diabetes habría causado 5.2 millones de muertes y un coste económico de 548,000 millones de dólares en gasto sanitario a nivel mundial (IDF, Atlas de Diabetes 6° Edición, 2013).



En México la diabetes ha tomado una gran relevancia ya que se encuentra como una de las primeras causas de muerte en nuestro país (ENSANUT, 2012). Cerca de 6.4 millones de personas han sido ya diagnosticadas con Diabetes. La proporción de adultos con diagnóstico previo es de 9.2%, el total de personas adultas podría ser incluso el doble tomando en cuenta las personas diabéticas que no conocen su condición siendo aproximadamente 12 millones de personas las que padecen esta enfermedad. Las personas diagnosticadas han representado un gasto de 3,430 millones de dólares al año en atención médica y complicaciones. Del 9.2% de personas adultas diagnosticadas, poco más del 80% recibe tratamiento, el 16% no cuenta con servicio médico, lo cual representa un gran porcentaje con riesgo de desarrollar complicaciones, incluso un 47% ya ha recibido un diagnóstico por hipertensión arterial que puede ser marcado como un parámetro asociado a riesgos de Enfermedades Cardiovascular (ECV) y Síndrome Metabólico (SM) ([www.fmdiabetes.org/fmd/pag/diabetes\\_numeros.php](http://www.fmdiabetes.org/fmd/pag/diabetes_numeros.php)).

En comparación con otros países a nivel mundial, México se ubica en la posición 6 y se espera que para el 2035 pase al 5º lugar (Atlas IDF, 2013). La tabla 1 muestra a los países con mayor prevalencia de Diabetes y el número de personas que la presentan, así como un estimado del número de personas que serán diagnosticadas con esta enfermedad para el 2035.



**Los 10 principales países/territorios por número de personas con diabetes (20-79 años), 2013 y 2035**

PAÍS/ TERRITORIO	2013 MILLONES	PAÍS/ TERRITORIO	2035 MILLONES
China	98,4	China	142,7
India	65,1	India	109,0
Estados Unidos de América	24,4	Estados Unidos de América	29,7
Brasil	11,9	Brasil	19,2
Federación de Rusia	10,9	México	15,7
México	8,7	Indonesia	14,1
Indonesia	8,5	Egipto	13,1
Alemania	7,6	Pakistán	12,8
Egipto	7,5	Turquía	11,8
Japón	7,2	Federación de Rusia	11,2

**Tabla 1.** Principales países con mayor número de personas con diabetes entre los 20 a 79 años. Estimaciones al 2035. Fuente: Atlas de la Diabetes de la IDF sexta edición. 2013.

### 2.3 Definición de Diabetes Mellitus y clasificación

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) define a la DM como un grupo de enfermedades metabólicas, que se caracteriza por una hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción de insulina, acción de esta o ambas (ADA 2014). El origen y la etiología de la DM pueden ser muy diversos, pero conllevan a la existencia de alteraciones en la secreción de insulina, en la sensibilidad a la acción de la hormona o bien en ambas en algún momento de su historia natural (Conget, 2002).

La ADA propuso la siguiente clasificación y actualmente se encuentra vigente. Se incluyen 4 categorías de pacientes (ADA 2014).

1. Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1). Se caracteriza por destrucción de las células  $\beta$ , lo cual conduce a una deficiencia absoluta de insulina.



2. Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Puede variar desde una predominante resistencia a la insulina, con una relativa deficiencia de esta, hasta un predominante defecto secretor con resistencia a la insulina.

3. Diabetes Mellitus gestacional (DMG). Este término se ha definido como cualquier grado de intolerancia a la glucosa iniciado o reconocido por primera vez durante el embarazo.

4. Otros tipos específicos de diabetes. Estos tipos específicos se refieren por ejemplo a defectos genéticos de las células  $\beta$ , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, inducidas químicamente, causada por infecciones etc.

## 2.4 Diabetes Mellitus tipo 2

Este tipo de diabetes se refiere comúnmente a aquellas personas que no son dependientes a la insulina. Dicha categoría abarca a los individuos que presentan resistencia a la insulina y por lo general tienen una relativa pero no absoluta deficiencia de insulina. Al menos inicialmente, estos individuos no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir (ADA, 2014).

La resistencia a la insulina RI es uno de los padecimientos más importantes que caracteriza a la DM2, y puede ser definida como una condición en la cual los órganos diana son resistentes a su acción, y es necesaria una alta concentración de esta hormona para tener un efecto biológico normal, por lo cual la hiperinsulinemia es una clara consecuencia de la RI (Mercurio *et al.*, 2012).



Más de 90% de pacientes con DM2 son obesos y presentan RI. Lo que distingue a individuos obesos con y sin diabetes es la capacidad para compensar la RI con un aumento en la secreción de esta. Los pacientes que desarrollan DM2 tienen una inadecuada compensación de insulina en las células  $\beta$ , para la resistencia a la insulina, es decir que la respuesta de las células  $\beta$  está por debajo de lo normal en pacientes con DM2 (Alsahli Mazen y Gerich, 2012).

El deterioro en la función de las células  $\beta$  y la resistencia a la insulina están presentes antes de la aparición de la DM2 y son predictivo a su posterior desarrollo.

## **2.5 Etiología y fisiopatología de la diabetes**

Se ha observado que en pacientes con DM2 la masa de células  $\beta$  presentes en el páncreas se encuentra disminuida considerablemente (60% aproximadamente), (Curtis L, 2012) por lo cual la capacidad para compensar la resistencia a la insulina disminuye, es decir que para cualquier grado de reducción de sensibilidad a la insulina la respuesta de las células  $\beta$  será inferior a la normal.

La resistencia a la insulina presente en las personas con DM2 puede ser atribuida al medio ambiente como factores de obesidad, inactividad física y dietas altas en grasa; cabe mencionar que una de las consecuencias más relevantes de la DM2 es la glucotoxicidad y la lipotoxicidad. Hay varios factores que pueden estar implicados en la resistencia a la insulina asociada a la obesidad, uno de los más importantes es la acumulación de lípidos en los órganos blancos de insulina. (Alsahli Mazen y Gerich, 2012). Evidencias actuales indican que el factor más importante implicado en la resistencia a la insulina asociada a personas obesas es



el nivel de ácidos grasos libres circulantes en el plasma, cuando aumentan estos niveles disminuye la captación de glucosa en el músculo y aumenta la producción de glucosa endógena y se ha demostrado en modelos animales que esto deteriora la secreción de insulina (Alsahli Mazen y Gerich, 2012).

Una persona con DM2 puede presentar los siguientes síntomas:

1. Glucosuria, se presenta cuando la glucosa se excreta en la orina, como consecuencia de un aumento en los niveles de glucosa en la sangre excediendo la capacidad de reabsorción de los túbulos renales.
2. La poliuria, se presenta debido al efecto osmótico, es decir que al aumentar la concentración de soluto osmóticamente activo en la orina provoca que el nivel de agua aumente.
3. La polidipsia, se presenta para compensar la pérdida de agua, a causa de la poliuria, para compensar esta pérdida de agua el centro de la sed se activa y consumiéndose más.
4. Finalmente para compensar la pérdida de glucosa y proteínas se presenta la polifagia, cuando el paciente ingiere más alimento.

Todos estos síntomas pueden dar como consecuencia infecciones recurrentes crónicas (Vasudevan DM, 2011).

La Cetoacidosis Diabética es una complicación metabólica aguda, es más común en la DM1, se debe a la deficiencia de insulina, la cual causa lipólisis acelerada liberando ácidos grasos a la circulación, la oxidación de estos ácidos grasos aumentan la concentración de Co A (Vasudevan DM, 2011).



### 2.5.1 Homeostasis de la Glucosa

Después de la ingestión de comida, la glucosa, es absorbida en el intestino y entra al torrente sanguíneo, el aumento de la concentración de glucosa circulante en plasma sanguíneo, desencadena la liberación de insulina por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas, la cual estimula la captación de glucosa periférica y suprime la producción endógena, principalmente de vía hepática. La insulina también contribuye al almacenamiento de glucosa como glucógeno o su conversión a grasas cuando funciona de forma antagónica con el glucagón (Vasudevan DM, 2011).

Los niveles de glucosa en la sangre de adultos sanos están regulados estrictamente dentro de un rango de 70 a 99 mg/dl, y son mantenidos por hormonas específicas como la insulina, el glucagón y las incretinas, así como por acciones del sistema nervioso central y periférico, para satisfacer los requerimientos metabólicos de varias células y tejidos entre los que se citan cerebro, muscular, tracto gastrointestinal, hígado, riñón, y tejido adiposo (Curtis, 2012).

En circunstancias fisiológicas normales, los niveles de glucosa rara vez suben más allá de 140 mg / dl, incluso después del consumo de una comida alta en carbohidratos. Considerando las hormonas involucradas en la regulación de la glucosa cabe mencionar que estas actúan en diferentes partes del cuerpo y tienen diferentes funciones, ya que la insulina es un potente antilípido y su función es acelerar el transporte de glucosa a las células sensibles de insulina, por otro lado el glucagón se produce por los bajos niveles de glucosa, acelera la





gluconeogénesis y glucogenólisis (la secreción de glucagón es inhibida por hiperinsulinemia) (Curtis, 2012).

Por último, las incretinas son hormonas que se producen en el tracto gastrointestinal y se liberan cuando llegan los nutrientes al intestino para posteriormente estimular la secreción de insulina. Las dos incretinas más importantes son el polipéptido inhibidor gástrico o péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP por sus siglas en inglés) y el péptido -1 el cual es similar al glucagón (GLP-1).

Para lograr transportar la glucosa dentro de las células se requiere la presencia de insulina y proteínas específicas que sirven como transportadores (facilitadores de transporte de glucosa denominadas moléculas GLUT), estas actúan formando un poro acuoso a través de la membrana. De las 12 moléculas GLUT conocidas, el GLUT4 (dependiente de la presencia de insulina) es conocido como el principal transportador para adipocitos, músculo y tejido cardíaco. Mientras que los GLUT 1, 2, 3 y 8 facilitan la entrada de glucosa en otros órganos (cerebro e hígado por ejemplo). El GLUT 2 es el transportador que se expresa principalmente en las células  $\beta$  del páncreas. (Curtis, 2012, Arechavaleta, 2006) y (Castrejón Vicente *et al*, 2007).

## 2.6 Diagnóstico de la Diabetes

Los criterios para realizar el correcto diagnóstico de DM son los siguientes:

- A) plasmática ocasional  $\geq 200$  mg/dl (11.1 mmol/L) en un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia,



B) glucemia plasmática en ayunas (GPA)  $\geq$  126mg/dl (7.0 mmol/L), entendiéndose por ayunas un período sin ingesta de alimentos de al menos 8 h,

C) glucemia plasmática  $\geq$  200 mg/dl (11.1 mmol/L) a las 2 h de una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG). La prueba debe realizarse según la descripción de la OMS (1985), con 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua. (Conget, 2002) y (Standards of Medical Care in Diabetes, 2012).

Otra prueba importante que se realiza para diagnosticar diabetes es medir la hiperglucemia crónica midiendo los niveles de hemoglobina glucosilada HbA1c, la cual es ampliamente utilizada como un biomarcador estándar. Esta prueba refleja los niveles de glucosa en sangre en un periodo de tiempo de 2 a 3 meses. El umbral de HbA1c para diagnosticar diabetes debe ser  $\geq$ 6.5%. La prueba de diagnóstico se debe realizar utilizando un método que está certificado por: El Programa Nacional de Glucohemoglobina Estandarizado (ADA, 2014).

### **2.6.1 Control de la Diabetes Mellitus**

Los esquemas recomendados en la práctica clínica para el control de la diabetes se agrupan en los siguientes puntos:

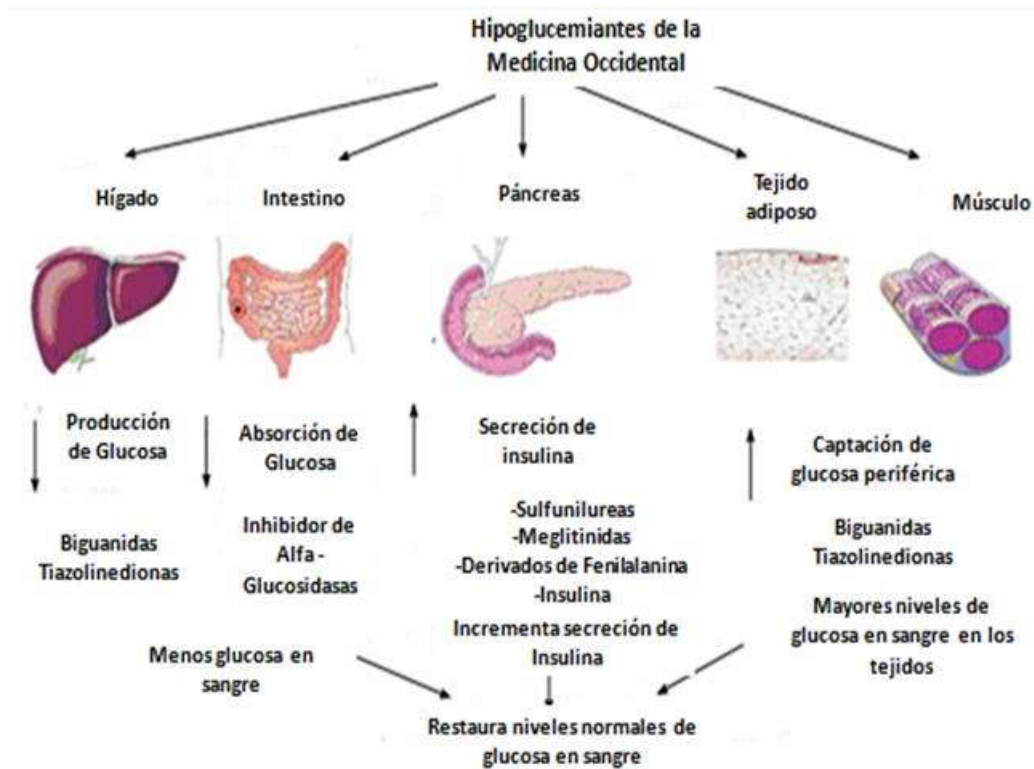
1. Dieta y ejercicio. Este puede ser el punto más importante para tratar la Diabetes y es considerada como la primera línea de tratamiento. La dieta debe ser equilibrada con contenido de alto valor proteico y bajo en calorías desprovistas de azúcares refinados y baja grasa saturada.
2. Agentes Hipoglucemiantes orales. Principalmente de dos tipos sulfonilurea y biguanidas utilizadas principalmente en DM2.



3. Inyecciones de Insulina. Para tratar la DM1 generalmente y algunas veces en la DM2 cuando los hipoglucemiantes orales no son suficientes.
4. Prevención de complicaciones. (Vasudevan DM, 2011).

## 2.7 Hipoglucemiantes Orales

Los hipoglucemiantes orales, son aquellos fármacos que son utilizados en el control de la hiperglucemia en pacientes diabéticos, presentan diferentes mecanismos de acción y los órganos blancos en los que actúan también varían (Figura 1). También reciben el nombre de antihiperglucemiantes debido a que al estabilizar la glucemia plasmática o circulante evitan que esta suba más de los niveles permitidos, caso específico, la metformina y las tiazolidinedionas (TZD).



**Figura1.** Mecanismos fisiopatológicos de la hiperglucemia y sus tratamientos farmacológicos adecuados. Tomado y editado de El-Abhar HS 2014 5(2):176-197.

Algunos de los Hipoglucemiantes Orales más frecuentemente usados para tratar la DM2 son:

- **Sulfonilureas (SU):** Son secretagogos de insulina, cierran los canales de K sensibles a ATP en la membrana plasmática. Existen dos generaciones de fármacos en este grupo, en la primera generación se encuentra la acetohexomida, clorpropamida, tolazamida y tolbutamida. En la segunda generación de fármacos se encuentra la Glibenclamida, glipizida, glicosida y glimepirida. Cabe resaltar que la segunda generación es mucho más usada ya que son mucho más potentes y tienen un rápido inicio de acción.



- **Meglitinidas:** Actúan como secretagogos de insulina. Sin embargo no se unen al mismo receptor y tienen una cinética diferente por lo cual su acción es mucho más rápida y tienen una vida media más corta.
- **Metformina:** Es una biguanida y tiene efecto gluco regulador solo en presencia de insulina endógena, disminuyendo la producción de glucosa endógena y la resistencia a la insulina periférica (de un 20% a un 30% aproximadamente)
- **Tiazolidinedionas:** Actúan mejorando la sensibilidad a la insulina particularmente en los tejidos periféricos. Son agonistas selectivos para el receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR  $\gamma$ ). Estos compuestos favorecen la inhibición de la gluconeogenesis hepática y disminuyen la resistencia a la insulina.
- **Inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas:** Este tipo de fármaco, es un inhibidor competitivo de enzimas presentes en el intestino delgado, que se encargan de romper los oligosacáridos y polisacáridos en monosacáridos, por lo tanto se retrasa la absorción de los carbohidratos y tarda en entrar la glucosa al sistema circulatorio, disminuyendo los niveles de glucosa postprandial (Cheng y Fantus, 2005; Glamoklija y Adlija, 2010).

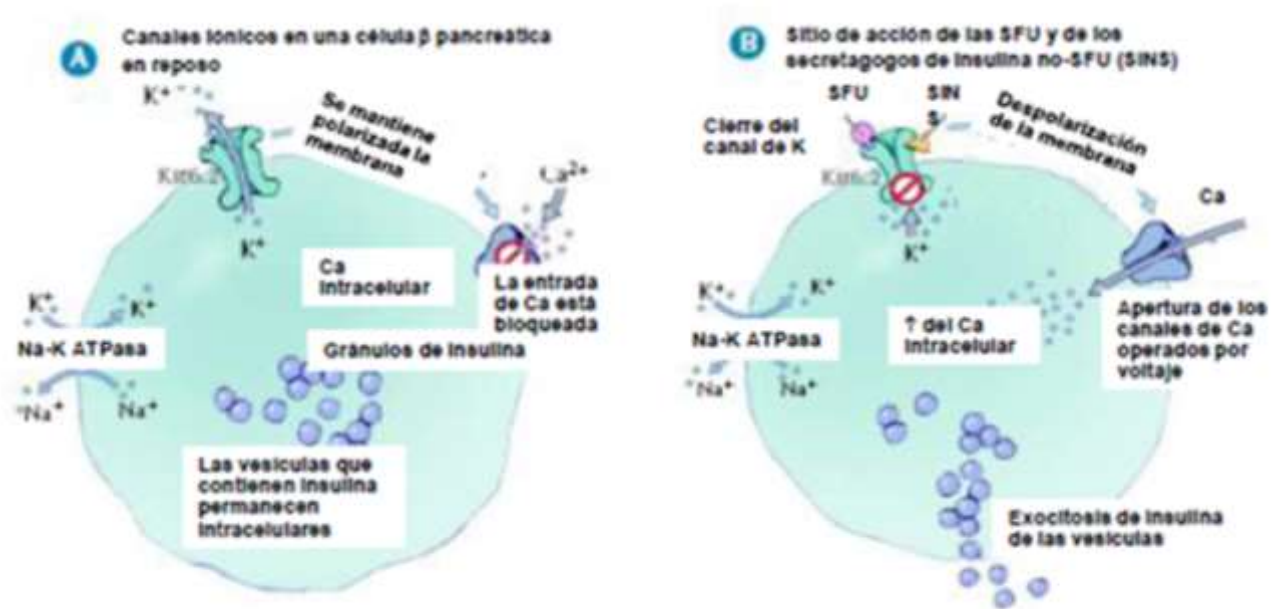
### 2.7.1 Mecanismo de acción de la Glibenclamida como hipoglucemiante oral

Las SU se unen su receptor de las sulfonilureas en la superficie de las células  $\beta$  pancreáticas. El receptor de las sulfonilurea está íntimamente relacionado con las subunidades de un canal de potasio sensible al adenosin trifosfato. La unión de



las SU con su receptor da como resultado el cierre de los canales de potasio, inhibiendo la salida de los iones potasio de las células  $\beta$  en reposo causando la despolarización de la membrana y a su vez se abren los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. La entrada de calcio hace que ocurra la exocitosis de las vesículas de insulina (Figura 2) (Cheng y Fantus G, 2005).

La dosis recomendada por la guía ALAD (2006) de diagnóstico control y tratamiento de la DM 2 es la siguiente: Dosis media diaria 5mg dos veces al día. Dosis máxima diaria 20 mg.



**Figura 2.** Secretagogos de insulina estimulan la secreción de glucosa tomado y editado de Cheng y Fantus, 2005

## 2.8 Modelos animales utilizados para el estudio de la Diabetes Mellitus tipo 2

Los modelos animales para la DM2, son un método para poder observar el efecto *in vivo* de un extracto y de este modo poder determinar su eficacia en un



organismo, el modo de acción y efectos secundarios de plantas hipoglucemiantes y sus principios activos.

El uso de modelos experimentales en investigación es muy recurrido. Se ha tratado de reproducir a la Diabetes mellitus sin alcanzar el objetivo en su totalidad, pero se han podido inducir ciertos síntomas que son característicos de esta; tales como, la hiperglucemia, tolerancia alterada a la glucosa y resistencia a la insulina. Por lo tanto, muchos modelos animales propuestos se han utilizado con el fin de seleccionar alguna de las diferentes patologías que se han observado en la diabetes humana. Estos modelos se han usado para evaluar la actividad hipoglucémica en principio y así, investigar el modo de acción de un extracto determinado. Cabe mencionar que aunque se encuentre un efecto hipoglucemiante en animales este no siempre puede ser eficaz en humanos (Eddouks *et al.*, 2012).

El avance para la prevención y tratamiento de la DM2 depende del entendimiento y comprensión de los mecanismos de esta enfermedad por lo cual seguirá siendo necesario utilizar modelos animales, ya que se usan experimentos que son éticamente inaceptables realizarlos en humanos.

La clasificación de modelos animales para la DM2 es la siguiente:

- A) Espontáneos o genéticamente derivados
- B) Inducidos por la dieta
- C) Inducidos químicamente
- D) Inducidos quirúrgicamente
- E) Transgénicos / knock out



Además de esta clasificación los modelos animales también pueden ser separados en otras dos categorías que son, a) modelos análogos y b) modelos intrínsecos. El primero trata de imitar la DM2 humana y el segundo es para responder preguntas concretas o aspectos específicos de ésta.

Se deben tomar muy en cuenta las precauciones a la hora de hacer una extrapolación clínica, debido a que ningún modelo refleja por completo la DM2 humana y por lo tanto es necesario utilizar diferentes tipos de modelos dependiendo el objetivo de la investigación y la pregunta que se quiere responder acerca de la enfermedad (Arias y Balibrea, 2007) y (Eddouks *et al*, 2012).

## **2.9 Modelo Inducido con Estreptozotocina y Nicotinamida (STZ-NA)**

Diversas drogas han sido probadas para tratar la DM2, por lo cual, ha sido necesario el desarrollo de modelos experimentales con animales que permitan realizar estudios que den pie al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento y su prevención. Uno de estos modelos animales es la diabetes inducida en ratas usando estreptozotocina y nicotinamida (STZ-NA) implementado por Masiello (Szkudelski T, 2012).

Pellegrino Masiello estableció un modelo animal para inducir hiperglucemia a ratas adultas Wistar de la siguiente manera, se aprovechó de la protección parcial ejercida por una dosis adecuada de nicotinamida (NA) contra la estreptozotocina (STZ) ya que está última ejerce un efecto citotóxico en células  $\beta$  del páncreas. Varias dosis de NA se probaron en un rango de 100-350 mg/Kg, esta se inyecta vía intraperitoneal (v.p.), 15 minutos antes de inyectar 65mg/kg de STZ vía intravenosa (v.i.). Es así, como se induce la hiperglucemia experimentalmente, sin embargo; no se puede reproducir por completo la diabetes humana ya que es muy compleja pero nos puede ser útil para un mayor entendimiento de la





patogénesis y evolución de la enfermedad, de igual modo para probar hipoglucemiantes orales. (Masiello *et al*, 1998).

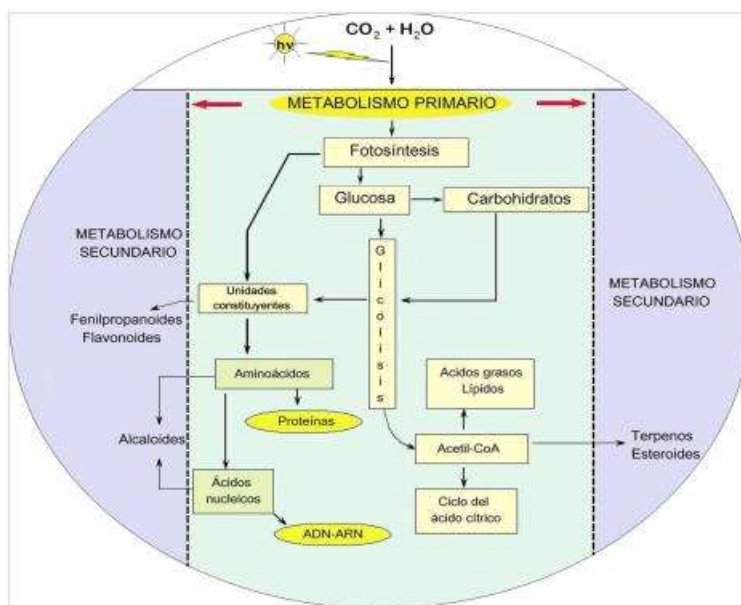
## 2.10 Características experimentales del modelo animal

La Estreptozotocina (STZ) (2-deoxi-2(3-metil-3 nitrosoureido)-D-glucopiranososa; es un análogo de nitrosurea ampliamente usado para inducir diabetes experimental en animales. Su acción citotóxica da como resultado la destrucción de las células  $\beta$  que son la única fuente de insulina ya que la STZ es selectiva con relación a estas células, y la fracción de glucosa que presenta la STZ en su estructura es responsable de que esta llegue a la célula  $\beta$ , mientras que la toxicidad de la STZ depende de la fracción alquilante (metilnitrosurea) que afecta al DNA. Numerosos estudios *in vitro* han revelado que la STZ causa alquilación de ADN lo que da como resultado su fragmentación en las células  $\beta$  y células del insulinoma (RIN m5F). Una extensa lesión en el ADN por STZ conduce a la hiperactividad de PARP-1, lo que es perjudicial a la célula ya que da como resultado un agotamiento sustancial de NAD<sup>+</sup>, lo cual conduce a la disminución de ATP provocando disfunción mitocondrial. La exposición de STZ disminuye la actividad mitocondrial ya que se reduce el consumo de oxígeno por las mitocondrias (Szkudelski T, 2012). Esta razón implica que la NA sea inyectada a las ratas poco antes de administrar la STZ, pues se ha demostrado en estudios *in vivo* que el NA reduce los daños en los islotes pancreáticos, y su acción protectora se debe a que reduce la metilación del ADN pancreático dando como resultado la inhibición de PARP-1 y el suministro de NAD. (Szkudelski T, 2012).



## 2.11 Componentes en plantas reportados con actividad farmacológica

Los metabolitos secundarios son aquellas moléculas sintetizadas por las plantas que no parecen tener una relación directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas. Sin embargo juegan un papel adaptativo importante, ya que muchos de estos desempeñan funciones ecológicas y se distribuyen diferencialmente entre los grupos taxonómicos. La figura 3 hace referencia al metabolismo primario y el secundario de las plantas.

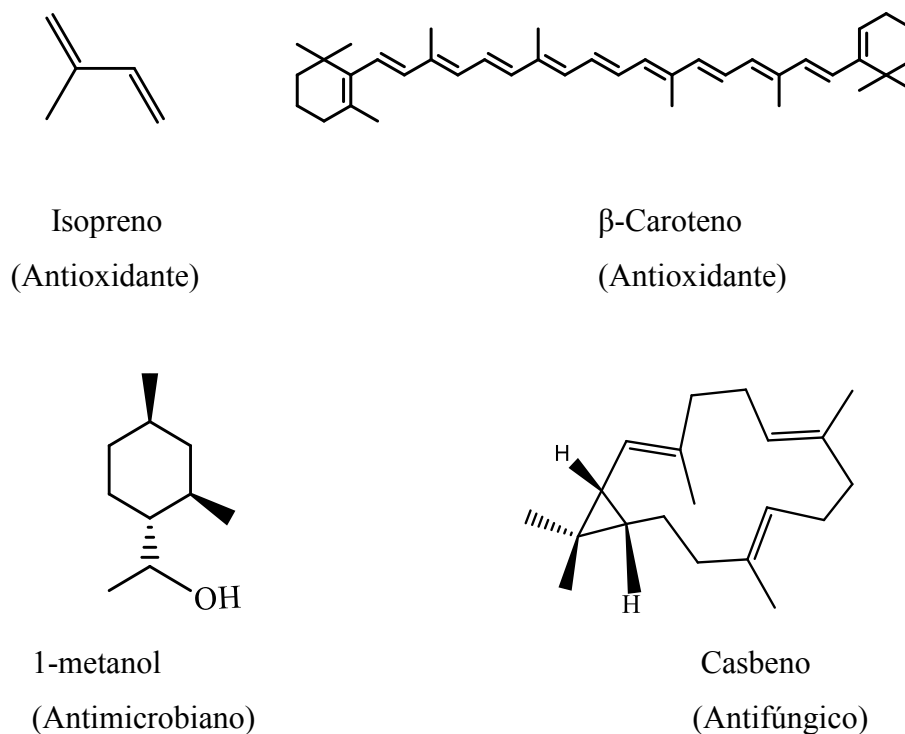


**Figura 3.** Rutas metabólicas de plantas vasculares. (Ávalos A, 2009)

Existen 4 tipos principales de metabolitos secundarios, los cuales se agrupan por estructura química:

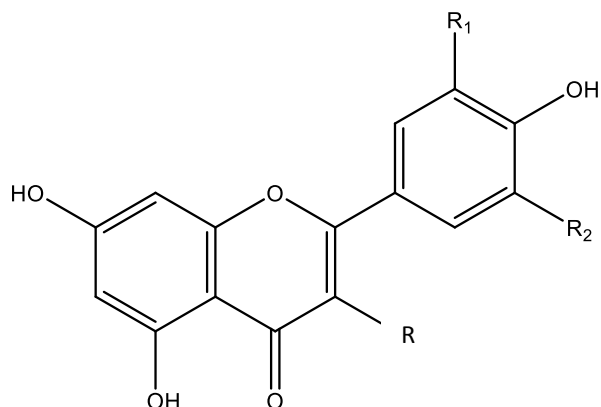


1. Terpenos. Este tipo de moléculas derivan de unidades de isopreno (5 átomos de carbono). Se clasifican por su número de unidades isopreno (C<sub>5</sub>) en monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) y diterpenos (C<sub>20</sub>). Ejemplos en (Figura 4).



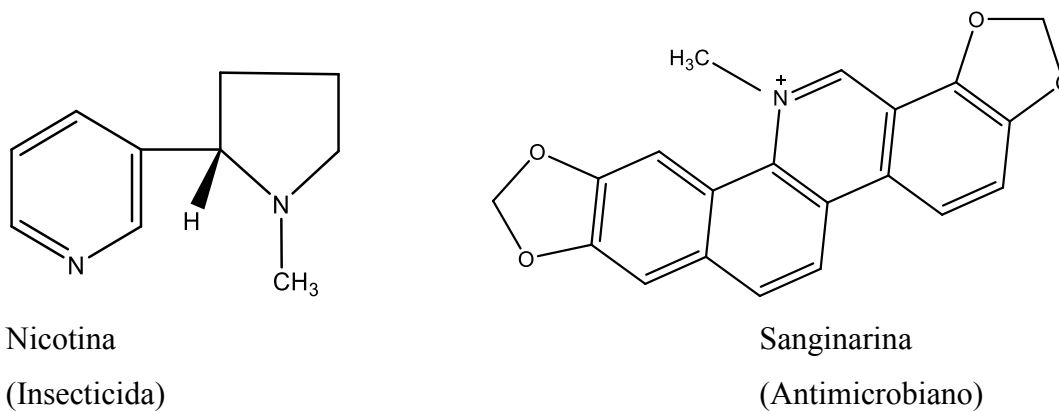
**Figura 4.** Moléculas que presentan unidades de isopreno. Editadas en Chembiodraw

2. Compuestos fenólicos. Estos se caracterizan principalmente por presentar un grupo fenol. Dentro de este grupo se encuentran los compuestos fenólicos polifenoles o fenilpropanoides todos estos derivan de un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Los ácidos *trans*-cinámico y *p*-cumárico se metabolizan formando ácido ferúlico y cafeico, ambos son precursores de derivados más complejos como: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides (Figura 5).



**Figura 5.** Esqueleto básico de los flavonoides. Editadas en Chembiobdraw

3. Glicósidos. Estos compuestos se forman cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que tiene un grupo hidroxilo formando un enlace glicosídico de ahí su nombre.
4. Alcaloides. Son compuestos heterocíclicos que se caracterizan por contener al menos un átomo de nitrógeno en el anillo (Figura 6).



Nicotina  
(Insecticida)

Sanginarina  
(Antimicrobiano)

**Figura 6.** Ejemplos de alcaloides. Editadas en Chembiobdraw



### 2.11.1 Ácido clorogénico

El ácido clorogénico (AC) es un compuesto fenólico encontrado en las plantas. Derivados del AC se han identificado como agentes hipoglucemiantes y pueden afectar el metabolismo de los lípidos. Los compuestos fenólicos tales como el AC resultado de la esterificación del ácido cafeico con el quínico se han caracterizado por modular la actividad de la glucosa 6-fosfatasa, enzima involucrada en el metabolismo de la glucosa (Figura 7) (Rodríguez de Sotillo D, 2002).

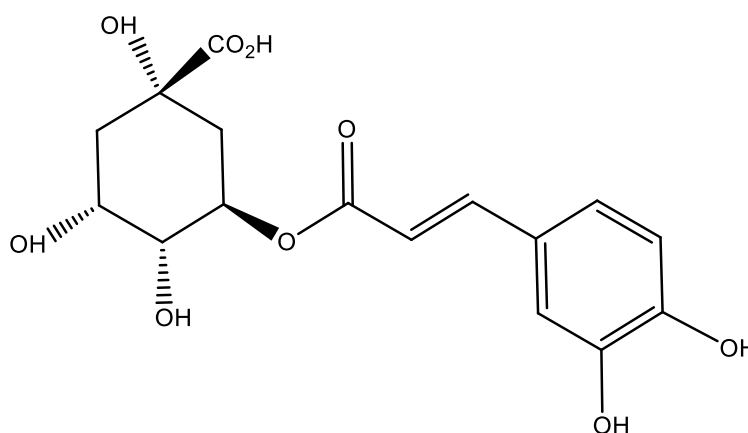


Figura 7. Ácido clorogénico. Editada en Chembiodraw

### 2.12 Plantas Medicinales en México

En México alrededor de 4,000 especies de plantas con flores (aproximadamente 15% de la flora total) tiene atributos medicinales, es decir que 1 de cada 7 especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo solo en 5% de estas especies. Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron; así pues desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales. (Ocegueda *et al.*, 2005). Esto demuestra que en México



existe un amplio campo de investigación debido a la gran biodiversidad de plantas que se tiene y que se han utilizado con fines terapéuticos durante muchos años tradicionalmente, por esta razón México es un país que tiene un potencial muy grande para hacer investigaciones que ayuden al desarrollo de nuevos medicamentos.

De acuerdo con estadísticas de la OMS, las plantas son utilizadas por el 80% de la población mundial para satisfacer o complementar sus necesidades médicas. Se estima que anualmente en todo el mundo se facturan 60 000 millones de dólares por concepto de comercialización de medicinas de patente elaboradas con plantas medicinales. La OMS reconoce que no existe un marco jurídico internacional que regule el acceso a las plantas mismas y su uso tradicional, ni la seguridad, eficiencia y calidad de sus principios activos, pues a pesar de que persiste un arraigado uso de la medicina tradicional, su aplicación ha superado fronteras ancestrales de países y culturas. (Ocegueda *et al.*, 2005). Esto nos deja saber que el uso de plantas medicinales ha tenido y seguirá teniendo una gran relevancia en la medicina, por lo cual es importante que se sigan realizando investigaciones relacionadas con el uso tradicional de plantas y sus sustancias activas, además de conservar los recursos naturales de nuestro país ya que estos no solo representan biodiversidad, también la cultura en México.

La disciplina que se encarga del estudio de las plantas con fines medicinales y que además tiene una relevancia importante en este trabajo de investigación es la etnofarmacología la cual se define como “La exploración científica interdisciplinaria de agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados u observados por el hombre” (Holmstedt y Bruhn, 1983).

El término etnobotánica fue usado por primera vez por John Harshbengers en 1895, para referirse al estudio de las plantas utilizadas por etnias y en especial, por los pueblos primitivos y/o aborígenes. (Marcano,D, Hasegawa M, 2002).



La observación, identificación descripción e investigación experimental de los ingredientes y los efectos de las drogas indígenas, es un verdadero campo de investigación interdisciplinario (Shultes y Swain, 1976).

### **2.12.1 Plantas reportadas con actividad hipoglucemiante.**

Existen diversas plantas que presentan actividad hipoglucemiante y cada una presenta compuestos de diferente naturaleza, que interfieren en la homeostasis de la glucosa sirviendo como coadyuvantes en el control de la diabetes. Por esta razón, el uso de plantas para uso terapéutico se ha convertido en una práctica muy popular entre las comunidades.

De acuerdo a la base de datos NEPRALERT, se conocen aproximadamente 1.200 especies vegetales (incluyendo algas marinas y hongos) pertenecientes a 725 géneros y 183 familias utilizadas popularmente en el tratamiento de la diabetes. (Giner Larza y García Catillo, 2003). Por ejemplo:

#### *Vaccinum myrtillus L.*

El arándano o mirtilo pertenece a la familia de las Ericáceas. Es un arbusto de tamaño pequeño de 15 a 50 cm de altura. Crece en zonas montañosas en la península Ibérica y en toda Europa Central y Septentrional. Con finalidad medicinal se usan las hojas y los frutos, sin embargo solamente las hojas (*Myrtilli folium*) se han empleado tradicionalmente como hipoglucemiantes.

Las hojas contienen gran diversidad de constituyentes: taninos, catéquicos, flavonoides (astragalina, hiperósido, quercetina, isoquercitina, meratina y avicularina) ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico (ácido salicílico y gentísico) y cínamico (ácido clorogénico), lucoantocianócidos, iridoides



(asperulócido monotropeína), y sales minerales destacando las de cromo. (Peris JB y Stubing G, 1995).

#### *Centaurea Aspera* L.

Conocida como travalera, es una planta herbácea de aproximadamente un metro de altura, cuyas hojas son lanceoladas y las flores de color rosa o blanco con estambres morados. Crece de forma espontánea en Europa y en América.

Se utilizan las plantas aéreas recolectadas después de la floración. En su composición destacan flavonoides, heterosidos, cianogenéticos, lactonas sesquiterpénicas y derivados de  $\beta$  sitosterol. Esta es una de las plantas más ampliamente utilizada tradicionalmente para disminuir el nivel de glucosa. Se le ha llegado a llamar popularmente insulina vegetal. Algunos autores atribuyen esta actividad a los heterosidos cianogenéticos. (Giner Larza y García Catillo, 2003)

#### *Tecoma stans* (L) Kunth.

*T. stans* perteneciente a la familia Bignoiaceae es ampliamente utilizada para el tratamiento empírico de la DM2 en Oaxaca y el resto de México. Se ha demostrado que las hojas contienen alcaloides (boschniakina, 4-noractinidina, tecomina, tecomanina, tecostatina, tecostidina, N-normetilskitantina y  $\alpha$ -skitatina), triterpenoides (ácido ursólico, oleanólico,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -sitosterol), compuestos fenólicos (ácidos clorogénico, vanílico, o-cumaríco y sinápico). En un estudio realizado por *Alonso-Castro* y otros se evaluó el efecto de los extractos acuosos de *T. stans* (TSE) en la captación de glucosa, por adipocitos humanos y en el sistema murino T3-F442A. Estudios realizados por *Lozoya-Meckes* y *Mellado-Campos* muestran que TSE posee una capacidad hipoglucemiante en perros, los efectos observados sobre los parámetros sanguíneos parecen estar relacionados con el metabolismo de glucógeno hepático, que implica la activación de la glucogenólisis. Uno de los probables compuestos candidato con efecto hipoglucemiante en la planta podría ser el ácido ursólico, debido a que existen





reportes científicos acerca de su efecto en la reducción de los niveles de glucosa en sangre. Adicionalmente, se ha demostrado que el extracto acuoso de *T. stans* presenta una actividad inhibidora de la  $\alpha$ -glucosidasa y también revierte la resistencia a la insulina en los adipocitos en un proceso mediado por el factor de necrosis tumoral (TNF). Es importante mencionar que los extractos acuosos de la planta poseen cierto grado de toxicidad, por lo que es altamente recomendable estandarizar las dosis para su empleo medicinal (Juárez Cástro y Villa Ruano, 2014).

Para el estado de Oaxaca que es uno de los lugares donde crece la planta de estudio para este trabajo, existen al menos 35 especies usadas para el tratamiento de la DM2 que sustentan su uso tradicional en estudios in vitro e in vivo en modelos animales o bien a través de la química hipoglucemiante de productos naturales. Se ha observado que en plantas que se distribuyen en Oaxaca los compuestos químicamente involucrados en los efectos hipoglucemiantes son en su mayoría compuestos fenólicos y terpenos con actividad comprobada. (Juárez Cástro y Villa Ruano, 2014).

### **2.12.2 *Cecropia peltata* L.**

*Cecropia peltata* L. (Cecropiaceae) es una planta muy apreciada en las comunidades mayas del suroeste de México ya que esta es utilizada para el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 (Imagen 1 y 2).

Su nombre tradicional maya es “Kooche” es un árbol monopódico de 15 metros de altura, crece como vegetación secundaria en el bosque tropical. (Andrade Cetto, 2007). También ha sido reportado el uso tradicional de la corteza



como infusión para el tratamiento de la DM2 además del uso de la hoja en la comunidad de Chikindzonot, Yucatán, México (Andrade Cetto y Heinrich, 2005).

**Reino** Plantae

**Phylum** Magnoliophyta

**Clase** Equisetopsida

**Orden** Rosales

**Familia** Urticaceae

**Género** *Cecropia*

**Especie** *Cecropia peltata* L

El género *Cecropia* spp se caracteriza por presentar infrutesencias múltiples estrobiliformes axilares digitadas, carnosas y agrupadas sobre un pedúnculo aplanado. Las 61 especies de este género se distribuyen en el Neotrópico desde el sur de México hasta el norte de Argentina entre el nivel del mar y 2600m de altitud (Franco-Rosselli ,1997) ([www.tropicos.org](http://www.tropicos.org))

*Cecropia peltata* se halla desde el sur de México y las Antillas (Jamaica y Trinidad), hasta el Norte de Sur América (Colombia, Venezuela, Surinam y Brasil) entre 1000 y 2500 metros de altitud. En Colombia se encuentra en Antioquia, Archipiélago de San Andrés y Providencia, Bolívar, Caldas, Cesar, Chocó, Córdoba, Cundinamarca, La Guajira, Huila, Magdalena, Norte de Santander, Santander y Tolima, entre el nivel del mar y 650 m de altitud (Linares E., 2010).



**Imagen1.** *C. peltata* L. tomado de <http://biogeodb.stri.si.edu/> Recuperada el 15 de marzo de 2015.



**Imagen 2.** Árbol de *Cecropia* tomado de [www.acguanacaste.ac.cr/bosque\\_seco\\_virtual](http://www.acguanacaste.ac.cr/bosque_seco_virtual) Recuperada el 15 de marzo de 2015



Se han reportado el uso de 306 especies, para el tratamiento de la DM2 entre estas se encuentra mencionada *C. peltata*, la cual ha sido reportada como una planta hipoglucemiante en Yucatán México (Andrade Cetto et al., 2007). El género *Cecropia* ha sido de gran importancia, en investigaciones etnofarmacológicas ya que ha sido empleado en usos tradicionales con fines médicos. Entre las menciones de su uso tradicional, se encuentra la preparación en forma de té para el tratamiento de enfermedades de vías respiratorias, control de hipertensión y control de la glucemia (Geison, et al. 2011).

Argueta en 1994 describe el uso de *Cecropia* y menciona que tradicionalmente se usan las hojas, la corteza y la raíz, estas se hierven en agua para preparar una infusión, la cual es tomada a lo largo del día. También menciona que las hojas de *C. peltata* y *C. obtusifolia* son usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la DM.

La yaruma, yagruma o el yagrumo (*C. peltata*) está compuesta por saponinas, flavonoides, fenoles y taninos o ambos, triterpenos y esteroides, compuestos reductores, azúcares, lípidos y quercetina la cual es usada en la elaboración de tabletas como fracción activa que se emplean como broncodilatadores. Algunas aplicaciones farmacológicas que se le atribuyen son el empleo del látex como cáustico y corrosivo contra las verrugas, los callos, los herpes y las úlceras; la corteza es antitusiva y antiblenorrágica, las raíces antibiliosas, el fruto emulsivo y las hojas son analgésicos y antiasmáticos. En general, se plantea que posee propiedades antiestimulantes cardiovasculares y vásculo-arteriales, tónicocapilares y cicatrizantes (Hernandez del Río M., 2014).

Andrade Cetto y Wiedenfield en el 2001 atribuyen el efecto hipoglucemiante de *Cecropia* a los compuestos fenólicos Ácido clorogénico e Isorientina. En 1997 Hemmerle H; probó el efecto del AC y sus derivados en la actividad microsomal de



la glucosa 6 fosfatasa, se demostró la inhibición de la glucogenólisis y gluconeogénesis, lo cual reduce altos índices de producción de glucosa hepática.

En el 2005 Nicasio, P; encontró una concentración de  $19.84 \pm 1.64$  mg de ác.clorogénico/gr en las hojas secas de *C. peltata* y *C. obtusifolia*. El extracto etanólico de *C. peltata* mostró una disminución de glucosa a las 2 y 4 horas después de la administración oral, bajando un 52.8% los niveles de glucosa en plasma mientras que *C. obtusifolia* disminuyó un 45.6%. Con esto demostró que el efecto hipoglucemiante se encuentra correlacionado con las concentraciones de AC en las hojas de la planta. Los resultados de este estudio sugirieron que *C. peltata* puede ser un potente fármaco hipoglucemiante incluso mayor que *C. obtusifolia*.

En el 2010 Andrade Cetto y Cárdenas Vázquez encontraron un mecanismo para entender como *C. obtusifolia* y *C. peltata* podían producir un efecto hipoglucemiante, observado de acuerdo a su uso tradicional. Se probó que el efecto hipoglucemiante se produce por la inhibición de la enzima glucosa 6 fosfatasa en la gluconeogénesis lo cual da como resultado una reducción en la producción de glucosa hepática, examinaron los efectos de ambas especies en la gluconeogénesis (*in vivo*) y la actividad de la enzima (*in vitro*).



### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la diabetes es una enfermedad crónica, es necesario recurrir a la búsqueda de nuevas alternativas para su tratamiento, buscando medicamentos más eficaces y/o accesibles para la población mexicana.

Por otro lado, debido a que se ha demostrado en estudios previos el efecto hipoglucemiante de la hoja de *C. peltata*, se decidió evaluar el efecto del extracto acuoso de la corteza de la planta bajo el esquema de tipo agudo, con el modelo de ratas STZ-NA para entender el uso tradicional en las comunidades mayas de Chikindzonot, Yucatán, México, ya que en estudios etnobotánicos de esta comunidad también es citado el consumo de la corteza en infusiones para el control de la diabetes.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de la corteza de *Cecropia peltata* L. administrada en forma oral en ratas STZ-NA.

### 4.2 Particulares

- Inducir hiperglucemia a las ratas por el modelo STZ-NA.
- Evaluar el efecto hipoglucemiante de la corteza de *C. peltata* de forma oral a una dosis tradicional.
- Evaluar el efecto hipoglucemiante de la corteza de *C. peltata* de forma oral a una dosis tradicional aumentada diez veces más (x10).
- Identificar mediante técnicas de cromatografía los metabolitos secundarios presentes en los extractos acuoso y Et-H<sub>2</sub>O de *C. peltata*.
- Determinar la presencia de Ácido clorogénico en el extracto acuoso de la corteza de *C. peltata* mediante HPLC.



## 5. HIPÓTESIS

**Ho:** El extracto acuoso de la corteza de *C. peltata* L., no tiene efecto hipoglucemiante al aplicar de forma aguda a un modelo de ratas STZ-NA.

**Ha:** El extracto acuoso de la corteza de *C. peltata* L., tiene un efecto hipoglucemiante al aplicar de forma aguda a un modelo de ratas STZ-NA.





## 6. METODOLOGÍA

### Recolección de la planta y preparación de extractos

La corteza de *C. peltata* fue colectada por el Biól. Christian Alan Cabello Hernández en el municipio de Cancún, Quintana Roo en México, durante el mes de Febrero en el 2012 y un ejemplar fue depositado en el IMSS con el número de colecta 15187. Los extractos acuosos y etanol-agua de *Cecropia* fueron preparados en el laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias, UNAM de la siguiente manera.

#### Preparación del extracto acuoso.

Para obtener el extracto acuoso, primero se pesaron 20g de la corteza molida seca de *C. peltata*, ésta se hirvió en 500 mL de agua destilada. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a filtrar al vacío la disolución utilizando un embudo kitazato y tierra de diatomea J.T.Baker®, con el fin de filtrar más rápidamente. Ya filtrada la muestra se congeló en un ultracongelador REVCO a -40°C, transcurrida 24 horas en congelación se procedió a liofilizar (liofilizadora marca LABCONO) por un periodo de 24 horas. Finalmente se determinó el peso seco del extracto acuoso de la corteza de *C. peltata*.

#### Preparación del extracto etanol-agua para las pruebas fitoquímicas

1. Se pesaron 20g de planta molida y se colocaron en un vaso de precipitado, al cual se le agregó agua destilada etanol, con una proporción (1:1)



2. La solución se calentó en una parrilla eléctrica a 40°C y se dejó en agitación durante 5 horas. Pasado ese tiempo se retiró y dejó enfriar a temperatura ambiente.
3. Posteriormente, con el fin de eliminar el exceso de metanol de la mezcla, ésta fue sometida a condiciones de un rotavapor marca BUCHI® para lo cual se colocó la mezcla en un matraz de evaporación. Las condiciones del rotavapor fueron 70 rpm y temperatura de 40°C en un periodo de 24 horas.
4. El extracto obtenido se colocó en dos cristalizadores para ultracongelarlos a -40°C durante 24 horas.
5. Finalmente se procedió a liofilizar por otras 24 horas en la Liofilizadora marca Labcono® para recuperar el peso seco del extracto.

### **Inducción de hiperglucemia a ratas Wistar.**

Para la inducción de hiperglucemia a las ratas se utilizó el modelo animal STZ/NA, el cual fue implementado por Massiello en 1998. Este modelo se usó porque con él se han logrado desarrollar síntomas muy parecidos al de la DM2 como la hiperglucemia, a excepción de la resistencia a la insulina la cual no se puede desarrollar con este modelo.

Al grupo de ratas Wistar seleccionadas se les administró vía intraperitoneal (i.p.) una solución de nicotinamida NA, la cual fue resuspendida en solución salina marca PISA® a una dosis de 150 mg/Kg, 15 minutos después se procedió a inyectar estreptozotocina (STZ, SIGMA, Chemical Co, St. Louis, MO, USA) vía intravenosa (i.v) a una dosis de 65 mg/Kg. La STZ fue reconstituida en una solución buffer de fosfatos a un pH 4.5. Después de 72 horas transcurridas, se tomaron valores de glucosa de las ratas tomando una gota de sangre de la vena caudal de la cola de las ratas y se midió en un glucómetro marca Accutrend, se



seleccionaron ratas que tuvieran valores alrededor de 300 mg/dL para este experimento en específico.

### **Animales de experimentación y grupos experimentales.**

Para la realización del presente experimento se utilizaron ratas wistar adultas del Bioterio de la Facultad de Ciencias, ya inducidas con hiperglucemia por el grupo de Etnofarmacología bajo el modelo de Masiello (1998) STZ-NA estandarizado por el grupo de etnofarmacología de la Facultad de Ciencias. Las ratas fueron colocadas en cajas de acrílico limpias y con camas de aserrín “estéril” separadas por sexo en grupos de experimentación de (3 o 4 individuos). Los grupos se formaron con pesos promedios de 250 gramos y se mantuvieron en condiciones controladas de luz (12:12) y temperatura (22°C). La alimentación fue a base de croquetas Purina y agua en condiciones *ad libitum*. Se realizaron mediciones de glucosa sanguínea a las ratas en experimentación, con espacios de tiempo en minutos de 0 (T0), 60 (T60), 120 (T120) y 180 (T180). Las mediciones fueron realizadas en ayuno.

Dichas mediciones se tomaron a partir de muestras de sangre obtenida de la vena caudal de la cola de la rata para lastimar lo menos posible al animal, realizando un pequeño corte en la punta utilizando tijeras quirúrgicas y posteriormente se procedía a limpiar la cola con alcohol para evitar cualquier tipo de infección. Las mediciones fueron cuantificadas mediante el uso de un glucómetro de Roche modelo Accutrend<sup>®</sup> Plus, y tiras reactivas de la marca Accutrend Glucose.

Se formaron 5 grupos con una n=11, tres grupos fueron controles y dos grupos experimentales. Los grupos fueron asignados de la siguiente forma: Control no Diabético (CND), Control Diabético (CD), Control Diabético con fármaco de referencia sulfonilurea glibenclamida (CD+G), Extracto acuoso de la corteza de la planta a una dosis tradicional (GE+P) y Extracto acuoso dosis tradicional



aumentada 10 veces (GE+Px10), los grupos se detallan en la Tabla 2. Para la administración oral se utilizó una cánula gastroesofágica. Tanto el fármaco de referencia, Glibenclamida como los extractos a evaluar se disolvieron en 1.5mL de solución fisiológica.

En la Tabla 2 se exponen las dosis de administración a los grupos en experimentación.

<b>Grupos n=11</b>	<b>Administración</b>	<b>Dosis</b>	<b>Forma de Administración</b>
<b>CND</b>	Solución fisiológica (Placebo)	1.5 mL	Oral
<b>CD</b>	Solución Fisiológica (Placebo)	1.5 mL	Oral
<b>CD+G</b>	Glibenclamida Fármaco	5 mg/Kg	Oral
<b>GE+ P</b>	Extracto acuoso de <i>Cecropia Peltata</i>	0.025 g /Kg (Dosis Tradicional)	Oral
<b>GE+Px10</b>	Extracto de <i>Cecropia peltata</i>	0.25 g /Kg (Dosis tradicional x10)	Oral

**Tabla 2.** Grupos experimentales y dosis de administración



## Estadística

Los resultados fueron evaluados mediante la prueba de t de Student con una diferencia significativa  $p \leq 0.05$  mediante el programa Excel MS v. 2007.

## Dosis para el extracto acuoso

La dosis se calculó tomando en cuenta que una persona de 70 Kg aproximadamente toma 20g de droga herbal, es decir la masa de material herbal inicial, de estos 20g se obtuvieron 1.793g de extracto liofilizado. Usando este factor de conversión se puede calcular cuánto se requiere de extracto por cada 1000g de peso en rata de la siguiente manera:

$$1\text{Kg de rata} = \frac{(1.793\text{g de extracto})}{(70\text{Kg de una persona})} = 0.025\text{g}$$

Por lo tanto se necesitan 0.025g de extracto por cada 1Kg de peso en rata.

Ahora bien para el cálculo de rendimiento del extracto acuoso se usó la siguiente fórmula:

$$\text{DER} = \frac{\text{Droga herbal (g)}}{\text{Preparación herbal (g)}} = 1 : X$$

$$\text{DER} = \frac{20}{1.7} = 11 : 1$$



Este cálculo se refiere a la masa del material herbal inicial (droga herbal) entre la masa del extracto resultante (preparación herbal). El resultado obtenido quiere decir que se necesitan once partes de planta seca molida para obtener una parte de preparación herbal.

### **Dosis para el cálculo del extracto etanol-agua**

La dosis para el extracto Et-H<sub>2</sub>O se calculó tomando en cuenta que una persona de 70 Kg aproximadamente toma 20g de droga herbal, de estos 20g se obtuvieron 2.253g de extracto liofilizado. Usando este factor de conversión se puede calcular cuánto se requiere de extracto por cada 1000g de peso en rata.

$$1\text{Kg de rata} = \frac{(2.253\text{g de extracto})}{(70\text{Kg de una persona})} = 0.032\text{g}$$

Por lo tanto se necesitan 0.035g por cada Kg de peso en rata

Ahora bien, para el cálculo de rendimiento del extracto Et-H<sub>2</sub>O se usó la siguiente fórmula:



$$\text{DER} = \frac{\text{Droga herbal (g)}}{\text{Preparación herbal (g)}} = 1 : X$$

$$\text{DER} = \frac{20}{2.2} = 9 : 1$$

Se necesitan 9 partes de planta molida para obtener una parte de preparación herbal. El cálculo de rendimiento para este extracto (Et-Ag) puede servir para futuros trabajos de investigación.

### **Cromatografía**

Para la detección de metabolitos secundarios en el extracto acuoso y Et-H<sub>2</sub>O se prepararon placas de cromatografía en placa fina para identificación de Alcaloides, Flavonoides, Flavonoides glucósilados y Terpenos. Ver Tabla 3. Todas las placas se realizaron con el apoyo de la Dra. Sonia Marlen Escandón Rivera.



<b>Metabolito</b>	<b>Control positivo</b>	<b>Sistema de elución</b>	<b>Revelador</b>
Alcaloides	0.005g de Quinina diluido en 1mL de metanol	21.25mL diclorometano, 3.5mL de MeOH:1 al 25% y 0.25mL de NH <sub>4</sub> OH.	Solución Drangendorff
Flavonoides agliconas	0.001g de Quercetina diluida en 1mL de metanol	2.5mL de ác. Acético, 2.5 de MeOH y 20 mL de diclorometano	Ácido difenilbouronico + UV-365 preparación: ácido difenilburinico β-etil amino éster 1%en MeOH (1g: 100mL)
Flavonóides glicosilados	0.001g de Rutina diluida en 1mL de metanol	n-butanol: 8.5 Isopropanol: 8.5 Ácido acético: 18 Agua: 9	Ácido difenilbouronico + UV-365nm preparación : ácido difenilburinico β-etil amino éster (1g:100mL)
Terpenos	0.001g Timol diluido en 1 mL de metanol	80 hexano: 20 diclorometano 20mL de hexano y 5mL de diclorometano	Vainillina (Vainilla + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) al 100% (p.e 0.2g/20mL) Verificar 1g de vainilla en 25 etOH:25 mL Wass, 35, mL H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1 gramo de vainillina más 100 mL de ácido sulfúrico

**Tabla 3.** Pasos a seguir para realizar las placas de cromatografía.





## Identificación cualitativa el ácido clorogénico de *C. peltata* por medio de HPLC

Con el objetivo de determinar cualitativamente el AC en la muestra analizada del extracto acuoso de la corteza de *C. peltata*, se utilizó la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa, a ciertas condiciones (Tabla 4.) está se comparó contra un estándar comercial.

Se pesaron 5mg del extracto acuoso de la planta la cual se disolvió en Agua /Met./ACN (33.3 : 50 : 16.6) , ya disuelto se filtró la muestra con un filtro 187-1320 marca Syringe , (0.2  $\mu$ m; 13mm ) para poder eliminar las impurezas solubles en el metanol que pudieran dañar la columna. Ya filtrado se inyectaron 20 $\mu$ l de la muestra en solución, controlada por una bomba peristáltica cuaternaria. Se utilizó como control un estándar, ácido clorogénico disuelto en metanol (1mg/mL). El equipo de HPLC utilizado fue marca Agilent Technologies 1260 Infinity. Columna analítica (MACHEREY -NIGEL CC 2546, Nucleosil 100-5 C18).

Tiempo	A%	B%	C%
0	85	7	8
2	85	7	8
17	60	20	20
20	60	20	20
25	85	8	8

**Tabla 4.** Condiciones a las que se sometió el HPLC.

$\lambda$ = 218nm, 254nm, 320nm, 360 nm., a 35°C, a un flujo de 1.200 ml/min

A= Agua ácida (0.04M de H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub>)

B= Metanol

C= Acetonitrilo



Después de analizar tanto el estándar de ácido clorogénico (AC) como la muestra del extracto en la columna, se obtuvo un perfil cromatográfico de cada uno, los cuales fueron evaluados posteriormente, tomando en cuenta los tiempos de retención lo que permitió hacer la identificación de AC. Los cromatogramas del estándar y la muestra se obtuvieron exactamente bajo las mismas condiciones de temperatura, gradiente y flujo.

## 7. RESULTADOS

Del estudio realizado a una muestra de ratas inducidas con STZ-NA (n=11); se obtuvieron los siguientes resultados de glucemia a los tiempos de T0, T60, T120 y T180.

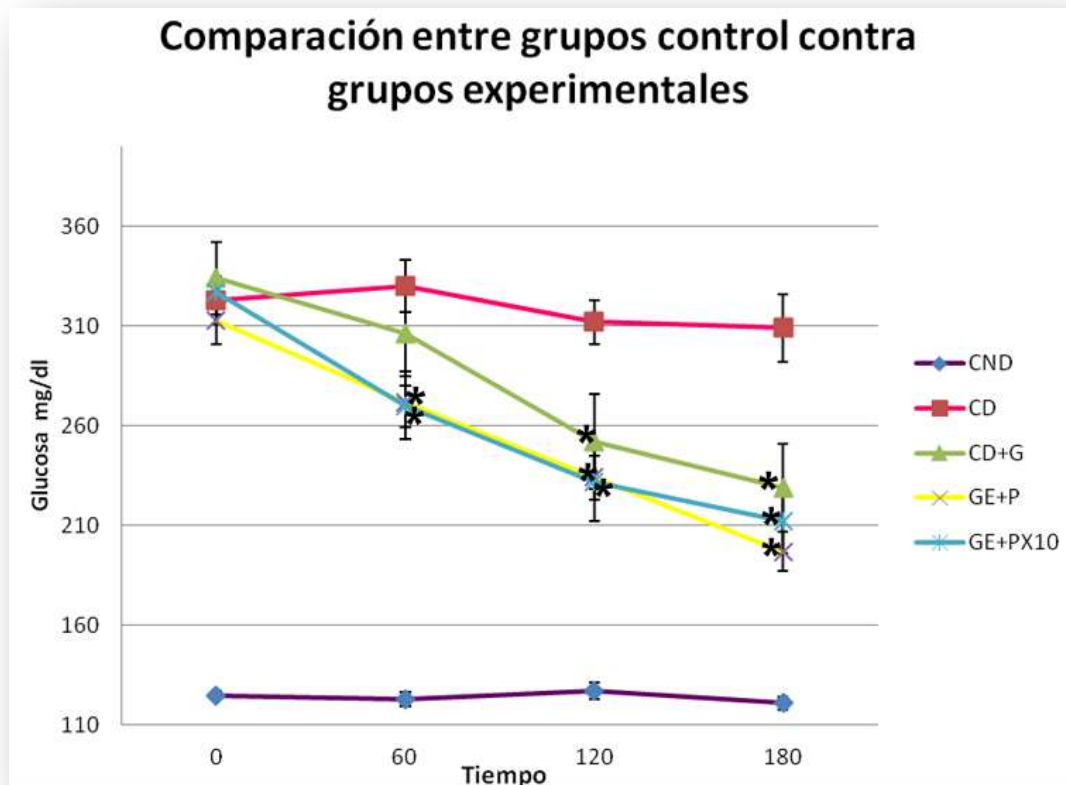
	0	60	120	180
CND	125 <sup>c</sup> ±2.1	123 <sup>c</sup> ±3.5	127 <sup>c</sup> ±4.3	121 <sup>c</sup> ±3.3
CD	323 <sup>c</sup> ±12.6	330 <sup>c</sup> ±13.2	312 <sup>c</sup> ±11	309 <sup>c</sup> ±17
CD+G	334 ±18.3	306 ±26.7	252 <sup>a b</sup> ±24.7	229 <sup>a b</sup> ±22.3
GE+P (Dosis tradicional)	313±12.4	272 <sup>a b</sup> ±13.2	234 <sup>a b</sup> ±11.7	197 <sup>a b</sup> ±10.9
GE+Px10 (Dosis tradicionalx10)	328 ±8.8	274 ±18.5 <sup>ab</sup>	233 ±20.4 <sup>ab</sup>	211 ±16.2 <sup>ab</sup>

**Tabla 5.** Valores medios de glucosa plasmática circulante transcurrido el tiempo en el estudio agudo. <sup>a</sup> Diferencia significativa contra el Tiempo cero (T0) p< 0.05 <sup>b</sup> Diferencia significativa contra



el Control Diabético (CD) y los grupos experimentales  $p < 0.05$  <sup>c</sup> Diferencia significativa entre el control Diabético (CD) y no diabético (CND)  $p < 0.05$ .

A continuación se presentan los gráficos del efecto hipoglucemiante después de administrar el extracto acuoso de *C. peltata*, durante el estudio agudo.



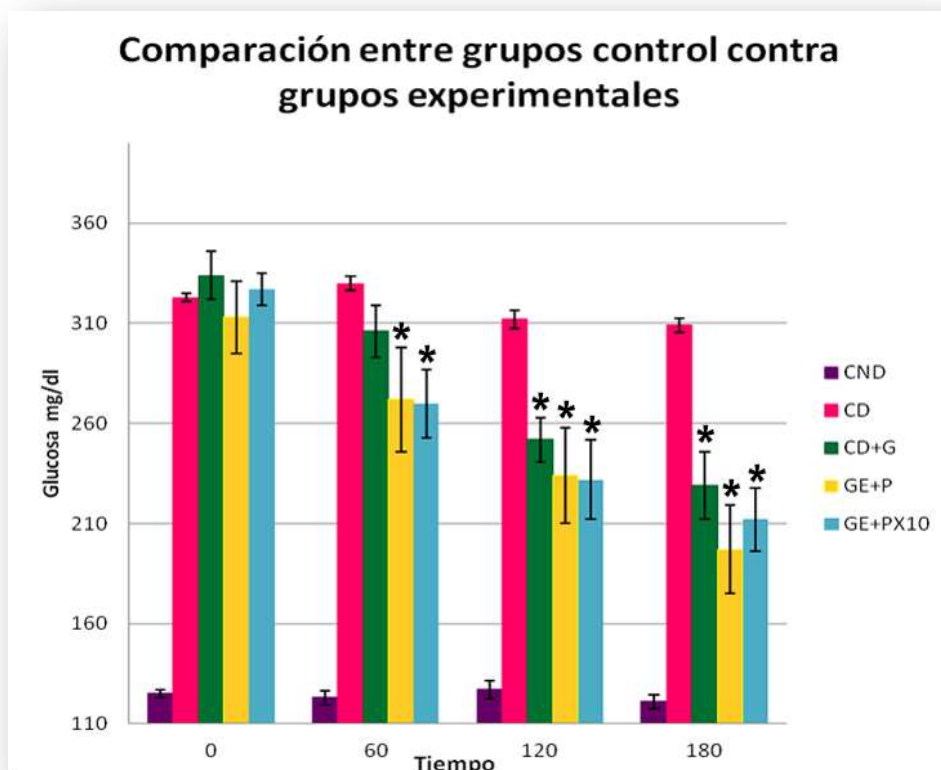
**Gráfica 1.** Efecto hipoglucemiante del extracto acuoso *C. peltata* en ratas Wistar adultas en estudio agudo durante 3 horas. \* Diferencias significativas contra el CD ( $p \leq 0.05$ ).

Al observar los resultados de la Tabla 5 y comparar el CD contra CND se encontró una significancia estadística ( $p \leq 0.05$ ) entre estos dos grupos control, lo



cual indica que el grupo de ratas STZ - NA inducido experimentalmente logró desarrollar un estado de hiperglucemia como parámetro de análisis para este estudio.

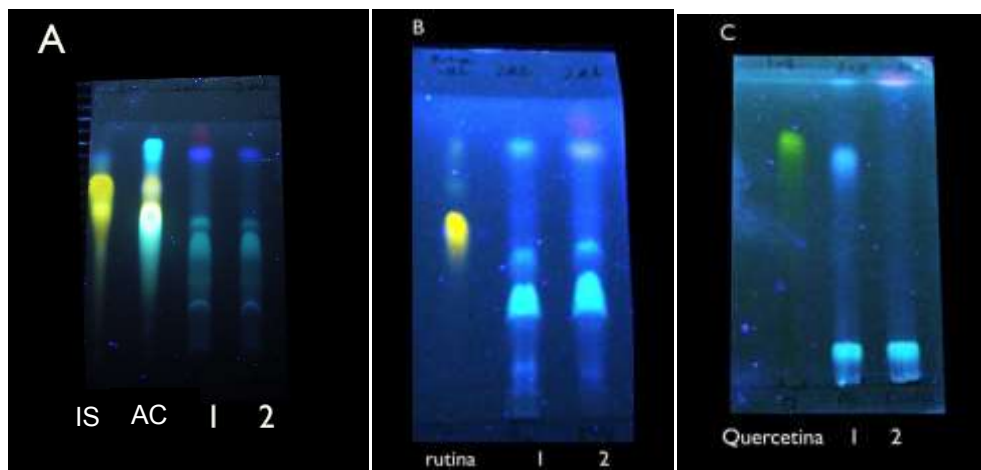
El grupo de ratas STZ – NA tratado con el fármaco de referencia (Glibenclamida), presentó un efecto hipoglucemiante en el tiempo 120 durante el estudio agudo, con una significancia estadística  $p \leq 0.05$  al comparar el CD+G contra el CD. Mientras que el grupo de ratas STZ-NA a las que se les administró el extracto acuoso de la corteza de *C. peltata*, empezaron a disminuir sus niveles de glucosa en sangre a partir del tiempo 60 y continuó disminuyendo hasta el tiempo 180 en el que concluía el estudio agudo, ya que las diferencias significativas aparecieron a partir del tiempo 60 al comparar el GE+P y GE+Px10 contra el CD. Al comparar cada uno de los grupos contra su tiempo 0, para poder evaluar el efecto de la planta. Se encontraron diferencias significativas en el tiempo 120 para el CD+G y en el tiempo 60 en el GE+P y GE+PX10, lo cual corrobora que el grupo de ratas STZ-NA inducidas con hiperglucemia sí presentan una disminución en sus niveles de glucosa en sangre tras ser administradas en forma oral con el extracto acuoso de la corteza de *C. peltata*.



**Gráfica 2.** Efecto hipoglucemiante del extracto acuoso *C. peltata* en ratas Wistar adultas en estudio agudo durante 3 horas. \* Diferencias significativas contra el CD ( $p \leq 0.05$ ).

<b>Extractos de Metabolitos secundarios <i>Cecropia peltata</i></b>				
	<b>Flavonoides agliconas</b>	<b>Flavonoides glicosilados</b>	<b>Terpenos</b>	<b>Alcaloides</b>
<b>Acuoso</b>	2	4	-	-
<b>Etanol-Agua</b>	1	5	-	-

**Tabla 6.** El número indica cuantos metabolitos fueron detectados, (-) indica Metabolito no detectado.



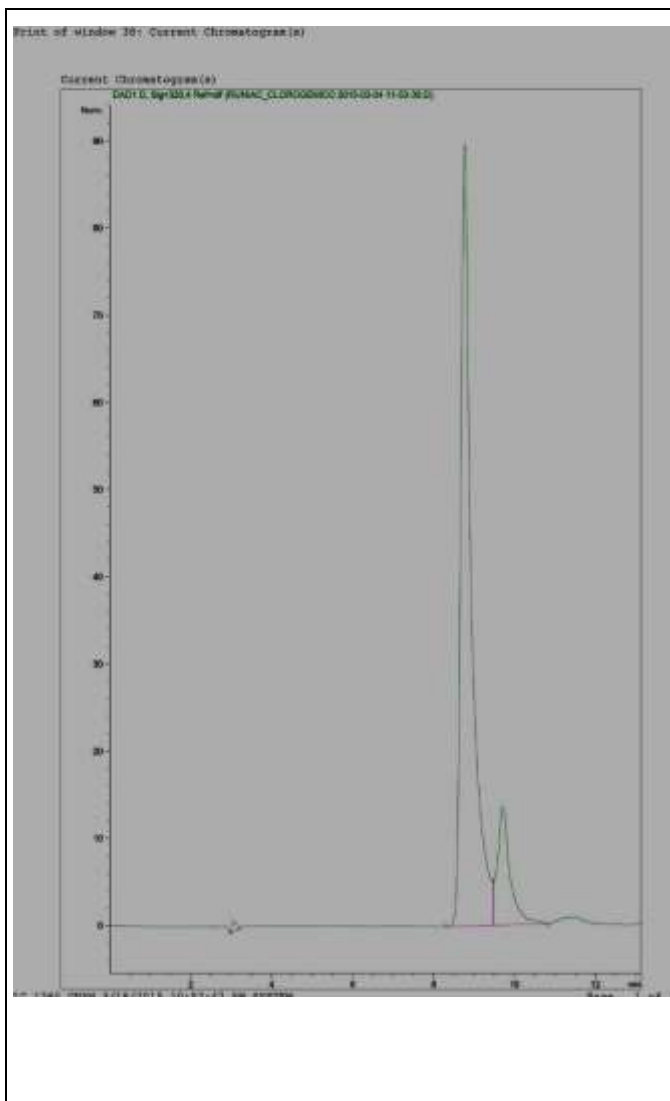
**Imagen 3.** Placa de TLC para detectar A y B) Flavonoides glicosilados , C) flavonoides agliconas.  
1. Extracto acuoso, 2. Extracto et-H<sub>2</sub>O. IS (isorientina), AC (ácido clorogénico).

Las pruebas de cromatografía TLC para los extractos acuosos y Et-H<sub>2</sub>O para detectar flavonoides agliconas dieron positivo, ante la presencia de 2 franjas para el extracto acuoso y 1 franja para el Et- Ag. Para la detección de flavonoides glicosilados se observaron 4 franjas en el extracto acuoso y 5 franjas en Et-H<sub>2</sub>O (Ver tabla 7; imagen 3). Las bandas expuestas ante UV-365nm se presentan con coloración de amarillo a verdes, indicativos de posibles flavonas, flavonoles y glicosilados de acuerdo a Wagner y Blandt 2001. La coloración azul con luz UV es un indicativo de compuestos hidroxilicos fenólicos como el ácido cafeico y el ácido clorogénico. El revelador usado en este trabajo el cuál es conocido como reactivo de Naturestoff, es selectivo para flavonoles como quercetina, kaemferol, miricetina y glucósidos. Al asperjar genera coloraciones entre naranja y amarillo relacionado con la presencia de dos grupos hidroxilo en el anillo, o amarillo y verde relacionado con la presencia de un grupo hidroxilo libre. Lo cual ha resultado similar en el presente estudio. (Wagner y Bladt 1996; Hierman y Bucar ,1994)

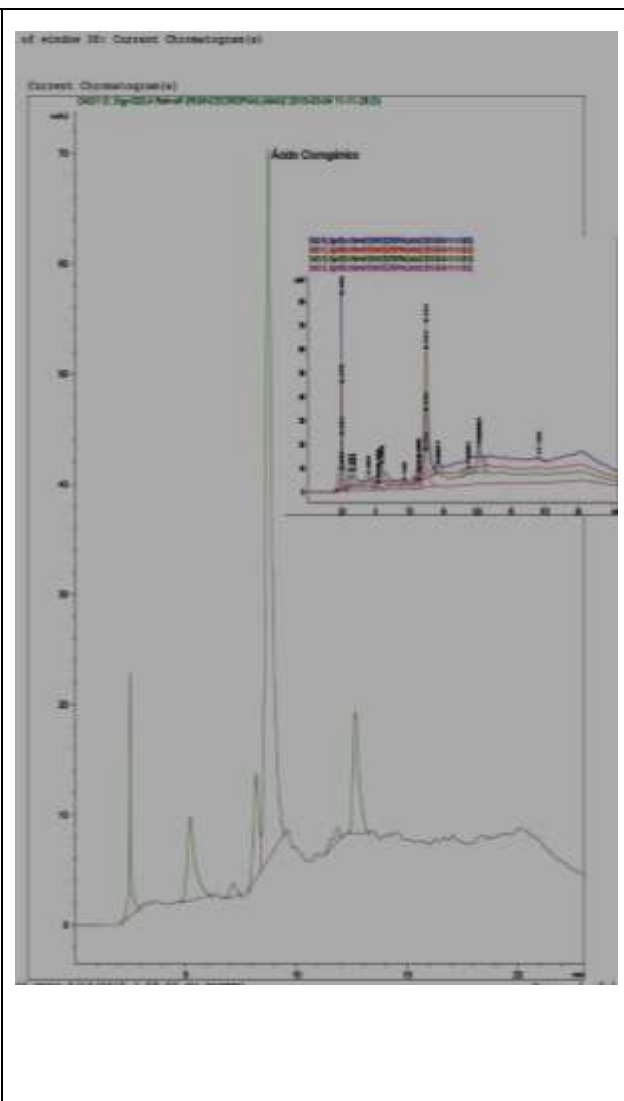


## HPLC

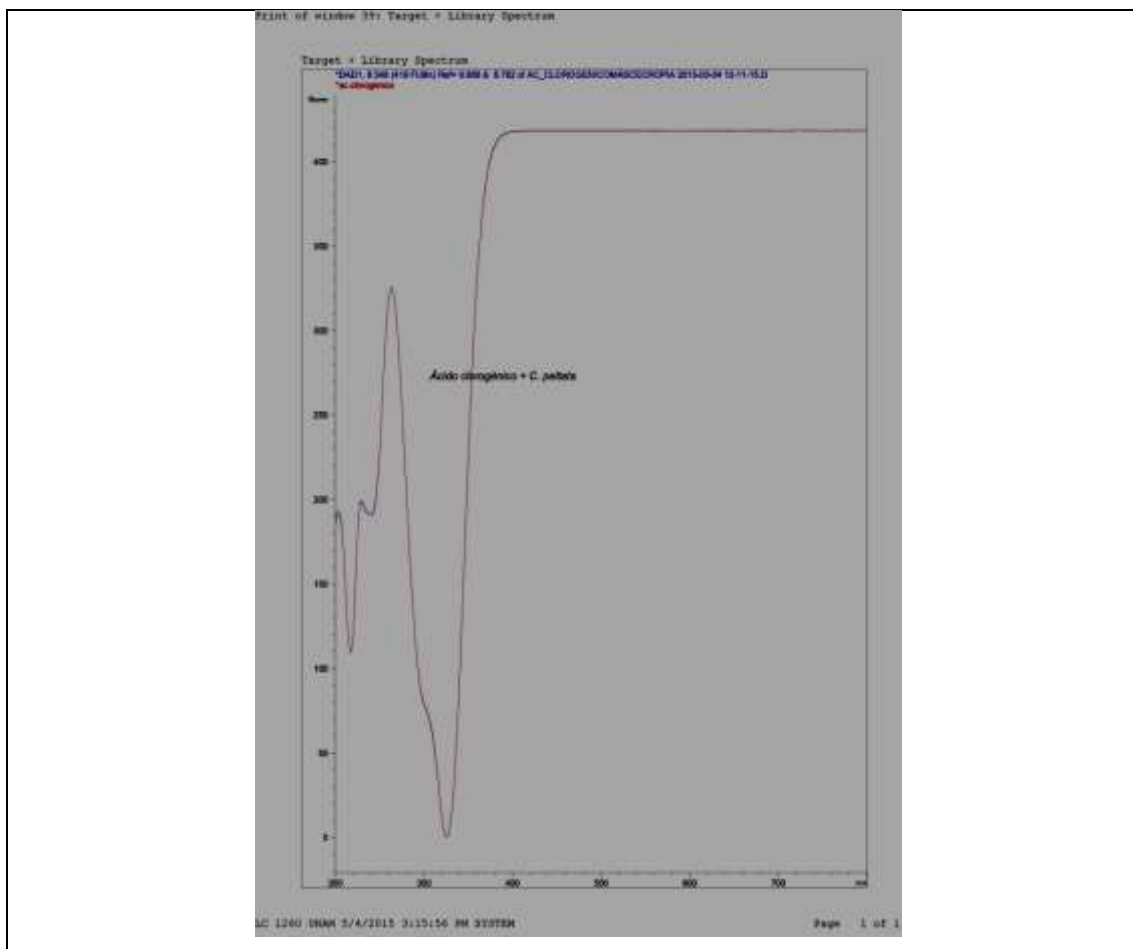
A



B



**Gráfica 3.** Cromatogramas del extracto acuoso de *C. peltata* .A) Muestra el cromatograma del estándar de ácido clorogénico resuelto en HPLC de fase reversa y B) Muestra el perfil cromatográfico del extracto acuoso de *C.peltata* resuelto en HPLC a una longitud de onda de 320nm. Tiempo de retención del AC 8.72 min.



**Gráfica 4.** Espectro de HPLC de *C. peltata* (línea azul) comparado con el espectro de Ácido clorogénico (línea roja). Se puede observar un alto porcentaje de similitud entre ambos espectros.

Porcentaje de similitud 99.5





## 8. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo contribuir al conocimiento sobre el posible efecto hipoglucemiante de los extractos de la corteza de *Cecropia peltata*, usada tradicionalmente por la comunidad maya de Chikindzonot Yucatán, y observar su acción hipoglucemiante en un modelo de ratas adultas inducidas experimentalmente con STZ y protegidas con NA para evaluar su estado de hiperglucemia.

La aplicación experimental con modelos inducidos químicamente para generar estados hiperglucémicos y otras fisiopatologías asociadas a la diabetes, es importante pues contribuye con el conocimiento y los posibles tratamientos terapéuticos a implementar para el control de la enfermedad. En el presente trabajo se evaluó un modelo de ratas adultas, que además llevan un químico de tipo citoprotector como la nicotidamina la cual actúa directamente en las células del páncreas. En un estudio previo con modelos inducidos con estreptozotocina (STZ) de 5 días de nacidos al cual se denomina modelo (n5), el valor medio de glucemia alcanzado después de la inducción es en razón de la mitad de hiperglucemia al obtenido en este modelo. Las ventajas sobre el modelo anterior, derivan en menos animales muertos durante la etapa de inducción con la STZ y se puede ver el efecto hipoglucemiante más tempranamente.

En cuanto a los resultados fitoquímicos que se presentan en este trabajo se pudo detectar la presencia de Ácido clorogénico como compuesto mayoritario con respecto de los otros en el perfil cromatográfico que se muestra en los resultados (gráfica 4), esta puede ser la razón, por la cual se observa una disminución en las concentraciones de glucosa en sangre, al administrarse el extracto de la planta a las ratas de forma oral. Nicasio P en 2005, reporta que el



efecto hipoglucemiante que se observa al administrar extractos tanto de *C. peltata* como de *C. obtusifolia* y este se encuentra relacionado con las concentraciones de AC presentes en estas plantas y que *C. peltata* presenta mayor concentración del AC, por lo cual el efecto hipoglucemiante resulta ser mayor comparado al de *C. obtusifolia*, claro está que esta variación de las concentraciones de AC puede deberse a efectos del ambiente en el que se desarrolla la planta, como el tipo de suelo, temperatura, altitud, humedad, también puede influir la forma en que se colectó. Por lo cual las concentraciones de ciertos compuestos en las plantas pueden variar y por ende su efecto farmacológico. La presencia de AC e isoorientina, son dos compuestos que se encuentran presentes en el extracto de la hoja, y ya habían sido determinados en un estudio previo con el modelo de ratas wistar n5-STZ por Andrade Cetto 2007 como los posibles compuestos responsables del efecto farmacológico de *C. obtusifolia* y *C. peltata*.

En las pruebas de TLC realizadas, se obtuvieron resultados positivos para flavonoides de tipo agliconas y glicosilados, y resultado negativo para alcaloides y terpenos. Se ha comprobado que la actividad hipoglucemiante también puede deberse a derivados de flavonoides por ejemplo la quercetina y la isoorientina. Los flavonoides pueden estar favoreciendo la presencia del inhibidor dipeptidil peptidasa IV (DPP IV), esta hormona juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa (Gordillo C *et al.*, 2012), de igual modo la rutina es un tipo de flavonoide que presenta actividad hipoglucemiante.

Como se observa tanto el ácido clorogénico como otros compuestos flavonoides encontrados en las placas pueden ser responsables del efecto, ya que se han reportado mecanismos que responsabilizan a los flavonoides de producir un efecto hipoglucémico, tanto para el ácido clorogénico como para muchos otros tipos de flavonoides por lo tanto no solo el ácido clorogénico puede estar



relacionado con el efecto, también pueden estar participando los otros compuestos e incluso puede ser el conjunto de todos.

La identificación del AC en *C. peltata* se realizó mediante la comparación con los tiempos de retención del estándar (extracto puro de AC) y la muestra analizada (Extracto acuoso de *C.peltata*). En el minuto 8.72 se detectó el pico del estándar, el cual coincide con un tiempo de retención detectado en el perfil cromatográfico de *C. peltata*, de igual modo se logró encontrar un porcentaje de similitud de 99.5 entre los espectros de UV comparados (ver gráfica 4) .Cabe mencionar que los resultados que aquí se muestran son confiables ya que las técnicas utilizadas para ese análisis son de alta sensibilidad, sin embargo este es sólo un estudio preliminar de tipo cualitativo y para tener una mayor información sobre la fitoquímica de la planta se deben realizar estudios cuantitativos que complementen la información de la planta.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran que sí existe un efecto del extracto de la corteza de la planta de *Cecropia*, corroborando que también puede presentar los compuestos mencionados a lo largo de todas sus estructuras. Cabe resaltar el efecto que se tiene con los extractos de *C. peltata*, tanto de la hoja (Andrade Cetto 2007) como los obtenidos en este diseño experimental con la corteza, al presentar mayor efecto hipoglucemiante que el fármaco de referencia glibenclamida en función del tiempo de administración. Esto puede ser atribuido al mecanismo de acción que posiblemente ejercen los metabolitos presentes en el género *Cecropia*, al disminuir la producción de glucosa hepática, debido a la inhibición de la glucosa 6 fosfatasa y que específicamente puede estar asociado con el ácido clorogénico que puede orientar simultáneamente la gluconeogénesis y la glucogenólisis. (Andrade Cetto 2002). Por otro lado, la glibenclamida es un secretagogo de insulina por lo cual su mecanismo de acción es diferente y a esto puede deberse las diferencias que



existen en cuanto al efecto farmacológico de la Glibenclamida y el extracto de la corteza de *Cecropia peltata*.

Este resultado demuestra que la especie *C. peltata* podría ser considerada para realizar estudios dirigidos que contribuyan a entender el mecanismo de acción de la planta con potencial hipoglucemiante, y someterla a estudios clínicos, al igual que *C. obtusifolia*. Para asegurar el efecto, los procesos de secado, extracción y preparación de la parte vegetal deben seguir un proceso que permita asegurar la oportunidad de una mayor concentración del AC así como otros compuestos que puedan estar relacionados con el efecto terapéutico de *Cecropia* y con ello establecer el mínimo de acción sobre el efecto terapéutico esperado. El tratamiento de la DM2 es apoyado por medio de la medicina tradicional y específicamente a través de la fitoterapia empírica que poco a poco ha tomado bases científicas más sólidas en el nuevo milenio (Juárez Castro 2014).

Finalmente, en cuanto a rescatar la información etnobotánica de la comunidad maya de Chikindzonot Yucatán, en este trabajo se ha contribuido en gran medida a la validación de los usos tradicionales que se le dan a *C. peltata* y queda como respaldo para que se sigan haciendo estudios de este tipo, en el cual las comunidades juegan un papel importante y lo seguirán haciendo, ya que el uso tradicional de plantas son una parte muy importante de nuestro país y un legado cultural el cual puede usarse para el desarrollo de muchos estudios enfocados a la ciencia.



## 9. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se confirma la hipótesis alternativa y se concluye que:

- El extracto acuoso de la corteza de *C.peltata*, presenta un efecto hipoglucemiante al administrarse de manera oral a ratas tratadas con STZ-NA a una dosis tradicional y a una dosis tradicional aumentada 10 veces (X10) a partir de los primeros 60 minutos.
- Los metabolitos secundarios presentes en la corteza de la planta pertenecen a los flavonoides de tipo agliconas y glicosilados los cuales pueden ser responsables del efecto hipoglucemiante en la planta.
- La identificación del ácido clorogénico permite confirmar su presencia no sólo en la hoja sino también en la corteza de la planta.
- Esto nos ayuda a entender porque los pobladores de ciertas comunidades también recurren a otras partes botánicas para el tratamiento de la diabetes.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. ADA (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus
2. Alonso-Cáastro, A, Zapata- Bustos, R, Romo-Yañez, J. *et al.* (2010). The antidiabetic plants *Tecoma Stans (L) ex Kunth (Bignoniaceae)* and *Tecium cúbense Jacq (Lamiaceae)* induce the incorporation of glucose in insulin-sensitive and insulin resistant murine and human adipocytes. *J.Ethnopharmacology*; 127 (1): 1-6
3. Alsahli Mazen y Gerich John, E (2012). Pathogenesis of Type Diabetes 2; J.S Skyler (ed.), Atlas of Diabetes: Fourth edition, DOI 10.1007/978-1-4614-1028-7\_7.
4. Andrade-Cetto, A. Cárdenas Vázquez, R (2010). Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *Journal of ethnopharmacology*. 130(1):93-97.
5. Andrade- Cetto, A. Cárdenas R & Reyes Ramirez, B (2007). Hipoglucemic effect of *Cecropia peltata* L, on N5-STZ type 2 diabetic rats *Pharmacologyonline* 3: 203-210
6. Andrade-Cetto A, Heinrich M (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes *Journal of Ethnopharmacology* 99 325–348



7. Andrade-Cetto, A, Wiedenfield, H (2001). Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 78(2-3):145-149.
8. Arechavaleta Granelle, R (2006). El efecto fisiológico de la hormonas incretinas, *Diabetes* 2003;26:2929-2940
9. Argueta, A *et al.* (1994). Atlas de las Plantas de Medicina Tradicional Mexicana. México: Instituto Nacional Indigenista.
10. Arias-Díaz, J, y Balibrea, J (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo dos. *Nutrición Hospitalaria. Nutr Hosp.* 22(2):160-68
11. Ávalos García, A. Pérez-Urria Carril, E (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Serie fisiológica vegetal*, Madrid 2 (3): 119-145
12. Becerra Jimenez, J; Martinez Zurita, E; Ortega Larrocea, P. *et al.* (2006). Disease-Consensus Index as a tool of selecting potencial hypoglycemic plants in Chikindzonot, Yucatán, México. *Journal of Ethnopharmacology.* 107:199-204.
13. Castrejón, V, Carbó, R y Martínez, M (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el metabolismo de la glucosa, México D.F. 26(2):49-57
14. Cañadell, J.M (1960). Valoración clínica de tres nuevos antidiabéticos (metahexamida clorpropamida y fenformina). Del Departamento de Endocrinología y Nutrición de la Clínica Médica B. *Anales de medicina y cirugía.* 40 (158):85-92



15. Conget, I (2002). Diagnóstico, clasificación, y patogenia de la diabetes mellitus, *Rev Esp Cardiol* ;55(5):528-35
16. Curtis, L. (2012) Examining the Mechanisms of Glucose Regulation, *The American Journal for managed care*. 18:4-10
17. Centro de Información de las Naciones Unidas (CINU) (2013). [www.cinu.mx](http://www.cinu.mx)  
In [<http://www.cinu.mx/noticias/mundial/dia-mundial-de-la-diabetes-onu-1/>]  
Consultado el 12 de Febrero de 2015.
18. Chavez Ospina, J (2010). Fraccionamiento bioguiado anticonvulsivante del extracto etanólico de las hojas de *Cecropia peltata* (Yarumo) Tesis de maestría *Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Bogotá*.
19. Cheng, A. y Fantus, G (2005). Oral Antihyperglycemic therapy for type2 diabetes Mellitus; *Canadian Medical Associationor licensors*; 172(2): 2013-226
20. Eddouks, M, Chattopadhyay, D, y Zeggwagh, N.A (2012). Animal Models as Tools to Investigate Antidiabetic and Anti-Inflammatory Plants, doi:10.1155/2012/142087
21. El-Abhar H.S y Schaalán M.F (2014). Fytoterapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. *World Journal on Diabetes*. doi:10.4239/wjd.v5.i2.176
22. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) (2012). [www.fmdiabetes.org](http://www.fmdiabetes.org) Consultado el 17 de enero de 2015





23. [ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/DiabetesMellitus.pdf](http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/DiabetesMellitus.pdf). Consultado 17 de enero de 2015
24. Franco-Rosselli, P (1997). Distribution patterns of *Cecropia* (*Cecropiaceae*): a panbiogeographic analysis. *Caldasia*. 19 (1-2):285 - 296.
25. Fuentes Arderiu, X. Castiñeiras Lacambra, M.J. Queraltó Compañó, L.M. (1998). *Bioquímica Clínica y Patología molecular*. Barcelona: Edit. Reverte.
26. Geison, M. Costa, Eloir P. Schenkel y Flávio, H. Reginatto (2011). Chemical and Pharmacological Aspects of the Genus *Cecropia*. *Nad Prod Commun* ;6(6):913-20.
27. Giner Larza, E. y García Castillo, E (2003). Fitoterapia y diabetes. *Revista de fitoterapia*, España. 3 (2):113,122
28. Glamoklija, Una, Adlija Jevric (2010). Genetic polymorphisms in diabetes: Influence on therapy with oral antidiabetics. Universidad de Sarajevo. *Acta Pharm.* 60 (2010) 387–406
29. Gordillo C., Luisa P, Zuñiga H, et al. (2012). Efecto Hipoglucemiante del extracto acuoso de las hojas de *Samallanthus sanchifolius* (YACÓN) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos 15 (1): 42-47
30. Guías ALAD (2006) de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Grupo de trabajo ALAD. *Rev Latinoam Diabetes* 14(3):31
31. Hemmerle, H., Hans-Joerg, B, Below, P. et al. (1997). Chlorogenic Acid and Synthetic Chlorogenic Acid Derivatives: Novel Inhibitors of Hepatic Glucose-6-phosphate Translocase., *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(2)



32. Hernández de Río, M ;Espín Pizarro, A; Hernandez Saucedo, Y. *et al.* (2014). Actividad antipirética de un extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. en ratas de la línea Wistar como modelo experimental *Acta Médica del Centro* 8 (3)
33. Hernandez Medina, A.M (2012). Estudio del efecto hipoglucemiante de *Bromelia plumieri* (E.Morr.) L.B.Smi en ratas tratadas con NA-STZ. (Tesis de grado) México D.F. Facultad de Ciencias UNAM.
34. Hiermann, A.; Bucar, F (1994). Diphenyltin dichloride as a chromogenic reagent for the detection of flavonoids on thin layer plates. *Journal of Chromatography* 675: 276-281
35. Holmstedt, B.O. y Bruhn, J.G (1983). Ethnopharmacology a challenge. *Journal of Ethnopharmacology*. 8: 251-256.
36. <http://biogeodb.stri.si.edu/> Recuperada el 15 de marzo de 2015.
37. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (2012). [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx) consultado el 17 de enero de 2015
38. Instituto de Ciencias Naturales [www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/](http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/) consultado el 5 de febrero de 2015
39. International Diabetes Federation (IDF). Atlas de Diabetes (2013). <http://fmdiabetes.org/fmd/pag/estadisticas.php> Consultado 22 de Enero del 2015



40. Juárez Castro, C.J., Villa Ruano, N., García Ramírez, S.A. *et al.* (2014). Uso medicinal de planas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño, *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1):101-120
41. Linares, Édgar, Moreno-Mosquera, E (2010). Morfología de los Frutiolos de *Cecropia* (Cecropiaceae) del Pacífico Colombiano y su valor taxonómico en el estudio de dietas de murciélagos, *Caldasia* 32:275-287
42. Lozoya-Meckes. Mellado-Campos, V (1985). Is the *Tecoma Stans* infusión an antidiabetic remedy? *J Ethnopharmacology* 14 (1): 1-9.
43. Masiello, P. Broca, C. Gross, R. Roye, M, *et al.* (1998). Experimental NIDDM. Development of a new model in adult. *Health & Medical Complete* 47(2):224
44. Marcano, D y Hasegawa, M (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Venezuela. Edit Torino.
45. Mercurio, V. Carlomagno, G. Fazio, V *et al.* (2012). Insulin resistace: Is it time for primary prevention?, *World Journal of Cardiology* 4(1):1-7
46. Mohamed Eddouks, Debprasad Chattopadhyay, and Naoufel Ali Zeggwagh. (2012). "Animal Models as Tools to Investigate Antidiabetic and Anti-Inflammatory Plants," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, doi:10.1155/2012/142087



47. Nigenda, G. Mora-Flores, G. López Aldama, S *et al.* (2001). La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia *Salud Pública México* 43 (1):41-51
48. Nicasio, P. Santamaría-Aguilar, L. Aranda, E, *et al.* (2005). Hypoglycemic Effect and Chlorogenic Acid Content in Two *Cecropia* species, *Phytotherapy Research*, 19:661-664.
49. Ocegueda, S.E. Morenoy, P. Koleff (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica .CONABIO. *Biodiversitas* 62:12-15
50. Peris, JB. Stubing, G. Vanaclocha, B. (1995). Fitoterapia aplicada. M.I.C.O.F. Valencia: Valencia. Citado de Giner E. y García E. 2003
51. Rodríguez de Sotillo D.V. Hadley, M (2002). Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats, *J Nutr Biochem* 13 (12):717-726
52. Sánchez Rivero, G. (2007). Historia de la Diabetes, *Gaceta Médica Boliviana* 30(2):74-78.
53. Schultes, R.E y Swain, T (1976). The Plant Kingdom: a virgin field for new biodynamic constituents. In: (Ed.) *The Recent Chemistry of Natural Products including Tobacco Philip Morris Science Symposium*, New York, 133-171.



54. Sepúlveda Jiménez, G. Porta Ducoing, H. Rocha Sosa, M (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas, *Revista Mexicana de Fisiopatología*, 21(3)
55. Standards of Medical Care in Diabetes (2012). *Diabetes Care*. 35 (1).
56. Systems. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Apartado 7495
57. Szkudelski Tomasz (2012). Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med* 237 (5):481-490
58. Varas Pacheco, D (2004). Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con HPLC Técnica,(Tesis de grado).Universidad Austral de Chile
59. Vasudevan, DM, Sreekumari, Kannan Vaidyanathan (2011), Texto de Bioquímica. Sexta edición, Edit. Jaypee Highlights Medical Publishers.
60. Wagner, H y Blandt, S (1996). *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag. Berlin, Germany p.384
61. Wagner, H y Blandt, S (2001). Los fármacos que contienen glucósidos terpénicos de sabor dulce. pp. 329-334. Es: Wagner, H .;Blandt, S. (Eds.). *Análisis de drogas de la planta, un atlas de cromatografía en capa fina*. Springer. Edición Segunda. Munchen .Alemania.



62. Wiley, J (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, USA, editado por Yuri Kazakevich y Rosario Lobrutto DOI: 10.1002 / 0470.087951
63. [www.acguanacaste.ac.cr/bosque\\_seco\\_virtual](http://www.acguanacaste.ac.cr/bosque_seco_virtual). Recuperada el 15 de marzo de 2015
64. [http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/principios\\_de\\_cromatografia.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf)
65. [www.fmdiabetes.org/fmd/pag/diabetes\\_numeros.php](http://www.fmdiabetes.org/fmd/pag/diabetes_numeros.php)
66. [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)
67. [www.iqb.es](http://www.iqb.es)
68. [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)